



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
АГРОНОМСКИ ФАКУЛТЕТ У ЧАЧКУ

Весна М. Ђуровић

**АНТИБАКТЕРИЈСКА И ФИТОХЕМИЈСКА
СВОЈСТВА ПШЕНИЧНИХ КЛИЈАНАЦА И ЊИХОВ
УТИЦАЈ НА КВАЛИТЕТ КЕКСА**

докторска дисертација

Чачак, 2021



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF AGRONOMY IN ČAČAK

Vesna M. Đurović

**ANTIBACTERIAL AND PHYTOCHEMICAL
PROPERTIES OF WHEAT SPROUTS AND THEIR
INFLUENCE ON BISCUIT QUALITY**

Doctoral Dissertation

Čačak, 2021

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Весна М. Ђуровић
Датум и место рођења: 06.05.1985. Ужице, Република Србија
Садашње запослење: Агрономски факултет у Чачку
Докторска дисертација
Наслов: Антибактеријска и фитохемијска својства пшеничних клијанаца и њихов утицај на квалитет кекса
Број страница: 148
Број слика (44) и графикона (20)
Број библиографских података: 538
Установа и место где је рад израђен: Агрономски факултет у Чачку
Научна област (УДК): Биотехнолошка микробиологија [579.6:633.11:631.547.1]:664.681(043.3)
Ментор: Др Лека Г. Мандић, редовни професор, Агрономски факултет у Чачку, Универзитет у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 11.03.2020. година
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације:
Одлука број IV-04-810/8-1, 10.11.2020. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none">1. Др Драгутин Ђукић, редовни професор, Агрономски факултет у Чачку, Универзитета у Крагујевцу. Ужа научна област: Микробиологија;2. Др Лека Мандић, редовни професор, Агрономски факултет у Чачку, Универзитета у Крагујевцу. Ужа научна област: Микробиологија;3. Др Славица Весковић Морачанин, научни саветник, Институт за хигијену и технологију меса, Београд. Ужа научна област: Технолошка микробиологија;4. Др Десимир Кнежевић, редовни професор, Пољопривредни факултет у Лешку, Универзитет у Приштини. Ужа научна област: Генетика и оплемењивање организама;5. Др Јелена Младеновић, ванредни професор. Агрономски факултет у Чачку, Универзитета у Крагујевцу. Ужа научна област: Примењена хемија.
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације
<ol style="list-style-type: none">1. Др Маријана Пешаковић, научни саветник, Институт за воћарство у Чачку, Ужа научна област: Микробиологија;2. Др Десимир Кнежевић, редовни професор, Пољопривредни факултет у Лешку, Универзитет у Приштини. Ужа научна област: Генетика и оплемењивање организама;3. Др Славица Весковић Морачанин, научни саветник, Институт за хигијену и технологију меса, Београд. Ужа научна област: Технолошка микробиологија;4. Др Јелена Младеновић, ванредни професор, Агрономски факултет у Чачку, Универзитета у Крагујевцу. Ужа научна област: Примењена хемија;5. Др Мирјана Радовановић, доцент, Агрономски факултет у Чачку, Универзитета у Крагујевцу, Ужа научна област: Технологија биљних сировина.
Датум одбране дисертације:

Ментор
Проф. др Лека Мандић

Чланови комисије за оцену и одбрану докторске дисертације

Др Маријана Пешаковић, председник комисије
Научни саветник за ужу научну област Микробиологија
Институт за воћарство у Чачку

Др Десимир Кнежевић, члан комисије
Редовни професор за ужу научну област Генетика и оплемењивање организама
Пољопривредни факултет у Лешку, Универзитет у Приштини

Др Славица Весковић Морачанин, члан комисије
Научни саветник за ужу научну област Технолошка микробиологија
Институт за хигијену и технологију меса, Београд

Др Јелена Младеновић, члан комисије
Ванредни професор за ужу научну област Примењена хемија
Агрономски факултет у Чачку, Универзитет у Крагујевцу

Др Мирјана Радовановић, члан комисије
Доцент за ужу научну област Технологија биљних сировина
Агрономски факултет у Чачку, Универзитет у Крагујевцу

Захвалница

Докторска дисертација рађена је под менторством проф. др Леке Мандића и проф. др Драгутина Ђукића, којима исказујем дубоку захвалност на помоћи, разумевању и стрпљењу. Проф. др Десимиру Кнежевићу, руководиоцу пројекта у оквиру којег је и реализована ова докторска дисертација, дугујем огромну захвалност на исказаној подршци, конструктивним разговорима и корисним сугестијама и саветима.

Такође, захвалност дугујем др Маријани Пешаковић, др Славици Весковић-Морачанин и др Јелени Младеновић на корисним саветима и учешћу у Комисији за оцену докторске дисертације. Најлепше се захваљујем др Мирјани Радовановић на свесрдној помоћи у експерименталном делу истраживања, тумачењу резултата и безграничној подршци. Захваљујем се Зорану Динићу, стручном саветнику са Института за земљиште у Београду, на извршеним анализама на ICP-AES и интерпретацији резултата. Др Наташи Шекуљици, са Технолошко-металуришког факултета у Београду, дугујем велику захвалност на помоћи у лиофилизацији узорака. Др Владимиру Зорнићу, са Института за крмно биље из Крушевца, захваљујем се на подршци и помоћи у статистичкој обради података. Захваљујем се и др Снежани Танасковић на исказаној подршци.

Хвала колективу Агрономског факултета у Чачку и свим сарадницима и колегама које сам упознала на овом „путовању“, а који су на било који начин допринели реализацији овог рада.

Наравно, највећу захвалност дугујем својим члановима породице, родитељима, браћи и сестри и мом Бобану.

Весна Ђуровић

Експериментални део докторске тезе урађен је у лабораторијама Агрономског факултета у Чачку, Универзитета у Крагујевцу и Института за земљиште у Београду. Докторска дисертација је урађена у оквиру пројекта „Изучавање генетичке основе побољшања приноса и квалитета стрних жита у различитим агроеколошким условима“ Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (ТР 31092).

АНТИБАКТЕРИЈСКА И ФИТОХЕМИЈСКА СВОЈСТВА ПШЕНИЧНИХ КЛИЈАНАЦА И ЊИХОВ УТИЦАЈ НА КВАЛИТЕТ КЕКСА

РЕЗИМЕ

Пшеница је добар извор хемијских и фитохемијских једињења и користи се за добијање пшеничних клијанаца и младе биљке, који могу представљати извор различитих фитохемијских једињења, макро- и микро елемената и могу испољити антиоксидативна и антибактеријска својства. Могу се користити као супституент брашна у неком прехранбеном производу и утицати на побољшање нутритивних и фитохемијских својстава производа.

Резултати су показали да су 50% ацетон и 50% етанол испољили највећу ефикасност при екстракцији укупних фенола и флавоноида из семена пшенице. Трајање и начин наклијавања семена имали су значајан утицај на садржај укупних фенола, флавоноида и α -токоферола и антиоксидативни потенцијал добијених пшеничних клијанаца, док је узраст младе биљке утицао и на садржај фотосинтетичких пигмената. Пшенични клијанци и изданци су бољи извор фитохемијских једињења и макро- и микро елемената у односу на семе пшенице. Пшенични изданци су бољи извор протеина и минералних материја у односу на пшеничне клијанце, који се карактеришу већим садржајем укупних фенола и α -токоферола и израженијом антиоксидативном активношћу. Хексански екстракти пшеничних клијанаца испољили су већу антибактеријску активност у поређењу са етанолским екстрактима пшеничних клијанаца и пшеничне траве. Делимична супституција пшеничног брашна прахом пшеничних клијанаца и младе пшеничне траве допринела је повећању садржаја протеина, минералних материја и укупних фенола и антиоксидативног потенцијала кекса, а добијени производ био је микробиолошки стабилан. Након складиштења од 210 дана, кекс са пшеничним клијанцима и изданцима имао је већи садржај укупних фенола и већи антиоксидативни потенцијал у односу на кекс без супституената.

Кључне речи: антибактеријска и фитохемијска својства, пшенични клијанци и изданци, кекс, функционална својства.

ANTIBACTERIAL AND PHYTOCHEMICAL PROPERTIES OF WHEAT SPROUTS AND THEIR INFLUENCE ON BISCUIT QUALITY

ABSTRACT

Wheat is a good source of chemical and phytochemical compounds, and it is used to obtain wheat sprouts and young plants (wheatgrass), which can be a source of various phytochemical compounds and macro- and micro elements and can exhibit antioxidant and antibacterial properties. They can also be used as a substitute for flour in a food product, and can improve the nutritional and phytochemical properties of the product.

The results showed that 50% acetone and 50% ethanol showed the highest efficiency in the extraction of total phenols and flavonoids from wheat seeds. The method of seed germination had a significant impact on the contents of total phenols, flavonoids and α -tocopherols and the antioxidant potential of the obtained wheat sprouts, while the age of the young plant also affected the content of photosynthetic pigments. Wheat sprouts and young plants (wheatgrass) are better sources of phytochemical compounds and macro- and micro elements compared to wheat seeds. Wheatgrass is a better source of protein and minerals compared to wheat sprouts, which are characterized by higher levels of total phenols and α -tocopherol and more pronounced antioxidant activity. Hexane extracts of wheat sprouts showed higher antibacterial activity compared to ethanolic extracts of wheat sprouts and wheatgrass. Partial substitution of wheat flour with wheat sprout and young wheatgrass powder contributed to an increase in protein, mineral substances, total phenols and antioxidant potential of biscuits, and the obtained product was microbiologically stable. After 210 days of storage, the biscuit with wheat sprouts and young wheatgrass had a higher content of total phenols and higher antioxidant potential compared to the biscuit without substituents.

Keywords: antibacterial and phytochemical properties, wheat sprouts and wheatgrass, biscuits, functional properties.

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ЦИЉ РАДА	3
3. РАДНА ХИПОТЕЗА	4
4. ТЕОРИЈСКИ ДЕО	5
4.1. Ботаничке карактеристике и просечни приноси пшенице (<i>Triticum aestivum</i> L.)	5
4.2. Структура и хемијски састав семена пшенице	6
4.3. Фитохемијска својства пшенице	7
4.3.1. Фенолна једињења у пшеници	7
4.3.2. Токофероли у пшеници	10
4.3.3. Антиоксидативна својства пшенице	11
4.4. Пшенични клијанци и изданци као потенцијални извор функционалних једињења	13
4.5. Млади изданци - пшенична трава	17
4.5.1. Фотосинтетички пигменти у пшеничној трави	19
4.6. Ултразвучна екстракција	20
4.6.1. Одабир растварача за ултразвучну екстракцију	21
4.7. Садржај макро- и микроелемената у биљном материјалу	23
4.8. Основна грађа бактерија	25
4.9. Антимикробна активност и резистентност микроорганизама	28
4.10. Патогени микроорганизми као узрочници тровања храном и изазивачи обољења	32
4.11. Методе одређивања антимикробне активности	34
4.11.1. Диск - дифузиона метода	34
4.11.2. Дилуционе методе одређивања минималне инхибиторне концентрације	35
4.12. Употреба биљака ради развоја производа побољшаних својстава	37
4.12.1. Микробиолошка одрживост кекса и сродних производа	39
5. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	41
5.1. Материјали, реагенси и апарати	41
5.2. Методе рада	43
5.2.1. Одређивање хемијског састава семена пшенице, клијанаца, пшеничне траве и кекса	48
5.2.1.1. Одређивање суве материје	48
5.2.1.2. Одређивање садржаја пепела	48
5.2.1.3. Одређивање садржаја протеина методом по Кјелдалу (Kjeldahl-u)	48
5.2.1.4. Полариметријска метода за одређивање садржаја скроба	49
5.2.1.5. Одређивање садржаја масти методом по Соксхлету (Soxhlet)	50
5.2.2. Припрема екстраката	51
5.2.3. Одређивање садржаја биолошки активних материја у семену пшенице, клијанцима, пшеничној трави и кексу	52
5.2.3.1. Одређивање укупних фенола	52
5.2.3.2. Одређивање укупних флавоноида	53
5.2.3.3. Одређивање концентрације фотосинтетичких пигмената пшеничних изданака	54
5.2.3.4. Одређивање антиоксидативне активности	55
5.2.3.5. Одређивање садржаја α -токоферола у семену пшенице, пшеничним клијанцима, пшеничној трави и кексу НРЛС методом	58
5.2.4. Одређивање садржаја макро- и микроелемената у биљном материјалу	59
5.2.5. Микродилуциона метода одређивања минималне инхибиторне концентрације	60

5.2.6. Микробиолошка анализа кекса	60
5.2.7. Статистичка анализа резултата истраживања	61
6. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА И ДИСКУСИЈА	62
6.1. Хемијски састав семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса	62
6.2. Утицај врсте растварача на ултразвучну екстракцију укупних фенола из семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса	62
6.3. Утицај примењеног екстракционог поступка на екстракцију укупних фенола из семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса	65
6.4. Утицај врсте растварача на ултразвучну екстракцију укупних флавоноида из семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса	66
6.5. Утицај растварача, примењених при ултразвучној екстракцији, на антиоксидативну активност екстраката из семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса	67
6.6. Садржај биоактивних материја у семену пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса	70
6.7. Утицај трајања и начина наклијавања на фитохемијска својства пшеничних клијанаца сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса	72
6.7.1. Утицај трајања наклијавања на фитохемијска својства пшеничних клијанаца сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса	72
6.7.2. Утицај начина наклијавања на фитохемијска својства пшеничних клијанаца сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса	73
6.8. Садржај биоактивних материја у пшеничној трави	77
6.9. Садржај фотосинтетичких пигмената у екстрактима пшеничне траве	80
6.10. Садржај макро- и микроелемената у семену пшенице, клијанцима и трави ..	82
6.11. Антибактеријска активност екстраката пшеничних клијанаца и пшеничне траве	87
6.12. Примена пшеничних клијанаца и пшеничне траве у производњи кекса	89
6.12.1. Хемијска и фитохемијска анализа сировина за производњу кекса	89
6.12.2. Утицај делимичне супституције пшеничног брашна са пшеничним клијанцима у праху на основна хемијска својства кекса	90
6.12.3. Утицај делимичне супституције брашна са пшеничним клијанцима у праху на фитохемијска својства кекса	92
6.12.4. Сензорна својства кекса са пшеничним клијанцима	96
6.12.5. Утицај делимичне супституције пшеничног брашна са прашкастим формама младе пшеничне траве на хемијска и фитохемијска својства кекса ...	98
6.12.6. Сензорна својства кекса са пшеничном травом	101
6.12.7. Компаративна анализа садржаја органских, минералних и биоактивних материја у кексу са различитим количинама пшеничних клијанаца и изданака/траве	102
6.12.8. Садржај укупних фенола и антиоксидативни потенцијал кекса након 210 дана складиштења	107
6.12.9. Микробиолошка анализа кекса са пшеничним клијанцима издањцима	111
7. ЗАКЉУЧАК	115
8. ЛИТЕРАТУРА	118

СПИСАК СКРАЋЕНИЦА

ANOVA	Анализа варијансе (eng. analysis of variance)
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ATCC	Лабораторијски сојеви микроорганизама (American Type Cell Collection)
a_w	Активност воде
BHA	Бутиловани хидроксианизол
BHT	Бутиловани хидрокситолуен
CE	Катехин еквивалент
CFU	Број ћелија способних за раст тј. стварање колонија (eng. Colony Forming Units)
DMSO	Диметил-сулфоксид
DPPH	2,2-дифенил-1- пикрилхидразил
FAE	Еквивалент ферулинске киселине
FAO	Организација за храну и пољопривреду (Food and Agricultural Organisation)
Gr^-	Грам негативне бактерије
Gr^+	Грам позитивне бактерије
GAE	Еквивалент галне киселине (eng. gallic acid equivalent)
HPLC	Течна хроматографија високих перформанси (eng. high performance liquid chromatography)
ICP-AES	Индукована спрегнута плазма атомска емисиона спектроскопија (eng. inductively coupled plasma atomic emission spectrometry)
<i>McFarland</i>	Стандард за одређивање густине бактеријске суспензије
RE	Рутин еквивалент
TE	Тролокс еквивалент
TPC	Садржај укупних растворљивих полифенола (eng. total phenolic content)
UAE	Ултразвучно потпомогнута екстракција (eng. ultrasound-assisted extraction)
WHO	Светска здравствена организација (eng. World Health Organization)
с.м.	Садржај суве материје

СПИСАК ТАБЕЛА

Табела 1.	Светска производња пшенице и житарица у свету, у милионима тона (http://www.fao.org/statistics/en/)
Табела 2.	Садржај састојака коришћених у производњи кекса од пшеничног брашна делимично супституисаног прашкастим формама пшеничних клијанаца/пшеничне траве
Табела 3.	Хемијски састав семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса
Табела 4.	Утицај екстракционог поступка на садржај екстрахованих укупних фенола из семена пшенице

- Табела 5. Садржај укупних фенола, флавоноида, α -токоферола и антиоксидативне активности у семену пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса
- Табела 6. Садржај укупних фенола у клијанцима наклијаваним у мраку 120 и 144 h
- Табела 7. Садржај α -токоферола у пшеничним клијанцима наклијаваним у мраку 120 и 144 h
- Табела 8. Садржај укупних фенола, флавоноида, α -токоферола и антиоксидативни потенцијал у пшеничним клијанцима добијеним по првом начину наклијавања
- Табела 9. Садржај укупних фенола, флавоноида, α -токоферола и антиоксидативни потенцијал у пшеничним клијанцима добијеним по другом начину наклијавања
- Табела 10. Садржај фотосинтетичких пигмената у пшеничној трави сорте Ренесанса, узраста 5, 8 и 11 дана
- Табела 11. Садржај фотосинтетичких пигмената у пшеничној трави сорте Симонида, узраста 5, 8 и 11 дана
- Табела 12. Садржај фотосинтетичких пигмената у пшеничној трави сорте НС-40С, узраста 5, 8 и 11 дана
- Табела 13. Садржај макроелемената у семену пшенице, пшеничним клијанцима и младој пшеничној трави сорти Симонида, НС-40С и Ренесанса
- Табела 14. Просечан садржај макроелемената у семену пшенице, пшеничним клијанцима и младој биљци (mg kg^{-1})
- Табела 15. Садржај В, Cu, Fe, Mn, Ni, Zn, N и С у семену пшенице, пшеничним клијанцима и пшеничној трави
- Табела 16. Просечан садржај В, Cu, Fe, Mn, N и С у пшеничном семену, пшеничним клијанцима и пшеничној трави
- Табела 17. Садржај тешких метала у семену пшенице, пшеничним клијанцима и младој пшеничној трави сорти Симонида, НС-40С и Ренесанса
- Табела 18. Антибактеријска активност екстракта пшеничних клијанаца, пшеничне траве и антибиотика довицина на проучаване сојеве Gr^+ и Gr^- бактерија
- Табела 19. Основни хемијски састав сировина које се користе за припрему кекса
- Табела 20. Садржај укупних фенола, α -токоферола и антиоксидативни потенцијал суплемената пшеничних клијанаца и пшеничне траве
- Табела 21. Хемијска анализа кекса од пшеничног брашна, делимично супституисаног са прашкастим формама пшеничних клијанаца
- Табела 22. Садржај укупних фенола, α -токоферола и антиоксидативна активност у кексу са додатком прашкастих форми клијанаца
- Табела 23. Хемијски састав и енергетска вредност кекса од пшеничног брашна са различитим количинама пшеничне траве
- Табела 24. Садржај укупних фенола, α -токоферола и антиоксидативни потенцијал у кексу са додацима прашкастих форми пшеничне траве
- Табела 25. Садржај укупних фенола и антиоксидативни потенцијал у кексу са пшеничним клијанцима након 210 дана складиштења
- Табела 26. Садржај укупних фенола и антиоксидативни потенцијал кекса са пшеничном травом након 210 дана складиштења
- Табела 27. Микробиолошка анализа кекса након 30 дана складиштења (CFU g^{-1})
- Табела 28. Микробиолошка анализа кекса након 120 дана складиштења (CFU g^{-1})

Табела 29. Микробиолошка анализе кекса након 210 дана складиштења (CFU g⁻¹)

СПИСАК ГРАФИКОНА

- Графикон 1а. Утицај врсте растварача на ултразвучну екстракцију укупних фенола из семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса
- Графикон 1б. Просечне вредности укупних фенола екстрахованих са различитим растварачима из семена све три сорте пшенице
- Графикон 2а. Утицај врсте растварача, примењених при ултразвучној екстракцији, на количину екстрахованих флавоноида из семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса
- Графикон 2б. Утицај врсте растварача, примењених при ултразвучној екстракцији, на просечну количину екстрахованих флавоноида из семена све три сорте пшенице
- Графикон 3а. Утицај врсте растварача, примењених при ултразвучној екстракцији, на антиоксидативну активност семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса, мерену АВТС-тестом
- Графикон 3б. Утицај врсте растварача, примењених при ултразвучној екстракцији, на просечне вредности антиоксидативне активности семена пшенице, мерене АВТС-тестом
- Графикон 4а. Утицај врсте растварача, примењених при ултразвучној екстракцији, на антиоксидативни потенцијал семена испитиваних сорти пшенице мерен DPPH-методом
- Графикон 4б. Утицај врсте растварача, примењених при ултразвучној екстракцији, на просечне вредности антиоксидативне активности семена пшенице, која је мерена DPPH-методом
- Графикон 5. Садржај укупних фенола у младој пшеничној трави сорти Ренесанса, Симонида и НС-40С
- Графикон 6. Садржај укупних флавоноида у младој пшеничној трави
- Графикон 7. Антиоксидативни потенцијал младе пшеничне траве (а – DPPH-метода и б – АВТС-метода)
- Графикон 8. Садржај фотосинтетичких пигмената у пшеничној трави сорти Ренесанса, Симонида и НС-40С, узраста 5, 8 и 11 дана
- Графикон 9. Упоредни приказ садржаја протеина у кексу са истим количинама пшеничних клијанаца и пшеничне траве
- Графикон 10. Упоредни приказ садржаја минералних материја у кексу са истим количинама пшеничних клијанаца и пшеничне траве
- Графикон 11. Упоредни приказ садржаја угљених хидрата у кексу са истим количинама пшеничних клијанаца и пшеничне траве
- Графикон 12. Упоредни приказ садржаја масти у кексу са истим количинама пшеничних клијанаца и пшеничне траве
- Графикон 13. Упоредни приказ садржаја укупних фенола у кексу са истим количинама пшеничних клијанаца и пшеничне траве

- Графикон 14. Упоредни приказ садржаја α -токоферола у кексу са истим количинама пшеничних клијанаца и пшеничне траве
- Графикон 15. Упоредни приказ антиоксидативног потенцијала кекса са истим количинама пшеничних клијанаца и пшеничне траве (ABTS-метода)
- Графикон 16. Упоредни приказ антиоксидативног потенцијала кекса са истим количинама пшеничних клијанаца и пшеничне траве (DPPH-метода)
- Графикон 17. Упоредни приказ садржаја укупних фенола у кексу са пшеничним клијанцима два дана након печења и складиштења од 210 дана
- Графикон 18. Упоредни приказ антиоксидативне активности у кексу са пшеничним клијанцима два дана након печења и складиштења од 210 дана
- Графикон 19. Упоредни приказ садржаја укупних фенола у кексу са пшеничном травом два дана након печења и складиштења од 210 дана
- Графикон 20. Упоредни приказ антиоксидативног капацитета кекса са пшеничном травом два дана након печења и складиштења од 210 дана

СПИСАК СЛИКА

- Слика 1. *Triticum aestivum* L.
- Слика 2. Структура семена пшенице (Barron et al., 2007)
- Слика 3. Хемијска структура токоферола и токотриенола (Liu et al., 2007)
- Слика 4. Заступљеност нових производа на светском тржишту за период јануар 2015–април 2017. који садрже клијанце по категоријама (www.mintel.com , Pagand et al., 2017)
- Слика 5. Хемијска структура хемоглобина и хлорофила *a*
- Слика 6. Хемијска структура хлорофила *a* и хлорофила *b*
- Слика 7. Шема распореда омотача бактеријске ћелије (Ђukić i sar., 2010)
- Слика 8. Фрагмент молекула муреина (NAG: N-ацетилглукозамин; NAM: N-ацетилмураминска киселина (Преузето и прилагођено од Lalošević i sar., 2011)
- Слика 9. Ћелијски зид *Gr*⁺ бактерија (Преузето и прилагођено од Lalošević i sar., 2011)
- Слика 10. Ћелијски зид *Gr*⁻ бактерија (Преузето и прилагођено од Lalošević i sar., 2010)
- Слика 11. Диск-дифузиона метода
- Слика 12. Промена боје ресазурин-индикатора из плаве/љубичасте у розе при читавању МИС
- Слика 13. Припрема суспензије микроорганизама – метода пораста, CLSI (преузето и прилагођено, Balouiri et al., 2016)
- Слика 14. Самлевени узорци семена пшенице

- Слика 15. Припрема узорака пшеничних клијанаца: а – потапање семена у води, б – наклијавање семена у клијалишту, в – изглед клијанаца, г – механички одвојени клијанци
- Слика 16. Изглед клијанаца сушених лиофилизацијом и сушених у струји топлог ваздуха
- Слика 17. Пшенични изданци/трава
- Слика 18. Припрема узорака пшеничне траве: испирање семена са H_2O_2 , засејавање, развој траве у клијалишту, припрема траве за екстракцију, ултразвучна екстракција и спектрофотометријска анализа добијених екстраката
- Слика 19. Шематски приказ израде кекса
- Слика 20. Самлевени узорци кекса са пшеничним клијанцима и са пшеничном травом
- Слика 21. Одређивање садржаја протеина методом по Кјелдалу
- Слика 22. Поступак и апаратура за одређивања скроба
- Слика 23. Поступак и апаратура за одређивање садржаја масти
- Слика 24. Калибрациона крива за одређивање укупних фенола
- Слика 25. Структура рутина и његов комплекс са алуминијумом (кверцетин-3-О-рутинозидалуминат (III) комплекс)
- Слика 26. Калибрациона крива за одређивање укупних флавоноида
- Слика 27. Екстракција фотосинтетичких пигмената
- Слика 28. а – механизам деловања АВТS-катјон радикала, б – Тролокс (6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина)
- Слика 29. Калибрациона крива за одређивање антиоксидативне активности АВТS радикалом
- Слика 30. Механизам неуталисања слободног радикала DPPH радикалом (Becker et al., 2019)
- Слика 31. Калибрациона крива за одређивање антиоксидативне активности DPPH радикалом и промена боје из љубичасте у жуту након додавања узорка
- Слика 32. Припрема узорака и пикови стандарда α -токоферола концентрација од 0,13–500 mg mL⁻¹
- Слика 33. Постављање узорака у Autosampler и калибрациона крива
- Слика 34. Хроматограми стандарда α -токоферола концентрације: 2,048 mg mL⁻¹, б – 200 mg mL⁻¹
- Слика 36. Микробиолошка анализа кекса
- Слика 36. Хроматограм α -токоферола у семену пшенице
- Слика 37. Хроматограми α -токоферола у семену пшенице сорти Ренесанса – црвено, Симонида – зелено и НС-40С – плаво
- Слика 38. Обојења раствора чији је интензитет сразмеран количини фенолних једињења а који се мери на 760 nm: лево – семе пшенице, средина - клијанци наклијавани првим начином, десно – другим начином.
- Слика 39. Обојења раствора чији је интензитет сразмеран количини фенолних једињења а који се мери на 760 nm: лево – контролни кекс, с лева на десно кекс са 2,5; 5 и 7,5% клијанаца

- Слика 40. Узорци метанолног раствора, добијени након упаравања хексана из екстракта кекса, за одређивање α -токоферола (1 – контрола; 2 – кекс са 2,5% клијанаца и 3 – кекс са 5% клијанаца)
- Слика 41. Печени кекс и одговарајући узорци млевеног кекса слева на десно растући садржај супституента. 2 – 2,5%; 3 – 5%; 4 – 7,5% клијанаца (оригинал, В. Ђуровић)
- Слика 42. Сирови, осушени и самлевени клијанци коришћени у припреми кекса (оригинал В. Ђуровић)
- Слика 43. Замес, печени кекс и млевени узорци кекса са и без праха пшеничне траве: 1 – контрола; 2 – 2,5%; 3 – 5%; 4 – 7,5% (оригинал, В. Ђуровић)
- Слика 44. Кекс са клијанцима и кекс са изданцима након 210 дана складиштења (оригинал, В. Ђуровић)

1. УВОД

Предмет дисертације је испитивање неких биотехнолошких карактеристика пшенице, као једне од „три најзначајније житарице“ и једне од главних биљних култура у људској исхрани. Пшеница је испитивана као основна сировина, полазни материјал за добијање пшеничних клијанаца и младих изданака пшеничне траве, као потенцијални извор биоактивних једињења.

