



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

**OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRUDIRANJA SPELTE ZA
KREIRANJE FUNKCIONALNIH PROIZVODA SA DODATKOM
BETAINA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof. dr Eva Lončar

Kandidat:

Jovana Kojić

Novi Sad, 2018.

Zahvalnica

**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: VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Jovana Kojić, dipl. inženjer tehnologije- master
Mentor: MN	Prof. dr Eva Lončar, redovni profesor
Naslov rada: NR	Optimizacija procesa ekstrudiranja spelte za kreiranje funkcionalnih proizvoda sa dodatkom betaina
Jezik publikacije: JP	srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	srpski / engeski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2018
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija

Fizički opis rada: FO	6 poglavlja, 137 stranica, 55 slika, 33 tabele, 248 literaturnih navoda
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Prehrambeno inženjerstvo
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	spelta, betain, ekstrudiranje, funkcionalni flips proizvod, HPLC
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bul. cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
Važna napomena: VN	Istraživanja u ovoj tezi finansirana su od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije u okviru projekta III46005
Izvod: IZ	<p>Betain je bioaktivno jedinjenje, koje ima značajne fiziološke funkcije u čovekovom organizmu kao osmolit i donor metil grupa za mnoge biohemijske procese. Endogena sinteza betaina je uglavnom nedovoljna da zadovolji potrebe organizma te je zbog toga neophodan njegov unos preko hrane. Žitarice predstavljaju glavni izvor betaina u ljudskoj ishrani. Jedan od načina da se poveća unos betaina u ljudskoj ishrani je preko funkcionalne hrane obogaćene betainom. Prema regulativi evropskog udruženja cerealija za doručak (European Breakfast Cereal Association) iz 2012. god. (Commission Regulation (EU) No 432/2012) dozvoljeno je deklarisanje zdravstvene izjave za prehrambene proizvode koji sadrže najmanje 500 mg betaina po porciji (40g flips proizvoda) uz navođenje napomene da se zdravstveni efekti mogu očekivati ukoliko se dnevno unese 1500 mg betaina. Zdravstvena izjava glasi: „betain doprinosi normalnom metabolizmu homocisteina“. Povećano interesovanje za zdravu ishranu dovelo je do veće potražnje za alternativnim žitaricama, gde spelta zbog svojih bioloških, agronomskih, prehrambenih i medicinskih karakteristika kao i bogatih nutritivnih svojstava, zauzima značajno mesto. Glavni cilj ove teze je bila optimizacija ekstrudiranja i proizvodnje funkcionalnog flips proizvoda od speltinog integralnog brašna sa dodatkom betaina na dvopužnom ekstruderu. Prvi put je u procesu prehrambenog ekstrudiranja primenjena analiza višeciljne optimizacije u kombinaciji sa neuronskim mrežama i genetskim algoritmom kako bi se dobio</p>

maksimalan sadržaj betaina u flips proizvodu pri minimalnoj potrošnji specifične mehaničke energije. Definisan je nov funkcionalni proizvod sa betainom koji bi potencijalno proširio asortiman flips proizvoda na tržištu i utvrđene su njegove fizičke, funkcionalne, teksturalne, reološke i senzorske osobine. Sadržaj betaina i potrošnja specifične mehaničke energije su ključni izlazi koji predstavljaju konkurentne ciljeve u procesu ekstrudiranja. Za proizvodnju flips proizvoda poboljšanog nutritivnog kvaliteta i funkcionalnog profila koji sadrži od 1601,6 do 1764,7 mg betaina u 40 g (čime se i zadovoljava preporučeni dnevni unos betaina) i kome odgovara potrošnja specifične mehaničke energije od 97,4 do 114,1 Wh/kg optimalni su sledeći procesni parametri: protok materijala od 20,45 do 24,04 kg/h, vlaga materijala od 18,6 do 19,44 % i brzina obrtanja pužnice od 250 obrtaja u minuti. Da bi se dobili pouzdani rezultati za sadržaj betaina u spelti i flips proizvodima razvijena je, optimizovana i validovana metoda tečne hromatografije visokih performansi. Metoda je uspešno primenjena i u analizi betaina u žitaricama, pseudožitaricama i njihovim proizvodima.

Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	22.6.2017.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: KO	<p>dr Zita Šereš, vanredni profesor, Tehnološki fakultet, Novi Sad, predsednik</p> <p>dr Eva Lončar, redovni profesor, Tehnološki fakultet, Novi Sad, mentor</p> <p>dr Nebojša Ilić, viši naučni saradnik, Naučni institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad, član</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TEHNOLOGY**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Jovana Kojić, MSc
Mentor: MN	PhD Eva Lončar, full professor
Title: TI	Optimization of the extrusion process in creation of snack products from spelt wholegrain flour with added betaine
Language of text: LT	Serbian, latin
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2018
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia
Physical description: PD	6 chapters, 137 pages, 55 figures, 33 tables, 248 references
Scientific field: SF	Technology engineering

Scientific discipline: SD	Food engineering
Subject, Key words: SKW	spelt, betaine, extrusion, HPLC, functional snack product
UDC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology, Novi Sad, Bul. cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia
Note: N	Research in this thesis was financed by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia within the project III46005
<p>Abstract: AB</p> <p>Betaine is a bioactive compound that has significant physiological functions in the human organism as an osmolite and methyl group donor for many biochemical processes. The endogenous synthesis of betaine is generally insufficient to satisfy the requirements of the organism, therefore its intake is necessary through the food. Cereals are the main sources of betaine in human nutrition. One of the ways to increase betaine intake in human nutrition is through betaine enriched functional foods. In the 2012 European Union Regulation (Commission Regulation (EU) No 432/2012), it is permissible to declare a health statement for foods containing at least 500 mg betaine per portion (40g of extruded product), stating that the health effects can be expected if 1500 mg of betaine are consumed on a daily basis. The health statement states: "Betaine contributes to the normal metabolism of homocysteine." Increased interest in healthy food has led to the higher demand for alternative cereals, where spelt takes a significant place due to its biological, agronomic, nutritional and medical characteristics, as well as its rich nutritional properties. The main goal of this work was the optimization of extrusion and production of the functional snack product from spelt wholegrain flour with the addition of betaine which is performed on twin-screw extruder. According to our best knowledge, there was no investigation in which the multi-objective optimization (MOO) analysis coupled with artificial neural network and genetic algorithm was applied to the extrusion cooking process in order to achieve simultaneously maximum betaine content and minimum energy consumption in the snack spelt product. A new functional snack product that can potentially expand the range of snack products and its physical, functional, textural, sensory and rheological properties were defined. The betaine content and specific mechanic energy are the key outputs that represent competing objectives in the extrusion proces. To produce snack product with improved nutritive quality and functional profile which contains betaine content from 1601,6 to 1764,7 mg/40g, which would contribute to the recommended daily intake of betaine, correspond to specific mechanical energy from 97,4 to 114,1 Wh/kg, following optimal parameters were obtained: feed rate from 20,45 to 24,04 kg/h, moisture content from 18,6 to 19,44</p>	

<p>% and screw speed at 250 rpm. Also, optimization, development and validation of the high pressure liquid chromatographic method for measuring betaine content in spelt and snack products was also designed and applied.</p>	
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>22.6.2017.</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>dr Zita Šereš, Associate professor, Faculty of Technology, Novi Sad, chairman</p> <p>dr Eva Lončar, Full professor, Faculty of Technology, Novi Sad, menthor</p> <p>dr Nebojša Ilić, Senior research associate, Scientific Institute of Food Technology, Novi Sad, member</p>

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DEO.....	3
2.1. Spelta: agronomski i tehnološki kvalitet - sirovina za proizvodnju nutritivno i funkcionalno obogaćenih flips proizvoda.....	3
2.2. Funkcionalna hrana i funkcionalni sastojci.....	6
2.3. Betain kao funkcionalni sastojak.....	8
2.3.1. Izvori betaina.....	9
2.3.2. Glavne funkcije betaina.....	13
2.3.3. Medicinska svojstva betaina.....	16
2.3.4. Uloga betaina u prevenciji bolesti.....	19
2.3.5. Stabilnost betaina u proizvodima na bazi žitarica.....	20
2.3.6. Određivanje betaina u različitim matriksima hrane tečnom hromatografijom.....	21
2.4. Ugradnja funkcionalnih komponenata u proizvod.....	24
2.4.1. Ekstrudiranje.....	24
2.4.2. Zone prerade u cevi ekstrudera.....	26
2.4.3. Uticaji pojedinih parametara na efikasnost ekstrudiranja.....	28
2.4.4. Klasifikacija ekstrudera sa dvojnim pužem.....	29
2.4.5. Prednosti ekstrudera sa dvojnim pužem.....	30
2.5. Ekstrudiranje flips proizvoda.....	31
2.5.1. Uticaj ekstrudiranja na skrob.....	32
2.6. Optimizacija procesa ekstrudiranja.....	36
2.6.1. Model odzivne površine.....	36
2.6.2. Linearni multivarijabilni <i>PCA</i> modeli.....	37
2.6.3. Neuronska mreža.....	38
2.6.4. Višeciljna optimizacija.....	41
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	43
3.1. Materijal.....	43
3.1.1. Sirovine.....	43
3.1.2. Hemikalije i reagensi.....	43
3.2. Određivanje hemijskog sastava speltinog integralnog brašna.....	44
3.3. Proizvodnja flips proizvoda ekstrudiranjem.....	44
3.4. Određivanje sadržaja betaina u uzorcima žitarica, pseudožitarica i njihovim proizvodima.....	45
3.4.1. Ekstrakcija betaina iz uzoraka.....	45
3.4.2. Kvantifikacija betaina metodom tečne hromatografije visokih performansi.....	46
3.5. Određivanje fizičkih karakteristika ekstrudata.....	47

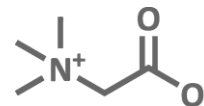
3.5.1. Nasipna masa flips proizvoda.....	47
3.5.2. Stepen ekspanzije flips proizvoda	47
3.6. Instrumentalno određivanje teksturnih svojstava flips proizvoda.....	47
3.7. Instrumentalno određivanje boje flips proizvoda.....	48
3.8. Određivanje indeksa apsorpcije vode i indeksa rastvorljivosti u vodi.....	49
3.9. Određivanje udela rezistentnog skroba	50
3.10. Određivanje udela oštećenog skroba.....	52
3.11. Određivanje reoloških svojstava flips proizvoda	53
3.12. Senzorska ocena flips proizvoda pomoću panela treniranih ocenjivača.....	54
4. REZULTATI I DISKUSIJA	56
4.1. Optimizacija ekstrudiranja spelte sa dodatim betainom.....	56
4.1.1. Uticaj ekstrudiranja na sadržaj betaina u flips proizvodu i potrošnju specifične mehaničke energije	56
4.1.2. Analiza varijanse i SOP model.....	58
4.1.3. Veštačka neuronska mreža	59
4.1.5. Višeciljna optimizacija	63
4.2. Uticaj parametara ekstrudiranja spelte na izlazne parametre	66
4.2.1. Stepen ekspanzije ekstrudata	66
4.2.2. Nasipna masa ekstrudata	70
4.2.3. Sadržaj rezistentnog skroba.....	74
4.2.4. Indeks apsorpcije vode i indeks rastvorljivosti u vodi	77
4.2.5. Stepen oštećenosti skroba.....	82
4.2.6. Tvrdoća ekstrudata	85
4.2.7. Boja ekstrudata	89
4.2.8. Karakteristike pastiranja ekstrudata	96
4.3. Razvoj <i>HPLC-ELSD</i> metode za određivanje betaina u žitaricama, pseudožitaricama, flips proizvodima i drugim proizvodima na bazi žita	100
4.3.1. Optimizacija ekstrakcije betaina iz uzoraka	100
4.3.2. Optimizacija vremena ekstrakcije betaina.....	102
4.3.3. Optimizacija metode <i>HPLC-ELSD</i>	103
4.3.4. Validacija <i>HPLC-ELSD</i> metode.....	107
4.3.5. Analiza betaina u uzorcima žitarica, pseudožitarica i njihovim proizvodima.....	110
5. ZAKLJUČCI.....	114
CONCLUSIONS	118
6. LITERATURA	122

Lista skraćénica

- a^* - udeo crvene/zelene boje, (gde $a^* > 0$ označava crvenu i $a^* < 0$, označava zelenu boju),
- ACN - acetonitril,
- AMG - amiloglukozidaza,
- ANN – (eng. Artificial Neural Network), neuronska mreža,
- ANOVA - analiza varijanse,
- APP - algoritam povratnog prostiranja,
- B - betain,
- b^* - je udeo žute/plave boje, (gde $b^* > 0$ označava žutu i $b^* < 0$ označava plavu boju),
- BBD - Box-Behnken dizajn,
- BHMT - betain- homocistein-metil transferaza,
- CCD - centralni kompozitni plan,
- CH₃-THF - metilen-tetrahidrofolat,
- CV - (eng. coefficient of variations), koeficijent varijacije,
- df – (eng. degrees of freedom), stepen slobode,
- ELSD detector - Evaporative light scattering detector,
- F - Fisher test,
- FOSHU – (eng. Foods for Specific Health Use),
- GC-MS - gasna hromatografija-masena spektrometrija ,
- GRAS - (eng. Generally Recognized As Safe), generalno priznat kao bezbedan,
- GSH – glutation,
- HILIC - (eng. Hydrophilic Interaction Chromatography), tečna hromatografija hidrofilnih interakcija,
- HPLC – (eng. high performance liquid chromatograph) - tečna hromatografija visokih performansi,
- Kurt. - (eng. Kurtosis), predstavlja odstupanje rezidualnih vrednosti od "nazubljenosti" normalne raspodele,
- L^* - koordinata svetloće boje, (gde 0 označava crno, a 100 belo),
- LC-MS/MS - (tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom),

- LOD- (eng. the limit of detection), limit detekcije,
- LOQ – (eng. the limit of quantitation), limit kvantifikacije,
- MBE - (eng. mean bias error), srednje greške biasa,
- Mean - srednja vrednost, mean value,
- MetO - metionin sulfoksid,
- MPE - (eng. mean percentage error), srednje vrednosti procentualne greške,
- MSR - metionin sulfoksid reduktaza,
- MTHFR - metilen-tetrahidrofolat reduktaza,
- n - brzina obrtanja pužnice,
- NAFLD - Nealkoholna masna boleost jetre,
- NASH - nealkoholni steato hepatitis,
- NM - nasipna masa,
- NP-HPLC-Normalno-fazna hromatografija,
- OM - obrtni momenat,
- OS - optimalni spelta
- OS+B - optimalni spelta + betain
- p vrednost- gusina verovatnoće,
- PCA analiza - (engl. Principial Component Analysis), analiza glavnih komponenti,
- PM - pritisak na matrici,
- Q - protok materijala,
- r^2 - koeficijent determinacije SOP modela,
- RMSE - (eng. root mean square error), koren srednje vrednosti kvadrata greške,
- ROS - (engl. ROS – Reactive Oxygen Species), reaktivne vrste kiseonika,
- RS - rezistentni skrob,
- RSD - relativna standardna devijacija,
- RSM - (eng. response surface methodology), model odzivne površine,
- S/N - (eng. signal-to-noice), odnos signala i šuma,
- SAM - S-adenozilmetionin,
- SD – (eng. starch damage), stepen oštećenosti skroba,
- SE - stepen ekspanzije,
- SIB - integralno speltino brašno

- SIB+B - integralno speltino brašno + betain
- Skew. - (engl. Skeweness - krivljenje), predstavlja odstupanje rezidualnih vrednosti od normalne raspodele,
- SME – (eng. Energy Consumption), specifična mehanička energija,
- SOP – (eng. Second Order Polynomial Approximation), polinom drugog stepena,
- SS - (eng. standard score), standardna odevana,
- StD - (eng. standard deviation), standardna devijacija,
- StD - standardna devijacija,
- TM - temperatura na matrici,
- V - vlaga polaznog materijala,
- Var – (eng. variance), varijansa,
- WAI – (eng. water absorption index), indeks apsorpcije vode,
- WSI- (eng. Water Solubility index), indeks rastvorljivosti u vodi,
- χ^2 - (eng. reduced chi-square), redukovani χ^2 kvadrat test.



1. UVOD

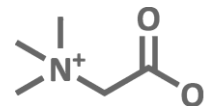
Većina ekstrudiranih flips proizvoda ubraja se u kategoriju direktno ekspanovanih flips proizvoda. Među njima su najpopularniji proizvodi na bazi kukuruzne krupice. Na našem tržištu neophodan je razvoj i povećanje proizvodnje različitih flips proizvoda dobijenih ekstrudiranjem koji imaju poboljšane nutritivne karakteristike. Godišnja potrošnja ekstrudiranih žitarica za doručak prema evropskom udruženju cerealija za doručak iznosi prosečno 2kg, ali varira od zemlje do zemlje (od 0,5 kg u Italiji do 8 kg u Irskoj). Ovakav tip proizvoda ima niz prednosti kao što su brže vreme pripreme, manji proizvodni troškovi, manja zapremina potrebnog prostora i kraće vreme pripremanja i, možda najznačajnije, povećana fleksibilnost proizvodnje, tj. procesa ekstrudiranja. Povećanje fleksibilnosti je omogućeno zahvaljujući brzom i lakom zameni ekstrudera i/ili faza rada neophodnih za dobijanje velikog broja ekstrudiranih flips proizvoda. Jednostavna promena matrice, procesnih uslova, receptura, preliva i aditiva, daje čitavo bogatstvo različitih oblika, tekstura i izgleda flips proizvoda.

Žitarice su glavni izvori betaina u ljudskoj ishrani. Međutim, endogena sinteza betaina je uglavnom nedovoljna da zadovolji potrebe organizma te je zbog toga neophodan njegov unos preko hrane. Kao donor metil grupa, betain učestvuje u metioninskom ciklusu, prvenstveno u ljudskoj jetri i bubrezima. S druge strane, kao donor metil grupa, betain obezbeđuje metil grupe za remetilaciju homocisteina u metionin koja se odigrava u jetri. Upravo je ovaj efekat redukcije homocisteina u krvi izazvao veliko interesovanje nutricionista za betainom.

Jedan od načina da se poveća unos betaina u ljudskoj ishrani je preko funkcionalne hrane obogaćene betainom. Obzirom da speltino integralno brašno predstavlja dobar izvor betaina ono može biti korišćeno kao osnovna sirovina za proizvodnju funkcionalne hrane obogaćene betainom. Mali je broj naučnih radova koji ispituju primenu speltinog integralnog brašna za proizvodnju ekstrudiranih proizvoda, kao i istraživanja koja se bave ispitivanjem svih aspekata kvaliteta ovakvih funkcionalnih proizvoda, odnosno analizom nutritivnog i funkcionalnog profila (Jozinović i sar., 2016; Marconi i sar., 2002).

Optimizacija ekstrudiranja i proizvodnje funkcionalnog ekstrudiranog proizvoda od speltinog integralnog brašna sa dodatkom betaina na dvopužnom ekstruderu bio je glavni cilj ove teze i obuhvatio je 3 faze:

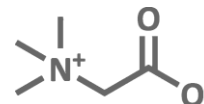
✓ Razvoj proizvoda poboljšanog nutritivnog kvaliteta i funkcionalnog profila, uz neznatno narušavanje njegovih senzorskih i teksturalnih karakteristika, a koji bi doprineo zadovoljenju preporučenog dnevnog unosa betaina, prema regulativi evropskog udruženja cerealija za doručak (European Breakfast Cereal Association). U Regulativi Evropske unije iz 2012. god. (Commission Regulation (EU) No 432/2012), dozvoljeno je deklarisanje zdravstvene izjave za prehrambene proizvode koji sadrže najmanje 500 mg betaina po porciji (40g flips proizvoda) uz navođenje napomene da se zdravstveni efekti mogu očekivati ukoliko se dnevno unese 1500 mg betaina. Zdravstvena izjava glasi: „betain doprinosi normalnom metabolizmu homocisteina“. Ograničavajući faktor pri kreiranju formulacije bili su nedovoljni literaturni podaci o uticaju



termičkog tretmana na sadržaj betaina u hrani. Ovaj deo doktorske disertacije se bavio uticajima sirovinskog sastava i procesnih parametara kao što su brzina obrtanja pužnice, protok materijala i sadržaj vlage materijala kao i utrošku specifične mehaničke energije na sadržaj betaina u flips proizvodu od speltinog integralnog brašna.

✓ Definisane karakteristike novog funkcionalnog proizvoda koji bi potencijalno proširio asortiman flips proizvoda na tržištu (fizičkih, funkcionalnih osobina, teksturalnih, reoloških i senzorskih).

✓ Optimizaciju, razvoj i validaciju metode visoko pritisne tečne hromatografije za određivanje sadržaja betaina. Uzimajući u obzir polarni i cviter jonski karakter betaina i neposredovanje hromofora optimizacija metode uključivala je multi-kriterijski pristup koji je podrazumevao: optimizaciju pH vrednosti mobilne faze, režima protoka mobilne faze i vremena ekstrakcije betaina iz uzorka sa ciljem da se razvije i validuje brza, jednostavna, tačna i pouzdana analitička metoda za određivanje sadržaja betaina u ekstrudiranim flips proizvodima, žitaricama i proizvodima od žitarica.



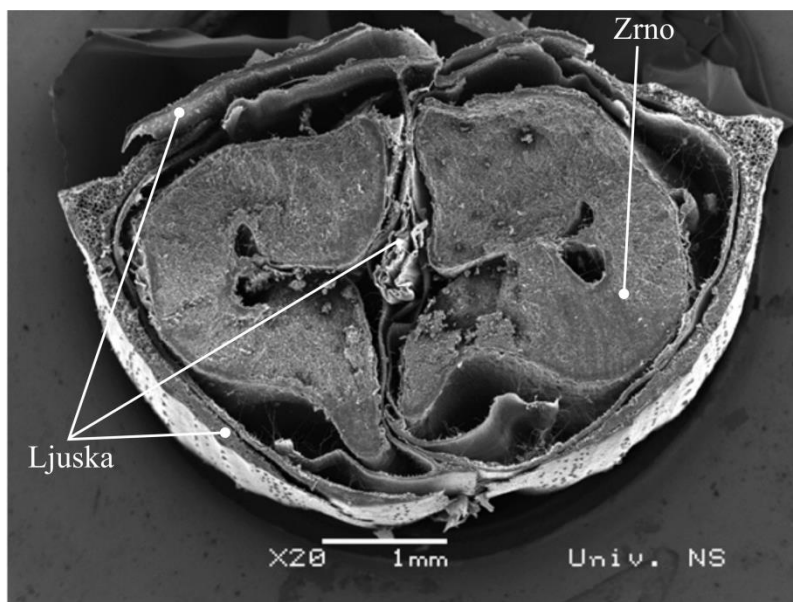
2. OPŠTI DEO

2.1. Spelta: agronomski i tehnološki kvalitet - sirovina za proizvodnju nutritivno i funkcionalno obogaćenih flips proizvoda

Spelta (*Triticum aestivum ssp. spelta* L.) je stara podvrsta meke pšenice poznata od davnina, ali je vremenom, upotrebom modernih visokoprinosnih sorti žitarica skoro potpuno zanemarena. Spelta pripada heksaploidnoj grupi gajenih vrsta roda *Triticum* i familije *Gramineae*. Zrno spelte je piramidalnog oblika i ima lomljivo vreteno klasa (Luo i sar., 2000), Slika 2.1a. Veza između spelte i obične pšenice je često istraživana i većina studija tvrdi da pripadaju istoj vrsti, ali različitom genetskom fondu (Abdel-Aal i sar., 2005). Povećano interesovanje za zdravu ishranu dovodi do veće potražnje za alternativnim žitaricama, gde spelta zbog svojih bioloških, agronomskih, prehrambenih i medicinskih karakteristika kao i bogatih nutritivnih svojstava, zauzima značajno mesto (Schober i sar., 2006). Skromni zahtevi prema klimatskim i zemljišnim činiocima i agrotehnici i visoka tolerantnost prema bolestima i štetočinama, predstavljaju niz preduslova za proizvodnju ove plevičaste vrste žitarica u ekološkim sistemima gajenja, od kojih organska proizvodnja ima naročit značaj (Bodroža-Solarov i sar., 2014; Lacko-Bartošova i sar., 2010; Grobelnik-Mlakar i sar., 2014). Hemijski tretman pre sejanja kod spelte nije neophodan, jer je zrno prekriveno čvrsto sraslom ljuskom (Slika 2.1b), koja štiti zrno na polju i tokom skladištenja, tako da prerada spelte uključuje jedan proces više, a to je ljuštenje, odnosno odvajanje zrna od ljuske, pa tek onda mlevenje (Campbell, 1997; von Büren i sar., 2001). Ljuska štiti zrno od zagađenja i insekata, poboljšava zadržavanje hranljivih materija u zrnu i produžava njegovu svežinu (Abdel-Aal i sar., 1997, Krulj 2017, Vučković i sar., 2013).

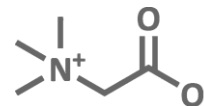


Slika 2.1 (a). Klas i zrno spelte



Slika 2.1. (b). Elektronski prikaz ljuske spelte

Spelta se obično doživljava kao "zdravija" i više "prirodna" od obične pšenice, i može da raste bez upotrebe đubriva i pesticida (Bonafaccia i sar., 2000; Schober i sar., 2006). Visok sadržaj nutritivno vrednih komponenti (proteini, vitamini, minerali, prehrambena vlakna, itd.) čini speltu pogodnom za proizvodnju širokog spektra organskih i tradicionalnih prehrambenih proizvoda. Brašno od spelte karakteriše prinos od 65%, a potrošnja brašna u ishrani ljudi se stalno povećava (Zieliński i sar., 2008). Njena glavna primena je za ljudsku ishranu. Iako se opisuje kao siromašnija u tehnološkom kvalitetu u odnosu na običnu pšenicu, spelta se koristi za proizvodnju testenina, hleba, flips proizvoda i drugih prehrambenih artikala (Kohajdová i Karovičová, 2008, Pasqualone i sar., 2011). Za razliku od obične pšenice spelta ima viši sadržaj proteina (naročito prolamina) i aminokiselina (prolina, glutaminske kiseline, tirozina i asparaginske kiseline), a sadržaj proteina varira u zavisnosti od lokacije na kojoj je gajena (Ruibal-Mendieta i sar., 2002; Pruska- Kędzior i sar., 2008; Wilson i sar., 2008; Jørgensen i sar., 1997; Abdel-Aal i sar., 2002; Ranhotra i sar., 1995). Ranhotra i sar. (1995) zaključili su da s obzirom na to da je speltino zrno bogatije mastima, skrobom i šećerima, ono sadrži oko 3% više energije nego obična pšenica. U radu Bodroža-Solarov i sar. (2014) primenom metode gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC-MS metode) potvrđena je autentičnost speltinog brašna i veći sadržaj lipida i nezasićenih masnih kiselina u zrnu i brašnu spelte u poređenju sa hlebnom pšenicom. Spelta ima visok sadržaj vitamina B (tiamina, riboflavina i niacina) i veći sadržaj β -karotena i retinola (Abdel-Aal i sar., 1995; Kohajdová i sar., 2008). U poređenju sa običnom pšenicom spelta ima u proseku 30-60% veću koncentraciju Fe, Zn, Cu, Mg i P (Ruibal-Mendieta i sar. 2005; Gomez-Becerra i sar., 2010). Vezani fosfor (P) koji se nalazi u formi fitinske kiseline prisutan je u manjim količinama od 40% u spelti u odnosu na običnu pšenicu (80%), što pokazuju podaci dobijeni u finim mekinjama i ćelijama aleuronskog sloja, gde je

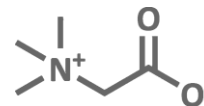


kiselina prirodno prisutna. Visok sadržaj mineralnih elemenata, bolja biološka raspoloživost usled niskog sadržaja fitinske kiseline nutritivno izdvaja speltu (Ruibal-Mendieta i sar., 2005). Takođe spelta sadrži dosta prehrambenih vlakana, mukopolisaharida, koji stimulišu imunološki sistem organizma (Abdel-Aal i sar., 2005; Escarnot i sar., 2010).

Kako u drugim zemljama tako je i u Srbiji poslednjih nekoliko godina zabeležen porast gajenja spelte i veliki je broj istraživanja rađen koji je vezan za zaštitnu ulogu plevičastog omotača zrna spelte (Vučković i sar., 2013), za njenu primenu u pekarstvu (Filipčev i sar., 2013a), proizvodnju testenine (Filipović i sar., 2013; Filipović i sar., 2015), kao i rešavanju nusproizvoda peletiranjem ljuske zrna spelte (Brlek i sar., 2012).

Gluten spelta pšenice je manje elastičan od obične pšenice tako da i testo dobijeno od brašna spelte karakteriše niža stabilnost, manja elastičnost i visoka rastegljivost. Nakon što se umesi testo od spelte je vrlo meko i lepljivo, te je obrada testa mnogo teža, a zapremina hleba je generalno manja (Abdel-Aal i sar., 1997, Pruska-Kędzior i sar., 2008, Bonafaccia i sar., 2000, Schober i sar., 2006). Rezultati kod ispitivanih sorti spelta pšenice u radu Filipčev i sar. (2013a) ukazuju da ispitivani genotipovi imaju visok sadržaj proteina i vlažnog glutena, ali i da postoje velike razlike u gluten indeksu zbog čega su ispitivani genotipovi produkovali testa osrednjih i slabih reoloških svojstava sa kratkim stabilitetom.

Testenina od spelta pšenice može se po svojoj konzistenciji i lepljivosti porediti sa durum testeninom, ali je tamnija i poseduje drugačiji ukus (Abdel-Aal i sar., 1998). Marconi i sar. (2002) zaključuju da spelta sa višim sadržajem proteina (više ili jednako 13,5 g/100g suve materije) i visokom temperaturom tokom sušenja može obezbediti proizvodnju kvalitetne testenine od spelte. U radu Filipčev i sar. (2013b) ispitivane sorte spelta pšenice su pokazale potencijal da daju krekerne prihvatljivog kvaliteta koji su se karakterisali nižim koeficijentom deformacije (skupljanja) testanog komada, višim modifikovanim koeficijentom krekerne i manjom čvrstoćom u odnosu na kontrolni uzorak, što je pozitivna karakteristika kod krekerne. Međutim, krekerne od spelte su pokazali slabiju sposobnost dizanja u toku pečenja što se delimično negativno odrazilo na strukturu i finoću preloma krekerne. Od reoloških svojstava testa, početni otpor testa proticanju i kvalitet glutena je pokazao najznačajniju korelaciju sa kvalitetnim svojstvima krekerne. Bonafaccia i sar. (2000) su dokazali da skrob spelte podleže hidrolizi mnogo brže na početku procesa varenja, što proizvode spelte stavlja u prvi red ukoliko se zahtevaju lako svarljivi ugljeni hidrati u ishrani.



2.2. Funkcionalna hrana i funkcionalni sastojci

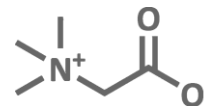
Posljednjih godina svetska istraživanja u oblasti hrane usmerena su ka prehrambenim proizvodima poboljšanog nutritivnog sastava i biološke vrednosti, a sve u cilju poboljšanja zdravstvenog stanja ljudskog organizma. Hrana koja se može konzumirati kao deo uobičajene ishrane i sačinjena je od prirodno dostupnih komponenata, u koncentracijama koje su često iznad onih karakterističnih za prirodne izvore, i pri tome ima pozitivan efekat na ciljane funkcije organizma kao i povoljno dejstvo na opšte zdravstveno stanje i smanjenje rizika od oboljenja, deklarirana je kao funkcionalna hrana (Bellisle i sar., 1998; Knorr, 1998, Sedej i sar., 2011).

Koncept funkcionalne hrane prvi put se javlja u Japanu 80-ih godina prošlog veka kada je Ministarstvo zdravlja Japana, objavilo zakonsku regulativu koja opisuje ovu vrstu proizvoda kao FOSHU (Foods for Specific Health Use). Da bi proizvod dobio FOSHU status neophodno je postojanje naučnih dokaza o zdravstvenom ili fiziološkom dejstvu finalnog proizvoda. Do danas, Japan je jedina država sa zakonom koji opisuje funkcionalnu hranu i reguliše upotrebu zdravstvenih izjava za ovu grupu proizvoda (Sedej, 2011).

S obzirom da funkcionalno svojstvo može biti uključeno u proizvod na različite načine, jedna od mogućih klasifikacija funkcionalne hrane prikazana je u tabeli 2.1.

Tabela 2.1. Vrste funkcionalne hrane (Kotilainen i sar., 2006; Spence, 2006; Sedej, 2011, Pastor, 2018)

Vrsta funkcionalne hrane	Definicija	Primer
Proizvod povećane vrednosti	Hrana sa povećanim sadržajem postojećeg nutrijenta	Voćni sokovi obogaćeni vitaminom C
Obogaćen proizvod	Hrana sa dodatim novim nutrijentima ili komponentama koje nisu inače prisutne u određenoj vrsti hrane	Margarin sa estrima biljnih sterola, probiotici, prebiotici
Izmenjen proizvod	Hrana kod koje je štetna komponenta uklonjena, njen sadržaj je smanjen ili je zamenjena supstancom sa povoljnim dejstvom	Prehrambena vlakna koja zamenjuju masnoće u mesu ili sladoledu
Unapređen proizvod	Hrana kod koje je jedna od komponenata prirodno unapređena putem posebnih uslova gajenja, novog sastava hraniva, genetskim postupkom ili na neki drugi način	Jaja sa povećanim sadržajem omega-3-masnih kiselina, dobijena korišćenjem izmenjene hrane za piliće



Problem nutritivne deficijencije se u svetu rešava raznim strategijama koje obuhvataju:

- a) sprovođenje programa edukacije stanovništva u vezi korekcija navika u načinu ishrane,
- b) obogaćivanje hrane raznim nutritivno vrednim dodacima i
- c) razvojem novih sorti biljaka.

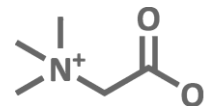
Funkcionalne komponente su dodaci hrani koji omogućavaju da hrana osim zadovoljenja osnovnih nutritivnih potreba doprinosi unapređenju zdravlja. U funkcionalnom proizvodu može biti prisutna samo jedna komponenta koja obezbeđuje funkcionalnost, ili može biti prisutno nekoliko dobro uklopljenih komponenata. Lista ispitanih i odobrenih komponenata za kreiranje funkcionalnih proizvoda se stalno proširuje. Najveći broj supstanci sa pozitivnim efektom na zdravlje je biljnog porekla (Sedej, 2011).

Primena veštačkih mineralnih i vitaminskih suplemenata predstavlja najčešći postupak obogaćivanja hrane, koji nije uvek pozitivno prihvaćen od strane potrošača i u većini zemalja je kontrolisan strogim zakonskim regulativama. Zbog toga je veoma aktuelno inkorporiranje prirodnih materija u prehrambene proizvode. U plasiranju ovakvog proizvoda na tržište, glavni cilj je prihvatljivost od strane potrošača, dok je osnovni problem implementacije koncepta funkcionalnih proizvoda u praksi to što razvoj ovih proizvoda predstavlja izuzetno složen i skup postupak, kome prethode ispitivanja na sledećim poljima:

- identifikacije funkcionalnih jedinjenja i ispitivanja njihovih fizioloških efekata kroz klinička ispitivanja,
- pronalaženja adekvatnog matriksa za njihovo inkorporiranje i
- razvoja funkcionalnog proizvoda sa tehnološkog aspekta (Šarić, 2017).

Ugradnja funkcionalnih komponenata u nove proizvode može se uraditi i postupkom ekstrudiranja i proizvodnjom flips proizvoda. U tom svetlu, interesovanje za upotrebu ekstrudera u proizvodnji funkcionalnih proizvoda ima izvanredan potencijal, a proizilazi iz činjenice da se ekstrudiranjem mogu mešati različiti sastojci i na taj način veoma lako formirati čitavu paletu novih proizvoda (Brennan i sar., 2013). Formulisanje novog funkcionalnog proizvoda koji bi potencijalno proširio asortiman flips proizvoda na domaćem tržištu i definisanje njegovih fizičkih, funkcionalnih, teksturalnih, reoloških i senzorskih osobina predstavlja izazov za prehrambenog tehnologa (Altan i sar., 2008a).

Jedno od prirodnih jedinjenja koje se može inkorporirati u prehrambene proizvode jeste betain, poreklom iz šećerne repe. Betainu i suplementima na bazi betaina pripisuje se širok spektar blagotvornih efekata, od održavanja zdravlja jetre, bubrega i srca, smanjenja nivoa cirkulatornog homocisteina do sveopšteg poboljšanja performansi ljudskog organizma koji se manifestuje kroz smanjenje osećaja umora, povećanje izdržljivosti i atletskih performansi kao i poboljšanja raspoloženja (Craig, 2004).

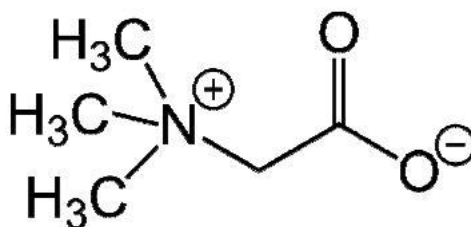


2.3. Betain kao funkcionalni sastojak

Betain (N, N, N-trimetilglicin, glicin betain) je organsko azotno jedinjenje, prvi put je pronađen u soku šećerne repe (*Beta vulgaris*), po kojoj je i dobio naziv. Šećerna repa sadrži oko 0,2 do 0,3% betaina i još uvek predstavlja glavni izvor ovog jedinjenja. Komercijalno dostupan betain na svetskom tržištu dobijen je kao prirodan proizvod, ekstrakcijom nusproizvoda iz procesa proizvodnje šećera ili bioetanola iz šećerne repe.

Betain predstavlja bioaktivno jedinjenje, koje ima značajne fiziološke funkcije u čovekovom organizmu kao osmolit i donor metil grupa za mnoge biohemijske procese. Značajna je uloga ovog jedinjenja u prevenciji i lečenju bolesti. Betain je prisutan u hrani biljnog i životinjskog porekla u različitim koncentracijama. Hrana biljnog porekla sadrži betain u različitim količinama, što zavisi od vrste hrane, sorte biljke, klimatskih uslova i agrotehničkih mera.

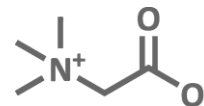
Betain je cviter jon kvaternarnog amonijuma koji se sreće još pod imenom trimetilglicin i glicin betain. On je metil derivat amino kiseline glicina ($((\text{CH}_3)_3\text{N}^+ \text{CH}_2\text{COO}^-)$ molekulska masa 117, 2). Okarakterisan je kao metilamin zbog njegove tri slobodne metil grupe (Yancey i sar., 1982). Strukturna formula betaina data je na slici 2.2.



Slika 2.2. Strukturna formula betaina

U SAD je betain generalno priznat kao bezbedan, odnosno GRAS sastojak (eng. Generally Recognized As Safe) dok je u Evropi dobio odobrenje za korišćenje u hrani od evropske komisije (Commission Regulation EU 432, 2012), koja dozvoljava korišćenje betaina u hrani kao zdravstveno bezbednog u količini od najmanje 500 mg po porciji hrane. Zdravstveno odobrenje je povezano sa doprinosom betaina u metioninskom ciklusu. Betain je komercijalno dostupan u 3 različite forme: prirodni anhidrovan betain, sintetski anhidrovan betain i betain hidrohlorid.

Jedan od načina poboljšanja statusa betaina u opštoj populaciji može biti obogaćivanje hrane betainom. Betain se takođe može dodavati hrani kao suplement.



2.3.1. Izvori betaina

Ljudski organizam se snabdeva betainom preko hrane koja sadrži ili betain ili holin. Pošto u ljudskom organizmu betain može da se ireverzibilno sintetiše iz slobodnog holina uz pomoć holin dehidrogenaze (Craig, 2004), ne smatra se esencijalnim nutrijentom. Međutim, endogena sinteza betaina je uglavnom nedovoljna da zadovolji potrebe organizma te je zbog toga neophodan njegov unos preko hrane. U tipičnoj ishrani svojstvenoj zapadnoj civilizaciji postoji relativno mali broj namirnica koje se mogu smatrati bogatim izvorom betaina ($\geq 150 \mu\text{g/g}$). Prema podacima de Zwart i sar. (2003), visok sadržaj betaina prisutan je u plodovima mora, beloj repi, cvekli, kinoi, spanaću, pšeničnim mekinjama, brašnu i škampima. Šećerna repa je veoma bogata betainom. Kao otporno jedinjenje prema hemijskim i enzimskim agensima, betain prolazi sve faze čišćenja difuzionih sokova u preradi šećerne repe i skoro se kvantitativno taloži u melasi.

U američkom Ministarstvu za poljoprivredu formirana je baza podataka koja se odnosi na sadržaj betaina i holina u hrani (Zeisel i sar., 2003). Najveće koncentracije betaina zabeležene su u (mg/100g): pšeničnim mekinjama (1339), pšeničnoj klici (1241), spanaću (645), prezlama (237), škampima (218) i belom hlebu (201). U tabeli 2.2 prikazan je sadržaj betaina u različitim matriksima hrane (Slow i sar., 2005).

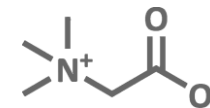
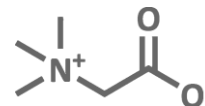


Tabela 2.2. Sadržaj betaina u različitim matriksima hrane (Slow i sar., 2005)

Hrana		Sadržaj betaina(µg/g)		Hrana		Sadržaj betaina(µg/g)		Hrana		Sadržaj betaina(µg/g)	
		vrsta 1	vrsta 2			vrsta 1	vrsta 2			vrsta 1	vrsta 2
Hleb	beli	360	520	Voće sveže	avokado	35	3	Čaj	crni	120	50
	od celog zrna	560	620		grožđe crveno	trag.	trag.		biljni	51	91
Žitarice	mekinje	2300	7200		grožđe zeleno	trag.	trag.		koka kola	-	-
	kukuruzne pahuljice	7	6		nektarine	-	-	Alkoholna pića	vino belo chardonnay	trag.	trag.
	musli	270	440		jagode	-	trag.		Pivo	točeno	77
Biskviti	pšenični	2500	1900		Voće sušeno	ananas	trag.	trag.	svetlo pivo	57	60
	čokoladni	160	160	šljiva		trag.	trag.	Meso	usoljena govedina	83	
Flips	kukuruzni	73	21	suvo grožđe		trag.	trag.		Sveže	ovčetiina	180
	nacho čips	trag.	11	pečeni pasulj	trag.	trag.	slanina	49		97	
Testenina	sveža	1400	1300	Povrće konz.	biber (crveni)	trag.	12	šunka		95	81
	špagete (konz. u sosu)	18	50		biber (zeleni)	24	31	Ostalo	pohovani pileći komadići	140	280
	nudle	1400	990		paradajz (voće)	-	-		pita od mesa	240	240
obična torta	270	170	paradajz (sok)		trag.	-	kobasice govede, nekuvano		320		
Ostalo	krekeri obični	1300	1000	Povrće sveže	asparagus	45	33	pileća supa u prahu	71	180	
	krekeri pirinčani	6	trag.		luk	-	trag.	Morska hrana			
	mafin sa borovnicom	120	160		krompir oljušten	38	37	Konz.	losos	23	20
	pogačice sa sirom	440	550		krompir neoljušten	39	26		tuna	33	45
	Voće konz.	kajsije (voće)	trag.		-	Bezalkoholna pića				Mleko	riba
kajsije (đus)		trag.	trag.	Instant kafa	zrnasta	31	30	čokoladno	6		trag.
voćna salata		-	-		u prahu	62	68	homog.	28		7
								sojino	trag.	12	
							brie	54	67		
							edam	trag.	trag.		



Žitarice su glavni izvori betaina u ljudskoj ishrani. Rezultati pokazuju da je različit sadržaj betaina u uzorcima žitarica promenljiv (Tabela 2.3). Ross i sar. (2014) su pronašli 2-4 puta veći sadržaj betaina u proizvodima od celog zrna pšenice u odnosu na proizvode od belog brašna. Slow i sar. (2005) su ukazali da nivo betaina zavisi od nivoa stresa pod kojim se usev nalazi. Tako primera radi rast pod sušom može uzrokovati veće nivoe betaina u poređenju sa dobro navodnjavanim usevima. Različite vrste žitarica mogu imati različite količine betaina (Corol i sar., 2012). U tabeli su prikazani različiti sadržaji betaina u proizvodima na bazi žitarica zabeleženi od različitih autora. Cerealije koje se koriste za doručak veoma variraju u sadržaju betaina, najverovatnije zbog promenljivog sastava ovakve vrste proizvoda koje čine mekinje, sušeno voće i različite žitarice. Vidljivo je da je u kuvanoj testenini sadržaj betaina manji nego u nekuvanoj, jer je betain lako rastvorljiv u vodi i dospeva u vodu u kojoj se kuva testenina. De Zwart i sar. (2003) utvrdili su da je gubitak betaina tokom kuvanja 60-80%.

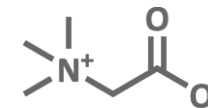
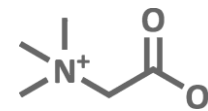


Tabela 2.3. Sadržaj betaina u proizvodima na bazi žitarica

Hrana	Tip i poreklo	Sadržaj betaina (µg/g)	Referenca
Brašno	Nisu naznačeni	270-1110	De Zwart i sar., 2003
Testenina	Nisu naznačeni	480-1350	
Ovas		200-1000	
Testenina	Spirala: nekuvana,	1449	
	kuvana	228	
	Organska: nekuvana,	1472	
	kuvana	352	
	Sveža: nekuvana,	1139	
	kuvana	271	
Pogačice	Pre pečenja	296	
	Pečene	245	
Hleb	Od belog brašna	200	Ross i sar., 2014
	Od celog zrna	550-1000	
Testenina	Od belog brašna	650	
	Od celog zrna	700-1200	
Flips proizvodi	Od belog brašna	100-200	
	Od celog zrna	300-500	
Cerealije za doručak	Od belog brašna	100-200	
	Od celog zrna	600-1100	
Hleb	Od belog brašna	360-520	Slow i sar., 2005
	Od celog zrna	670-790	
Pšenične mekinje		2300-7200	
Musli		270-440	
Biskviti		160-430	
Torta		170-270	
Krekeri		1000-1300	
Pogačice sa sirom		440-500	
Testenina	Sveža	1300-1400	
	Instant nudle	990-1400	



Bezglutenski proizvodi imaju nizak sadržaj betaina (Bruce i sar., 2010; Ross i sar., 2014). U najvećem broju komercijalno dostupnih bezglutenskih proizvoda zabeležen je niži nivo od 150 $\mu\text{g/g}$ betaina. Sadržaj betaina u različitim bezglutenskim proizvodima je prikazan u tabeli 2.4.

Tabela 2.4. Sadržaj betaina u različitim bezglutenskim sastojcima i proizvodima

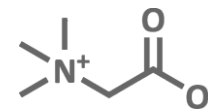
Hrana	Tip i poreklo	Sadržaj betaina ($\mu\text{g/g}$)	Referenca
Bazirani na kukuruzu	Zrno	<5	De Zwart i sar., 2003
	Kukuruzne pahuljice	6-7	Slow i sar., 2005
	Ekstrudirani Kukuruzni flips	21-73	
Komercijalna bezglutenska hrana	Nije specifikovano	tragovi	Ross, i sar., 2014
Kinoa		4000	
Pirinač	Beli, sirov	2	
	Braon, sirov	3	

2.3.2. Glavne funkcije betaina

Osnovna fiziološka funkcija betaina je dvostruka: s jedne strane, betain je organski osmolit sa funkcijom očuvanja ćelijske osmotske ravnoteže i održavanja tercijarne strukture makromolekula, dok je s druge strane, važan katabolički izvor metil grupa neophodnih za odvijanje brojnih biohemijskih ciklusa (Betaine. Monography, 2003).

Primarna uloga betaina u mikroorganizmima i biljkama se odnosi na zaštitu ćelija od inaktivacije usled osmotskog stresa (Virtanen, 1995). Izlaganje biljaka nepovoljnim uslovima spoljne sredine (suša, visok salinitet, temperaturni šok) dovodi do sinteze betaina u mitohondrijama i njegovom koncentrisanju u ćelijama. Kod sisara, betain ostvaruje svoju ulogu osmolita u tkivu bubrega, štiteći ćelije medule (srži) bubrega od osmotskog stresa i omogućava savladavanje koncentracionog gradijenta i nakupljanje otpadnih produkata metabolizma u urinu (Burg i sar., 2007). Betain je podesan osmolit koji povećava zadržavanje vode u ćelijama, zamenjuje neorganske soli i štiti intracelularne enzime od osmotskog pritiska ili temperaturno izazvane inaktivacije (Courtenay i sar., 2000). Na primer, kod spanaća uzgajanom na slanom zemljištu betain se akumulira u hloroplastu i sprečava oticanje vode iz ćelija usled osmotskog pritiska. Mitohondrije u jetri lososa adsorbuju betain kada su izložene osmotskom pritisku i na taj način telo troši manje energije kako bi održalo neophodnu vodu u ćelijama. Betain je dodavan u ribnjacima kao osmoregulator, kako bi zaštitio ribe kada se kreću kroz vodu različitog saliniteta.

Kao donor metil grupa, betain učestvuje u metioninskom ciklusu, prvenstveno u ljudskoj jetri i bubrezima. S druge strane, kao donor metil grupa, betain obezbeđuje metil grupe za remetilaciju homocisteina u metionin koja se odigrava u jetri (Craig, 2004). Blago povišeni nivo homocisteina u krvi smatra se biomarkerom povećanog rizika od



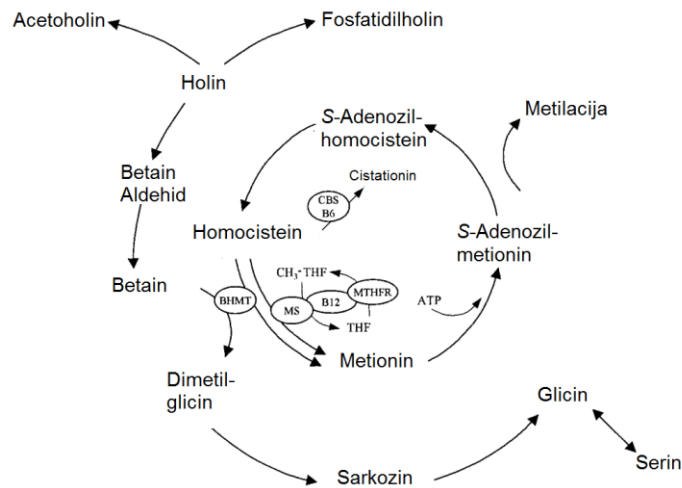
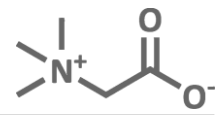
kardiovaskularnih, cerebralnih i perifernih vaskularnih bolesti kao i neurodegenerativnih bolesti i pogoršanja kognitivnih sposobnosti (Bates i sar., 2010; Smith i sar., 2010). Zapaženo je da unos betaina doprinosi efikasnom sniženju nivoa cirkulatornog homocisteina kod obolelih od homocistinurije, hronične bubrežne insuficijencije kao i zdravih subjekata (Wilken i sar., 1983; Brouwer i sar., 2000).

Upravo je ovaj efekat redukcije homocisteina u krvi izazvao veliko interesovanje nutricionista za betainom.

Neodgovarajući unos metil grupa ishranom vodi ka hipometilaciji (deficit metionina) koja u većini slučajeva uključuje: 1) poremećaj metionina usled povećane koncentracije plazma homocisteina i time smanjenje koncentracije S-adenosil-metionina, 2) hepatičnu lipidozu (masna jetra) koja vodi ka dislipidemiji-poremećaju koncentracije lipoproteina u krvi. Ove promene u metabolizmu jetre mogu da dovedu do raznih bolesti kao što su koronarne (smanjeni protok krvi kroz srčane arterije), cerebralne, hepatične i vaskularne bolesti. Kao donor metil grupa, betain može da zameni veliku količinu holina i metionina, pošto njihove metil grupe nisu podjednako dostupne za reakcije metilacije (Craig, 2004). Pokazano je da betain zaštićuje ćelijske membrane unutrašnjih organa, smanjuje rizične faktore kod vaskularnih oboljenja i poboljšava fizičku snagu.

Baza podataka sadržaja betaina u hrani je razvijana u korelaciji sa studijama o njegovom uticaju na zdravlje populacije. Veliki broj dokaza ukazuje da je betain važan nutrijent u sprečavanju hroničnih bolesti (Kidd i sar., 1997; Saunderson i sar., 1990). Betain se koristi i kao dodatak hrani za životinje već više od 50 godina i to je dalo ideju da se betain počne koristiti i u ljudskoj ishrani.

Betain se stvara u organizmu serijom enzimskih reakcija koje se uglavnom odvijaju u ćelijama mitohondrija jetre i bubrega. Ove reakcije transmetilacije uključuju prenos metil grupa putem metioninskog ciklusa (Slika 2.3) u vitalnim biološkim procesima. Konverzija homocisteina u metionin je važna za očuvanje metionina, detoksifikaciju homocisteina i proizvodnju S-adenozilmetionina (SAM) (Barak i sar., 1996). Betain prenosi metil grupu preko enzima betain-homocistein-metil transferaze (BHMT) prelazeći u dimetilglicin.

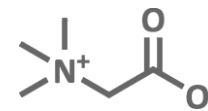


Slika 2.3. Metioninski ciklus

Formiranje metionina iz homocisteina može biti iz betaina putem BHMT ili putem 5-metil-tetra-hidrofolata (CH₃-THF). 5-metil-tetra-hidrofolat (CH₃-THF) koristi enzim metionin sintetazu (MS) za prenošenje metil grupe do vitamina B-12 (kobalamina). Nakon toga nastali metilkobalamin daje metil grupu homocisteinu da bi se formirao metionin. Metilen-tetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) je uključena u oslobađanje metil grupe iz CH₃-THF (metilen-tetrahidrofolat).