Познато је да присуство фитохемијских једињења у биљкама у корелацији, са антиоксидативним својствима и са антимикробним потенцијалом, који човек у значајној мери користи у вековној борби са инфективним болестима. Иако савремена цивилизација, посебно у развијеним земљама, има интензиван развој и висок ниво достигнућа науке, технологије и медицине, подаци Светске здравствене организације (WHO, 2002a) указују да човечанство није успело да контролише ширење и спречи умирање људи од заразних болести. Стога су, истраживања која се односе на потребе за развојем нових антимикробних агенаса и интерес научне заједнице за новим природним лековима (агенсима) биљног порекла у сталном порасту. Претпоставља се да приближно 60–80% савремене светске популације употребљава лековито биље у борби са инфективним болестима (Harvey, 2000). Међу најзначајнијим фитохемијским супстанцама са антибактеријским дејством издвајају се феноли, полифеноли, флавоноиди, флавоноли, хинони, танини, кумарини, терпеноиди, етарска уља, алкалоиди, лецитини, полипептиди итд. (Cowan, 1999). Савремене методе хемијске анализе су омогућиле карактеризацију једињења присутних у биљкама, која се дефинишу као секундарни метаболити, а доводе се у везу са антиоксидативним и антимикробним својствима. Човек се окреће биљкама како због учестале злоупотребе антибиотика, тако и због утицаја синтетске хемијске индустрије на загађење животне средине. Иако је велики број биљних врста испитан, ипак биљно царство представља неисцрпан извор биоактивних компоненти. Биљни материјал различитог порекла може поседовати велику биолошку активност, што се приписује присуству секундарних метаболита, који имају значајан ефекат на здравље људи, због чега се интензивно изучавају. Циљ је, с једне стране, смањити употребу синтетичких конзерванаса у прехранбеној индустрији, а с друге стране, смањити појаву микробне резистентности.

Тровање храном се сматра једним од најчешћих узрока болести и смрти у земљама у развоју. Већина извештаја о тровању храном повезана је са бактеријском контаминацијом, посебно *Gr⁻* бактеријама, као што су *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. Неке *Gr⁺* бактерије (*Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus*) су идентификоване као узрочници кварења хране и настанка болести, које су последица тровања храном (Vesković i Đukić, 2015). Превенција кварења хране и њиховог етиолошког агенса традиционално се постиже коришћењем хемијских конзерванаса. Упркос доказаној ефикасности хемијских конзерванаса у превенцији и контроли појаве болести и тровања храном, њихова поновљена примена резултира накупљањем хемијских остатака у ланцу исхране. Такође, последице су и стицање микробне отпорности и негативне нуспојаве примењених хемикалија на здравље људи. Због наведених ризика, бројна истраживања су усмерена на развој потенцијално ефикаснијих, здравијих, безбеднијих и природних алтернативних конзерванаса хране. Честа је примена биљака и биљних екстраката, који се сматрају нутритивно сигурним и лако разградивим, као и потенцијалних антимикробних средстава ради очувања хране (Mostafa et al., 2018). Отуда испитивање антимикробног потенцијала пшеничних клијанаца и пшеничне траве и њихова примена у прехранбеним производима има велики значај.

Прехрамбена технологија има значајну улогу у остваривању циља да произведе довољне количине хране да задовољи основну људску потребу, и да истовремено произведена храна буде нутритивно вредна, са позитивним ефектом на здравље људи. Растући интерес за функционалном храном условио је истраживања нових извора биоактивних једињења. Одређена испитивања упућују на закључак да се додавање пшеничних клијанаца, као и младих изданака пшеничне траве одражава на побољшање како основног хемијског састава добијеног производа, тако и на његова нутритивна својства. Конзумирање функционалне хране може позитивно допринети очувању и побољшању здравља, а то се управо приписује или биолошки активним једињењима (пребиотицима, витаминима, минералима) или нутритивним компонентама (фитохемијским једињењима). Увођење у исхрану фитохемијских једињења: полифенола, токоферола, каротеноида, аскорбинске киселине има позитиван ефекат на здравље и заштиту од болести, узрокованих оксидативним стресом. Захтеви потрошача за храном богатом минералима, витаминима, прехранбеним влакнима и антиоксидантима, последњих деценија значајно су већи. Ови захтеви су утицали на развој тржишта производа који садрже биоактивна једињења, међу којима пшеница и клијанци добијени од ње заузимају значајно место.

Иако је пшеница, као житарица, широко распрострањена у исхрани људи и обезбеђује унос велике количине скроба, дијеталних влакана, мању количину масти, витамина групе В и минерала, као што су Са, Mg и Fe, ипак, већина ових састојака се губи током процеса прераде жита. Стога, производи од белог пшеничног брашна имају релативно ниску нутритивну вредност (Škrbić i Filipčev, 2007). Рафинирано пшенично брашно је основни састојак пекарских производа, али са мањим протеинским квалитетом од осталих житарица. Ово је превасходно због ниског садржаја лизина, метионина и треонина у пшеничним протеинима (Үақооб et al., 2018). Међутим, такви производи се могу лако обогатити протеинима, влакнима, разним витаминима и минералима, како би се задовољиле специфичне потребе циљних група и осетљивих слојева становништва који су неухрањени. Узимајући у обзир чињеницу да пшенични клијанци и изданци поседују висок садржај протеина, минерала и биоактивних једињења, њихово додавање у прехранбени производ као што је кекс, значајно би унапредило његову вредност и функционалност у смислу повећања антиоксидативног потенцијала. Кекс добијен на овакав начин задовољио би захтеве потрошача за природним производима високе нутритивне и функционалне вредности.

2. ЦИЉ РАДА

Циљ овог истраживања је испитивање антибактеријског и антиоксидативног потенцијала пшеничних клијанаца и изданака и њиховог утицаја, као супституената, на нутритивна и функционална својства и микробиолошку стабилност кекса.

У оквиру ове докторске дисертације постављени су следећи подциљеви и задаци:

- изучавање хемијских и фитохемијских карактеристика три генетички дивергентне хлебне сорте пшенице: Симонида, Ренесанса и НС 40С;
- оцена ефикасности екстракције фенола и флавоноида поступком ултразвучне екстракције са различитим растварачима, као и утицаја избора растварача на антиоксидативни потенцијал екстраката;
- детерминација услова наклијавања семена за добијање пшеничних клијанаца, као и оптималног времена старости изданака младе биљке који дају биљни материјал добрих фитохемијских својстава;
- изучавање антибактеријског ефекта екстраката пшеничних клијанаца и пшеничне траве на различите Gr^+ и Gr^- бактерије;
- утврђивање утицаја прашкастих форми пшеничних клијанаца и младих изданака, као делимичних супституената пшеничног брашна, на побољшање нутритивних и фитохемијских својстава кекса и његову микробиолошку стабилност.

3. РАДНА ХИПОТЕЗА

Ефикасност поступка ултразвучне екстракције фенола и флавоноида и антиоксидативни потенцијал екстраката зависи од врсте коришћеног растварача.

Пшенични клијанци и млада пшенична трава су извор фитохемијских једињења која имају антиоксидативну способност.

Пшенични клијанци и млада пшенична трава садрже фитохемијска једињења која имају антимикуробни потенцијал.

Садржај фитохемијских једињења код пшеничних клијанаца варира у зависности од генотипа пшенице и поступка наклијавања семена.

Екстракти пшеничних клијанаца и пшеничне траве испољавају антибактеријски ефекат на различите Gr^+ и Gr^- бактерије.

Делимична супституција брашна са пшеничним клијанцима и младом пшеничном травом позитивно утиче на хемијски састав и фитохемијска својства кекса.

Мешавином брашна са прашком од пшеничних клијанаца и младе пшеничне траве се добија нутритивно обогаћен производ (кекс) који је функционална храна.

Супституцијом брашна са пшеничним клијанаца и младом пшеничном травом добија се производ (кекс) који је микробиолошки стабилан.

4. ТЕОРИЈСКИ ДЕО

4.1. Ботаничке карактеристике и просечни приноси пшенице (*Triticum aestivum* L.)

Пшеница (*Triticum aestivum* L.), уз оvas, спада у прве култивисане житарице. Потиче из Северозападне Азије, где се око 10 000 година пре нове ере (п.н.е.) гајила као усев за производњу хране у региону „Плодни полумесец“ који обухвата простор југозападне Азије и североисточне Африке. На овом простору пшеница је гајена у периоду између 7000–6000 година п.н.е. у области данашње државе Ирака, а у периоду 6000–5000 године п.н.е. на територији Египта и Кине. Преко Анадолије је 6000 год. п.н.е. стигла у Европу, најпре у Грчку, а затим се проширила на Балкан, Италију, Француску и Шпанију (Feldman, 2001), а у периоду од 5000–4000 година п.н.е. се шири на територију Велике Британије, Скандинавије, Русије, Мађарске, Румуније, Пољске, Чешке, Словачке, Бугарске. У области Немачке почетак гајења пшенице је у првом веку нове ере. У 16. веку (1529) пшеница је пренета у Јужну Америку у Мексико. Од почетка 17 века (1602) почело је гајење пшенице у САД, у Аустралији и Океанији – 1788. године (Shewry, 2009) и касније у 19 веку (1812) у Канади.

Систематика пшенице
(Кнежевић, 2007)
Царство: *Plantae*
Одељак: *Magnoliophyta*
Класа: *Liliopsida*
Ред: *Poales*
Фамилија: *Poaceae*
Подфамилија: *Pooideae*
Племи: *Triticeae*
Род: *Triticum*
Врсте: *T. turgidum* L., *T. durum* L.,
T. aestivum L.



Слика 1. *Triticum aestivum* L.

Пшеница се убраја међу „три велике“ житарице, са годишњом производњом већом од 700 милиона тона. У 2018. години укупна светска жетва износила је око 730 милиона тона, у поређењу са 516 милиона тона пиринча и 1482 милиона тона кукуруза (<http://www.fao.org/statistics>). Укупна светска жетва житарица износила је преко 2655 милиона тона (Табела 1). У истом периоду укупан принос пшенице у Србији био је приближно три милиона тона (<http://data.stat.gov.rs/>).

Табела 1. Светска производња пшенице и житарица у свету, у милионима тона (<http://www.fao.org/statistics/en/>)

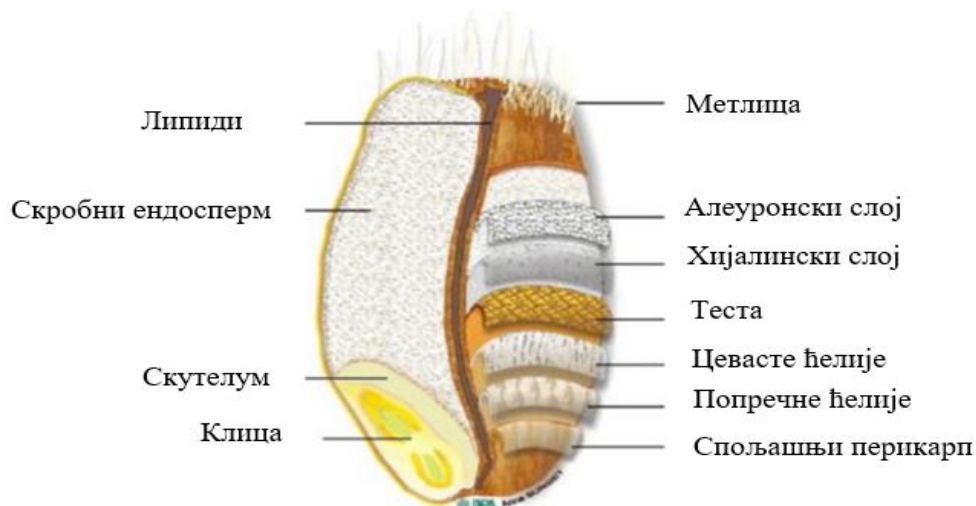
	2014/2015	2015/2016	2016/2017	2017/2018	2018/2019
Пшеница	734,967	736,765	761,331	759,918	730,880
Цереалије	2611,478	2586,982	2664,197	2703,803	2655,009

Пшеница се узгаја у широком опсегу, од 67 °N у Скандинавији и Русији до 45 °S у Аргентини (Feldman, 1995) и чини око 30% произведених жита. Спада у жита са великим приносом који је у Србији у 2018. години износио просечно 4,6 t ha⁻¹ (<http://data.stat.gov.rs/>).

Пшеница представља једну од главних биљних култура у исхрани људи (Shewry, 2009). У развијеним земљама се у просеку 50% од укупне производње преради у храну, док је у земљама у развоју заступљена са близу 85%. Она чини приближно једну петину од укупног калоријског уноса светске популације (ФАО, 2009).

4.2. Структура и хемијски састав семена пшенице

Семе пшенице се састоји од три одвојене целине: омотач (13–17% суве материје семена), скробни ендосперм (80–85%) и ембрион/клица (2–3%) (Belderok et al., 2000). Омотач или перикарп семена чине два дела, спољни и унутрашњи перикарп. Спољни перикарп се састоји од епидермиса, хиподерма и такозваних танкозидних ћелија, а унутрашњи перикарп чине интермедијарне ћелије (попречне и цевасте ћелије). Следећи слој ћелија је обојени слој срастао са алеуронским слојем, и назива се хијалински слој. Алеуронски слој се налази на површини ендосперма, одмах испод омотача. По хистолошким карактеристикама алеуронски слој припада ендосперму, а по технолошким – омотачу. У призматичним ћелијама овог слоја налазе се протеини, а посебно алеурон, по ком је слој добио име. Поред протеина у алеуронском слоју су присутни липиди, витамини, ензими и неорганске материје. Протеини и ензими имају виталну улогу у процесу клијања. Ендосперм без алеуронског слоја, унутрашњи ендосперм, богат је скробом и углавном садржи резервне материје потребне за раст клијанаца и младих биљака и назива се и брашнасти или скробни ендосперм. Поред угљених хидрата, брашнасти ендосперм садржи масти (1,5%) и протеине (13%). Садржај минерала (пепела) и дијеталних влакана је низак – 0,5% и 1,5% (Belderok et al., 2000). Клица се налази на једном крају семена, богата је липидима (8–13%) и протеинима (25%), садржи висок ниво минералних материја (4,5%) и врло је значајна као извор витамина Е (Cornell, 2003; Šramková et al., 2009).



Слика 2. Структура семена пшенице (Barron et al., 2007)

Семе пшенице садржи угљене хидрате (70–75%), воду (12–14%), протеине (8–18%) и друге компоненте, као што су прехранбена влакна, липиди и пепео (Šramková et al., 2009). Садржај појединих компоненти значајно се разликује у зависности од дела семена, па тако Šramková et al. (2009) наводе да је у ендосперму садржај масти 1,5%, протеина 13%, минералних материја 0,5% и влакана 1,5%, док је клица значајно богатија у свим наведеним компонентама и садржи око 25% протеина, 8–13% масти и 4,5% минералних

материја. До сличних резултата дошли су и други аутори (Belderok, 2000; Goesaert et al., 2005; Belitz et al., 2009).

Квалитет пшеничног брашна зависи од садржаја и карактеристика поменутих компонената, као и од сорте пшенице (Morita et al., 2002). Пшенично брашно садржи и витамине (В1, В2, Е, провитамин А, никотинску киселину) и ензиме – протеазе, липазе, оксидазе и друге (Petronijević, 2000). Угљени хидрати су најзаступљенији састојци семена. Највећи део угљених хидрата чини скроб (55–70%), а поред њега у семену су присутни и целулоза (2,5%), арабиноксилани (1,5–8%), β -гљукани (0,5–7%), шећери (~3%), гљукофруктани (~1%) (McKevith, 2004). Скроб је најважнији резервни полисахарид код многих жита (Parker and Ring, 2001). У поређењу са другим једињењима, представља доминантну компоненту (Goesaert et al., 2005) и чини у просеку 60–70% садржаја семена и 70–80% садржаја брашна.

По процентуалном учешћу у семену, након скроба, следе протеини са уделом од 8–18%. Протеини представљају најбитнији хемијски показатељ квалитета семена пшенице (Šramková et al., 2009). Пшеница је житарица са просечно највећим садржајем протеина (Belitz et al., 2009). Osborn је 1907. године класификовао протеине житарица на основу растворљивости у различитим растворима (води, сланом раствору, воденом раствору алкохола) на албумине, глобулине, глијадине и гљутенине.

Липиди су компонента, која има удео 2–3% у укупном хемијском саставу семена пшенице и 2–2,5% у хемијском саставу пшеничног брашна. Садржај липида у семену пшенице је условљен генетичким, еколошким факторима и интеракцијом генотип/средина. Прецизност одређивања садржаја липида зависи од процеса мљења пшенице и методе екстракције липида (Chung et al., 2009).

4.3. Фитохемијска својства пшенице

Семе житарица је веома важна компонента у људској исхрани, што је и показано укључивањем у пирамиду исхране. Међутим, иако је цело семе неопходно за оптимално здравље (USDA, 2000, 2005), пажња усмерена на коришћење и потрошњу целог семена била је незнатна у поређењу са воћем и поврћем. Извештаји Светске здравствене организације за 2012–2016 (World Health Organization report WHO-2018) показују да конзумација целог семена житарица смањује ризик од дијабетеса и хипертензије, што се приписује биолошкој активности семена. Цело семе садржи јединствена фитохемијска једињења, које допуњују она из воћа и поврћа при заједничкој конзумацији, а једна од таквих је ферулинска киселина која се углавном налази у семену, а није у значајним количинама присутна у воћу и поврћу (Shahidi and Naczk, 1995; Bunzel et al., 2001). У семену хлебне пшенице су присутна различита фитохемијска једињења као што су фенолне киселине (326–2620 $\mu\text{g g}^{-1}$ суве материје), ферулинска киселина (181–742 $\mu\text{g g}^{-1}$), укупни токоли (23,3–79,7 $\mu\text{g g}^{-1}$), α -токоферол (8,69–36,94 $\mu\text{g g}^{-1}$), каротеноиди (1,40–4,90 $\mu\text{g g}^{-1}$), стероли (225–959 $\mu\text{g g}^{-1}$) и др. (Shewry and Hay, 2015). Синергијски ефекти фитохемијских једињења из житарица, воћа и поврћа одговорни су за здравствене бенефите код човека (Liu et al., 2003).

4.3.1. Фенолна једињења у пшеници

Фенолна једињења су секундарни метаболити биљака који су широко заступљени у храни биљног порекла. Она имају улогу у заштити од ултраљубичастиг зрачења или патогена (Manach et al., 2004; Rocha et al., 2012). У биљкама феноли могу деловати као привлачни агенси за опрашивање, као антиоксиданти и могу изазвати пигментацију биљака, а у прехранбеним производима могу допринети горчини, боји, укусу, мирису и

оксидативној стабилности (Tarasevičienė et al., 2019). Постоје и наводи да фенолне киселине инхибирају биосинтезу трихотецена (токсина) код гљива рода *Fusarium* (Boutigny et al., 2009).

У семену житарица присутна су многа фенолна једињења, фенолне киселине, флавоноиди, танини и лигнани (Kandil et al., 2012). Фенолне киселине, присутне у целом семену житарица, испољавају високу биолошку активност, изражену кроз антиоксидативни, антитуморни, антиинфламаторни и антимикуробни потенцијал (Shahidi et al., 2018). Као природни антиоксиданти, фенолна једињења су нашла широку примену како у фармацеутској индустрији (Gani et al., 2012) тако и у очувању стабилности прерађених производа у прехранбеној индустрији (Mackevic, 2010; Keriene et al., 2015).

Фенолне киселине су сврстане у две групе: деривате хидроксибензојеве киселине и деривате хидроксицинаминске киселине (Karamać et al., 2005; Mattila et al., 2005). Кофеинска, хлорогенска, синапинска, ферулинска и *p*-кумаринска киселина су деривати хидроксицинаминске киселине. Ове киселине се углавном јављају у везаној форми, везане за структурна једињења ћелијског зида (Adom and Liu, 2002; Wang et al., 2013). Приближно 85% фенолних киселина присутних у кукурузу, 75% у пшеници и овсу и 62% у пиринчу је у везаном облику (Adom and Liu, 2002). У семену житарица од хидроксицинаминских киселина доминантна је ферулинска киселина (Smith and Hartley, 1983; Weidner et al., 1999; Gani et al., 2012; Boz, 2015). Ферулинска киселина, 4-хидрокси-3-метоксицинаминска киселина (Bourne and Rice-Evans, 1998; Mathew and Abraham, 2004) има значајну функцију примаоца слободних радикала и заштите људског здравља (Guo and Beta, 2013), а због високог антиоксидативног ефекта смањује ризике од настанка болести као што су рак и дијабетес (Srinivasan et al., 2007; Anson et al., 2009; Itagaki et al., 2009; Réblová, 2012; Acosta-Estrada et al., 2014).

Ферулинска киселина се може наћи слободна, димеризована или естерификована са полисахаридима и протеинима у ћелијском зиду (Fazary and Ju, 2007). Житарице садрже значајне количине ферулинске киселине и њених оксидационо везаних производа (званих диферулинске киселине или ферулске киселине дехидродимери). У дебелом цреву естерификоване киселине се мењају под утицајем ензима бактерија и прелазе у слободну форму и имају улогу у заштити од канцера (Kroon et al., 1997; Ferguson et al., 2003). То је антиоксидант који неутралише слободне радикале (супероксид, азотни оксид) који могу изазвати оксидативно оштећење ћелијских мембрана и ДНК. Поред тога, ферулинска киселина смањује ризик од настанка дијабетеса, холестерола и триглицерида. Као природни антиоксидант и антимикуробик представља природну алтернативу синтетичким адитивима. С обзиром на то да их, попут многих биоактивних компоненти, има више у спољашњим слојевима семена (Ndolo and Beta, 2014), коришћење и потрошња целог семена препорука је за конзументе, јер је то начин већег уноса ових једињења у организам и њиховог искоришћења у смислу здравије исхране (Boz, 2015).

Adom and Liu (2002) и Zhao and Moghadasian (2008) су констатовали да је садржај ферулинске киселине у целом семену пшенице 64–127 mg 100 g⁻¹. У истраживању које је обухватило 10 генотипова хлебне пшенице и 10 генотипова дурум пшенице у Србији Žilić i sar. (2013) су утврдили да је ферулинска киселина у свим генотиповима била најзаступљенија и да је садржај слободне ферулинске киселине, у зависности од генотипа хлебне пшенице, био између 0,027–0,175 μg g⁻¹ суве материје, а дурум пшенице – 0,085–0,151 μg g⁻¹ суве материје. Значајно више вредности наводе Li et al. (2008) – од 1,2–6,2 μg g⁻¹ за хлебну и 2,1–3,8 μg g⁻¹ за дурум пшеницу, док Liyana-Pathirana and Shahidi (2007) наводе вредности од 0,54 за хлебну и 0,43 μg g⁻¹ за дурум пшеницу, а Adom et al. (2003) – 0,19–1,42 μg g⁻¹.