Metabolički putevi transmetilacije blisko povezuju holin, betain, metionin, CH₃-THF i vitamine B-6 i B-12, kako bi formirali metionin iz homocisteina. U ciklusu transmetilacije nastaje S-adenozil-metionin (SAM), koji je glavni donor metil grupa u organizmu, a sinteza DNK i RNK, karnitina, kreatina, neurotransmitera, regeneracija tkiva i sinteza fosfolipida su samo neki od procesa u kojima SAM učestvuje.

Betain, metionin i holin (trimetil-etanol-amin) su tri glavna donora metil-grupa, ali njihove metil-grupe nisu podjednako dostupne za reakcije metilacije. Holin, u obliku acetilholina, učestvuje u prenosu nervnih impulsa i ulazi u sastav lecitina i sfingomijelina, koji su važne komponente ćelijskih membrana (Craig, 2004).



2.3.3. Medicinska svojstva betaina

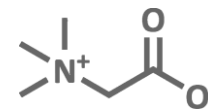
2.3.3.1. Apsorpcija i metabolizam

Ćelijska apsorpcija betaina se odvija u mnogim organizmima od bakterija do kičmenjaka. Betain kao aminokiselina se uglavnom transportuje uz pomoć γ -aminobuterne kiseline (Wettstein i sar., 1998). Ispitivanja na životinjama su pokazala brzu apsorpciju betaina u tankom crevu nakon obroka, preko dvanaestopalačnog creva (Kettunen i sar., 2001a).

Studije na ljudima su pokazale brzu apsorpciju i distribuciju betaina tokom 1-2 h nakon unosa. Stalna koncentracija betaina u ljudskom serumu je u rasponu od 20 do 70 $\mu\text{mol/L}$. Betain se uglavnom troši metabolizmom, ne izlučivanjem, čak ni pri velikim dozama od 100 mg/kg ljudske težine. Međutim, betain se može izlučiti preko urina kod osoba sa bubrežnim bolestima i dijabetesom. Subakutna ispitivanja na pacovima pokazala su da betain nije toksičan kada je dodavan u količini 0-5% od ukupne ishrane. Međutim, pri velikim unosima odnos crvenih krvnih ćelija je malo poremećen. Na osnovu svega, autori su zaključili da je maksimalni dnevni unos betaina od 9-15 g, a može ići i do 20 g (Frontiera i sar., 1994, Schwahn i sar., 2003, Lever i sar., 1994).

2.3.3.2. Osmoregulacija

Ako se betain ne kataboliše, onda se koristi kao organski osmoregulator. Regulacija sadržaja vode u ćeliji i samim tim njene zapremine je veoma bitna za održavanje ćelija. Ćelije se prilagođavaju osmotskom pritisku tako što akumuliraju neorganske jone malih molekulskih masa (jone natrijuma, kalijuma i hlora) i organske osmoregulatory (metil-amine, amino kiseline i šećerne alkohole). Uloga neorganskih jona kao osmotskih regulatora je ograničena jer njihove veće koncentracije utiču na proteinsku strukturu i enzimsku funkciju (Burg i sar., 1994; Petronini, i sar. 1992). S druge strane, organski osmoliti (naročito betain) ne ometaju funkcionisanje enzima i odvijanje metaboličkih procesa u ćeliji. Osmolitičko delovanje betaina rezultat je njegove dipolarne strukture i dobre rastvorljivosti u vodi (Yancey i sar., 1982). Studije su pokazale da se betain malo ili skoro nikako ne veže za površinu proteina, time omogućavajući ćelijama da kontrolišu površinski napon vode bez da utiču na stabilizaciju lipaze (Soderlund i sar., 2002). On se akumulira u bubrezima kako bi sačuvarao ćelije od velike koncentracije elektrolita i uree. Betain reguliše balans vode i njeno kretanje kroz epitelsko tkivo (Kettunen i sar., 2001b).



2.3.3.3. Antioksidativna aktivnost

Poslednjih godina, antioksidativne osobine betaina su široko proučavane i urađene studije sugeriraju da betain ima potencijalne primene kao antioksidant u poljoprivredi i kod zdravlja ljudi. Betain se smatra kao pogodan antioksidant za ublažavanje toplotnog stresa i poboljšanje kvaliteta mesa kod živine (Alirezai i sar., 2012). Pored toga rezultati pokazuju i korisna antioksidativna i metil donorska svojstva betaina protiv oksidativnog stresa i hiperhomocisteinemije koje su izazvane korišćenjem levodope i benserazida u životinjskom modelu (Alirezai i sar., 2015).

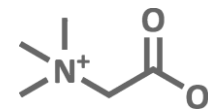
Epidemiološka ispitivanja su pokazala da osobe sa povećanom koncentracijom serumskog homocisteina (homocisteinemija) mogu imati povećan rizik od pojave kardiovaskularnih bolesti, infarkta, Alchajmerove bolesti, demencije, defekta neuralne tube i drugih metaboličkih poremećaja (Seshadri i sar., 2002). Nakupljanje homocisteina uzrokuje oštećenje krvnih sudova (pukotinu), a vremenom dolazi do upalnog procesa. Zapaljenje dalje dovodi do napada slobodnih radikala i oksidacije lošeg holesterola, to jest LDL holesterola, koji se lepi na oštećenom mestu prouzrokujući suženje krvnog suda i posledično infarkt miokarda ili moždani udar, pri čemu je povišen pritisak dodatni faktor rizika. Mehanizam delovanja betaina kao antioksidanta još uvek nije jasan.

Antioksidanti, prema najšire prihvaćenoj definiciji bioloških antioksidanata su “supstance koje prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat (biomolekul) koji se oksiduje, značajno usporavaju ili sprečavaju oksidaciju tog supstrata”. Antioksidanti mogu ispoljavati svoju aktivnost različitim mehanizmima zahvaljujući njihovoj sposobnosti da deluju kao: “hvatači” slodobnih radikala, donori elektrona, donori H-atoma peroksil ili hidrosil radikalima ili akceptoru elektrona i akceptoru H-atoma ugljenikovih slobodnih radikala (Carocho i sar., 2013).

Prethodni radovi ukazuju da su antioksidativna svojstva betaina zbog njegove sposobnosti da “uhvati” slobodne radikale (Alirezai i sar., 2012). Međutim, trenutno nema dovoljno podataka koji podržavaju ovu ideju. Neke studije pokazuju da betain ima svoja antioksidativna svojstva povećavajući aktivnost antioksidaze (Alirezai i sar., 2015). Druge studije pak pokazuju da nema promene u aktivnostima antioksidaze koje su primećene nakon tretmana sa betainom (Balkan i sar., 2004). Neki radovi čak ukazuju na to da betain povećava samo aktivnost SOD-a (superoksid dizmutaza) i ne utiče na aktivnost drugih antioksidaza, uz neophodnost budućih istraživanja koji potkrepljuju ove činjenice (Zhang i sar., 2016).

Istraživanja pokazuju da betain može da poveća nivo glutaciona regulacijom metabolizma aminokiselina koje sadrže sumpor. Samim tim novija ispitivanja idu u smeru procene efekta betaina na metabolizam aminokiselina koje sadrže sumpor i pokazuju da betain povećava nivo neenzimatskih antioksidanata, S-adenozilmetionina (SAM) i metionina i to regulacijom metionin- homocistein ciklusa. Naknadno je nađeno da 3 metil grupe betaina igraju ključnu ulogu u njegovoj antioksidativnoj aktivnosti. Mogući razlog za to je hidrofobnost 3 metil grupe i hidrofilnost karboksilne grupe betaina, koje stvaraju čvrstu zaštitnu membranu oko ćelija kako bi se sprečio oksidativni stres izazvan reaktivnim vrstama kiseonika (engl. Reactive Oxygen Species, ROS) i oštećenje ćelija (Zhang i sar., 2016).

Aminokiseline koje sadrže sumpor (Sulfur-Containing Amino Acid Metabolism) su poznate da učestvuju u kontroli oksidativnog statusa, tako što su uključene u sintezu



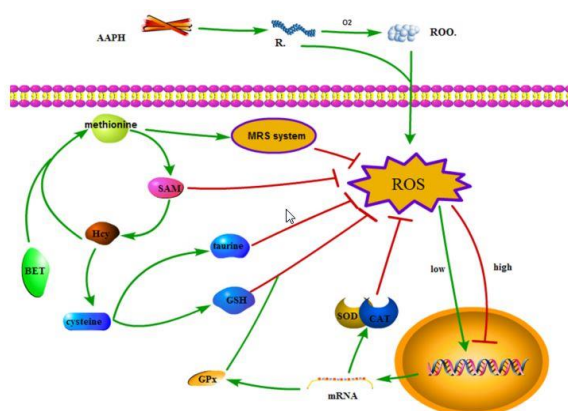
intracelularnih antioksidanata, naročito glutationa, i metionin sulfoksid reduktaze (MSR). Tretman betainom doprinosi značajnim promenama u količini koje su u velikoj meri bile okarakterisane povećanjem količine metionina i SAM i smanjenjem sadržaja homocisteina i taurina i obnavljanjem nivoa cisteina i glutationa (GSH). Dakle, betain može vršiti antioksidativni efekat putem regulacije metabolizama aminokiselina koje sadrže sumpor (Zhang i sar., 2016).

SAM kao glavni biološki metil donor stvara cistein za sintezu glutationa (GSH). Eksperimenti ukazuju da SAM ima direktnu antioksidativnu aktivnost preko ROS-reaktivne vrste kiseonika i mnogo je efikasniji od GSH-a u direktnom uklanjanju hidroksilnog radikala.

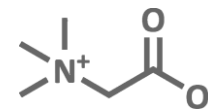
Ostaci metionina su naročito podložni oksidaciji ROS-a i pretvaraju se u metionin sulfoksid (MetO). MetO se može pretvoriti u metionin uz pomoć metionin sulfoksid reduktaze. Svaki ciklus oksidacije i redukcije metionina u ovom sistemu uništava jedan ekvivalent ROS-a. Prema tome, podizanje nivoa metionina i SAM-a može se smatrati antioksidativnim mehanizmom betaina (Zhang i sar., 2016).

Cistein, GSH i taurin su takođe neophodni za zaštitu od oksidativnog stresa. Koncentracija GSH u ćelijama reguliše se balansom između njegove sinteze i korišćenja. Dostupnost cisteina je glavni ograničavajući faktor u sintezi GSH. Kada je koncentracija cisteina visoka, više cisteina učestvuje u sintezi taurina. Nasuprot tome, kada je raspoloživost cisteina niska, sinteza taurina je inhibirana da bi se obezbedilo da se više cisteina konzervira kao GSH. Tako se nivoi cisteina i GSH nisu promenili, ali je nivo taurina smanjen.

Sve u svemu, efekat betaina na metabolizam amino kiselina koji sadrže sumpor je rezultat efektivnog ciklusa metionin-homocisteina (Slika 2.4), (Zhang i sar., 2016).



Slika 2.4. Antioksidativni mehanizam betaina preko metionin-homocisteinskog ciklusa



2.3.4. Uloga betaina u prevenciji bolesti

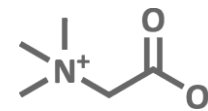
2.3.4.1. Bolesti jetre

Nealkoholna masna bolest jetre (eng. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) je relativno nov termin koji opisuje širok spektar oštećenja jetre od proste steatoze (masna akumulacija) do steatohepatitisa (masna inflamacija), fibroze (ekcezivno umnožavanje vezivnog tkiva) i ciroze (ozbiljno oštećenje jetre). NAFLD se javlja u oko 20% opšte populacije, oko 50% obolelih od šećerne bolesti, preko 50% gojaznih osoba i 90% osoba morbidne gojaznosti (Patrick i sar., 2002). Promene u hepatičnoj transmetilaciji mogu doprineti različitim bolestima uključujući koronarne, cerebralne, hepatične i vaskularne bolesti. Hepatična steatoza (masna jetra) je često rezultat gojaznosti, konzumiranja masne hrane, insulinske rezistencije, dijabetesa, konzumiranja alkohola i drugih oštećenja jetre. Betain kao lipotrop prevenira ili redukuje akumulaciju masti u jetri. Ispitivanja sprovedena na zdravim životinjama i životinjama obolelim od šećerne bolesti su ukazala da hrana bogata mastima doprinosi razvoju hepatične steatoze i može biti smanjena unosom betaina ili holina. Na animalnom modelu je potvrđeno da betain može usporiti razvoj ciroze kod pacova. Kod osoba sa dijabetesom koji su razvili hepatičnu steatozu jetre pokazano je da unos betaina neznatno smanjuje nivo plazmatskog holesterola i lipida, a značajno smanjuje nivo bilirubina, smanjuje veličinu jetre i pomaže u kontroli dijabetesa. Betain smanjuje sadržaj nikotinamid koenzima i adenin nukleotida u jetri i povećava transformaciju holesterola u žučne kiseline i ekskreciju u žuč. Studija pokazuje da je unos betaina u količini od 20 g bezbedan i dobro se toleriše, a doprinosi značajno biohemijskom i histološkom poboljšanju kod pacijenata koji boluju od NASH (nealkoholnog steato hepatitisa) (Craig, 2004).

2.3.4.2. Bolesti srca

Ranije studije su otkrile da betain u crvenom vinu i celom zrnu žitarica pozitivno utiče na sprečavanje koronarnih bolesti arterija srca. Unos betaina može doprineti poboljšanju srčane funkcije (kod osoba sa srčanom dekompenzacijom) kognitivnih bolesti srca i sniženju krvnog pritiska. Primena betaina kod osoba sa aterosklerozom poboljšava odnos serumskih fosfolipida i holesterola, povećava toleranciju ka fizičkom naporu, smanjuje anginozni bol i dispneu (osećaj otežanog disanja). Zaključuje se da korišćenje betaina u kombinaciji sa holinom, vitaminom B-12 i hranom siromašnom mastima kao i holesterolom utiče na smanjenje mortaliteta osoba sa aterosklerozom (Craig, 2004).

Najčešći tip homocistinurije (izlučenje preko urina) je uslovljen deficitom enzima jetre cistation-sintetaze, koji omogućava spajanje homocisteina i serina u cistation. Vitamin B-6 je kofaktor za cistation-sintetazu i oko 50% osoba sa homocistinurijom ima dobar terapijski odgovor nakon primene vitamina B-6. Betain poboljšava niz kliničkih simptoma na taj način što smanjuje nivo homocisteina u serumu i povećava koncentraciju metionina, serina i cisteina (Matthews i sar., 2002, Orendac i sar., 2003).



2.3.5. Stabilnost betaina u proizvodima na bazi žitarica

Betain je termostabilno jedinjenje koje podnosi intenzivan tretman tokom prerade šećerne repe (ekstrakcija sa vodom, tretman sa $\text{Ca}(\text{OH})_2$ i CO_2 , uparavanje, kristalizacija) i gotovo kvantitativno prelazi u melasu šećerne repe. Anhidrid betaina se raspada na temperaturama $> 245\text{ }^\circ\text{C}$. Obzirom da se u procesima proizvodnje hrane ne koriste ovako visoke temperature gubitak betaina izazvan termičkim tretmanima nije očekivan (The Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Alergies). Međutim, neki podaci ukazuju na to da određeni gubici betaina tokom kuvanja i pečenja hrane mogu postojati uprkos termostabilnosti betaina u čistoj formi.

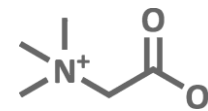
Samo par studija govori o stabilnosti betaina tokom procesa obrade hrane. De Zwart i sar. (2003) porede srednje vrednosti sadržaja betaina u različitim matriksima hrane, pre i nakon kuvanja. Oni zaključuju da sadržaj betaina veoma varira, u zavisnosti od hrane i načina kuvanja. Najmanji gubitak je primećen tokom mikrotalasnog kuvanja povrća a najveći tokom ključanja u vodi.

U slučaju hrane na bazi žitarica najveći gubici betaina (76-84%) su primećeni tokom kuvanja testenine što se može pripisati rastvaranju betaina u vodi za kuvanje i njegovom uklanjanju nakon odvajanja vode od testenine. Slični rezultati su dobijani u istraživanjima Ross i sar. (2014) u kuvanoj testenini i nudlama. Tokom pečenja pogačica de Zwart i sar. (2003) primećuju gubitak betaina u iznosu od 17%.

U našim istraživanjima hlebovi su tako formulisani da sadrže približno 500, 1000, 2000 i 3000 mg betaina na 100 g hleba. Međutim, u pečenim hlebovima su analitički utvrđeni neočekivano niski sadržaji betaina. U svim formulacijama hleba registrovani su visoki gubici betaina ($>90\%$). Jedan od mogućih objašnjenja za ovako visok gubitak betaina u pečenim hlebovima može biti činjenica da pekarski kvasac *Saccharomyces cerevisiae* može da metaboliše betain, koristeći ga kao izvor azota. Da bi se u potpunosti ispitala ova mogućnost, neophodno je nastaviti detaljnija istraživanja sadržaja betaina u testu prilikom zamesa i raznim fazama fermentacije. Uprkos velikom gubitku, obogaćeni hlebovi su sadržali značajno više betaina od kontrolnog hleba (2-29 puta više). Međutim, zbog visokih gubitaka u betainu i ekonomske isplativosti, može se zaključiti da hleb i uopšte proizvodi od kvasnog dizanog testa, nisu pogodni kao osnova za proizvodnju proizvoda obogaćenih betainom (Filipčev i sar., 2018; Filipčev i sar., 2015a)

Sadržaj betaina u keksu obogaćenom različitim koncentracijama betaina (500-3000 mg/100g brašna), u zavisnosti od stepena obogaćenja, je bio od 7,5 do 40 puta veći od kontrolnog keksa. Prema podacima iz ovog eksperimenta, procenjeni gubitak betaina se kretao u opsegu od 17,4-28,6% što je nešto više u odnosu na podatke koji su objavili de Zwart, i sar. (2003). Keks napravljen određenim formulacijama po sadržaju betaina bi mogao da bude potencijalni nosilac zdravstvene izjave o povoljnom uticaju na metabolizam homocisteina, u skladu sa evropskom regulativom (Commission Regulation (EU) No. 432/2012) jer bi relativno razumne porcije keksa obezbeđivale unos od minimum 500 mg betaina (Filipčev i sar., 2016).

Sadržaj betaina u eksperimentalnim bezglutenskim keksima obogaćenim betainom je bio značajno viši nego u kontrolnom uzorku. Najmanji stepen obogaćenja je doprineo

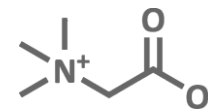


četverostrukom povećanju količine betaina u odnosu na kontrolni, dok je u keksu sa najvećim stepenom obogaćenja sadržaj betaina bio 20 puta veći. Gubitak betaina se kretao u opsegu od 10, 8-17,9% što je u skladu sa literaturnim podacima (de Zwart, et al., 2003). Porcija bezglutenskog kekisa sadrži ≥ 500 mg betaina i može da bude nosilac zdravstvene izjave o povoljnom uticaju na metabolizam homocisteina (Filipčev i sar., 2015b).

2.3.6. Određivanje betaina u različitim matriksima hrane tečnom hromatografijom

Hefni i sar. (2016) ukazuju na značajan uticaj uslova ekstrakcije na kvantifikaciju betaina u različitim uzorcima hrane, naglašavajući neophodnost ponavljanja ekstrakcione procedure kako bi se dobili pouzdani rezultati. U cilju da se odredi sadržaj betaina u hrani, razvijene su različite metode. Najčešće su metode tačne hromatografije, ali nema univerzalne metode koja se može primeniti na sve matrikse hrane. Saarinen i sar. (2001) su analizirali sadržaj betaina u pilećoj jetri koristeći katjon izmenjivačku kolonu Ca^{2+} i refraktometrijski detektor mada je kvantifikacija ograničena zbog slabe osetljivosti detektora. Uzimajući u obzir fizičko-hemijske osobine ovaj kvaternarni amin ne može biti analiziran konvencionalnom reverzno-faznom tečnom hromatografijom i ne može biti detektovan UV-detektorom bez derivatizacije. De Zwart i sar. (2003) su derivatizovali betain u većem broju namirnica i njegovu analizu izveli tečnom hromatografijom i UV-detektorom koristeći različite kolone. Slow i sar. (2005) su ekstrahovali betain iz različitih proizvoda grupisanih u 10 kategorija: zrna, voće, povrće, bezalkoholna pića, alkoholna pića, meso, morska hrana, mlečni proizvodi, koštunjavo voće i ostalo. Za ekstrakciju su koristili vodu i dihlormetan, a za derivatizaciju 2-naptacil trifluorometansulfonat. Hefni i sar. (2016) su razvili jednostavnu *HPLC-UV* metodu u nekoliko različitih matriksa hrane kao što su spanać, integralno pšenično brašno, pšenica (*Triticum aestivum*), šećerna repa (*Beta vulgaris*), uz derivatizaciju na katjon izmenjivačkoj koloni. Bruce i sar. (2010) i Ross i sar. (2014) su analizu betaina izveli uz pomoć LC-MS/MS (tačne hromatografije sa masenom spektrometrijom) i *HILIC* (tačna hromatografija hidrofилnih interakcija) kolone. Bruce i sar. (2010) su razvili LC-MS/MS metodu za analizu 47 uzoraka krvi, 32 brašna žitarica i frakcija žitarica, i 51 proizvod od žitarica. Dodatno, Ross i sar. (2014) su analizirali betain metodom LC-MS/MS u velikom broju komercijalno dostupnih žitarica i frakcija žitarica.

Bruce i sar., (2010) su radili optimizaciju postojećih metoda ekstrakcije betaina i holina iz brašna, proizvoda od žitarica kao i uzoraka plazme. Prvi pokušaji ekstrakcije betaina u radu Holm i sar. (2003) iz uzorka plazme su pokazali da deproteinizacija sa metanolom vodi ka boljem obliku pikova (hromatograma) nego sa acetonitrilom, te su se za pripremu uzorka od cerealijsa za analizu kombinovanom metodom tačna hromatografija-masena spektrometrija (LC-MS/MS metodom) odlučili da uzorak mešaju sa 50%-im rastvorom metanol/voda. Graham i sar., (2009) su radi određivanja betaina i holina u frakcijama *Triticum aestivum*, mešali mlevene frakcije sa smešom metanol/voda 40:60 (v/v). Ekstrakcije su ponavljane 6 puta, supernatanti su osušeni i liofilizovani, rekonstituisani u fosfatnom puferu, centrifugirani i supernatant analiziran NMR (nuklearna magnetska rezonancija) metodom. I Chendrimada i sar. (2002) su kvantifikovali sadržaj betaina u nekoliko sastojaka hrane uključujući i pšenicu. Pri njihovom ispitivanju postojećih metoda ekstrakcije i tačne



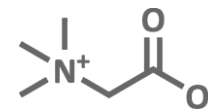
hromatografije visokih performansi (*HPLC*) za analizu betaina u uobičajenim uzorcima hrane veći broj nečistoća je koeluirao sa betainom. Radi pronalaženja kolone koja će omogućiti izdvajanje betaina od drugih (nečistoća) isprobane su brojne kolone. Odabrana je katjon izmenjivačka kolona jer je dala dobre rezultate razdvajanja betaina od ostalih nečistoća. Za ovu kolonu uzorak je pripreman zagrevanjem sa KOH i perlicama, 3 sata, nakon čega je ohlađen i dodato je 10 mL metanola, aktivnog uglja i HCl. Posle mešanja i držanja 15 min u zamrzivaču uzorak je centrifugiran, filtriran i supernatantu dodat metanol. Osim u proizvodima od pšenice i pšenici, gde je za ekstrakciju betaina korišćen razblaženi metanol, zagrejani metanol je korišćen za njegovu ekstrakciju iz biljnog materijala.

U radu MacKinnon i sar., (2010) optimizacija uslova ekstrakcije betaina iz morske trave *A. nodosum* je uključila ispitivanje 20%-ih rastvora voda/acetona, voda/metanol i voda/acetonitril kao rastvarača na različitim temperaturama. Odabrana je ekstrakcija sa metanolom na 78°C. Usitnjena morska trava ili ekstrakt su nakon zagrevanja sa metanolom osušeni i rastvoreni u mravljoj kiselini sa amonijum formijatom. J. Gorham (1984) je izvršio separaciju betaina iz biljnog materijala sa katjon izmenjivačkom *HPLC* kolonom. Biljni materijal je ekstrahovan vrelin metanolom ili kombinacijom metanol-hloroform-voda. Ekstrakt je filtriran i osušen, a ostatak rastvoren u vodi. U radu Du Shina i sar. (2012) ukazano je na nemogućnost rutinske analize betaina u *Fructus Lycii* postojećim *HPLC* metodama zbog aminokiselina koje interferiraju u kvantifikaciji betaina. Zato su predložili *HILIC* kolonu u kombinaciji sa *ELSD* detektorom. Za analizu su uzorci *Fructus Lycii* fino samleveni i propušteni kroz sito, a zatim izmešani sa 70% metanolom i sonifikovani u ultrazvučnom kupatilu 40 min na 25 °C.

HILIC (tečna hromatografija hidrofilnih interakcija) je alternativa reverzno-faznoj hromatografiji, koja je tip normalno-fazne hromatografije, NP (*normal phase*), kod koje je stacionarna faza polarna, ali mogu se koristiti veće količine organskih rastvarača kao mobilna faza za razliku od obične normalno-fazne hromatografije. Kod *NP-HPLC* mobilne faze su nepolarne i nemaju dovoljnu moć da eluiraju polarne supstance sa površine stacionarne faze. Shodno tome, *HILIC* kolona predstavlja najefektniju kolonu za hromatografsko razdvajanje betaina. Korišćenjem *HILIC* tipa hromatografije prevazilaze se poteškoće prilikom hromatografske analize molekula polarnih karakteristika. Mobilne faze u *HILIC* sistemima predstavljaju smeše vode (ili vodenog rastvora pufera) i organskog rastvarača (najčešće acetonitrila ili metanola).

Betain ima manju apsorpciju u UV vidljivom spektru i zato je neophodno korišćenje detektor tipa, *evaporative light scattering detector (ELSD)* koji se koristi u novije vreme, kao univerzalni detektor koji obezbeđuje stabilnu baznu liniju, čak i pri gradijentnom režimu, a koji može da detektuje većinu neisparljivih analita (Shin i sar., 2012).

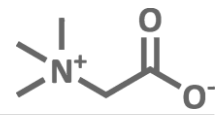
ELSD detektor se koristi za jedinjenja koja su teže isparljiva od mobilne faze i nezavisna su od optičkih svojstava jedinjenja i za jedinjenja koja ne poseduju hromofore. Uklanjanje vodene mobilne faze unutar *ELSD*-a obično se postiže podešavanjem temperature na tačku ključanja eluenta (npr. 100 °C) u cilju uklanjanja rastvarača. Za neisparljiva jedinjenja korišćenje visokih temperatura maksimizira odziv signala. Međutim, na ovim temperaturama, isparljiva i polu-isparljiva jedinjenja se uništavaju i stoga ne bivaju detektovana. Ovo je naročito problematično za male molekule kao što su lekovi. Ovakvi



detektori su dakle dizajnirani da mogu da ispare teško isparljive rastvarače na sobnoj temperaturi, a u cilju detekcije teško isparljivih jedinjenja. Dakle *ELSD* detektori imaju specijalnu tehnologiju, smanjuju vreme isparavanja vodenih rastvarača na niskim temperaturama (iz: Agilent user manual).

Kod *ELSD* detektora struja rastvarača koja sadrži raspršenu rastvorenu supstancu prenosi se uz pomoć gasa do komore za isparavanje. Rastvarač koji je uparen ostavlja maglu rastvorenih čestica koje raspršuju svetlost do fotosenzitivnih ćelija. To dovodi do pojačanja signala, a izlazni napon predstavlja koncentraciju izlaznih čestica koje prolaze kroz svetlost. Ovaj detektor koristi protok inertnog gasa u zoni isparavanja kako bi potpomogao isparavanje na niskim temperaturama. Dodavanjem struje suvog azota na ulazu u cev za isparavanje teže isparljivim rastvaračima (na primer vodi) pomaže isparavanje. Količina svetlosti koja se detektuje zavisi od koncentracije rastvorenih supstanci i veličine raspodele rastvorenih čestica (iz: Agilent user manual).

U našim istraživanjima, shodno svemu gore navedenom, korišćen je *HPLC-ELSD* sistem uz korišćenje *HILIC* kolone.



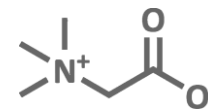
2.4. Ugradnja funkcionalnih komponenata u proizvod

2.4.1. Ekstrudiranje

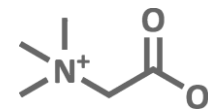
Ekstrudiranje je jednostavna operacija oblikovanja plastičnih ili testastih materijala istiskivanjem kroz otvor ili matricu. Tokom procesa se mogu menjati jedan, ili više parametara u različitim fazama obrade materijala, što rezultuje različitim karakteristikama dobijenog proizvoda. Tokom procesa ekstrudiranja sirov materijal se podvrgava različitim operacijama kao što su: mešanje, smicanje, zagrevanje, kuvanje, teksturiranje i završno oblikovanje prehrambenih proizvoda pod uslovima koji pogoduju održavanju kvaliteta, uz veliku produktivnost i male troškove (Shankar i sar., 2010; Sumathi i sar., 2007).

Unutar cevi ekstrudera odvijaju se specifične hemijske promene, koje u kombinaciji sa raznorodnim sastavom namirnica, predstavljaju poseban izazov za prehrambene tehnologe. Oblikovanje i vođenje procesa ekstrudiranja hrane mora uzeti u obzir prirodne varijacije materijala u sadržaju vlage, skroba i proteina, kao i eksperimentalne promene.

Ekstruder za hranu je uređaj kojim se obavlja oblikovanje i restrukturiranje sastojaka hrane. Ekstrudiranje je vrlo prilagodljiva operacija koja se može primeniti u mnogim procesima obrade namirnica (Rossen i Miller, 1973). Glavne prednosti tehnologije ekstrudiranja u poređenju sa tradicionalnim postupcima pripreme hrane prema Smithu (1969; 1971) uz izvesne modifikacije obuhvataju:



Adaptabilnost:	Moguća je proizvodnja širokog spektra proizvoda uz minimalne izmene sastojaka i uslova rada ekstrudera. Proces ekstrudiranja je značajno prilagodljiv za udovoljavanje želja potrošača ka dobijanju novih proizvoda.
Karakteristike proizvoda:	Moguće je dobijanje čitavog niza različitih oblika, tekstura, boja, što nije lako ostvarljivo kod drugih postupaka obrade namirnica.
Energetska efikasnost:	Prilikom kuvanja hrane ekstruderi rade uz relativno mali sadržaj vlage te je, stoga, manja potreba ponovnog sušenja proizvoda.
Mali troškovi:	Ekstrudiranje se odlikuje manjim produkcionim troškovima u odnosu na druge postupke kuvanja i oblikovanja (uštede prilikom primene ekstrudiranja su kod sirovina 19%, radne snage 14% i investicija 44%). Za smeštaj opreme neophodne za ekstrudiranje treba manje prostora nego za opremu koja se koristi za druge postupke tretiranja hrane.
Nove namirnice:	Ekstrudiranjem se mogu modifikovati animalni i biljni proteini, skrob i drugi sastojci hrane, što omogućava dobijanje niza novih i jedinstvenih flaps proizvoda.
Velika produktivnost i automatska kontrola:	Ekstruder omogućava kontinualnu i visoku proizvodnju i može se potpuno automatizovati.
Visok kvalitet proizvoda:	Pošto je ekstrudiranje proces kratkotrajnog zagrevanja na visokoj temperaturi, kod njega je razgradnja sastojaka hrane minimalna, dok se svarljivost proteina (putem denaturacije) i skroba (putem klajsterizacije) poboljšava. Kuvanjem putem ekstrudiranja na visokim temperaturama takođe se mogu razoriti antinutritivna jedinjenja, npr. inhibitori tripsina, kao i neželjeni enzimi, kao što su lipaze, lipoksidaze, a i mikroorganizmi.
Nema otpadnih voda:	Ovo je vrlo značajna prednost za prehrambenu industriju, jer su nove odredbe o životnoj sredini vrlo stroge i skupe (prilikom ekstrudiranja količine otpadaka su vrlo male ili ih ni nema).
Dimenzionisanje procesa:	Rezultati dobijeni na poluindustrijskom postrojenju mogu se upotrebiti za dimenzionisanje sistema ekstrudera proizvodnih kapaciteta.
Upotreba kao kontinualnog reaktora:	Ekstruderi se koriste kao kontinualni reaktori u nekoliko zemalja za inaktivisanje aflatoksina u brašnu od kikirikija i razgradnju alergena i toksičnih supstanci u brašnu semenki ricinusa i drugih uljastih kultura.



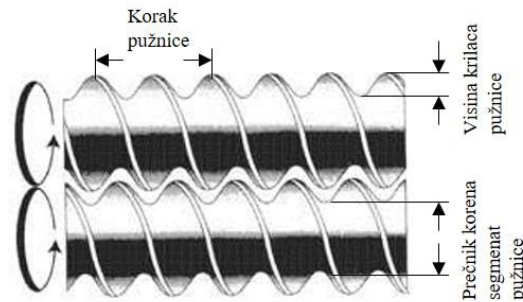
2.4.2. Zone prerade u cevi ekstrudera

Zona za punjenje je deo cevi ekstrudera gde se u unutrašnjost cevi ekstrudera unosi prekondicionirani materijal ili voda po potrebi i transportuje prema glavi ekstrudera. Materijal koji se ekstrudira u ovoj zoni je obično male gustine. Ovaj materijal sadrži mehuriće vazduha koji se uvek nalaze u strukturi praškastih supstanci. Kako se materijal transportuje prema glavi ekstrudera on počinje da se kompresuje, a mehurići vazduha izlaze iz njega. Segmenti pužnice u zoni za punjenje imaju obično jednostruku spiralu sa korakom ≥ 1 kako bi se ostvarila što veća zapremina između krilaca pužnice. U ovu zonu se obično uvodi voda kako bi promenila teksturu i viskozitet i kako bi poboljšala prenos toplote.

U **zoni za mešanje** nastavlja se kompresija materijala započeta u zoni za punjenje. Pošto se smanjuje korak pužnice ekstrudera dolazi do većeg punjenja cevi ekstrudera materijalom. Materijal koji se ekstrudira počinje da gubi svoju granularnu strukturu, gustina mu se povećava i on polako prelazi u testo, a u cevi ekstrudera dolazi do povećanja pritiska. Sile smicanja počinju da imaju dominantnu ulogu pošto je cev ekstrudera sve više ispunjena materijalom za ekstrudiranje. Pojedinačne čestice materijala počinju da se aglomerišu zbog povećanja temperature koja potiče od kondukcije ili trenja. Kako se materijal kreće kroz zonu za mešanje on počinje da formira testo koje je najkompaktnije na kraju ove zone. Segmenti pužnice u zoni za mešanje imaju dvostruku spiralu (Slika 2.5) čiji je korak od 0,5 do 1,0 da bi se postigao bolji efekat mešanja i gnječenja.

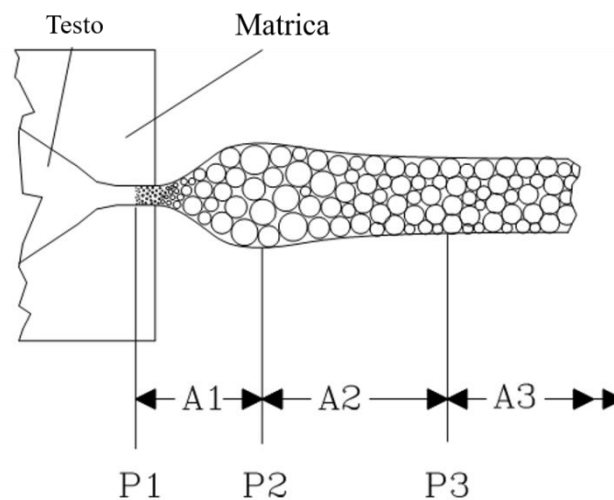
Spirala pužnice može imati konstantan korak i visinu krilaca pužnice po celoj dužini, ali oba se smanjuju od ulaza prema izlazu. Na ovaj način se postiže da cev ekstrudera bude potpuno ispunjena iako se materijalu koji se ekstrudira menja gustina zbog termičkog tretmana i dejstva visokog pritiska. Pužnice sa segmentima različite konstrukcije se koriste kada se želi postići različito dejstvo na materijal koji se ekstrudira. Na primer primenom segmenata sa dvostrukom i trostrukom spiralom (segmenti pužnice čija krilca u jednom koraku dva ili tri puta obmotaju koren pužnice) povećava se konverzija mehaničke energije u toplotnu odnosno dolazi do zagrevanja materijala koji se ekstrudira, jer se povećao odnos površine pužnice prema zapremini materijala koja se transportuje.

U **zoni za završno kuvanje** materijal koji se ekstrudira postaje amorfan i dolazi do njegovog teksturizacije. Temperatura i pritisak nastavljaju još više da rastu, dok pužnica ima najmanju dubinu kanala za proticanje materijala koji se ekstrudira (koriste se segmenti sa dvostrukom i trostrukom spiralom i najmanjom visinom i uglom nagiba krilaca). Za ovu zonu karakteristična je maksimalna kompresija ekstrudata i maksimalno smicanje. Temperatura i pritisak će usloviti prolazak materijala kroz matricu ekstrudera i dobijane finalnog proizvoda željene teksture, gustine, boje i funkcionalnih osobina.

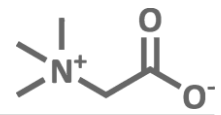


Slika 2.5. Segmenti pužnica koje se međusobno uklapaju i obrću u istom smeru

U zoni formiranja ekstrudata koja je podeljena na tri zone A1, A2 i A3 (Slika 2.6) testo koje prolazi kroz matricu expanduje jer voda isparava velikom brzinom, postaje elastičnije, hladi se zbog gubitka toplote, ojačava zbog hlađenja i gubitka vode i zadržava oblik i formu koju je dobilo zahvaljujući ekspanziji. Ekspanzija se može videti kao pojava koja je ograničena vremenom, polazeći od vremena kada je pritisak opao jer je voda koja je prisutna u pregrejanom testu počela da isparava. Nazovimo ovo kao tačku P1. Sledeća faza se karakteriše povećanjem zapremine maksimalno do P2, kada se i završava proces proširenja. U ovom trenutku pritisak pare unutar expandovanog testa je jednak spoljašnjem pritisku vazduha. U sledećoj fazi pritisak pare unutar proizvoda teži da se smanji još više zbog dodatnog hlađenja koje rezultuje manjim ili većim skupljanjem testa, smanjenjem obima do tačke P3, kada dolazi do očvršćavanja testa. Za vreme faze A3 testo se dalje hladi, gubi vlagu i očvršćava do tačke kada je dostignuta sobna temperatura. Princip ekstrudiranja po zonama je isti bilo da se radi o jednopužnim ili dvopužnim ekstruderima (Riaz i sar., 2000; Huber i sar., 2000).



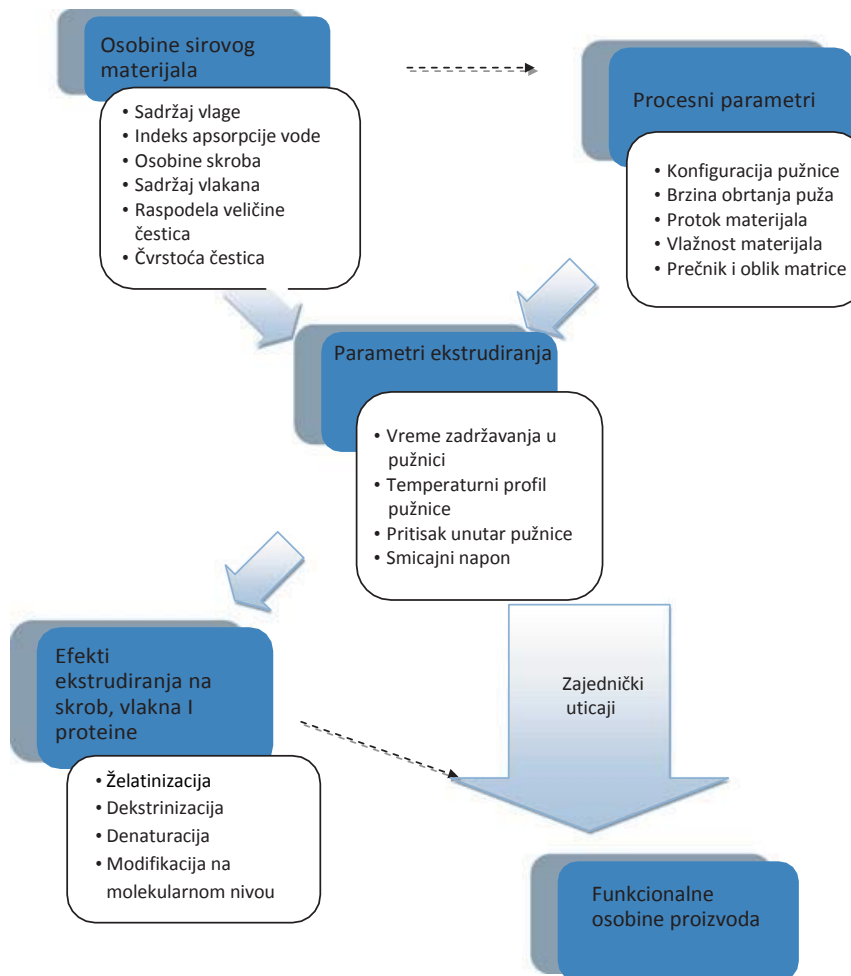
Slika 2.6. Zona formiranja ekstrudata



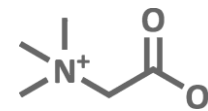
2.4.3. Uticaji pojedinih parametara na efikasnost ekstrudiranja

Kvalitet ekstrudiranog proizvoda zavisi od nekoliko parametara ekstrudiranja kao što su: sastav sirovina, vlaga materijala, brzina obrtanja pužnice, tip ekstrudera, konfiguracija puža (Miller i Mulvaney, 2000).

Na slici 2.7 prikazana je potencijalna interakcija sirovog materijala, procesnih parametara ekstrudiranja na formiranje flips proizvoda (Brennan i sar., 2013).



Slika 2.7. Potencijalna interakcija sirovog materijala, procesnih parametara ekstrudiranja na formiranje flips proizvoda (Brennan i sar., 2013)



Visoka temperatura testa prilikom ekspanzije uzrokuje: da ranije dolazi do ekspanzije, nasilnog širenja, okomitog povećanja zapremine, veće zapremine pare, većeg gubitka vlage, jačeg očvršćavanja, niže specifične težine ekstrudata i mekšeg proizvoda.

Visoka vlaga testa prilikom ekspanzije uzrokuje: veću elastičnost testa, veće i grube pore proizvoda, manji viskozitet testa, hrskavu teksturu ekstrudata i visok nivo vlage u finalnom proizvodu. Vlaga u testu je značajna jer reguliše viskozitet testa. Ako je sadržaj vlage u testu veliki, onda je viskoznost testa mala i obrnuto. Nivo vlage sirovina ima direktan efekat na ekstrudiranje, karakteristike testa, ekspanziju i teksturu finalnog proizvoda.

Obrtni moment puža i samim tim količina ulaznog materijala zavisi od viskoznosti testa. Viskoznost testa utiče na gnječenje, homogenizaciju i grejanje u ekstruderu. Manji viskozitet testa izaziva manji pritisak na matricu ekstrudera. Niži viskozitet uzrokuje i nižu temperaturu testa i nižu ekspanziju. Visok procenat vlage sa druge strane uzrokuje procese klajsterizacije i denaturacije i razvoj elastičnih osobina testa kao i bolju homogenizaciju masti, šećera i protein-skrobnog kompleksa.

Transportne osobine ekstrudera zavise od količine napojne smeše pri konstantnoj brzini obrtanja puža i od brzine obrtanja puža pri konstantnoj količini napojne smeše. Transportna efikasnost je najveća kod potpuno ispunjenog puža ekstrudera. Transportni kapacitet i efikasnost se smanjuju sa habanjem puža.

Povećanjem brzine puža: poboljšava se gnječenje i homogenizacija, potrošnja energije je veća, povećava se temperatura, povećava se ekspanzija.

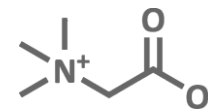
Povećanje količine doziranja pri istoj brzini obrtanja puža pogoršava se gnječenje i homogenizacija, smanjuje se potrošnja energije, povećava se temperatura, smanjuje se ekspanzija testa. Povećanjem količine doziranja, transportna efikasnost raste, manje se energije utroši na gnječenje materijala i na snižavanje temperature u odnosu na nedovoljno napunjeni puž (iz uputstva za rad, Schaaf Technologie GmbH).

2.4.4. Klasifikacija ekstrudera sa dvojnim pužem

Istorijski gledano, prva primena ekstrudera za kuvanje u prehrambenoj industriji je bila za dobijanje ekspanzovanih flaps proizvoda od kukuruzne krupice sredinom 1940-ih, na ekstruderu sa jednim pužem. Kod ekstrudera sa jednom pužnicom, upotreba pare za grejanje obezbeđuje oko jednu polovinu energije koja je neophodna za grejanje, dok se druga polovina obezbeđuje mehaničkom energijom. Upotreba pare će sniziti troškove energije, pošto je ona jeftin izvor energije koji će ekstruderima sa jednom pužnicom dati prednost. Mana ekstrudera sa jednom pužnicom je u tome da rade sa materijalima koji imaju viši sadržaj vlage nego ekstruderi sa dve pužnice i sa efikasnošću sušenja od samo 40%, tako da ne mogu proizvoditi ekstrudate sa niskim sadržajima vlage koji postaju sve atraktivniji za prehrambenu industriju.

Ekstruderi sa dva puža sve brže postaju prvi izbor ekstrudera u prehrambenoj industriji, jer se pomoću njih bolje preovlađuju razlike kvaliteta sirovina u zavisnosti od godine i lokaliteta žetve, pogodniji su za ekstrudiranje proizvoda od komplikovanih receptura sa „teškim“ sirovinama, imaju bolje mogućnosti transporta i u njima je prenos toplote bolji.

Ekstruderi sa dvojnim puževima mogu se klasifikovati na osnovu smera obrtanja pojedinih puževa u sledeće dve kategorije: ekstruderi sa dvojnim puževima sa rotiranjem jednog nasuprot drugom i ekstruderi sa dvojnim puževima sa rotiranjem jednog prema



drugom. Ove kategorije ekstrudera mogu se dalje podeliti na osnovu položaja puževa jednoga prema drugome na: ekstrudere sa puževima koji se međusobno uklapaju i sa puževima koji se ne uklapaju (Riaz, 2000).

Ekstruderi sa dvojnim puževima sa rotiranjem jednog nasuprot drugom koriste se ređe u prehrambenoj industriji, mada su odlični kao transporteri, pogodni za obradu materijala relativno malog viskoziteta kod kojih se zahtevaju male brzine i dugačko vreme zadržavanja. Ovakvi ekstruderi se koriste za dobijanje guma za žvakanje, želea i različitih konditorskih proizvoda.

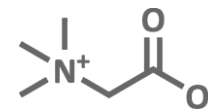
Ekstruderi sa dvojnim puževima sa rotiranjem jednog prema drugom se najčešće koriste u prehrambenoj industriji i za dobijanje flips proizvoda. Oni imaju dominantnu ulogu kod rasprostranjivanja različitih proizvoda koji se mogu dobiti tehnologijom ekstrudiranja. Ovi tipovi ekstrudera obezbeđuju visok stepen prenosa toplote bez prinudnog transportovanja (Elsner i Wiedmann, 1985). Prednosti sistema ovoga tipa su velika efikasnost prepumpavanja, dobra kontrola raspodele vremena zadržavanja, samočistivi mehanizam i homogenost obrade materijala (Schuler, 1986).

Položaji puževa u ekstruderu mogu biti:

1. ***Puževi koji se međusobno uklapaju*** – U ekstruderu ovoga tipa spirala jednoga puža prodire ili uleže u kanale drugoga puža. Karakteristike koje nudi ovaj tip ekstrudera su pozitivno delovanje s obzirom na transport tečnosti, efikasno mešanje i samočistivost.
2. ***Puževi koji se međusobno ne uklapaju*** – U ekstruderu ovoga tipa spirale ne ulaze jedna u drugu, pa se svaki od puževa može obrtati bez da ometa obrtanje drugoga. Clark (1978) je ove ekstrudere opisao kao dva ekstrudera sa po jednim pužem postavljenim jedan kraj drugoga, kojima je samo mali deo bubnja zajednički. Kao i ekstruderi sa jednim pužem, ovi ekstruderi nisu namenjeni za prepumpavanje ili za mešanje. Ekstruderi sa puževima koji se ne uklapaju, deluju kao ekstruderi sa jednim pužem, ali su im kapaciteti veći (Dziezak, 1989).

2.4.5. Prednosti ekstrudera sa dvojnim pužem

Ekstruderi sa dvojnim puževima koji se uklapaju koštaju za 50 – 150% više od ekstrudera sa jednim pužem istoga kapaciteta, što je prvenstveno zbog kompleksnosti pužnica i plašta ekstrudera koji služi za zagrevanje materijala koji se ekstrudira. Ekstra troškovi ekstrudera sa dve pužnice mogu biti delimično kompenzovani mogućnošću da se dobijaju proizvodi sa nižim vlagama, što će zahtevati manje energije za sušenje, kao i time što se potrebe za toplotnom energijom prvenstveno obezbeđuju mehaničkom energijom. U njima je moguć rad sa viskozim, uljastim, lepljivim ili vrlo vlažnim materijalima i sa nekim drugim proizvodima, koji proklizavaju u ekstruderu sa jednim pužem (u ekstruderu sa dvojnim puževima moguće je dodati i do 25% masti); oni imaju pozitivno delovanje transporta tečnosti i smanjuju pulsiranja na matrici; kod njih napajanje nije pulsirajuće; čišćenje im je vrlo jednostavno, jer imaju karakteristike samočistivosti; oni omogućavaju lakši prelaz sa semiindustrijskih uređaja na industrijske proizvodne uređaje; proces rada je pogodniji u slučaju da radnici nemaju odgovarajuća iskustva.



Ekstruderi sa dve pužnice zbog svoje konstrukcije ne mogu efikasno da konvertuju trenje u toplotu i za prevazilaženje ovog nedostatka pužnica mora sadržati segmente za mešanje (dodatno mešaju materijal koji se ekstrudira) i segmente za vraćanje materijala nazad (povećavaju zadržavanje materijala u ekstruderu).

Ekstruderi sa dve pužnice su lakši za kontrolisanje u smislu procesnih promenljivih. Takođe mogu da rade sa većim brojem sastojaka zbog njihovog većeg ugla transportovanja i osobina pužnica da utiskuju jedna u drugu materijal koji se ekstrudira. Oni mogu da poboljšaju preradu pomoću povećavanja količine materijala koja se meša u kanalu čime se skraćuje vreme zadržavanja materijala u cevi ekstrudera, i postiže ujednačen napon smicanja po dubini kanala (Gray i Chinnaswyamy, 1995). Konstrukcija ekstrudera sa dve pužnice takođe je omogućila da se smanje fluktuacije pritiska koji deluje na materijal koji se ekstrudira čime se omogućava da proces radi u kontinualnom režimu proticanja, čime se postiže lakša kontrola procesa. Ekstruderi i sa dve pužnice i ekstruderi sa jednom pužnicom imaju mnoge primene u prehrambenoj industriji. Ekstruderi sa dve pužnice nude povećani opseg primena u kuvanju i omogućavaju bolju kontrolu i fleksibilnost pri radu (Riaz, 2000).

2.5. Ekstrudiranje flips proizvoda

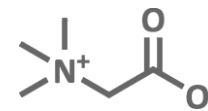
Na osnovu Pravilnika o kvalitetu i drugim zahtevima za fine pekarske proizvode, žita za doručak i snek proizvode ("Sl. list SCG", br. 12/2005 i "Sl. glasnik RS", br. 43/2013 - dr.

pravilnik i 68/2016 - dr. pravilnik) flips proizvodi predstavljaju proizvode koji su dobijeni postupkom ekstrudiranja i ekspaniranja sirovina na bazi žita, mahunjača, krompira i drugih namirnica, uz dodatak masnoća, šećera, soli i drugih namirnica. Na našem tržištu najpopularniji flips proizvodi dobijeni ekstrudiranjem su proizvodi na bazi kukuruzne krupice.

Ekstrudiranje flips proizvoda nudi brojne prednosti u odnosu na konvencionalne postupke proizvodnje hrane. Te prednosti su brže vreme pripreme, manji proizvodni troškovi, manja zapremina potrebnog prostora i kraće vreme proizvodnje i, što je, možda najznačajnije povećana fleksibilnost. Povećanje fleksibilnosti je omogućeno zahvaljujući brzom i lakom zameni ekstrudera i/ili faza rada neophodnih za dobijanje bezbrojnih vrsta flips proizvoda. Jednostavna promena matrice, procesnih uslova, formulacija, preliva i aditiva u prelive, daje čitavo bogatstvo različitih oblika, tekstura i izgleda direktno ekspaniranih proizvoda.

Većina ekstrudiranih flips proizvoda ubraja se u kategoriju direktno ekspaniranih flips proizvoda. Među njima su najpopularniji proizvodi na bazi kukuruzne krupice. Pravilno odabrana kukuruzna krupica se unosi u ekstruder konstantnom brzinom. Krupica se podvrgava delovanju vlage, toplote i pritiska na svom putu kroz ekstruder do matrice. Kada materijal izađe iz matrice, on ekspanuje zahvaljujući snižavanju pritiska i dimenzioniše se na odgovarajuću dužinu pomoću rotacionog noža kojim se dobija koletast ili loptast oblik. Posle oblikovanja, obavlja se sušenje i oblaganje materijalom za aromatizaciju.