Žilić i sar. (2013) су одређивали и садржај укупних фенола у пшеници и наводе опсег од 0,99–1,60 mg CE g⁻¹ и 1,27–1,65 mg CE g⁻¹ за хлебну и дурум пшеницу, при чему CE представља катехин еквивалент. Они констатују да је дурум пшеница имала у просеку 1,2 пута више укупних фенола него хлебна пшеница. Yu and Beta (2015) наводе да је у пшеничном брашну три сорте, различитог пигмента, садржај слободних фенола варирао између 105,4 и 113,2 mg FAE 100 g⁻¹, а као екстрагенс су применили 80% метанол, при чему је FAE еквивалент ферулинске киселине. До сличних резултата (70,6–110,8 mg FAE 100 g⁻¹) су дошли и Li et al. (2008), користећи 100% метанол. Садржај слободних фенола, уз ацидификовани метанол, у истраживању Liu et al. (2010) био је 146–226 mg FAE 100 g⁻¹. Садржај везаних фенола у пшеничном брашну варирао је између 91,9–94,3 mg GAE 100 g⁻¹ (Yu and Beta, 2015), 86–128 mg GAE 100 g⁻¹ (Adom et al., 2003) и 93–113 mg GAE 100 g⁻¹ (Okarter et al., 2010).

Садржај укупних фенола у пшеничном брашну целог семена је био 169–177 mg GAE 100 g⁻¹, односно 227–237 mg FAE 100 g⁻¹ (Yu and Beta, 2015). Đorđević et al. (2010) су утврдили да вредности садржаја укупних фенола, при екстракцији са 70% етанолом, код обичне хлебне пшенице износе 16,2 mg GAE g⁻¹ с.м. екстракта, а Liyana-Pathirana and Shahidi (2007) наводе садржај од 1291 mg FAE g⁻¹ обезмашћеног семена, уз 80% етанол као екстракционо средство. Abozed et al. (2014) истичу да је садржај укупних фенола у целом семену, екстрахованих 50% ацетоном, био 2,57 mg GAE g⁻¹ семена, док је уз екстракцију 70% метанолом и 70% етанолом екстраховано знатно мање 1,12 mg GAE g⁻¹ семена. El-Sayed et al. (2008) истичу да је садржај укупних фенола у семену пшенице у опсегу од 881–2382 µg FAE g⁻¹. Pasqualone et al. (2014) су код 65 генотипова дурум пшенице у Италији установили да садржај укупних фенола варира између 1,87–2,40 mg FAE g⁻¹ семена. Yu and Beta (2015), у пшеничном брашну целог семена, су утврдили да је садржај укупних фенола 169–177 mg GAE 100 g⁻¹, односно 227–237 mg FAE 100 g⁻¹. Durazzo et al. (2015) су анализирали садржај укупних фенола у водено-органичним екстрактима, у семену хлебне пшенице у Италији, и установили варирање од 165,57 до 183,75 mg 100 g⁻¹ с.м., док код старих сорти садржај укупних фенола је варирао од 149 до 175 mg 100 g⁻¹ с.м. У бројним истраживањима је констатовано варирање садржаја фенолних киселина у пшеници и то: 326–1171 µg g⁻¹ с.м. (Li et al., 2008), 200–900 µg g⁻¹ с.м. (Belobrajdic and Bird, 2013), 2,71–3,16 mg GAE g⁻¹ с.м. (Konopka et al., 2012).

Adom et al. (2002) су утврдили да је укупни садржај фенола у пшеници 7,99 ± 0,39 µmol GAE g⁻¹ у семену, док су Chlopicka et al. (2012) нашли да је укупан садржај фенола у пшеничном брашну 6,96 mg GAE g⁻¹. Okarter et al. (2010) су испитивали садржај укупних фенола у шест различитих сорти пшенице, и установили варирање вредности од 841 до 1099 µmol GAE 100 g⁻¹. Mrofu et al. (2006) су утврдили варирање садржаја фенола од 1709 до 1990 µg еквивалента ферулинске киселине по граму узорка. Mikulajova et al. (2007) у свом раду наводе да је садржај укупних фенола у опсегу 0,460–1,070 mg GAE g⁻¹.

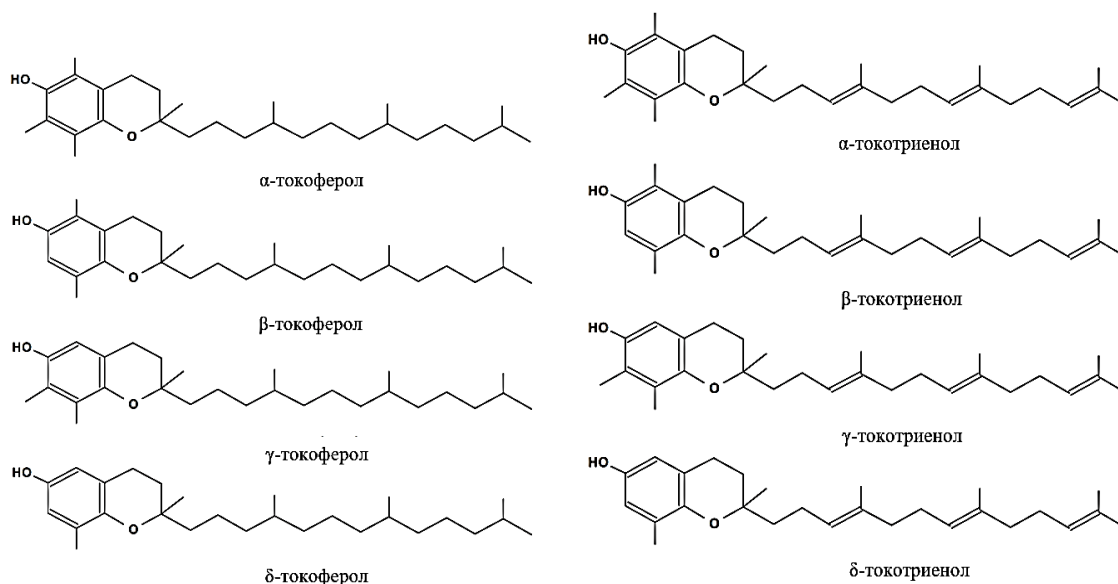
Садржај фенолних материја зависи од дела семена из којих се екстрахују и он се постепено смањује, идући од спољашњих ка унутрашњим слојевима семена. Beta et al. (2005) су нашли прогресивно смањење идући ка унутрашњим деловима семена (од 5300 до 1300 mg kg⁻¹), што потврђује наводе о локацији ових једињења у спољашњим слојевима семена пшенице. У прилог томе иде и истраживање Zhang et al. (2018) који тврде да садржај укупних фенола у спољашњем слоју семена достиже вредност 8269,97 µg GAE g⁻¹ и смањује се у унутрашњим слојевима до 4647,64 µg GAE g⁻¹ обезмашћеног семена пигментисане сорте пшенице. Фенолна једињења су углавном концентрисана у ћелијским зидовима спољашњих слојева семена, али семе чине и структурни елементи ендосперма, које смањују концентрацију укупних фенолних једињења, и у случају рафинисаног брашна њихов садржај опада (Aprodu and Vanu, 2012).

Литературни наводи указују да је садржај укупних фенола, у зависности од сорте, типа екстракције и примењеног екстракционог средства, услова чувања добијених екстраката, фенолне киселине која се користи за интерпретацију резултата, локалитета и технологије гајења, генотипа, зрелости биљке, утицаја спољашње средине, присуства/одсуства хранљивих материја у земљишту, климатских услова и услова складиштења биљног материјала. Сви ови фактори утичу на фенилпропаноидне метаболичке путеве, па самим тим и на садржај ових супстанци у биљци (Dixon and Paiva, 1995).

4.3.2. Токофероли у пшеници

Међу биоактивним компонентама у житарицама су присутни и токофероли (Lloyd et al., 2000). Витамин Е представља породицу од осам антиоксиданата, растворљивих у липидима, са два типа структуре: токофероли – α -токоферол, β -токоферол, γ -токоферол, δ -токоферол и токотриеноли – α -токотриенол, β -токотриенол, γ -токотриенол и δ -токотриенол. Иако су примарни извори токоферола биљна уља, истраживања су показала да их и житарице садрже у извесној мери (Panfili et al., 2004). С обзиром на то да житарице чине велики део исхране, оне су значајан извор токоферола за људе. Токофероли представљају здравствени бенефит, јер доводе до смањења срчаних обољења (Raederstorff et al., 2002) и смањују ризик настанка канцера дебелог црева (Malila et al., 1999), док недостатак токоферола у исхрани узрокује хемолитичку анемију или смањење покретљивости очију (Becker, 2013).

Активност витамина Е зависи од његове хемијске структуре и физиолошких фактора, али је познато да најјаче витаминско дејство има α -токоферол, а највећи антиоксидативни потенцијал има α -токотриенол (Cahoon et al., 2003; Gani et al., 2012). Раније студије су показале да токотриеноли инхибирају биосинтезу холестерола и на тај начин смањују ниво LDL - холестерола (Quereshi et al., 1986; Theriault et al., 1999). Висок унос α -токоферола смањује липидну пероксидацију и агрегацију тромбоцита, а познато је и да функционишу као снажан антиинфламаторни агенс (Singh et al., 2005).



Слика 3. Хемијска структура токоферола и токотриенола (Liu, 2007)

На ниво акумулације токоферола у житарицама утичу многобројни фактори као што су генотип, околина, примењене агротехничке мере, складиштење семена, као и

међусобна интеракција поменутих фактора (Tiwari and Cummins, 2009). Када су у питању клијанци житарица, садржај витамина Е у највећој мери зависи од врсте житарице и услова наклијавања – температура, време наклијавања, релативна влажност (Lemmens et al., 2019).

У својим истраживањима Panfili et al. (2003) наводе да се садржај токола (токоферола и токотриенола) у житарицама креће од 10,7 до 74,7 mg kg⁻¹. Код обичне/хлебне пшенице најзаступљенији токоферол и токотриенол били су и α-токоферол (14 μg g⁻¹ суве материје) и β-токотриенол (35 μg g⁻¹суве материје). Hidalgo et al. (2006) наводе да је однос токотриенол/токоферол износио 2 у корист токотриенола. Ови резултати указују да пшеница садржи више токотриенола од токоферола. Најзаступљенији токоферол у дурум пшеници (*Triticum turgidum*) је α-токоферол (10 μg g⁻¹ суве материје), најзаступљенији токотриенол је β-токотриенол (30 μg g⁻¹ суве материје), а њихов однос је 3:1 у корист токотриенола (Hidalgo et al., 2006).

У раду Tiwari and Cummins (2009) наводи се да је садржај појединачних токоферола варирао између 7 и 20 mg kg⁻¹ за α-токоферол; 2 и 10 mg kg⁻¹ за β-токоферол; 3 и 25 mg kg⁻¹ за α-токотриенол и 15 и 80 mg kg⁻¹ за β-токотриенол. Студија, која је обухватила 175 генотипова пшенице из целог света, показала је да просечан садржај токоферола и токотриенола износи 49 μg g⁻¹ с.м. (Lampri et al., 2008). Садржај витамина Е, који се састоји од токоферола и токотриенола, у семену житарица је у опсегу од 0,9–4,1 mg 100 g⁻¹ (Plaza et al., 2003; Moongngarm and Saetung, 2010; EFSA, 2015). Zielinski et al. (2001) наводе да је у целом семену садржај α-токоферола, β-токоферола, α-токотриенола и β-токотриенола износио 6,26; 4,23; 1,05; 23,68 μg g⁻¹. Jeong et al. (2017) су у свом истраживању обухватили 32 сорте пшенице у Кореји, и утврдили су садржај витамина Е у опсегу од 64,38–111,83 mg kg⁻¹, при чему је садржај α-токоферола био од 6,03–21,98 mg kg⁻¹, а β-токотриенола од 38,71–61,07 mg kg⁻¹. Конопка et al. (2012) у својим истраживањима наводе да је у пшеничном семену садржај α-токоферола износио од 13,56–15,48 μg g⁻¹; док El-Sayed et al. (2008) наводе да је пшенично семе садржало значајне количине токола са нагласком да је β-токотриенол главни (9,6–23,2 μg g⁻¹). Поред њега присутни су и α-токоферол (5,5–11,9 μg g⁻¹), β-токоферол (2,0–6,6 μg g⁻¹) и α-токотриенол (2,5–7,4 μg g⁻¹). Ови аутори истичу да садржај токола (токоферола) у семену пшенице зависи од генотипа, порекла и услова средине. Öztürk et al. (2012) су у свом истраживању пратили садржај α-токоферола у семену две сорте пшенице и њиховим клијанцима. Резултати истраживања су показали да је садржај α-токоферола у семену био 26,99 и 23,77 mg kg⁻¹, а у клијанцима су вредности достигле 54,62 и 47,19 mg kg⁻¹ (услови клијања: 9 дана при температури од 17 °C и релативној влажности од 85%). Yang et al. (2001) у својим истраживањима наводе да се садржај токоферола у клијанцима пшенице повећао 2,2 пута након 7 дана наклијавања на 16,5 °C.

4.3.3. Антиоксидативна својства пшенице

Оксидативно оштећење важних биомолекула, као што су протеини и ДНК, могу бити узрок здравствених проблема повезаних са старењем, коронарним болестима и карциногенезом (Zhou and Yu, 2004; Reuter et al., 2010.) Антиоксиданти могу модулирати ћелијски оксидативни статус и смањити ризик настанка болести (Meydani, 1999; Scheibmeir et al., 2005).

Антиоксиданти су молекули који могу донирати један електрон или водоников атом неком реактивном, слободном радикалу. Врше улогу неутрализације слободних радикала и на тај начин штите људски организам од могућих болести, али и успоравају квариње хране богате липидима (Pryor, 1991; Kinsella et al., 1993). Ако се слободни радикали не би уклањали, то би резултирало оксидационим стресом који је узрочник тешких метаболичких поремећаја (Kazazić, 2004).

Епидемиолошке студије су откриле да исхрана богата антиоксидативним једињењима има значајну улогу у пружању заштите против бројних болести, које се доводе у везу са оксидативним стресом – канцер, кардиоваскуларне и неуродегенеративне болести (Tydeman et al., 2010; Ismail et al., 2010; Kastorini et al., 2011; Ma et al., 2014).

Fardet (2010) је дао преглед неких изолованих биоактивних једињења из семена пшенице и њихових позитивних дејстава на људско здравље. У том погледу се посебно истичу полифеноли и фенолне киселине (ферулинска) који су одговорни за антиоксидативну заштиту ћелија, очување вида и срчане функције, спречавање настанка дегенеративних болести, дијабетеса типа 2, поспешење функције респираторног система и др. Истакнута је и значајна функција улоге α -токоферола у форми очувања статуса кардиоваскуларног система и карцинома панкреаса (Fardet, 2010).

Као потенцијални извори антиоксиданата истражени су воће, поврће, житарице, махунарке, зачини, биље и семена (Chan et al., 2009; Ismail et al., 2010; Chan et al., 2012). У фокусу истраживања је проналажење потенцијалних извора дневних прехранбених намирница, будући да већи део светске популације не може приуштити узимање антиоксиданата из несвакодневних, додатних, дијететских производа (Zhu et al., 2010). Интересовање за истраживањем антиоксидативног потенцијала пшенице је оправдано из разлога што представља највише конзумирану житарицу на свету и основну храну, чије се брашно користи за справљење резанаца и различитих пекарских производа, као што су хлеб, кекс и сродни производи. Ранија истраживања су показала да семе пшенице представља значајан извор природних антиоксиданата (Beta et al., 2005; Liyana-Pathirana and Shahidi, 2007; Jonnala et al., 2010; Gunenc et al., 2015). Студије су показале да различите сорте пшенице се разликују према садржају антиоксидативних компоненти (Zielinski et al., 2000; Yu et al., 2002; Martínez-Tomé et al., 2004; Yu et al., 2004), саставу биоактивних једињења као што су фенолне киселине (Abdel-Aal et al., 2001), каротеноида (Abdel-Aal et al., 2002; Abdel-Aal et al., 2007), токоферола (Zhou et al., 2004) и антоцијанина (Abdel-Aal et al., 2006). Највећа концентрација већине ових једињења је садржана у мекињама и заједно доприносе антиоксидативном потенцијалу (Iqbal et al., 2007).

У складу са истраживањима Rice-Evans et al. (1997) све фенолне киселине имају потенцијално антиоксидативно својство услед присуства ароматичног фенолног прстена. Студија Sevgi et al. (2015) је показала да, посматрајући појединачне киселине, ферулинска киселина има најјачи антиоксидативни потенцијал у поређењу са хлорогенском, кафеинском, галном, рузмаринском, кумаринском, сиригинском и ванилинском киселином.

У литератури постоје два супротна става о повезаности садржаја фенолних киселина и укупне антиоксидативне активности. Неки извештаји су показали позитивну корелацију између њих (Zielinski and Kozłowska, 2000; Kähkönen et al., 2001; Wangensteen et al., 2004), док су други показали да нема корелације (Sun and Ho, 2005; Yang et al., 2007). Међутим, Kaur and Karoor (2002) износе став да се ова појава може објаснити на основу високе антиоксидативне активности неких фенолних јединица, које могу деловати као ефикасни антиоксиданти, уместо да доприносе укупном фенолном садржају, док су Kähkönen et al. (2001) указали да укупан антиоксидативни потенцијал не зависи само од укупних фенола, већ и од других једињења као што су токофероли, каротеноиди, антоцијани, аскорбинска киселина итд. Vinson et al. (2001) и Sun and Ho. (2005) су се држали идеје да синергизам између антиоксиданата у матриксу доприноси укупном антиоксидативном потенцијалу и да антиоксидативно деловање не зависи само од концентрације појединачних антиоксиданата, већ и од структуре и интеракције међу антиоксидантима. Синергистичке интеракције између фенола и једињења попут

растворљивих угљених хидрата и протеина, такође, могу допринети повећању антиоксидативне активности (López-Perea, 2019; Xu et al., 2019).

Yu and Beta (2015) су утврдили да је антиоксидативна активност везаног (нерастворљивог) фенолног екстракта у сировом брашну износила између 755 и 832 $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ (TE –Тролокс еквивалент). Антиоксидативна активност растворљивог фенолног пшеничног екстракта, мерена DPPH-методом, износила од 127 до 139 $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ а мерена ABTS-тестом, уз 50% ацетон као екстрагенс, је износила 275–296 $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ (Yu and Beta, 2015). За брашно (необојено) вредност антиоксидативне активности је износила између 201 и 248 $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$, уз 50% ацетон као екстрагенс (Lv et al., 2012). Pasqualone et al. (2014) су установили антиоксидативни потенцијал чија вредност је варијала од 1,48 до 2,24 $\mu\text{mol TE } \text{g}^{-1}$ семена. Dey and Kuhad, (2014) су одређивали антиоксидативни потенцијал пшеничног брашна (мерен DPPH-методом), при чему је екстракција извођена у воденом купатилу при температури 30–60 °C, уз воду, 70% етанол, етанол, 70% метанол, метанол, 70% ацетон и ацетон као екстракционо средство, и добили резултате који показују да се антиоксидативни потенцијал повећавао са порастом температуре и да је био највећи при 60 °C код свих екстрагенаса. Ови аутори су утврдили да је при коришћењу 70% ацетона за екстракцију испољена најјача антиоксидативна активност (2,2 $\mu\text{mol TE } \text{g}^{-1}$ семена).

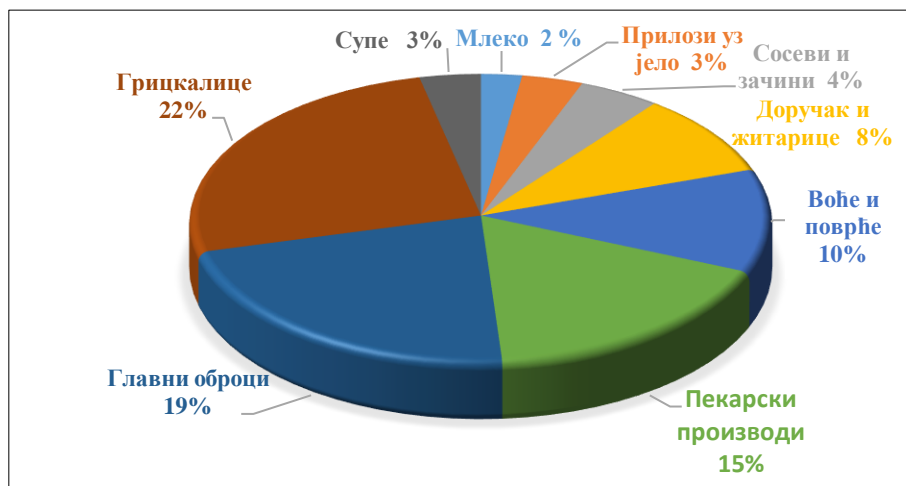
4.4. Пшенични клијанци и изданци као потенцијални извор функционалних једињења

Иако је интересовање за оваквим истраживањима новијег датума, према легенди, кинески лекари су пре више од 5000 година прописивали конзумирање проклијалих житарица за лечење неколико поремећаја. У време 1700-их година, морнари су током дугих путовања конзумирали клице како би спречили скорбут, болест условљену недостатком витамин С у исхрани. Раних четрдесетих година прошлог века др Clive McCaу, професор исхране на Универзитету Корнел у Америци и његов тим, почели су проучавати својства проклијале соје. Открили су да проклијала соја садржи висок ниво витамина А и С, а задржава сличан ниво витамина групе В (Shurtleff et al., 2009).

Упркос овим предностима, донедавно се клијало семе обично сматрало неисправним, како је назначено у Уредби Европске Уније (ЕУ) бр. 1272/2009, јер се процес клијања одвијао неконтролисано. Данас клијање семена представља добро контролисан процес са циљем развијања сигурних и здравствено безбедних проклијалих житарица, семенки и махунарки са оптималним и обогаћеним садржајем хранљивих материја.

Од 2000-те године потрошачи постају знатно заинтересованији за потенцијална хранљива својства проклијалих житарица, а као одговор на то, произвођачи хране покрећу и развијају значајан број производа који их садрже. Интересовање, за производе који садрже проклијала семена, је повећано широм света у периоду између 2006. и 2016. године. Просечно годишње повећање броја нових производа, који садрже проклијала семена пшенице, износило је 14% у периоду од 2006. до 2011. године, а просечно годишње повећање појаве оваквих производа на тржишту било је 26% у периоду од 2012. до 2016. године (www.mintel.com)

У категорији пекарских производа, појавили су се бројни производи, који садрже проклијале житарице на тржишту од јануара 2015. до априла 2017. године, међу којима је било 17 производа за кекс и слатки програм, 46 за слане бисквите и крекере и чак 84 за хлеб и сродне производе (слика 4, www.mintel.com, Pagand et al., 2017).



Слика 4. Заступљеност нових производа на светском тржишту за период јануар 2015–април 2017. који садрже клијанце по категоријама (www.mintel.com , Pagand et al., 2017)

Последњих година дошло је до пораста употребе проклијалих житарица и клијанаца у људској исхрани и повећања научних истраживања која се баве њиховим хранљивим особинама и фитохемијским садржајем (Benincasa et al., 2019). Узгајивачи развијају обојене сорте пшенице са високим садржајем антоцијанина у семену и клијанцима, и на тај начин побољшавају квалитет мељаве (Syta et al., 2018).

Поред тога, клијање семена може смањити антинутријенте попут фитинске киселине. Целовите житарице, семенке и махунарке садрже значајне количине фитата (Larsson and Sandberg, 1992), који могу формирати комплексе са витаминима и минералима, чинећи их недоступним за апсорпцију. Фитинска киселина хелатира и ниацин, чинећи га, такође, недоступним за апсорпцију у телу. Фитати испољавају посебно снажне афинитете према минералима, попут К, Fe, Mg, Ca, Zn, Cu и Mn (Nelson et al., 2013), чинећи их нерастворљивим и недоступним као хранљиве материје (Bohn et al., 2008). Једно од важнијих својстава које се везује за процес клијања је биорасположивост минерала унутар проклијалих семена у односу на неклијало семе. Током клијања део ових комплекса, који се јављају у житарицама, семену и махунаркама, се разграђује, што повећава биорасположивост микронутријената. Многе студије указују на деградацију фитата током клијања у житарицама, као што су просо (Suma et al., 2014), сирак (Tizazu et al., 2011), раж и пшеница (Centeno et al., 2001), а време клијања је у позитивној корелацији са обимом разградње фитата. Примећено је повећање разградње од 20–30% после 4 дана клијања (Afify et al., 2011), али и смањење садржаја фитата од 80–85% након 10 дана клијања семена (Azeke et al., 2011).

Клијање представља једноставан, јефтин и еколошки прихватљив поступак производње биљних намирница са функционалним својствима (Abderrahim et al., 2012). Према подацима из литературе, управо клијанци биљних врста из рода *Triticum*, због повећаног садржаја укупних полифенола и слободних фенолних киселина, могу бити корисни за развој функционалне хране (Cevallos-Casals et Cisneros-Zevallos, 2010; Benincasa et al., 2019). Установљен је утицај клијања амаранта, квиное и пшенице на полифенолни профил и антиоксидативни потенцијал (Alvarez-Jubete et al., 2010).