Postoje dva postupaka dobijanja ekstrudiranih flips proizvoda: indirektno ili direktno pripremljeni flips proizvodi za konzumiranje. Proces dobijanja flips proizvoda direktnim ekspaniranjem je jednostavniji od postupka indirektnog ekspaniranja i zahteva manje utroške energije i radne snage. Opšti trend u industriji je u napuštanju topova za kukanje i



tornjeva za ekspanzovanje i potpunom prelazu na direktno ekspanzovane proizvode (Riaz i sar., 2000).

Glavni sastojci većine flips proizvoda na tržištu su kukuruz, pšenica, pirinač, krompir i ovas. Brojni radovi razmatrali su ulogu ekstrudiranja u proizvodnji proizvoda od pšenice i kukuruza (Brennan i sar., 2013). Uključivanje vlakana u flips proizvode uglavnom dovodi do promena parametara ekstrudiranja (obrotnog momenta, pritiska na matrici i potrošnje energije), hemijskih svojstava (nutritivnog profila) i fizičkih osobina (struktura i tekstura) ekstrudiranih proizvoda (Brennan i sar., 2008).

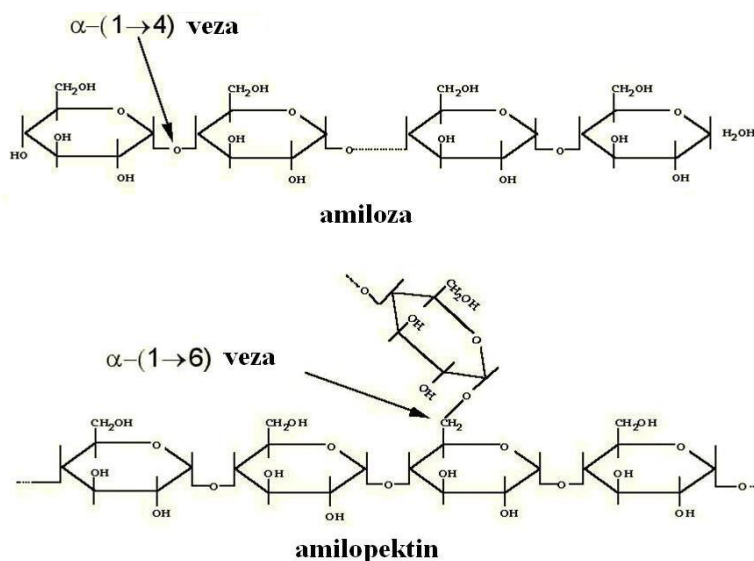
Sve zrnaste sirovine mogu se kontinualno prerađivati ekstrudiranjem za dobijanje flips proizvoda. Mali broj proizvođača organske hrane za dobijanje flips proizvoda koristi egzotična ili tzv. antička žita, kao što su spelta, proso, amarantus. Bez obzira na to, koja se sirovina koristi, proces u osnovi ostaje isti kada se prave direktno ekstrudirani flips proizvodi. Brz i jednostavan način da se učine mnoge izmene u proizvodima predstavlja variranje njihovih receptura (Riaz, 2000).

I sastojci i formulacija igraju važnu ulogu za formiranje dobre teksture flips proizvoda i mogu imati veliki efekt na prihvatljivost i funkcionalne osobine ekstrudiranog proizvoda. U ekstrudiranim proizvodima gde je ekspanzija poželjna i očekivana tekstura igra bitnu ulogu u pogledu prihvatljivosti od strane potrošača. Dakle, jasno je da različite sirovine sa različitim funkcionalnostima dovode do stvaranja različitog kvaliteta proizvoda, kao što su boja, ukus i nutritivni kvalitet (Kim i sar., 2009).

Korišćenjem nutritivno vrednih sirovina kakva je spelta za obogaćivanje klasičnih ekstrudiranih proizvoda od kukuruzne krupice, može se dobiti proizvod poboljšanog nutritivnog kvaliteta i funkcionalnog profila, uz neznatno narušavanje njegovih senzorskih karakteristika.

2.5.1. Uticaj ekstrudiranja na skrob

Skrobna zrna predstavljaju glavni izvor energije u ishrani ljudi, što je naročito karakteristično za slabije razvijene zemlje sa nižim standardom. Sirovi skrob dobija se uglavnom iz cerealija i korena biljaka, a pojavljuje se u formi granularnih aglomerata molekula, koji se sastoje od dva polimera α -D-glukoze: amiloze (20-30%) i amilopektina (70-80%) (Slika 2.8). Ove granule apsorbuju relativno malo vlage na sobnoj temperaturi, ali grejanjem u prisustvu vode bubre, a zatim se dekomponuju. Nakon dekomponovanja, skrobni molekuli zauzimaju homogeniju i ređe pakovanu strukturu, tako da je svakom molekulu omogućen neposredan kontakt sa rastvaračem, čime se formira gel (Piletić, 1989).

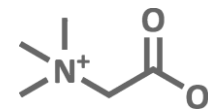


Slika 2.8. Hemijska struktura amiloze i amilopektina

Proces konverzije skroba od sirovog stanja do želatinoznog stanja naziva se želatinizacija. Želatinizacija je ireverzibilan proces i značajno utiče na svarljivost namirnica. Prilikom obrade namirnica ekstrudiranjem, želatinizacija skroba javlja se već pri sadržaju vlage od 12 do 22%, što je znatno niže nego kod drugih vidova obrade (Qu i Wang, 1994). Zbog razredene strukture, olakšana je prolaznost enzima amilaze do mesta dejstva, pa je ubrzana konverzija skroba u prostije, rastvorljivije ugljene hidrate, uključujući i krvni šećer (glukozu). Želatinizirani skrob ima izražene vezivne karakteristike i može da povezuje ostale konstituente u uniformno oblikovan finalni produkt. Svarljivost skroba uveliko zavisi od stepena njegove želatinizacije. Kod specijalnih životnih namirnica, kao npr. kod hrane za odojčad i decu važna je velika svarljivost skroba (Riaz, 2000).

Da bi se gel uspešno obrazovao i kasnije ekspanovao, obavezno je pravilno postavljanje preduslova rada. Materijal je neophodno usitniti do čestica optimalnih dimenzija (maksimalna veličina je 1500 μm), jer se time povećava reaktivna zapremina i efikasnost. Vodu i paru treba ujednačeno uvoditi u masu do sadržaja od 25 do 32%. U uslovima povišene temperature i pritiska unutar ekstrudera, jednom formirani gel ostaće u elastično-viskoznom stanju, sve dok produkt ne izađe iz kalupa. Ako u ovom trenutku pritisak iznenada padne, vlaga koja se nalazi u obrađivanoj masi prelazi u paru, čime se drastično povećava zapremina proizvoda. Ovo dalje izaziva naduvavanje elastičnog skrobnog gela, koje je postojano i nakon hlađenja i sušenja, uz očekivano minimalno smanjenje zapremine. Izvodi se zaključak da prisustvo skroba u smeši sirovog materijala pruža potencijal za proizvodnju ekspanovanih finalnih proizvoda.

Ekstrudirana hrana može da sadrži skrob u različitim fazama prelaska u gel. Ekstrudat male vlažnosti sadrži smešu neželatiniziranih skrobnih zrna, oštećenih zrna, želatiniziranih granula bez i sa bubrenjem i razoreni zrnastih struktura i fragmenata (Riaz, 2007; Woodroffe, 1993). Uniformnija želatinizacija i veći viskozitet postižu se pri višim sadržajima vlage. Generalno gledano, skrob iz cerealija ponaša se različito, od slučaja do slučaja. Pri nižoj vlažnosti, ne mora nužno želatinizirati u pravom smislu te reči, ali ako se izloži toploti i



smicanju u ekstruderu, proći će kroz fazu otapanja (dekstrinovanja). Ekstrudiranjem u dvopužnim uređajima, pri temperaturama između 170 i 200°C skrob postaje potpuno rastvorljiv u hladnoj vodi. Blaži uslovi ekstrudiranja od 25% vlage i 100°C rezultuju samo slabim bubrenjem i deformacijom skrobnih zrna. Pooštravanjem uslova u vidu smanjenja sadržaja vlage na 19% i povišenja temperature na 150°C, razara se struktura granula. Da li će doći do kompletnog narušavanja kristala sirovog skroba, zavisi od odnosa amiloze i amilopektina i drugih promenljivih faktora, kao što su konfiguracija i primenjeno smicanje (Riaz, 2007).

Tip i poreklo skroba određuju njegovo ponašanje (Tabela 2.5). Skrob iz korena biljaka želatinizira lakše nego cerealni i pirinčani, koji zbog svojih malih dimenzija i velike gustine zahteva najvišu temperaturu i strožije uslove.

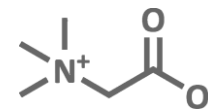
Tabela 2.5. Karakteristike različitih skrobova

poreklo skroba	toplota želatinizacije (cal/g)	sadržaj amiloze (%)	veličina granula (μm)
visoko amilozni kukuruz	7.6	55	5-25
krompir	6.6	20	15-121
pšenica	4.7	28	1.35
obični kukuruz	4.7	0	5.25

2.5.1.1. Uticaj ekstrudiranja na rezistentni skrob

Englyst i sar. (1985) su objavili da skrob može imati različite nivoe varenja u zavisnosti od strukturnih svojstava skroba i procesa obrade skrobne komponente. Oni dele skrobove na brzo svarljive (RDS), polako svarljive (SDS) i rezistentni skrob (RS) prema osetljivosti skroba na pankreasnu amilazu. Veliki broj faktora može da utiče na nivo hidrolize skroba kao što su: odnos amiloze i amilopektina, tip i raspored kristalnih struktura, prosečna molekulska masa komponenti, veličina čestica, amlozno-lipidni kompleks, prisustvo proteina i šećera u matriksima hrane i enzim inhibitora (Annison i Topping, 1994; Tester i sar., 2006; Sharma i sar., 2008). Rezistentni skrob spada u prehambena vlakna koja nisu svarljiva, dakle ne dolazi do razgradnje u želucu i tankom crevu, dok se potpuno ili delimično fermentišu u debelom crevu uz pomoć bakterija (Niba, 2002). Rezistentni skrobovi se mogu podeliti u 4 grupe (Tabela 2.6):

- ✓ RS1 je fizički nedostupan skrob, koji je vezan u ćelijama potpuno ili delimično samlevenog zrna i semena.
- ✓ RS2 se nalazi prirodno u bananama, krompiru i visoko amiloznom skrobu, a ovakav tip skroba je rezistentan zbog usaglašenosti u strukturi granule skroba. Ovakav tip se može dodati u širok opseg hrane i lekova (Brown, 2004).
- ✓ RS3 je obično retrogradirani skrob, dobijen kao rezultat procesa obrade hrane. Sadržaj RS3 se može povećati produženim ili brzim hlađenjem, obzirom da se na taj način pospešuje proces retrogradacije.



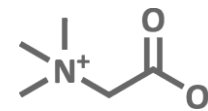
- ✓ RS4 su skrobovi koji su hemijski modifikovani (esterifikacijom ili umrežavanjem)

Tabela 2.6. Prikaz tipova rezistentnog skroba, izvora i karakteristika (Alsaffar, 2011)

Tip	Karakteristike	Rezistenstnost smanjena usled	Izvor žitarica
RS1	granule koje su fizički nepristupačne enzimima jer su uklještene u nesvarljivu matricu	mlevenje, žvakanje	delimično ili potpuno mleveno zrno
RS2	kristalna struktura koja je nesvarljiva	prerada hrane i kuvanje	visoko amilozni skrobovi
RS3	retrogradirani skrobovi, komercijalno u prodaji	uslovi proizvodnje	korn fleks, ekstrudirani i eskpandirani proizvodi, pekarski proizvodi
RS4	hemijski modifikovani skrobovi	manje podložan svarljivosti in vitro	sintetički

Rezistentni skrob se smatra važnom dijetetskom komponentom obzirom da doprinosi smanjenju incidence zdravstvenih poremećaja creva (Morrell i sar., 2004). Fermentacijom RS u debelom crevu nastaju masne kiseline kratkih lanaca kao što su acetat, butirat, propionat i gasovi poput CO₂, H₂ i CH₄ preko formiranja piruvata (Sharma i sar., 2008; Topping i sar., 2008). Butirat igra važnu ulogu u smanjenju rizika od dobijanja kancera debelog creva. RS kao sastojak namirnica ima ulogu u snižavanju energetske vrednosti namirnica i deluje kao prebiotik. Uloga prebiotika se ogleda da kao nesvarljiva vlaknasta jedinjenja prođu kroz gornji deo digestivnog trakta i stimulišu rast i aktivnost povoljnih bakterija (Englyst i sar, 1992).

U brojnim studijama navedeno je smanjenje sadržaja RS (odnosno povećanje svarljivosti) nakon ekstrudiranja zbog uništavanja granularne strukture (Parchure i sar., 1997; Unlu i Faller, 1998; Vasanthan i sar., 1998; Farhat i sar., 2001; Wolf, 2010; Faraj i sar., 2004; Mahasukhonthachat, 2010). Mahasukhonthachat i sar. (2010) navode da je procenat varenja skroba sirka povećan za oko 10 puta nakon ekstrudiranja kada se poredi sa neekstrudiranim. Haralampu (2000) je otkrio da pri sadržaju vode od 30%, a prilikom ekstrudiranja RS3 je izgubljen u iznosu od 22%, verovatno zbog velikog oštećenja usled smicanja. Čak i prilikom uslova ekstrudiranja koji su ispod ekstremnih (20-40% sadržaja vlage) i malih brzina obrtanja pužnice (60 o/min) primećena je mala količina RS3 (Faraj i sar., 2004). Postoje i suprotne informacije ovima koje ukazuju na povećanje sadržaja RS nakon ekstrudiranja. Chanvrier i sar. (2007) saopštavaju malo povećanje u RS nakon ekstrudiranja kod pšeničkih skrobova (sa 0,8% na 2,8%) i kod kukuruznih skrobova (sa 1,5% na 2,1%). RS sadržaj u pšeničnom brašnu za kolače je nakon ekstrudiranja porastao sa 0,38% na vrednosti između 0,52% do 2,65% koristeći različite kombinacije vlage: 20%, 40%, 60% i brzine okretanja pužnice (150, 200 i 250 o/min) (Kim i sar., 2006).



2.6. Optimizacija procesa ekstrudiranja

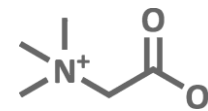
Matematičko modelovanje procesa ekstrudiranja je počelo sa progresom u polimernoj industriji. Nagli razvoj računara i softvera je omogućio upotrebu kompleksnih modela kako bi se izvršile simulacije procesa koje do tada nisu bile moguće. Tek kasnije modeli razvijeni za ekstrudere u polimernoj industriji su primenjeni i na ekstrudere koji se koriste u prehrambenoj industriji. Fizičko hemijske osobine prehrambenih proizvoda je mnogo teže meriti nego kod polimera, tako da je modelovanje u prehrambenoj industriji mnogo teži zadatak i time veći izazov (Popescu i sar., 2001).

Posle svih ovih godina korišćenja ekstrudera u prehrambenoj industriji i dalje je veoma teško razumeti kompleksni proces ekstrudiranja. Male promene u ulaznim procesnim parametrima utiču ne samo na izlazne procesne parametre nego i na kvalitet proizvoda ekstrudiranja. Tako da je detaljnom pretragom literature uočeno da na kvalitet procesa ekstrudiranja utiču sledeći procesni parametri: brzina obrtanja pužnice, protok napojne smeše, početni sadržaj vlage, pritisak na pužnici i matrici, temperatura na pužnici i matrici (Singha i Muthukumarappan, 2017).

Poslednjih decenija modeli odzivne površine, PCA analize i neuronskih mreža su opravdali svoju upotrebu u predviđanju izlaza i optimizaciji procesa ekstrudiranja kroz mnoge radove (Altan i sar., 2008b; Chávez-Jáuregui i sar., 2000; Ganjyal i Hanna, 2002; Lohani i Muthukumarappan, 2017; Shankar i Bandyopadhyay, 2007; Shihani i sar., 2006; Singha i Muthukumarappan, 2017).

2.6.1. Model odzivne površine

Model odzivne površine (eng. *Response Surface Methodology*, RSM) u istraživanjima se primenjuje radi planiranja eksperimenta, kako bi se predvidele izlazne zavisne promenljive, takozvani odzivi, ispitali uticaji ulaznih nezavisnih promenljivih i njihovih interakcija na odzive i na kraju optimizovao sam proces. Takođe, RSM ima važnu upotrebu u dizajnu i formulaciji novih proizvoda, kao i poboljšanju kvaliteta već postojećih. Primena RSM -a u optimizaciji formulacije prehrambenih proizvoda, osim što omogućava manji broj eksperimenata i time manji utrošak sirovina za probne formulacije, obezbeđuje i određivanje značajnosti ulaznih parametara (Baş i Boyacı, 2007). 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 (Šarić, 2016). Najčešće korišćeni eksperimentalni planovi u istraživanjima su: Box-Behnken dizajn (BBD), centralni kompozitni plan (eng. *Central Composite Design*, CCD), potpuni eksperimentalni plan i dr. Nakon prihvaćenog eksperimentalnog plana, optimizacija se zasniva na odabiru optimalnih vrednosti nezavisno promenljivih veličina sa ciljem postizanja željenog izlaza, odnosno odziva. Najčešće postoji veliki broj kombinacija vrednosti promenljivih, pa je za optimizaciju procesa neophodno primeniti neku od multivarijabilnih statističkih tehnika da bi se selektovale one sa najvećim uticajem na željene izlaze. Postupak odzivne površine kao jednu od tih tehnika, prvi su opisali Box i Wilson (1951). Oni su koristili polinom, najčešće drugog stepena, da opišu vezu između ulaznih i



izlaznih eksperimentalnih veličina. Polinom drugog stepena koji se koristi u metodi odzivne površine je predstavljen na sledeći način:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j$$

gde su β_0 , β_i , β_{ii} i β_{ij} koeficijenti polinoma koji se računaju preko modela razlike najmanjih kvadrata. Razlika najmanjih kvadrata predstavlja model koji predviđa koeficijente polinoma tako da izračunate vrednosti za zavisno promenljive budu što približnije njihovim stvarnim eksperimentalnim vrednostima. X_i i X_j su nezavisno promenljive, dok je Y zavisno promenljiva veličina (Y je željena funkcija u metodi odzivne površine). U ovom doktoratu je korišćen softver Minitab da bi se isplanirao eksperiment i analizirali uticaji nezavisnih veličina na odzivne parametre.

Optimizacija nekog proizvoda, uključuje sledeće korake (Šarić, 2016):

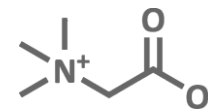
1. definisanje cilja optimizacije,
2. odabir faktora koji će biti optimizovani,
3. odabir faktorskih nivoa,
4. odabir eksperimentalnog plana,
5. odabir odgovora koji će biti praćeni,
6. kreiranje matematičkog modela,
7. definisanje optimalnih uslova.

2.6.2. Linearni multivarijabilni PCA modeli

Analiza glavnih komponenti (eng. Principal Component Analysis, *PCA*) predstavlja jednu od najpopularnijih multivarijabilnih tehnika i svaki noviji softverski paket za analizu podataka je poseduje. Popularnost je stekla, najviše zbog svoje jednostavnosti i jasne vizualizacije krajnjeg proračuna, i ima dva osnovna cilja da:

- Identifikuje zajedničke karakteristike različitih promenljivih;
- Smanji broj promenljivih koje se odnose na istu dimenziju i ne pružaju dodatnu informaciju koja već nije obuhvaćena drugom promenljivom.

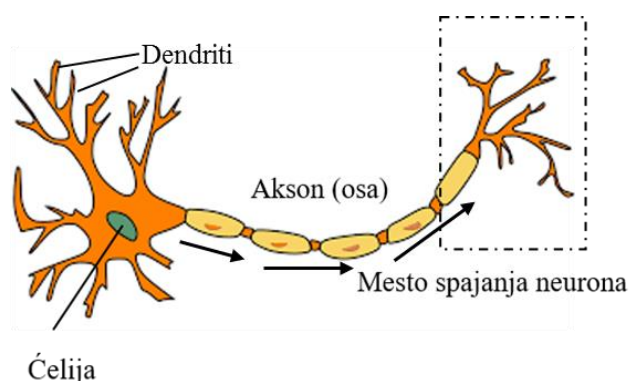
Linearni multivarijabilni *PCA* modeli razvijaju se primenom ortogonalnih baznih vektora, koji se nazivaju glavne komponente (Thielemans i Massart, 1985). *PCA* analiza ispituje korelacije između promenljivih, a na osnovu toga se broj promenljivih smanjuje i određuju se nove, faktorske koordinate. Ove transformisane koordinate raspoređene su tako da prva faktorska koordinata pokriva najveću moguću varijansu sistema, a analiza se koristi da se obezbedi najveće moguće razdvajanje između grupa (klastera) koje definišu promenljive (Hotelling, 1933). Na osnovu eksperimentalnih merenja svih promenljivih veličina koje se pripisuju određenom uzorku vrši se karakterizacija i razdvajanje uzoraka na osnovu uočenih osobina uzoraka. Na ovaj način *PCA* omogućava značajno smanjivanje broja promenljivih, kao i detektovanje zavisnosti između eksperimentalno mernih veličina i različitih uzoraka, što daje sveobuhvatniju sliku procesa. Kako *PCA* obezbeđuje uvid u



međusobni odnos promenljivih i otkriva na prvi pogled skrivenu strukturu podataka, ona predstavlja dobru početnu osnovu za kasnije tehnike, u našem slučaju ANN i višeciljnu optimizaciju. Takođe omogućava istraživaču jasno razumevanje relativnog uticaja pojedinačnih procesnih parametara, tako da može da odabere one koje imaju najviše uticaja na sam proces.

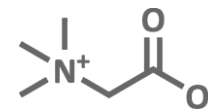
2.6.3. Neuronska mreža

Veštačka neuronska mreža (ANN) je sistem velikog broja međusobno umreženih elemenata procesiranja koji rade paralelno. Ona je sposobna da izađe na kraj sa problemima koji se tradicionalnim postupkom teško rešavaju, kao što su nelinearni sistemi. Služi da bi predvidela funkciju koja daje izlaze, a zavisi od velikog broja ulaza. Težinski koeficijenti povezuju elemente procesiranja. Postoje dve kategorije neuronskih mreža: veštačke i biološke neuronske mreže (Kröse i sar., 1993). Biološka neuronska mreža je nervni sistem živih bića. Veštačke neuronske mreže po funkciji, obradi informacija i strukturi podsećaju na biološke neuronske mreže (Anderson, 1995). Učenje na osnovu iskustva je najvažnija osobina ANN. Ljudski mozak je sastavljen od nervnih ćelija tj. neurona. Neuroni su dugovečni i uglavnom ne postoji mogućnost da se uginuli ili oštećeni nadoknade, za razliku od ostalih ćelija koje posle reprodukcije zamenjuju sebe i potom umiru. Procena broja neurona u ljudskom mozgu varira i kreće se do 100 milijardi, a smatra se da postoji više od 100 različitih neurona (Arbib, 2003). Neuroni su raspoređeni u grupe koje čine mreže. Svaka mreža sadrži više hiljada neurona koji su međusobno povezani i informacije procesiraju paralelno. Tako posmatrano, može se reći da je mozak skup neuronskih mreža. Deo mreže sastavljen od jedne nervne ćelije prikazan je na slici 2.9. Sa leve strane ćelije zapažaju se dendriti koji obezbeđuju "ulaze" u ćeliju. Sa desne strane se nalazi osa ili akson, koja šalje signale (izlaze) ka osnom terminalu nove ćelije. Signal može da se prenosi nepromenjen, ili može biti promenjen pomoću sinapse. Signal se prenosi putem označenim strelicama na slici. Ako sinapsa prenosi signal na susedni neuron, tada se proces naziva eksitacija. Ako sinapsa blokira prenošenje signala, onda se radi o inhibiciji.



Slika 2.9. Deo biološke neuronske mreže

Veštačka neuronska mreža je model koji oponaša biološke neuronske veze. Na

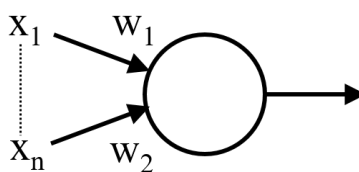


današnjem nivou, neuronsko računanje koristi veoma ograničen skup šema u odnosu na biološki neuronski sistem. Neuronsko računanje, tj. softverske simulacije velikih paralelnih procesa, uključuju elemente procesiranja (veštačke neurone) međusobno povezane u arhitekturu mreže. Veštački neuron prima ulaze koji su analogni elektro-hemijskim impulsima, koje dendriti bioloških mreža primaju od ostalih neurona. Izlaz veštačkog neurona je analogan sa signalom poslatim iz biološkog neurona kroz njegove ose. Veštački signali se mogu menjati slično promenama koje se dešavaju u sinapsama. Veza između bioloških i veštačkih neuronskih mreža je prikazana u tabeli 2.7.

Tabela 2.7. Veza između bioloških i veštačkih neuronskih mreža

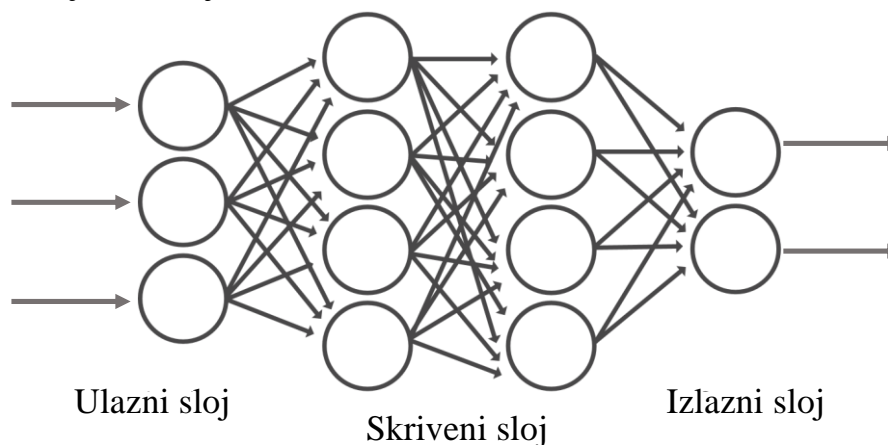
Bioška	Veštačka
Telo ćelije	Neuron
Dendriti	Ulaz
Osa-Akson	Izlaz
Sinapsa	Težina
Mala brzina	Velika brzina
Mnogo neurona	Malo neurona (stotine)

Procesuiranje podataka u veštačkom neuronu je prikazano na slici 2.10. Podaci dolaze do neurona koji ih procesuiraju uz pomoć težinskih koeficijenata (W_1 , W_2) u izlaze. Ulazni podaci mogu biti sirovi ili izlazi iz drugih neurona.



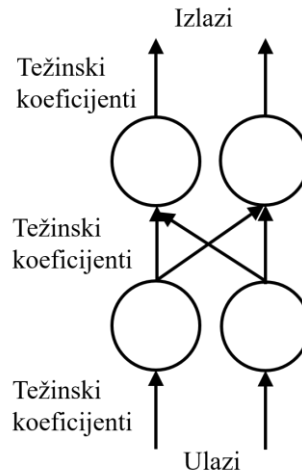
Slika 2.10. Veštački neuron

Neuronska mreža se sastoji od neurona koji čine slojeve: ulazni, izlazni sloj i skriveni sloj između njih. Na slici 2.11 dat je primer mreže sa dva skrivena sloja. Slojevi su povezani težinskim koeficijentima koji su označeni strelicama na slici 2.12.



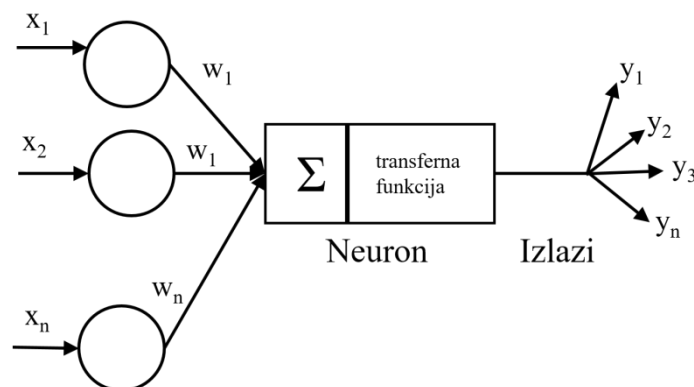
Slika 2.11. Mreža sa dva skrivena sloja

Neuronska mreža uči putem treninga na osnovu poznatih izlaznih veličina podešavajući težinske koeficijente kako bi predvidela izlaze. Kada više ne dolazi do promene težinskih koeficijenata, smatra se da je mreža obučena (Kröse i sar., 1993). Učenje ANN se svodi na učenje iz primera kojih bi trebalo da bude što više da bi mreža bila preciznija u kasnijoj primeni.



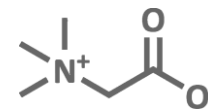
Slika 2.12. Prostiranje težinskih koeficijenata između neurona

Na slici 2.13. prikazan je jedan od paralelnih procesa obrade signala. Neuron sabira ulazne vrednosti pomnožene sa odgovarajućim težinskim koeficijentima, pa ih propušta kroz transfernu funkciju. Transferna funkcija može biti: stepenasta, polu-linearna i S-oblika (Kröse i sar., 1993). Ova funkcija sadrži uslov (threshold), koji ako je zadovoljen omogućava prolaz signala i ta vrednost predstavlja izlaz iz neurona.



Slika 2.13. Deo veštačke neuronske mreže

Ustaljeni algoritam za obučavanje ANN je algoritam povratnog prostiranja (eng. Back Propagation Algorithm, APP). Cilj APP je da procesuirati veliki broj slučajeva kroz neuronsku mrežu u fazi treninga, kako bi se obezbedio najbolji kvalitet izlaza u odnosu na postojeće ulaze. Ulaz je poznati uzorak podataka koji se prenosi preko skrivenog sloja u izlazni sloj. U izlaznom sloju se minimizuje razlika najmanjih kvadrata između stvarnog i predviđenog izlaza. Greška se minimizuje tako što se modifikuju težinski koeficijenti. Kada



su uslovi tačnosti ispunjeni algoritam prestaje sa ponavljanjem procesa. Da bi to bilo moguće mreža mora da koristi bias. On se lako može shvatiti ako se poistoveti sa odsečkom u jednačini prave, dakle prava bi bez njega uvek prolazila kroz koordinatni početak. Tako, bias omogućava da se modifikuje transferna funkcija kako bi se smanjila greška predviđanja ANN.

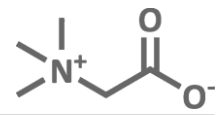
Neuronske mreže predstavljaju veoma atraktivnu oblast istraživanja i postoje brojne oblasti u kojima se koriste, npr. medicini, upravljanju sistemima, vremenskoj prognozi, naučnim istraživanjima. O. Popescu i sar. (2001) su jedni od prvih istraživača koji su koristili ANN kako bi modelovali i regulisali dinamiku procesa ekstrudiranja prehrambenog ekstrudera. Ganjyal i sar. (2003) su takođe koristili ANN da bi istražili uticaje procesnih parametara na željene izlaze ekstrudera u prehrambenoj industriji. Shihani i sar. (2006) su u svojoj studiji poredili metodu odzivne površine sa ANN. Pri tome, ANN su se pokazale bolje u predviđanju izlaznih parametara kao što su specifična mehanička energija, ekspanzija, moć upijanja vode i senzorske karakteristike. Oni su koristili pšenično i sojino brašno u odnosu 95:5 koje su ekstrudirali u jednopužnom ekstruderu tako što su varirali temperaturu, početnu vlažnost materijala i brzinu obrtanja puža. Na sličan način su Shankar i sar. (2010) koristili genetski algoritam i metodu odzivne površine kako bi pronašli optimalni protok napojne smeše. Oni su varirali procesne promenljive kao što su brzinu obrtanja puža, odnos dužine i prečnika cevi ekstrudera, temperaturu u pužnici i početnu vlažnost smeše.

S obzirom na gore navedeno u ovom doktoratu je korišćen centralni kompozitni rotacioni plan kako bi se selektovao najmanji mogući broj eksperimenata da bi se razvio model koji predviđa izlazne promenljive ekstrudiranja. U sledećem koraku su upoređeni modeli koji su se koristili za predviđanje izlaza, a to su ANN i polinom drugog stepena. I pored duge tradicije korišćenja ANN i RSM niko nije otišao korak dalje i iskoristio genetski algoritam kako bi optimizovao dva sukobljena izlazna parametra, tj. funkcije. Ova praznina u literaturi koja se odnosi na ekstrudere u prehrambenoj industriji treba da se popuni jer tokom ekstrudiranja ne postoji samo jedan željeni izlaz uvek ima više međusobno suprotstavljenih izlaza koji utiču na globalni optimum. Tako da je jedan od ciljeva ove disertacije formiranje *Pareto* skupa optimalnih nedominantnih rešenja kako bi operatoru bio olakšan posao odabira željenog rešenja u datoj situaciji.

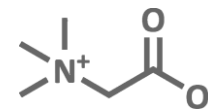
Treba napomenuti da je višeciljni genetski algoritam već korišćen pri optimizaciji kod ekstrudera koji se koristi u procesima ekstrudiranja prilikom oblikovanja aluminijuma (Bakhtiari i sar., 2016). I pored toga ova studija je inovativna jer prvi put koristi ovaj algoritam za ekstrudere u prehrambenoj industriji.

2.6.4. Višeciljna optimizacija

Višeciljna optimizacija podrazumeva da je rešenje vektorska veličina. Skup *Pareto*-optimalnih vektora predstavlja skup optimalnih tačaka, tj. rešenja takvih da se jedno rešenje ne može poboljšati, a da se drugo ne pokvari. Genetski algoritam je vrlo prikladan za problem više - ciljnih optimizacije zbog toga što istovremeno radi sa čitavom populacijom rešenja, a ne samo jednim rešenjem. Genetski algoritam je stohastička tehnika koja se zasniva na teoriji evolutivnih algoritama (Goldberg i sar., 1989).



Bez obzira na dugi uspeh upotrebe odzivne površine i ANN-a, pretragom literature, nije pronađeno istraživanje koje se odnosi na proces prehrambenog ekstrudiranja u kojem je primenjena analiza višeciljne optimizacije u kombinaciji sa ANN i genetskim algoritmom. Ovaj jaz u literaturi treba popuniti jer u procesu ekstrudiranja postoje konfliktne željene funkcije (izlazi). Na primer, uobičajeni slučaj je da maksimalni sadržaj izabranog jedinjenja u finalnom proizvodu predstavlja prvu željenu funkciju u odnosu na potrošnju energije (tj. druga željena funkcija je minimalna energija). Dakle, glavni cilj ove studije jeste da se reši problem višeciljne optimizacije i predstavi više optimalnih rešenja dobijenih prilikom procesa ekstrudiranja.



3. EKSPERIMENTALNI DEO

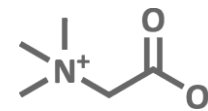
3.1. Materijal

3.1.1. Sirovine

Neidentifikovana sorta spelta pšenice poreklom iz Austrije korišćena je u ovoj studiji za dobijanje brašna. Sorta je gajena u 2015. i 2016. godini pod ekološkim uslovima gajenja na gazdinstvu „ Jeftić ”, Bačko Gradište, Vojvodina, Srbija. Pre mlevenja uzorci su oljušteni na ljuštilici (Heger tip DS I 400S, Herrensberg D-7033, Nemačka). Oljuštena zrna su zatim mlevena na mlinu (A 500 MSM KOMBI Getreide Mühle, Osttiroler Getreidemühlen, Stribach-Dölsach A-9991, Austrija) u brašno od celog zrna. Sadržaj vlage u brašnu je bio 9,62%. Anhidrovani betain je korišćen kao suplement (98% čistoće, AlfaAesar GmbH&KG, Karlsruhe, Nemačka). Kada je reč o uzorcima žitarica i pseudožitarica korišćenih za validaciju metode najveći deo materijala je nabavljen iz lokalnih marketa i prodavnica prehrambenih proizvoda u Novom Sadu. Uzorci ispitivanih žitarica u zrnju su komercijalni uzorci domaćeg porekla prikupljeni iz Laboratorije za ispitivanje prehrambenih proizvoda i hrane za životinje Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu. Uzorci amarantusa su nabavljeni od lokalnog proizvođača. Bezglutenski keks obogaćen melasom dobijen je eksperimentalno i detalji njegove pripreme su opisani u publikaciji Filipčev i sar. (2015c).

3.1.2. Hemikalije i reagensi

Acetonitril i metanol su bili *UHPLC* čistoće (PanReac AppliChem (Barselona, Španija). 10 mM rastvor amonijum acetatnog pufera je pripremljen korišćenjem amonijum acetata (99% čistoće, Lach-Ner, Neratovice, Češka) i ultra čiste vode koja je proizvedena korišćenjem Simplicity UV system (Millipore Bedford, MA, Amerika). Vrednost pH je podešena korišćenjem koncentrovane sirćetne kiseline ili rastvora amonijum hidroksida i konačno je pufer filtriran kroz membranski filter prečnika pora 0,45 mm (Millipore). Test kitovi za određivanje rezistentnog skroba i oštećenja skroba nabavljeni su od proizvođača Megazyme (Bray, Irska).



3.2. Određivanje hemijskog sastava speltinog integralnog brašna

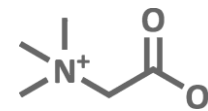
Osnovni hemijski sastav (sadržaj sirovih proteina, masti, pepela i vlage) određen je prema metodama propisanim u Pravilniku o metodima fizičkih i hemijskih analiza za kontrolu kvaliteta žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzo smrznutih testa („Sl. list SFRJ“, 1988). Sadržaj sirovih proteina određen je metodom po Kjeldahlu, masti po Weibull-Stoldt, vlage i pepela gravimetrijski.

3.3. Proizvodnja flips proizvoda ekstrudiranjem

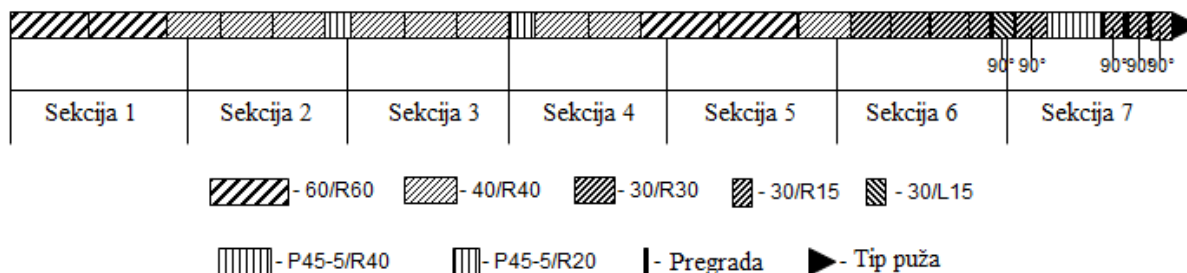
Betain je pre ekstrudiranja samleven na laboratorijskom mlinu čekićaru opremljenim sitom od 0,8 mm (Retsch SK1, Retsch GmbH, Haan, Germany). Brašno spelte je umešano sa betainom (dodato 9% na masu brašna) u dvoosovinskoj, lopatastoj mešalici laboratorijskog vakuum zamašćivača, model F-6-RVC (Forberg International AS, Norveška), zapremine 6 L. Suva smeša je ekstrudirana primenom dvopužnog ekstrudera Bühler BTKS 30/28D (Bühler, Uzwil, Švajcarska) sa 7 zona, dužine cevi od 880 mm i odnosa dužina/prečnik=28:1, sa pužnicama koje se međusobno uklapaju i rotiraju u istom smeru (Slika 3.1).



Slika 3.1. Dvopužni ekstruder Bühler BTKS 30/28D



Korišćena je posebna konfiguracija pužnica za direktno ekspanzirane proizvode (šema na slici 3.2).



Slika 3.2. Šematski prikaz korišćene konfiguracije pužnica i segmenata od kojih je konfiguracija sastavljena.

R - označava element koji transportuje materijal ka napred; L -označava element koji transportuje materijal ka nazad; P - označava element za mešanje i gnječenje materijala; Prvi broj u oznaci segmenta - korak navoja segmenta izražen u milimetrima; Drugi broj - dužina segmenta u milimetrima. Spejser – platna.

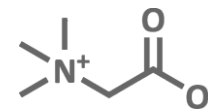
Regulacija temperature zona cevi ekstrudera izvedena je primenom uređaja za kontrolu temperature sa vodom kao fluidom za razmenu toplote (Regloplas P140 smart, Regloplas, St. Gallen, Švajcarska): zone 2 – 4 temperatura 60 °C, 6 – 7 temperatura 120 °C. Korišćena je matrica otvora 4 mm, sa konusnim ulazom materijala radi promovisanja ekspanzije proizvoda. U zonu 2 ekstrudera uvođena je voda kako bi se podesila vlaga materijala na željeni nivo. Protok materijala (15, 20 i 25 kg/h), brzina obrtanja pužnice (250, 500 i 750 o/min) i vlažnost polaznog materijala (15, 20 i 25 %) su varirani tokom ekstrudiranja.

Ekstruder je opremljen vodenom pumpom za direktno dodavanje vode u zonu za punjenje i time je omogućena promena sadržaja vlage u materijalu. Protok vode je podešen prema protoku materijala i početnoj vlagi speltinog integralnog brašna (9,58%) u cilju da se dobije željena vlaga koja je predložena eksperimentalnim planom. Početna vlaga speltinog integralnog brašna je određena korišćenjem brzog vlagomera (MB45, Ohaus, New Jersey, USA). Senzori za merenje temperature i pritiska matrice su postavljeni na izlazu. Svi parametri ekstrudiranja uključujući temperature, pritisak matrice, opterećenje motora ekstrudera izraženo kao obrtni moment, i specifičnu mehaničku energiju su direktno ispisivani na PLC ekranu ekstrudera. Kako bi se postigla krajnja dužina ekstrudata broj obrtaja noža bio je konstantan i podešen na 450 obrtaja u minuti.

3.4. Određivanje sadržaja betaina u uzorcima žitarica, pseudožitarica i njihovim proizvodima

3.4.1. Ekstrakcija betaina iz uzoraka

Postupak ekstrakcije se sastojao od suspendovanja 2 g prethodno dobro samlevenog i homogenizovanog uzorka, u 25 mL metanola. Uzorak je 10 min homogenizovan na vorteksu i podvrgnut polučasovnoj ekstrakciji u ultrazvučnom kupatilu (ATU Ultrasonidos, Španija). Nakon toga, kiveta sa uzorkom je snažno promućkana i centrifugirana 10 min na 5000 o/min (Eppendorf Centrifuge 5804R). Tri mililitra gornjeg metanolskog sloja je odvojeno i upareno



do suva. Ostatak je rekonstituisan u 2 mL vode i filtriran kroz membranski filter (regenerisana celuloza, veličina pora 0,22 mm, prečnika 25 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, Amerika).

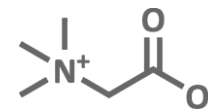
3.4.2. Kvantifikacija betaina metodom tečne hromatografije visokih performansi

Analiza betaina je izvedena na hromatografu *HPLC* system Agilent (Agilent Technologies Inc., SAD) opremljenim kolonom Kinetex®HILIC (Phenomenex, Nemačka) dimenzija (2,6 μ m, 100 x 2,1 mm) i *ELSD* detektorom (1290 Infinity *ELSD*, Agilent Technologies, SAD), (Slika 3.3). Protok mobilne faze je bio 0,5 mL/min. Mobilnu fazu je činio rastvor acetonitrila i 10 mM acetatnog pufera pH 3,7 (80% acetonitrila i 20% pufera). Korišćen je izokratski režim rada. Ukupno vreme određivanja je bilo 10 min. Zapremina injektovanja je bila 5 μ L, a način injektovanja automatski. Temperatura injektora je bila temperatura okoline. Detektor je bio podešen prema sledećim parametrima: temperatura isparivača 40 °C, raspršivača 55 °C, brzina protoka gasa 1,60 SLM.

Anhidrovani betain čistoće 98% je korišćen kao kalibracioni standard. Sve analize su rađene u duplikatu (Kojić i sar., 2017).



Slika 3.3. *HPLC* system Agilent sa *ELSD* detektorom



3.5. Određivanje fizičkih karakteristika ekstrudata

3.5.1. Nasipna masa flips proizvoda

Nasipna masa flips proizvoda određena je primenom uređaja za određivanje nasipne mase (Tonindustrie, West und Goslar, Nemačka). Merenje nasipne mase rađeno je u 3 ponavljanja.

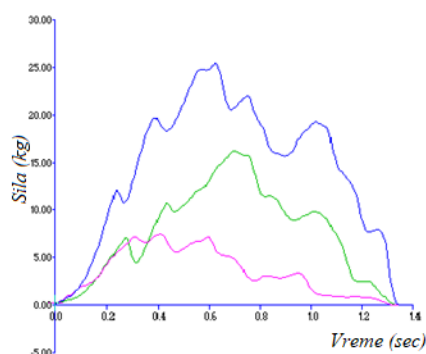
3.5.2. Stepen ekspanzije flips proizvoda

Prečnik 20 granula izmeren je pomičnim, kljunastim merilom (MIB Messzeuge GmbH, Spangenberg, Nemačka). Stepen ekspanzije (SE) određen je računski kao odnos prečnika ekstrudata i prečnika matrice.

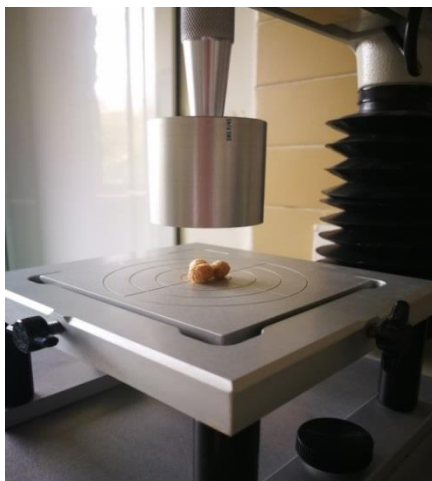
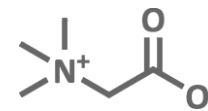
3.6. Instrumentalno određivanje teksturnih svojstava flips proizvoda

Tvrdoća flips proizvoda određivana je dijametralnom kompresijom na analizatoru teksture TA-XT2 Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Surrey, Velika Britanija) prema metodi opisanoj od Svihus-a i sar. (2004). Na slikama 3.4. i 3.5. je prikazan primer krivih dobijenih na uređaju za jedan od uzoraka, kao i izvođenje analize korišćenjem cilindrične sonde.

Tvrdoća flips proizvoda je određena prema modifikovanom metodu (dry catfood_CTF1_P35). Iz svakog uzorka uzeto je 15 ekstrudata, a po 3 pojedinačna ekstrudata su postavljena horizontalno na ravnu podlogu uređaja i potom komprimovana cilindričnom sondom od nerđajućeg čelika prečnika 45 mm, pri opterećenju od 50 kg i sili okidanja od 100 g. Tvrdoća predstavlja silu pri kojoj dolazi do prvog loma ekstrudata, a koja predstavlja maksimum na dobijenoj krivoj zavisnosti sile od vremena (Slika 3.4). Tvrdoća uzorka izražena je kao srednja vrednost 15 merenja i izražena je u kilogramima. Parametri podešavanja instrumenta tokom testa su bili sledeći: brzina pre merenja – 2,0 mm/sec; brzina tokom merenja – 1 mm/sec; brzina nakon merenja – 10 mm/sec, put sonde: 2,5 mm.



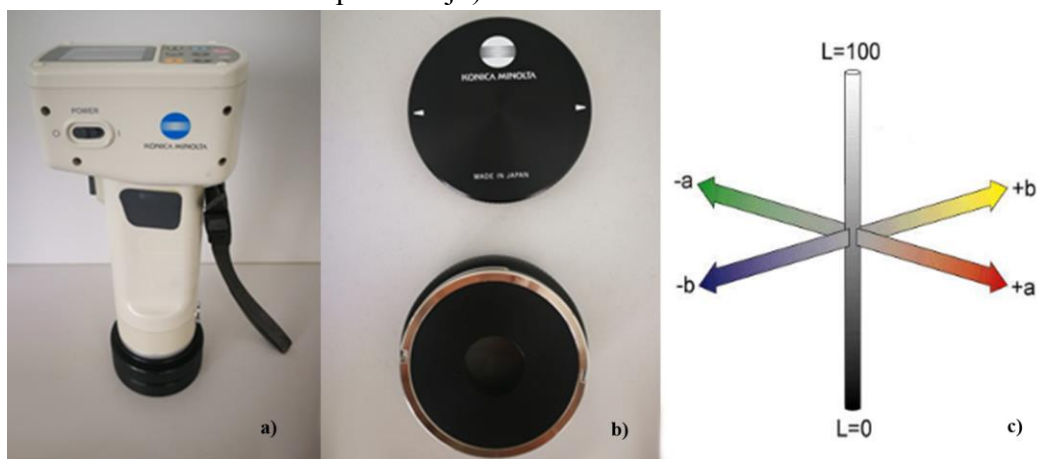
Slika 3.4. Tipičan izgled grafika prilikom određivanja čvrstoće flips proizvoda



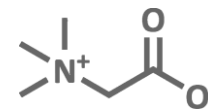
Slika 3.5. Prikaz cilindrične sonde postavljene iznad flips uzorka

3.7. Instrumentalno određivanje boje flips proizvoda

Boja integralnog speltinog brašna sa dodatkom betaina i samlevenih proizvedenih flips proizvoda određena je u deset ponavljanja upotrebom kolorimetra Minolta Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) i odgovarajućeg nastavka (CR-A50), prilagođenog za merenja ovakve vrste uzoraka (Slika 3.6b). Pre merenja izvršena je kalibracija kolorimetra standardom bele boje. Rezultati su prezentovani prema CIELab sistemu boja (Slika 3.6a), 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).



Slika 3.6. a) Merenje boje flips proizvoda pomoću kolorimetra Minolta Chroma Meter; b) nastavak CR-A50; c) Prikaz CIELab sistema boja



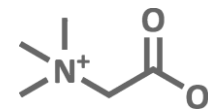
3.8. Određivanje indeksa apsorpcije vode i indeksa rastvorljivosti u vodi

Indeks apsorpcije vode (engl. Water Absorption Index, WAI) i indeks rastvorljivosti u vodi (engl. Water Solubility Index, WSI) su određeni prema metodi Anderson i sar. (1970) opisanoj u radu Lazou i Krokida (2010). U izmerenu epruvetu za centrifugu od 15 mL dodato je 5 mL destilovane vode i 0,2 g samlevenog uzorka koji je odmeren sa preciznošću od 1 mg. Nakon mešanja uzorka na vortex mešaču 2 min uzorak je centrifugiran 20 minuta na 5000 g (g-relativna centrifugalne sila što odgovara 6300 o/min). Supernatant je dekantovan u tariranu posudu za isparavanje. Istaloženi deo uzorka je izmeren i WAI (g/g) je izračunat kao:

$$WAI = \frac{\text{masa istaloženog uzorka (g)}}{\text{masa uzorka (g SM)}}$$

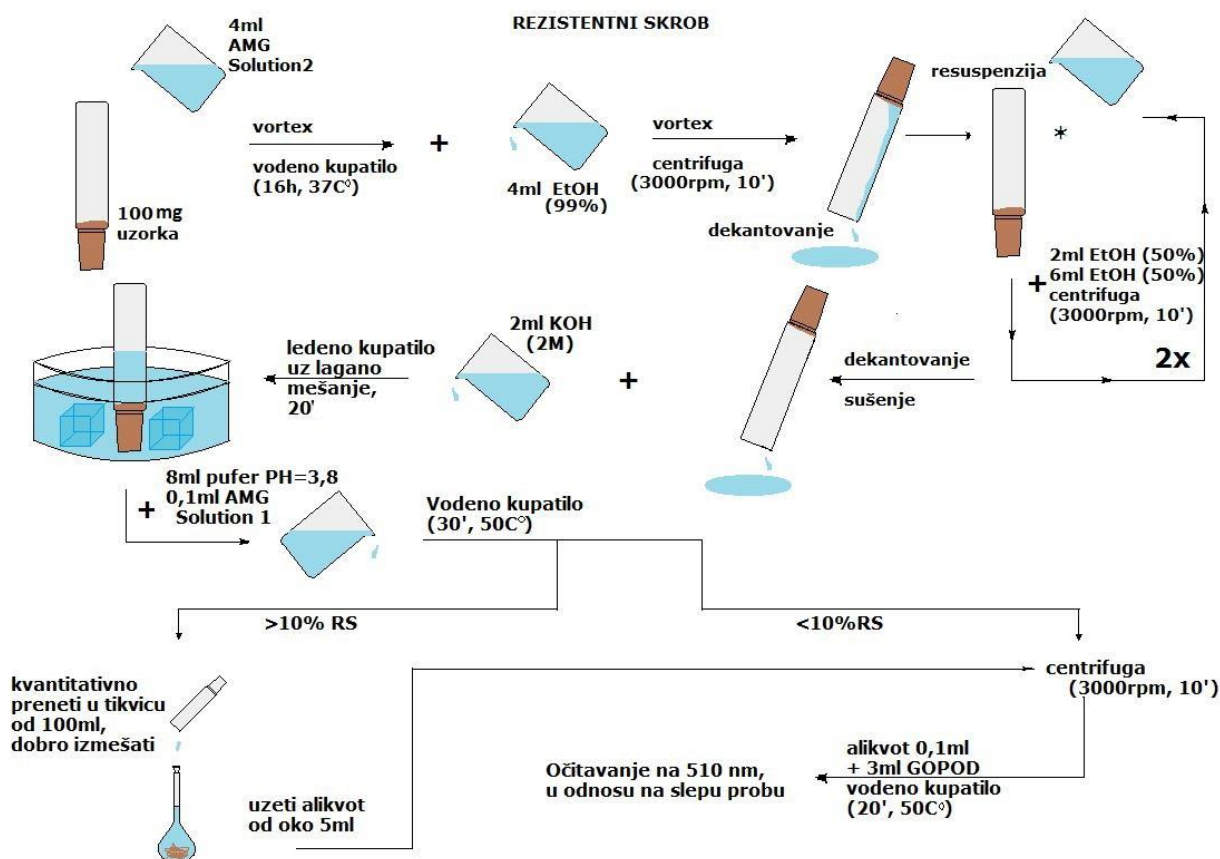
Indeks rastvorljivosti u vodi (WSI) je određen iz količine suve materije nakon uparavanja supernatanta (g/100 g):

$$WSI = \frac{\text{masa rastvorene čvrste materije u supernatantu (g)}}{\text{masa uzorka (g SM)}} \cdot 100$$



3.9. Određivanje udela rezistentnog skroba

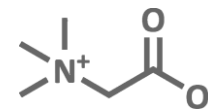
Na Slici 3.7. prikazana je šema određivanja udela rezistentnog skroba (RS) metodom AOAC 2002.02



Slika 3.7. Šema određivanja udela rezistentnog skroba metodom AOAC 2002.02

Da bi se odredio rezistentni skrob, uzorci su inkubirani u vodenom kupatilu sa tresilicom uz dodatak pankreasne α -amilaze i amiloglukozidaze (AMG) 16 sati na 37 °C i pH 6,0. Tokom tog vremena nerezistentni skrob je rastvoren i kombinovanim delovanjem dvaju enzima hidrolizovan do glukoze. Reakcija je prekinuta dodatkom etanola nakon čega je rezistentni skrob (RS) centrifugiranjem izdvojen u obliku taloga pri 3000 o/min tokom 10 minuta. Dobijeni RS ispran je dva puta etanolom (50% v/v), uz centrifugiranje (3000 o/min, 10 min). Supernatant je dekantovan, a talog RS-a je rastvoren u 2M KOH snažnim mešanjem u ledenom kupatilu na magnetnoj mešalici tokom 20 minuta. Rastvor je neutralizovan acetatnim puferom (pH 3,8) nakon čega je skrob kvantitativno hidroliziran do glukoze delovanjem AMG-a (30 min, 50 °C).

Za uzorke koji sadrže više od 10% RS uzorak je kvantitativno prenet u odmernu tikvicu (100mL) i razblažen destilovanom vodom do 100mL i nakon toga centrifugiran (3000 o/min, 10 min), dok su uzorci koji imaju manje od 10% RS odmah centrifugirani bez razblaživanja.



Udeo glukoze određen je spektrofotometrijski na talasnoj dužini 510 nm, nakon reakcije s glukoza oksidaza-peroksidaza-aminoantipirin (GOPOD) reagensom, a iz dobijene vrednosti izračunat je udeo *RS*-a u uzorku.

Proračun:

Uzorci koji sadrže -> 10% RS:

$$RS = \frac{\Delta E \times F \times 100}{0,1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} = \Delta E \times \frac{F}{W} \times 90$$

Uzorci koji sadrže -< 10% RS:

$$RS = \frac{\Delta E \times F \times 10,3}{0,1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} = \Delta E \times \frac{F}{W} \times 9,27$$

gde je:

ΔE - razlika apsorbance uzorka i apsorbance slepe probe,

F - konverzija apsorbance u μg (odredi se apsorbancu za 100 μg glukoze u reakciji sa GOPOD i računa: $F = 100$ (μg glukoze) / apsorbancu GOPOD sa 100 μg glukoze),

10.3/0.1 - korekcija zapremine (0.1 mL uzet iz 10.3 mL),

100/0.1 - korekcija zapremine (0.1 mL uzet iz 100 mL),

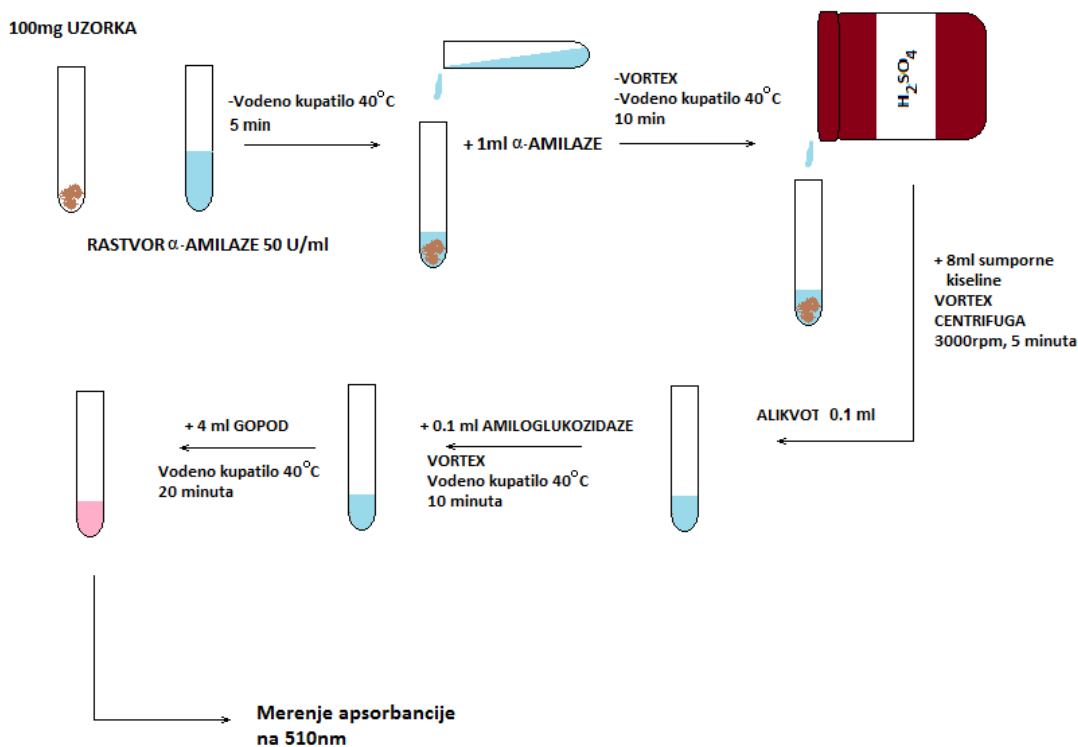
1/1000 - konverzija μg u mg,

W - masa suve materije uzorka,

162/180 - faktor koji pretvara slobodnu glukozu, koja se detektuje, u bezvodnu glukozu koja se nalazi u skrobu.

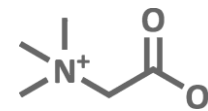
3.10. Određivanje udela oštećenog skroba

Određivanje udela oštećenog skroba metodom AACC 76-31.01 prikazano je na slici 3.8.



Slika 3.8. Određivanje udela oštećenog skroba metodom AACC 76-31.01

Stepen oštećenosti skroba definiše se kao procenat skroba, u odnosu na masu uzorka, koji je podložan enzimskoj hidrolizi. Princip metode zasniva se na hidrataciji i hidrolizi oštećenih skrobnih granula uzorka pomoću fungalne α -amilaze pri 40 °C tokom 10 minuta. Ovakvi uslovi omogućavaju gotovo potpunu hidrolizu oštećenih skrobnih granula i minimalnu razgradnju neoštećenih granula. Enzimaska hidroliza prekinuta je nakon 10 minuta dodatkom razblažene sumporne kiseline. Uzorak je centrifugiran, a alikvot supernatanta (sadrži maltooligosaharide i α -granične dekstrine) tretiran amiloglukozidazom. Nastala glukoza sa glukoza oksidaza-peroksidaza reagensom (GOPOD) stvara obojenje, čiji je intenzitet određen spektrofotometrijski.



Stepen oštećenosti skroba izračunat je prema formuli:

$$SD(\%) = \Delta E \times F \times 90 \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} = \Delta E \times \frac{F}{W} \times 8,1$$

gde je:

SD - stepen oštećenosti skroba (%),

ΔE - razlika apsorbance uzorka i apsorbance slepe probe,

F - konverzija apsorbance u μg (odredi se apsorbancu za 150 μg glukoze u reakciji sa GOPOD i računa: $F = 150$ (μg glukoze) / apsorbancu GOPOD sa 150 μg glukoze),

90 - korekcija zapremine (0,1 mL uzet iz 9,0 mL),

1/1000 - konverzija μg u mg,

W – masa uzorka [mg],

162/180 - faktor koji pretvara slobodnu glukozu, koja se detektuje u bezvodnu glukozu koja se nalazi u skrobu.

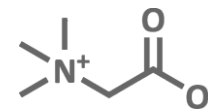
3.11. Određivanje reoloških svojstava flips proizvoda

Reološka svojstva uzorka ispitana su reometrom HAAKE Mars, Thermo Scientific, Nemačka. Praćenje promene viskoziteta tokom želatinizacije izvedeno je uz pomoć sledećeg pribora: posude cilindra Z43S koji je nazubljen kako bi se sprečilo proklizavanje materijala u toku merenja i propelerskog rotora FL2B (Slika 3.9) specijalno konstruisanog za skrobne suspenzije, sa prorezima koji poboljšavaju mešanje i sprečavaju taloženje na dnu posude.

Ovim testom ispitivane su 15% suspenzije uzorka (računato na masu osušenog uzorka) pri čemu je količina dodate destilovane vode bila 60 mL. Suspenzije su temperirane na 25 °C u trajanju od 3 min, a zatim zagrevane do 95 °C brzinom od 1,5 °C/min, nakon čega je temperatura održavana konstantnom (95 °C) u toku 15 min, da bi ponovo bila spuštena na 25 °C brzinom od 1,5 °C/min. Brzina smicanja propelera u toku merenja je iznosila 10 s⁻¹. Kako bi se sprečilo isparavanje vode u toku merenja, korišćena je zaštita od isparavanja ("solvent trap" za Z40 geometriju).



Slika 3.9. Propelerski rotor FL2B



Dobijena je kriva promene viskoziteta u funkciji vremena i temperature sa koje su očitani sledeći parametri:

1. Početni viskozitet na 25 °C koji označava viskozitet suspenzije na početku faze grejanja (PV).
2. Maksimalni viskozitet na 95 °C tj. viskozitet suspenzije pri kojem je većina granula dostigla maksimum bubrenja (MV).
3. Finalni viskozitet na 25 °C koji označava viskozitet hladne paste (FV).
4. Temperatura početka želatinizacije tj. temperatura u trenutku porasta viskoziteta usled početka bubrenja skrobnih granula (T_g) (Kokić, 2017).

3.12. Senzorska ocena flips proizvoda pomoću panela treniranih ocenjivača

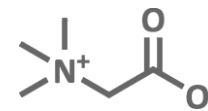
Šest treniranih panelista, između 25 i 50 godina starosti, sa Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, učestvovalo je u ispitivanju senzorskih svojstava flips proizvoda. Panelisti su imali više od 4 godine iskustva u radu kako sa komercijalnim proizvodima, tako i sa proizvodima razvijanim u okviru naučno-istraživačkih projekata. Njihov trening je obuhvatao vežbe u identifikaciji, razvoju terminologije i ocenjivanju intenziteta senzorskih atributa. Panelisti su prošli dodatni trening o flips proizvodima za potrebe ove studije. Održane su dve dvočasovne sesije da bi se uspostavila senzorska terminologija za ispitivane flips proizvode. U početku, panelisti su koristili termine iz prethodno publikovanih radova sa sličnim tematikom (Lazou i sar., 2010; Lazou i Krokida, 2010; Paula i Conti-Silva, 2014), ali im je rečeno da su oni samo početna tačka i da mogu da zadrže, obrišu ili dodaju bilo koji termin. Konsenzus pristup je korišćen kako bi se dozvolila dalja diskusija nakon svakog uzorka i da bi se uspostavili deskriptori. Vođa panela vodio je diskusiju o svakom deskriptoru u cilju određivanja pogodnosti termina, definicija i tehnika ocene.

Panel je odabrao 10 deskriptora za opis senzorskog profila flips proizvoda, od kojih su 2 atributa služila za opis izgleda, 2 za opis ukusa i 2 za opis teksture. Nakon dogovora koji deskriptori će se koristiti, panel je ocenio sve uzorke po intenzitetu. Ocena intenziteta izvedena je korišćenjem nestrukturirane linearne skale sa tačkama 0 – neprimetno i 100 – veoma intenzivno. S obzirom da je predviđeno da se kreirani flips proizvodi konzumiraju nakon potapanja u mleko, senzorska ocena se sastojala iz dva dela.

U prvom delu ocenjeno je 6 odabranih atributa na flips proizvodima pre potapanja u mleko (Slika 10a). U drugom delu, 5 g flips proizvoda je potopljeno u 50 mL mleka (1,5% mlečne masti) na sobnoj temperaturi, bez mešanja (Slika 10b). Na slici 3.11. (c) prikazan je panel utreniranih ocenjivača u radu. Nakon 5 min, atributi koji opisuju ukus i teksturu su ponovo ocenjeni. Destilovana voda poslužena je za čišćenje usta između uzoraka tokom ocene. Ocena je sprovedena u laboratoriji za senzorska ispitivanja sa odgovarajućom kontrolom uslova okoline (ISO, 2007).



Slika 3.10. Senzorska ocena flips proizvoda: a) referentni uzorci i pribor za ocenjivanje; b) šifrirani uzorci nakon potapanja u mleko; c) panel utreniranih ocenjivača u radu



4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Optimizacija ekstrudiranja spelte sa dodatim betainom

4.1.1. Uticaj ekstrudiranja na sadržaj betaina u flips proizvodu i potrošnju specifične mehaničke energije

Ovaj deo ispitivanja bavio se utvrđivanjem uticaja parametara ekstrudiranja kao što su brzina obrtanja pužnice ekstrudera (n), protok materijala (Q) i sadržaj vlage materijala (V) na sadržaj betaina (B) u flips proizvodu od speltinog integralnog brašna kao i na potrošnju specifične mehaničke energije (SME). Pri tome su kontrolisani i pritisak na matrici (PM), obrtni momenat (OM), temperatura na matrici (TM). Dodata količina betaina pre ekstrudiranja je bila 9%, a karakteristike speltinog integralnog brašna su sledeće: sadržaj vlage 9,58; pepela 2,05%; proteina 14,21% i sadržaj masti 2,3%.

Sadržaj betaina u uzorcima tokom ovog dela ispitivanja određen je razvijenom i validovanom metodom tečne hromatografije visokih performansi sa *ELSD* detektorom, koja će detaljno biti prikazana u poglavlju 4.3.

Prema regulativi evropskog udruženja cerealija za doručak (European Breakfast Cereal Association) porcija ekstrudiranog proizvoda trebalo bi da bude veličine 40 g. U našim preliminarnim istraživanjima pri dodatku 1% betaina na masu speltinog integralnog brašna utvrđeno je da se sadržaj betaina nakon ekstrudiranja kretao u opsegu 60,63-79,53 mg/40 g uzorka. Iz toga se zaključuje da prilikom formulisanja flips proizvoda od speltinog integralnog brašna koji bi potencijalno bio nosilac zdravstvene izjave o povoljnom uticaju na metabolizam homocisteina treba dodati betain u količini 6,25- 8,52% na masu brašna. Radi pronalaženja optimalnog rešenja dodat je betain u količini od 9% na masu brašna. Konačno sadržaj betaina u našem finalnom funkcionalom proizvodu kretao se u opsegu 1248-1543mg/40g. Konzumiranjem porcije od 40 g u kojoj se nalazi 1500 mg betaina po danu, trebalo bi da se poboljša ljudska ishrana i time zadovolji potreba ljudi za ovim nutrijentom.

U tabeli 4.1 prikazani su eksperimentalni podaci sa procesnim parametrima i odzivnim promenljivama procesa, pri ekstrudiranju brašna od spelte sa betainom dobijeni planom eksperimenta - central kompozit dizajn.

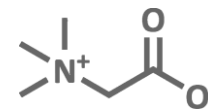
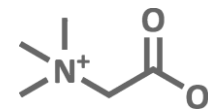


Tabela 4.1. Eksperimentalni dizajn sa procesnim parametrima i odzivnim promenljivama procesa, dobijenih pri ekstrudiranju brašna od spelte sa betainom

CCD broj	<i>Q</i>	<i>n</i>	<i>V</i>	<i>B</i>	<i>PM</i>	<i>OM</i>	<i>SME</i>	<i>TM</i>
	(kg/h)	(RPM)	(%)	(mg/40 g)	(bar)	(N m)	(Wh/kg)	(°C)
	Procesne promenljive			Odzivne promenljive				
1	20	500	20	1434,9	14,8	66,0	153	151,0
2	20	250	20	1543,1	32,8	92,4	104,8	135,0
3	17	350	17	1332,8	25	66,0	140,1	151,0
4	20	750	20	1496,1	12,7	81,4	213	159,0
5	20	500	20	1400,0	13,4	66,0	152,6	151,0
6	17	350	23	1290,0	21,8	77,0	142,33	133,0
7	17	650	17	1390,0	0,7	50,6	197,6	161,0
8	20	500	25	1331,2	16,1	63,8	136,1	130,0
9	25	500	20	1366,5	26,3	77	140,6	152,0
10	17	650	23	1321,2	0,6	57,2	179,8	146,0
11	15	500	20	1248,0	6	55	171	153,0
12	23	650	23	1298,2	5,9	68,2	161,3	147,0
13	20	500	20	1420,0	13,2	66	152,2	151,0
14	20	500	15	1461,3	18,3	57,2	151,8	168,0
15	23	650	17	1508,3	12,9	77,98	209,8	160,0
16	23	350	23	1466,4	28,4	94,6	127,3	133,0
17	23	350	17	1504,1	34	99	143,7	141,0

CCD - centralni kompozitni plan; *Q* - protok materijala; *n* - brzina obrtanja pužnice; *V* - vlaga polaznog materijala; *B* - betain; *PM* - pritisak na matrici; *OM* - obrtni momenat; *SME* - specifična mehanička energija; *TM* - temperatura na matrici



4.1.2. Analiza varijanse i SOP model

ANOVA analiza je urađena radi dobijanja SOP (eng. Second Order Polynomial Approximation) modela, koji opisuju odzivne promenljive, i da bi se ispitali uticaji svih procesnih parametara na odzivne promenljive (Tabela 4.2).

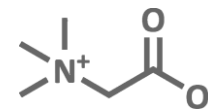
Tabela 4.2. Analiza varijanse za odzivne promenljive B , PM , OM , SME i TM

	df	PM	TM	OM	SME	B
Q	1	330,5 ⁺	10,0	1164,6 ⁺	345,1	30266,0 ⁺
Q^2	1	0,3	0,2	3,1	129,4	21465,4 ⁺
n	1	1108,8 ⁺	679,9 ⁺	751,8 ⁺	10396,3 ⁺	1746,2
n^2	1	71,3 ^{**}	48,9	714,0 ⁺	227,4	11496,2 ⁺
V	1	28,2	1015,6 ⁺	15,3	838,9 [*]	24499,1 ⁺
V^2	1	3,3	21,2	23,2	7,7	1610,9
$Q \times n$	1	0,5	12,5	18,7	3,3	7960,6 [*]
$Q \times V$	1	10,8	18,0	126,2	304,2	2320,9
$n \times V$	1	0,4	0,5	12,0	339,7	4918,4 [*]
Greška modela	5	134,5	107,8	253,1	783,3	5770,2

df - broj stepeni slobode; B - betain; PM - pritisak na matrici; OM - obrtni momenat; SME - specifična mehanička energija; TM - temperatura na matrici; ⁺ Statistički značajno na nivou $p < 0,01$; ^{*} Statistički značajno na nivou $p < 0,05$; ^{**} Statistički značajno na nivou $p < 0,10$

Na osnovu rezultata ANOVA-e, u SOP modelu za izračunavanje sadržaja betaina najviše uticajan je bio linearni član Q , statistički značajan na nivou $p < 0,01$. Uticajnost promenljive Q takođe se ogleda i preko kvadratnog člana Q ($p < 0,01$) i nelinearnog člana proizvoda $Q \times n$, statistički značajnog na nivou $p < 0,05$. Linearni član V i kvadratni član n takođe su pokazali vrlo značajan uticaj u SOP modelu za računanje B , statistički značajni na nivou $p < 0,01$, kao i član proizvoda $n \times V$, koji je pokazao statistički značajan uticaj na nivou $p < 0,05$. Q ima takođe najveći uticaj na izračunavanje OM , statistički značajno na nivou $p < 0,01$. Linearni član n je najuticajniji u SOP modelima za izračunavanje PM i SME , dok je linearni član V najuticajniji u SOP modelu za izračunavanje TM , $p < 0,01$ (Tabela 4.2).

Ispitivanje adekvatnosti modela na osnovu poklapanja eksperimentalnih vrednosti i rezultata modela prikazana je u Tabeli 4.3. Iz tabele se vidi da su vrednosti r^2 bliske 1, dok vrednosti χ^2 , $RMSE$, MBE i MPE gravitiraju oko 0, što ukazuje na dobro poklapanje rezultata razvijenih modela sa eksperimentalnim vrednostima. Takođe je izvršena rezidualna analiza razvijenih SOP modela. Ova analiza je pokazala da su srednje vrednosti reziduala jednaki nuli, a standardne devijacije (StD) bile su u rasponu od 2,595 do 18,990. Štaviše, ovi rezultati su pokazali dobro poklapanje sa normalnom raspodelom oko nule sa verovatnoćom od 95% ($2 \times StD$), što pokazuje dobre sposobnosti razvijenog modela za generalizacijom, na opsegu posmatranih eksperimentalnih vrednosti (parametar skewnessa je pokazao minimalno odstupanje od normalne raspodele, prikazavši vrednosti između -0,555 do 0,469, dok je parametar kurtosis pokazao razlike u visinama "pikova" u odnosu na normalnu raspodelu, u granicama od -0,592 do 0,780. Iz Tabele 4.3. može se zaključiti da su razvijeni modeli



pokazali statistički beznačajno odstupanje od eksperimentalnih vrednosti, čime je potvrđena njihova podobnost da reprezentuju eksperimentalna merenja.

Tabela 4.3. Testovi za ispitivanje adekvatnosti modela i rezidualna analiza razvijenih SOP modela

	Adekvatnost modela					Rezidualna analiza				
	χ^2	<i>RMSE</i>	<i>MBE</i>	<i>MPE</i>	r^2	<i>Skew</i>	<i>Kurt</i>	<i>Mean</i>	<i>StD</i>	<i>Var</i>
<i>PM</i>	11,212	0,184	0,000	58,525	0,920	0,469	0,526	0,000	2,900	8,409
<i>TM</i>	8,982	0,058	0,000	1,289	0,943	0,390	0,780	0,000	2,595	6,736
<i>OM</i>	21,096	0,046	0,000	4,036	0,922	-0,319	-0,247	0,000	3,978	15,822
<i>SME</i>	65,275	0,295	0,000	3,486	0,941	-0,555	-0,010	0,000	6,997	48,956
<i>B</i>	480,850	3,667	0,000	1,112	0,954	-0,449	-0,592	0,000	18,990	360,638

χ^2 - redukovani χ^2 kvadrat test; *RMSE* - koren srednje vrednosti kvadrata greške; *MBE* - srednje greške biasa; *MPE* - srednje vrednosti procentualne greške; r^2 - koeficijent determinacije; *Skew* - odstupanje rezidualnih vrednosti od normalne raspodele; *Kurt* - odstupanje rezidualnih vrednosti od "nazubljenosti" normalne raspodele; *Mean* - srednja vrednost; *StD* - standardna devijacija; *Var* – varijansa

4.1.3. Veštačka neuronska mreža

Sve promenljive koje su učestvovalе pri formiranju SOP modela za predviđanje odzivnih promenljivih, takođe su korišćene i za modelovanje veštačkom neuronskom mrežom (ANN modeliranje). Optimalni broj skrivenih neurona odabran je tehnikom minimiziranja razlika između eksperimentalnih vrednosti i vrednosti izlaza predviđenih ANN-om, korišćenjem sume kvadratnih grešaka tokom ciklusa testiranja, koja je korišćena kao indikator performanse mreže. Na osnovu rezultata, utvrđeno je da je optimalan broj neurona u skrivenom sloju za proračun *B*, *OM*, *SME*, *PM* i *TM* bio 4. Testiran je kvalitet poklapanja modela sa eksperimentalnim vrednostima, ispitana je i rezidualna analiza razvijenog modela što je predstavljeno u Tabeli 4.4.

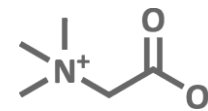
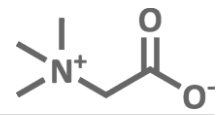


Tabela 4.4. Testovi za ispitivanje adekvatnosti modela i rezidualna analiza razvijenog ANN modela

	Adekvatnost modela					Rezidualna analiza				
	χ^2	<i>RMSE</i>	<i>MBE</i>	<i>MPE</i>	r^2	<i>Skew</i>	<i>Kurt</i>	<i>Mean</i>	<i>StD</i>	<i>Var</i>
<i>PM</i>	7,949	2,369	-0,283	75,281	0,947	0,655	0,051	-0,283	2,424	5,877
<i>TM</i>	6,192	2,091	0,026	1,195	0,961	-0,699	-0,255	0,026	2,155	4,644
<i>OM</i>	12,126	2,926	-0,020	3,327	0,955	0,097	-0,521	-0,020	3,016	9,094
<i>SME</i>	79,208	7,477	0,003	4,176	0,929	-1,338	2,392	0,003	7,708	59,406
<i>B</i>	214,738	12,312	-1,087	0,670	0,980	-0,052	0,450	-1,087	12,641	159,799

χ^2 - redukovani χ^2 kvadrat test; *RMSE* - koren srednje vrednosti kvadrata greške; *MBE* - srednje greške biasa; *MPE* - srednje vrednosti procentualne greške; r^2 - koeficijent determinacije; *Skew* - odstupanje rezidualnih vrednosti od normalne raspodele; *Kurt* - odstupanje rezidualnih vrednosti od "nazubljenosti" normalne raspodele; *Mean* - srednja vrednost; *StD* - standardna devijacija; *Var* – varijansa

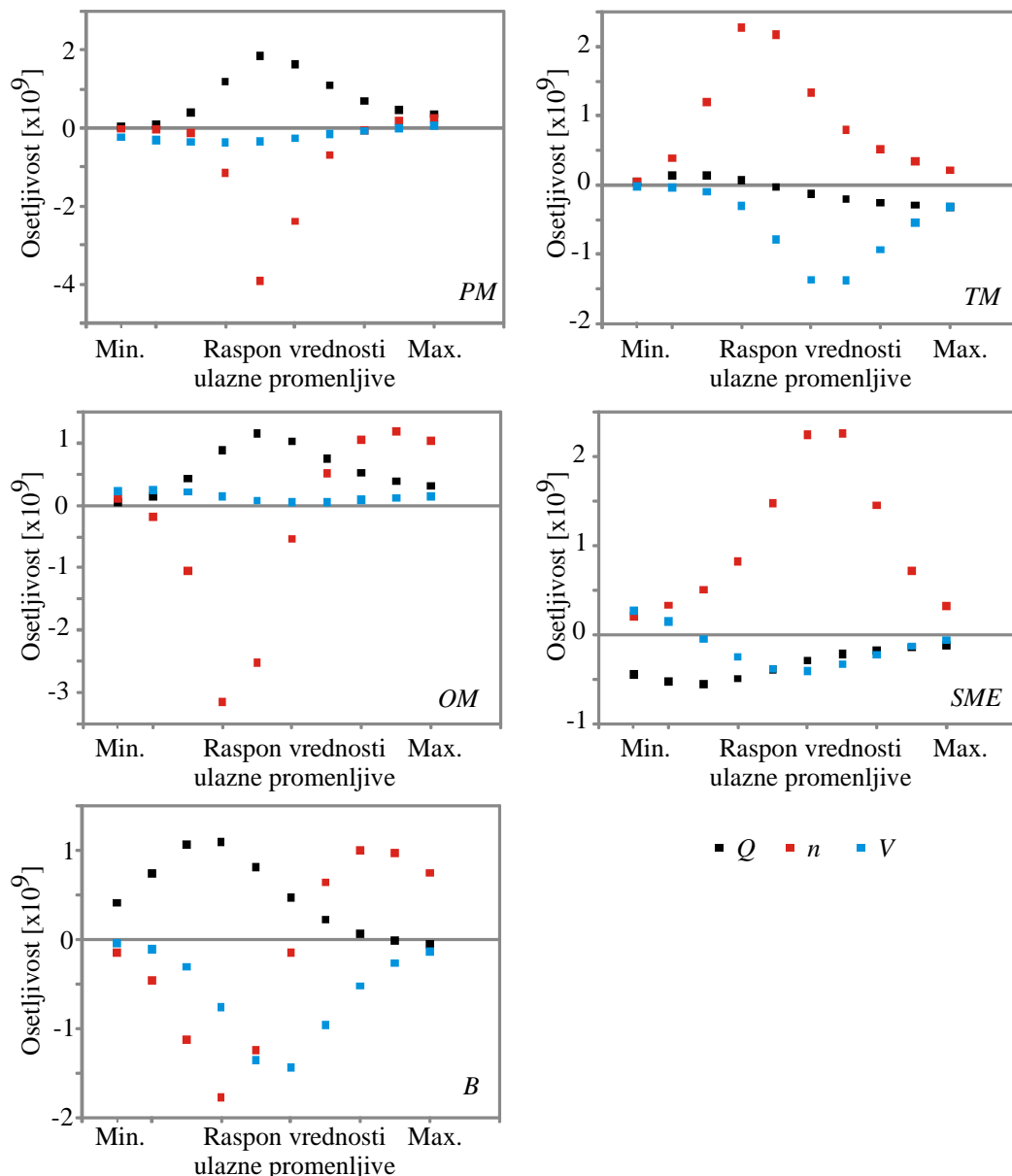
Kada se uporede testovi adekvatnosti SOP i ANN modela, kao i rezidualne analize iz Tabela 4.3. i 4.4, može se zaključiti da ANN model bolje predviđa eksperimentalne vrednosti od SOP modela.



4.1.4. Analiza osetljivosti

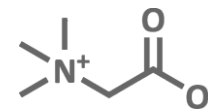
4.1.4.1. Lokalna analiza osetljivosti za ANN model

Uticaj parametara procesa na izlaze je već detaljno razmatran u prethodnim poglavljima, ali ANN model pruža dodatno tumačenje ovih uticaja. Uticaj ulaznih promenljivih u ANN model (Q , n i V) na izlazne promenljive (B , OM , TM , PM , SME), odnosno promene izlaznih promenljivih izazvane infinitezimalnim promenama ulaznih promenljivih, prikazane su na slici 4.1.



Slika 4.1. Analiza osetljivosti - uticaj ulaznih promenljivih na izlazne promenljive

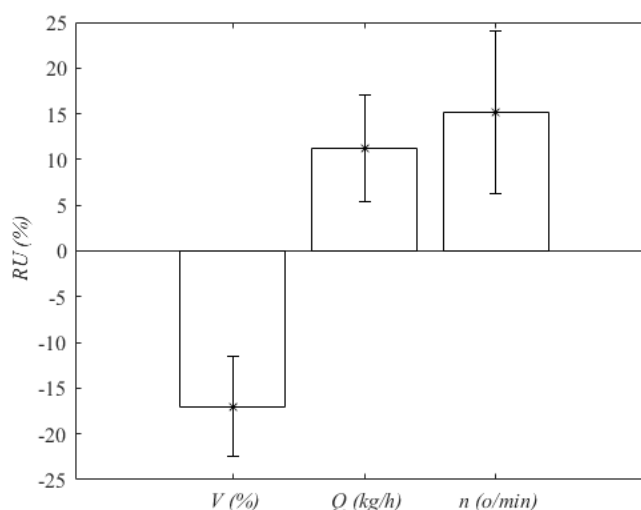
Sa slike 4.1. se može videti da na promene PM i OM uglavnom negativno utiču mala promene n na sredini ulaznog prostora (550 obrtaja u minuti), dok je uticaj Q pozitivan, posebno na sredini ulaznog prostora (19 kg/h). Na promenu SME pozitivno utiče infinitezimalna promena n , u sredini ulaznog prostora (550 obrtaja u minuti) dok na TM



pozitivno utiče n , u blizini minimuma ulaznog prostora (350 obrtaja u minuti). Na TM negativno utiču male promene V na sredini ulaznog prostora (19%). Na B pozitivno utiču infinitezimalne promene Q u blizini minimuma ulaznog prostora (15 kg/h), ali i male promene n , u blizini maksimuma ulaznog prostora (650 obrtaja u minuti). Na B negativno utiče mala promena n i V , na sredini ulaznog prostora. Zaključci koji su dobijeni analizom osetljivosti su u skladu sa PCA i $ANOVA$ analizom, kao i sa eksperimentalnim merenjima.

4.1.4.2. Globalna analiza - Yoonov model

U ovom odeljku analizirane su zajedno dve najznačajnije izlazne veličine tokom procesa ekstrudiranja: betain i specifična mehanička energija, SME (Slika 4.2). Glavni cilj ovog rada bio je što veći sadržaj betaina u flips proizvodima preostao nakon ekstrudiranja. SME je odličan kvantitativni parametar koji u sebi objedinjuje sledeće veličine Q , n , OM (Ibanoglu i Ainsworth, 2010).



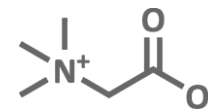
Slika 4.2. Yoonov model uticaja procesnih parametara na betain i SME

Sa slike 4.2. se može zaključiti da su V i n najuticajniji parametri na sadržaj betaina i SME sa 17% i 15%, respektivno, dok Q ima uticaj od 12%. Q i n su pokazali pozitivan uticaj na B i SME , dok V ima negativan uticaj na B i SME .

Baik i sar. (2004) su utvrdili da povećanje brzine pužnice povećava potrošnju SME , a to pripisuju povećanom smicajnom naponu. Iz slike 4.2. vidi se da se sa povećanjem n povećava i SME , tako da su ovi rezultati u saglasnosti sa rezultatima navedenih autora. Meng i sar. (2010) su takođe zaključili da linearni član n ima signifikantni uicaj na SME .

Povećanjem vlažnosti materijala redukuje se potrošnja SME i napon smicanja u ekstruderu, što uslovljava smanjenje stepena želatinizacije skroba (Ilo i sar., 1996).

U našim rezultatima povećanjem V i smanjenjem viskoznosti i trenja, dolazi do niže potrošnje SME , što je u saglasnosti sa gore navedenim rezultatima prikazanim na Yoonovom grafiku (Slika 4.2). Sadržaj betaina u flips proizvodu i SME rastu sa povećanjem Q . Veća SME obično rezultuje većim stepenom želatinizacije skroba i SE (stepen ekspanzije), što je



poželjno za ovakvu vrstu proizvoda (Meng i sar., 2010). Ova analiza je veoma bitna da bi se kasnije razumela višeciljna optimizacija.

4.1.5. Višeciljna optimizacija

Jedan od ciljeva ove teze bila je višeciljna optimizacija procesa ekstrudiranja kako bi se dobio maksimalan sadržaj betaina u flips proizvodu pri minimalnoj potrošnji *SME*. Prethodno razvijena ANN metoda preko Levenberg Marquardta modela je iskorišćena da bi se uspostavila najpreciznija interpolacija između ulaznih i izlaznih veličina. Prilikom optimizacije ulazni procesni parametri koji odgovaraju izlazima na *Pareto* grafiku su razmatrani samo u eksperimentalnom opsegu. Broj generacija u višeciljnoj optimizaciji bio je 475, dok je veličina populacije bila 50 za svaku ulaznu promenljivu. Ulazne nezavisno promenljive (procesni parametri) koje odgovaraju tačkama prikazanim na *Pareto* grafiku su predstavljene u Tabeli 4.5. Broj tačaka na *Pareto* grafiku bio je 43 i praćena je zavisnost *SME* od *B* (Slika 4.3).

Tabela 4.5. Procesni parametri koji odgovaraju optimalnim rešenjima *B* i *SME* na *Pareto* grafiku

Vlažnost materijala u cevi ekstrudera (%)	Protok materijala, Q (kg/h)	Broj obrtaja pužnice, n (o/min)	Sadržaj betaina (mg/40g)	<i>SME</i> (Wh/kg)
18,6030	20,4549	250,0123	1601,6	97,4
15,0309	24,9912	250,0449	1806,0	155,7
16,0976	24,9833	250,1292	1802,6	143,5
18,8624	21,7956	250,2709	1674,7	100,1
15,3768	24,9838	250,0482	1805,0	152,1
15,9520	24,9662	250,1261	1803,0	145,3
18,1571	24,9826	250,2302	1794,2	124,6
16,4728	24,9831	250,0499	1801,3	139
19,3366	23,8631	250,4186	1760,6	113
16,2020	24,9662	250,1261	1802,1	142,3
18,6658	22,2407	250,0948	1705,3	103,5
18,8853	22,6739	250,0221	1721,6	105,5
19,2160	21,6129	250,1144	1653,1	99,2
15,6003	24,9724	250,0927	1804,2	149,6
15,1648	24,9913	250,1891	1805,5	154,4
17,2979	24,964	250,1254	1797,9	130,3
18,9874	22,2956	250,5209	1699,3	102,4
18,6030	20,4549	250,0123	1601,6	97,4
18,7606	22,0254	250,1405	1691,0	101,7

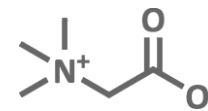
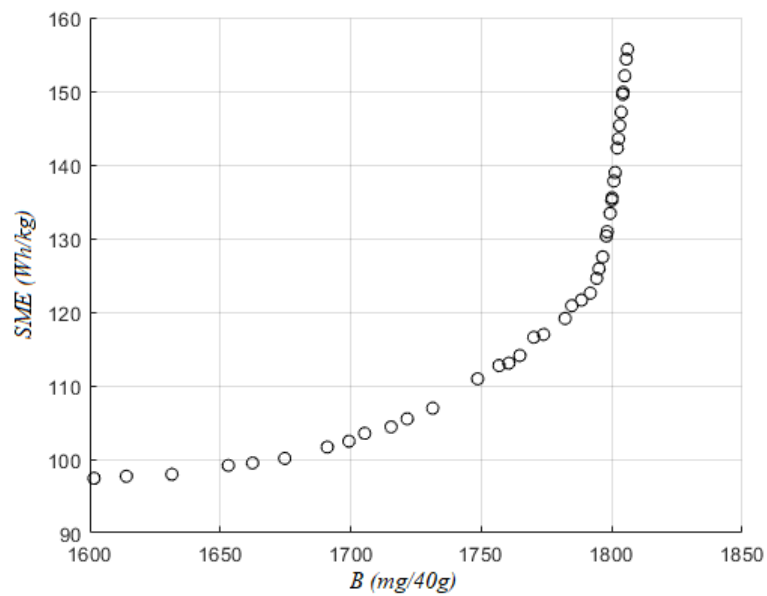
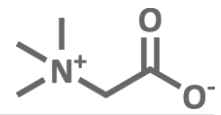


Tabela 4.5. Procesni parametri koji odgovaraju optimalnim rešenjima *B* i *SME* na *Pareto* grafiku (nastavak)

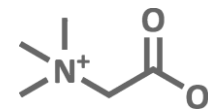
17,6608	24,9846	250,1463	1796,5	127,5
19,1353	22,6739	250,0846	1715,4	104,4
16,5742	24,965	250,112	1800,8	137,8
19,1392	24,5852	250,1483	1782,1	119,1
18,8335	23,5097	250,2566	1756,8	112,7
18,7770	23,2524	250,1224	1748,6	110,9
16,9728	24,9831	250,0499	1799,4	133,4
19,4415	24,0423	250,3367	1764,7	114,1
18,6030	20,9549	250,5123	1631,5	98
17,8983	24,9367	250,0927	1795,1	125,9
16,8012	24,9924	250,1137	1800,0	135,2
18,9816	24,1603	250,449	1773,9	117
18,8624	20,7956	250,2709	1614,0	97,7
20,1392	24,5852	250,1483	1770,1	116,6
15,8012	24,9924	250,1137	1803,6	147,2
18,6608	24,9846	250,1463	1791,8	122,6
18,5493	24,4598	250,1826	1784,7	120,9
16,7741	24,9872	250,1065	1800,1	135,5
15,5739	24,9858	250,1351	1804,3	149,9
17,2330	24,9714	250,1075	1798,2	130,9
19,1047	22,9951	250,1254	1731,4	106,9
18,6571	24,7326	250,2302	1788,4	121,6
15,0309	24,9912	250,0449	1806,0	155,7
19,1658	21,7407	250,0948	1662,4	99,5

Iz Tabele 4.5. može se videti da sa povećanjem Q od 20,5 do 25%, B i SME rastu. Sa druge strane sa povećanjem V od 15,0 do 20,1% sadržaji B i SME opadaju. Broj obrtaja pužnice (n) skoro da ne menja vrednost i iznosi oko 250 o/min, tako da iz ove analize proizilazi da Q i V imaju najviše uticaja na formiranje *Pareto* grafika. Višeciljna optimizacija pokazuje da su sledeći uslovi optimalni, ukoliko želimo dobiti maksimalan sadržaj betaina u flips proizvodu od speltinog integralnog brašna: Q i V treba da imaju vrednosti od 25 kg/h i 15%, dok brzina obrtanja pužnice treba da ima vrednost od 250 obrtaja u minuti. Sadržaj betaina u flips proizvodu je pri ovim uslovima 1806 mg/40 g što je za 17% više nego eksperimentalno postignutim putem (1543,09 mg/40 g), ali je utrošnja energije za 48,57% veća nego u eksperimentu. Ako dodamo uslov da je preporučeni dnevni unos betaina od 1500 mg potreban da bi se osetili uticaji na poboljšanje zdravlja (Commission Regulation (EU) No 432/2012), tada sa grafika možemo izdvojiti sledeća optimalna rešenja: uzorci sa SME od 97,4 do 114,1 Wh/kg i betaina od 1601,6 do 1764,7 mg/40 g kojima odgovaraju sledeći procesni parametri: Q od 20,45 do 24,04 kg/h, V od 18,6 do 19,44% i n od 250 obrtaja u minuti.



Slika 4.3. *Pareto* grafik zavisnosti *SME* (specifičnu mehaničku energiju) od *B* (betaina)

Sa Slike 4.3. uočava se gladak i neprikadan trend *Pareto* rešenja, što dovodi do zaključka da se višeciljna optimizacija može koristiti pri procesu ekstrudiranja.



4.2. Uticaj parametara ekstrudiranja spelte na izlazne parametre

4.2.1. Stepen ekspanzije ekstrudata

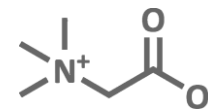
Stepen ekspanzije (*SE*) ekstrudiranih flips proizvoda je najvažniji parametar kada je u pitanju njihova prihvatljivost od strane potrošača. Stepenn ekspanzije u ovim istraživanjima varira između 1,54 i 1,93 (Tabela 4.6).

Tabela 4.6. Eksperimentalne vrednosti odzivnih promenljivih (*TM*, *SME* i *SE*) u procesu ekstrudiranja, pri promeni nezavisnih parametara, po usvojenom eksperimentalnom planu

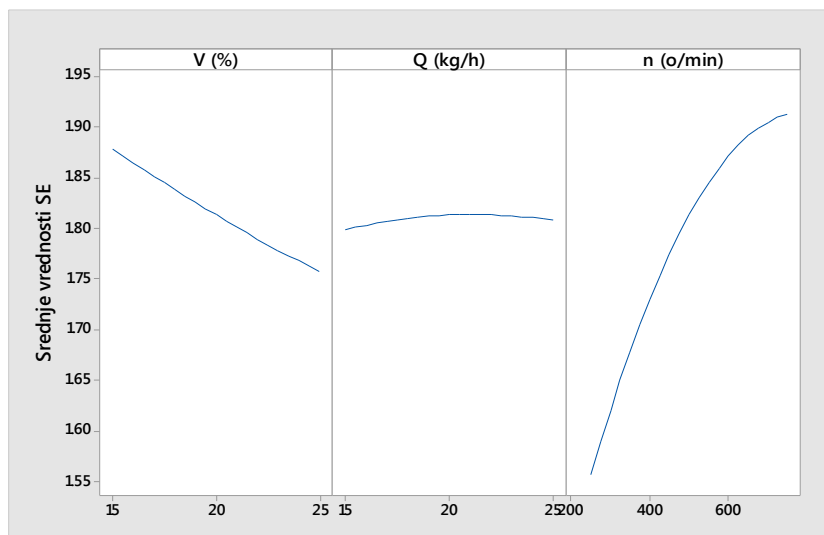
Nezavisno promenjive			Zavisno promenjive		
<i>V</i> (%)	<i>Q</i> (kg/h)	<i>n</i> (o/min)	<i>TM</i> (°C)	<i>SME</i> (Wh/kg)	<i>SE</i>
20	20	500	151	153	1,82
20	20	250	135	104,8	1,54
17	17	350	151	140,1	1,60
20	20	750	159	213	1,93
20	20	500	151	152,6	1,81
23	17	350	133	142,3	1,69
17	17	650	161	197,6	1,90
25	20	500	130	136,1	1,72
20	25	500	152	140,6	1,78
23	17	650	146	179,8	1,88
20	15	500	153	171	1,83
23	23	650	147	161,3	1,86
20	20	500	151	152,2	1,81
15	20	500	168	151,8	1,92
17	23	650	160	209,8	1,89
23	23	350	133	127,3	1,62
17	23	350	141	143,7	1,82

V - vlaga polaznog materijala; *Q* - protok materijala; *n* - brzina obrtanja pužnice; *TM* - temperatura na matrici; *SME* - specifična mehanička energija; *SE* - stepen ekspanzije

Povećanje vlage ulaznog materijala vodi do velikog smanjenja ekspanzije ekstrudata (Ding i sar., 2006). U istom radu je utvrđeno da nema uticaja protoka materijala na stepen ekspanzije, što su pokazali i naši rezultati (Slika 4.4). Harmann i Harper (1973) su pronašli dva najuticajnija faktora bitna za ekspanziju: viskozitet testa i elastične sile u ekstrudatu. Prilikom ekspanzije mehurići rastu na osnovu razlike pritiska u unutrašnjosti mehurića i atmosferskog pritiska na zidu mehurića, kao pogonskom silom, koja se povećava sa pritiskom i temperaturom (Panmanabhan i sar., 1989). Uticaj vlage na *SE* može se objasniti time što testo tokom ekstrudiranja sa višim sadržajem vlage materijala proizvodi niži pritisak pare (verovatno zbog redukcije temperature u bubnju), što dovodi do smanjenja ekspanzije (Hagenimana i sar., 2006). Povećanje sadržaja vode može da omekša amilopektinsku

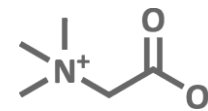


strukturu i redukcijom elastičnih osobina testa dovede do smanjenja ekspanzije ekstrudata (Alvarez-Martinez i sar., 1988). Smanjenje stepena ekspanzije sa povećanjem vlage je zabeleženo u mnogim radovima (Filli i sar., 2012; Ding i sar., 2005; Lazou i sar., 2010; Chakraborty i sar., 2011; Gulati i sar., 2016; Singh i sar., 2007; Diaz i sar., 2015).



Slika 4.4. Uticaji procesnih parametara (V , Q i n) na stepen ekspanzije flips proizvoda

Diaz i sar. (2013) su utvrdili negativnu korelaciju stepena ekspanzije sa sadržajem vlage i pozitivnu korelaciju sa brzinom obrtanja pužnice kod ekstrudata na bazi kukuruza koji su sadržali amarantus i kinou, a što je takođe potvrđeno rezultatima u ovoj tezi. Chávez-Jauregui i sar. (2000) i Coulter i Lorenz (1991) su pronašli da se stepen ekspanzije povećava na većim brzinama obrtanja pužnice za ekstrudate na bazi kukuruza koji sadrže brašno kinoe i amarantusa, respektivno. Da se stepen ekspanzije ekstrudata koji sadrže amarantus i kinou povećava sa povećanjem brzine obrtanja pužnice potvrđeno je i u radu Diaza i sar. (2015). Povećanje brzine obrtanja pužnice tokom ekstrudiranja dovodi do manjeg viskoziteta testa i veće elastičnosti, što doprinosi većoj ekspanziji ekstrudata (Fletcher i sar. 1985; Ding i sar., 2006). U radu Altan i sar. (2009) utvrđen je statistički značajan efekat brzine obrtanja pužnice na ekspanziju ekstrudata ($p < 0.05$). U našim istraživanjima najveći stepen ekspanzije zabeležen je pri najvećim brzinama obrtanja pužnice (750 o/min) i vlažnosti polaznog materijala i protoka materijala od 20% i 20 kg/h.



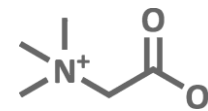
U Tabeli 4.7. prikazana je analiza varijanse za SOP model za predikciju *SE* u procesu ekstrudiranja.

Tabela 4.7. Analiza varijanse za *SE*, za model u obliku polinoma drugog reda (prikazana je suma kvadrata razlika)

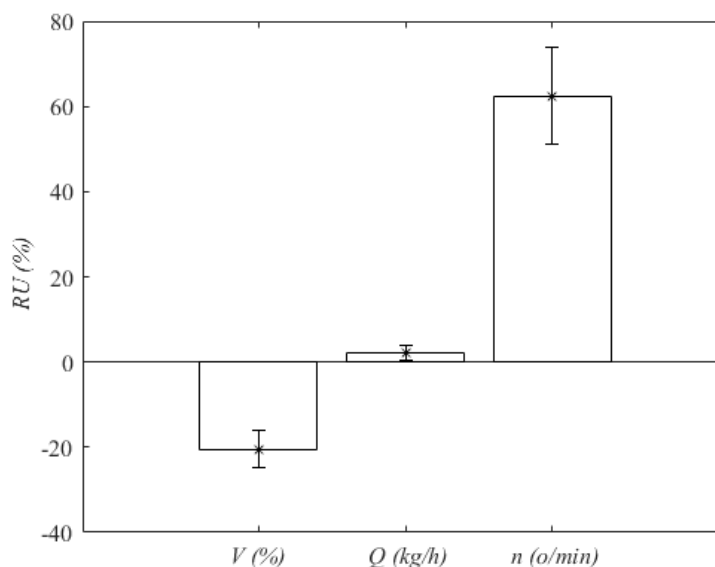
Članovi	<i>df</i>	<i>SE</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>V</i>	1	0,018*	6,606	0,037
<i>V</i> ²	1	0,000	0,015	0,906
<i>Q</i>	1	0,000	0,036	0,854
<i>Q</i> ²	1	0,000	0,049	0,831
<i>n</i>	1	0,155 ⁺	57,072	0,000
<i>n</i> ²	1	0,009	3,332	0,111
<i>V</i> × <i>Q</i>	1	0,011**	4,140	0,081
<i>V</i> × <i>n</i>	1	0,000	0,166	0,696
<i>Q</i> × <i>n</i>	1	0,004	1,490	0,262
<i>Greška</i>	7	0,019		
<i>r</i> ²		0,913		

df – stepen slobode; *F* - Fisher test; *p* - *p* vrednost; ⁺statistički značajno na nivou *p*<0,01; *statistički značajno na nivou *p*<0,05; **statistički značajno na nivou *p*<0,10

U SOP modelu najveći uticaj za izračunavanje *SE* ima linearni član *n*, statistički značajan na nivou *p*<0,01, kao i linearni član *V* (značajan na nivou *p*<0,05), što odgovara istraživanju Filli i sar. (2012), u kome je pokazano da postoje statistički značajni uticaji linearnih članova vlage polaznog materijala i brzine obrtanja pužnice (*p*<0,05) na stepen ekspanzije. Linearni član *Q* nije statistički značajan u ovom SOP modelu. Kvadratni članovi SOP polinoma nisu bili statistički značajni, a mešoviti član proizvoda promenljivih *V* × *Q* u SOP modelu je statistički slabo značajan, na nivou *p*<0,10. Ostali članovi proizvoda u SOP modelu nisu pokazali statističku značajnost. Izračunata vrednost koeficijenta determinacije SOP modela (*r*²), kao i sračunata vrednost greške modela (bliska nuli, što implicira mali ili nikakav uticaj na formiranje modela) garantuje dobru i pouzdanu predikciju *SE* za proces ekstrudiranja, kao i na dobro fitovanje vrednosti SOP modela sa eksperimentalnim podacima za *SE* ekstrudata, (Tabela 4.7).



Yoonov model uticaja procesnih parametara na *SE* dat je na slici 4.5.

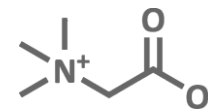


Slika 4.5. Yoonov model uticaja procesnih parametara na *SE*

Iz prikazanog Yoonovog modela može se uočiti da brzina obrtanja pužnice ima najveći efekat na *SE* (približno 60%). Negativan je uticaj vlažnosti materijala na *SE* i pozitivan uticaj brzine obrtanja pužnice, dok za protok materijala nije zabeležen značajan uticaj (Slika 4.5).

U radu Chakraborty i sar. (2011) utvrđen je pozitivan uticaj temperature na matrici na *SE*, što je potvrđeno i našim rezultatima (Tabela 4.11). Gujska i Khan (1991) su saopštili da povećanje temperature utiče na povećanu želatinizaciju skroba i time dovodi do većeg stepena ekspanzije. Pšenično brašno zahteva visoke temperature da bi se dostigla velika ekspanzija, jer se velikom temperaturom favorizuje rast mehurića (Ding i sar., 2006).

Altan i sar. (2009) su utvrdili pozitivnu korelaciju između *SE* i *SME* statistički značajnu na nivou $p < 0,05$. Ryu i Ng (2001) su pronašli da povećanje *SME* tokom ekstrudiranja dovodi do povećanja *SE* kod ekstrudata od pšeničnog brašna i celog zrna kukuruza. Garber i sar. (1997) su zaključili da manja vrednost *SME* rezultuje manjom temperaturom, što dovodi do manje ekspanzije. Manja temperatura rezultuje manjom želatinizacijom, čime se smanjuje ekspanzija. U istraživanjama u okviru ove teze potvrđen je pozitivan uticaj *SME* na stepen ekspanzije (Tabela 4.6).