У истраживањима је установљено да наклијало семе представља нутритивно и функционално побољшан материјал, у поређењу са неклијалим семеном (Khattak et al., 2007). Садржај нутритивних материја се мења због активирања хидролитичких ензима који разлажу сложене молекуле скроба, полисахарида и протеина, резултирајући

повећањем једноставних шећера и аминокиселина код клијалих семена пшенице (Yang et al., 2001), јечма (Rimsten et al., 2003), пиринча (Saman et al., 2008). Услед повећаног садржаја слободних аминокиселина и редукујућих шећера, клијање може потенцијално промовисати Мајарове (Maillard) реакције (Abderrahim et al., 2012). Установљено је да клијање повећава садржај антиоксиданата, токоферола, тиамина (витамина В1), рибофлавина (витамина В2), пантотенске киселине (витамина В5), биотина (витамина В7), фолата (В9), влакана (Plaza et al., 2003; Koehler et al., 2007; Van Hung et al., 2011) и нутритивну вредност семена (Žilić i sar., 2013). Клијање условљава и стварање и повећање биоактивних компоненти, као што су аскорбинска киселина, токоферол, токотриеноли и фенолна једињења, што доводи до повећања антиоксидативне активности (Frias et al., 2005; Fernandez-Orozco et al., 2008; Oh and Rajashekar, 2009; Aguilera et al., 2013; Tarasevičienė et al., 2019).

Истраживања Liukkonen et al. (2003) су показала да је дошло до повећања садржаја фенолних једињења током клијања семена ражи на 5, 10 и 25 °C у периоду од 6 дана, с тим што је најзначајнији пораст забележен код клијања при температури од 25 °C. Ово се објашњава тиме да клијање индукује синтезу или активацију хидролитичких ензима у клијалом семену, што резултира структурним модификацијама и синтезом једињења високе биолошке и нутритивне вредности (Kaukovirta-Norja et al., 2004; Bondia-Pons et al., 2009). Истраживања су показала да је садржај укупних флавоноида, фенола и антиоксидативна активност значајно већи у клијанцима пшенице у односу на пшенично семе (Syta et al., 2018). Спроведена истраживања промене у садржају фенолних једињења и антиоксидативне активности код три сорте пшенице током клијања на 15, 20 и 25 °C у мраку, су показала да је највећи садржај укупних фенола и да су најјачу антиоксидативну активност имали клијанци наклијавани при 20 °C. Најмањи садржај укупних фенола су имала семена све три сорте пре клијања и тај садржај се кретао између 10 и 12 mg GAE g⁻¹ суве материје. Сличан садржај је нађен и након 2 дана клијања, а након 8 дана је износио око 18 mg GAE g⁻¹ суве материје (Dziki et al., 2015).

Benincasa et al. (2020) су изучавали утицај различите светлости на клијанце пшенице (наклијавање три дана у мраку и два дана светлости) и наводе да је садржај укупних фенола при (SUN) светлости у клијанцима *T. monococtum* L. ssp. *monococtum*, cv. Monlis био 24,4 mg GAE g⁻¹ с.м., а у *T. turgidum* L. ssp. *dicocctum*, (Schränk ex Schubler) Thell., cv. Zefiro био 18,1 mg GAE g⁻¹ с.м., док је садржај флавоноида био 15,8 и 12,2 mg GAE g⁻¹ с.м. (све изражено mg GAE g⁻¹). У зависности од примењене светлости, они наводе да је садржај укупних фенола износио од 15,8 до 26,5 mg GAE g⁻¹ с.м., док је садржај укупних флавоноида био од 10,6 до 20,9 mg GAE g⁻¹ с.м. (за анализу нису одвајали клијанце од остатка који остаје након наклијавања, већ су користили сав материјал).

Повећање укупног фенолног садржаја, па према томе и антиоксидативне активности у клијанцима хлебне пшенице, утврђено је и у истраживањима Falcioni et al. (2002) и Alvarez-Jubete et al. (2010). Позитивни ефекти клијања на антиоксидативну активност се наводе у истраживањима Feng et al. (2018), који даље закључују да антиоксидативност зависи од дужине клијања. Повећање антиоксидативне активности је једно од неколико метаболичких промена, које се дешавају при клијању, услед активности ендогених хидролизних ензима (Kim et al., 2004).

У истраживању Hung et al. (2011) DPPH способност уклањања слободних радикала у првих 6 сати клијања се смањивала, а након тога повећавала, са повећањем времена клијања. Ово је последица промене у саставу и количини слободних и везаних фенола, као и чињенице да се током клијања повећава садржај и витамина С и токоферола, што би такође могло утицати на повећање антиоксидативне активности (Yang et al., 2001). У истраживањима је нађено да су фитохемијски састав, антиоксидативна активност (DPPH

и ABTS) и садржај фенола знатно већи у тродневним клијанцима, у поређењу са семеном (Ravikumar et al., 2014).

Сумарно, промене у семену које се дешавају током клијања делом су приказане у резултатима Nelson et al. (2013). Они указују да том приликом долази до повећања садржаја шећера, протеина, укупних фенола, ферулинске и сирингинске киселине, антиоксидативне активности, садржаја Mg, Fe, Cu, Zn, K, Na, витамина C, тиамина, рибофлавиона, γ -токоферол, α -токоферол након 96 h, а смањује се садржај скроба, α -токоферол до 96 h, Fe, Ca и Mn.

Постоји велики број фактора који утичу на промене у току клијања и садржај биоактивних материја у клијанцима. Неки од фактора, као што су температура и светлост, могу се посматрати и као стресни фактори при процесу наклијавања. Температура је један од главних услова процеса клијања и један од абиотичких фактора, који може регулисати биосинтезу фенола. Познато је да биљке производе полифенолна једињења кроз фенилпропаноидни пут, као реакцију на стрес изазван спољашњим окружењем или неким изазивачем – биотички и абиотички фактори (Kim et al., 2006). Светлост, такође, представља веома важан фактор који утиче на раст и развој биљака. Фоторецептивни системи биљака реагују на интензитет и трајање светлости, утичући, на тај начин, на морфогенетске промене код биљака, функционисање фотосинтетског апарата и тренд метаболичких путева. Услови осветљења могу иницирати фотооксидативне промене у биљкама, што условљава промењено деловање антиоксидативног одбрамбеног система (Benincasa et al. 2019). У истраживањима у којима се пореди садржај фенолних једињења у клијанцима слатког кукуруза, добијених наклијавањем са и без светлости, је установљено да је светлост стимулисала стварање фенолних киселина и имала позитиван утицај на нутритивне вредности, док је код култивације у мраку то било значајно спорије (Xiang et al., 2017). Изучавање утицаја светлосних диода различитих таласних дужина на клијање грашка, је показало да је у поређењу са клијањем у мраку, клијање уз светлост довело до значајног повећања укупних фенола, флавоноида и антиоксидативне активности (Liu et al., 2016). Ово би се могло довести у везу са регулацијом неких структурних гена који су укључени у биосинтезу секундарних метаболита под светлошћу унутар светло/тамног режима, у поређењу са наклијавањем у тамном режиму (Liu et al., 2016).

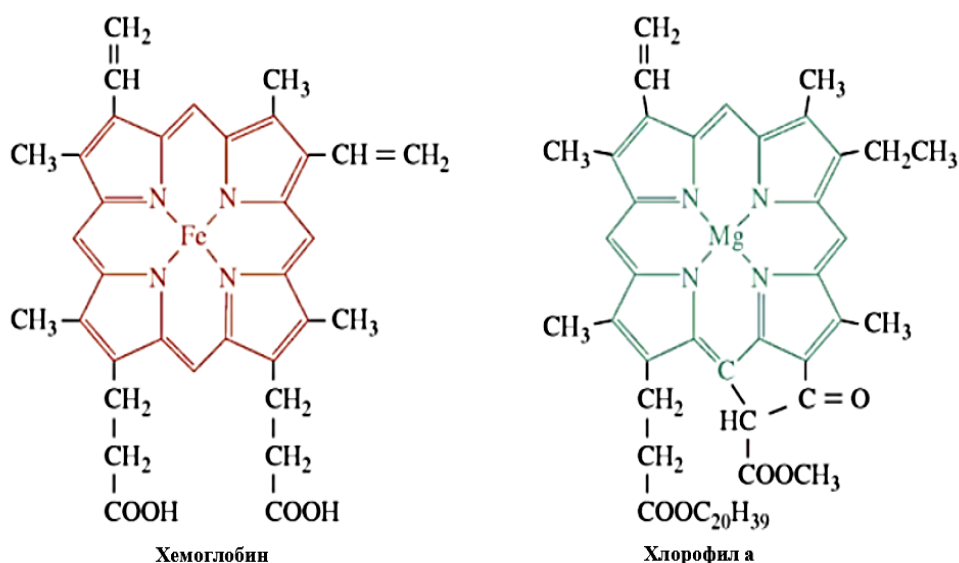
Поред режима наклијавања, важан фактор представља начин сушења биљног материјала. Највећи садржај укупних фенола констатовани су у узорцима биљног материјала који су сушени лиофилизацијом, а као разлог наводе ограничену термичку и хемијску разградњу, јер се процес изводи при ниским температурама (Karaman et al., 2014). Сличне резултате наводе и Chou and Chua (2001). Леофилизација, као метод сушења, побољшава екстракцију фенолних једињења из биљног материјала, јер формиран кристали леда унутар матрикса узорка, могу да разоре ћелијску структуру, и тако омогуће приступ растварачу, чиме се побољшава екстракција ћелијских компоненти (Goulas and Manganaris, 2012). Леофилизација, ослобађа везана фитохемијска једињења чинећи их приступачним екстракцији (Devic et al., 2010). Сличне закључке дају и Calín-Sánchez et al. (2013) који указују на већу укупну концентрацију фенола код биљног материјала сушеног смрзавањем. Управо због тога се лиофилизација препоручује за сушење материјала који садрже термички осетљиве антиоксидативне компоненте попут токоферола, аскорбинске киселине, каротена и биљних фенола. Насупрот томе, сушење топлим ваздухом, у поређењу са лиофилизацијом, подстиче оксидацију и кондензацију фенолних једињења (Asami et al., 2003). Литературни наводи указују на негативне ефекте (недостатке) сушења топлим ваздухом – ензимска активност полифенолоксидаза је висока на температури сушења од 55 °C док је ензимска активност умерена тек изнад 75 °C (полифенолоксидаза утиче на деградацију хидроксицинаминских киселина током

сушења топлим ваздухом). Devic et al. (2010) наводе да хидроксицинаминске киселине бивају слабије очуване током сушења топлим ваздухом. Конвенционалне методе, које користе високе температуре дехидратације биљног материјала, узрокују драматичан губитак и фенолних једињења и антиоксидативног потенцијала, који достиже и до 60%, тврде Orphanides et al. (2013).

4.5. Млади изданци – пшенична трава

Постоји растући интерес од стране потрошача за младим изданцима различитог ароматичног биља, поврћа и житарица који се конзумирају у фази котиледона и непотпуно развијених првих правих листова (Di Gioia and Santamaria, 2015; Pinto et al., 2015). Млади изданци (engl. Microgreens) се разликују од клијанаца (engl. sprouts) и младих биљака (engl. baby leaf) (Treadwell et al., 2010; Toth i sar., 2012). Клијанци се производе намакањем у води, и производни циклус траје од 2 до 7 дана, док је у случају младих изданака период узгајања од 7 до 21 дан од клијања (Di Gioia and Santamaria, 2015). Иако нема ботаничког термина који тачно дефинише шта су млади изданци, аутори их углавном слично описују. Xiao et al. (2012) наводе да су млади изданци незреле биљке нежне структуре, узгајане из семена поврћа, житарица, лековитих, ароматичних и јестивих биљака. Биљке које се најчешће узгајају и комерцијално употребљавају у облику младих изданака припадају породицама: Alliaceae (*Allium cepa* L. var. *Cepa.*, *Allium schoenoprasum* L.); Apiaceae (*Anethum graveolens* L. var. *hortorum* Alef., *Coriandrum sativum* L.); Asteraceae (*Helianthus annuus* L.); Brassicaceae (*Brassica olearacea* L. var. *italica* Plenck., *Brassica oleracea* L. var. *Capitata*, *Brassica oleracea* L. var. *Sabauda.*, *Nasturtium officinale* R. Brown. *Raphanus sativus* L. var. *Sativus.*, *Eruca sativa* Miller., *Brassica juncea* L.); Chenopodiaceae (*Beta vulgaris* L. ssp. *Vulgaris.*, *Beta vulgaris* var. *Conditiva.*, *Spinacea oleracea* L.); Fabaceae (*Phaseolus vulgaris* L. ssp. *Vulgaris.*, *Pisum sativum* L. ssp. *Sativum.*, *Lens culinaris* Medicus., *Cicer arietinum* L., *Trigonella foenum-graecum* L.); Lamiaceae (*Ocimum basilicum* L.); **Poaceae** (*Zea mays* L., ***Triticum aestivum*** L., *Hordeum vulgare* L., *Avena sativa* L.). Њихов значај се приписује високом садржају биоактивних једињења као што су полифеноли, каротеноиди, витамини (Di Gioia and Santamaria, 2015; Mir et al., 2016), док се због штетног утицаја алкалоида биљке из породице Solanaceae не конзумирају у облику младих изданака (Lešić i sar., 2004; Parađiković, 2009; Di Gioia and Santamaria, 2015).

Млади изданци житарица као што су пшеница, раж, јечам и овас, због богатог садржаја витамина и различитих фитохемијских једињења, чине саставни део функционалних пића (Gruenwald, 2009). Сок од пшеничне траве коришћен је као промотер људског здравља од стране Ann Wigmore, оснивача Института за здравље у Бостону (Wigmore, 1985). Због високог садржаја хлорофила (70%) познат је као зелена крв „green blood“ (Padalia et al., 2010). Хлорофил, због хемијске структуре која је слична хемоглобину, делује као његов супституент и препоручљив је у случају клиничких стања као што су таласемија и хемолитичка анемија (Marwaha et al., 2004; Padalia et al., 2010). Синергистичко деловање хлорофила и ензима као што су супероксид-дисмутаза и цитохром-оксидаза, биљних хормона/абсцисинска киселина има антиканцерогену функцију (Pokhrel, 1999; Jed et al., 2005; Wangcharoen and Phimphilai, 2016). Ензими играју кључну улогу у антиканцерогеном, а витамини у антиалергијском и антиасматском третману, сматрају Padalia et al. (2010).



Слика 5. Хемијска структура хемоглобина и хлорофила *a*

Након дугог истраживања, спроведеног од стране бројних научника од 1930 године, за пшеничну траву се сматрало да је најбоља храна од свих трава (Mishra et al., 2011). То је једна од намирница која је укључена у категорију „зелене хране“ и сматрана природним извором хранљивих састојака (Mishra et al., 2011). Пшенична трава је значајан извор витамина А, С, Е, К, витамина В-комплекса, ниацина, као и витамина В-17, познатог као амигдалин (Payal et al., 2015). Пшенична трава је богат извор протеина, а садржи и аминокиселине попут аланина, аргинина, глицина, леуцина, цистеина, триптофана, треонина, глутаминске киселине, лизина, хистидина, фенилаланина, метионина, аспарагинске киселине, валина, пролина и тирозина. Од великог броја аминокиселина које садржи, осам је есенцијалних (Pallavi et al., 2016). Ако се упореди са семеном пшенице, сви ови конституенти, изузев угљених хидрата, присутни су у већој мери у пшеничној трави. Пшенична трава се користи у европским земљама, Индији и САД у облику пшеничног сока или таблета. Оба облика представљају извор минерала, ензима, хлорофила, витамина и аминокиселина (Padalia et al., 2010; Aydos et al., 2011). Ефикасна је против гојазности, високог крвног притиска, дијабетеса, астме, чира, гастритиса и ексама (Shah et al., 2011). Користи се у лечењу анемије, умора, проблема са јетром и панкреасом (Rajoria et al., 2016). Пшенични изданци/младе биљке, познате и као „wheatgrass“ старости једне до две недеље, представљају алтернативу у исхрани људи (Benincasa et al., 2015).

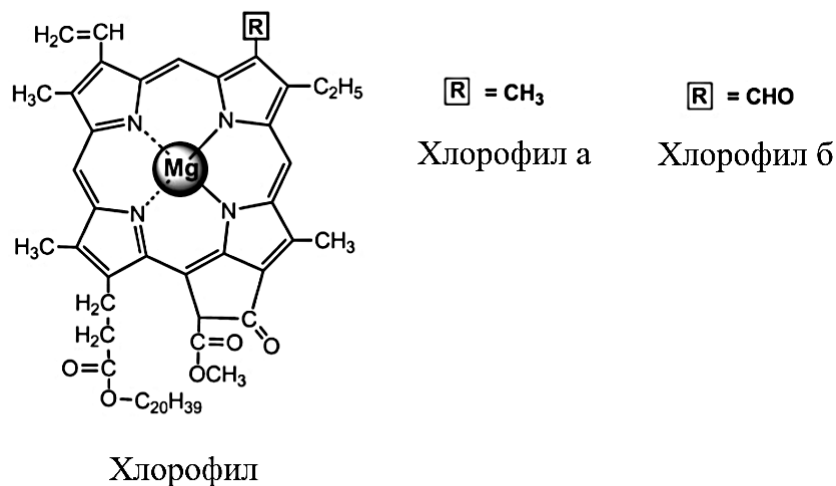
Своју јаку антиоксидативну активност, пшенична трава дугује присуству фенолних киселина и флавоноида у узорцима (Sun et al., 2014; Zendeabad et al., 2014; Akbas et al., 2017). Биофлавоноиди у пшеничној трави: апигенин, кверцетин и лутеолин су значајни у детоксикацији организма (Wangcharoen and Phimphilai, 2016). Главне фенолне киселине присутне у пшеничној трави су ферулинска, гална, кофеинска, сиригинска и кумаринска (Kardas and Durucasu, 2014; Benincasa et al., 2015). Садржај и састав биоактивних једињења у изданцима/младој биљци зависе од многих фактора, као што су генотип, стадијум раста, услови клијања и услови раста младе биљке (Cevallos-Casals and Cisneros-Zevallos, 2010). Суша, светлост, заслаћеност и мраз представљају абиотички стрес (Lim et al., 2007; Oh and Rajashekar, 2009), због којег биљке акумулирају различита фитохемијска једињења, које имају важну улогу у прилагођавању биљака неповољним условима раста (Guo and Beta, 2013; Yuan et al., 2018).

Ове особине пшеничне траве, као и пожељне нутритивне вредности, могле би се искористити у циљу побољшања хранљиве вредности и текстуре хлеба, кекса и сродних производа пекарске индустрије, па се зато и препоручује њено мешање са пшеничним брашном (Ranhotra et al., 1977; Morad and Rubenthaler, 1983). Употребом пшеничне траве, као природног конзерванса хране, смањили би се негативни ефекти по здравље људи, повезани са употребом синтетичких конзерванаса хране (Kardas and Durucasu, 2014).

Такође, употреба пшеничне траве има позитивне ефекте на људско здравље, јер доприноси детоксикацији јетре и делује антибактеријски (Payal et al., 2015; Deshwal and Deepshikha, 2018).

4.5.1. Фотосинтетички пигменти у пшеничној трави

Фотосинтеза представља основни процес у природи којим биљке, алге и неке бактерије, уз помоћ сунчеве енергије и фотосинтетичких пигмената, стварају органску материју за остале живе организме. У групу фотосинтетичких пигмената убрајају се хлорофили и каротеноиди. Хлорофили су пигменти заслужни за зелену боју биљака и имају значајну улогу у апсорпцији и преносу светлосне енергије у току фотосинтезе (Willows, 2004). По хемијској структури, хлорофили се убрајају у групу тетрапирила, и карактерише их присуство атома Mg у средишњем делу молекула и додатни изоциклични прстен (Willows, 2004). Хлорофили a и b су хемијски сродни облици (слика 6), при чему је хлорофил a модрозелен, док је хлорофил b жутозелен и налазе се у квантитативном односу 3:1 у корист хлорофила a. Хлорофил a је примарни фотосинтетички пигмент, јер омогућава претварање светлосне у хемијску енергију, док у секундарне метаболите, због њихове помоћне и заштитне улоге, спадају други фотосинтетички пигменти (Taiz and Zeiger, 1998). Хлорофилу се приписују антимутагена и антиоксидативна својства јер путем механизма, у којим представљају донор водоника, могу прекидати реакције радикала које су узроковане аутооксидацијом (Ferruzzi et al., 2002).



Слика 6. Хемијска структура хлорофила a и хлорофила b

Садржај хлорофила у пшеничној трави зависи од примењених агрономских мера, додавања азота, али и од времена узорковања током вегетационог периода. Jhanji et al. (2017) су утврдили да се садржај хлорофила у пшеничном листу креће од 1,61–2,45 mg g⁻¹ свежег биљног материјала, док нешто ниже вредности за садржај хлорофила наводи Karele (2001) – 0,31 до 0,54 mg g⁻¹ свежег биљног материјала. Садржај хлорофила у

пшеничној трави висине 10–12 инча је 279 до 323 mg 100 g⁻¹ праха (Singh, 2016). У поређењу са броколијем (10 mg 100 g⁻¹ свеже масе), пшенична трава садржи вишеструко већи садржај хлорофила – 80 mg 100 g⁻¹ свежег биљног материјала (Wakeham, 2013).

4.6. Ултразвучна екстракција

Конвенционалне технике екстракције не захтевају сложена опрема, али су дуготрајне, недовољно селективне за циљане биоактивне компоненте и имају негативан утицај на животну средину (Nyiredy, 2004). Данас се све више развијају и примењују алтернативни екстракциони поступци (Karabegović et al., 2011), да би се остварио већи принос и квалитет производа, што је и крајњи циљ сваке екстракције, односно боље искоришћење биоактивних једињења из полазног матрикса и већи принос екстракта. То се управо постиже употребом савремених екстракционих поступака, као што су ултразвучна екстракција (ultrasound assisted extraction – UAE), микроталасна екстракција, екстракција флуидима под притиском и екстракција субкритичном водом (Wang and Weller, 2006).

Ултразвучна екстракција подразумева употребу ултразвука са фреквенцијама од 20 до 2000 kHz. Она представља новију екстракциону технику, чије се предности, у односу на класичне екстракционе технике, огледају у смањеној потрошњи растварача, мањој деградацији продуката и повећаном учинку екстракције. У поређењу са осталим савременим методама, њена предност се огледа и у мањим трошковима опреме и могућности коришћења растварача познатих као „food grade solvents“, као што су вода и етанол. У поређењу са конвенционалним методама, UAE значајно скраћује време екстракције полифенолних једињења (Tabaraki and Nateghi, 2011; Roselló-Soto et al., 2015), што је важно у индустријској производњи екстракта који могу имати примену како у прехранбеној, тако и у фармацеутској индустрији. Успешност UAE се приписује ефектима кавитације, услед проласка ултразвучних таласа кроз медијум. Као резултат тога долази до наизменичних компресија и декомпресија молекула, формирања мехурића гаса (Luque-Garcia and De Castro, 2003), до бржег разарања ћелијских зидова матрикса, што резултира лакшим продирањем растварача и повећањем контактне површине између чврсте и течне фазе. Ово је значајна разлика у поређењу са, на пример, мацерацијом која се одвија по механизму дифузије кроз ћелијске зидове и захтева дуже време екстракције (Vinatoru et al., 1997; Vinatoru, 2001).

У својим радовима бројни истраживачи наводе да се у случају коришћења ултразвука повећава екстракција полифенола и антоцијана (Springett, 2001), ароматичних материја (Vinatoru, 2001) и уља (Chemat et al., 2017). Такође, предност ултразвучне екстракције фенолних киселина из мандарина (*Citrus unshiu* Marc), флавоноида из каучука (*Folium eucommia*), хетероксилана богатих фенолима из житног брашна (*Triticum aestivum*), хесперидина и укупних фенолних компоненти из мандарина (*Citrus reticulata*) наводе Khan et al. (2010).

Ултразвучну екстракцију треба оптимизирати подешавањем фактора као што су: фреквенција, снага ултразвука, време трајања екстракције, температура и избор растварача.

4.6.1. Одабир растварача за ултразвучну екстракцију

Поред одабира методе екстракције, веома је важно одабрати и тип растварача за екстракцију (Hammer et al., 1999). Биљни материјал представља сложену смешу различитих класа биоактивних једињења. Отуда се избор најбољег растварача за екстракцију биоактивних једињења базира на хемијском саставу и поларности циљаних компонената екстракције. Током екстракције растварач дифундује у чврсти биљни материјал и раствара компоненте истог поларитета. Биљни материјал, растварач и начин екстракције имају синергистички ефекат на добијени екстракт, екстракцију и раздвајање активних од неактивних компоненти. Количина и састав секундарних метаболита у добијеном екстракту зависе од типа растварача, његове поларности и концентрације.

За екстракцију биоактивних једињења са антиоксидативним својствима препоручују се вода, етанол, ацетон, метанол, етил-ацетат и њихови водени раствори (Hayat et al., 2009; Karacabey and Mazza, 2010). Иако је вода, пре свега, јефтин и нетоксичан растварач, њен недостатак као растварача у екстракцији се огледа у чињеници да се у добијеним екстрактима у великом уделу налазе и примесе нечистоћа које ометају како идентификацију, тако и квантификацију испитиваних биоактивних једињења (Rafiee et al., 2011). Предност етанола и етанолно-водених раствора је у високом приносу екстракције и зато су врло чести екстрагенци у прехранбеној и фармацеутској индустрији. Одликује их низак ниво токсичности и минималан утицај на здравље људи. Поред тога, етанол се може добити ферментацијом из различитих биоресурса, па је и еколошки и економски прихватљив (Pérez-Serradilla and De Castro, 2011; Li et al., 2012). И ацетон има предности као екстрагенс и сматра се једним од бољих, углавном због способности извлачења једињења широког спектра (Martini and Eloff, 1998; Kotze and Eloff, 2002), ниске токсичности за системе биолошког испитивања (Eloff et al., 2007) и лаког уклањања из екстраката.