4.2.2. Nasipna masa ekstrudata

Nasipna masa (*NM*) ekstrudata od kukuruznog griza kreće se u opsegu od 90 do 320 g/L (Ilo i sar., 1996). U radu Jozinović i sar. (2016) dodatak speltinog brašna u kukuruzni griz povećava nasipnu masu, proporcionalno udelu speltinog brašna u poređenju sa ekstrudatima od kukuruznog griza. Prema rezultatima Stojceska i sar. (2008) dodavanje pivskog tropa u ekspanzirane proizvode spremne za doručak dovodi do povećanja *NM*. Slični rezultati su dobijeni u radovima Brnčić i sar. (2009) i Lazou i Krokida (2010). Našim rezultatima je potvrđeno povećanje vrednosti *NM* ekstrudata od speltinog integralnog brašna sa dodatkom betaina u odnosu na ekstrudate od kukuruznog griza.

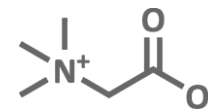
Eksperimentalne vrednosti odzivne promenlje (*NM*) u procesu ekstrudiranja, pri promeni nezavisnih parametara, po usvojenom eksperimentalnom planu prikazane su u Tabeli 4.8. Grafički prikaz uticaja procesnih parametara (*V*, *Q* i *n*) na *NM* flips proizvoda dat je na slici 4.6.

Tabela 4.8. Eksperimentalne vrednosti nasipne mase ekstrudata

<i>V</i> (%)	<i>Q</i> (kg/h)	<i>n</i> (o/min)	<i>NM</i> (g/L)
20	20	500	328,7
20	20	250	478,0
17	17	350	367,0
20	20	750	244,4
20	20	500	333,1
23	17	350	359,1
17	17	650	367,2
25	20	500	380,0
20	25	500	359,1
23	17	650	299,9
20	15	500	321,8
23	23	650	298,7
20	20	500	341,6
15	20	500	324,7
17	23	650	249,8
23	23	350	385,7
17	23	350	380,0

V - vlaga polaznog materijala; *Q* - protok materijala; *n* - brzina obrtanja pužnice; *NM* – nasipna masa

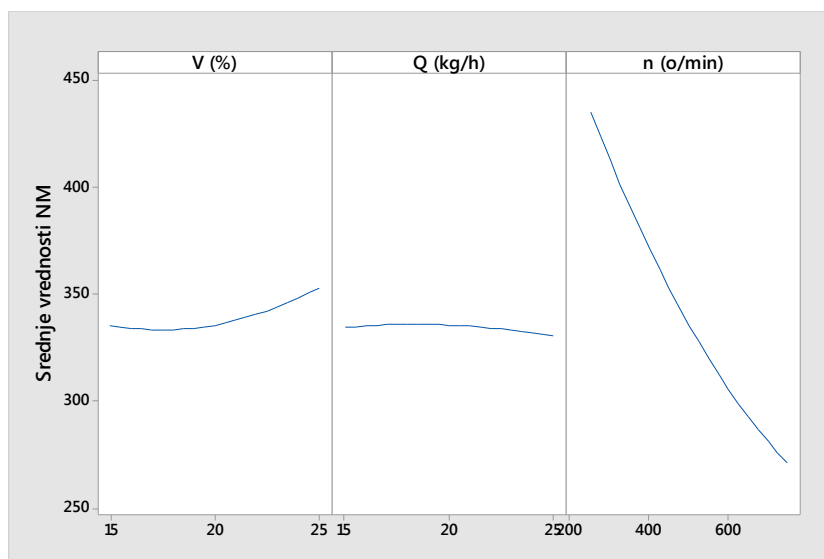
Povećanje brzine obrtanja pužnice rezultuje ekstrudatima sa manjom *NM* (Ding i sar., 2006; Filli i sar., 2012; Gulati i sar., 2016) kako su pokazali i rezultati u Tabeli 4.8. velika brzina obrtanja pužnice smanjuje viskozitet i time povećava elastičnost testa u cevi ekstrudera, što dovodi do smanjenja *NM*. Ovi efekti su i ranije publikovani (Fletcher i sar., 1985). Male brzine obrtanja pužnice dovode do povećanja *NM*, verovatno zbog smanjene želatinizacije skroba (Hagenimana i sar., 2006). Prema istraživanjima Case i sar. (1992) i



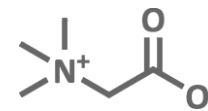
Mercier i Feillet (1975), kako se želatinizacija povećava, zapremina ekstrudata se povećava i *NM* smanjuje. Povećanjem brzine pužnice dolazi do smicanja što utiče na slabljenje veze između proteina i skroba, rezultujući proizvodom većeg *SE* i posledično smanjene *NM*. Takođe je poznato da povećanje stepena ekspanzije uzrokuje smanjenje *NM* kod ekstrudiranih proizvoda (Ding i sar., 2006; Chakraborty i sar., 2011; Gulati i sar., 2016; Singh i sar., 2007).

Povećanje vlažnosti materijala dovodi do povećanja *NM* (Ding i sar., 2005; Liu i sar., 2011; Gulati i sar., 2016), a što je potvrđeno u našoj studiji (Tabela 4.8). Povećanje vlažnosti materijala za vreme ekstrudiranja može da redukuje elastičnost testa, i time redukuje *SME*, a usled toga dovodi do smanjenja želatinizacije, smanjujući *SE* i povećavajući *NM* ekstrudata. Oni su takođe potvrdili da protok materijala nema uticaja na *NM*, a što su pokazali i naši rezultati.

Povećanje temperature povećava zagrevanje vode u cevi ekstrudera i podstiče formiranje mehurića čime dolazi do smanjenja viskoziteta i to vodi do smanjenja *NM* (Chakraborty i sar., 2011). Singh i sar. (2016) su utvrdili veliko smanjenje *NM* sa povećanjem temperature zbog veće potencijalne energije za isparavanje zagrejane vode. Toplota koja se razvije tokom ekstrudiranja može da poveća temperaturu vode iznad tačke ključanja tako da kod ekstrudata koji napuštaju matricu deo vode brzo isparava, što rezultuje expandovanom strukturom i niskom *NM* (Chakraborty i sar., 2011).



Slika 4.6. Uticaji procesnih parametara (*V*, *Q* i *n*) na *NM* flips proizvoda



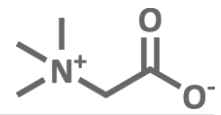
U Tabeli 4.9. prikazana je ANOVA kalkulacija razvijenog SOP modela za odziv *NM* u procesu ekstrudiranja.

Tabela 4.9. Analiza varijanse za nasipnu masu ekstrudata, za model u obliku polinoma drugog reda (prikazana je suma kvadrata razlika)

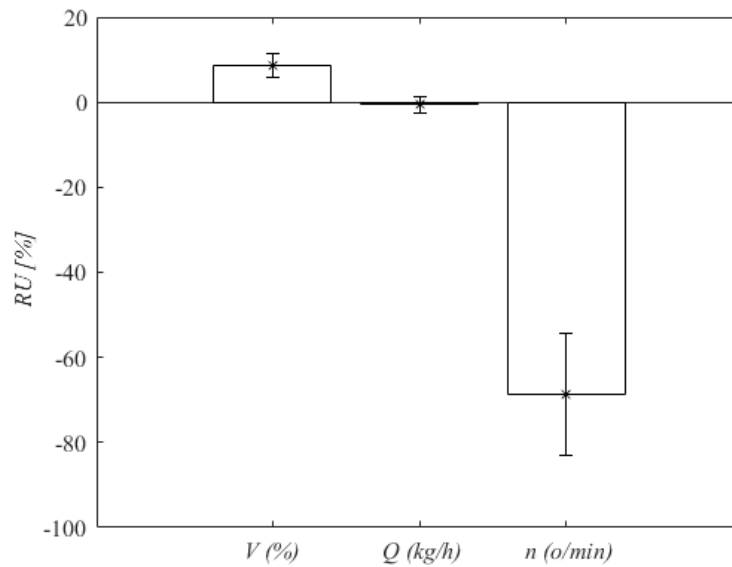
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>V</i>	1	377,84	0,30	0,60
<i>V</i> ²	1	108,53	0,09	0,78
<i>Q</i>	1	20,90	0,02	0,90
<i>Q</i> ²	1	14,44	0,01	0,92
<i>n</i>	1	32675,50 ⁺	25,88	0,00
<i>n</i> ²	1	440,65	0,35	0,57
<i>V</i> × <i>Q</i>	1	2106,01	1,67	0,24
<i>V</i> × <i>n</i>	1	32,81	0,03	0,88
<i>Q</i> × <i>n</i>	1	3128,41	2,48	0,16
<i>Greška</i>	7	8837,98		
<i>r</i> ²		0,82		

df – stepen slobode; *F* - Fisher test; *p* - *p* vrednost; ⁺ statistički značajno na nivou *p*<0,01

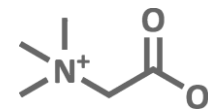
Iz tabele 4.9. se vidi da u SOP modelu za izračunavanje *NM* najveći uticaj ima linearni član *n*, koji je statistički značajan na nivou *p*<0,01. Gulati i sar. (2016) takođe su ukazali na značajnost uticaja parametra *n* na *NM*, a što je u saglasnosti sa našim rezultatima (Tabela 4.9). Ostali linearni i kvadratni članovi, kao i članovi mešovutih proizvoda promenljivih u SOP modelu nisu imali statistički značajan uticaj na izračunavanje *NM*. Visoka vrednost koeficijenta determinacije bliska jedinici, kao i niska vrednost greške modela (koja nije statistički značajna), na osnovu SOP modela, ukazuju na pouzdanu predikciju *NM* za proces ekstrudiranja, i na dobro poklapanje vrednosti *NM* dobijenih ovim modelom sa eksperimentalnim podacima za *NM* ekstrudata.



Iz Yoonovog modela uticaja procesnih parametara na *NM* (Slika 4.7) može se zaključiti da najmanji uticaj ima Q i pozitivan uticaj vlage polaznog materijala. Takođe je Yoonovim modelom potvrđen najveći uticaj n na *NM* koji je negativan.



Slika 4.7. Yoonov model uticaja procesnih parametara na *NM*



4.2.3. Sadržaj rezistentnog skroba

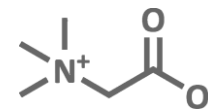
Uticaj procesnih promenljivih tokom ekstrudiranja na sadržaj rezistentnog skroba prikazan je u tabeli 4.10. i na slici 4.8.

Tabela 4.10. Eksperimentalne vrednosti odzivne promenjive *RS* u procesu ekstrudiranja, pri promeni nezavisnih parametara, po usvojenom eksperimentalnom planu

<i>V</i> (%)	<i>Q</i> (kg/h)	<i>n</i> (o/min)	<i>RS</i> (g/100g)
20	20	500	0,94
20	20	250	4,94
17	17	350	4,10
20	20	750	0,23
20	20	500	0,82
23	17	350	1,42
17	17	650	0,43
25	20	500	2,10
20	25	500	1,16
23	17	650	0,48
20	15	500	0,31
23	23	650	0,91
20	20	500	0,61
15	20	500	0,97
17	23	650	0,37
23	23	350	1,54
17	23	350	2,91

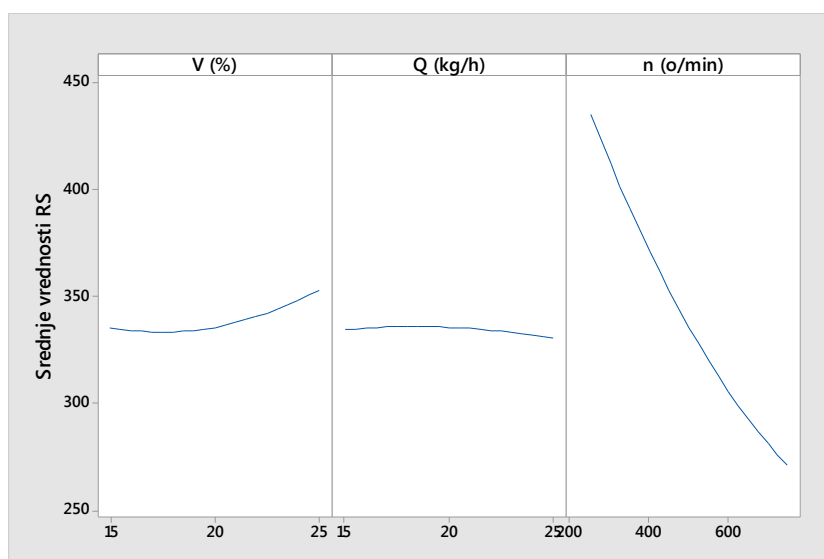
V - vlaga polaznog materijala; *Q* - protok materijala; *n* - brzina obrtanja pužnice; *RS* – sadržaj rezistentnog skroba

Manji broj obrtaja pužnice *n* obezbeđuje uzorke sa većim sadržajem *RS*, u poređenju sa uzorcima ekstrudata dobijenim na većim brzinama obrtanja pužnice. Najverovatnije uzrok ovome je manja degradacija skroba zbog manjeg smicajnog napona na manjim brzinama obrtanja pužnice (Sarawong i sar., 2014). Gonzalez-Soto i sar. (2006) ukazali su takođe da se na nižim *n* u ekstrudiranom kukuruzu i mangu produkuje veći nivo *RS*. Pored toga, duže vreme zadržavanja u cevi ekstrudera pri brzini obrtanja od 200 o/min može biti razlog za veću mogućnost formiranja amiloznih lanaca i posledično su uzrok formiranja *RS*. Sadržaj amiloze je važan faktor koji povećava proizvodnju *RS* tokom procesa ekstrudiranja (Huth i sar., 2000). Pri visokim vrednostima *V*, *RS* se može formirati i povećati usled visokog sadržaja amiloze, verovatno zbog retrogradacije, a sa tendencijom formiranja jakih intermolekularnih vodoničnih veza u frakcijama amiloze (Gonzalez-Soto i sar., 2006). U našoj studiji je najveća vrednost *RS* pronađena pri *V* od 20%, *Q* od 20 kg/h i najmanjoj brzini obrtanja pužnice od 250 o/min (Tabela 4.10). U poređenju sa nativnim speltinim integralnim brašnom sa dodatkom betaina kao kontrolnim uzorkom (sadržaj *RS* je 9,19%), u svim uzorcima vrednosti sadržaja *RS* su niske nakon ekstrudiranja. Naši rezultati su u saglasnosti

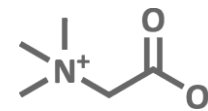


sa rezultatima Martínez i sar. (2014), Faraj i sar. (2004), i Limsangouan i sar. (2010) koji su pronašli da različiti uslovi ekstrudiranja dovode do smanjene količine *RS* u ekstrudiranim proizvodima kada se porede sa neekstrudiranim.

Na slici 4.8. jasno je vidljiva gore navedena tvrdnja da se povećanjem broja obrtanja pužnice dobijaju ekstrudati sa manjim sadržajem *RS*. Povećanje *V* dovodi do većih vrednosti rezistentnog skroba (Sarawong i sar., 2014). Slični rezultati su ranije publikovani za brašno od ječmenog zrna (Vasanthan i sar., 2002) i za ekstrudirano pšenično brašno (Kim i sar., 2006). Isto su pokazali i naši rezultati za speltino integralno brašno kada je u pitanju uticaj vlage polaznog materijala na sadržaj *RS*, dok protok polaznog materijala nema uticaja na sadržaj *RS* (Slika 4.8).



Slika 4.8. Uticaji procesnih parametara (*V*, *Q* i *n*) na sadržaj rezistentnog skroba



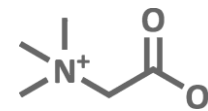
U Tabeli 4.11. prikazana je analiza varijanse za SOP model za predikciju RS u toku procesa ekstrudiranja.

Tabela 4.11. Analiza varijanse za rezistentni skrob, za model u obliku polinoma drugog reda (prikazana je suma kvadrata razlika)

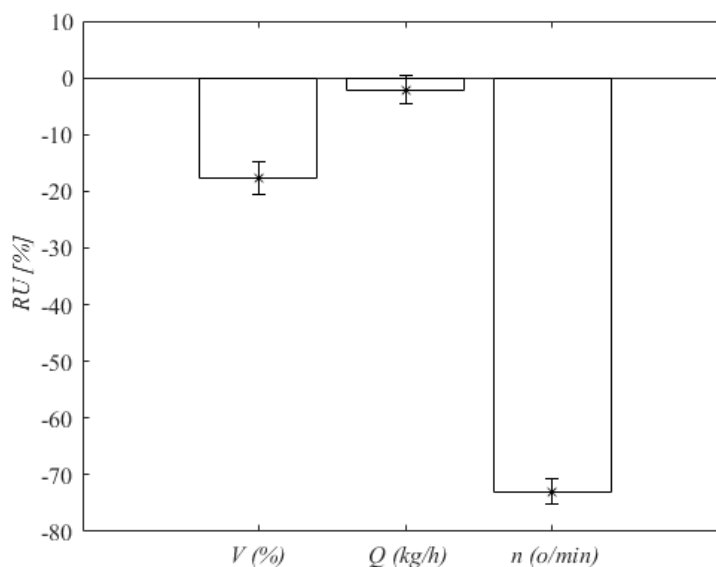
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>V</i>	1	0,183	0,402	0,546
<i>V</i> ²	1	0,583	1,277	0,296
<i>Q</i>	1	0,038	0,083	0,782
<i>Q</i> ²	1	0,037	0,081	0,784
<i>n</i>	1	18,022 ⁺	39,467	0,000
<i>n</i> ²	1	4,073 [*]	8,920	0,020
<i>V</i> × <i>Q</i>	1	0,405	0,887	0,378
<i>V</i> × <i>n</i>	1	2,691 [*]	5,894	0,046
<i>Q</i> × <i>n</i>	1	0,259	0,568	0,476
<i>Greška</i>	7	3,196		
<i>r</i> ²		0,892		

df – stepen slobode; *F* - Fisher test; *p* - *p* vrednost; ⁺ statistički značajno na nivou $p < 0,01$; ^{*} statistički značajno na nivou $p < 0,05$

Prema rezultatima iz Tabele 4.11. očigledno je da najveći uticaj u SOP modelu za izračunavanje RS ima linearni član *n*, statistički značajan na nivou $p < 0,01$. Uticaj *n* na RS se ogleda i preko kvadratnog člana *n* i člana mešovitog proizvoda promenljivih *V* × *n*, koji su statistički značajni na nivou $p < 0,05$. Linearni i kvadratni članovi ostalih promenljivih (*V* i *Q*), kao i članovi mešovitih proizvoda promenljivih (*V* × *Q* i *Q* × *n*) nisu imali statistički značajan uticaj u SOP modelu za izračunavanje RS. Visoka vrednost koeficijenta determinacije je bliska jedinici, kao i niska vrednost greške modela (koja nije statistički značajna), na osnovu ANOVA-e, za SOP model RS ukazuju na dobru predikciju RS za proces ekstrudiranja, i na dobro poklapanje vrednosti RS dobijenih ovim modelom sa eksperimentalnim podacima za RS ekstrudata.



Najveći negativan uticaj na sadržaj *RS* ima n , a što može se zaključiti iz Yoonovog modela uticaja procesnih parametara na *RS* (Slika 4.9).



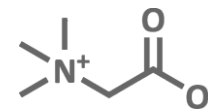
Slika 4.9. Yoonov model uticaja procesnih parametara na *RS*

Poznato je da vlaga ima ulogu plastifikatora prilikom retrogradacije skroba i ova uloga može biti maksimalna pri sadržaju vlage u opsegu 30–60% (Jang i Pyun, 2004). Ovi rezultati su u saglasnosti sa Sievert i Pomeranz (1989) i Kim i Lee (1998) koji su utvrdili da visok sadržaj vlage (do 67%) tokom ekstrudiranja rezultuje sadržajem *RS* od 38,4% kod visoko amiloznih kukuruznih skrobova. Prema Shin i sar. (2002) najveće vrednosti *RS* (14,2–15,5%) kod kukuruznih skrobova nakon ekstruzije su pri sledećim parametrima ekstrudiranja: temperatura unutar cevi ekstrudera 110 °C, brzina obrtanja pužnice od 150 o/min, i približno 30% sadržaja vlage. Rezultati Leloup i sar. (1992) pokazali su da sadržaj amiloze mnogo više doprinosi formiranju *RS* nego amilopektin.

Parametri ekstrudiranja, naročito napon smicanja u cevi ekstrudera, mogu izazvati degradaciju amiloze u molekule koji imaju stepen polimerizacije manji od 26, te oni ne mogu biti inkorporirani u kristalnu strukturu, i kao posledica toga slabo je formiranje *RS3* (Faraj i sar., 2004). Unlu i Faller (1998) su našli negativnu vezu između formiranja *RS3* i brzine obrtanja pužnice.

4.2.4. Indeks apsorpcije vode i indeks rastvorljivosti u vodi

Indeks apsorpcije vode, *WAI* je indikator promena strukture materijala (Rocha-Guzman i sar., 2008) koji predstavlja količinu vode apsorbovane od strane skroba i služi kao indeks želatinizacije jer nativni skrob ne apsorbuje vodu na sobnoj temperaturi (Anderson i sar., 1970; Colonna i sar., 1989; Ding i sar., 2006). Prisustvo neskrobnih komponenti, kao što su npr. vlakna utiče na vrednosti *WAI* (Lopez i sar., 1996). *WAI* zavisi takođe od dostupnosti hidrofilnih grupa i od sposobnosti formiranja gela (Gomez i Aguilera, 1984). Tokom ekstrudiranja, struktura skroba je prekinuta i dolazi do narušavanja kristalne strukture, što



predstavlja proces želatinizacije. Nakon ovoga granule mogu slobodno da bubre i da apsorbuju mnogo više vode, što se odražava promenom vrednosti *WAI* (Kokić, 2017).

Indeks rastvorljivosti u vodi, *WSI* predstavlja količinu rastvorljivih materija koje napuštaju skrobnu komponentu posle ekstrudiranja (Altan i sar., 2008a). *WSI* se često upotrebljava kao indikator degradacije molekulskih komponenata kojim se meri stepen konverzije skroba za vreme ekstrudiranja (Yagci i sar., 2008; Diaz i sar., 2007), odnosno prisustvo molekula sa malom molekulskom masom (Gutkoski i El-Dash, 1999). *WAI* i *WSI* mogu se koristiti za procenu funkcionalnih karakteristika ekstrudiranih proizvoda.

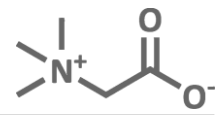
Vrednosti *WAI* i *WSI* u procesu ekstrudiranja, pri promeni nezavisnih parametara predstavljene su u Tabeli 4.12.

Tabela 4.12. Eksperimentalne vrednosti *WAI* i *WSI* u procesu ekstrudiranja, pri promeni nezavisnih parametara, po usvojenom eksperimentalnom planu

Nezavisno promenjive			Zavisno promenjive	
<i>V</i> (%)	<i>Q</i> (kg/h)	<i>n</i> (o/min)	<i>WAI</i> (g/g)	<i>WSI</i> (g/100g)
20	20	500	9,14	11,04
20	20	250	9,35	8,69
17	17	350	8,26	9,32
20	20	750	9,12	12,76
20	20	500	9,12	11,04
23	17	350	9,27	9,32
17	17	650	9,02	10,14
25	20	500	10,10	8,78
20	25	500	9,73	9,98
23	17	650	9,72	11,07
20	15	500	9,34	10,43
23	23	650	9,23	10,98
20	20	500	9,11	11,04
15	20	500	8,02	13,02
17	23	650	8,12	10,77
23	23	350	9,87	9,14
17	23	350	8,32	11,85

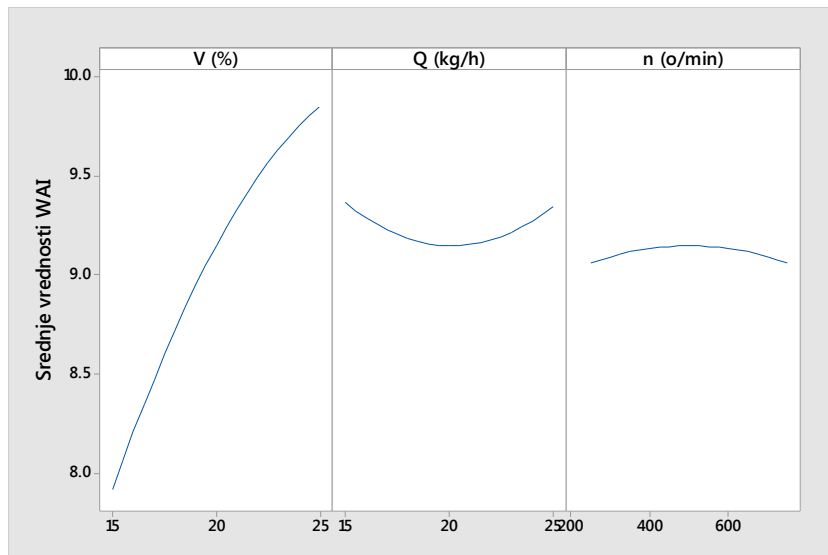
V - vlaga polaznog materijala; *Q* - protok materijala; *n* - brzina obrtanja pužnice; *WAI* - indeks apsorpcije vode; *WSI* - indeks rastvorljivosti u vodi

U ovoj studiji najmanje vrednosti *WAI* i *WSI* dobijene su za uzorke koji nisu ekstrudirani i iznose 2,19 g/g suve materije i 8,01 g/100 g suve materije, respektivno. Dakle, u svim ekstrudiranim uzorcima u ovom eksperimentu utvrđeno je povećanje vrednosti *WAI* i *WSI* nakon ekstrudiranja (Tabela 4.12). Ovi rezultati su u saglasnosti sa mnogim studijama za sledeće uzorke: ekstrudirana mešavina kukuruznog griza i spelte (Jozinović i sar., 2016), kinoa (Dogana i Karwe, 2003), amarantus (Menegassi i sar., 2011), sirak (Mahasukhonthachai i sar., 2010), kukuruzni griz sa dodatkom heljde i kestena (Jozinović, 2012), kukuruzno-pšenični ekstrudat (Sobota i sar. 2010).

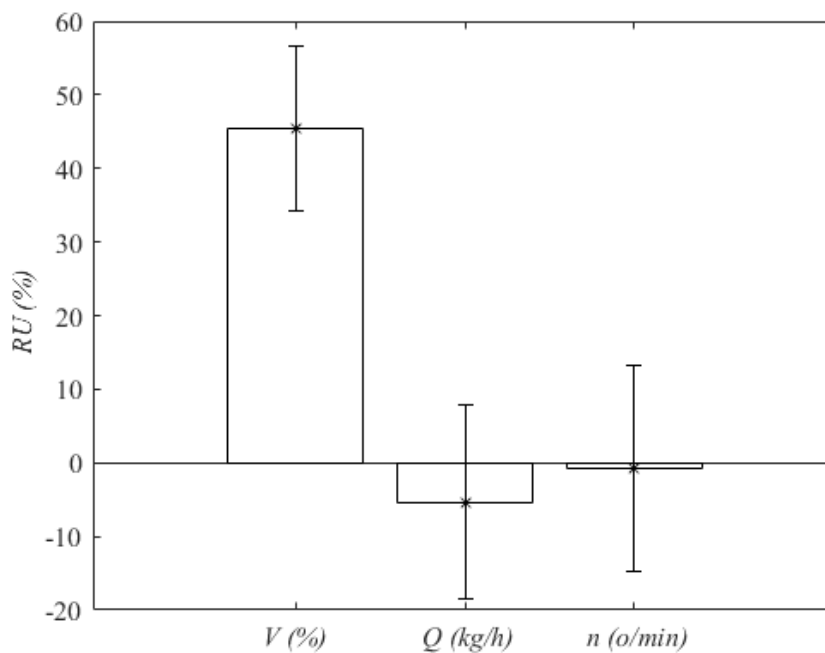


Povećanje vrednosti *WSI* u ekstrudiranim proizvodima može se povezati sa komponentama male molekulske mase, koje se lako mogu odvojiti jedna od druge kada su uslovi ekstrudiranja intenzivniji (Colonna i sar., 1989).

Kako se odražavaju procesni parametri ekstrudiranja na *WAI* ilustruju slike 4.10. i 4.11.

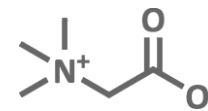


Slika 4.10. Uticaji procesnih parametara (*V*, *Q* i *n*) na *WAI*



Slika 4.11. Yoonov model uticaja procesnih parametara na *WAI*

Sa Slike 4.10. se može videti da povećanje vlage polaznog materijala utiče na povećanje vrednosti *WAI* i da vlaga polaznog materijala ekstrudata od speltinog brašna sa dodatkom betaina ima najveći uticaj na vrednosti *WAI* (Slika 4.11). Povećanje vrednosti *WAI*



sa povećanjem vlage polaznog materijala ustanovljeno je i kod kukuruznog ekstrudata i ekstrudata koji se sastoji od mešavine kukuruza i sočiva (Lazou i Krokida 2010), ekstrudiranog pirinča (Gulati i sar., 2016), teksturisanih proizvoda od pirinča (Liu i sar., 2011), ekstrudiranog prosa i mahunarki (Chakraborty i sar., 2011), ekstrudata od brašna banane (Sarawong i sar., 2014) i pšeničnih ekstrudata (Ding i sar., 2006). Ovaj trend uticaja vlage na *WAI* je u saglasnosti i sa rezultatima drugih autora (Ding i sar., 2005; Yagci i Gogus, 2008, Singh i sar., 2007).

Vlaga polaznog materijala ima najveći uticaj na želatinizaciju, dakle maksimalna želatinizacija se odvija pri najvećim vrednostima vlage polaznog materijala (Lawton i sar., 1972). Povećanje vlage pospešuje unutrašnje mešanje i ravnomernije zagrevanje, što poboljšava želatinizaciju i povećava vrednosti *WAI*.

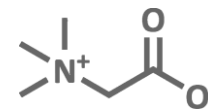
Što se tiče brzine obrtanja pužnice u ovoj studiji pokazano je početno povećanje vrednosti *WAI* sa povećanjem brzine obrtanja pužnice, nakon čega ova vrednost opada sa povećanjem brzine obrtanja pužnice. Isto su utvrdili Gulati i sar. (2016) za ekstrudate od prosa. Sa povećanjem protoka materijala vidljivo je početno smanjenje vrednosti *WAI*, nakon čega dolazi do njegovog povećanja (Slika 4.10). Iz Yoonovog modela jasno je vidljivo da je na vrednosti *WAI* zanemarljivo mali uticaj imala brzina obrtanja pužnice, nešto intenzivniji je uticaj imao je protok materijala a izuzetno velik uticaj vlaga materijala (Slika 4.11).

U Tabeli 4.13. dati su podaci analize varijanse za *WAI* i *WSI*.

Tabela 4.13. Analiza varijanse za *WAI* i *WSI*, za model u obliku polinoma drugog reda (prikazana je suma kvadrata razlika)

Članovi	<i>df</i>	<i>WAI</i>	<i>WSI</i>
<i>V</i>	1	4,530 ⁺	5,503
<i>V</i> ²	1	0,100	0,130
<i>Q</i>	1	0,000	0,338
<i>Q</i> ²	1	0,063	1,419
<i>n</i>	1	0,000	7,545 [*]
<i>n</i> ²	1	0,011	0,325
<i>V</i> × <i>Q</i>	1	0,113	1,471
<i>V</i> × <i>n</i>	1	0,070	1,853
<i>Q</i> × <i>n</i>	1	0,525 [*]	0,410
Greška	7	0,512	7,417
<i>r</i> ²		0,914	0,715

df – stepen slobode; *F* - Fisher test; *p* - *p* vrednost; *WAI* - indeks apsorpcije vode; *WSI* - indeks rastvorljivosti u vodi; ⁺statistički značajno na nivou *p*<0,01; ^{*} statistički značajno na nivou *p*<0,05

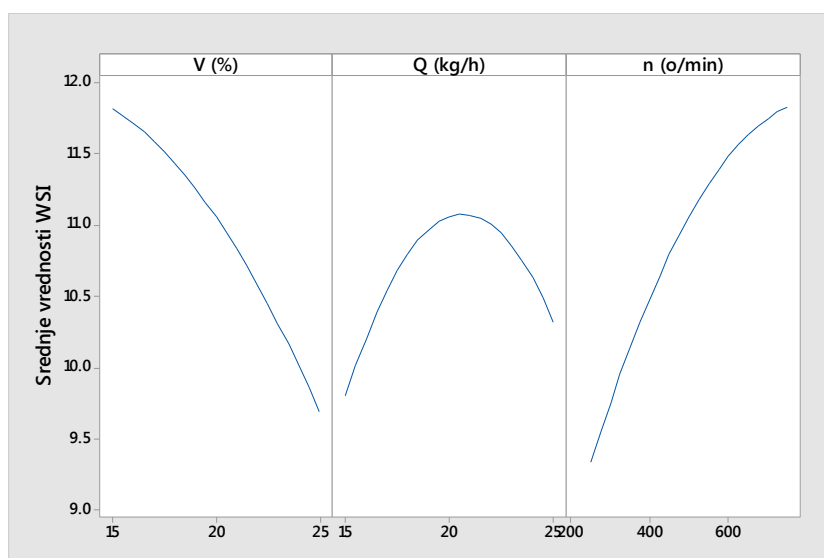


Na osnovu rezultata ANOVA-e, u SOP modelu za izračunavanje vrednosti *WAI* najviše uticajan je bio linearni član *V*, statistički značajan na nivou $p < 0,01$. Uticajnost promenljivih *Q* i *n* se ogleda preko člana mešovitoeg proizvoda $Q \times n$ ($p < 0,05$). Linearni član *n* je pokazao značajan uticaj u SOP modelu za izračunavanje vrednosti *WSI*, statistički značajnog na nivou $p < 0,05$. Koeficijenti determinacije za izračunavanje *WAI* i *WSI* imaju vrednosti 0,914 i 0,715, respektivno, što se može smatrati zadovoljavajućim predviđanjem ovih odziva sistema (Tabela 4.13).

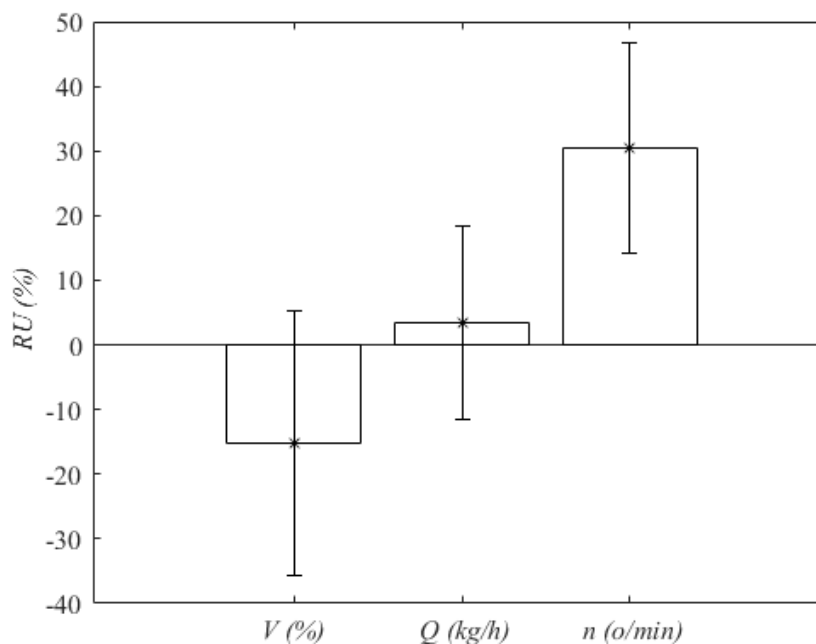
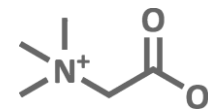
Vrednost *WSI* opada sa povećanjem vlage polaznog materijala (Tabela 4.12), što je u saglasnosti sa tvrdnjom Gulati i sar. (2016), prema kojima je vrednost *WSI* maksimalna pri niskim sadržajima vlage. Povećanje vlage polaznog materijala smanjuje vrednosti *WSI* kod formulacija ekstrudata od različitih nusproizvoda (Yağcı i sar., 2008), ekstrudata od pirinčanog brašna (Hagenimana i sar., 2006), kukuruznih ekstrudata sa dodatkom griza graška (Singh i sar., 2007), ekstrudata od brašna banane (Sarawong i sar., 2014), kinoe (Dogan i Karwe, 2003), ekstrudata od pirinča, kukuruznog griza, i pšenice (Bryant i sar., 2001; Kirby i sar., 1988).

U radu Hagenimana i sar. (2006) nađeno je da najveći uticaj na vrednosti *WSI* ima temperatura, zatim brzina obrtanja pužnice i sadržaj vlage. Direktno poređenje dobijenih vrednosti *WSI* sa vrednostima iz literature složeno je zbog razlika u primenjenom materijalu prilikom ekstrudiranja i različitih procesnih parametara.

Na slikama 4.12. i 4.13. prikazani su uticaji procesnih parametara ekstrudiranja na *WSI*.



Slika 4.12. Uticaji procesnih parametara ekstrudiranja (*V*, *Q* i *n*) na *WSI*



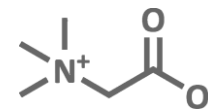
Slika 4.13. Yoonov model uticaja procesnih parametara na indeks rastvorljivosti u vodi, *WSI*

Prema rezultatima sa Slike 4.12. se može zaključiti da povećanje brzine obrtanja pužnice dovodi do povećanja *WSI*. Isti trend je potvrđen za uzorke ekstrudirane kinoe u radu Dogan i Karwe, (2003) i Gulati i sar. (2016). Ovaj trend se može objasniti razgradnjom skroba usled smicanja, čime fragmenti skroba bivaju rastvorljivi u vodi (Yagci i Gogus, 2008), što dovodi do povećanja vrednosti *WSI*. Takođe pri visokom sadržaju vlage brzina obrtanja pužnice nema uticaja jer dolazi do plastifikacije granula skroba, čime se sprečava degradacija usled smicanja (Hagenimana i sar., 2006). Iz Yoonovog modela uticaja parametara na vrednost *WSI* može se videti da brzina obrtanja pužnice ima najveći dok protok materijala ima najmanji uticaj na vrednosti *WSI* (Slika 4.13).

4.2.5. Step en oštećenosti skroba

Step en oštećenosti skroba (*SD*) definiše se kao procenat skroba, u odnosu na masu uzorka, koji je podložan enzimskoj hidrolizi. Kako se intenzitet ekstrudiranja povećava, povećava se želatinizacija skroba, fizički se razbijaju granule skroba i otvaraju svoju kristalnu strukturu, pa je olakšan pristup hidrolitičkim enzimima (Mu i sar., 2013). Dakle ekstrudiranje dovodi do progresivnog povećanja sadržaja step ena oštećenosti skroba sa povećanjem njegovog intenziteta, verovatno zbog oštećenja granula skroba nastalih smicanjem i temperaturom tokom procesa ekstrudiranja (Camire i sar., 1990).

U Tabeli 4.14. su date eksperimentalne vrednosti za step en oštećenosti skroba, *SD* pri različitim procesnim parametrima tokom postupka ekstrudiranja speltinog integralnog brašna sa dodatkom betaina. Vidi se da su nakon ekstrudiranja povećane vrednosti step ena oštećenja skroba (14,59 – 17,58%) u odnosu na neekstrudirani skrob čija je vrednost iznosila 1,78%.



Kod kukuruznog brašna i brašna sirka te vrednosti su iznosile 2,22 i 1,81, respektivno (Licata i sar., 2014).

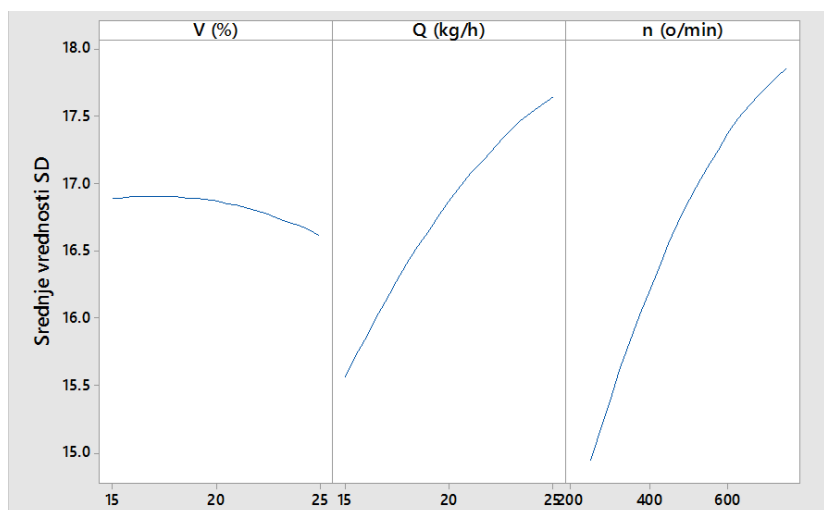
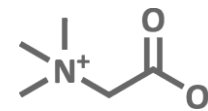
Tabela 4.14. Eksperimentalne vrednosti *SD* u procesu ekstrudiranja, pri promeni nezavisnih parametara, po usvojenom eksperimentalnom planu

<i>V</i> (%)	<i>Q</i> (kg/h)	<i>n</i> (o/min)	<i>SD</i> (%)
20	20	500	16,98
20	20	250	14,79
17	17	350	15,16
20	20	750	18,27
20	20	500	16,86
23	17	350	14,59
17	17	650	17,58
25	20	500	16,98
20	25	500	18,01
23	17	650	16,46
20	15	500	15,46
23	23	650	17,55
20	20	500	16,71
15	20	500	16,79
17	23	650	17,31
23	23	350	16,58
17	23	350	16,55

V - vlaga polaznog materijala; *Q* - protok materijala; *n* - brzina obrtanja pužnice; *SD* - stepen oštećenosti skroba

Povećanje *SD*-a nakon procesa ekstrudiranja utvrđeno je i u ranije objavljenom radu o uticaju parametara ekstrudiranja na svojstva kukuruznih ekstrudata (Jozinović i sar., 2012). Jozinović i sar. (2016) navode da je trend povećanja stepena oštećenja skroba u ekstrudiranim uzorcima povezan s visokom vrednošću *WSI* i boljom ekspanzijom ekstrudata, pri čemu je utvrđeno da se pri nižoj vlažnosti, odnosno većem stepenu ekspanzije dolazi do većeg stepena oštećenja skroba.

U nekoliko studija je navedeno da je povećanje sadržaja vlažnosti materijala dovelo do sniženih vrednosti stepena oštećenja skroba za različite proizvode tokom procesa ekstrudiranja (Bhattacharya i Hanna, 1988; Gomez i Aguilera, 1984; Lai i Kokini, 1991). Ovakav uticaj vlage je potvrđen i u ovoj studiji (Slika 4.14). Povećanjem početne vrednosti sadržaja vlažnosti materijala smanjuje se temperatura testa tokom ekstrudiranja (Hsieh, 1991; Huang i sar., 1993; Fletcher i sar., 1985), što dovodi do smanjenja želatinizacije skroba. Voda u ekstruderu takođe može delovati kao lubrikant i smanjiti trenje i time usloviti smanjenje stepena oštećenja skroba (Hayashi i sar., 1993; Miller i sar., 1985).



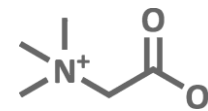
Slika 4.14. Uticaji procesnih parametara (V , Q i n) na stepen oštećenosti skroba flips proizvoda

Na osnovu rezultata ANOVA-e, u SOP modelu za izračunavanje SD najviše uticajni su bili linearni članovi n i Q , statistički značajan na nivou $p < 0,01$. Uticajnost ovih promenljivih se ogleda i preko člana njihovog mešovitog proizvoda ($Q \times n$), koji se statistički značajan na nivou $p < 0,05$. Koeficijenti determinacije za izračunavanje SD ima vrednost 0,949, što se može smatrati dobrim predviđanjem za ovaj odziv sistema (Tabela 4.15).

Tabela 4.15. Analiza varijanse za SD , za model u obliku polinoma drugog reda (prikazana je suma kvadrata razlika)

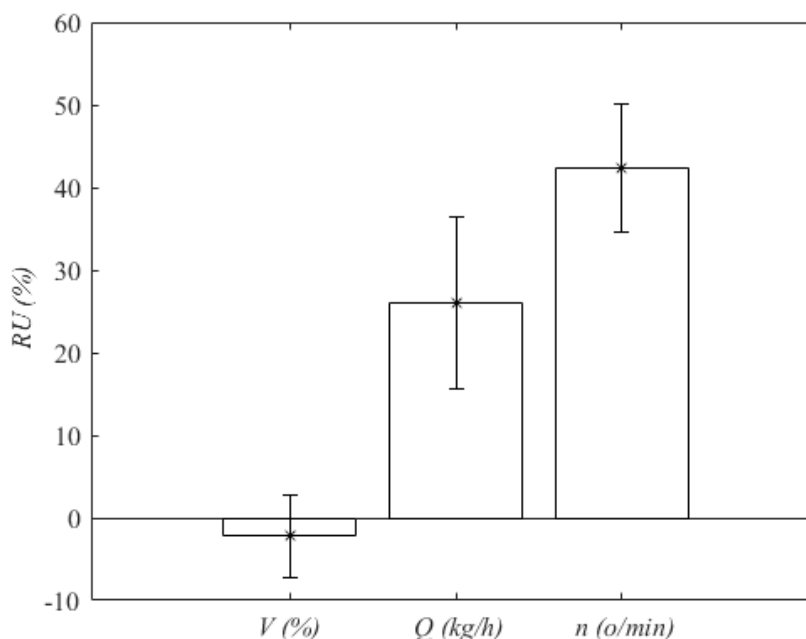
Članovi	df	SD
V	1	0,090
V^2	1	0,019
Q	1	5,267 ⁺
Q^2	1	0,100
n	1	10,307 ⁺
n^2	1	0,315
$V \times Q$	1	0,480 ^{**}
$v \times n$	1	0,014
$Q \times n$	1	0,819 [*]
<i>Greška</i>	7	0,926
r^2		0,949

df – stepen slobode; F - Fisher test; p - p vrednost; SD - stepen oštećenosti skrob; ⁺ statistički značajno na nivou $p < 0,01$; ^{*} statistički značajno na nivou $p < 0,05$; ^{**} statistički značajno na nivou $p < 0,01$



Yoonov model uticaja procesnih parametara na *SD* dat je na slici 4.15.

Sa Slika 4.14. i 4.15. je jasno vidljivo da se povećanjem protoka materijala prilikom ekstrudiranja povećava stepen oštećenosti skroba. Protok materijala ima uticaj na vreme zadržavanja u cevi ekstrudera, tako da je u pozitivnoj korelaciji sa uticajem brzine obrtanja pužnice (Martínez i sar., 2014).

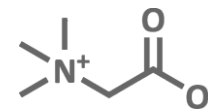


Slika 4.15. Yoonov model uticaja procesnih parametara na *SD*

Brzina obrtanja pužnice pokazala je značajan pozitivan efekat na vrednosti stepena oštećenja skroba (Slika 4.15). Mehanička energija je jedan od glavnih faktora koji doprinose degradaciji skroba (Diosady i sar, 1985; Mitchell i sar., 1992). Tako i u ovoj studiji sa povećanjem broja obrtaja pužnice raste i *SME*, što uslovljava povećanje stepena oštećenosti skroba, a time i vrednosti *WSI*. Kako su pokazali rezultati Lee i sar. (2006) stepen oštećenja skroba se povećava sa brzinom obrtanja pužnice, ali nema statistički značajne razlike u pogledu uticaja vrednosti brzine obrtanja pužnice od 300 o/min i 400 o/min na *SD*. Povećanje ili smanjenje oštećenja skroba uz povećanje brzine obrtanja pužnice oni pripisuju relativno dominantnoj ulozi bilo smicajnog napona ili vremena zadržavanja unutar cevi pužnice. U njihovoj studiji uticaj smicajnog napona bio je dominantniji u odnosu na termički efekat, jer su temperature unutar pužnice bile slične za sve tretmane.

4.2.6. Tvrdoća ekstrudata

Tekstura je bitan senzorski pokazatelj kvaliteta ekstrudiranih proizvoda. U ekstrudiranim proizvodima gde je ekspanzija poželjna i očekivana tekstura igra bitnu ulogu u pogledu prihvatljivosti od strane potrošača (Anton i Luciano, 2007). Mnoge studije proučavale su merenje teksture flips proizvoda za šta su korišćeni različiti testovi i vrste sonde. Najčešće su korišćeni testovi sečenja ili smicanja, kompresije i testovi uboda za merenje teksture flips



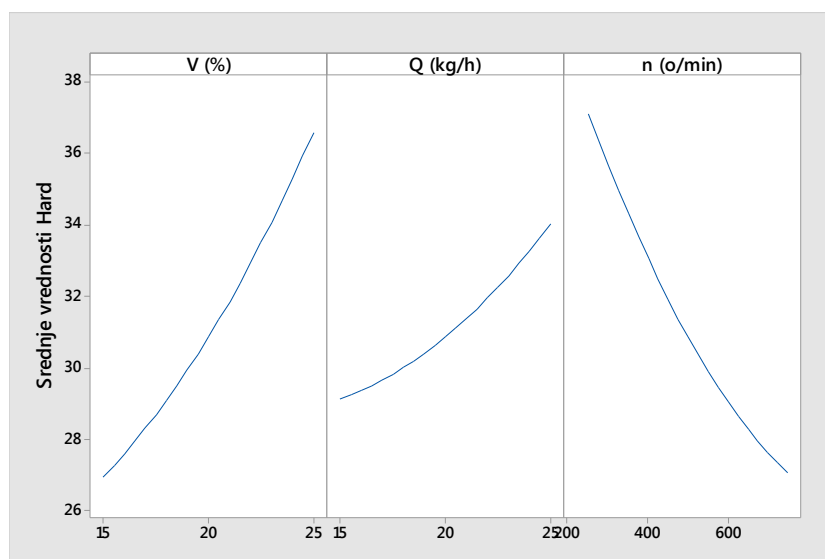
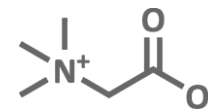
proizvoda. Ne postoji jedan opšti pojam koji opisuje teksturu ekstrudiranih flips proizvoda, a najčešći izrazi su tvrdoća, krhkost i hrskavost (Paula i Conti-Silva, 2014). U ovoj studiji tvrdoća flips proizvoda od speltinog integralnog brašna sa dodatkom betaina određena je dijametralnom kompresijom. U Tabeli 4.16. su prikazane eksperimentalne vrednosti tvrdoće za dobijene flips proizvode.

Tabela 4.16. Eksperimentalne vrednosti tvrdoće u procesu ekstrudiranja, pri promeni nezavisnih parametara, po usvojenom eksperimentalnom planu

<i>V</i> (%)	<i>Q</i> (kg/h)	<i>n</i> (o/min)	<i>Tvrdoća</i> (g/100g)
20	20	500	30,83
20	20	250	37,94
17	17	350	27,33
20	20	750	26,78
20	20	500	30,83
23	17	350	35,82
17	17	650	30,64
25	20	500	37,40
20	25	500	34,86
23	17	650	28,21
20	15	500	28,83
23	23	650	35,06
20	20	500	30,83
15	20	500	26,69
17	23	650	21,84
23	23	350	38,43
17	23	350	36,40

V - vlaga polaznog materijala; *Q* - protok materijala; *n* - brzina obrtanja pužnice

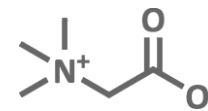
Slika 4.16. prikazuje uticaj procesnih parametara (*V*, *Q* i *n*) na tvrdoću ekstrudata. Može se uočiti tendencija porasta tvrdoće sa povećanjem sadržaja vlage u polaznom materijalu. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatima za nasipnu masu i ekspanziju gde su zabeleženi porast nasipne mase i smanjenje stepena ekspanzije sa povećanjem vlažnosti materijala (Tabele 4.6. i 4.8). Liu i sar. (2011) povezuju rezultate za nasipnu masu i ekspanziju sa vlagom i tvrdoćom. Naime, do manjeg stepena ekspanzije dolazi sa povećanjem sadržaja vlage, a povećanja nasipne mase sa smanjenjem stepena ekspanzije. Ovi rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima Anton i sar. (2009), koji zaključuju da su teksturalne osobine veoma zavise od stepena ekspanzije, tj. da ekstrudati sa većim stepenom ekspanzije imaju manju tvrdoću.



Slika 4.16. Uticaji procesnih parametara (V , Q i n) na tvrdoću

Sa povećanjem sadržaja vlage polaznog materijala, naročito pri niskim vrednostima protoka materijala, raste tvrdoća ekstrudata, jer vlaga dovodi do plastifikacije uzorka, obrazuje se zaštitni sloj i uzorak se komprimuje, što mu daje veliku gustinu i tvrdoću (Slika 4.16). Ovi rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima Ding i sar. (2005) po kojima vlaga polaznog materijala ima najznačajniji uticaj na tvrdoću ekstrudata od pirinča. Ovo je potvrđeno i u njihovim kasnijim istraživanjima na pšeničnim ekstrudatima (Ding i sar., 2006). Naime, voda deluje kao plastifikator i smanjuje viskozitet, rast mehurova unutar testa i potrošnju mehaničke energije u ekstruderu, pa proizvod ima veliku gustinu i tvrdoću. I brojne studije potvrđuju da se tvrdoća ekstrudata povećala s povećanjem sadržaja vlage polaznog materijala (Badrie i Mellowses, 1991; Liu i sar., 2000). Do suprotnog zaključka su došli Lazou i Krokida (2010), kod kojih je tvrdoća ekstrudata na bazi kukuruznog griza sa sočivom smanjena sa povećanjem sadržaja vlage polaznog materijala. Ovaj trend je primećen i kod ekstrudata na bazi kukuruza i soje (Chen i sar., 1991, Li i sar., 2005).

Sa povećanjem broja obrtaja pužnice uzorak expanduje i samim tim postaje mekši, dok sa povećanjem ulaznog protoka materijala pužnica ekstrudera postaje ispunjenija zbog čega raste pritisak u njoj i materijal se komprimuje i postaje čvrst (Slika 4.16). Ding i sar. (2006) su zaključili da protok materijala i brzina obrtanja pužnice imaju značajan uticaj na tvrdoću ekstrudata pšenice. Sa povećanjem brzine obrtanja pužnice smanjuje se viskozitet, što rezultira manjom gustinom i ekstrudatom manje tvrdoće. Nasuprot tome, sa povećanjem protoka povećava se viskozitet u ekstruderu, dajući ekstrudate velike gustine i tvrdoće. Diaz i sar. (2013) su pokazali da su promene u tvrdoći ekstrudata koji sadrže kanivu izazvane pre brzinom obrtanja pužnice nego promenom vlage polaznog materijala. Međutim, tvrdoća ekstrudata koji sadrže amarantus, kinou i čist kukuruz, više je povezana sa promenama u vlazi polaznog materijala. Mala tvrdoća povezana je sa niskom vlagom polaznog materijala i velikom brzinom obrtanja pužnice.



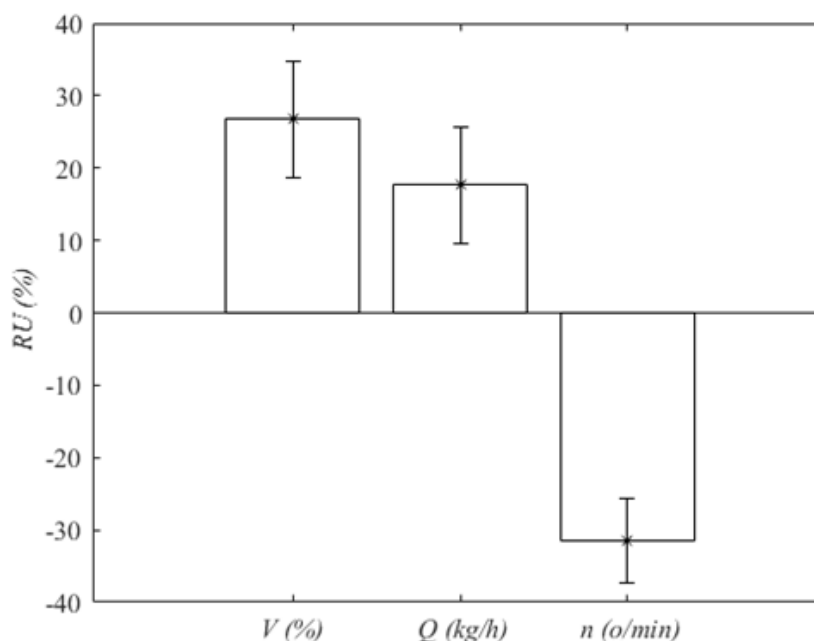
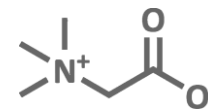
Prema analizi ANOVA-e, u SOP modelu za izračunavanje tvrdoće najviše uticajni su bili: linearni član n , statistički značajan na nivou $p < 0,01$ i linearni član V , statistički značajan na nivou $p < 0,05$. Koeficijent determinacije za izračunavanje tvrdoće imao je vrednost 0,823, što se može smatrati zadovoljavajućim za predviđanje tvrdoće (Tabela 4.17).

Tabela 4.17. Analiza varijanse za tvrdoću, za model u obliku polinoma drugog reda (prikazana je suma kvadrata razlika)

Članovi	df	Tvrdoća
V	1	113,128*
V^2	1	1,194
Q	1	28,863
Q^2	1	0,729
n	1	122,982 ⁺
n^2	1	2,158
$V \times Q$	1	10,557
$V \times n$	1	0,009
$Q \times n$	1	23,222
<i>Greška</i>	7	64,989
r^2		0,823

df – stepen slobode; F - Fisher test; p - p vrednost; ⁺statistički značajno na nivou $p < 0,01$; *statistički značajno na nivou $p < 0,05$

Sa Slike 4.17, na kojoj je dat Yoonov model uticaja procesnih parametara na tvrdoću ekstrudata, jasno se vidi da vlaga polaznog materijala i broj obrtaja pužnice najznačajnije utiču na tvrdoću ekstrudata. Zapravo, tvrdoća pokazuje visoku pozitivnu korelaciju sa vlagom polaznog materijala (povećava se sa povećanjem sadržaja vlage) i negativnu korelaciju sa brzinom obrtanja pužnice (smanjuje se sa povećanjem broja obrtaja pužnice). Protok ulaznog materijala je imao najmanji uticaj na tvrdoću ekstrudata gde je sa povećanjem protoka rasla i tvrdoća ekstrudata.



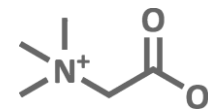
Slika 4.17. Yoonov model uticaja procesnih parametara na tvrdoću ekstrudata

Chavez Jauregui i sar. (2000), Ding i sar. (2005) i Ilo i Liu (1999) su pronašli snažnu negativnu korelaciju između stepena ekspanzije i tvrdoće u svojim istraživanjima na ekstrudatima amarantusa i pirinča.

4.2.7. Boja ekstrudata

Boja je veoma bitna kvantitativna karakteristika kvaliteta ekstrudata koja je direktno povezana sa prihvatljivošću od strane potrošača (Nascimento i sar., 2012). Uticaji parametara ekstrudiranja i primena različitih sirovina na boju ekstrudiranih proizvoda bili su predmet brojnih istraživanja (Ilo i Berghofer, 1999; Ondo i sar., 2013; Singkhornart i sar., 2014; Wang i Ryu, 2013), u kojima je promena boje ekstrudata pripisana različitim reakcijama koje u osnovi uključuju Majlardovu reakciju, karamelizaciju, hidrolizu i degradaciju pigmenta. Poznato je da je glavni razlog promene boje rezultat ishoda Majlardovih reakcija, koje su podeljene u procesu u tri koraka: u početnoj fazi postoji reakcija između redukovano šećera i amina, što rezultuje bezbojnim proizvodima; sledi intermedijska faza, što rezultuje bezbojnim ili blago žutim nijansama. Proizvodi intenzivne boje su rezultat završne faze procesa (Ames, 1998).

Važno je napomenuti da boja ekstrudiranih proizvoda može varirati u zavisnosti od kombinacije utvrđenih parametara kao što su vlažnost materijala, temperatura i hemijske komponente svake sirovine i njihov odnos u smeši (Teba i sar., 2017). Dakle, za dobijanje i održavanje željene boje, važno je kontrolisati boju sastojaka, kao i praćenje proizvoda tokom celog proizvodnog procesa (Menegassi i sar., 2011).

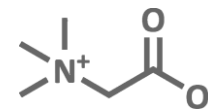


Vrednosti svetloće boje, L^* samlevenih ekstrudata speltinog brašna sa dodatim betainom kretale su se u opsegu (65,04-73,50), a udeli boja a^* i b^* istih uzoraka (3,20-4,97) i (15,71-17,25), respektivno (Tabela 4.18). Vrednost L^* za kontrolno speltino integralno brašno sa 9% betaina iznosila je 81,232, dok su vrednosti a^* i b^* iznosile 1,084 i 11,614, respektivno. Iz prikazanih rezultata vidi se da su vrednosti L^* nakon ekstrudiranja smanjene, dok su vrednosti a^* i b^* povećane. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Ilo i sar. (1999) i Menegassi i sar. (2011). Promene u boji ekstrudata mogu se povezati sa potencijalnom ulogom betaina kao aminokiseline u Majlardovim reakcijama, a mogu biti i posledica reakcije između betaina sa šećerom koja doprinosi nastanku bojenih jedinjenja (produkti Majlardovih reakcija) koje smanjuju svetloću ekstrudata.

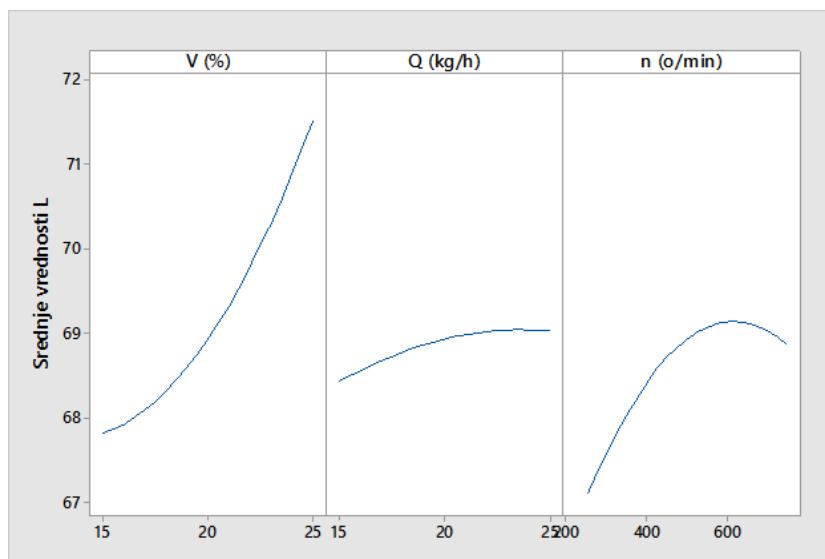
Tabela 4.18. Eksperimentalne vrednosti L^* , a^* i b^* u procesu ekstrudiranja, pri promeni nezavisnih parametara, po usvojenom eksperimentalnom planu

V (%)	Q (kg/h)	n (o/min)	L^*	a^*	b^*
20	20	500	69,00	4,18	16,89
20	20	250	66,07	4,01	15,74
17	17	350	67,80	4,97	17,00
20	20	750	69,10	3,20	16,94
20	20	500	69,00	4,25	16,50
23	17	350	69,12	4,25	16,41
17	17	650	68,79	4,30	15,76
25	20	500	73,50	4,66	17,14
20	25	500	68,38	3,91	16,74
23	17	650	69,44	3,88	17,25
20	15	500	68,28	3,80	17,07
23	23	650	68,75	4,22	16,53
20	20	500	69,00	4,35	16,98
15	20	500	65,04	4,26	15,93
17	23	650	70,38	3,86	16,31
23	23	350	69,41	4,23	15,71
17	23	350	68,86	4,34	15,73

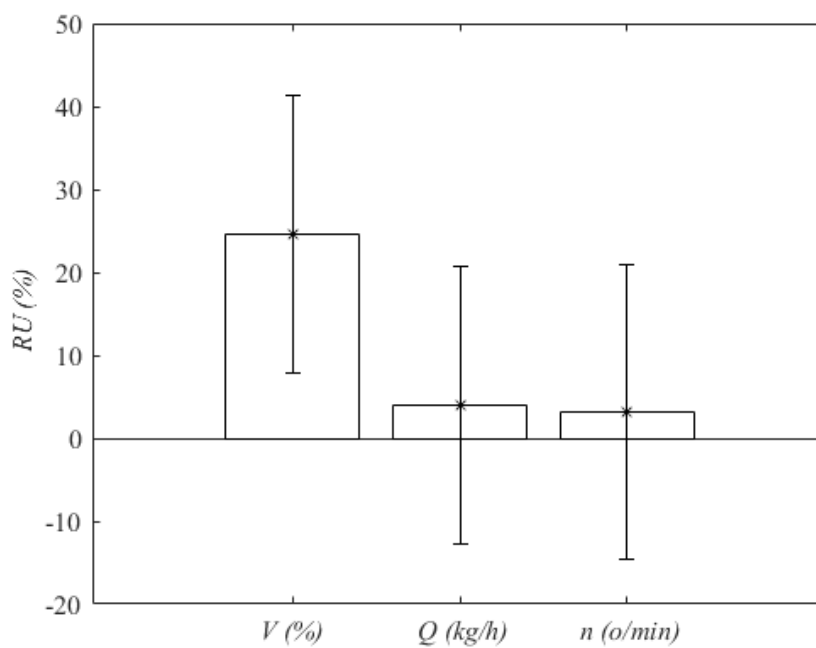
V - vlaga polaznog materijala; Q - protok materijala; n - brzina obrtanja pužnice
 L^* - koordinata svetloće boje, a^* - a^* - udeo crvene/zelene boje, b^* - udeo žute/plave boje



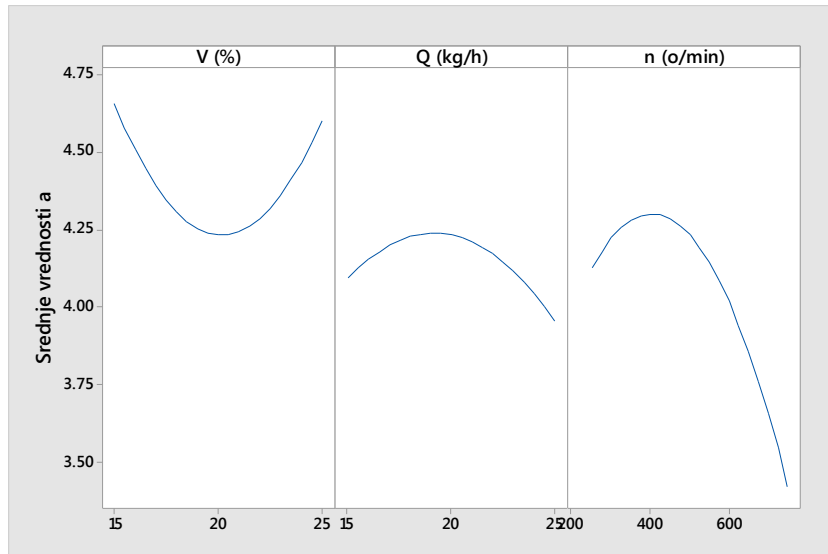
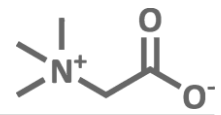
Utjecaji procesnih parametara ekstrudiranja na koordinate boje prikazani su na slikama 4.18– 4.23, a analiza varijanse u Tabeli 4.19.



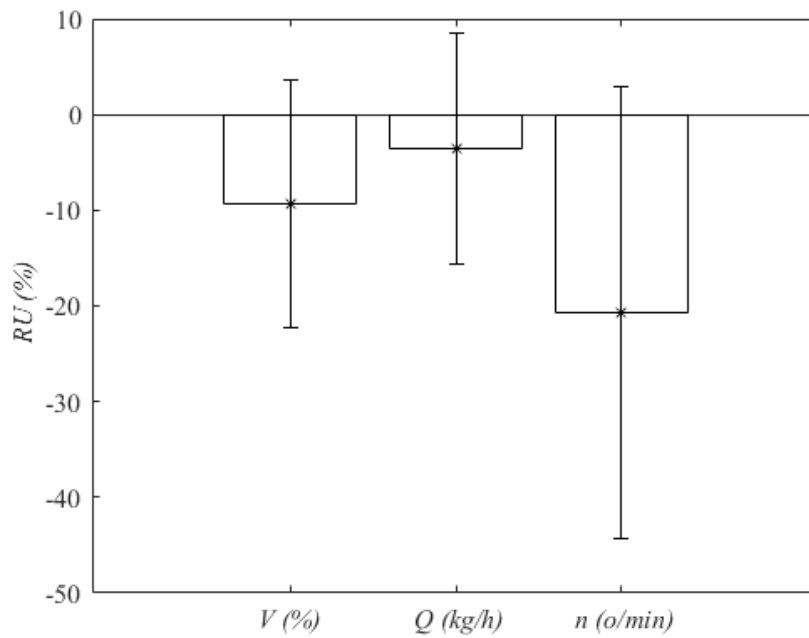
Slika 4.18. Utjecaji procesnih parametara (V , Q i n) na L^*



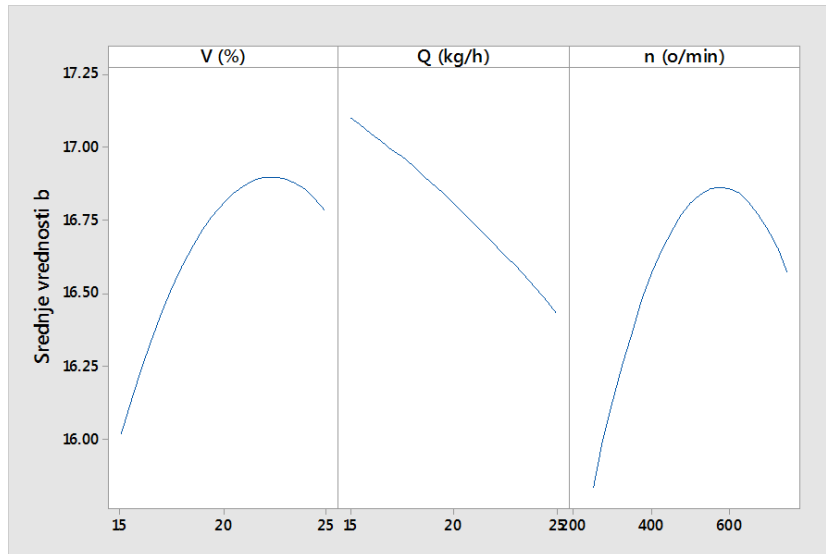
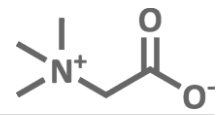
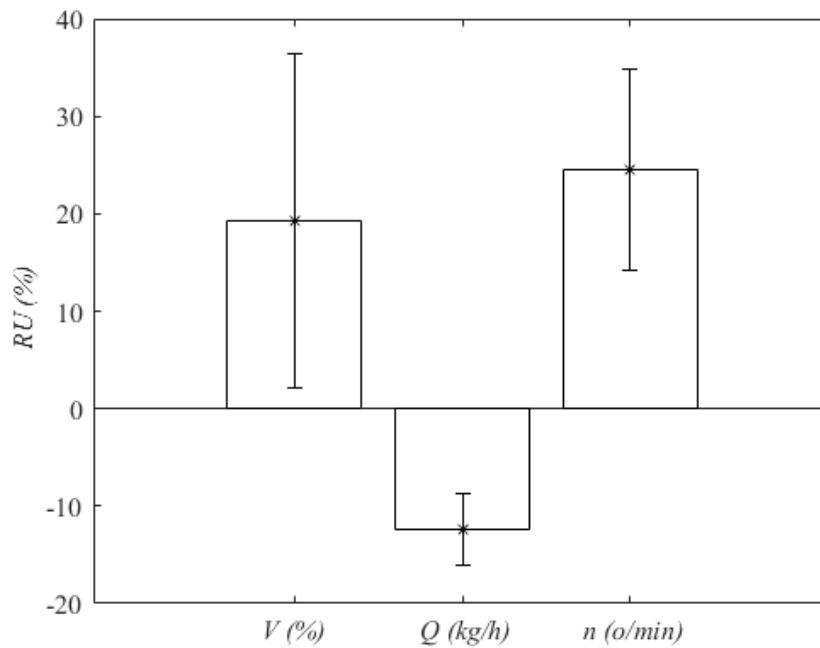
Slika 4.19. Yoonov model uticaja procesnih parametara na L^*



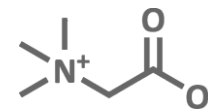
Slika 4.20. Uticaji procesnih parametara (V , Q i n) na a^*



Slika 4.21. Yoonov model uticaja procesnih parametara na a^*

Slika 4.22. Uticaji procesnih parametara (V , Q i n) na b^* Slika 4.23. Yoonov model uticaja procesnih parametara na b^*

Sa Slika 4.18, 4.20. i 4.22. se jasno vidi da porast vlage polaznog materijala utiče na povećanje vrednosti L^* i b^* , dok je kod parametra a^* zabeleženo smanjenje pri sadržaju vlage do 20%, a nakon povećanja vlage sledi i povećanje vrednosti a^* . Saglasno ovim rezultatima su podaci koje su objavili Gulati i sar. (2016) da povećanje vlage utiče na veće vrednosti L^* odnosno, svetliji proizvod i niže vrednosti a^* . Pri većim vrednostima vlage, efekat temperature je smanjen, što rezultuje manjim tamnjenjem uzorka. Najsvetliji, najmanje crveni i proizvod sa najvećom vrednošću udela žute/plave boje (b^*) dobijen je prilikom ekstrudiranja brašna prosa pri uslovima visoke vlage, što ukazuje na njenu zaštitnu ulogu tokom postupka ekstrudiranja. Hagenimana i sar. (2006) su zaključili da što je veći sadržaj vlage, svetlija je boja ekstrudata koju je karakterisala visoka L^* vrednost i niska vrednost a^* .

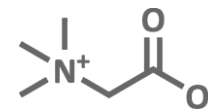


Visoke temperature u kombinaciji sa malim sadržajem vlage favorizuju Majlardove reakcije između redukujućih šećera i slobodnih amino grupa. Do istih zaključaka došli su i Sun i Muthukumarappan (2002).

Povećanje brzine obrtanja pužnice povećava vrednosti za L^* i b^* , a vrednost koordinate a^* se smanjuje (Slike 4.18, 4.20. i 4.22). Kako su zaključili Gulati i sar. (2016) rastuća vrednost b^* sa povećanjem brzine obrtanja pužnice može biti povezana sa nižim vremenom zadržavanja materijala u cevi ekstrudera, čime se postiže manje kuvanje uzorka. Dobijeni rezultati su u skladu sa ekstrudiranim pirinčanim brašnom (Hagenimana i sar., 2006).

Povećanje protoka materijala dovodi do povećanja L^* vrednosti, dok vrednosti a^* i b^* opadaju (Slike 4.18, 4.20 i 4.22).

Iz Yoonovih modela (Slike 4.19, 4.21, 4.23) se vidi da je vlaga polaznog materijala imala najveći uticaj na vrednosti L^* , dok je brzina obrtanja pužnice imala najveći uticaj na vrednosti parametara a^* i b^* . Gulati i sar. (2016) su pokazali je da je vlaga glavni faktor koji utiče na vrednosti L^* i a^* , dok je vlaga u interakciji sa temperaturom bila glavni faktor uticaja na vrednosit b^* .

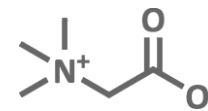


Na osnovu rezultata ANOVA-e, u SOP modelu (Tabela 4.19) za izračunavanje koordinate L^* najviše uticajan je bio linearni član V , statistički značajan na nivou $p < 0,10$; za izračunavanje koordinate a^* najviše uticajan je bio linearni član n , statistički značajan na nivou $p < 0,05$, a za izračunavanje koordinate b^* najviše uticajni su bili linearni članovi V i n , kao i član proizvoda ove dve promenljive, statistički značajan ili značajni na nivou $p < 0,10$. Koeficijenti determinacije za izračunavanje L^* , a^* i b^* imali su vrednosti 0,533, 0,766, 0,760, respektivno što se može smatrati relativno zadovoljavajućim za predviđanje navedenih kolornih koordinata.

Tabela 4.19. Analiza varijanse za koordinatu L^* i kolorne coordinate a^* i b^* za model u obliku polinoma drugog reda (prikazana je suma kvadrata razlika)

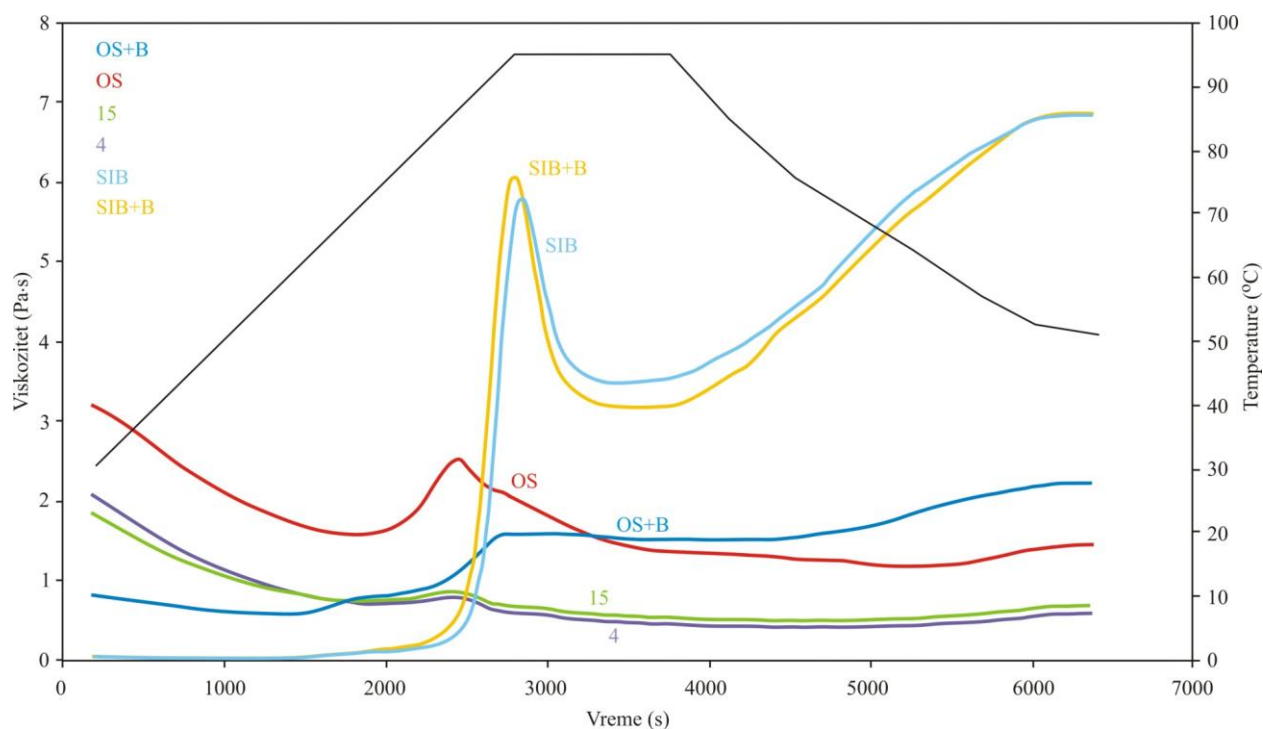
Članovi	df	L^*	df	a^*	df	b^*
V	1	16,576**	1	0,004	1	0,717**
V^2	1	0,769	1	0,225	1	0,239
Q	1	0,431	1	0,024	1	0,534
Q^2	1	0,060	1	0,062	1	0,002
n	1	3,846	1	0,612*	1	0,664**
n^2	1	1,291	1	0,300**	1	0,521
$V \times Q$	1	1,163	1	0,242	1	0,061
$V \times n$	1	1,015	1	0,074	1	0,673**
$Q \times n$	1	0,025	1	0,038	1	0,405
Greška	7	22,756	7	0,546	7	1,174
r^2		0,533		0,766		0,760

df – stepen slobode; F - Fisher test; p - p vrednost; * statistički značajno na nivou $p < 0,05$; ** statistički značajno na nivou $p < 0,10$; L^* - koordinata svetloće boje; a^* - udeo crvene/zelene boje; b^* - udeo žute/plave boje



4.2.8. Karakteristike pastiranja ekstrudata

Krive pastiranja netretiranog speltinog integralnog brašna sa i bez betaina i optimalnih ekstrudiranih uzoraka (sa i bez betaina), kao i uzoraka sa najvećim stepenom ekspanzije (uzorak redni broj 4 iz Tabele 4.1.) i najmanjom čvrstoćom (uzorak redni broj 15 iz Tabele 4.1.) su prikazane na slici 4.24., a u tabeli 4.20. su prikazane očitane vrednosti sa dobijenih kriva.

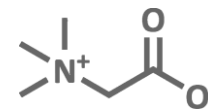


Slika 4.24. Krive pastiranja speltinog integralnog brašna (sa i bez betaina) pre i nakon ekstrudiranja

Tabela 4.20. Karakteristike pastiranja netretiranog i termički tretiranog integralnog speltinog integralnog brašna (sa i bez betaina)

uzorak	Početni viskozitet (Pa·s)	Maksimalni viskozitet (Pa·s) na 95°C	Finalni viskozitet (Pa·s)	Temperatura želatinizacije (°C)
SIB	0,145	6,06	6,86	80,68
SIB + betain	0,148	5,66	6,813	78,76
4	2,104	0,78	0,615	74,8
15	1,856	0,889	0,714	75,16
OS	3,138	2,46	1,47	71,92
OS+ betain	0,831	1,59	2,23	59,88

SIB-integralno speltino brašno; SIB +betain- integralno speltino brašno + betain; OS - optimalni spelta; OS+B-optimalni spelta + betain; 4-uzorak najvećeg stepena ekspanzije; 15-uzorak sa najmanjom čvrstoćom

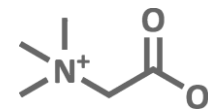


Kod svih ekstrudiranih uzoraka zabeleženo je povećanje početnog viskoziteta u poređenju sa netretiranim uzorcima. Ovo povećanje početnog viskoziteta pri niskoj temperaturi je posledica veće količine prisutnih rastvorljivih materija nastalih termičkom razgradnjom skroba, što je u skladu sa dobijenim rezultatima za *WSI*. Tabela 4.12. potvrđuje veće vrednosti *WSI* za uzorke 4 (uzorak maksimalne ekspanzije, uzorak redni broj 4 iz Tabele 4.1.) i 15 (uzorak najmanje čvrstoće, uzorak redni broj 15 iz Tabele 4.1.) kada se porede sa vrednostima ovog parametra netretiranog speltinog integralnog brašna sa i bez betaina. Dobijeni rezultati za tretman ekstrudiranja su potvrđeni za kukuruz (Souza i sar., 2011; Zeng i sar., 2011; Kokić, 2017), kukuruzni skrob (Ozcan i Jackson, 2005), amarantus (Menegassi i sar., 2011) i sirak (Mahasukhonthachat i sar., 2010).

Kokić (2017) navodi da viskozitet paste ne mogu dati delovi granula ili rastvorene skrobne supstance, već samo netaknute nabubrele granule. Na osnovu toga se zaključuje da odsustvo karakterističnog pika kod uzoraka 4 i 15 potvrđuje gotovo potpunu želatinizaciju skroba. Uzorci 4 i 15 imaju najmanji finalni viskozitet, dakle povećan stepen želatinizacije što je jasno vidljivo i iz prikazane krive pastiranja i tabele 4.20.

Za uzorak netretiranog speltinog integralnog brašna sa i bez betaina je zabeležena najveća vrednost maksimalnog viskoziteta, takođe i temperatura želatinizacije. Kod svih analiziranih uzoraka u poređenju sa netretiranim uzorkom došlo je do smanjenja vrednosti maksimalnog viskoziteta (na 95°C), što je posledica delimične želatinizacije skroba tokom termičkog tretmana, odnosno smanjenja broja granula čijim bubrenjem dolazi do povećanja viskoziteta paste. Isti trend je dobijen kod uzoraka ekstrudiranog kukuruza u radu Kokić, 2017.

Pad viskoziteta tokom održavanja uzorka na visokoj temperaturi (u ovom slučaju na 95°C) je posledica pucanja skrobnih granula nakon čega dolazi do linearnog usmeravanja polimera što smanjuje viskozitet paste, i on je zabeležen kod svih uzoraka izuzev kod uzorka OS + B. Kako navode Mahasukhonthachat i sar. (2010) ovo može biti povezano sa ograničenim i nepotpunim bubrenjem skroba tokom faze zagrevanja zbog veza koje postoje između skroba i proteina. Obzirom da se u ovom optimalnom ekstrudiranom uzorku nalazi betain (OS + B) može se pretpostaviti da je tokom tretmana ekstrudiranja došlo do formiranja veza između skroba i betaina, što je uticalo da kog pomenutog uzorka ne dođe do pada viskoziteta pri održavanju na visokoj temperaturi.



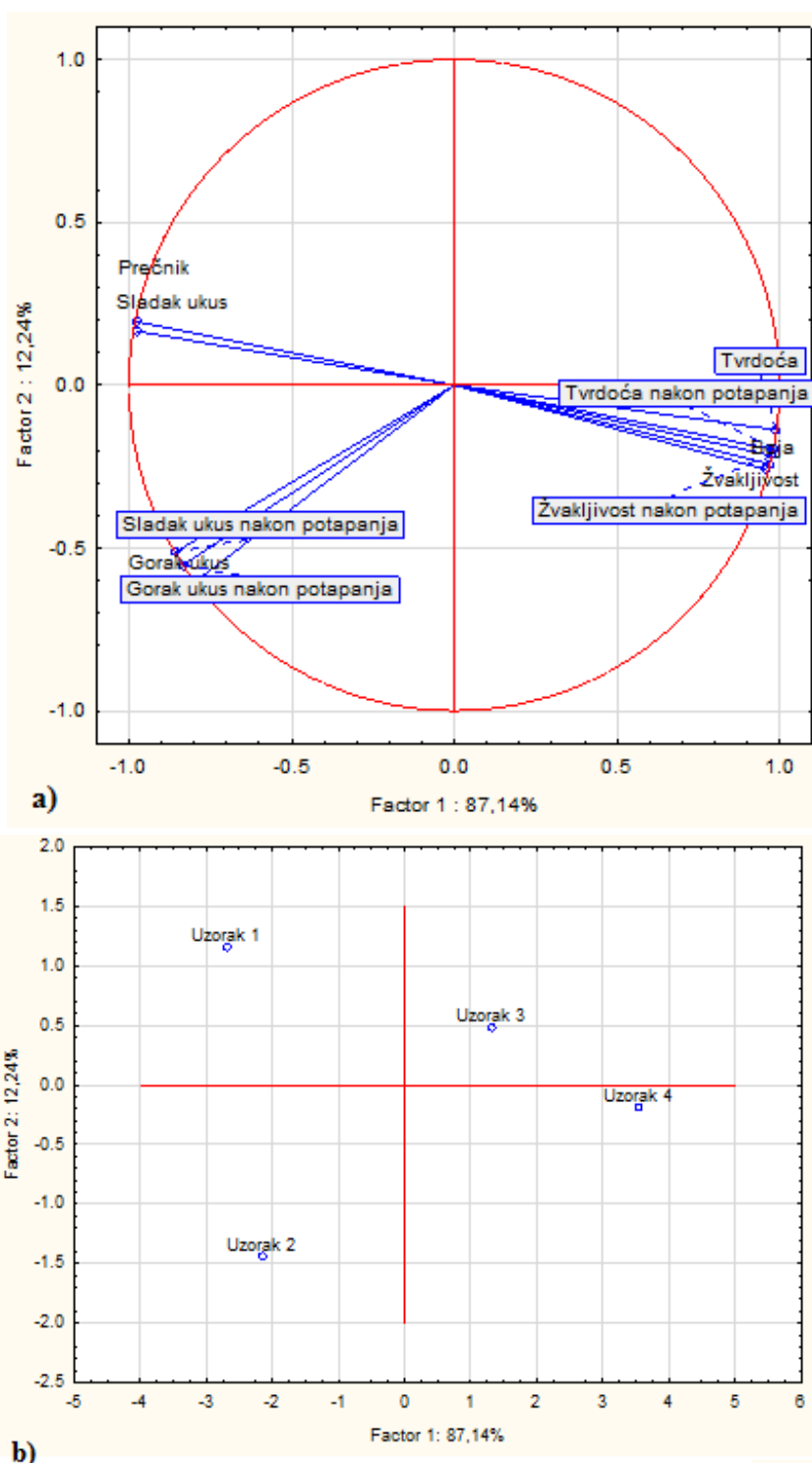
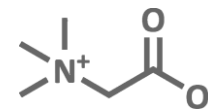
4.6. Senzorska ocena flips proizvoda

U cilju utvrđivanja i kvantifikovanja senzorskih svojstava koja doprinose razlikama između uzoraka, panel treniranih ocenjivača sproveo je senzorsku ocenu flips proizvoda od speltinog brašna sa dodatim betainom metodom deskriptivne analize. Lista deskriptora sa definicijama data je u Tabeli 4.21.

Tabela 4.21. Senzorski deskriptori i definicije korišćene u senzorskoj analizi uzoraka flips proizvoda

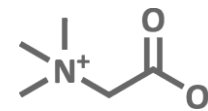
Deskriptor		Definicija
Izgled	Boja	Boja na skali od svetložute do tamnobraon
	Prečnik	Širina poprečnog preseka uzorka
PRE POTAPANJA U MLEKO		
Tekstura	Tvrdoća	Sila potrebna da sekutić zgnječi hranu
	Žvakljivost	Broj žvakova potreban da se hrana proguta
Ukus	Sladak	Osnovni ukus tipičan za rastvor saharoze
	Gorak	Osnovni ukus tipičan za rastvor kofeina ili kinina
NAKON POTAPANJA U MLEKO		
Tekstura	Tvrdoća	Sila potrebna da sekutić zgnječi hranu
	Žvakljivost	Broj žvakova potreban da se hrana proguta
Ukus	Sladak	Osnovni ukus tipičan za rastvor saharoze
	Gorak	Osnovni ukus tipičan za rastvor kofeina ili kinina

Podaci dobijeni senzorskom analizom uzoraka flips proizvoda konvertovani su u matricu odabranih senzorskih deskriptora (kolone) i uzoraka flips proizvoda (redovi). Analiza glavnih komponenti (*PCA*) sprovedena je korišćenjem softverskog sistema Statistica 13.2 (Dell Inc., USA, 2016). Odnos između odabranih senzorskih deskriptora i ocenjenih uzoraka flips proizvoda vizuelno je predstavljen linearnim kombinacijama promenljivih identifikovanih *PCA* (*Loading Plot*) i pozicije uzoraka u prostoru prve dve osnovne komponente (*Score plot*) (Slika 4.24a,b). Prve dve osnovne komponente (F1 i F2) objasnile su čak 99,37% ukupne varijabilnosti, što se može objasniti dobrim odabirom senzorskih deskriptora i malim brojem ispitanih uzoraka. Ako se posmatra odnos između promenljivih, mogu se uočiti tri grupe, na osnovu čega sledi zaključak da su sve promenljive unutar jedne grupe međusobno u značajnoj pozitivnoj korelaciji (r blisko +1). Prvu grupu čine prečnik i sladak ukus, dok se druga grupa koju čine boja, tvrdoća i žvakljivost pre i nakon potapanja u mleko nalazi nasuprot prve grupe. To ukazuje da su promenljive u prvoj i drugoj grupi međusobno u značajnoj negativnoj korelaciji (r blisko -1). Treću grupu čine gorak i sladak ukus nakon potapanja u mleko, kao i gorak ukus pre potapanja. Ovo grupisanje ukazuje da su flips proizvodi sa manjim prečnikom u isto vreme tvrđi, žilaviji i tamniji, kao i da nakon potapanja u mleko odnos između njihovih mehaničkih svojstava ostaje isti.



Slika 4.25. Grafički prikaz linearnih kombinacija varijabli identifikovanih *PCA* (a) i pozicije uzoraka u prostoru prve dve osnovne komponente (b)

Dijagrami prikazani na Slici 4.25. pokazuju da su odabrani senzorski deskriptori omogućili jasno razlikovanje između uzoraka dobijenih flips proizvoda. Uzorak sa maksimalnom ekspanzijom (uzorak 1) se izdvojio, što je i bilo očekivano, najvećim prečnikom, ali i najizrazitijim slatkim ukusom. Uzorak sa najmanjom čvrstoćom (uzorak 2) se izdvojio po izrazitom gorkom i slatkom ukusu nakon potapanja u mleko. S obzirom na to da je ovaj uzorak imao najbolja svojstva rehidracije (najslabija mehanička svojstva) i stoga



upio najveće količine mleka, oba ukusa prisutna u uzorku su došla do izražaja zbog rastvaranja materija koje daju sladak i gorak ukus u mleku. Flips proizvodi koji su dobijeni optimizovanim tehnološkim postupkom (uzorci 3 i 4) bili su okarakterisani većom tvrdoćom i žvkljivošću kako pre, tako i nakon potapanja u mleko, kao i tamnijom bojom. Ova svojstva su bila još izraženija kod uzorka 4 kod koga je dodat betain. Na osnovu ovog se može zaključiti da optimizovani proces ekstrudiranja daje proizvode manjeg prečnika koji su tamniji, tvrdi i žilaviji, kao i da dodatak betaina dodatno usložnjava njihova mehanička svojstva. Zanimljivo je i da dodatak betaina ne utiče na pojačanje gorkog ukusa.

Obzirom da je uzorak broj 1 ima najbolja mehanička svojstva (najveći prečnik, najmanja tvrdoća pre i nakon potapanja, najmanja žvkljivost pre i nakon potapanja), izrazit sladak ukus, može se smatrati najpogodnijim za potrošača. Ako se doda zaključak da betain ne utiče na povećanje gorkog ukusa (uzorak broj 4), a narušava mehanička svojstva (uzorci 3 i 4), pretpostavlja se da bi uzorak broj 1 bio najpogodniji i za obogaćivanje betainom.

4.3. Razvoj *HPLC-ELSD* metode za određivanje betaina u žitaricama, pseudožitaricama, flips proizvodima i drugim proizvodima na bazi žita

Da bi se dobili pouzdani rezultati u nekoj analizi, mora se koristiti validna metoda, tj. metoda za koju su utvrđeni optimalni uslovi pod kojima se mora izvoditi i čija je značajnost potvrđena odgovarajućim statističkim parametrima.

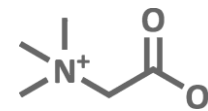
U ovim istraživanjima bilo je neophodno da se betain iz uzoraka ekstrahuje sa što manje pratećih materija i da se razvije *HPLC-ELSD* metoda kojom će se dobiti pouzdani rezultati za sadržaj betaina u analiziranim uzorcima spelte, flips proizvoda od spelte sa dodatim betainom, drugim žitaricama, pseudožitaricama i njihovim proizvodima.

Optimizacija metode za određivanje sadržaja betaina u navedenim uzorcima *HPLC-ELSD* metodom podrazumevala je višeparametarski pristup:

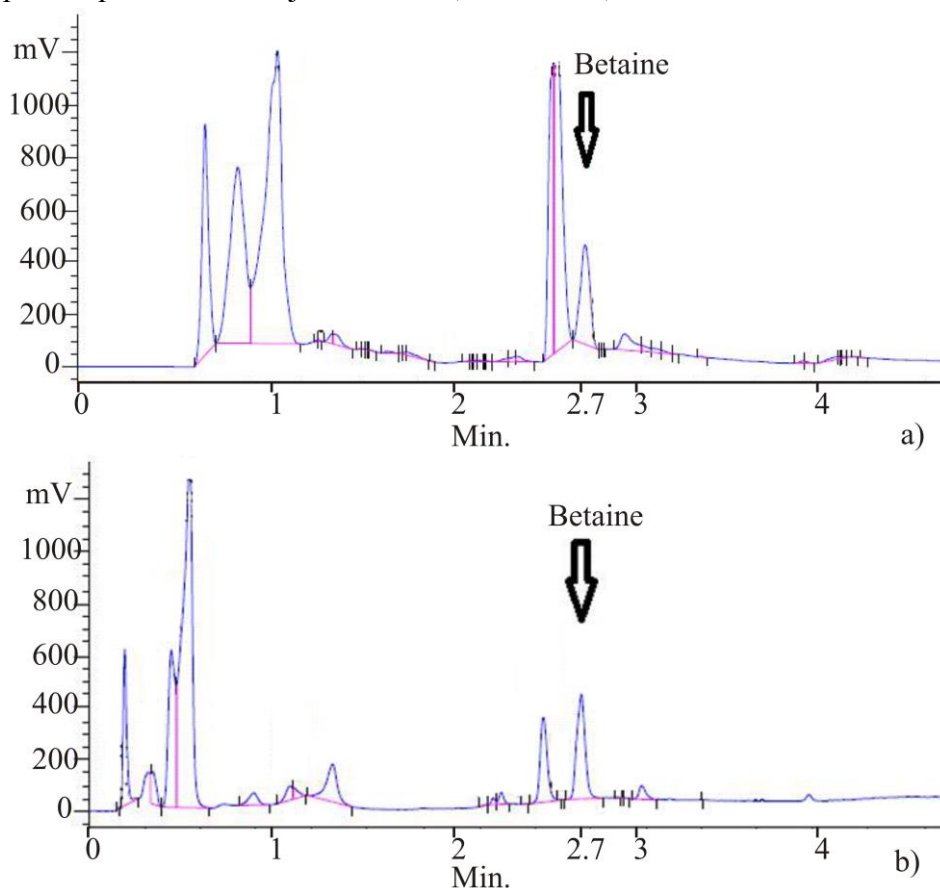
- izbor najpogodnijeg rastvarača za ekstrakciju betaina iz uzorka,
- optimizaciju vremena ekstrakcije betaina iz uzorka,
- optimizaciju *HPLC-ELSD* metode:
 - optimizaciju pH vrednosti mobilne faze,
 - optimizaciju gradijenta protoka mobilne faze (elucije),
 - efikasnost kolona.

4.3.1. Optimizacija ekstrakcije betaina iz uzoraka

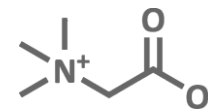
Pri ispitivanju postojećih metoda ekstrakcije i tačne hromatografije visokih performansi (*HPLC*) za analizu betaina u uobičajenim uzorcima hrane veći broj nečistoća je koeluirao sa betainom. Iz tog razloga je značajan deo ispitivanja posvećen problemu iznalaženja optimalnih uslova (ekstrakcija iz uzoraka, kolona, mobilna faza, protok mobilne faze) za određivanje betaina metodom *HPLC*. Radi pronalaženja kolone koja će omogućiti izdvajanje betaina od drugih pratećih materija (nečistoća) isprobane su brojne kolone. Shodno tome, *HILIC* kolona se pokazala najefikasnijom za hromatografsko razdvajanje betaina. Korišćenjem *HILIC* tipa hromatografije prevazilaze se poteškoće prilikom hromatografske analize molekula polarnih karakteristika. Iako je najčešće korišćeno ekstrakciono sredstvo za



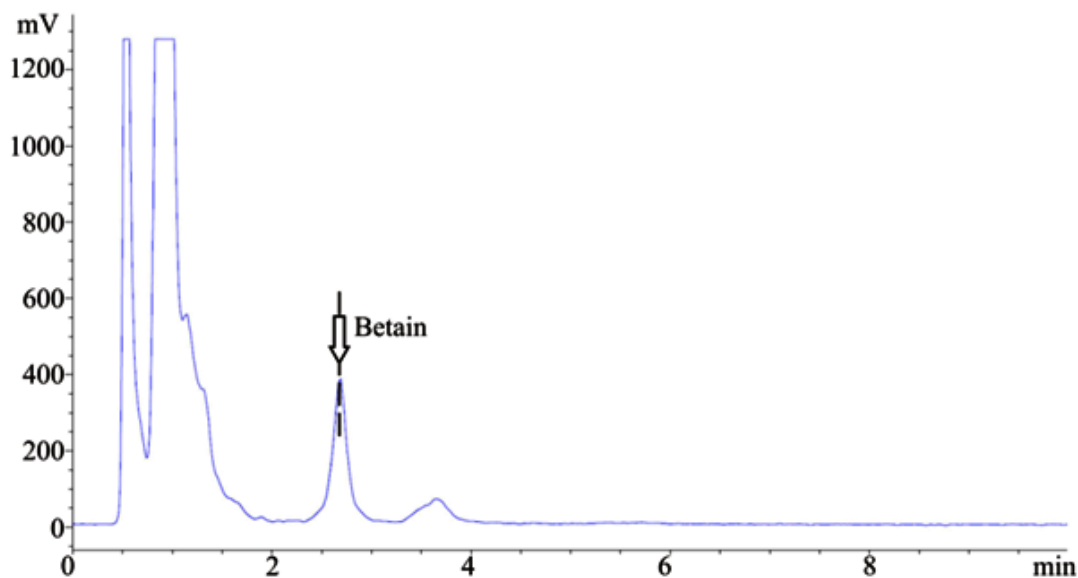
betain voda (Bruce i sar., 2010; De Zwart i sar., 2003; Ross i sar., 2014; Saarinen i sar., 2001; Slow i sar., 2005), u ispitivanjima u ovoj doktorskoj disertaciji korišćenjem vode kao rastvarača ekstrahovana su različita jedinjenja iz matriksa zbog čega je hromatografska slika bila kompleksna. Hromatografski pikovi ugljenih hidrata često su prekrivali i sakrivali pikove betaina čineći kvantifikaciju i identifikaciju betaina otežanom (Slika 4.26a). U cilju da se prevaziđu ovi problemi čist metanol je korišćen kao rastvarač za ekstrakciju. Analiza betaina sastojala se u ekstrakciji iz uzorka metanolom, tretiranju uzorka u ultrazvučnom kupatilu, i centrifugiranju, da bi se zatim gornji metanolni sloj odvojio i upario do suva i nakon rekonstituisanja u vodi profiltrirao kroz membranski filter i analizirao *HPLC - ELSD* metodom uz korišćenje *HILIC* kolone (Kojić i sar., 2017). Rezultat je bio jasno odvojen pik betaina od pikova pratećih materija iz uzorka (Slika 4.26b).



Slika 4.26. Uzorak rastvoren u vodi (a) i uzorak rastvoren u metanolu (b), (Kojić i sar., 2017)



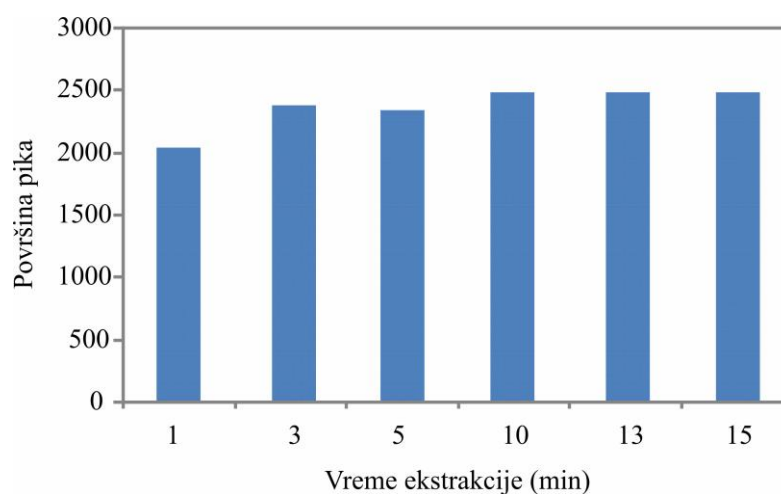
Na slici 4.27 prikazan je hromatogram speltinog integralnog brašna sa izdvojenim pikom betaina (Kojić i sar., 2017).



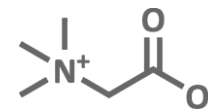
Slika 4.27. Hromatogram speltinog integralnog brašna sa izdvojenim pikom betaina (Kojić i sar., 2017)

4.3.2. Optimizacija vremena ekstrakcije betaina

Optimizacija vremena ekstrakcije (vorteksovanja) betaina je određena preko maksimalne vrednosti površine pika. Optimalno vreme vorteksovanja dobijeno je za površinu pika 2491,2 (izokratski režim: 80% ACN i 20% 10 mM acetatnog pufera; protok 0,5 mL/min; pH mobilne faze 3,7, temperatura kolone sobna, injektovana zapremina je 5 μ l). Optimalno vreme vorteksovanja je postignuto nakon 10 min posle kog nije povećavana površina pika (Slika 4.28.).



Slika 4.28. Otimalno vreme ekstrakcije



4.3.3. Optimizacija metode *HPLC-ELSD*

4.3.3.1. Optimizacija pH vrednosti i gradijenta protoka mobilne faze

Da bi se omogućila optimizacija parametara *HPLC* analize betaina, na osnovu hemometrijskog pristupa, određene su standardne ocene *SS* (eng. *standard score*), merenjem vrednosti rezolucije i odnosa signala i šuma (*signal-to-noise*, *S/N*). Tokom snimanja *HPLC* hromatograma, za optimizaciju pH vrednosti i gradijenta protoka mobilne faze, korišćena je "*min-max*" normalizacija, kao jedna od najčešće korišćenih tehnika u određivanju standardne ocene za poređenje različitih hromatograma. Rangiranje (ocenjivanje) uzoraka se zasniva na osnovu merenih vrednosti i ekstremnih vrednosti merenja (Monzón i sar., 2016; Klein i sar., 2014.).

Svaki podatak koji se koristi u optimizaciji pH vrednosti, treba da se transformiše u normalnu ocenu (eng. *normalized score*), bezdimenzionu vrednost, koja se dobija oduzimanjem minimalne vrednosti od posmatrane pH vrednosti i deljenjem tako dobijene razlike sa razlikom maksimalne i minimalne pH vrednosti koje su dobijene merenjem, prema sledećoj jednačini:

$$\bar{x}_i = DPI \cdot \left(\frac{x_i - \min_i x_i}{\max_i x_i - \min_i x_i} \right), \quad \forall i,$$

koja predstavlja kriterijum "što veći - to bolji" (koristi se za ocenjivanje parametra "rezolucija" i odnosa signala i šuma).

U datoj jednačini su: \bar{x}_i - ocena parametra x_i , *DPI* -indikator duplog pika (logička promenljiva), $\min_i x_i$ - minimalna vrednost parametra, $\max_i x_i$ - maksimalna vrednost parametra x_i , x_i - u ovom slučaju su pH vrednosti.

Ukoliko se pojavljuje dvostruki pik betaina na hromatogramu (usled različite jonske forme), *DPI* ima vrednost 0, u svim drugim slučajevima vrednost ovog parametra jednaka je 1.

Slična jednačina koristi se i pri optimizaciji gradijenta elucije:

$$\bar{x}_i = \frac{x_i - \min_i x_i}{\max_i x_i - \min_i x_i}, \quad \forall i$$

kao i za ocenjivanje parametara "rezolucija" i odnosa signala i šuma. U jednačini su: \bar{x}_i - ocena parametra x_i , $\min_i x_i$ - minimalna vrednost parametra, $\max_i x_i$, - maksimalna vrednost parametra x_i , x_i - u ovom slučaju je: gradijent elucije.

Srednja vrednost normalnih ocena parametara: "rezolucija" i "odnos signala i šuma" hromatograma predstavlja bezdimenzionalnu veličinu koja se označava sa *SS* (standardna ocena), koja predstavlja specifičnu (objedinjenu) kombinaciju podataka o hromatogramu, dobijenu na osnovu različitih parametara hromatograma.

Standardne ocene rađene za posmatrana *HPLC* merenja sumirane su u Tabeli 4.22 (za optimizaciju pH) i Tabeli 4.23 (za optimizaciju sastava i gradijenta mobilne faze) i prikazane na slikama 4.29. i 4.30.