Иако се традиционално за екстракцију може користити вода, бољу антимицробну активност показују екстракти добијени употребом органских растварача. Полифенолна једињења и већина других биоактивних компоненти се растварају у поларним растварањима. За испитивање антимицробне активности биљних компонената најчешће се користе следећи растварачи: метанол, етанол, ацетон и вода, а неки истраживачи користе мешавине растварача у различитим односима.

Када је у питању екстракција биоактивних компоненти из житарица, познато је да се полифенолна једињења, присутна у житарицама, налазе у слободном или у естерификованом облику, као и у везаном облику са састојцима ћелијских зидова, полисахаридима, протеинима или лигнанима (Clifford., 1999; Adom and Liu, 2002; Nackz and Shahidi, 2004; Arranz and Calixto, 2010). Везане форме полифенола могу се ослободити киселом или алкалном хидролизом (Delgrado-Andrade et al., 2010). Екстракција полифенолних једињења из житарица се најчешће врши помоћу поларних органских једињења или њихових водених смеша - етанол, метанол, ацетон (Adom and Liu, 2002; Arranz and Calixto, 2010; Ryan et al., 2011; Durazzo et al., 2015; Đurović et al., 2018). Воду као растварач у екстракцији полифенолних једињења из житарица у својим истраживањима су користили Vaublis et al. (2000), Zielinski and Troszynska (2000), а 70% метанол и 50% ацетон – Zhou and Yu (2004), 80% метанол – Zielinski and Kozłowska (2000), 70% етанол – Zhou and Yu (2004), 80% етанол – Zieliński and Kozłowska (2000), Adom and Liu (2002), 95% етанол – Onyeneho and Hettiarachcru (1992), апсолутни етанол – Yu et al. (2002), Zhou and Yu (2004).

У анализама садржаја фенола у целом семену пшенице и пшеничним мекињама, у којима су коришћени различити растварачи (50% ацетон, 70% метанол и 70% етанол), установљено је да је 50% ацетон био најефикаснији екстрагенс и да између 70% етанола

и 70% метанола није било статистички значајне разлике у садржају екстрахованих фенола (Abozed et al., 2014). Потврда да је 50% ацетон најбољи екстрагенс за екстракцију фенола и антиоксидативне активности у пшеничним мекињама се наводи у истраживањима (Zhou and Yu, 2004), док су најмању ефикасност у екстракцији фенолних једињења испољили апсолутни етанол и ацетон (López-Perea et al., 2019). У истраживањима је утврђено да је за екстракцију фенолних једињења из производа пшеничне мељаве редослед у ефикасности издвајања екстрактивних компоненти био: вода > метанол > етанол > ацетон (Smuda et al., 2018). Међутим, овај редослед се није могао приписати на екстракцију из производа мељаве пиринча и кукуруза.

Испитивањем утицаја растварача (вода, 70% етанол, етанол, 70% метанол, метанол, 70% ацетон и ацетон) на садржај укупних фенола у пшеници, при екстракцији у воденом купатилу на 30–60 °С, установљено је да је најефикасније екстракционо средство 70% ацетон са којим је укупна количина екстрахованих фенола износила 1,1 mg GAE g⁻¹ обезмасћеног семена (Dey and Kuhad, 2014).

У анализама садржаја укупних фенола у фракцијама млевења пшенице (клица и мекиње), у којима је као екстракционо средство коришћена дестилована вода, етанол, метанол и ацетон је установљено да је најмањи садржај укупних фенола био у ацетонским екстрактима поменутих фракција. Редослед ефикасности растварача био је следећи: дестилована вода > метанол > етанол > ацетон (Smuda et al., 2018). Нађена је највећа количина фенолних једињења екстрахованих помоћу 70% ацетона из семена јечма (Liu and Yao, 2007), док се у другим истраживањима наводи да је најбољи екстрагенс семена јечма 70% етанол (Djordjevic i sar., 2011).

У истраживању за изоловање фенолних једињења и антиоксидативне активности пшеничних мекиња у којима је примењен: метанол, 80% метанол, етанол, 80% етанола и 50% ацетон, утврђено је да је 80% етанол показао највећу, а апсолутни етанол – најмању ефикасност (López-Perea, 2019). Ови аутори тврде да је 50% ацетон био најефикаснији у издвајању фенолних једињења из јечмене љуске, при чему је био и најефикаснији у издвајању кофеинске и *p*-кумаринске киселине, док су гална и ферулинска киселина екстраховане свим растварачима са истом ефикасношћу.

Ефикасност екстракције зависи од поларности одређених фенолних једињења присутних у испитиваном узорку. Нису сва једињења подједнако ефикасно екстрахована органским растварачима, а додавање воде у растварач ствара средњу поларност која олакшава екстракцију и других компоненти растворљивих у органским растварачима и/или у води, у поређењу са апсолутним растварачима (Do et al., 2014). Додавање воде у коришћени растварач омогућава већу ефикасност екстракције биоактивних једињења, што је потврђено у истраживањима López-Perea et al. (2019). Ту склоност повезују са стереохемијом фенола, поларним и неполарним фрагментима унутар молекула, као и интермолекуларним силама водоничних веза које настају између фенолних једињења и растварача (Galanakis et al., 2013). Универзалан растварач који би могао екстраховати све класе фенолних једињења из узорка не постоји, тврде Mokrani and Madani (2016).

Повећање концентрације етанола до одређеног нивоа у етанолно-воденим смешама, доводи до повећања екстракције фенолних једињења.

И вода и етанол лако продиру у ћелије биљног материјала и реагују са протеинима везаним за полифеноле, али већа концентрација етанола може довести до денатурације протеина, и тиме до спречавања (ономогућавања) растварања полифенола. Повећањем удела воде, поларност бинарне смеше воде и етанола расте, а с обзиром на то да су и феноли поларна једињења, њихова концентрација у добијеним екстрактима се повећава.

Истраживања су показала да су екстракти купине, добијени екстракцијом 50% ацетоном, дали највећи садржај фенола, док је код јагода иста ефикасност постигнута применом 50% и 70% ацетона (Boeing et al., 2014). Водени раствор 50% етанола се

показао као најпогоднији екстрагенс при ултразвучној екстракцији полифенолних једињења и из плода ароније и остатака након њене прераде (D'Alessandro et al., 2012, 2014). Утврђено је да се количина екстрахованих полифенолних једињења из плодова црне рибизле повећава са повећањем концентрације етанола до 60%. Даљим повећањем концентрације етанола количина екстрахованих полифенолних једињења се смањује (Casace and Mazza, 2003). Сличне промене су забележене и у екстрактима зеленог чаја (Pan et al., 2003), боровнице (Routray and Orsat, 2014) и листова биљке *Myrtus communis* L. (Dahmoune et al., 2015).

У истраживањима се наводи да је и за екстракцију укупних фенола и флавоноида из две сорте папаје, редослед у ефикасности екстрагенаса био следећи: 50% раствори етанола, ацетона и метанола су се показали као ефикаснији од 70%, а они од 100% етанола, ацетона и метанола, тј. са повећањем концентрације чистог растварача ефикасност у екстракцији је била мања (Addai et al., 2013).

Утврђено је да је варирање садржаја полифенола у екстрактима, добијеним применом различитих растварача, у зависности од поларитета употребљеног растварача и да су водени растварачи ефикаснији у екстракцији слободних фенолних једињења, у поређењу са њиховим одговарајућим апсолутним растварачима, монокомпонентним системима (Singh et al., 2012).

Физичке карактеристике растварача значајно утичу на укупан принос свих класа фенолних једињења. Претпоставља се да се разлике у приносима екстракције фенолних једињења могу објаснити различитим диелектричним константама (ϵ) растварача ($\epsilon = 80,1$ – вода; $\epsilon = 20,7$ – ацетон; $\epsilon = 24,5$ – етанол), као и различитим поларитетима употребљених растварача (вода = 1; ацетон = 0,355; етанол = 0,654). Присуство воде повећава поларност екстракционог средства и утиче на бубрење биљног материјала, што повећава контактну површину између чврсте и течне фазе, тј. биљног материјала и растварача, што може резултирати различитим приносима екстракције фенолних једињења. Ови налази потврђују да екстрагенс има важну улогу у екстрабилности фенолних једињења из различитих материјала и да сваки материјал има најпогоднији растварач за екстракцију укупних фенола, тј. не постоји универзалан екстрагенс (Dailey et al., 2015).

4.7. Садржај макро- и микроелемената у биљном материјалу

Многи елементи, присутни у малим количинама, чак и у траговима имају значајну улогу у метаболичким процесима и неопходни су за опште добро људи. Неки од суштинских елемената су Ca, K, Na, Mg, Fe, Mn, P, Zn, Cr, Cu, F, Se, Mo. Они се налазе у саставу различитих једињења или комплекса у телу. И у вишку и у мањку могу пореметити нормалне биохемијске функције у организму. Елементи Cu, Fe, Zn, Mn, Mo, Ni спадају у есенцијалне елементе, а њихова најважнија улога је структурна, јер улазе у састав ензима и делују као ензимски активатори.

Људима су у исхрани, за одржавање оптималних физиолошких функција, потребна најмање 22 минерала, међутим, процењује се да светска популација оскудева у Fe (60%), Zn (30%) као и Ca, Mg итд. (Martinez-Ballesta et al., 2009). Минерали попут N, K, P, Ca, Mg, S, K су људима неопходни. Недостатак појединих елемената у исхрани је потребно надокнадити, што се најчешће постиже употребом цитрусног воћа, банана, грожђа, клица и клијанаца житарица (Plaza et al., 2003; Benincasa et al., 2019).

Мањак Ca може довести до рахитиса, а он се сматра и кофактором у ензимским реакцијама и укључен је у одржавање минералне хомеостазе (Strain and Cashman, 2009). Потребне за Ca се могу задовољити повећањем уноса Ca са храном (Lobo et al., 2010), а препоручени дневни унос Ca је између 300 mg за новорођенчад и 1300 mg за адолесценте

и одрасле. Улога Mg је у регулацији функционисања глатких мишића, кофактор за око 300 ензима, а чијим се оптималним уносом може спречити дијабетес и хипертензија (Strain and Cashman, 2009). Препоручени дневни унос Mg је између 200–400 mg (<http://www.anyvitamins.com/rda.htm>). Значај K је у одржавању електролитне и осмотске равнотеже, са препорученим уносом од 3500 mg/дан (Strain and Cashman, 2009; <http://www.anyvitamins.com/rda.htm>). Fe је есенцијални елемент, нарочито због учешћа у структури хемоглобина и ензима, као што су цитохроми; важан је део ланца преноса електрона, а препоручени унос је између 8 до 18 mg/дан (Lobo et al., 2010). Улога Mn је значајна јер је кофактор за ензиме као што је супероксид-дисмутаза или аргиназа и активатор осталих ензима, док су потребе за њим око 2 mg/дан (Strain and Cashman, 2009; Lobo et al., 2010).

Fardet (2010) наводи следећа потенцијална дејства минерала на људско здравље: Fe утиче на физичко и ментално здравље; Mg на здравље имуног система, мускулатуру; Zn има имунопротективно дејство; Cu утиче на функционисање мозга и ментално здравље – дисфункције централног нервног система, а има и утицај на здравље костију, тетива и хрскавица – остеоартритис, као и користан утицај код лечења карцинома; P има позитивно дејство на здравље костију – код остеопорозе, зуба, функционисање мозга и ментално здравље, у очувању здравља срца и бубрега, на варење и раст; Ca има утицај на здравље костију и зуба, протективно дејство код гастро- и колоректалног карцинома, на здравље срца – код хипертензије и срчаног удара, на нервни систем и ментално здравље – инсомнија и стрес, на дијабетес и регулацију телесне масе. Na има утицаја на регулацију крвног притиска и воде у организму и на нервни систем, а K испољава кардио-протективни ефекат и има утицај на функције нервног система, остеоартритис и остеопорозу, ублажава артеријску хипертензију и има антидијабетски ефекат (Fardet, 2010). Mn има позитивно дејство код васкуларне склерозе и утиче на формирање костију, на пример код остеопорозе и има „anti-aging“ ефекат тј. ефекат успоравања старења, неопходан је за раст костију, развој нервног система, функционисање различитих хормона (Santamaria, 2008). Осим тога, значајан је као елемент који се налази у структури антиоксидативног ензима супероксид-дисмутазе (SOD, MnSOD), па отуда и његова улога у борби са слободним радикалима. Zn активира или улази у састав неких ензима (карбоанхидраза, супероксиддисмутаза, алкална фосфатаза, протеиназа, пептидаза и др.) и тако, посредно или непосредно, има вишеструку улогу у животу биљака, а његов недостатак изазива промене, како у промету материја у биљкама, тако и у морфолошкој и анатомској грађи. Zn је неопходан за биосинтезу ауксина, у ћелијској деоби, у синтези генетичког материјала. Zn учествује у више од 200 ензимских реакција у организму. Чини део ензима бакар-цинк супероксиддисмутаза (Cu/Zn SOD) и помаже у ћелијској заштити од деловања слободних радикала (Plum et al., 2010).

Са нутриционистичког становишта, пажња је углавном усмерена на битне елементе као што су Fe, K, Ca, Zn (Kashian and Fathivand, 2015; Jākobsone et al., 2015), а врло важно питање је и сигурност хране, јер је конзумирање хране идентификовано као главни пут изложености људи контаминентима из окружења. Микронутријенти могу постати штетни ако су њихове стопе уноса превисоке, а елементи у траговима, као што су Cd и Pb, могу бити токсични ако им је унос путем гутања или удисања претеран (Al-Gahri and Almussali, 2008).

Садржај минералних материја у семену пшенице је око 2%, а у брашну и производима мељаве од 0,45% до 2% (Kaluderski i Filipović, 1998). Садржај појединих елемената у семену пшенице варира у зависности од сорти, географског порекла и начина гајења (Teklić et al., 2013).

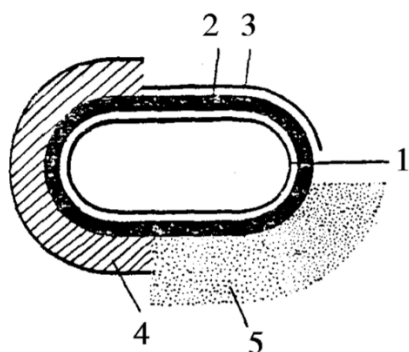
Минералне материје у семену пшенице су највећим делом концентрисане у омотачу и у алеуронском слоју, а најмање у ендосперму (Kaluderski i Filipović, 1998).

Главни део минералних материја семена пшенице чини P. Чак 70% P се налази у облику фитина, које човеков организам не може користити. У семену пшенице су присутни и K, Mg и Ca. Садржај Ca у семену је веома мали, и он се као и већина елемената највише налази у омотачу и алеуронском слоју, па се мељавом већи део и одстрањује. Поред наведених елемената у семену су значајни и микроелементи Fe, Mn, Zn, Ni, Cd и Cr. И они су у највећој мери присутни у омотачу и алеуронском слоју, а имају физиолошки значај за метаболизам и човека и домаћих животиња

Пшенична трава садржи минерале попут Ca, Mg, Se, Fe, K, Na, Mn, S, P, Co и Zn (Pallavi et al., 2011). С обзиром на то да су велике количине минерала присутне у пшеничној трави, она се може сматрати потенцијалним извором таквих елемената. Потрошња сока од пшеничне траве може допринети задовољењу дневних потреба за одређеним елементима. Конзумацијом у количини од 100 mL уноси се 5–7% потребног Mg, 10% Na, и више од 60% потребног Ca. Већи садржај одређених елемената у биљним екстрактима може бити у позитивној корелацији са већим нивоом биоактивности. На пример, утврђено је да је количина елемената, као што су K, Zn и Mg, у корелацији са већим вредностима антиоксидативне активности екстракта пшеничне траве (Ghumman et al., 2017), а једно од могућих објашњења за Mg је његово присуство у молекулу хлорофила, једињења са значајним антиоксидативним потенцијалом. Ова веза постаје важна, имајући у виду да се антиоксидативна активност пшеничне траве може повећати при различитим условима гајења, посебно променом количине и доступности минералних елемената у супстрату. Kulkarni et al. (2006) су утврдили да пшенична трава узгојена на земљишном супстрату има већу антиоксидациону активност, мерену тестовима (ABTS, DPPH, ORAC и антиоксиданса липидне пероксидације), у поређењу са пшеничном травом узгајеном на води или хранљивом раствору. Истраживања су показала да присуство Pb, Cu, Cd и Hg у супстрату утиче на смањење укупног хлорофила у биљци, а као одговор на стрес, узрокован тешким металима, биљке повећавају садржај пролина, ретинола, α -токоферола и аскорбинске киселине (Zengin and Munzuruglu, 2005).

4.8. Основна грађа бактерија

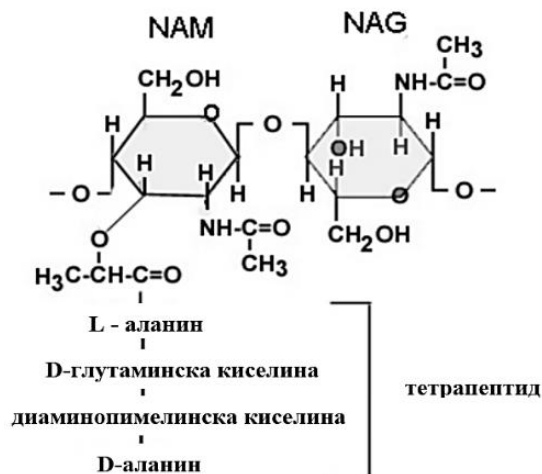
Према ћелијској грађи бактерије спадају у прокариоте и имају једноставнију грађу у односу на еукариотске микроорганизме. Бактеријска ћелија се састоји од ћелијског зида, цитоплазмине мембране с мезозомима и цитоплазме, у којој се налазе примитивно једно (нуклеоид), плазмид, рибозоми и инклузије. Поједине бактерије могу имати и неке од следећих елемената: слузасте омотаче око ћелије (капсулу, слузаста слој), органеле за кретање (флагеле, аксијална нит), споре, цисте, фимбрије и пили (Lalošević i sar., 2011). Цитоплазма бактеријске ћелије је окружена омотачима, који се налазе у сталној функционалној повезаности и одређују облик ћелије (ћелијски зид), њену биохемијску активност (цитоплазматска мембрана и мембранске структуре), антигена својства (капсула, ћелијски зид), учествују у размени материја између ћелије и околне средине, штите бактеријску ћелију од штетних фактора из спољашње средине (антибиотици, тешки метали, пестициди, детерџенти), утичу на површинска својства ћелије – површински напон и електрични потенцијал, као и осмотско стање ћелије (Đukić i sar., 2010). На слици 7 дата је шема размештаја омотача бактеријске ћелије.



- 1 - цитоплазматична мембрана;
- 2 - ћелијски зид;
- 3 - микрокапсула;
- 4 – капсула;
- 5 - слузави слој.

Слика 7. Шема распореда омотача бактеријске ћелије (Ђukić i sar., 2010)

Са слике се може видети да цитоплазму окружују цитоплазматична мембрана, ћелијски зид и слузави слој, али сваки од наведених слојева се разликује у погледу структурних, хемијских и функционалних својстава. За капсулу су везана антигена, серолошка и вирулентна својства бактерија. Код бактерија из фамилије *Enterobacteriaceae* капсула је изграђена из глукозе, галактозе и N-ацетилглукозамина. Ћелијски зид даје облик и чврстину ћелији, штити је од механичких и других неповољних утицаја спољашње средине. У ћелијском зиду патогених бактерија налазе се компоненте одговорне за изазивање обољења домаћина (фактори вируленције), а код покретних бактерија за ћелијски зид су причвршћене флагеле. Као што је основна компонента ћелијског зида код већине алги целулоза, код мицеларних гљива је хитин, код квасаца су глукани и манани, основна компонента ћелијског зида код бактерија је полимер, који се зове пептидогlukan/муреин (Ђukić i sar., 2010). Пептидогlukan или муреин је састављен од великог броја идентичних подјединица (Prescott, 2002). Муреин се састоји из пептидног и полисахаридног дела (Слика 8).

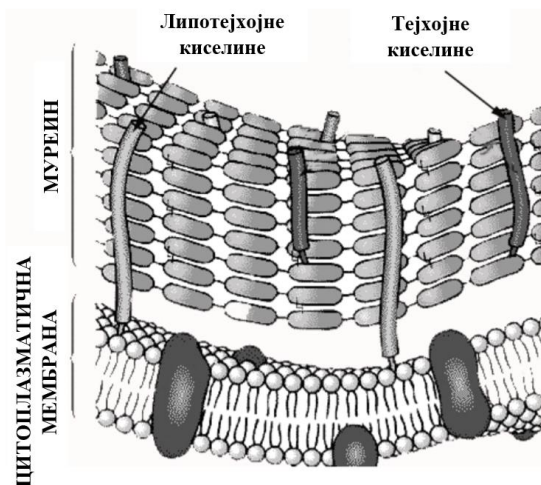


Слика 8. Фрагмент молекула муреина (NAG: N-ацетилглукозамин; NAM: N-ацетилмураминска киселина (преузето и прилагођено од Lalošević i sar., 2011)

Пептидни део је тетрапептид изграђен из D-глутаминске киселине, мезо-диаминопимелинске киселине, D-аланина и L-аланина, док неке бактерије, уместо мезо-диаминопимелинске киселине, садрже лизин. Полисахаридни део је изграђен из два аминокшећера: N-ацетил-глукозамина (NAG) и N-ацетил-мураминске киселине (NAM), који су међусобно повезани β -1,4 гликозидним везама. Пептидни и полисахаридни део су повезани преко карбоксилне групе из N-ацетилмураминске киселине. За карбоксилну

групу N-ацетилмураминске киселине везани су пептидни ланци од 4 наизменично повезане D - и L - аминокиселине (Prescott, 2002). Глукозидне и пептидне везе су два типа веза које повезују субјединице у пептидогlukanу и на тај начин формирају муреинску мрежу.

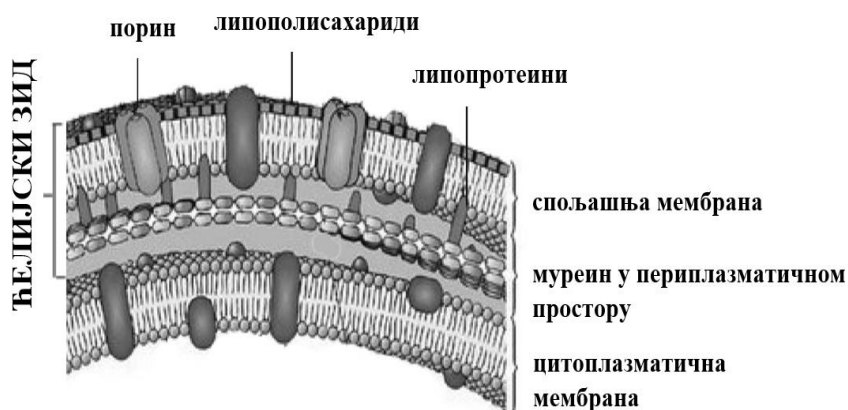
Разлике у грађи ћелијског зида омогућавају поделу свих бактерија на Грам – позитивне и Грам – негативне (Gr^+ и Gr^-). Бојење по Граму, које је увео 1884. године дански научник и бактериолог Х. Грам (*Hans Christian Joachim Gram*), једно је од најзначајнијих дијагностичких поступака у бактериологији. И по томе се све бактерије деле на Грам – позитивне (Gr^+), које се боје тамно плаво/љубичасто и Грам – негативне (Gr^-) – црвено. Бојење по Граму указује на разлику у саставу ћелијског зида бактерија, као и на утицај избора антимикробних агенаса. У ћелијском зиду Gr^+ бактерија, поред муреина, налазе се и тејхојне киселине и липотејхојне киселине (Слика 9).



Слика 9. Ћелијски зид Gr^+ бактерија (Преузето и прилагођено од Lalošević i sar., 2011)

Тејхојне киселине су полимери хемијски модификоване глукозе или глицерола повезани са фосфатима. Тејхојна киселина је везана за муреин. Молекули тејхојних киселина дају ћелијском зиду негативно наелектрисање, које потиче од фосфатне групе (PO_4^{3-}). Улога тејхојне киселине је у регулацији раста ћелије, и она представља фактор вируленције. Липотејхојна киселина је повезана за муреин и масне киселине цитоплазмине мембране.

Код Gr^- бактерија ћелијски зид је значајно сложеније грађе и чине га спољашња мембрана, периплазматични простор и муреин. Спољашња мембрана се састоји од липополисахарида, липопротеина и порин-протеина (Слика 10). Она има неколико улога, јер се преко ње усвајају хранљиве материје, при чему посебно место заузимају липопротеини и порин-протеин, јер стварају пролазе за молекуле мале молекулске масе, као што су моносахариди. Спољашња мембрана је и баријера за антибиотике, пестициде, детерџенте и тешке метале. Липополисахаридни део мембране се састоји од липидног дела, који делује као ендотоксин и полисахаридног дела који делује као антиген (соматски, O антиген). Ендотоксин Gr^- бактерија на површини ћелије се ослобађа приликом лизе бактеријске ћелије.