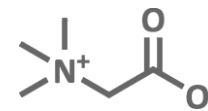
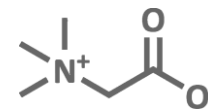


Tabela 4.22. Optimizacija pH (protok=0,5 mL/min i gradijentni režim kao u radu Ross i sar. (2014))

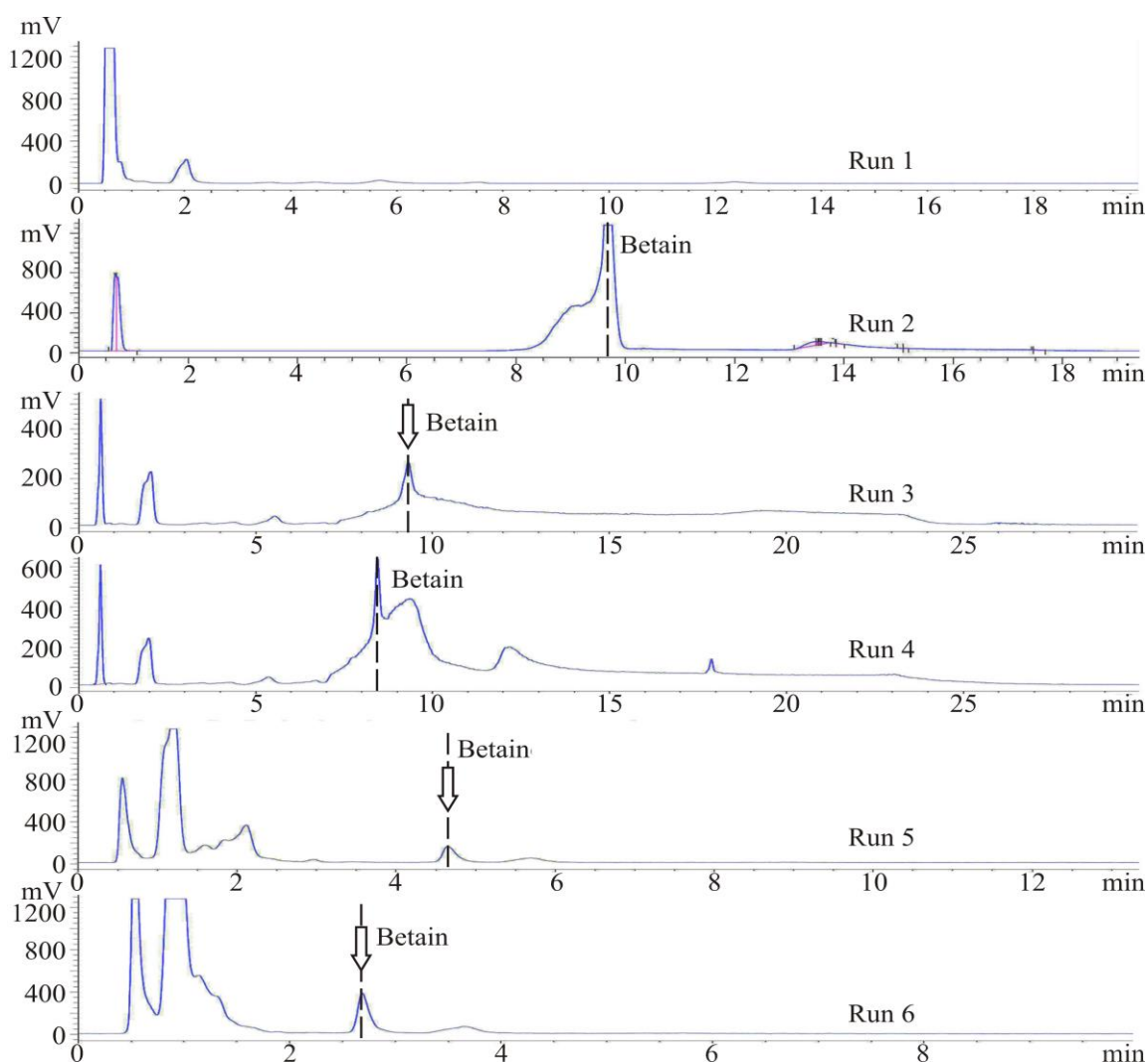
RUN	pH mobilne faze	Rezolucija 1	Rezolucija 2	odnos signala i šuma 1	odnos signala i šuma 2	Dupli Pik indeks	SS
1	1,9	29,12	29,2	4,51	2,4	0	0,00
2	4	2,83	2,66	22,1	5,5	0	0,00
3	5	1,24		8,2		1	0,00
4	3,7	3,58		10,5		1	0,58

Tabela 4.23. Optimizacija gradijenta mobilne faze

RUN	protok (mL/min)	Izokratski ili gradijentni režim (mobilna faza ACN i 10 mM acetatni pufer)	Rezolucija 1	odnos signala i šuma	SS
1	0,5	izokratski tok: 90% ACN i 10% 10 mM acetatni pufer	/	/	0,00
2	0,5	gradijent: 90% ACN u toku 5 min, sniženje koncentracije ACN do 70% tokom 10 min, održavanje 90% ACN u toku 5 min i finalno povećanje koncentracije ACN na 90%.	1,05	0,098	0,00
3	0,5	gradijent: 90% ACN u toku 3 min, sniženje koncentracije ACN do 70% tokom 15 min, održavanje 90% ACN u toku 6 min i finalno povećanje koncentracije ACN na 90%.	2,46	2,3	0,16
4	0,5	gradijent: 90% ACN u toku 3 min, sniženje koncentracije ACN do 50% tokom 15 min, održavanje 50% ACN u toku 6 min i finalno povećanje koncentracije ACN na 90%.	4,38	7,2	0,40
5	0,5	izokratski tok: 85% ACN i 15% 10 mM acetatni pufer	5,11	36,9	0,78
6 (optimum)	0,5	izokratski tok: 80% ACN i 20% 10 mM acetatni pufer	3,22	58,6	0,81

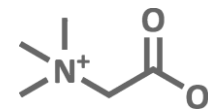


Analiza *standardne ocene* korišćene za optimizaciju pH mobilne faze pokazala je da su optimalne vrednosti rezolucije i odnosa signala i šuma dobijene za hromatogram 4 (Run 4), kod koga je pH vrednost mobilne faze bila 3,7. Vrednosti za parametre rezolucija (3,58) i odnos signala prema šumu (10,5) pokazale su optimalnu ocenu za ovaj hromatogram (0,58). Korišćenjem ove pH vrednosti, oba parametra od važnosti (odnos signala prema šumu i rezolucija) istovremeno su dobili zadovoljavajuće vrednosti, bez pojave dvostrukog pika (Tabela 4.22). Hromatogram 6 je bio optimalan za podešavanje proticanja mobilne faze, sa *SS* vrednošću jednakom 0,81, rezolucijom od 3,22 i odnosom signala prema šumu od 58,6 (Tabela 4.23). Dakle, korišćenjem izokratskog režima proticanja mobilne faze (80% ACN i 20% 10 mM acetatni pufer, ostvarena je maksimalna rezolucija snimanja i odnos signala i šuma, a takođe i optimalno odvajanje pikova (Slika 4.29).

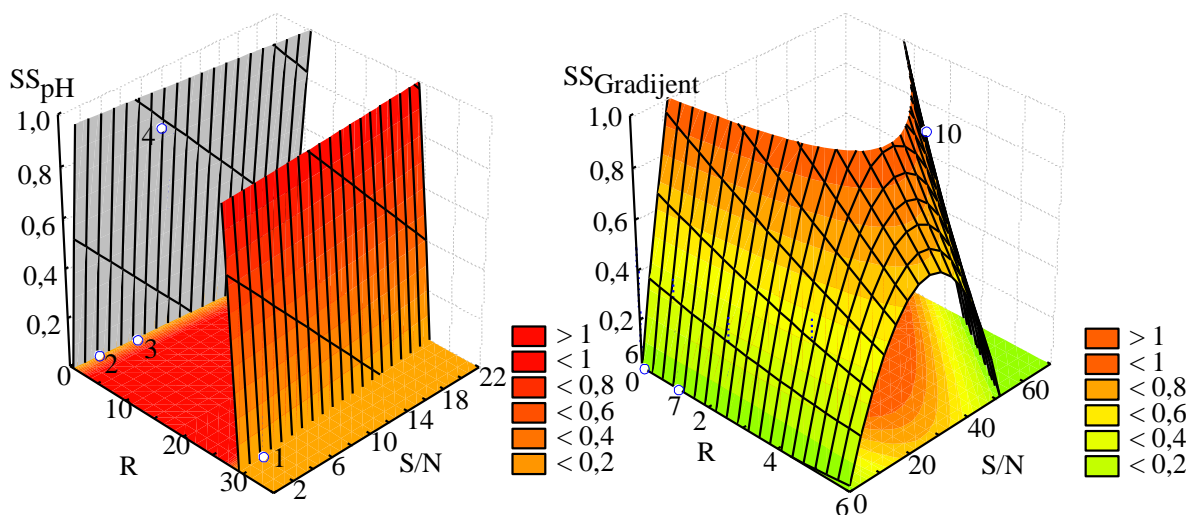


Slika 4.29. Pikovi betaina na različitim gradijentnim i izokratskim režimima proticanja mobilne faze

Optimalne funkcije za podešavanje pH vrednosti mobilne faze i gradijenta proticanja mobilne faze, obrađene modelom odzivne površine, *RSM* (eng. *Response Surface Methodology*) prikazane su na slici 4.30. pH vrednosti mobilne faze ocenjivane su na osnovu



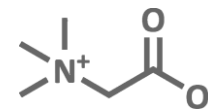
merenih vrednosti za vrednosti rezolucije između 0 i 30 i za raspon odnosa signala i šuma od 2-22. Vrednosti gradijenta ocenjivane su na osnovu merenih vrednosti za vrednosti rezolucije između 0 i 6 i za raspon odnosa signala i šuma od 0-60. Optimum vrednosti za gradijent se dobija na sredini raspona rezolucija, kao i pri većim vrednostima ispitivanog intervala odnosa signala i šuma.



Slika 4.30. Optimalne funkcije za podešavanje pH vrednosti mobilne faze i gradijenta

Prema napred iznetim podacima optimalni uslovi za analizu betaina u spelti, flaps proizvodima, žitaricama, pseudožitaricama i njihovim proizvodima *HPLC - ELSD* metodom su sledeći:

- ekstrakcija betaina: *metanol*,
- vreme ekstrakcije: *10 minuta*,
- rastvarač za upareni metanolni ekstrakt: *voda*,
- kolona: *HILIC*
- mobilna faza: *80% ACN i 20% 10 mM acetatnog pufera*,
- vrednost pH mobilne faze: *3,7*,
- režim proticanja mobilne faze: *izokratski*.



4.3.4. Validacija *HPLC-ELSD* metode

4.3.4.1. Linearnost

Linearnost metode je određena preko kalibracione krive koja je napravljena u sličnom biloškom matriksu kao uzorci, spajkovanjem matriksa poznatim koncentracijama analita, odnosno betaina, kako bi se uračunao uticaj matriksa. Kalibraciona kriva sadrži uzorak bez analita (0 mg/mL) i uzorke sa poznatim koncentracijama analita koje pokrivaju očekivani opseg koncentracija u uzorcima (0,05, 0,075, 0,1, 0,15, 0,20 mg/mL). Kalibraciona kriva je formirana na osnovu površina pika određivanog jedinjenja nasuprot koncentracijama ispitivanog analita na osnovu 6 tačaka u 3 ponavljanja. Linearnost kalibracione krive određena je koeficijentom determinacije ($r^2=0,9958$). Na osnovu površine pika sa *HPLC-ELSD* hromatograma računata je koncentracija betaina prema jednačini:

$$Y = 25293 \cdot X - 522,87$$

gde Y predstavlja površinu pika, a X koncentraciju betaina izraženu u mg/mL.

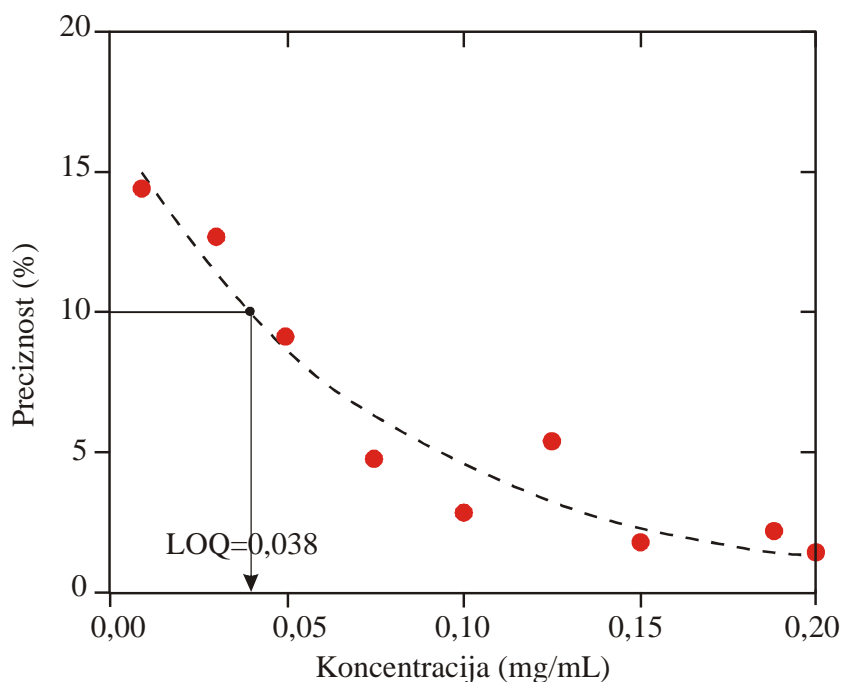
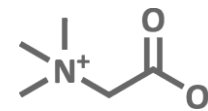
4.3.4.2. Limit kvantifikacije i limit detekcije

Limit (granica) kvantifikacije (eng. Limit of Quantitation, LOQ) je određen sa uzorcima iste koncentracije kao kalibraciona kriva, sa poznatom koncentracijom analita i predstavljen je kao najmanja koncentracija koja može biti kvantifikovana sa prihvatljivom preciznošću i tačnošću. Uzorci sa rastućim koncentracijama analita (0,01; 0,03; 0,05; 0,075; 0,1; 0,125; 0,15; 0,1875; 0,2 mg/mL) su ispitani 6 puta i izračunata je relativna standardna devijacija (*RSD*). *LOQ* odgovara koncentraciji analita koja može da se kvantifikuje sa *RSD* koja nije veća od 10% (Taverniers, i sar., 2004). Grafički je predstavljena eksponencijalna funkcija zavisnosti *RSD* od koncentracije analita (koeficijent determinacije je 0,99). Sa grafika zavisnosti preciznost-koncentracija betaina očitana je *LOQ* (Slika 4.31). Sa predstavljenog grafika može se uočiti dobra zavisnost između eksperimentalnih i računskih vrednosti, koje se mogu opisati sledećim izrazom:

$$Y = 17,89 \cdot e^{-15,63 \cdot x}$$

gde Y predstavlja preciznost (%), a X koncentraciju betaina (mg/mL).

LOQ izračunata sa prikazanog grafika (Slika 4.31) iznosi *LOQ*=0,038mg/mL.



Slika 4.31. *LOQ* izračunata na osnovu preciznosti

Sa predstavljenog grafika (Slika 4.31) može se uočiti dobra zavisnost između eksperimentalnih i računskih vrednosti:

Limit (granica) detekcije (eng., Limit of Detection, *LOD*) je određen merenjem istih rastućih koncentracija analita koje su ponovljene 6 puta i određivanjem odgovora signala pri odnosu signal/šum ($S/N \geq 3$). *LOD* za $S/N=3$ bio 0,01mg/mL.

4.3.4.3. Preciznost i tačnost

Preciznost i tačnost su određene tokom jednog dana (*the intra-day precision and accuracy*) analiziranjem 6 ponavljanja istog uzorka sa 7 različitih rastućih koncentracija betaina (0,050, 0,075, 0,10, 0,125, 0,15, 0,175, 0,20 mg/mL), dok je preciznost i tačnost tokom različitih dana (*the inter-day precision and accuracy*) izračunata merenjem svake od 7 koncentracija 6 dana uzastopno (Tabela 4.24). Tačnost je izražena kao vrednost odstupanja u % od prave vrednosti. Preciznost je izražena kao relativna standardna devijacija koeficijentom varijacije, *CV*.

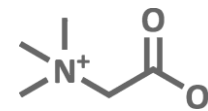


Tabela 4.24. Preciznost i ponovljivost unutar jednog dana i između dana

		Betain		
Koncentracija (mg/mL)	Izmerena kon. (mg/mL)	Preciznost (% RSD)	Tačnost (%)	
Unutar dana (n=7)	0,05	0,0554	9,07	110,85
	0,075	0,0737	4,77	98,28
	0,1	0,0950	2,74	94,96
	0,125	0,1093	5,37	87,44
	0,15	0,1470	1,68	97,99
	0,1875	0,1876	2,11	100,07
	0,2	0,2038	1,34	100,88
Između dana (n=7)	0,05	0,0530	3,33	106,08
	0,075	0,0755	4,39	100,69
	0,1	0,0981	0,95	98,13
	0,125	0,1178	1,30	94,29
	0,15	0,1489	0,97	99,31
	0,1875	0,1876	2,11	100,06
	0,2	0,2037	1,34	101,89

Preciznost unutar i preciznost između različitih dana varira u opsegu 1,34-9,07% i 0,95-4,39%, respektivno. Tačnost unutar jednog dana i tačnost između različitih dana varira u opsegu 87,44-110,85% i 94,29%-106,08%, respektivno. Sve vrednosti su u prihvatljivom opsegu (Tabela 4.24). Bruce i sar. (2010) su dobili tačnost između različitih dana u opsegu 5-11%, za belo i crno brašno, respektivno. Dok je tačnost unutar dana za belo brašno iznosila 1–8%, za crno brašno je iznosila 3–9%. U našoj studiji slični rezultati za preciznost i tačnost unutar i između dana su dobijeni kao u radu Du Shin i sar. (2012).

4.3.4.4. Recovery

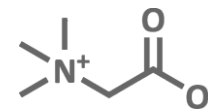
Analiza je izvedena sa 3 različite koncentracije betaina (0,02, 0,03, 0,05 mg/mL). Mase od po 2 g speltinog brašna i brašna obične pšenice su spajkovane sa gorenavedenim koncentracijama standarda betaina i analize su urađene kako je opisano u materijalu i metodama (3.4.2).

Recovery je računat iz jednačine:

$$R = (C_{\text{pronađeno}} - C_{\text{uzorka}}) / C_{\text{dodato}}$$

gde $C_{\text{pronađeno}}$, izmerena koncentracija u spajkovanom uzorku, C_{uzorka} je izmerena koncentracija u uzorku pre spajkovanja, i C_{dodato} je dodata koncentracija.

U tabeli 4.25. date su *recovery* vrednosti za određivanje betaina u pšeničnom brašnu i speltinom brašnu.

Tabela 4.25. *Recovery* vrednosti za određivanje betaina u pšeničnom brašnu i speltinom brašnu

Hrana	C _{uzorka} (mg/mL)	C _{dodato} (mg/mL)	C _{pronađeno} (mg/mL)	Recovery (%)
Pšenično brašno	0,0996	0,02	0,1192	98,1±10
		0,03	0,1285	96,3±12
		0,05	0,1502	101,2±8
Speltino brašno	0,1444	0,02	0,1637	96,7±12
		0,03	0,1737	97,8±12
		0,05	0,1899	90,9±4

Dobijeni rezultati pokazuju *recovery* vrednosti za speltino brašno i pšenično brašno u rang 90,9–97,8% i 96,3– 101,2%, respektivno (Tabela 4.25). Bruce i sar., 2010 su utvrdili da je *recovery* za betain 102–119%, za belo brašno i crno brašno, respektivno. Hefni i sar. (2016) su dobili prosečan *recovery* u opsegu 92–109% za pšenično brašno od celog zrna. Sve vrednosti za *recovery* su bile u istom opsegu, bez obzira na ekstrakcioni postupak.

4.3.5. Analiza betaina u uzorcima žitarica, pseudožitarica i njihovim proizvodima

Razvijena i validovana metoda za određivanje betaina opisana u 4.3.1 – 4.3.4. primenjena je na analizu betaina u različitim žitaricama, pseudožitaricama i njihovim proizvodima (Tabela 4.26).

Tabla 4.26. Sadržaj betaina u različitim uzorcima žitarica i pseudožitarica (Kojić i sar., 2017)

Uzorci	Betain (mg/100g sm*)
1 Amarantus (<i>Amarantuscruentus</i>) ekspanovano zrno	60,73±0,54 ^k
2 Amarantus (<i>Amarantuscruentus</i>) brašno 1	92,51±0,32 ^p
3 Amarantus (<i>Amarantuscruentus</i>) brašno 2	81,72±0,66 ^o
4 Ječmene (<i>Hordeumvulgare</i>) mekinje	35,94±0,29 ^e
5 Ječmeno (<i>Hordeumvulgare</i>) brašno	42,36±0,37 ^{fgh}
6 Ječam (<i>Hordeumvulgare</i>) oljušteni	27,44±0,21 ^c
7 Ječmeno (<i>Hordeumvulgare</i>) brašno od celg zrna	77,87±0,82 ^l
8 Smeša za hleb	<LOQ
9 Žitarice za doručak 1	29,98±0,22
10 Žitarice za doručak 2	18,00±0,03
11 Heljda (30%) i pšenična testenina, kuvana	<LOQ
12 Heljda (<i>Fagopyrumesculentum</i>) testenina	17,53±0,01
13 Heljdino (<i>Fagopyrumesculentum</i>) brašno od celog zrna	<LOQ
14 Obogaćen biskvit sa melasom	328,45±3,53 ^t
15 Bezglutenska smeša za hleb	<LOQ
16 Bezglutenski keks sa bademom	<LOQ

sm* – suva materija

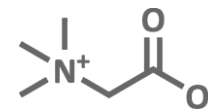


Tabla 4.26. Sadržaj betaina u različitim uzorcima žitarica i pseudožitarica (Kojić i sar., 2017) nastavak

Uzorci	Betain (mg/100g sm*)
17 Bezglutenski kreker	<LOQ
18 Bezglutenski slani štapići	<LOQ
19 Testenina od tikve golicе	<LOQ
20 Kukuruzne (<i>Zea mays</i>) mekinje	18,45±0,05 ^a
21 Kukuruzni (<i>Zea mays</i>) ekspanđati	<LOQ
22 Kukuruzne (<i>Zea mays</i>) pahuljice 1	<LOQ
23 Kukuruzne (<i>Zea mays</i>) pahuljice 2	<LOQ
24 Kukuruzno (<i>Zea mays</i>) zrno	17,55±0,17 ^a
25 Kukuruzni (<i>Zea mays</i>) skrob	<LOQ
26 Testenina od kukuruza i pirinča	<LOQ
27 Ovseno (<i>Avena sativa</i>) zrno 1	41,82±0,45 ^{fg}
28 Ovseno (<i>Oryza sativa</i>) zrno 2	35,80±0,08 ^e
29 Testenina sa dodatkom spanaća	25,13±0,20 ^c
30 Proso (<i>Panicum miliaceum</i>) zrno, neoljušteno	22,65±0,32 ^b
31 Pirinač (<i>Oryza sativa</i>) ekspanđati	<LOQ
32 Pirinač (<i>Oryza sativa</i>) zrno	<LOQ
33 Pirinčana (<i>Oryza sativa</i>) testenina	<LOQ
34 Pirinčani (<i>Oryza sativa</i>) skrob	<LOQ
35 Ražano (<i>Secale cereale</i>) zrno	44,42±0,28 ^h
36 Ražano (<i>Secale cereale</i>) celozrno brašno	98,57±0,67 ^q
37 Sojine mekinje	18,16±0,15 ^a
38 Speltino (<i>T. aestivum</i> spp. <i>spelt</i>) zrno 1	56,52±0,15
39 Speltino (<i>T. aestivum</i> spp. <i>spelt</i>) zrno 2	71,42±0,46 ^m
40 Speltini (<i>T. aestivum</i> spp. <i>spelt</i>) ekstrudati	30,80±0,23 ^d
41 Speltino (<i>T. aestivum</i> spp. <i>spelt</i>) belo brašno	41,00±0,34 ^f
42 Speltino (<i>T. aestivum</i> spp. <i>spelt</i>) zrno 3	82,46±0,34 ^o
43 Speltino (<i>T. aestivum</i>) brašno od celog zrna	125,64±0,23 ^r
44 Bezglutenski slatki biskvit	<LOQ
45 Triticale zrno	64,08±0,48 ^l
46 Pšenične (<i>T. aestivum</i>) mekinje	271,68±3,27 ^s
47 Pšenično (<i>T. aestivum</i>) zrno	44,03±0,64 ^{gh}
48 Pšenična (<i>T. aestivum</i>) testenina	25,33±0,31 ^c
49 Pšenično (<i>T. aestivum</i>) belo brašno 1	49,15±0,35

sm* – suva materija

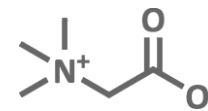


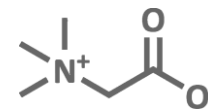
Tabla 4.26. Sadržaj betaina u različitim uzorcima žitarica i pseudožitarica (Kojić i sar., 2017) nastavak

Uzorci	Betain (mg/100g sm*)
50 Pšenično (<i>T.aestivum</i>) belo brašno 2	41,55±0,29 ^f
51 Pšenični (<i>T.aestivum</i>) biskvit od celog zrna	42,49±0,29 ^{fgh}
52 Pšenično (<i>T.durum</i>) brašno	31,00±0,24 ^d
53 Testenina od pšenične (<i>T.durum</i>) krupice	18,83±0,09 ^a
54 Pšenična (<i>T.durum</i>) krupica	48,27±0,68 ⁱ

sm* – suva materija

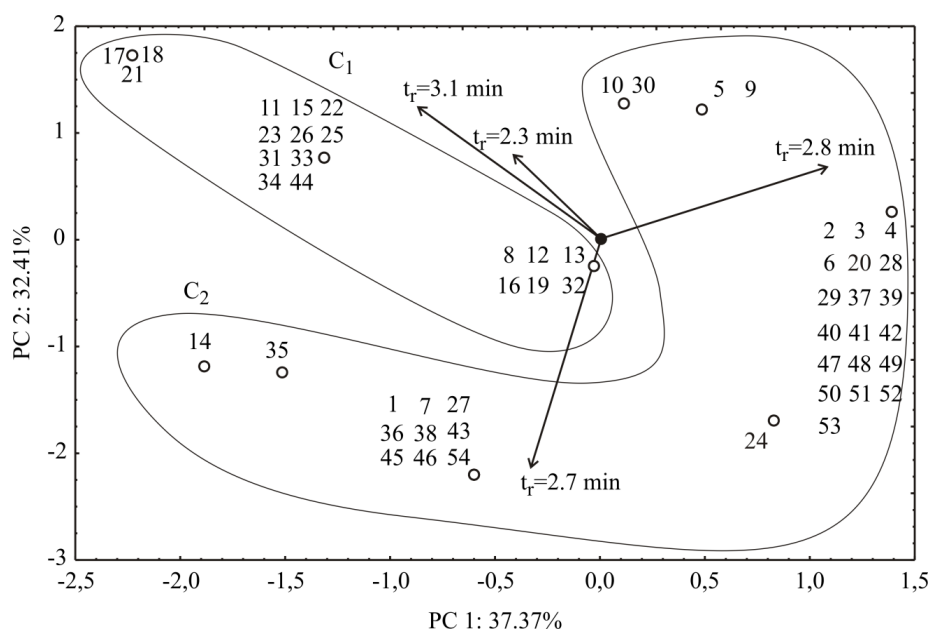
Najveći sadržaj betaina je pronađen u pšeničnim mekinjama (uzorak 46) i obogaćenom biskvitu sa melasom (uzorak 14). Žitarice za doručak (10) variraju u sadržaju betaina, zbog promenljivog sastava koji je baziran na različitim vrstama žitarica, sušenog voća i mekinja. Ross i sar. (2014) su našli nizak sadržaj betaina u musliju (<150 mg/g) jer su uglavnom bazirani na ovsu i suvom voću, a koji imaju nizak sadržaj betaina. Dva ili četiri puta veća koncentracija betaina je pronađena u pšeničnim proizvodima od celog zrna u poređenju sa sadržajem betaina u rafinisanim pšeničnim proizvodima od strane istih autora. Razlike u sadržaju betaina među uzorcima žitarica i pseudožitarica mogu biti zbog uslova rasta ili zbog razlika u gubicima frakcija tokom mlevenja. U našim istraživanjima otkriveno je da speltino zrno i brašno od celog zrna spelte (uzorci 38, 39, 42, 43) imaju više betaina od brašna obične pšenice (uzorci 49, 50) (56,52 – 81,46 mg/100 g sm, 125,640 mg/100 g sm i 31,00 mg/g sm, respektivno). Speltino pšenično zrno predstavlja bogatiji izvor betaina u poređenju sa običnom pšenicom, kao što je i amarantus bogat izvor betaina kada se posmatraju bezglutenski izvori (uzorci 2 i 3). Utvrđeno je da klimatski uslovi i nivo stresa utiče na sadržaj betaina u zrnu, pa uslovi suše mogu dovesti do većeg nivoa betaina u zrnu (Slow i sar., 2005). Različite sorte mogu imati različit sadržaj betaina (Corol i sar., 2012). Sličan sadržaj betaina pronađen je kod brašna od durum (tvrde) pšenice (uzorak 52) i u pšeničnoj krupici (uzorak 54), gde je niži nivo betaina zabeležen u brašnu od durum (tvrde) pšenice (31,0 mg/100 g sm), dok u je u pšeničnoj (*Triticum durum*) krupici pronađeno 48,27 mg/100g sm. Visok sadržaj betaina je u žitaricama kao što su tritikale, ječam i raž u poređenju sa običnom pšenicom (uzorci 45, 6, 35 i 47). U našim istraživanjima dobili smo slične rezultate za nivo betaina u ovsu (uzorci 27 i 28) kao i De Zwart i sar. (2003) u iznosu od 200–1000 µg/g. Bezglutenski proizvodi imaju nizak sadržaj betaina (Bruce i sar., 2010; Ross i sar., 2014). U najvećem broju komercijalno dostupnih bezglutenskih proizvoda zabeležen je niži nivo od 150 µg/g betaina.

Sadržaj betaina u bezglutenskim uzorcima koji su korišćeni u našim istraživanjima (skrob, ekspanđati, testenina, pahuljice od kukuruza i pirinča) bio je ispod nivoa detekcije. Isto tako, u komercijalno dostupnim bezglutenskim proizvodima (hlebna smeša, biskviti, krekeri, testenina) sadržaj betaina je bio ispod nivoa detekcije, a što je u skladu sa literaturnim navodima (Ross i sar., 2014). Umereni nivo sadržaja betaina je pronađen u testenini od heljde i prosa. Naša istraživanja pokazuju da je dodatak melase u bezglutenske biskvite uzrokovao povećanje sadržaja betaina do 328 mg/100 g sm (uzorak 14).



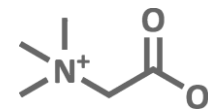
Higginbotham i McCarthy (1998) smatraju melasu šećerne repe bogatim izvorom betaina (5–6%), što je i razlog za njegovo industrijsko dobijanje iz melase šećerne repe. Uključivanjem amarantusa, prosa, melase šećerne repe u bezglutenske proizvode, može se poboljšati ishrana onih koji prate bezglutensku ili vegansku ishranu (Kojić i sar., 2017).

Radi klasifikacije uzoraka ispitivanih žitarica, pseudožitarica i njihovih proizvoda na osnovu sadržaja betaina primenjena je i *PCA* (eng. *Principal Component Analysis*) analiza. Posmatrana je površina ispod pikova *HPLC* hromatograma, u opsegu retencionog vremena između 2,3 i 3,1 min i ona je korišćena kao deskriptor za diferenciranje analiziranih uzoraka. Orijehtacija vektora koji opisuje promenljivu u faktorskom prostoru pokazuje rastući trend posmatrane promenljive, a magnituda tog vektora je proporcionalna kvadratu korelacije između izračunate vrednosti za promenljivu i same promenljive. Uglovi između odgovarajućih promenljivih ukazuju na stepen njihove korelacije (mali uglovi koji odgovaraju visokim korelacijama) kao što je prikazano na slici 4.32.



Slika 4.32. *PCA* analiza uzoraka žitarica i pseudožitarica

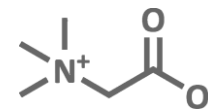
Rezultati dobijeni *PCA* analizom predstavljaju razlike između uzoraka na osnovu sadržaja betaina. Tačke na *PCA* grafiku koje su geometrijski blizu jedna drugoj pokazuju sličnost među uzorcima, koji su grupisani u dve velike grupe obeležene sa C1 i C2 (Slika 4.32). Velika grupa uzoraka koja nije sadržala betain obeležena sa C1: 8, 12, 13, 16, 19, 32, 11, 15, 22, 23, 26, 25, 31, 33, 34, 44, 17, 18, 21. Betain je određen u uzorcima koji čine grupu C2, a koja uključuje sledeće uzorke: 2, 3, 4, 6, 20, 28, 29, 37, 39, 40, 41, 42, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 24, 10, 30, 5, 9, 1, 7, 27, 36, 38, 43, 45, 46, 54, 14, 35. Grupa C1 obuhvata sve bezglutenske uzorke. Dakle, prema *PCA* analizi određena su dva glavna trenda: 1. bezglutenski proizvodi koji su karakterisani bez sadržaja betaina (izuzev amarantusa i prosa), obeleženi kao C1 i 2. i svi ostali proizvodi obeleženi sa C2 sa potvrđenim sadržajem betaina (Slika 4.32).



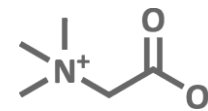
5. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata i diskusije u vezi sa izvedenim analizama može se izvesti više značajnih zaključaka:

- Povećanje proizvodnje i upotrebe speltinog brašna u ishrani ljudi nametnulo je potrebu definisanja i karakterizacije flips proizvoda od ove sirovine. S obzirom na to da žitarice predstavljaju glavni izvor betaina u ljudskoj ishrani, jedan od načina da se poveća unos betaina je preko funkcionalne hrane obogaćene betainom. Prema regulativi evropskog udruženja cerealija za doručak (European Breakfast Cereal Association) porcija ekstrudiranog proizvoda trebalo bi da bude veličine 40 g. Konzumiranjem dnevno porcije od 40 g u kojoj se nalazi 1500 mg betaina, trebalo bi da se poboljša ljudska ishrana i time zadovolji potreba ljudi za betainom. Rezultat ove disertacije je optimizacija ekstrudiranja na dvopužnom ekstruderu i proizvodnje funkcionalnog flips proizvoda od speltinog integralnog brašna koji bi sadržao preporučenu količinu betaina u dnevnoj porciji.
- Prilikom formulisanja flips proizvoda od speltinog integralnog brašna koji bi potencijalno bio nosilac zdravstvene izjave o povoljnom uticaju na metabolizam homocisteina treba dodati betain u količini 6,25- 8,52% na masu brašna. Zbog toga je u ispitivanjima dodat betain u količini od 9% na masu brašna. Sadržaj betaina u finalnom funkcionalom proizvodu kretao se u opsegu 1248-1543 mg/40g, odnosno u dnevnoj porciji ekstrudiranog proizvoda.
- Prvi put je urađeno istraživanje koje se odnosi na proces prehrambenog ekstrudiranja u kojem je primenjena analiza višeciljne optimizacije u kombinaciji sa analizom neuronske veštačke mreže (ANN) i genetskim algoritmom.
- Višeciljna optimizacija pokazala je da su za proizvodnju flips proizvoda od speltinog integralnog brašna koji bi sadržao preporučeni dnevni unos betaina od 1500 mg u 40 g flips proizvoda, a koji je neophodan da bi se osetili uticaji na poboljšanje zdravlja, optimalni sledeći procesni parametri: protok materijala (Q) od 20,45 do 24,04 kg/h, sadržaj vlage materijala (V) od 18,6 do 19,44 %, brzina obrtanja pužnice ekstrudera (n) 250 obrtaja u minuti. Pri tim uslovima sadržaj betaina u uzorcima je od 1601,6 do 1764,7 mg/40g, a potrošnja specifične mehaničke energije (SME) iznosi od 97,4 do 114,1 Wh/kg.
- Povećanje vlage ulaznog materijala vodi do velikog smanjenja ekspanzije ekstrudata. Povećanje brzine obrtanja pužnice tokom ekstrudiranja dovodi do manjeg viskoziteta testa i veće elastičnosti, što doprinosi većoj ekspanziji ekstrudata. Najveći stepen ekspanzije (1,93) zabeležen je pri najvećim brzinama obrtanja pužnice (750 o/min) i vlažnosti polaznog materijala od 20% i protoka materijala od 20 kg/h. Yoonov model je pokazao da na stepen ekspanzije najveći uticaj ima brzina obrtanja pužnice (približno 60%) dok je uticaj vlažnosti materijala negativan, a protok materijala nema značajan uticaj.



- Nasipna masa flips proizvoda se smanjuje sa povećanjem brzine pužnice i stepena ekspanzije. Sa povećanjem vlažnosti materijala za vreme ekstrudiranja redukuje se elastičnost testa i potrošnja specifične mehaničke energije usled čega dolazi do smanjenja želatinizacije, stepena ekspanzije i povećanja nasipne mase ekstrudata. Protok materijala nema uticaja na nasipnu masu. Iz Yoonovog modela uticaja procesnih parametara na nasipnu masu ekstrudata potvrđeno je da najmanji uticaj ima protok materijala, dok sadržaj vlage polaznog materijala ima pozitivan uticaj. Najveći, ali negativan uticaj je brzine obrtanja pužnice.
- Manji broj obrtaja pužnice obezbeđuje uzorke flipsa sa većim sadržajem rezistentnog skroba, što je najverovatnije posledica manje degradacije skroba zbog manjeg smicajnog napona na manjim brzinama obrtanja pužnice. Povećanje vlage polaznog materijala dovodi do većih vrednosti rezistentnog skroba, dok protok polaznog materijala nema uticaja na sadržaj rezistentnog skroba. Najveća vrednost rezistentnog skroba od 4,94 g/100g je u uzorku pri sadržaju vlage početnog materijala od 20%, protoka od 20 kg/h i najmanjoj brzini obrtanja pužnice od 250 o/min. U svim uzorcima vrednosti sadržaja rezistentnog skroba su niske nakon ekstrudiranja.
- U svim ekstrudiranim uzorcima od speltinog brašna sa dodatkom betaina utvrđeno je povećanje vrednosti indeksa apsorpcije vode (*WAI*) i indeksa rastvorljivosti u vodi (*WSI*) kada se porede sa onima koji nisu ekstrudirani. Povećanje vlage polaznog materijala ima najveći uticaj na povećanje vrednosti *WAI*. Pokazalo se da početno povećanje vrednosti *WAI* sa povećanjem brzine obrtanja pužnice opada sa daljim povećanjem brzine obrtanja pužnice, dok se sa povećanjem protoka materijala u početku smanjuju vrednosti *WAI*, nakon čega dolazi do povećanja. Iz Yoonovog modela jasno je vidljivo da je na vrednosti *WAI* zanemarljivo mali uticaj imala brzina obrtanja pužnice, nešto izraženiji je uticaj protoka materijala, a izuzetno velik uticaj vlage materijala.
- Povećanje brzine obrtanja pužnice dovodi do povećanja indeksa rastvorljivosti u vodi (*WSI*). Ovaj trend se može objasniti razgradnjom skroba usled smicanja, čime fragmenti skroba bivaju rastvorljivi u vodi što dovodi do povećanja vrednosti *WSI*. Takođe, pri visokom sadržaju vlage brzina obrtanja pužnice nema uticaja jer dolazi do plastifikacije granula skroba, čime se sprečava degradacija usled smicanja. Iz Yoonovog modela uticaja parametara na vrednost *WSI* može se videti da brzina obrtanja pužnice ima najveći dok protok materijala ima najmanji uticaj na vrednosti *WSI*.
- Nakon ekstrudiranja vrednosti stepena oštećenja skroba su veće (14,59 – 17,58%) u odnosu na neekstrudirani skrob (1,78%). Povećanje sadržaja vlažnosti materijala dovelo je do sniženih vrednosti stepena oštećenja skroba jer dolazi do smanjenja temperature testa tokom ekstrudiranja i smanjenja želatinizacije skroba. Voda u ekstruderu takođe može delovati kao lubrikant i smanjiti trenje i time usloviti smanjenje stepena oštećenja skroba. Brzina obrtanja pužnice pokazala je značajan pozitivan efekat na vrednosti stepena oštećenja skroba. Mehanička energija je jedan od glavnih faktora koji doprinose degradaciji



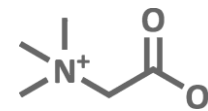
skroba te sa povećanjem broja obrtaja pužnice raste i *SME*, što uslovljava povećanje stepena oštećenosti skroba, a time i vrednosti *WSI*. Povećanjem protoka materijala prilikom ekstrudiranja povećava se stepen oštećenosti skroba. Protok materijala ima uticaj na vreme zadržavanja u pužnici ekstrudera, tako da je u pozitivnoj korelaciji sa uticajem brzine obrtanja pužnice.

➤ Teksturalne osobine ekstrudata veoma zavise od stepena ekspanzije, tj. ekstrudati sa većim stepenom ekspanzije imaju manju tvrdoću. Sa povećanjem sadržaja vlage u polaznom materijalu raste tvrdoća ekstrudata. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatima za nasipnu masu i ekspanziju ekstrudata kada nasipna masa raste a smanjuje se stepen ekspanzije sa povećanjem vlažnosti materijala. Tvrdoća pokazuje visoku pozitivnu korelaciju sa vlagom polaznog materijala, tj. povećava se sa povećanjem sadržaja vlage i negativnu korelaciju sa brzinom obrtanja pužnice odnosno smanjuje se sa povećanjem broja obrtaja pužnice. Protok ulaznog materijala je imao najmanji uticaj na tvrdoću ekstrudata.

➤ Vrednosti svetloće boje (L^*) nakon ekstrudiranja su smanjene, dok su vrednosti udela crvene/zelene boje (a^*) i udela žute/plave boje (b^*) povećane. Promene u boji ekstrudata mogu se povezati sa potencijalnom ulogom betaina kao aminokiseline u Majlardovim reakcijama, a mogu biti i posledica reakcije između betaina sa šećerom koja doprinosi nastanku bojenih jedinjenja (produkti Majlardovih reakcija) koje smanjuju svetloću ekstrudata. Porast vlage polaznog materijala utiče na povećanje vrednosti svetloće (L^*) i udela žute/plave boje (b^*), dok se udeo crvene/zelene boje (a^*) smanjuje pri sadržaju vlage do 20%, a nakon povećanja vlage sledi i povećanje vrednosti ovog parametra. Pri većim vrednostima vlage, efekat temperature je smanjen, što rezultuje manjim tamnjenjem uzorka. Povećanje brzine obrtanja pužnice povećava vrednosti za L^* i b^* , a vrednost koordinate a^* se smanjuje. Povećanje protoka materijala dovodi do povećanja L^* vrednosti, dok vrednosti a^* i b^* opadaju. Yoonovi modeli su pokazali da je vlaga polaznog materijala imala najveći uticaj na vrednosti svetloće boje (L^*), dok je brzina obrtanja pužnice imala najveći uticaj na vrednosti parametara boje a^* i b^* .

➤ Prilikom senzorske ocene flips proizvoda uzorak sa maksimalnom ekspanzijom se izdvojio najvećim prečnikom, ali i najizrazitijim slatkim ukusom što je i bilo očekivano. Uzorak najmanje čvrstoće se izdvojio po izrazitom gorkom i slatkim ukusu nakon potapanja u mleko. S obzirom na to da je ovaj uzorak imao najbolja svojstva rehidracije (najslabija mehanička svojstva) i stoga upio najveće količine mleka, oba ukusa prisutna u uzorku su došla do izražaja zbog rastvaranja materija koje daju sladak i gorak ukus u mleku. Flips proizvode koji su dobijeni optimizovanim tehnološkim postupkom ekstrudiranja karakteriše veća tvrdoća i žvkljivost kako pre, tako i nakon potapanja u mleko, kao i tamnija boja. Dodatak betaina ne utiče na pojačanje gorkog ukusa flips proizvoda (kada se poredi optimizovani uzorci sa i bez betaina).

➤ Kod svih ekstrudiranih uzoraka zabeleženo je povećanje početnog viskoziteta pri niskoj temperaturi u poređenju sa netretiranim uzorcima koje je posledica veće količine

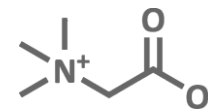


prisutnih rastvorljivih materija nastalih termičkom razgradnjom skroba, što je u skladu sa dobijenim rezultatima za *WSI*. Kod svih analiziranih uzoraka u poređenju sa netretiranim uzorkom došlo je do smanjenja vrednosti maksimalnog viskoziteta (na 95°C), što je posledica delimične želatinizacije skroba tokom termičkog tretmana, odnosno smanjenja broja granula čijim bubrenjem dolazi do povećanja viskoziteta paste. Pad viskoziteta tokom održavanja uzorka na visokoj temperaturi (95°C) je posledica pucanja skrobnih granula nakon čega dolazi do linearnog usmeravanja polimera što smanjuje viskozitet paste, i on je zabeležen kod svih uzoraka izuzev kod optimalnog uzorka sa dodatkom betaina. Obzirom da se u ovom optimalnom ekstrudiranom uzorku nalazi betain može se pretpostaviti da je tokom tretmana ekstrudiranja došlo do formiranja veza između skroba i betaina, što je uticalo da kog pomenutog uzorka ne dođe do pada viskoziteta pri održavanju na visokoj temperaturi.

➤ Uzorak maksimalne ekspanzije imao je najbolja mehanička svojstva (najveći prečnik, najmanja tvrdoća pre i nakon potapanja, najmanja žvakljivost pre i nakon potapanja) i izrazit sladak ukus i može se smatrati najpogodnijim za potrošača. Ako se doda zaključak da betain ne utiče na povećanje gorkog ukusa, pretpostavlja se da bi uzorak maksimalne ekspanzije bio najpogodniji i za obogaćivanje betainom.

➤ Sadržaj betaina u uzorcima određen je validovanom i optimizovanom metodom tečne hromatografije visokih performansi *HPLC* uz *HILIC* kolonu i *ELSD* detektor. Značajnost metode potvrđena je odgovarajućim statističkim parametrima: linearnost, limit kvantifikacije, limit detekcije, preciznost, tačnost, recovery. Optimizacija metode obuhvatila je višeparametarski pristup: izbor najpogodnijeg rastvarača za ekstrakciju betaina iz uzorka, optimizaciju vremena ekstrakcije betaina iz uzorka, optimizaciju *HPLC* - *ELSD* metode: (kolona, pH vrednosti mobilne faze, gradijent protoka mobilne faze - elucije).

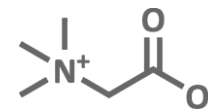
➤ Optimalni uslovi *HPLC* - *ELSD* metode za analizu betaina u uzorcima spelte i flips proizvoda od spelte sa dodatim betainom su sledeći: rastvarač za ekstrakciju betaina - *metanol*, vreme ekstrakcije - *10 minuta*, rastvarač za upareni metanolni ekstrakt - *voda*, mobilna faza - *80% acetonitrila i 20% 10 mM acetatnog pufera*, vrednost pH mobilne faze - *3,7*, protok mobilne faze - *0,5 mL/min*, režim proticanja mobilne faze - *izokratski*. Metoda je uspešno primenjena i u analizi betaina u žitaricama, pseudožitaricama i njihovim proizvodima.



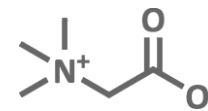
CONCLUSIONS

Based on the results and discussion related to the performed analyses, several significant conclusions can be made:

- Nowadays, increased production and use of spelt flour in human nutrition increases necessity to define and characterize snack products from this raw material. Because cereals are the main source of betaine in human nutrition, one way to increase betaine intake is through betaine enriched functional foods. According to the regulation of the European Breakfast Cereal Association, the portion of the extruded product should be 40 g. By consuming daily portion of 40 g which contains 1500 mg of betaine, an improvement in human nutrition can be expected. The main result of this thesis is the optimization of extrusion process in creation of snack products from spelt wholegrain flour with added betaine using twin screw extruder.
- In order to produce extruded snack product from spelt wholegrain flour which would potentially satisfy health statement about the normal metabolism of homocysteine, betaine should be added in the amount of 6.25- 8.2% by weight of flour. Therefore, betaine was added in the amount of 9% on the weight of the flour. The content of betaine in the final functional product was in the range of 1248-1543 mg/40 g.
- This is the first investigation in which the multi-objective optimization (*MOO*) analysis coupled with artificial neural network and genetic algorithm was applied for the extrusion cooking process.
- In order to potentially improve the human health and contribute to the recommended daily intake of betaine (1500mg/40g extruded snack product), following optimal parameters were obtained by multi-objective optimization method: feed rate from 20.45 to 24.04 kg/h, moisture content from 18.6 to 19.44 % and screw speed at 250 rpm. According to these conditions betaine content was from 1601.6 to 1764.7mg/40g and corresponds to the use of specific mechanical energy from 97.4 to 114.1 Wh/kg.
- Increased feed moisture leads to a decrease in the expansion of extrudate. It was observed that an increase in screw speed resulted in dough with lower viscosity and higher elasticity, which have resulted in the higher expansion index. The highest expansion index (1,93) was achieved at the following operating conditions: screw speed (750 rpm), feed moisture (20%) and feed rate (20kg/h). Yoon's model has shown that screw speed has the greatest influence on the expansion index (approximately 60%). It is followed by negative influence of feed moisture, while the feed rate has an insignificant influence on the expansion index.



- The bulk density decreases with increasing screw speed and the expansion index. Increased feed moisture content during extrusion may reduce the elasticity of the dough resulting in reduced specific mechanical energy, therefore reducing gelatinization, decreasing the expansion and increasing the bulk density of extrudate. Feed rate has no effect on the bulk density. From the Yoon's model it has been confirmed that the feed rate has the lowest influence, while the feed moisture has a positive effect, and screw speed has the highest, negative effect on bulk density.
- Lower screw speed produces extrudates with the higher content of resistant starch, which is probably due to less degradation of the starch caused by lower shear stress at lower screw speed. Increasing feed moisture leads to a higher resistant starch values, while feed rate does not influence on the content of the resistant starch. The highest value of the resistant starch (4,94 g/ 100 g) was achieved at the following operating conditions: feed moisture (20%), feed rate (20kg/h) and screw speed (250 rpm). In all samples, the values for resistant starch content are low after the extrusion.
- An increase in the water absorption index (*WAI*) and the water solubility index (*WSI*) were observed in all extruded samples from spelt wholegrain flour with added betaine compared to products which were not extruded. An increase in feed moisture has the greatest influence on the increase in the value of *WAI*. It has been shown that the initial increase in *WAI* values with increasing screw speed decreases with further increase in screw speed, while increasing feed rate initially reduces the values of *WAI*, followed by an increase. From Yoon's model, it is clearly visible that the screw speed has the lowest influence on *WAI*, while feed rate has higher influence, and the extremely high effect has feed moisture.
- Increase in the screw speed leads to an increase in the water solubility index (*WSI*). This trend can be explained by the degradation of the starch caused by the shear stress, which makes starch fragments soluble in water, leading to an increase in the value of *WSI*. Also, at high moisture content, the screw speed has no effect, because the starch granules are plasticized, which prevents shear degradation. From Yoon's model, it can be seen that the screw speed has the greatest, while the feed rate has the lowest impact on the *WSI* values.
- The starch damage was higher (14.59 – 17.58%) after extrusion process compared to the starch damage (1.78%) before extrusion process. The increase in the moisture content resulted in the reduced values of starch damage due to the reduced temperature of dough and to the starch gelatinization during the extrusion process. Moisture can act as a lubricant during extrusion and reduce shear rate and thus reduce the starch damage. The screw speed has shown a significant positive effect on the starch damage. Specific mechanical energy is one of the main factors which contribute to the degradation of starch. Therefore, increasing the screw speed increases specific mechanical energy which influences the increase in starch damage and water solubility index. Increasing the feed rate during extrusion also



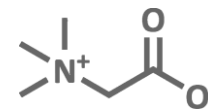
increases the starch damage. Feed rate has an effect on the retention time in the extruder barrel, thus it is positively correlated with the effect of the screw speed.

➤ The textural properties of the extrudates are highly dependent on the expansion index, i.e. extrudates with a higher expansion index are softer. The hardness of the extrudate has increased with increasing the feed moisture content. This result is in agreement with results for the bulk density and expansion index. The bulk density increases and the expansion rate decreases with increasing the feed moisture. Hardness shows a high positive correlation with the feed moisture, i.e. it increases with increasing moisture content. Also, it shows a negative correlation with the screw speed, i.e. it decreases with the increase in the screw speed. The feed rate had the lowest effect on the hardness of extrudate.

➤ L^* color values were decreased after extrusion while a^* and b^* values were increased. Changes in color values might be due to possible reaction of higher doses of betaine (aminoacid) with sugar in Maillard reactions that contributed to the formation of colored products that decreased products brightness. L^* and b^* color values have increased with increasing the feed moisture. Values for a^* have decreased with increasing the feed moisture up to 20%, and after that a^* values started to increase. The higher feed moisture content prevents the effects of the high temperatures and results in lower browning of the sample. Increasing the screw speed in extrusion cooking increased the values of L^* and b^* , while the value of a^* was decreased. Also, increasing the feed rate increased the L^* values, while a^* and b^* decreased. Yoon's model has shown that feed moisture content has the greatest influence on the L^* values. The screw speed has the greatest influence on the a^* and b^* values.