Слика 10. Ћелијски зид Gr^- бактерија (Преузето и прилагођено од Lalošević i sar., 2011)

Управо разлика у осетљивости на спољашње агенсе између Gr^+ и Gr^- бактерија може бити последица варијације у структури ћелијског зида. Ово је сигурно значајно поједностављено објашњење јер и други механизми, вероватно, имају улогу у отпорности, тј. разлици у осетљивости на спољашње агенсе. На пример, отпорност Gr^- бактерија на антибиотике попут пеницилина потиче од секреције, односно продукције β -лактамаза, односно ензима који разлажу β -лактамски прстен у антиотицима, у периплазматски простор између танке спољашње мембране и цитоплазматичне мембране (Elisha et al., 2017). Код Gr^- бактерија у периплазматски простор се лучи велики број β -лактамаза, које су хромозомски кодиране, што поред слабо пропустљивог ћелијског зида, доприноси наследној резистенцији ових бактерија на β -лактамске антибиотике. Иако Gr^- бактерије (*Klebsiella* sp, *Proteus* sp, *Pseudomonas* sp, *Enterobacter* sp), обично излучују β -лактамазе у периплазматски простор, па су интрацелуларне и много концентрованије, β -лактамазе могу бити и екстрацелуларне (егзоензими), када се луче у околину, изван бактеријске ћелије и, на тај начин, штите и бактерије које нису продуценти овог ензима. Постоје бројне Gr^+ бактерије које луче екстрацелуларне β -лактамазе, међу њима, нарочито стафилококе (Lalošević i sar., 2011). Без обзира на то, ипак су Gr^+ бактерије далеко осетљивије на дејство β -лактамских антибиотика.

4.9. Антимикробна активност и резистентност микроорганизама

Потреба за развојем нових антимикробних агенаса постаје већа него икада па је све већа пажња научне заједнице усмерена ка истраживањима нових лекова природног порекла и примени биљака у ту сврху. Иако је последњих деценија фармацеутска индустрија произвела велики број нових антибиотика, уочљив је тренд раста антимикробне резистенције у односу на све већи број антибиотика, јер бактерије имају способност генетичке трансмисије чиме стичу резистентност. Све присутнија бактеријска резистентност, условљена неселективном употребом комерцијалних антибиотика, захтева трагање за новим антибактеријским агенсима. Биљно царство је огромно и броји између 25 000 и 50 000 врста на планети, од чега се до 10% користи у исхрани људи и животиња, а нешто више у медицинске сврхе (Borris, 1996; Cowan, 1999). Различити биљни делови, као што су корен, лист, плод, кора и цвет користе се за производњу лековитих препарата. Биљке су, генерално, богат извор фитохемијских супстанци, као што су витамини, терпеноиди, феноли, лигнини, танини, флавоноиди, алкалоиди и други метаболити, који се доводе у везу са антиоксидативном активношћу,

а осим тога имају и антидијабетско, антиинфламаторно и антимикуробно дејство (Zheng and Shioh, 2001). Различита етарска уља, биљни екстракти, чиста једињења и мешавине фитохемијских једињења, већ су истражени и испољили су антибактеријска, антифунгална, антивирална, инсектицидна и антиоксидативна својства. Међутим, постоји много неистражених биљних врста које могу представљати потенцијалне изворе биолошки активних материја (Blumenthal et al., 1999) које треба да нађу место у превенцији и лечењу инфекција.

Предност биљака, као ресурса, може се посматрати и са економског становишта, с обзиром на то да су производни трошкови синтетичких лекова високи. Ако се узме у обзир и утицај синтетичке хемијске индустрије на загађење животне околине и свеприсутнија злоупотреба антибиотика, не изненађује чињеница што се значајан део светске популације опредељује за традиционалну медицину и природне производе.

Начини на које микроорганизми испољавају резистентност и отпорност на антимикуробне агенсе су следећи:

- бактерије производе ензиме, који или уништавају антимикуробни агенс пре него што достигне свој циљ или га модификују, тако да не препознаје мету;
- ћелијски зид постаје непропустљив за антимикуробни агенс;
- бактерија мутацијом мења циљно место за које се више не може везати антимикуробни агенс;
- бактерије поседују „пумпу“ која истискује антимикуробни агенс из ћелије, пре него што он достигне свој циљ;
- специфични метаболички путеви у бактерији бивају генетички модификовани, тако да антимикуробни агенс не успева да испољи ефекат (Cavaliere et al., 2005).

Феноли и полифеноли, флавоноиди, флаволи и флавоноли, танини, хинони, терпеноиди, кумарини, етарска уља, алкалоиди, лецитини, полипептиди итд. су најзначајнија фитохемијска једињења са антибактеријским дејством (Cowan, 1999). Постоји неколико хипотеза о антибактеријској активности полифенола. Ikigai et al. (1993) сматрају да се полифеноли адсорбују на површини бактеријске ћелије и тако или инхибирају бактерију или је убијају физички. Arakawa et al. (2004) сугеришу да полифеноли стварају водоник-пероксид који има антибактеријско дејство. За сада нема јасног консензуса у вези са овим механизмима. Антибактеријска активност фенола повезује се са положајем и бројем хидроксилних група. Већу активност имају феноли са већим бројем хидроксилних група. Механизам њиховог дејства приписује се инхибицији ензима, оштећењу мембране и ремећењу њене функције (Geissman, 1963). Феноли имају способност да реагују са цитоплазматичном мембраном, изазивајући њене лезије и промене у пропустљивости, и тако доводе до промена АТФ-а, мембранског потенцијала, рН-градијента (Nguefack et al., 2004). Такође, механизам деловања фенолних компоненти на микроорганизме може се приписати и могућим реакцијама са сулфхидрилним групама (тј. реакцијама са протеинима). У истраживању Taguri et al. (2006) су тестирани антимикуробни утицаји 22 полифенола на 26 бактеријских сојева. Утврђено је да постоји веза антибактеријске активности, изражене кроз минималну инхибиторну концентрацију, између полифенола и њихове структуре, тј. броја пирогалолних прстенова (Taguri et al., 2006; Sánchez-Maldonado et al., 2011), што указује на значајну улогу ове врсте ароматичног прстена у израженом антибактеријском ефекту. Утврђено је да обе класе фенолних киселина – деривати хидроксибензојеве киселине и деривати хидроксицинаминске киселине испољавају антибактеријско дејство (Sánchez-Maldonado et al., 2011; Ripari et al., 2019, преузето из рада Călinoiu and Vodnar, 2018), а у новијој

литератури су представљени антимикуробни ефекти хидроксицинамата, попут кофеинске, ферулинске и *p*-кумаринске киселине (Borges et al., 2012; Marín et al., 2018). Гална киселина и метил-естри галне киселине имају инхибиторно дејство на одређене бактерије. Антимикуробни потенцијал фенолних једињења, укључујући *p*-хидрокси бензоеву, ванилинску, кофеинску, протокатехинску, сиригинску, *p*-кумаринску киселину и кверцетин, изолованих из маслина, тестиран је на раст *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*. Кафеинска и протокатехинска киселина су инхибирале раст *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Bacillus cereus*. Ванилинска и кофеинска киселина су инхибирале раст и продукцију афлатоксина код *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus* (Aziz et al., 1998). Раније студије су указале на антимикуробну активност ферулинске киселине у односу на *Gr*⁺ и *Gr*⁻ бактерије и квасце (Jeong et al., 2000; Tsou et al., 2000). Својим проучавањима Lo and Chung (1999) и Ou and Kwok (2004) су утврдили инхибиторни ефекат ферулинске киселине на *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter koseri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* и *Shigella sonnei*. Mathew and Abraham (2004) су утврдили антибактеријску активност ферулинске киселине у односу на *Bacillus subtilis* и *Streptococcus pneumoniae*. Ou and Kwok (2004) наводе да од 12 фенолних киселина, ферулинска киселина има најјачи антифунгални ефекат у односу на *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea* и *Penicillium digitatum*. Baranowski et al. (1980) наводе да фенолне киселине (кафеинска, *p*-кумаринска, ферулинска) имају антифунгалну активност у односу на *Saccharomyces cerevisiae*. Фенолне киселине имају антимикуробно дејство и перспективне су за примену као конзерванси у храни и материјалима за паковање хране (Călinoiu and Vodnar, 2018). Препарати који садрже флавоноиде од давнина су се користили у лечењу рана, а позната су и лековита својства прополиса, који је прописивао и Хипократ у 4. веку пре нове ере. Постоји мишљење да је управо високи садржај флавоноида одговоран за антимикуробна својства прополиса, при чему је испољена знатно већа активност против *Gr*⁺ бактерија, а ограничена је у борби са *Gr*⁻ бактеријама (Grange and Davey, 1990). С обзиром на то да биљке синтетишу флавоноиде, као одговор на микробне инфекције, не чуди чињеница да су флавоноиди испољили антимикуробно дејство у *in vitro* условима. Утврђено је да су флавоноиди способни да граде комплексе са екстрацелуларним и растворљивим/солубилним протеинима ћелијског зида бактерија, а поред тога оштећују и ензиме (Cowan, 1999).

Када се ради о компонентама које су по природи хидрофобне, на пример етарска уља и екстракти са хидрофобним компонентама, њихово антибактеријско дејство се доводи у везу са њиховим липофилним карактером и заснива се на липофилним особинама и њиховим функционалним групама. Хидрофобне материје имају афинитет према липидима ћелијске мембране бактерија, имају особину да се растварају у липидном двослоју ћелијске мембране и доводе до промена у структури и пропустљивости ћелијске мембране, што резултира изласком јона и ћелијских компонената из ћелије, а као секундарни ефекат настаје смрт ћелије (Carson et al., 2002).

Први антибактеријски пептид, изолован из биљних врста, био је пуротионин из пшеничног брашна (*Triticum aestivum*), који је инхибирао раст неких фитопатогена, као што су *Pseudomonas solanacearum*, *Xanthomonas campestris* и *Corynebacterium michiganense* (Fernandez et al., 1972). Скоро 40 година касније описано је неколико додатних пептида са антибактеријским деловањем, представљених не само тионинима, који су сада названи дефензини, већ и групама протеина, као што су циклотиди, протеини богати глицином и др. (Selitrennikoff, 2001). Пептиди су изоловани из корена, семена, цвета, стабљика и лишћа и испољили су активност како у односу на фитопатогене, тако и патогене човека (Pelegri et al., 2008).

Током година, антибактеријски пептиди постали су значајно средство за развој нових техника у контроли пропадања усева и у производњи нових антибиотика за лечење инфекција код људи (Pelegriani et al., 2008). Међутим, још увек је мало информација о томе како ови пептиди инхибирају раст патогена или изазивају његову смрт.

Главна хипотеза за механизам њиховог деловања заснива се на способности пептида да изазову колапс мембране, интеракцијом са молекулима липида на површини бактеријске ћелије. Према овој хипотези, катјонски пептиди се привлаче електростатички на негативно наелектрисане честице, као што су анијонски фосфолипиди, липополисахариди – код *Gr⁻* бактерија и тејхојна киселина код *Gr⁺* бактерија, који су градивни елементи ћелијског зида, тј. пептидогљукана (Sitaram and Nagaraj, 1999).

Најчешћи механизми дејства активних компонената из природних производа су везани за специфична циљна места, као што су ћелијска мембрана, електронски транспорт, протеинска транслокација, јонски градијент, фосфорилација и друге ензимски зависне реакције (Silva and Fernandes Júnior, 2010).

Антимикробни агенси су класификовани на основу специфичних начина деловања против бактеријских ћелија. Њихово деловање се огледа у ометању синтезе како ћелијског зида, тако и нуклеинске киселине, инхибирају синтезу протеина или метаболичких путева. Начини деловања антимикробних агенаса против *Gr⁺* и *Gr⁻* бактерија врло су слични (Cavaliere et al., 2005).

Истраживања о антимикробној активности пшеничне траве су контрадикторна. Pallavi et al. (2011) сведоче о активности хексанског екстракта сока пшеничне траве против *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*. Das et al. (2012) наводе активност 80% ацетонског екстракта на бактерије – *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* и плесан *Aspergillus niger*. Ashok (2011) указује на антибактеријску активност екстракта пшеничне траве против *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Murali et al. (2016) наводе да је хлороформски екстракт листа младе пшеничне траве испољио јаче дејство, мерено пречником инхибиције, према *Escherichia coli*, него према *Klebsiella pneumoniae*. Rajpraghit et al. (2015) наводе да етанолски екстракт пшеничне траве испољава већи ефекат при нижој концентрацији на *Lactobacillus spp.* у односу на *Streptococcus mutans*. Међутим, Desai (2005) тврди да ацетонски и метанолски екстракти пшеничне траве нису показали антибактеријски ефекат, док је свеж и неразређен сок од пшеничне траве показао благо и краткотрајно антибактеријско дејство против *Escherichia coli* NCTC 10418, *Staphylococcus aureus* NCTC 6571 и *Streptococcus mutans* NCIMB 702062. Sundaresan et al. (2015) су вршили „скрининг“ антибактеријске активности, агар-дифузионом методом, различитих екстракта пшеничне траве. Као тест организме користили су *Salmonella typhi*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* и *Escherichia coli*. Утврдили су, на пример, да су метанолски и етил-ацетатни екстракти младе пшеничне траве испољили дејство на све наведене микроорганизме; водени екстракт је деловао на *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, док није испољио дејство на *Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*; етанолски екстракт није испољио дејство на *Streptococcus pneumoniae*, а хексански екстракт на *Staphylococcus aureus*. Рад Sundaresan et al. (2015) јасно указује да екстракти пшеничне траве имају различите ефекте на проучаване микроорганизме, што зависи од растварача коришћеног у екстракцији. Хексански екстракти испољили су највећи ефекат, изражен кроз % инхибиције бактеријског раста, на *Yersinia enterocolitica*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, док су метанолски екстракти, у поређењу са осталима, имали највећу активносту односу на *Salmonella typhi*. Ови аутори су утврдили

да је антибактеријска активност зависила и од старости пшеничне траве и растварача коришћеног при екстракцији. Rajoria et al. (2016) наводе да хексански екстракти пшеничне траве испољавају антибактеријски ефекат у односу на *Salmonella enteritidis*, а да ефекат зависи од примењене концентрације екстракта – већа концентрација има већи ефекат. Deshwal and Deepshikha (2018) наводе да су и 50% ацетонски екстракти пшеничних клијанаца и младе траве, мерени пречником инхибиције, одређиваног применом диск-дифузионе методе, испољили антибактеријски ефекат на *E. coli*.

4.10. Патогени микроорганизми као узрочници тровања храном и изазивачи обољења

Постоји велики број микроорганизама који су узрочници тровања храном и изазивачи различитих обољења. Само неки од тих ће бити описани.

Staphylococcus aureus је округла, аспорогена, непокретна Gr^+ бактерија која припада роду *Staphylococcus*, фамилији *Micrococcaceae*. Иако спада у анаеробне, ипак боље расте у аеробним условима. Може расти у широком распону температура (7–48,5 °C; оптимално од 30 до 37 °C), рН (4,2–9,3; оптимално 7–7,5) и концентрације NaCl (до 15%). *S. aureus* је коагулаза-позитиван микроорганизам који на хранљивом агару формира сјајне и глатке колоније жуте боје (златни стафилокок), док на крвном агару ствара зону бета-хемолize. Одређени број сојева има капсулу, која је полисахаридне природе и фактор је вируленције ове бактерије (антифагоцитна улога). Ова свеприсутна бактерија је важан патоген због комбинације „вируленције посредоване токсинима, инвазивности и отпорности на антибиотике“. Може изазвати контаминацију прехранбених производа током припреме и прераде хране. *S. aureus* је толерантан на сушење и има способност да преживи у потенцијално сувим и стресним окружењима, као што су људски нос и кожа и неживе површине и да се развија у многим прехранбеним производима (Kadariya et al., 2014). Отпорност ове бактерије према антибиотцима је кодирана генима у плазмидима, што узрокује резистентност бактерије на антибиотик.

Врсте рода *Listeria* су Gr^+ бактерије, каталаза-позитивне, оксидаза-негативне и факултативно анаеробне бактерије. Оне су још увек недовољно истражене, а посебно њихова патогенеза. Листериије су способне да толеришу температуре од 0–45 °C, рН од 6–9 и до 10% соли. Оптимална температура им је од 30–37 °C. Род *Listeria* припада породици *Listeriaceae*, познате су врсте *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. booriae* и *L. newyorkensis*. Међу овим врстама најважније су *Listeria monocytogenes* и *Listeria ivanovii*, с тим што је *Listeria monocytogenes* патоген и за човека и за преживаре, а *Listeria ivanovii* више је патоген преживара. Листерииоза проузрокована са *Listeria monocytogenes* је тешка болест са стопом смртности од 20–30%. Листерииоза се јавља, углавном, код трудница и особа са ослабљеним имунитетом, са симптомима побачаја, неонаталне смрти, септикемије и менингитиса. *L. monocytogenes* је штапићаста, Gr^+ , каталаза-позитивна, оксидаза-негативна и факултативно анаеробна бактерија. Покретна је, аспорогена и не садржи капсулу. Свеприсутни интрацелуларни патоген који је врло примећен као узрочник епидемија, изазива инфекције и болести изазване храном, јер се често јавља у месу, месним прерађевинама и риби, салатима, поврћу и млечним производима. Може да се развија и на температурама око 0 °C, па хлађење не зауставља њен раст, настављајући да се развија и изазива тровања храном (Tchatchouang et al., 2020). Управо из разлога што преживљава високе концентрације соли, киселост и температуру хлађења, представља главну претњу прехранбеној индустрији. Због тога, многе

организације широм света, као што су Светска здравствена организација – World Health Organisation (WHO), Организација за храну и пољопривреду – Food and Agricultural Organisation (FAO) and Codex Alimentarius, између осталог, примењују политику “Zero Tolerance – нулте толеранције” за *L. monocytogenes* у прерађеној храни у циљу смањења високог ризика од контаминације хране и, према томе, смањивање ширења инфекције у општој популацији (Tchatchouang et al., 2020).

Escherichia coli је штапићаста, *Gr* бактерија, распоређена појединачно, у паровима или неправилним групама, припада породици *Enterobacteriaceae*. Већина сојева се креће перитрихама, а неке могу имати капсулу. Отимална температура за њен раст и развој је 37–44 °C. На површини чврстих хранљивих подлога колоније могу бити округле, глатке, сјајне, безбојне. Неки сојеви понекад имају танку капсулу. Ферментише многе шећере, уз продукцију киселине и гаса. Међу сојевима ове бактерије има оних који луче и отровне супстанце (ентеротоксине). Поједини сојеви код људи могу изазвати различита обољења: инфекције уrogenиталних органа, коли-сепсу, цревна обољења (Vesković i Đukić, 2015). Иако је саставни део људске цревне микробне заједнице, ипак њено присуство у храни представља показатељ фекалне контаминације. Пастеризацијом се може елиминисати, као и већина вегетативних облика.

Salmonella enteritidis је *Gr*, факултативно аеробна, аспорогена, штапићаста бактерија. Припада породици *Enterobacteriaceae*. Бактерије рода *Salmonella* расту и размножавају се на великом броју хранљивих подлога и у великом броју намирница, при широком температурном дијапазону од 5–47 °C, као и при рН од 4,5–9,0, иако им је оптимална температура око 37 °C, а рН од 6–6,5. Могу преживљавати у намирницама чија је активност воде $a_w \geq 0,94$. Осетљиве су према хлору и хлорним једињењима, као и хлорамфениколу, а отпорне према дејству сулфонамида и бензил-пеницилина. Врло су штетне за човека, узрокују тровања храном, као и различита обољења. Могу се уништити пастеризацијом.

Бактерије рода *Klebsiella* су широко распрострањене у природи, у земљи и води. Такође су део нормалне микробне заједнице цревног тракта, али у поређењу са *E. coli* заступљене су у мањем броју. Многи сојеви *Klebsiella* могу поправити ниво азота у земљишту, вршећи биолошку фиксацију атмосферског азота, тј. могу преводити атмосферски азот до амонијака и аминокиселина (*Klebsiella planticola*, асоцијативни азотофиксатори). *Klebsiella pneumoniae* је *Gr* и непокретна бактерија, припада породици *Enterobacteriaceae*. Најупечатљивија разлика између већине сојева рода *Klebsiella* и његових блиских сродника, *E. coli* и *Salmonella*, које такође припадају породици *Enterobacteriaceae*, је што ћелије *Klebsiella* имају густу слој слузи или ванћелијски полисахарид који се назива „капсула“. Капсула штити ћелије од одавања влаге, а може их заштитити и од фагоцитозе. Сојеви врсте *Klebsiella pneumoniae* су опортунистички патогени који могу изазвати упалу плућа, бактеријемије, менингитис, инфекције мокраћних путева. Последњих година је број инфекција у порасту, због сојева отпорних на већи број антибиотика. Вирулентност бактерија је условљена низом фактора, који могу довести до инфекције и резистенције на антибиотике. Један од најважнијих фактора је полисахаридна капсула, а други фактор вируленције су липополисахариди који прекривају спољашњу површину *Gr* бактерија, затим следе, фимбрије и сидерофори. Ова четири фактора су добро проучена и важна су за вируленцију (Paczosa and Meccas, 2016).

Током последње три деценије *Enterobacter aerogenes* је пријављен као важан опортунистички и мултирезистентни бактеријски патоген за људе. Ова *Gr*, факултативно анаеробна, аспорогена и каталаза-позитивна бактерија из породице

Enterobacteriaceae, у великој мери је описана током неколико епидемија, болничких инфекција у Европи, а посебно у Француској. Ширење *Enterobacter* sp. је повезано са присуством регулаторних каскада које ефикасно контролишу пропустљивост/пермеабилност мембране, осигуравајући бактеријску заштиту и експресију детоксикационих ензима, који су укључени у разградњу /инактивацију антибиотика. Уз то, ове бактеријске врсте су у стању да стекну бројне генетичке елементе који значајно доприносе отпорности на антибиотике. Штавише, ова посебна способност им помаже да колонизују различита окружења и домаћине и брзо и ефикасно прилагоде свој метаболизам и физиологију спољним условима и стресу у окружењу (Davin-Regli and Pagès, 2015).

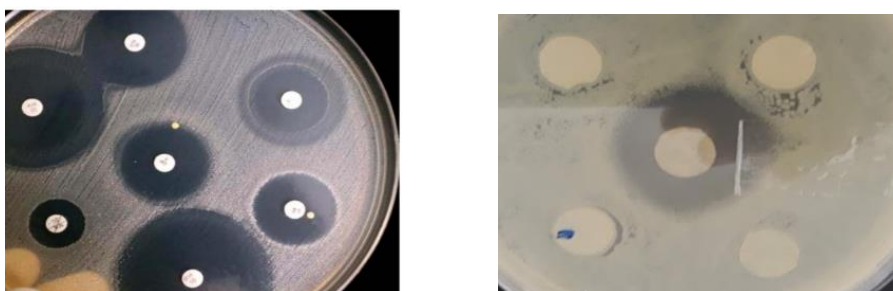
Генерално, најзначајнија карактеристика ентеробактерија је антигена структура, која се односи на три основна антигена: антиген ћелијског зида – антиген О, који је липополисахарид капсуле; антиген К – антиген капсуле који је полисахарид, али понекад има и додатке протеина; антиген флагела – Н антиген који је изграђен од флагелина, протеина који има специфан редослед аминокиселина. Познато је да су ентеробактерије осетљиве на дезинфицијенсе и високе температуре, али њихова осетљивост на антибиотике је варијабилна, што је последица постојања G - плаزمида, помоћу кога бактерије у току процеса коњугације могу стећи отпорност на антибиотике (Radulović i Petrušić, 2011).

4.11. Методе одређивања антимикуробне активности

Сви тестови антимикуробне активности могу бити сврстани у дифузионе, дилуционе и биоаутографске (Rios et al., 1988). Они се не могу у потпуности екстраполирати на живе организме, али оваква испитивања су значајна и корисна као прелиминарна, из разлога што се само оне супстанце које показују изразито деловање *in vitro* могу и имају смисла испитивати у *in vivo* условима.

4.11.1. Диск – дифузиона метода

Ова метода се базира на примени целулозних дискова, на које се наноси узорак, чија се примена тестира, и који се смештају на инокулисани агар у петри шољама (Слика 11). Узорак дифундује са места наношења у подлогу у свим правцима. Након инкубације у термостату на 37 °C у трајању од 24–48 часова, читавају се резултати, мерењем пречника зоне инхибиције раста микроорганизма у mm или cm. Ширина (пречник) зоне инхибиције сразмеран је степену осетљивости микроорганизма на примењени агенс, односно антимикуробном учинку испитиваног узорка. Одсуство зоне инхибиције симболизује отпорност микроорганизма на испитивану супстанцу. При оваквим испитивањима треба користити две врсте контроле: позитивну и негативну.



Слика 11. Диск-дифузиона метода

Позитивна контрола подразумева примену стандардних антибиотика, а негативна примену растварача који је коришћен у истраживању. Ова метода представља скрининг антибактеријске активности.

4.11.2. Дилуционе методе одређивања минималне инхибиторне концентрације

Дилуционе методе разблаживања су најприкладније за одређивање минималне инхибиторне концентрације – МИС (eng. minimum inhibitory concentration), јер нуде могућност оцењивања концентрације антимикробног агенса у агару – агар-дилуционе или бујону као медијуму: макро- и микро-дилуциони метод. Минимална инхибиторна концентрација је најнижа концентрација која инхибира видљив раст микроорганизама који се тестира. Смернице за одређивање и протокол одређивања минималне инхибиторне концентрације дате су од стране CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute) и EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) – Balouiri et al. (2016).

Макро- и микро-дилуционе методе разблажења су често коришћене методе испитивања антимикробне активности. Поступак обухвата припрему двоструких разблажења антимикробног агенса (на пример: 32, 16, 8, 4, 2, 1 mg mL⁻¹) у течном медијуму који се налази у епруветама, са минималном запремином од 2 mL – макродилуциони метод, или у случају мањих запремина у микротитар-плочама, које садрже 96 бунарчића у 12 колона и 8 редова – микродилуциони метод.

Свака епрувета или јамица микротитар-плоче садржи течни медијум Милер-Хилтонов бујон (Müller-Hinton, МНВ) – за бактерије или Сабуроов (Sabouraud) течни бујон – за гљиве, антимикробни агенс и инокулум добијен након разблаживања стандардне микробне суспензије прилагођене 0.5 *McFarland* скали. Након инокулације микротитар-плоче се инкубирају у одговарајућим условима у зависности од тест-микроорганизама. За одређивање антибактеријске активности CLSI, (2012) препоручује се коришћење МНВ као медијума, финална густина инокулума је $5 \cdot 10^5$ CFU/mL (Collony Forming Units – број ћелија способних за раст, тј. стварање колонија), температура инкубације 35 ± 2 °C, време инкубације 20 сати и за микро- и макро-дилуционе методе. За одређивање минималне инхибиторне концентрације за плесни, и код макро- и микро-дилуционе методе, препоручује се финална густина инокулума $(0.4 - 5) \cdot 10^4$ CFU/mL, температура инкубације 35 °C, време инкубације 48 сати (CLSI, 2012).

Након периода инкубације, микробиолошки раст се одређује или голим оком или уз помоћ универзалног читача микротитарских плоча, мерењем апсорбанце на 620 nm.

Да би се лакше одредила минимална инхибиторна концентрација, постоје и колориметријске методе које подразумевају додавање одређених реагенаса. У том смислу може се користити, на пример, тетразолиум-хлорид при одређивању МИС крајње тачке како у антибактеријским, тако и у антифунгалним микродилуционим огледима (Al-Vakri and Afifi, 2007; Liang et al., 2012). МИС је дефинисана као најнижа концентрација антимикробног агенса (екстракта, етарског уља) при којој нема видљивог раста бактерија – црвено обојених колонија на дну удубљења микротитар плоче (Miladinović et al., 2012). Поред тога, у ове сврхе се може користити и ресазурин (Montoro et al., 2005; Martin et al., 2005). Ресазурин је индикатор плаво-љубичасте боје, који мења боју у светло розе у случају микробног раста (Слика 12). Минимална инхибиторна концентрација се читава на месту где није дошло до промене боје, тј. последња јамица у микротитар-плочи где је боја остала љубичаста (плава) означава одсуство микробног раста и узима се као минимална инхибиторна концентрација (Balouiri et al., 2016).



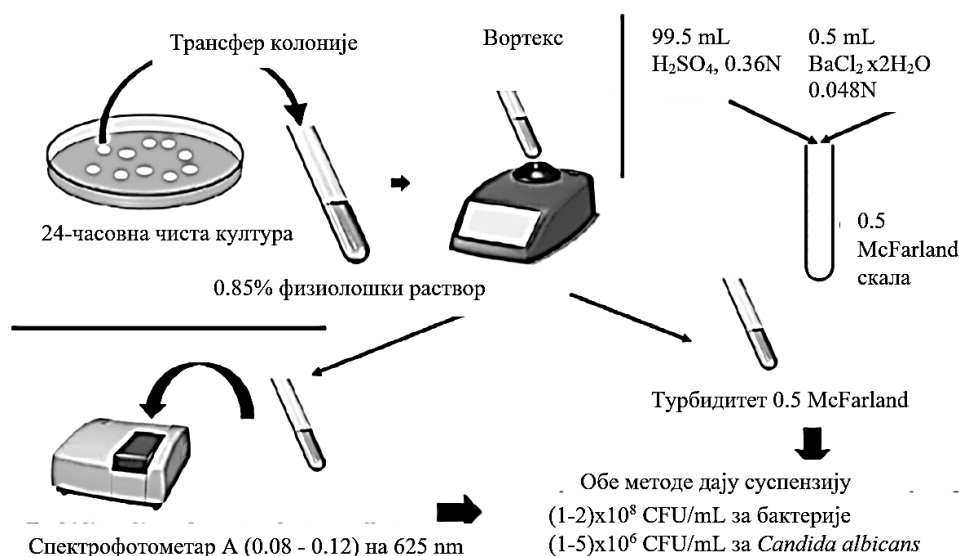
Слика 12. Промена боје ресазурин-индикатора из плаве/љубичасте у розе при читавању МИС

Поступак одређивања минималне инхибиторне концентрације укључује: припрему *McFarland*-овог стандарда, инокулума, раствора ресазурин и одређивање МИС/МВС. Све операције треба изводити у стерилним условима и у одсуству било какве контаминације.

Постоје две методе за припрему инокулума: метода пораста и метода директне суспензије колонија.

Метода пораста подразумева избор 3–5 појединачних колонија, које се пребацују у епрувету са 4–5 mL одговарајуће течне хранљиве подлоге, инкубирају на 35 °С, док се не достигне турбидитет од 0.5 *McFarland* (2–6 сати). Турбидитет се подешава стерилним физиолошким раствором, да одговара 0.5 *McFarland* стандарду, односно да одговара густини инокулума од $(1-2) \cdot 10^8$ CFU/mL за бактерије, односно $(1-5) \cdot 10^6$ CFU/mL за *Candida albicans* (Слика 13).

Метода директне суспензије колонија подразумева коришћење колонија, пораслих након 18–24 часовне инкубације, за прављење суспензије у физиолошком раствору или бујону који одговара турбидитету од 0.5 *McFarland* (CLSI, 2012). Замућеност почетне суспензије подешава се поређењем са 0.5 *McFarland*-овим стандардом (Andrews, 2005). Када је замућеност прилагођена 0.5 *McFarland*-овом стандарду, суспензија бактерија садржи око 10^8 CFU/mL (Balouiri et al., 2016). Спектрофотометријске методе се користе за мерење оптичке густине, тј. апсорпције. Ако је апсорпција на 625 nm у распону од 0.08–0.12, суспензија је прилагођена 0.5 *McFarland* скали, односно одговара густини инокулума од $(1-2) \cdot 10^8$ CFU/mL за бактерије, односно $(1-5) \cdot 10^6$ CFU/mL за *Candida albicans*.



Слика 13. Припрема суспензије микроорганизама – метода пораста, CLSI (преузето и прилагођено, Balouiri et al., 2016)

У пракси је често присутно прилагођавање постојећих метода за испитивање антибактеријског дејства антибиотика/екстраката, а литературне податке је често тешко поредити, јер на резултате истраживања утичу примењена метода, запремина инокулума, фаза раста, инкубационо време, температура и рН вредност медијума (Rios i sar., 1988). Постоји потреба и захтев за стандардизацијом метода и тачном границом раздвајања („cut-off points“) антимикуробне активности, јер неки аутори сведоче о активностима екстраката већим од 10 mg mL^{-1} , док неки, укључујући и Kuete (2010), верују да се само вредности МИС-а мање од $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (за екстракте) и $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (за чиста једињења) могу наводити као „изражена активност“. У прилог различитом сагледавању концентрација са инхибиторним бактеријским дејством сведочи и опсежно истраживање Bussmann et al. (2010), које је обухватило испитивање водених и етанолних екстраката 141 биљне врсте, при чему ови аутори наводе да су се МИС концентрације кретале у опсегу од 0,008 до 256 mg mL^{-1} , али је само 36 биљних врста имало инхибиторне концентрације $< 4 \text{ mg mL}^{-1}$. Такође, Aqil and Ahmad (2007) у својим истраживањима етанолних екстраката 66 традиционално коришћених индијских лековитих биљака наводе да је 39 имало антибактеријска својства, а *in vitro* ефикасност, изражена као минимална инхибиторна концентрација, на пример према *Staphylococcus aureus*, кретала се у опсегу од 0,32–7,5 mg mL^{-1} , што је далеко од критеријума ефикасности који примењује Kuete (2010).

4.12. Употреба биљака ради развоја производа побољшаних својстава

Кекс и сродни производи представљају једну од најпопуларнијих пекарских намирница на свету. Због сензорних својстава (укуса, мириса, боје, текстуре), доступности и економичности, тј. ниске цене, популарни су међу свим узрастима, а осим по добром укусу и квалитету, кекс је познат и по трајности.

Основни састојци кекса су: пшенично брашно, шећер и масноћа. Управо ове компоненте лекари и нутриционисти доводе у везу са развојем различитих болести. То је и разлог зашто се кекс и сродни производи неповољно позиционирају међу прехранбеним производима. Међутим, с обзиром на заступљеност кекса у исхрани, њихово конзумирање може бити погодан начин за унос и различитих функционалних компонената са позитивним дејством на здравље.

Искључивањем или заменом неких од састојака, кекс и сродни производи могу постати и безбедна храна за људе са интолеранцијом на неке састојке хране. Отуда на тржишту постоје различите врсте кекса: кекс са смањеним садржајем масти, кекс за дијабетичаре, за популацију интолерантну на глутен или лактозу, као и обogaћени кекс са минералима, влакнима, полифенолима, протеинима итд.

У новије време је нагласак на природним прехранбеним производима са мање калорија и угљених хидрата, а више дијеталних влакана, на протеински обogaћеним и антиоксидантима обogaћеним производима. Обogaћивање кекса разним врстама минерала, витамина и биљака представља уобичајну праксу (Karklina et al., 2012).

Данас постоји велико интересовање за функционалном храном, познатом као „суперхрана“. За термин суперхрана нема јасне дефиниције – то је термин који се користи за храну која поседује комбинацију прехранбених/нутритивних, здравствених користи и превенцију болести (Pacias et al., 2018). Концепт функционалне хране развијен је у Јапану крајем осамдесетих година двадесетог века (Kaur and Singh, 2017). Јапанско министарство здравља осмислило је јасан регулаторни оквир за категорију намирница корисних за здравље, при чему су ове намирнице одвојили од лекова (Rodriguez et al., 2009). Ако храна доприноси очувању здравља и превенцији болести, може се сматрати функционалном храном. Стога се функционална храна може дефинисати као свака храна која поред хранљиве вредности, позитивно утиче на здравље, стање духа или физичке

перформансе. Носиоци функционалности прехранбеног производа су функционална једињења присутна у његовом саставу. Ту се убрајају полифеноли, каротеноиди, прехранбена влакна, масне киселине, пребиотици и пробиотици, биљни стероли, фитостероли, протеини, витамини и минерали (IFICF, 2009; Kapsak et al., 2011). Формулисање кекса са додатом или унапређеном вредношћу, уз употребу сировина са биоактивним особинама, сврставају финални производ у ред функционалне хране (Škrbić and Cvejanov, 2011; Sedej et al., 2011; Reis et al., 2012).

Последњих деценија потрошачи све више избегавају синтетичке адитиве у храни, укључујући и антиоксиданте, и окрећу се употреби природних антиоксиданата биљног порекла (Reddy et al., 2005). Природни антиоксиданти спречавају аутооксидацију масти и уља садржаних у прехранбеним производима. Постоје различита истраживања о утицају додатка различитог биља, воћа и поврћа у циљу испитивања њиховог утицаја на одређена својства производа. Многа од њих указују да се на тај начин може добити производ побољшаних нутритивних и функционалних својстава. Тако су и Reddy et al. (2005) испитивали утицај додавања биљних екстраката, добијених из биљака *Emblica officianalis*, *Moringa oleifera* и *Vitis vinifera*, на својства бисквита, при чему су резултати показали да су на овај начин значајно побољшана антиоксидативна својства оваквих производа.

Произвођачи развијају нове рецепте и производе како би привукли потрошаче новим укусима и обогатили кондиторске производе здравим састојцима. Зачини су добро познати извори природних антиоксиданата, који се могу користити као конзерванси или појачивачи укуса у кексу и сродним производима (Embuscado, 2015). Сматра се да је за висок антиоксидативни статус зачина одговоран широк спектар једињења различитих молекуларних структура (Yashin et al., 2017). Због тога могу значајно утицати на квалитет и сензорне параметре кондиторских производа, али и повећати њихова функционална својства, као на пример њихово антиоксидативно деловање (Nanditha and Prabhasankar, 2009). Прашкасте форме представљају главни облик у коме се зачини уграђују у кондиторске производе. Вајеј et al. (2006) су утврдили да су постигнути бољи ефекти и прихватљивост код потрошача, у случају кекса који садржи прах од менте, него кекса са екстрактом менте или ментолом. У неким случајевима се додају есенцијална уља зачина, углавном прихватљива за потрошаче, да би се побољшао антиоксидативни потенцијал производа (Basuny et al., 2012). Цимет, нана, мускатни орашчић и каранфилић су најчешће коришћени зачини и зачинско биље у посластичарству (Nanditha and Prabhasankar, 2009). Прашкасте форме белог лука, ђумбира, босиљка, куркуме или коријандера су такође коришћени у неким истраживањима са пшеничним хлебом (Dziki et al., 2014).

Очекује се да додавање зачина, као главног извора антиоксиданата, продужи стабилност складиштења кондиторских производа, обезбеди прихватљивост код потрошача и здравствено корисна својства. Према многим извештајима, на прихватљивост код потрошача могу утицати настала оксидисана једињења, која узрокују непријатну арому и/или непријатан и горак укус у складиштеним производима. Watanabe et al. (2014) су саопштили да је додавање квиноиног брашна пшеничним колачићима повећало антиоксидативни капацитет производа, а затим им побољшало оксидативну стабилност током 50-дневног периода складиштења (нижа вредност пероксида кекса који садржи 7,5% квинојевог брашна). Zieliński et al. (2012) су утврдили пораст антиоксидационог капацитета након дуготрајног складиштења колача, направљених од раженог, уместо пшеничног брашна, уз додаток ђумбира. Они претпостављају да би то могло бити последица формирања неких од Мајарових реакционих продуката, на пример меланоидина, што је и назначено вишим вредностима индекса смеђе боје. Jensen et al. (2011) указују на значајне промене оксидативног статуса пшеничног хлеба током

складиштења, коме је додат екстракт рузмарина или раствор α -токоферола. У студијама Ning et al. (2017) наводе да је додаток зеленог чаја у праху пшеничном хлебу, чак и у количини од 1%, значајно повећао његов укупни антиоксидативни потенцијал и инхибирао стварање пероксида.

Пшеница је значајна у људској исхрани и обезбеђује унос велике количине скроба, дијеталних влакана и мању количину масти, а поред тога, представља извор витамина групе В и минерала Са, Mg и Fe. Већина ових састојака се губи током процеса прераде жита, што резултира ниском нутритивном вредношћу производа од белог пшеничног брашна (Škrbić i Filipčev, 2007). У циљу побољшања хранљиве вредности ових производа, новија истраживања су базирана на додавање нових извора хранљивих састојака, као што су концентрати протеина сурутке, пшеничне клице/клијанци, гљиве, брашна кестена (Okafor et al., 2002; Arshad et al., 2007; Noor Aziah et al., 2012; Wani et al., 2015; Bala et al., 2015). Обогаћивање прехранбених производа, међу осталим и кекса, представља добар начин уноса протеина, витамина, минерала и биоактивних једињења.

Иако не постоји много научних истраживања о коришћењу пшеничне траве у праху у производњи кекса, мафина и сродних пекарских производа, ипак имајући у виду чињеницу да поседују висок садржај вредних биоактивних једињења, додавање пшеничних клијанаца и изданака у прехранбени производ као што је кекс, могло би унапредити његову функционалност. У својој основној формулацији овај фини пекарски производ садржи прилично велики садржај масноћа (до 30% м/м). Присуство пшеничних клијанаца и изданака, односно природних антиоксидативних састојака, може утицати на спречавање липидне пероксидације, па би овакви производи, поред, унапређених нутритивних својстава, могли имати и продужени рок трајања (Sedej et al., 2011). Познато је да природни антиоксиданти могу инхибирати липидну пероксидацију у храни и повећати квалитет и безбедност хране. Фенолне киселине из пшеничне траве могу се као суплементи додати храни и пружити здравствене бенефите од конзумирања исте (Rana et al., 2011).

4.12.1. Микробиолошка одрживост кекса и сродних производа

Битни параметри квалитета кекса су садржај влаге и активност воде (a_w). Ови параметри имају велики утицај на прхкост и текстуру кекса, на микробиолошку стабилност и рок трајања производа. Низак ниво влаге у производу погодује очувању квалитета током чувања кекса, јер већина микроорганизама одговорних за кварење имају мању способност опстанка при овим нивоима влаге (Agu and Okoli, 2014). Кекс и сродни производи, са ниским садржајем влаге, могу имати дужи рок трајања ако су складиштени у контролисаним условима и у адекватној амбалажи (Bertagnoli et al., 2014). Рок трајања печених производа има директне везе са садржајем влаге, који представља индекс активности воде и мерило стабилности и подложности микробној контаминацији.

Смањење количине расположиве воде у пекарским производима доводи до редукције броја микроорганизама и дужег рока трајања. Снижење a_w вредности производа може се постићи дехидратацијом, било испаравањем или сушењем смрзавањем. Један од начина је стварање високог осмотског притиска, додавањем, на пример, шећера у храну – осмоанабиозом. Вода садржана у растворима шећера постаје недоступна микробима. Поред тога, микроби се директно осмотски оштећују концентрацијама додатих супстанци. Овај ефекат може бити последица негативног утицаја смањене доступности воде на све метаболичке активности, јер је за хемијске реакције у ћелији неопходна вода (Saranraj and Geetha, 2012). Са повећањем концентрације суве материје расте и осмотски притисак (осмоза), вода из ћелије микроорганизама прелази у део са већом концентрацијом суве материје, што доводи до

„исушивања“ микроорганизама, резултирајући нарушавањем нормалних животних процеса, престанком размножавања, а самим тим и кварења намирница узрокованим микроорганизмима.

Да би се избегао негативан утицај на карактеристике кекса и обезбедила његова одрживост током дужег времена складиштења, садржај воде и активност воде треба да буду релативно ниски. Активност воде представља количину воде којом микроорганизми располажу у реакцијама метаболизма и за сваки микроорганизам постоји оптимална a_w вредност за раст и развој, а такође и a_w вредност испод које се не може развијати, формирати споре или производити токсичне метаболите (Beuchat, 1981).

Садржај воде у производу и a_w вредност производа могу се довести у везу, јер постоји одређена корелација између садржаја воде, односно суве материје и a_w вредности (De Morais et al., 2018).

Минималне a_w вредности које „подржавају“ раст репрезентативних микроорганизама одговорних за квар хране су: 0,97 за *Alicyclobacillus* (термофилни ацидофилни бацили) и *Pseudomonas*; 0,95 за ентеробактерије; 0,92 за бактерије млечне киселине и *Saccharomyces cerevisiae*; 0,90 за *Bacillus subtilis* и квасце које могу да изазову квар; 0,84 за плесни које изазивају квар; 0,62 за ксерофилне плесни, и 0,60 за осмофилне плесни (Sperber, 2009). Anthony и Fontana (2007) наводе да *Enterobacteriaceae*, у које спадају и *E. coli* и *Salmonella* spp., немају способност раста при $a_w < 0,95$. Одсуство квасаца и плесни у финалним производима може се приписати ниској вредности воде у производу, односно a_w вредности производа.

5. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

5.1. Материјали, реагенси и апарати

У овом експерименту коришћено је пшенично семе сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса, добијених од Института за ратарство и повртарство у Новом Саду. Пшеница је гајена на земљишту типа карбонатни чернозем у току 2017/2018. године, на локалитету Римски Шанчеви.

За испитивање хемијског састава, садржаја фенолних компоненти, антиоксидативне и антимикробне активности у биљном материјалу коришћена је следећа опрема: аналитичка вага (Mettler Toledo АВ-204-S, САД) за одмеравање узорака и чврстих супстанци; ултразвучно купатило (Bandelin sonorex digitec, Немачка); термостат (Termo 120, Pirska Bistrica и FOC cooled incubator, Velp scientifica, Италија); варијабилне аутоматске пипете Lab Mat+ за пипетирање раствора; хронометар за мерење времена; техничка вага (Kern, EW 150-3M, Немачка); аналитичка вага, (Kern 770-15, Немачка); ламинарна комора, (Iskra, Словенија); центрифуга (Tehtnica); електрична пећ за жарење (Gefran 1200); UV-VIS спектрофотометар Cary Series 300 (Agilent Technologies, САД); апарат за дестилацију по Парнас-Вагнеру; Soxhlet-апаратура; полариметар (Carl Zeiss Jena DDR, модел 32.G580C, Немачка); полариметар Pol-1 (Optika, Италија); генератор азота (N2 MICRO, Италија); шејкер (ИКА, Немачка); HPLC уређај (Waters, САД); ICP AES-у Termo iCAP 6300 duo и Elementar Vario EL III CNS - Институт за земљиште, Београд; клијалиште (Plant growth chamber, Type: Eugc 250); Chris BETA 2-8 plus лиофиллизатор (Osterode, Немачка).

Највећи број хемијских реагенса, коришћених у раду, били су р.а. чистоће: метанол, J.T.Baker HPLC чистоће; 2,2-дифенил-1 пикрилхидразил (DPPH) (TCI, Токуо chemical industry CO, LTD, Јапан); 2,2-азино-бис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонил) диамонијумова со (ABTS); Trolox (6-хидроксил-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина) (Sigma Chemical Co., St. Luis. USA). Гална киселина; AlCl₃; Folin-Ciocalteu реагенс; рутин трихидрат; K₂S₂O₈ (Merck, Немачка); Стандард DL алфа-токоферол (Ehreustorfer Quality, Немачка). Сви остали примењени реагенси и хемијске супстанце су били аналитичке чистоће.

У раду су коришћени следећи раствори и хранљиве подлоге:

- Раствор Folin-Ciocalteu реагенса садржи смешу фосфоволфрамове (H₃PW₁₂O₄₀) и фосфомолибденове киселине (H₃PMo₁₂O₄₀) (биохемијски реагенс, комерцијални производ);
- Раствор Na₂CO₃ (20%, m/v);
- Радни раствор NaNO₂ (5%, m/v), припремљен је одмеравањем 5 g NaNO₂ и растварањем у нормалном суду од 100 cm³ дестилованом водом;
- Стандардни раствор галне киселине је припремљен на следећи начин: 0,5 g галне киселине се раствори у 10 cm³ 96% етанола, пренесе у нормални суд од 100 cm³ и допуни дестилованом водом до запремине 100 cm³. Добијена концентрација износи 5 mg cm⁻³. Од почетне концентрације прави се серија разређења 0,05 mg cm⁻³ до 1 mg cm⁻³, тако што се у тиквице од 50 cm³ пипетом додаје по 0,5 cm³; 1 cm³; 1,5 cm³; 2,5 cm³; 5 cm³; 7,5 cm³; 10 cm³ раствора галне киселине и допуни до запремине од 50 cm³ дестилованом водом;
- Радни раствор AlCl₃ (10%, m/v) припремљен је одмеравањем 18,11 g AlCl₃·6 H₂O и растварањем у нормалном суду од 100 cm³ дестилованом водом;
- Стандардни раствор рутина, концентрације 1 mg cm⁻³, припремљен је одмеравањем 0,0109 g рутин трихидрата и растварањем у 96%-ном етанолу у

нормалном суду од 10 cm³. Из овог раствора прављена је серија разблажења на основу чега је конструисана калибрациона крива;

- Радни раствор NaOH, $c=1 \text{ mol dm}^{-3}$, припремљен је одмеравањем одређене масе NaOH и растварањем у дестилованој води;
- Основни раствор DPPH•, $c=6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ припремљен је одмеравањем DPPH и растварањем у етанолу ($m \text{ DPPH} \cdot, g) = M(\text{ DPPH} \cdot) \cdot 6 \cdot 10^{-5} \cdot V$ мерног суда (L);
- Основни раствор Trolox-a, $c = 10 \text{ mM}$ је направљен у етанолу. Из овог раствора прављена је серија разблажења ($c = 1,0 \text{ mM} - 0,01 \text{ mM}$) помоћу којих је конструисана калибрациона крива;
- Стандард DL алфа-токоферол (vitamin E) – направљен је радни раствор растварањем у метанолу ($c=500 \mu\text{g ml}^{-1}$), а од њега је прављена серија стандардних раствора у опсегу ($500 - 0,13 \mu\text{g mL}^{-1}$);
- Таширо-индикатор добијен је мешањем 20 cm³ 0,04%-тног раствора метилцрвеног у апсолутном етанолу и 20 cm³ 0,02%-тног раствора метилплавог у апсолутном етанолу;
- Раствор Carrez I: 10,6 g K₄Fe(CN)₆·3H₂O у 100 mL воде;
- Раствор Carrez II: 30 g ZnSO₄ 7H₂O у 100 mL воде;
- Физиолошки раствор – физиолошки раствор је 0,85%, m/v раствор NaCl. Радни раствор је направљен растварањем 8,5 g NaCl у 1L дестиловане воде, затим стерилисан и чуван на температури од 4 °C до употребе;
- 10% m/v раствор DMSO-а (диметил сулфоксид) – радни расвтор је направљен растварањем DMSO-а у дестилованој води, затим је стерилисан и чуван на температури од 4 °C;
- Хранљиви агар (Торлак) је коришћен за пресејавање микроорганизама при њиховом одржавању, као и за добијање преконоћних култура од којих су прављене суспензије микроорганизама. 1L хранљиве подлоге садржи: пептон (15 g), месни екстракт (3 g), натријум хлорид (5g), калијум фосфат (0,3g), агар-агар (18 g). Коначна вредност рН је 7,3 на 25 °C. Припрема ове хранљиве подлоге је вршена суспендовањем 38 g суве подлоге у 1L дестиловане воде;
- Милер-Хинтон бујон (МНВ, Торлак) је коришћен као течна хранљива подлога за гајење бактеријских култура у експериментима за одређивање минималних инхибиторних (МИС) концентрација екстраката. 1L готове хранљиве подлоге садржи: месни екстракт (2g), казеин хидролизат (17,5g), штирак (1,5g). Коначна рН вредност је 7,4±0,2 на 25 °C. Хранљива подлога је припремана растварањем 21 g суве хранљиве подлоге у 1L дестиловане воде;
- Сабуроов декстрозни агар (Торлак) је коришћен као чврста хранљива подлога за гајење и одређивање броја плесни. 1L готове хранљиве подлоге садржи: пептон (10 g), декстрозу (40 g), агар (15 g). Хранљива подлога је припремана растварањем 65 g суве подлоге у 1L дестиловане воде;
- Сулфитни агар: 1L готове хранљиве подлоге садржи казеин-хидролизат (10 g), натријум-сулфит (0,5 g), гвожђе (III) – цитрат (0,5 g), агар (15 g). Хранљива подлога је припремана растварањем 26 g суве подлоге у 1L дестиловане воде;
- Ендо-агар за одређивање присуства *E.colli*: 1L готове хранљиве подлоге садржи: пептон - 4 (10 g), лактозу (10 g), калијум-хидрогенфосфат (3,5 g), натријум-сулфит (2,5 g), агар (15 g), фуксин (0,4 g). Хранљива подлога је припремана растварањем 41,4 g суве подлоге у 1L дестиловане воде;
- СС агар за одређивање присуства *Salmonella*: 1L готове хранљиве подлоге садржи: пептон (5 g), месни екстракт(5 g), лактозу (10 g), жучне соли (8,5 g), натријум-цитрат (8,5 g), натријум-тиосулфат (8,5 g), гвожђе (III) - цитрат (1 g),

агар (13,5 g), неутрал црвено (0,02 g), брилијант зелено (0,00033 g). Подлога је припремана растварањем 60 g суве хранљиве подлоге у 1L дестиловане воде. Хранљива подлога је остављана да одстоји 15 минута, загревана на решоу до кључања, ради потпуног растварања, а затим хлађена на 50°C и разливана у Петри-шоље;

- Третман за све хранљиве подлоге, осим за СС агар, био је исти и обухватао је следеће: подлоге су остављане да одстоје по 15 минута, након чега су загреване на решоу ради потпуног растварања и затим стерилисане у аутоклаву на 121 °C 20 минута;
- Раствор ресазурина је припремљен растварањем 270 mg ресазурина у 40 mL стерилне дестиловане воде.