➤ Results of the sensory evaluation of extruded snack product showed that the sample with maximal expansion was separated from other samples by the largest diameter and the most pronounced sweet taste, which was expected. Sample with the lowest hardness was distinguished by strong bitter and sweet taste after immersion in milk. Considering that this sample had the best rehydration properties (due to the weakest mechanical properties) and therefore absorbed the largest amount of milk, both tastes present in the sample became prominent due to the dissolution of substances that give a sweet and bitter taste in milk. Snack extruded products that are obtained by optimized extrusion process are characterized by higher hardness and chewiness both before and after immersion in the milk, as well as by the darker color. Betaine addition did not affect the bitter taste of the snack extruded product (when the optimized sample with and the optimized sample without betaine were compared).

➤ An increase in initial viscosity at low temperatures was observed in all extruded samples compared to untreated samples which resulted from a higher amount of the present soluble substances that appeared during thermal degradation of starch, which is consistent with the results obtained for *WSI*. In comparison to the untreated sample, in all analyzed samples a decrease in the value of the maximum viscosity (at 95°C) was recorded which

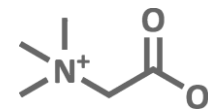


was the result of partial gelatinization of the starch during thermal treatment, i.e., the decrease in the number of granules whose swelling results in an increase in viscosity of the paste. The decrease in viscosity while holding the sample at high temperature (95°C) is due to the leaching of starch granules, resulting in a linear orientation of the polymer, which reduces the viscosity of the paste, and it is observed in all samples except in the optimal sample with added betaine. Since this optimal extruded sample contains betaine, it can be assumed that during extrusion there was a formation of bonds between starch and betaine, which caused that the mentioned sample did not exhibit a decrease in the viscosity during holding the sample at high temperature.

➤ Considering that the sample with maximal expansion had the best mechanical properties (the largest diameter, the lowest hardness before and after immersion, and the lowest chewiness before and after immersion) and the most pronounced sweet taste, it could be considered as the most suitable for the consumption. If it is taken into account that betaine does not influence the increase in bitter taste, it could be presumed that the sample with maximal expansion would be the most suitable for the enrichment with betaine.

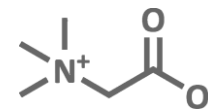
➤ Betaine content from samples has been quantified using *HPLC-ELSD* (high pressure liquid chromatography - evaporative light scattering detector) method which is validated and optimized. Proposed method accomplishes the requirements for the method linearity, limits of detection and quantitation, precision, accuracy and recovery. Optimization of the method included a multi-parameter approach: optimization of the sample extraction, optimization of the betaine extraction time from the sample, optimization of the *HPLC-ELSD* method: (column type, pH values of the mobile phase and the gradient).

➤ Optimal chromatographic conditions for the *HPLC - ELSD* method in the analysis of betaine levels in spelt and its products are following: extraction solvent - *methanol*, extraction time - *10 min*, solvent for the evaporated methanol extract - *water*, mobile phase - *80% of acetonitrile and 20% of 10 mM acetate buffer*, pH of mobile phase - *3,7*, flow rate - *0,5 mL/min*, flow mode - *isocratic*. The method has been successfully applied for the analysis of betaine in cereals, pseudocereals and their products.

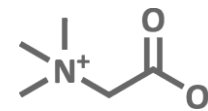


6. LITERATURA

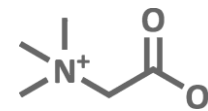
1. Abdel-Aal E.S., Hucl P., Sosulski F.W. (1995). Compositional and nutritional characteristics of spring einkorn and spelt wheats. *Cereal Chemistry*, 72, 621–624.
2. Abdel-Aal E.S., Hucl P., Sosulski F.W. (1998). Food uses for ancient wheats. *Cereal Foods World*, 43, 763–767.
3. Abdel-Aal E.S.M., Hucl P. (2002). Amino acid composition and in vitro protein digestibility of selected ancient wheats and their end products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 737–747.
4. Abdel-Aal E.S.M., Hucl P. (2005). Spelt: a specialty wheat for emerging food uses. In: Abdel-Aal E.S.M., Wood P.: Specialty grains for food and feed. St Paul, MN, USA: American Association of Cereal Chemists, 109–141.
5. Abdel-Aal E.S.M., Hucl P., Sosulski F.W., Bhirud P.R. (1997). Kernel, milling and baking quality of spring type spelt and einkorn wheats. *Journal of Cereal Science*, 26, 363–370.
6. Agilent 1200 Infinity Series, ELSD, User Manual: Introduction to the ELSD.
7. Alirezai M., Gheisari H.R., Ranjbar V.R., Hajibemani A. (2012). Betaine: a promising antioxidant agent for enhancement of broiler meat quality. *British Poultry Science*, 53, 699–707.
8. Alirezai M., Khoshdel Z., Dezfoulian O., Rashidipour M., Taghadosi V. (2015). Beneficial antioxidant properties of betaine against oxidative stress mediated by levodopa/benserazide in the brain of rats. *The Journal of Physiological Sciences*, 65, 243–252.
9. Alsaffar A.A. (2011). Effect of food processing on the resistant starch content of cereals and cereal products – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 455–462.
10. Altan A., McCarthy K., Maskan M. (2008a). Evaluation of snack foods from barley-tomato pomace blends by extrusion processing. *Journal of Food Engineering*, 84, 231–242.
11. Altan A., McCarthy K.L., Maskan M. (2008b). Extrusion cooking of barley flour and process parameter optimization by using response surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1648–1659.
12. Altan A., McCarthy K.L., Maskan M. (2009). Effect of screw configuration and raw material on some properties of barley extrudates. *Journal of Food Engineering*, 92, 377–382.
13. Alvarez-Martinez, L., Kondury, K. P., & Harper, J. M. (1988). A general model for expansion of extruded products. *Journal of Food Science*, 53, 609–615.
14. Ames J.M. (1998). Applications of the Maillard reaction in the food industry. *Food Chemistry*, 62(4), 431–439.
15. Anderson J.A. (1995). An introduction to neural networks. MIT press.
16. Anderson, R., Conway, H., Peplinski, A. (1970). Gelatinization of corn grits by roll cooking, extrusion cooking and steaming. *Starch-Stärke*, 22, 130–135.
17. Annison G., Topping, D.L. (1994). Nutritional role of resistant starch: chemical structure vs physiological function. *Annual Review of Nutrition*, 14, 297–320.
18. Anton A.A., Gary Fulcher R., Arntfield S.D. (2009). Physical and nutritional impact of fortification of corn starch-based extruded snacks with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour: Effects of bean addition and extrusion cooking. *Food Chemistry*, 113, 989–996.
19. Anton A.A., Luciano F.B. (2007). Instrumental texture evaluation of extruded snack foods: a review. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, 5 (4), 245–251.



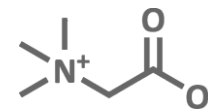
20. AOAC Method 2002.02, AACC Method 32-40.01, Resistant starch assay procedure, Megazyme.
21. AOAC Method 76-31.01, ICC Method No.164, Starch damage assay procedure, Megazyme.
22. Arbib M.A. (2003). The handbook of brain theory and neural networks. MIT press.
23. Badrie N., Mellows W.A. (1991). Texture and microstructure of cassava flour extrudate. *Journal of Food Science*, 56, 1319–1322, 1364.
24. Baik B.K., Powers J., Nguyen L.T. (2004). Extrusion of regular and waxy barley flours for production of expanded cereals. *Cereal Chemistry*, 81, 94–99.
25. Bakhtiari H., Karimi M., Rezazadeh S. (2016). Modeling, analysis and multi-objective optimization of twist extrusion process using predictive models and meta-heuristic approaches, based on finite element results. *Journal of Intelligent Manufacturing*, 27, 463–473.
26. Balkan J., Öztezcan S., Küçük M., Cevikbas U., Kocak-Toker N., Uysal M. (2004). The effect of betaine treatment on triglyceride levels and oxidative stress in the liver of ethanol-treated guinea pigs. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 55, 505–509.
27. Barak A.J., Beckenhauer H.C., Tuma D.J. (1996). Betaine, ethanol, and the liver: a review. *Alcohol*, 13, 395–398.
28. Baş D., Boyacı İ.H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78, 836–845.
29. Bates C., Mansoor M., Pentieva K., Hamer M., Mishra G. (2010). Biochemical risk indices, including plasma homocysteine, that prospectively predict mortality in older British people: The national diet and nutrition survey of people aged 65 years and over. *British Journal of Nutrition*, 104 (6), 893-899.
30. Bellisle F., Diplock A.T., Hornstra G., Koletzko B., Roberfroid M., Salminen S., Saris W.H.M. (1998). Functional food science in Europe. *British Journal of Nutrition*, 80, Suppl. 1, S1-S193.
31. Betaine. Monography. (2003). *Alternative Medicine Review*, 8, 193-196.
32. Bhattacharya M., Hanna M.A. (1988). Effects of lipids on the properties of extruded products. *Journal of Food Science*, 53, 1230–1231.
33. Bodroža Solarov M., Vujić Đ., Ačanski M., Pezo L., Filipčev B., Mladenov N. (2014). Characterization of the liposoluble fraction of common wheat (*Triticum aestivum*) and spelt (*T. aestivum* ssp. *spelta*) flours using multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94 (13), 2613-2617.
34. Bonafaccia G., Galli V., Francisci R., Mair V., Skrabanja V., Kreft I. (2000). Characteristics of spelt wheat products and nutritional value of spelt wheat-based bread. *Food Chemistry*, 68(4), 437-441.
35. Box J., Wilson W. (1951). Central composites design. *Journal of the Royal Statistical Society*, 1, 1–35.
36. Brennan M., Derbyshire E., Tiwari B., Brennan C. (2013). Ready-to-eat snack products: the role of extrusion technology in developing consumer acceptable and nutritious snacks. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 893–902.
37. Brennan M.A., Merts I., Monro J., Woolnough J., Brennan C.S. (2008). Impact of guar and wheat bran on the physical and nutritional quality of extruded breakfast cereals. *Starch – Stärke*, 60, 248 – 256.
38. Brlek T., Bodroža-Solarov M., Vukmirović Dj., Čolovic R., Vučkovic J., Lević J. (2012). Utilization of Spelt Wheat Hull as a Renewable Energy Source by Pelleting. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 18 (5), 752-758.



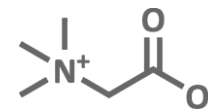
39. Brnčić M., Tripalo B., Rimac Brncic S., Karlovic S., Zupan A., Herceg Z. (2009). Evaluation of textural properties for whey enriched direct extruded and puffed corn based products. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 15 (3), 204-214.
40. Brouwer I.A., Verhoef P., Urgert R. (2000). Betaine supplementation and plasma homocysteine in healthy volunteers. *Archives of Internal Medicine*, 160, 2546-2547.
41. Brown I. (2004). Applications and uses of resistant starch. *Journal of AOAC International*, 87, 727-732.
42. Bruce S.J., Guy P.A., Rezzi S., Ross A.B. (2010). Quantitative measurement of betaine and free choline in plasma, cereals and cereal products by isotope dilution LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2055-2061.
43. Bryant R.J., Kadan R.S., Champagarte E.T., Vinyard B.T., Boykin D. (2001). Functional and digestive characteristics of extruded rice flour. *Cereal Chemistry*, 78, 131-137.
44. Burg M., Ferraris J., Dmitrieva N. (2007). Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiological Reviews*, 87(4), 1441-1474.
45. Burg M.B. (1994). Molecular basis for osmoregulation of organic osmolytes in renal medullary cells. *Journal of Experimental Zoology*, 268, 171-175.
46. Camire M.E., Camire A., Krumhar K. (1990). Chemical and nutritional changes in foods during extrusion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29, 35-57.
47. Campbell K.G. (1997). Spelt: agronomy, genetics, and breeding. *Plant Breeding Reviews*, 15, 187-214.
48. Carocho M., Ferreira I.C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15 - 25.
49. Case S.E., Hamann D.D., Schwartz S.J. (1992). Effect of starch gelatinization on physical properties of extruded wheat- and corn based products. *Cereal Chemistry*, 69, 401-409.
50. Chakraborty S.K., Singh D.S., Kumbhar B.K., Chakraborty S. (2011). Millet-legume blended extrudates characteristics and process optimization using RSM. *Food and Bioproducts Processing*, 89, 492-499.
51. Chanvrier H., Uthayakumaran S., Appelqvist I.A.M., Gidley M.J., Gilbert E.P. Lopez-Rubio A. (2007). Influence of storage conditions on the structure, thermal behaviour and formation of enzyme resistant starch in extruded starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9883-9890.
52. Chávez-Jáuregui R.N., Silva M.E.M.P., Arêas J.A.G. (2000). Extrusion Cooking Process for Amaranth (*Amaranthus caudatus* L.). *Journal of Food Science*, 65, 1009-1015.
53. Chen J., Serafin F.L., Pandya R.N., Daun H., (1991). Effects of extrusion conditions on sensory properties of corn meal extrudates. *Journal of Food Science*, 56 (1), 84-89.
54. Chendrimada T.P., Neto M.G., Pesti G.M., Davis A.J., Bakalli R.I. (2002). Determination of the betaine content of feed ingredients using high-performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1556-1563.
55. Clark J. P. (1978): Texturization by extrusion. *Journal of Texture Studies*, 9, 109-123.
56. Colonna P., Tayeb J., Mercier C., (1989). Extrusion cooking of starch and starchy products. In: Mercier C., Linko P., Harper J.M. (Eds.), *Extrusion Cooking*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, pp. 247-319.
57. Corol D.I., Ravel C., Raksegi M., Bedo Z., Charmet G., Beale M.H., Shwery P.R., Ward J.L. (2012). Effects of genotype and environment on the contents of betaine, choline, and trigonelline in cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5471-5481.



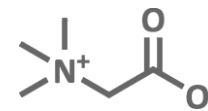
58. Coulter L.A., Lorenz K. (1991). Extruded corn grits e quinoa blends: II. Physical characteristics of extruded products. *Journal of Food Processing and Preservation*, 15, 231-259.
59. Courtenay E.S., Capp M.W., Anderson C.F., Record M.T.Jr. (2000). Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: implications for the action of osmoprotectants in vivo and for the interpretation of “osmotic stress” experiments in vitro. *Biochemistry*, 39, 4455–4471.
60. Craig S.A. (2004). Betaine in human nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 539–549.
61. Da Silva Teba C., Madeira Moreira da Silva E., Chávez D.WH., Wanderlei Piler de Carvalho C., Ramírez Ascheri J.L. (2017). Effects of whey protein concentrate, feed moisture and temperature on the physicochemical characteristics of a rice-based extruded flour. *Food Chemistry*, 228, 287–296.
62. De Zwart F.J., Slow S., Payne R.J., Lever M., George P.M., Gerrard J.A., Chambers S.T. (2003). Glycine betaine and glycine betaine analogues in common foods. *Food Chemistry*, 83, 197–204.
63. Diaz J.M.R., Kirjoranta S., Tenitz S., Penttilä P.A., Serimaa R., Lampi A.-M., Jouppila K. (2013). Use of amaranth, quinoa and kañiwa in extruded corn-based snacks. *Journal of Cereal Science*, 58, 59-67.
64. Diaz, J. M. R., Sundarajan, L., Kariluoto, S., Lampi, A.-M., Tenitz S., Jouppila K. (2015). Effect of extrusion cooking on physical properties and chemical composition of corn-based snacks containing amaranth and quinoa: application of partial least squares regression. *Journal of Food Process Engineering*, 40, 1-15.
65. Diaz, J.R. H., Quintero-Ramos, A., Barnard J., Balandran-Quintana, R.R. (2007). Functional properties of extrudates prepared with blends of wheat flour/pinto bean meal with added wheat bran. *Food Science and Technology International*, 13(4), 301–308.
66. Ding Q.B., Ainsworth P., Plunkett A., Tucker G., Marson H. (2006). The effect of extrusion conditions on the functional and physical properties of wheat-based expanded snacks. *Journal of Food Engineering*, 73, 142–148.
67. Ding Q.B., Ainsworth P., Tucker G., Marson H. (2005). The effect of extrusion conditions on the physicochemical properties and sensory characteristics of rice-based expanded snacks. *Journal of Food Engineering*, 66, 283–289.
68. Diosady L.L., Paton D., Rosen N., Rubin L.J., Athanassoulis C. (1985). Degradation of wheat starch in a single-screw extruder: mechano-kinetic breakdown of cooked starch. *Journal of Food Science*, 50, 1697–1706.
69. Do Nascimento E.M.D.G.C., Carvalho C.W.P., Takeiti C.Y., Freitas D.D.G.C., Ascheri J.L.R. (2012). Use of sesame oil cake (*Sesamum indicum* L.) on corn expanded extrudates. *Food Research International*, 45, 434-443.
70. Dogan H., Karwe M. (2003). Physicochemical properties of quinoa extrudates. *Food Science and Technology International*, 9, 101-114.
71. Dziezak J.D. (1989). Single and twin-screw extruders in food processing. *Journal of Food Science and Technology*, 43 (4), 163-174.
72. Elsner G., Wiedmann W. (1985). Cooker extruder for the production of gums and jelly articles. *Impulse Foods Supplement*, Nov, 2.
73. Englyst H.N., Kingman S.M., Cummings J.H. (1992). Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46 (Suppl. 2), S33–S50.
74. Englyst, H.N., Cummings, J.H. (1985). Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in the human small intestine. *American Journal of Clinical Nutrition*, 42, 778–787.



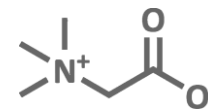
75. Escarnot E., Agneessens R., Wathelet B., Paquot M. (2010). Quantitative and qualitative study of spelt and wheat fibres in varying milling fractions. *Food Chemistry*, 122 (3), 857-863.
76. European Commission (2012). Commission Regulation (EU) No 432/2012 of 16 May 2012 establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health. *Official Journal of the European Union L*, 136 (55), 1-40.
77. Faraj A., Vasanthan T., Hoover R. (2004). The effect of extrusion cooking on resistant starch formation in waxy and regular barley flours. *Food Research International*, 37, 517-525.
78. Farhat I.A., Protzman J., Becker A., Valles-Pamies B., Neale R., Hill S.E. (2001). Effect of the extent of conversion and retrogradation on the digestibility of potato starch. *Starch / Staerke*, 53, 431-436.
79. Filipčev B., Brkljača J., Krulj J., Bodroža-Solarov M. (2015c). The betaine content in common cereal-based and gluten-free food from local origin. *Food & Feed Research*, 42, 129-138.
80. Filipčev B., Kojić J., Krulj J., Bodroža-Solarov M., Ilić N. (2018). Betaine in cereal grains and grain-based products. *Foods*, doi:10.3390/foods7040049.
81. Filipčev B., Krulj J., Brkljača J., Šimurina O., Jambrec D., Bodroža-Solarov M., Pestorić M. (2016). Quality attributes of cookies enriched with betaine, III International Congress "Food Technology, Quality and Safety", 25.-27.10.2016., Novi Sad, 46-51.
82. Filipčev B., Krulj J., Brkljača J., Šimurina O., Jambrec D., Bodroža-Solarov M. (2015b). Fortification of gluten-free biscuits with betaine, 8th International Congress "Flour-Bread '15" & 10th Croatian Congress of Cereal Technologists, 29-30.10.2015. Opatija, Croatia, 92-98.
83. Filipčev B., Šimurina O., Bodroža Solarov M., Brkljača J. (2013b). Dough rheological properties in relation to cracker making performance of organically grown spelt cultivars. *International Journal of Food Science & Technology*, 48 (11), 2356-2362.
84. Filipčev B., Šimurina O., Bodroža-Solarov M., Obreht D. (2013a). Comparison of the bread-making performance of spelt varieties grown under organic conditions in the environment of norther Serbia and their responses to dough strengthening improvers. *Hemijska industrija*, 67 (3), 443-453.
85. Filipčev B., Šimurina O., Brkljača J., Krulj J., Bodroža-Solarov M., Popov S. (2015a). Nutritional quality and baking performance of bread enriched with betaine. In proceedings of the 11th Symposium „Novel Technologies and Economic Development“, Leskovac, Serbia, 23-24. October 2015; Lazić M. (Ed.); Faculty of Technology in Leskovac, University of Niš, Leskovac, Serbia; 83-88.
86. Filipović J., Pezo L., Filipović V., Brkljača J., Krulj J. (2015). The effects of omega-3 fatty acids and inulin addition to spelt pasta quality. *LWT-Food Science and Technology*, 63 (1), 43-51.
87. Filipović J., Pezo L., Filipović N., Filipović V., Bodroža-Solarov M., Plančak M. (2013). Mathematical approach to assessing spelt cultivars (*Triticum aestivum* subsp. spelt) for pasta making. *International Journal of Food Science & Technology*, 48 (1), 195-203.
88. Filli K.B., Nkama I., Jideani V.A., Abubakar U.M. (2012). The Effect of Extrusion Conditions on the Physicochemical Properties and Sensory Characteristics of Millet – Cowpea Based Fura. *European Journal of Food Research & Review*, 2 (1), 1-23.
89. Fletcher S.I., Richmond P., Smith A.C. (1985). An experimental study of twin-screw extrusion cooking of maize grits. *Journal of Food Engineering*, 4, 291-312.



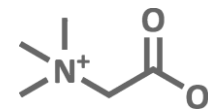
90. Frontiera M.S., Stabler S.P., Kolhouse J.F., Allen R.H. (1994). Regulation of methionine metabolism: effects of nitrous oxide and excess dietary methionine. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 5, 28–38.
91. Ganjyal G., Hanna M. (2002). A Review on Residence Time Distribution (RTD) in Food Extruders and Study on the Potential of Neural Networks in RTD Modeling. *Journal of Food Science*, 67, 1996–2002.
92. Ganjyal G.M., Hanna M.A., Jones D.D. (2003). Modeling Selected Properties of Extruded Waxy Maize Cross-Linked Starches with Neural Networks. *Journal of Food Science*, 68, 1384–1388.
93. Garber B.W., Hsieh F., Huff H.E. (1997). Influence of particle size on the twin-screw extrusion of corn meal. *Cereal Chemistry*, 74, 656–661.
94. Goldberg, D. E., Holland, J. H. (1989). Genetic algorithms and machine learning. *Machine Learning*, 3(2), 95–99.
95. Gomez M.H., Aguilera J.M. (1984). A physicochemical model for extrusion of corn starch. *Journal of Food Science*, 49, 40–44.
96. Gomez-Becerra H.F., Erdem H., Yazici A., Tutus Y., Torun B., Ozturk L., Cakmak I. (2010). Grain concentrations of protein and mineral nutrients in a large collection of spelt wheat grown under different environments. *Journal of Cereal Science*, 52 (3), 342-349.
97. Gonzalez-Soto R.A., Mora-Escobedo R., Hernández-Sánchez H., Sánchez-Rivera M., Bello-Pérez L.A. (2006). Extrusion of banana starch: Characterization of the extrudates. *Journal of the Sciences and Food and Agriculture*, 87, 348–356.
98. Gorham J. (1984). Separation of plant betaines and their sulphur analogues by cation-exchange high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 287, 345-351.
99. Graham S., Hollis, J. H., Miguard, M., Browne R. A. (2009). Analysis of betaine and choline contents of aleurone, bran, and flour fractions of wheat (*Triticum aestivum* L.) using ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1948–1951.
100. Gray D., Chinnaswamy R. (1995). Food processing recent developments, Chapter 1th – role of extrusion in food processing, Elsevier Science B.V., United Kingdom, Atchinson, 241-263.
101. Grobelnik-Mlakar S., Bavec F., Bavec M., Jakop J., Robačar M., Brkljača J., Bodroža-Solarov M. (2014). Technological properties of spelt according to different production systems, Proceeding of II International Congress Food Technology, Quality and Safety, Novi Sad, Serbia, 28.-30. October 2014., 610-615.
102. Gujska E., K. Khan. (1991). Functional properties of extrudates from high starch fraction of navy pinto beans and corn meal blended with legume high protein fractions. *Journal of Food Science*, 56 (1), 431-435.
103. Gulati P., Weier, S. A., Santra, D., Subbiah J., Rose D. (2016). Effects of feed moisture and extruder screw speed and temperature on physical characteristics and antioxidant activity of extruded proso millet (*Panicum miliaceum*) flour. *International Journal of Food Science and Technology*, 51, 114–122.
104. Gutkoski, L.C., El-Dash A.A. (1999). Effect of extrusion process variables on physical and chemical properties of extruded oat products. *Plant Foods for Human Nutrition*, 54, 315–325.
105. Hagenimana A., Ding X.L., Fang T. (2006). Evaluation of rice flour modified by extrusion cooking. *Journal of Cereal Science*, 43, 38-46.
106. Haralampu S.G. (2000). Resistant starch – a review of the physical properties and biological impact of RS3. *Carbohydrate Polymers*, 41, 285–292.



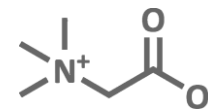
107. Harmann D.V., Harper J.M. (1973). Effect of extruder geometry on torque and flow. *American Society of Agricultural Engineering*, 16, 1175–1178.
108. Hayashi N., Hayakawa I., Fujio Y. (1993). Flow behavior of soy protein isolate melt with low and intermediate moisture levels at an elevated temperature. *Journal of Food Engineering*, 18, 1–11.
109. Hefni M., McEntyre C., Lever M., Slow S. (2016). Validation of HPLC-UV methods for the quantification of betaine in foods by comparison with LC-MS. *Food Analytical Methods*, 9, 292–299.
110. Higginbotham J.D., McCarthy J. (1998). Quality and storage of molasses. In P. Van der Poel W., Schiweck H., Schwartz T. (Eds.), *Sugar technology-beet and cane manufacture* (pp. 973–992). Berlin, Germany: Bartens.
111. Holm P.I., Ueland P.M., Kvalheim G., Lien E.A. (2003). Determination of choline, betaine, and dimethylglycine in plasma by a high-throughput method based on normal-phase chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 49 (2), 286-294.
112. Hotelling H. (1933). Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology*, 24, 417.
113. Hsieh F., Huff H.E., Lue S., Stringer L. (1991). Twinscrew extrusion of sugar beet fiber and corn meal. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 24, 495–500.
114. Huang S. (1993). Extrusion cooking of rapeseed meal. Master thesis, Department of Agricultural Engineering, University of Missouri, Columbia.
115. Huber G. R. (2000). Twin-Screw Extruders. In: *Extruders in Food Applications*. M. N. Riaz (Ed.), Taylor & Francis Group & CRC Press, Boca Raton, USA, 81-114.
116. Huth M., Dongowski G., Gebhard E., Flamme W. (2000). Functional properties of dietary fibre enriched extrudates from barley. *Journal of Cereal Science*, 32, 115–128.
117. Ibanoglu Ş., Ainsworth P. (2010). Energy considerations on extrusion of tarhana, a wheat flour based product. *Journal of Food Process Engineering*, 33(3), 448–465.
118. Ilo S., Berghofer E. (1999). Kinetics of colour changes during extrusion cooking of maize grits. *Journal of Food Engineering*, 39, 73-80.
119. Ilo S., Tomschik U., Berghofer E., Mundigler N. (1996). The Effect of Extrusion Operating Conditions on the Apparent Viscosity and the Properties of Extrudates in Twin-screw Extrusion Cooking of Maize Grits. *LWT-Food Science and Technology*, 29, 593–598.
120. Ilo S.E., Liu Y. (1999). Extrusion cooking of rice flour and amaranth blends. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 32, 79-88.
121. ISO (2007). Sensory analysis — general guidance for the design of test rooms, AMENDMENT 1. In: ISO 8589. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
122. Jang J.K., Pyun Y.R. (2004). Effect of sucrose and gluten on glass transition, gelatinization, and retrogradation of wheat starch. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 36, 288–293.
123. Jørgensen J.R., Olsen C.C. (1997). Yield and quality assessment of spelt (*Triticum spelta* L.) compared with winter wheat (*Triticum aestivum* L.) in Denmark. In Working group meeting Crop development for the Cool and Wet Regions of Europe. Spelt and Quinoa, 33-40.
124. Jozinović A., Subari D., Ačkar Đ., Babić J., Miličević B. (2016). Influence of spelt flour addition on properties of extruded products based on corn grits. *Journal of Food Engineering*, 172, 31-37.
125. Jozinović, A., Šubarić, D., Ačkar, Đ., Babić, J., Klarić, I., Kopjar, M., Valek Lendić, K. (2012). Influence of buckwheat and chestnut flour addition on properties of corn extrudates. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 4, 26-33.



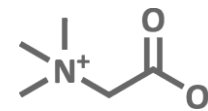
126. Kettunen H., Peuranen S., Tiihonen K. (2001b). Betaine aids in the osmoregulation of duodenal epithelium of broiler chicks, and affects the movement of water across the small intestinal epithelium in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 129, 595–603.
127. Kettunen H., Peuranen S., Tiihonen K., Saarinen M. (2001a). Intestinal uptake of betaine in vitro and the distribution of methyl groups from betaine, choline, and methionine in the body of broiler chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 128, 269–278.
128. Kidd M.T., Ferket P.R., Garlich J.D. (1997). Nutritional and osmoregulatory functions of betaine. *World's Poultry Science Journal*, 53, 125–139.
129. Kim E., Corrigan V., Hedderley D., Motoi L., Wilson A., Morgenstern M. (2009). Predicting the sensory texture of cereal snack bars using instrumental measurements. *Journal of Texture Studies*, 40, 457 – 481.
130. Kim J.H., Tanhehco E.J., Ng P.K.W. (2006). Effect of extrusion conditions on resistant starch formation from pastry wheat flour. *Food Chemistry*, 99, 718–723.
131. Kim, J.Y., Lee, C.H. (1998). Formation of enzyme resistant starch by extrusion cooking of high amylose corn starch. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 30, 1128–1133.
132. Kirby A.R., Ollett A.L., Parker R., Smith A.C. (1988). An experimental study of screw configuration effects in the twin screw extrusion cooking of maize grits. *Journal of Food Engineering*, 8, 247–272.
133. Klein J. (2014). Assessing university students' achievements by means of standard score (Z score) and its effect on the learning climate. *Studies in Educational Evaluation*, 40, 63–68.
134. Knorr D. (1998). Functional food science in Europe. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 295-340.
135. Kohajdová Z., Karovičová J. (2008). Nutritional value and baking applications of spelt wheat. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 7 (3), 5-14.
136. Kojić J., Krulj J., Ilić N., Lončar E., Pezo L., Mandić A., Bodroža-Solarov M. (2017). Analysis of betaine levels in cereals, pseudocereals and their products. *Journal of Functional Foods*, 37, 157–163.
137. Kokić B. (2017). Uticaj termičkih tretmana hrane za životinje na promene skrobne komponente i svarljivost. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1-129.
138. 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*.
139. Kröse B., Krose B., Van der Smagt P., Smagt P. (1993). An introduction to neural networks.
140. Krulj J., Đisalov J., Bočarov-Stančić A., Pezo L., Kojić J., Vidaković A., Bodroža Solarov M. (2018). Occurrence of aflatoxin B1 in Triticum species inoculated with *Aspergillus flavus*. *World Mycotoxin Journal*, 11(2), 247-257.
141. Krulj J., Đisalov J., Bodroža-Solarov M., Bočarov Stančić A., Markov S., Mladenov N., Kojić J. (2017). First Report of *Aspergillus flavus* on Organic Spelt Wheat in Serbia. *Plant Disease*, 1045-1045.
142. Lacko-Bartošová M., Korczyk-Szabó J., Ražný R. (2010). Triticum spelta—a speciality grain for ecological farming systems. *Research Journal of Agricultural Science*, 42 (1), 143-147.
143. Lai S., Kokini J.L. (1991). Physicochemical changes and rheological properties of starch during extrusion (A review). *Biotechnology Progress*, 7, 251–266.



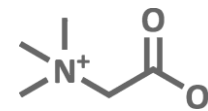
144. Lawton B.T., Henderson G.A., Derlatka E.J. (1972). The effects of extruder variables on the gelatinisation of corn starch. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 50, 168–172.
145. Lazou A., Krokida M. (2010). Structural and textural characterization of corn–lentil extruded snacks. *Journal of Food Engineering*, 100 (3), 392–408.
146. Lazou A., Krokida M., Tzia C. (2010). Sensory properties and acceptability of corn and lentil extruded puffs. *Journal of sensory studies*, 25 (6), 838–860.
147. Lee K.M., Bean S.R., Alavi S., Herrman T.J., Waniska R.D. (2006). Physical and Biochemical Properties of Maize Hardness and Extrudates of Selected Hybrids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4260–4269.
148. Leloup V.M., Colonna P., Ring S.G. (1992). Physico-chemical aspects of resistant starch. *Journal of Cereal Science*, 16, 253–266.
149. Lever M., Sizeland P.C., Bason L.M, Hayman C.M, Chambers S.T. (1994). Glycine betaine and proline betaine in human blood and urine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1200, 259–264.
150. Li S.-Q., Zhang H.Q., Tony Jin Z., Hsieh F.-H. (2005). Textural modification of soya bean/corn extrudates as affected by moisture content, screw speed and soya bean concentration. *International Journal of Food Science and Technology*, 40 (7), 731–741.
151. Licata R., Chu J., Wang S., Coorey R., James A., Zhao Y., Johnson S. (2014). Determination of formulation and processing factors affecting slowly digestible starch, protein digestibility and antioxidant capacity of extruded sorghum–maize composite flour. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 1408–1419.
152. Limsangouan N., Takenaka M., Sotome I., Nanayama K. (2010). Functional properties of cereal and legume based extruded snack foods fortified with by-products from herbs and vegetables. *Kasetsart Journal - Natural Science*, 44, 271–279.
153. Liu C., Zhang Y., Liu W., Wan J., Wang W., Wu L., Zuo N., Zhou Y., Yin Z. (2011). Preparation, physicochemical and texture properties of texturized rice produce by Improved Extrusion Cooking Technology. *Journal of Cereal Science*, 54, 473–480.
154. Liu Y., Hsieh F., Heymann H., Huff H.E. (2000). Effect of process conditions on the physical and sensory properties of extruded oat–corn puff. *Journal of Food Science*, 65, 1253–1259.
155. Lohani U.C., Muthukumarappan K. (2017). Process optimization for antioxidant enriched sorghum flour and apple pomace based extrudates using liquid CO₂ assisted extrusion. *LWT-Food Science and Technology*, 86, 544–554.
156. Lopez G., Ros G., Rincon F., Periago M.J., Martinez 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.
157. Luo M.C., Yang Z.L., Dvorak J. (2000). The Q locus of Iranian and European spelt wheat. *Theoretical and applied genetics*, 100, 602–606.
158. MacKinnon S.L., Hiltz D., Ugarte R., Craft C.A. (2010). Improved methods of analysis for betaines in *Ascophyllum nodosum* and its commercial seaweed extracts. *Journal of Applied Phycology*, 22, 489–494.
159. Mahasukhonthachat K., Sopade P., Gidley M. (2010). Kinetics of starch digestion and functional properties of twin-screw extruded sorghum. *Journal of Cereal Science*, 51, 392–401.
160. Marconi E., Carcea M., Schiavone M., Cubadda R. (2002). Spelt (*Triticum spelta* L.) pasta quality: Combined effect of flour properties and drying conditions. *Cereal chemistry*, 79 (5), 634–639.



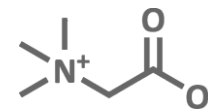
161. Martínez M.M., Rosell C.M., Gomez M. (2014). Modification of wheat flour functionality and digestibility through different extrusion conditions. *Journal of Food Engineering*, 143, 74-79.
162. Matthews A., Johnson T.N., Rostami-Hodjegan A., Chakrapani A., Wraith, J. E., Moat, S., J., Bonham, J. R., Tucker G. T. (2002). An indirect response model of homocysteine suppression by betaine: optimizing the dosage regimen of betaine in homocystinuria. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 54, 140-146.
163. Menegassi B., Pilosof A.M., Areas J.A. (2011). Comparison of properties of native and extruded amaranth (*Amaranthus cruentus* L.–BRS Alegria) flour. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 1915-1921.
164. Meng X., Threinen D., Hansen M., Driedger D. (2010). Effects of extrusion conditions on system parameters and physical properties of a chickpea flour-based snack, *Food Research International*, 43, 650-658.
165. Mercier C., Feillet P. (1975). Modification of carbohydrate components by extrusion-cooking of cereal products. *Cereal Chemistry*, 52, 283-297.
166. Miller C. (1985). Low moisture extrusion: Effects of cooking moisture on product characteristics. *Journal of Food Science*, 55, 249-253.
167. Miller R., Mulvaney S. (2000). Extrusion and extruders. In: *Breakfast Cereals, and How They are Made* (edited by R. Fast & E. Caldwell). St. Paul, Minn.: American Association of Cereal Chemists, 215-278.
168. Mitchell J.R., Areas J.A.G. (1992). Structural changes in biopolymers during extrusion. In: Kokini J.C., Ho C.-T., Karwe M.V. (Eds), *Food Extrusion Technology*. New York, NY: Marcel Dekker, pp. 345-360.
169. Monzón C.M., Teglia C.M., Delfino M.R., Goicoechea H. C. (2016). Chemometric optimization and validation of a novel dispersive liquid-liquid microextraction-HPLC method for gliclazide, glibenclamide and glimepiride quantitation in serum samples. *Microchemical Journal*, 127, 113-119.
170. Morrell M.K., Konik-Rose C., Ahmed R., Li Z., Rahman S. (2004). Synthesis of resistant starches in plants. *Journal of AOAC International*, 87, 740-748.
171. Mu T., Abegunde O., Sun H., Deng F., Zhang M., (2013). Physicochemical characterization of enzymatically hydrolyzed heat treated granular starches. *Starch-Starke*, 65, 893-901.
172. Niba L. L. (2002). Resistant starch: a potential functional food ingredient. *Nutrition and Food Science*, 32, 62-67.
173. Ondo S.E., Singkhornart S., Ryu G.H. (2013). Effects of die temperature alkalized cocoa powder content and CO₂ gas injection on physical properties of extruded cornmeal. *JouVnal of Food Engineering*, 117, 173-182.
174. Orendac M., Zeman J., Stabler S. P., Allen R. H., Kraus J. P., Bodamer O., Stöckler-Ipsiroglu S., Kvasnička J., Kožich V. (2003). Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: novel biochemical findings and treatment efficacy. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 26, 761-773.
175. Ozcan, S., Jackson, D.S., 2005. Functionality Behavior of Raw and Extruded Corn Starch Mixtures. *Cereal Chemistry Journal*, 82, 223-227.
176. Panmanabhan, M., Bhattachayrya, M. (1989). Extrudate expansion during extrusion cooking of foods. *Cereal Food World*, 34, 945-949.
177. Parchure A.A., Kulkarni P.R. (1997). Effect of food processing treatments on generation of resistant starch. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 48, 257-260.
178. Pasqualone A., Piergiovanni A.R., Caponio F., Paradiso V.M., Summo C., Simeone R. (2011). Evaluation of the technological characteristics and bread-making quality of



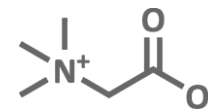
- alternative wheat cereals in comparison with common and durum wheat. *Food Science and Technology International*, 17 (2), 135-142.
179. Pastor K. (2018). Autentičnost cerealija i pseudocerealija razvoj novih metoda analize brašna i gotovih pekarskih proizvoda. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1–211.
180. Patrick L. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease: relationship to insulin sensitivity and oxidative stress. Treatment approaches using vitamin E, magnesium, and betaine. *Alternative Medicine Review*, 7, 276–291.
181. Paula A.M., Conti-Silva A.C. (2014). Texture profile and correlation between sensory and instrumental analyses on extruded snacks. *Journal of Food Engineering*, 121, 9-14.
182. Petronini P.G., De Angelis E.M., Borghetti P., Borghetti A.F., Wheeler K.P. (1992). Modulation by betaine of cellular responses to osmotic stress. *Biochemical Journal*, 282, 69-73.
183. Piletić M.V., Milić B.Lj. (1989). Organska hemija III deo, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
184. Popescu O., Popescu D.C., Wilder J. (2001). A New Approach To Modeling and Control of a Food Extrusion Process Using Artificial Neural Network and an Expert System. *Journal of Food Process Engineering*, 24, 17–36.
185. Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za fine pekarske proizvode, žita za doručak i snek proizvode ("Sl. list SCG", br. 12/2005 i "Sl. glasnik RS", br. 43/2013 - dr. pravilnik i 68/2016 - dr. pravilnik).
186. Pruska- Kędzior A., Kędzior Z., Klockiewicz-Kaminska E. (2008). Comparison of viscoelastic properties of gluten from spelt and common wheat. *European Food Research and Technology*, 227(1), 199-207.
187. Qu D., Wang S., (1994). Kinetics of the formations of gelatinized and melted starch at extrusion cooking conditions. *Starch*, 46, 225-229.
188. Ranhotra, G.S., Gelroth, J.A., Glaser, B.K., Lorenz, K.J. (1995). Baking and nutritional qualities of a spelt wheat sample. *LWT-Food Science and Technology*, 28 (1), 118-122.
189. Riaz M. (2007). Extruders and Expanders in Pet Food, Aquatic and Livestock Feeds, Clenze, Germany.
190. Riaz M. N. (2000). Extruders in Food Applications, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Filadelfia.
191. Rocha-Guzman, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Gonzalez-Laredo R. F., Bello-Perez, A., Delgado-Licon E., Ochoa-Martinez, A., Prado-Ortiz, M. J. (2008). Physical Properties of Extruded Products from Three Mexican Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63, 99–104.
192. Ross A.B., Zangger A., Guiraud S.P. (2014). Cereal foods are the major source of betaine in the Western diet—analysis of betaine and free choline in cereal foods and updated assessments of betaine intake. *Food Chemistry*, 145, 859–865.
193. Rossen J. L., Miller R.C. (1973). Food extrusion. *Food Technology*, 27 (8). 46-53.
194. Ruibal-Mendieta N.L., Delacroix D.L., Meurens M. (2002). A comparative analysis of free, bound and total lipid content on spelt and winter wheat wholemeal. *Journal of Cereal Science*, 35(3), 337-342.
195. Ruibal-Mendieta N.L., Delacroix D.L., Mignolet E., Pycke J.M., Marques C., Rozenberg R., Larondelle Y. (2005). Spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) as a source of breadmaking flours and bran naturally enriched in oleic acid and minerals but not phytic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (7), 2751-2759.
196. Ryu G.H., Ng P.K.W. (2001). Effects of selected process parameters on expansion and mechanical properties of wheat flour and whole cornmeal extrudates. *Starch*, 53, 147–154.



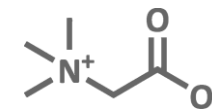
197. Saarinen M.T., Kettunen H., Pulliainen K., Peuranen S., Tiihonen K., Remus J. (2001). A novel method to analyze betaine in chicken liver: Effect of dietary betaine and choline supplementation on the hepatic betaine concentration in broiler chicks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 559–563.
198. Sarawong C., Schoenlechner R., Sekiguchi K., Berghofer E., Ng K.W.P. (2014): Effect of extrusion cooking on the physicochemical properties, resistant starch, phenolic content and antioxidant capacities of green banana flour. *Food Chemistry*, 143, 33–39.
199. Šarić B. (2016). Iskorišćenje tropa borovnice i maline u formulaciji bezglutenskog keksa sa dodatkom vrednošću. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1-164.
200. Saunderson C.L., Mackinlay J. (1990). Changes in body-weight, composition and hepatic enzyme activities in response to dietary methionine, betaine and choline levels in growing chicks. *British Journal of Nutrition*, 63, 339–349.
201. Schaaft Technologie GmbH: Basic Extrusion, (1995).
202. Schober T.J., Scott R.B., Kuhn M. (2006). Gluten proteins from spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) cultivars: a rheological and size-exclusion high-performance liquid chromatography study. *Journal of Cereal Science*, 44, 161-173.
203. Schuler E.W. (1986). Twin-screw extrusion cooking for food processing. *Cereal Foods World*, 31, 413-416.
204. Schwahn B.C., Hafner D., Hohlfeld T., Balkenhol N., Laryea M.D., Wendel U. (2003). Pharmacokinetics of oral betaine in healthy subjects and patients with homocystinuria. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 55, 6–13.
205. Sedej I. (2011). Funkcionalna i antioksidativna svojstva novih proizvoda od heljde. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1–165.
206. Seshadri S., Beiser A., Selhub J., Jacques P. F., Rosenberg I. H., D'Agostino R. B., Wilson P. W. F., Wolf P. A. (2002). Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 346, 476–483.
207. Shankar T.J., Bandyopadhyay S. (2007). Prediction of Extrudate Properties Using Artificial Neural Networks. *Food and Bioprocess Processing*, 85, 29–33.
208. Shankar T.J., Sokhansanj S., Bandyopadhyay S., Bawa A.S. (2010). A Case Study on Optimization of Biomass Flow During Single-Screw Extrusion Cooking Using Genetic Algorithm (GA) and Response Surface Method (RSM). *Food Bioprocess Technology*, 3, 498–510.
209. Sharma A., Yadav B.S., Ritika B.S. (2008). Resistant starch: physiological roles and food applications. *Food Reviews International*, 24, 193–234.
210. Shihani N., Kumbhar B., Kulshreshtha M. (2006). Modeling of extrusion process using response surface methodology and artificial neural networks. *Journal of Engineering Science and Technology*, 1, 31–40.
211. Shin H. D., Suh J.H., Kim J.H., Lee H.Y., Eom H.Y., Kim U.Y., Yang D.H., Han S.B., Youm J.R. (2012). Determination of betaine in *Fructus Lycii* using hydrophilic interaction liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 33, 553–558.
212. Shin M.S., Mun S.H., Bae C.H. (2002). Effects of processing parameters of twin screw extruder and dry methods on the resistant starch formation from normal maize starch. *Korean Journal of Human Ecology*, 5, 62–70.
213. Sievert D., Pomeranz Y. (1989). Enzyme-resistant starch. I. Characterization and evaluation by enzymatic, thermoanalytical, and microscopic methods. *Cereal Chemistry*, 66, 342–347.



214. Singh B., Sekhon K.S., Singh N. (2007). Effects of moisture, temperature and level of pea grits on extrusion behaviour and product characteristics of rice. *Food Chemistry*, 100, 198–202.
215. Singh J.P., Kaur A., Shevkani K., Singh N., Singh B. (2016). Physicochemical characterisation of corn extrudates prepared with varying levels of beetroot (*Beta vulgaris*) at different extrusion temperatures. *International Journal of Food Science and Technology*, 51, 911–919.
216. Singha P., Muthukumarappan K. (2017). Effects of processing conditions on the system parameters during single screw extrusion of blend containing apple pomace. *Journal of Food Process Engineering*, 40, 1-11.
217. Singkhornart S., Edou-Ondo S., Ryu G.H. (2014). Influence of germination and extrusion with CO₂ injection on physicochemical properties of wheat extrudates. *Food Chemistry*, 143, 122-131.
218. Slow S., Donaggio M., Cressey P.J., Lever M., George P.M., Chambers S.T. (2005). The betaine content of New Zealand foods and estimated intake in the New Zealand diet. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 473–485.
219. Smith A., Smith S., De Jager C., Whitbread P., Johnston C., Agacinski G. (2010). Homocysteine-lowering by B vitamins slows the rate of accelerated brain atrophy in mild cognitive impairment: A randomized controlled trial. *PLOS ONE*, 5(9), 122-144.
220. Smith O.B. (1969). History and status of specific protein-rich foods: extrusion-processed cereal foods. Protein-Enriched Cereal Food for World Needs, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, 140-153.
221. Smith O.B. (1971). „Why use extrusion“, Symposium on Extrusion: Process and Product Development, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.
222. Sobota A., Sykut-Domańska E., Rzedzicki Z. (2010). Effect of extrusion-cooking process on the chemical composition of corn-wheat extrudates, with particular emphasis on dietary fibre fractions. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, 60, 251-259.
223. Söderlun T., Zhu K., Jutila A., Kinnunen P.K.J. (2002). Effects of betaine on the structural dynamics of *Thermomyces* (*Humicola*) *lanuginosa* lipase. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 26, 75–83.
224. Souza, V., Ortiz, J., Nascimento, E. (2011). Pasting properties of expanded extrudate and pellets from corn flour and rice flour. *Brazil Journal of Food Technology*, 14, 106-114.
225. Spence, J. T. (2006). Challenges related to the composition of functional foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S4-S6.
226. Stojceska V., Ainsworth P., Plunkett A., Ibanoglu S. (2008). The recycling of brewer's processing by-product into ready-to-eat snacks using extrusion technology. *Journal of Cereal Science*, 47, 469-479.
227. Sumathi A., Ushakumari S., Malleshi N. (2007). Physico-chemical characteristics, nutritional quality and shelf-life of pearl millet based extrusion cooked supplementary foods. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 58, 350 – 362.
228. Sun Y., Muthukumarappan K. (2002). Changes in functionality of soy-based extrudates during single-screw extrusion processing. *International Journal of Food Properties*, 5 (2), 379–389.
229. Svihus, B., Kløvstad, K.H., Perez, V., Zimonja, O., Sahlström, S., Schuller, R.B., Jeksrud, W.K., Prestløkken, E. (2004). Physical and nutritional effects of pelleting of broiler chicken diets made from wheat ground to different coarsenesses by the use of roller mill and hammer mill. *Animal Feed Science and Technology*, 117, 281-293.
230. Tester R.F., Qi X., Karkalas J. (2006). Hydrolysis of native starches with amylases. *Animal Feed Science and Technology*, 130, 39–54.



231. Thielemans A., Massart D.L. (1985). The use of principal component analysis as a display method in the interpretation of analytical chemical, biochemical, environmental, and epidemiological data. *Chimia (Aarau)*, 39, 236–242.
232. Topping D.L., Bajka B.H., Bird A.R., Clarke M.J., Cobiac L., Conlon A.M. (2008). Resistant starches as a vehicle for delivering health benefits to the human large bowel. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 20, 103–108.
233. Unlu E., Faller J.F. (1998). Formation of resistant starch by a twin screw extruder. *Cereal Chemistry*, 37, 346–350.
234. Vasanthan T., Bhattar R. (1998). Enhancement of resistant starch (RS3) in amylo maize, barley, field pea and lentil starches. *Starch/Staerke*, 50, 286–291.
235. Vasanthan T., Gaosong J., Yeung J., Li J. (2002). Dietary fiber profile of barley flour as affected by extrusion cooking. *Food Chemistry*, 77, 35–40.
236. Virtanen E. (1995). Piecing together the betaine puzzle. *Feed Mix Magazine*, 3, 12–17.
237. Von Büren M., Stadler M., Lüthy J. (2001). Detection of wheat adulteration of spelt flour and products by PCR. *European Food Research and Technology*, 212 (2), 234–239.
238. Vučković J., Bodroža-Solarov M., Vujić Đ., Bočarov-Stančić A., Bagi F. (2013). The protective effect of hulls on the occurrence of *Alternaria* mycotoxins in spelt wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 1996–2001.
239. Wang Y.Y., Ryu G.H. (2013). Physical properties of extruded corn grits with corn fibre by CO₂ injection extrusion. *Journal of Food Engineering*, 116, 14–20.
240. Wettstein M., Weik C., Holneicher C., Haussinger D. (1998). Betaine as an osmolyte in rat liver: metabolism and cell-to-cell interactions. *Hepatology*, 27, 787–793.
241. Wilken D.E., Wilken B., Dudman N.P., Tyrell P.A. (1983). Homocystenuria-The effects of betaine in the treatment of patients not responsive to pyridoxine. *New England Journal of Medicine*, 309, 448–453.
242. Wilson J.D., Bechtel D.B., Wilson G.W.T., Seib P.A., (2008). Bread quality of spelt wheat and its starch. *Cereal Chemistry*, 85 (5), 629–638.
243. Wolf B. (2010). Polysaccharide functionality through extrusion cooking. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15, 50–54.
244. Woodroffe J.M. (1993). Dry Extrusion Applications in The Feed Industry. *Technical Bulletin. American Soybean Association*, 5, 1–16.
245. Yagcı, S., Gogus, F. (2008). Response surface methodology for evaluation of physical and functional properties of extruded snack foods developed from food-by-products. *Journal of Food Engineering*, 86, 122–132.
246. Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D., Somero G.N. (1982). Living with stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217, 1214–1222.
247. Zeisel, S. H., Mar, M. H., Howe, J. C., Holden, J. M. (2003). Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods. *The Journal of Nutrition*, 133, 1302–1307.
248. Zeng, J., Gao, H., Li, G., Liang, X. (2011). Extruded corn flour changed the functionality behaviour of blends. *Czech Journal of Food Sciences*, 29, 520–527.
249. Zhang M., Zhang H., Li H., Lai F., Li X., Tang Y., Min T., Wu H. (2016). Antioxidant mechanism of betaine without free radical scavenging ability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 7921–7930.
250. Zieliński H., Ceglińska A., Michalska A. (2008). Bioactive compounds in spelt bread. *European Food Research and Technology*, 226 (3), 537–544.



PRILOG: Izgled ocenjivačkog lista korišćen prilikom senzorske ocene flips proizvoda

SENZORSKA OCENA

Ocenjivač: _____

Datum: _____

Vreme ocene: _____

NAPOMENA:

Molim Vas da svoj opažaj za pojedine deskriptore označite na predstavljenoj skali inteziteta, stavljajući oznaku "X ili /", zajedno sa šifrom ocenjenog uzorka iznad te oznake. Hvala!

DESKRIPTOR:

Pre potapanja u mleko

Boja (vizuelno)

Neprimetno

Veoma izraženo

Prečnik (vizuelno)

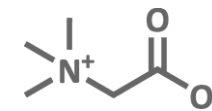
Neprimetno

Veoma izraženo

Tvrdoća (oralno)

Neprimetno

Veoma izraženo

**Žvakljivost (oralno)**_____
Neprimetno_____
Veoma izraženo**Sladak ukus (oralno)**_____
Neprimetno_____
Veoma izraženo**Gorak ukus (oralno)**_____
Neprimetno_____
Veoma izraženo**Nakon potapanja u mleko****Tvrdoća (oralno)**_____
Neprimetno_____
Veoma izraženo**Žvakljivost (oralno)**_____
Neprimetno_____
Veoma izraženo**Sladak ukus (oralno)**_____
Neprimetno_____
Veoma izraženo**Gorak ukus (oralno)**_____
Neprimetno_____
Veoma izraženo