5.2. Методе рада

Методолошка истраживања обухватила су неколико фаза:

1. Карактеризација семена пшенице

Одређен је хемијски састав у семену пшенице све три сорте: садржај воде, укупни протеини, скроб, укупне сирове масти, пепео, укупни угљени хидрати; извршена ултразвучна екстракција активних компоненти помоћу више растварача; одређена количина укупних фенола и флавоноида; испитивана антиоксидативна активност (DPPH, ABTS) и одређен садржај α -токоферола HPLC методом; одређен минерални састав ICP методом. За све анализе коришћено је зрно у млевеном облику (до гранулације 0,5 mm) – слика 14.



Слика 14. Самлевени узорци семена пшенице

2. Наклијавање семена и карактеризација добијених клијанаца

Пшенични клијанци су добијени наклијавањем пшеничног семена. Клијање је вршено према методи коју је описао Vale et al. (2014) са малим изменама. Чиста семена су испрана раствором водоник-пероксида (5% v/v) током 5 минута, затим испирани дестилованом водом у више наврата и натапана у води током 24 h у мраку (слика 15а). Натопљена семена су распоређивана на филтер папир у Петри-шоље, смештана у клијалиште и свакодневно је вршено влажење дестилованом водом (слика 15б).

За потребе различитих испитивања клијанци су добијени уз следеће режиме наклијавања:

Први циклус клијања се састојао из светлог режима (16 h, 25 °C) и тамног режима (8 h, 20 °C). Укупно време наклијавања је било 80 h (слика 18в). Добијени су клијанци

светло жућкасте боје чија је дужина била између 0,5 и 2 cm, механички су одвојени од остатка семена (слика 15г). Клијанци су лиофилизовани при следећим условима: 24 h, температура -60 °C, и притиску 0,011 mbar, на лиофилизатору (Chris ВЕТА 2-8 plus) на Технолошко-металуршком факултету у Београду. Леофилизовани клијанци су самлевени и чувани у затвореним стакленим посудама на -20 °C (слика 16, лево).

Други циклус клијања је вршен на температури од 20 °C у мраку. При овим условима пшенично семе сорти Ренесанса, Симонида и НС-40С је наклијавано два пута, први пут 5 дана или 120 сати, при чему су клијанци имали дужину од 1,5 до 3 cm, а други пут 6 дана, односно 144 сата и клијанци су достигли дужину између 2,5 и 4 cm. Клијанци добијени наклијавањем у мраку, старости 5 и 6 дана, сушени су у струји топлог ваздуха на 60 °C (14 h), затим самлевени и чувани на -20 °C. Имали су светло-браон боју (слика 16, десно).



Слика 15. Припрема узорака пшеничних клијанаца: а – потапање семена у води, б – наклијавање семена у клијалишту, в – изглед клијанаца, г – механички одвојени клијанци

За све анализе добијени клијанци су коришћени у млевеном облику .



Слика 16. Изглед клијанаца сушених лиофилизацијом (лево) и сушених у струји топлог ваздуха (десно)

Испитивани су пшенични клијанци, добијени у различитим условима наклијавања, како би се дефинисали најбољи услови наклијавања семена: одређивана је количина укупних фенола, антиоксидативна активност (DPPH- и АВТS-методом), садржај α -токоферола (HPLC методом), минерални састав клијанаца (добијени наклијавањем у трајању од 5 дана) и антибактеријска активност екстракта клијанаца добијених наклијавањем у трајању од 5 дана.

3. Добијање пшеничних изданака и њихова карактеризација

Млада пшенична трава/изданци добијена је сејањем пшеничног семена (слика 17). Семе је најпре испирано H_2O_2 (5%, v/v) у времену од 5 минута, затим дестилованом водом, након чега је остављано у дестилованој води у мраку 6 h (слика 18).



Слика 17. Пшенични изданци/трава

За сетву је коришћен супстрат Еко-хумус (произвођач Еко-фарма Ковачевић, Горњи Милановац). Супстрат је имао следеће хемијске карактеристике: $\text{pH}=6-6,7$; органска материја 59,79%; минералне материје 37,96%, $\text{N} - 2,08\%$, $\text{P}_2\text{O}_5 - 0,75\%$, $\text{K}_2\text{O} - 0,77\%$, $\text{C/N} - 10,55$. Млада пшенична трава је гајена под дефинисаним условима: дан/ноћ, 16/8h, 25/20 °C. За ултразвучну екстракцију фенола, флавоноида и антиоксидативну активност, као и за одређивање садржаја фотосинтетички пигмената (спектрофотометријски) коришћени су свежи изданци пшеничне траве, сечени 5., 8. и 11. дана од ницања.



Слика 18. Припрема узорка пшеничне траве: испирање семена са H_2O_2 , засејавање, развој траве у клијалишту (горе), припрема траве за екстракцију, ултразвучна екстракција и спектрофотометријска анализа добијених екстраката (доле)

Пшенична трава, сечена 8. дана од ницања, осушена и самлевена коришћена је за одређивање садржаја макро- и микроелемената, као и за припрему екстраката за одређивање минималне антибактеријске концентрације.

4. Анализа сировина за припрему кекса

Следећи део експеримента подразумевао је анализу појединих сировина, коришћених у изради кекса: брашно, клијанци и пшенична трава у прашкастом облику. У брашну је одређиван садржај влаге, протеина, масти, пепела, док су у клијанцима и пшеничној трави одређени и укупни феноли, α -токоферол и антиоксидативна активност.

5. Добијање и анализа кекса

За ручну производњу кекса коришћене су следеће сировине:

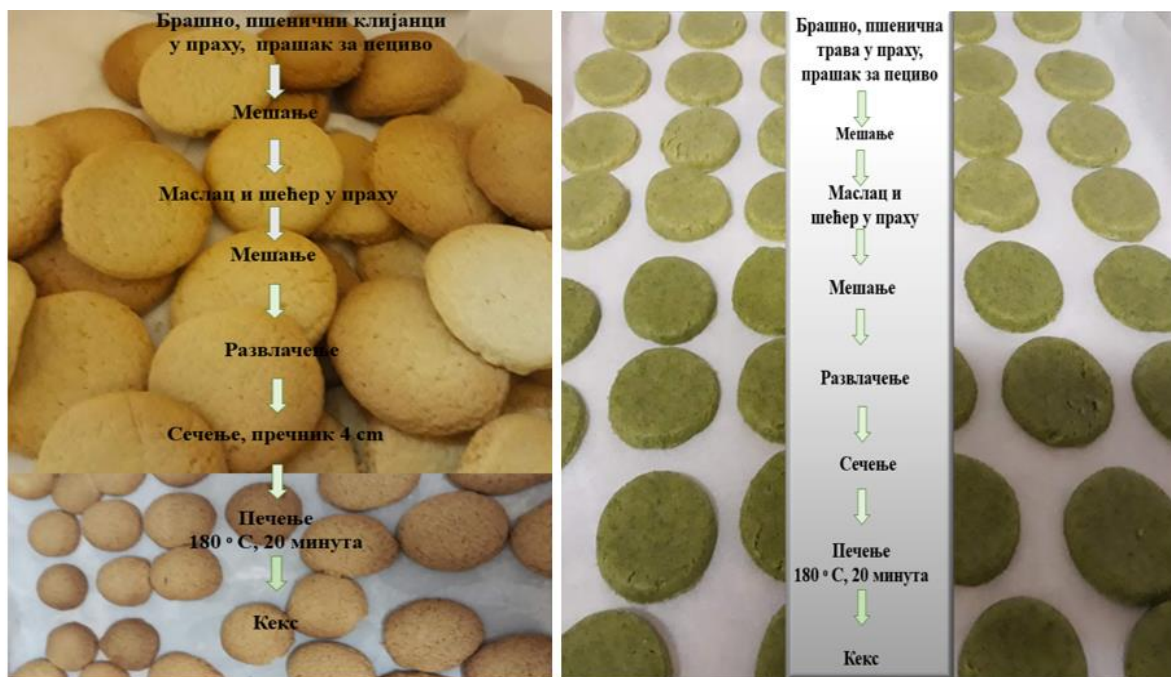
- пшенично бело брашно тип „500“ (произвођач „Данубиус“, Нови Сад);
- шећер у праху (произвођач „Центропроизвод“, Београд);
- масноћа - маслац (произвођач „Имлек“, Београд);
- сода бикарбона (произвођач „Центропроизвод“, Београд);
- прашак за пециво (произвођач „Центропроизвод“, Београд);
- вода за пиће.

Садржај коришћених састојака у кексу дат је у табели 2. Тесто је припремано на следећи начин: путер и шећер у праху су првобитно измешани, а затим им је додато брашно, прашак за пециво, сода бикарбона и вода (контрола). Замес је остављен да одстоји 20 минута на температури од 4 °С. Тесто је развучено на дебљину око 4 mm и обликовано калупом кружног облика, чији је пречник износио 40 mm. Печење обликованог теста вршено је на температури од 180 °С, 20 минута. Након печења, кекс је охлађен на собној температури и запакован у полиетиленску амбалажу.

Табела 2. Садржај састојака коришћених у производњи кекса од пшеничног брашна делимично супституисаног прашкастим формама пшеничних клијанаца/пшеничне траве

Састојци (g)	Контрола	2,5%	5%	7,5%
Пшенично брашно	100	97,5	95	92,5
Прах пшеничних клијанаца/прах пшеничне траве	-	2,5	5	7,5
Шећер у праху	50	50	50	50
Путер	38	38	38	38
Сода бикарбона	0,5	0,5	0,5	0,5
Прашак за пециво	0,5	0,5	0,5	0,5
Вода	20	20	20	20

Исти поступак је примењен за прављење кекса од пшеничног брашна, делимично супституисаног различитим количинама (2,5; 5 и 7,5%) прашкастих форми пшеничних клијанаца или пшеничне траве (однос је наведен у табели 2). Експеримент је садржао контролу и 3 варијанте са пшеничним клијанцима у праху и 3 варијанте са пшеничном травом у праху (слика 19).



Слика 19. Шематски приказ израде кекса

У кексу је одређен основни хемијски састав: садржај воде, протеина, масти, скроба и пепела. Анализе су вршене у првој недељи након печења кекса. Одређен је утицај супституената на хемијске карактеристике кекса, као и на садржај укупних фенола, α -токоферола и антиоксидативни потенцијал кекса. Анализе су вршене током два дана у првој недељи након печења. Осим тога, одређен је и садржај фенола и антиоксидативни потенцијал кекса, са и без супституената, након 7 месеци складиштења. За све анализе су коришћени самлевени узорци (слика 20).



Слика 20. Самлевени узорци кекса са пшеничним клијанцима (лево) и са пшеничном травом (десно)

Поред хемијских анализа праћен је и микробиолошки квалитет добијених производа у периоду од 48 сати након печења, затим на сваких 30 дана, током периода од 7 месеци (210 дана).

5.2.1. Одређивање хемијског састава семена пшенице, клијанаца, пшеничне траве и кекса

Одређиван је основни хемијски састав семена пшенице, клијанаца, пшеничне траве и кекса: садржај сирових протеина, масти, скроба, пепела и влаге одређен је према методама прописаним у „Правилнику о методама физичких и хемијских анализа за контролу квалитета жита, млинских и пекарских производа, тестенина и брзо смрзнутих теста“ (Сл. лист СФРЈ, бр. 74/1988). Садржај влаге и пепела одређен је гравиметријски, сирових протеина – методом по Кјелдалу, микро-поступак, скроба – полариметријски, а масти по Soxhlet-у.

5.2.1.1. Одређивање суве материје

У претходно осушен и измерен вегеглас, унесено је 2 g узорка, који је сушен у сушници најмање 16 h на 105 °С. Након сушења вегеглас је затворен поклопцем и хлађен у ексикатору око 1h. Мерење је вршено након вађења вегегласа из ексикатора, уз поновно враћање на сушење 30–60 минута док није постигнута константна маса (Рајковић i sar., 1983). Анализа је понављана (са истим узорком) најмање 2 пута.

5.2.1.2. Одређивање садржаја пепела

Од припремљених, самлевених и осушених узорака, познате влаге, одмеравано је по 5–6 g узорка – за узорке где се очекивао мањи садржај пепела од 1%, и 2–3 g за узорке где се очекивао виши садржај пепела од 1%. Узорци су растресито распоређени у слоју једнаке дебљине у претходно ижарене, охлађене и измерене посуде за спаљивање. Ради уједначеног сагоревања садржај је преливан са по 1 до 2 mL H₂O₂. Посуде са одмереним узорцима најпре су загреване на електричној грејној плочи, при чему се водило рачуна да се не појави пламен. Сагоревање је вршено до потпуног угљенисања. Када је садржај у посудама угљенисан, посуде су унете у пећ загрејану до температуре од 580°С. Узорци су жарени 10–12h. Сагоревање је завршено када је остатак након жарења постао беле боје. Након жарења посуде су вађене из пећи и хлађене 1 минут на терморезистентној плочи, а затим у ексикатору до собне температуре. Због хигроскопности пепела, узорак се брзо измери, са тачношћу 0,001 g.

5.2.1.3. Одређивање садржаја протеина методом по Кјелдалу (Keldahl-u)

Принцип методе по Кјелдалу (Keldahl-u) заснива се на загревању и разарању органске супстанце са сумпорном киселином у присуству катализатора. Издвојени азот се преводи у амонијак и везује са киселином као амонијум-сулфат. Након додавања натријум-хидроксида, ослобађа се азот и дестилише у суд у коме се налази H₂SO₄ познате концентрације. Титрацијом се одређује количина преостале киселине. Од добијене количине азота (N), уз помоћ корективног фактора – 5,7, прерачунава се количина протеина у семену пшенице, а за садржај протеина у кексу, пшеничним клијанцима и пшеничној трави коришћен је корективни фактор 6,25.

Ова метода се користи за одређивање укупних протеина у житу и млинским производима.

Прибор: апаратура за одређивање азота по Парнас-Вагнеру (Parnas –Wagner)

Мерено је по 1 g фино уситњеног узорка и пренето у Кјелдалове балоне од по 100 mL. Додавано је по 0,5 g CuSO₄·5H₂O и 9,5 g K₂SO₄ а затим и 25 mL концентроване H₂SO₄. Смеша је добро промешана и загревана у уређају за разарање под углом од 45°. Загревање

је постепено појачавано до кључања. Садржај Кјелдаловог балона је повремено мешан да би се спаљивање убрзало. Спаљивање је трајало док садржина није постала бистра – плаво-зелена (слика 21). Након тога се настављало са кувањем још 15 минута. Садржај се хладио, разблаживао дестилованом водом до запремине од 50 mL. Након хлађења се преносио у мерне судове од 100 mL и допуњавао до црте. Узимао се аликвотни део од 20 mL и преносио у семимикро апарат за дестилацију по Парнас – Вагнеру. Левак се испирао са 2–3 mL воде, затим се додавало по 1–2 капи фенолфталеина и по 40 mL 33% раствора NaOH. Затварала се гумена цев испод левка, а отворао довод за водену пару. У пријемни суд испод кондензатора из бирете додавало се по 20 mL раствора H₂SO₄, концентрације 0,05 mol dm⁻³. Цев кондензатора је урађана у киселину.



Слика 21. Одређивање садржаја протеина методом по Кјелдалу

Након појаве прве капи дестилата, дестилација је трајала још 7 до 8 минута. Након тога цев кондензатора се вадилa из пријемног суда, а вишак сумпорне киселине се титрисао са 0,1 mol dm⁻³ раствором NaOH, уз таширо-индикатор (промена боје од љубичасте до слабо зелене).

5.2.1.4. Полариметријска метода за одређивање садржаја скроба

Скроб показује велику оптичку активност, па је због тога погодан за полариметријско одређивање. Да би се садржај скроба одредио полариметријски, потребно га је превести у растворно стање, што се постиже додатком хлороводоничне киселине. На резултат полариметријског одређивања скроба утичу и друге оптички активне супстанце, између осталих и шећери, па се оне одстрањују испирањем узорка хладном водом. Остале оптички активне супстанце талоче се применом различитих средстава за бистрење, као што су натријумфосфоволфрамат, базни оловоацетат, инфузоријска земља и други. Полариметријско одређивање скроба погодно је за анализу чистог скроба, као и намирница са великим садржајем скроба (брашно, хлеб, пециво, дијететска храна, сушени кромпир итд). У пракси се најчешће користи полариметријска метода за одређивање скроба по Еверсу (Ewers) или њена модификација, са корекцијом за растворљиве угљене хидрате (Ewers, 1908).

Принцип ове методе се заснива на мерењу угла скретања равни поларизоване светлости, на основу чега се може одредити садржај растворљивог скроба у узорку.

У мерни суд од 100 mL квантитативно се преноси по 5 g узорка познатог садржаја влаге (одмеравано са тачношћу ±0,1 mg) и додаје по 25 mL 1,124% раствора хлороводоничне киселине. Смеша је добро промешана, како у суспензији не би било грудвица. Након тога се додаје још по 25 mL исте хлороводоничне киселине, којом се испирају сви делови узорка заостали на зидовима мерног суда. Суспензије се након мућкања уносе у водено купатило са кључалом водом. Сви мерни судови се мућкају прва

три минута, а тачно 15 минута од уношења у водено купатило се ваде. Хидролиза се нагло прекида додавањем по 10 mL охлађене дестиловане воде. Након тога се врши потпуно хлађење под млазом воде. У охлађене мерне судове додаје се по 20 mL 25% раствора хлороводоничне киселине и по 2 mL Carrez I, након чега се садржај промућка, а затим се додаје и по 2 mL Carrez II и поново се садржај мућка. Мерни судови се допуњавају дестилованом водом до 100 mL и садржај се након мућкања филтрира преко сувог набораног филтер-папира. Потпуно бистрим филтратом се пуни цев полариметра. Очитава се угао скретања равни поларизоване светлости, уз натријумову лампу на полариметру (Carl Jena DDR, модел 32.G580C) – за семе и (Pol-1 Optika, Италија) – за анализу кекса (слика 22).



Слика 22. Поступак и апаратура за одређивања скроба

Садржај скроба се изражавао у процентима на суву материју узорка и израчунава се по следећој формули:

$$\text{садржај скроба (\%, m/m с. м.)} = \frac{\alpha \cdot 100 \cdot 100}{\alpha_d^{20} \cdot l \cdot m} \cdot \frac{100}{100 - V}$$

где су:

α – очитано скретање поларизоване светлости за испитивани узорак у °;

α_d^{20} – специфично скретање поларизоване светлости за одређену врсту скроба (за пшенични износи $182.7 \text{ }^\circ\text{cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dm}^{-1}$); l – дужина цеви полариметра (dm); m – маса узорка (g); V – садржај воде у узорку (% , m/m).

5.2.1.5. Одређивање садржаја масти методом по Соксхлету (Soxhlet)

Метода одређивања масти и уља по Соксхлету (Soxhlet) заснива се на растварању масних материја у појединим испарљивим органским растварачима, после чега се употребљени растварачи могу лако одстранити, а сирова уља која заостану суше се, хладе, мере и утврђује се њихова количина. Одређивање се заснива на екстракцији масних материја органским растварачима из жита, брашна и биљног материјала уопште. Петрол-етром се, поред естара тровалентног алкохола – глицерола, са вишим масним киселинама, екстрахују и сродне материје као што су фосфатиди, воскови и друге липофилне материје, пигменти и неки витамини. Овом методом се добија садржај такозване „сирове масти“.

Узорци од 5 g су завијани у филтер-папир и стављани у хилзне. Хилзне са узорцима су стављане у екстракционе делове апаратуре спојене са претходно осушеним балонима (2 h на $105 \text{ }^\circ\text{C}$) и хладњацима. С горње стране хладњака, помоћу левка, уливало се толико петрол-етра да се екстракциони део пунио и мало преливао у балон. Етар је при загревању испаравао а његове паре пролазиле су кроз екстракциони део, одлазиле у

хладњак где су се кондензовале, одакле су у облику капљица падале у екстракциони део, где се растварало уље из узорка. Када би се екстракциони део напунио етром, он се празнио сифонирањем и са масним материјама враћао поново у балон (слика 23).



Слика 23. Поступак и апаратура за одређивање садржаја масти

Екстракција укупних масти је трајала 7–8 h. После завршене екстракције хилзне су вађене из екстракционих делова апаратуре, етар предестилисао у екстракциони део и пре сифонирања одливао. Балони са уљем су уношени у сушницу 2 h на температури 105 °С. Након сушења држани су у ексикатору 40 минута и потом мерени.

5.2.2. Припрема екстраката

За одређивање утицаја растварача на екстраховање укупних фенола, флавоноида, као и добијање екстраката са највећим антиоксидативним потенцијалом у пшеничном семену, примењен је следећи поступак екстракције: одређена маса самлевоног узорка је екстрахована са различитим растварачима – вода, етанол 50% (v/v), етанол 96% (v/v), ацетон, 50% (v/v) ацетон у односу биљни материјал: екстракционо средство 1:10. Екстракција је вршена у ултразвучном купатилу на 25–30 °С, 30 минута у ерленмајерима запремине 100 mL. Суспензија је филтрирана кроз Whatman No.1 филтер-папир, центрифугирана 10 минута на 5000 o/min и супернатант је одвојен и држан у тамни на 4 °С. Сва одређивања су вршена из супернатанта.

Да би се испитао утицај екстракционог поступка на садржај екстрахованих укупних фенола, уз ултразвучну екстракцију, примењена је и екстракција у воденом купатилу на 70 °С, извођена у две етапе. У првој етапи екстракција је трајала 10 минута, затим је вршено центрифугирање и одвајање супернатанта. У другој етапи вршена је поновна екстракција заосталих фенолних једињења, центрифугирање, одвајање супернатанта и његово спајање са супернатантом добијеним у првом кораку. Збирно посматрајући, ова два примењена начина екстракције била су различита: први – ултразвучна екстракција уз 70% етанол у трајању од 30 минута, при чему је однос између чврсте и течне фазе био 1:10 и други начин: екстракција у воденом купатилу на температури 70 °С, у два наврата, уз 70% етанол и однос између чврсте и течне фазе од 1:100.

Поступак ултразвучне екстракције, али уз 50% (v/v) ацетон као екстрагенс, примењен је и за добијање екстраката из семена пшенице сорти Симонида, Ренесанса и НС-40С, пшеничних клијанаца, пшеничних изданака/пшеничне траве и кекса. У екстрактима је одређен садржај укупних фенола, флавоноида и антиоксидативног капацитета.

Припрема екстраката пшеничних клијанаца и пшеничне траве за испитивање антибактеријске активности вршена је на следећи начин: осушени и уситњени биљни материјал екстрахован је употребом органских растварача (етанола и хексана) – за

пшеничне клијанце и етанола – за пшеничну траву, у односу 1:10. Екстракција се одвијала у току 24 h на тамном месту. Екстракција је у првих 30 минута предвиђеног времена вршена у ултразвучном купатилу. Након филтрирања вршено је упаравање екстракта у вакууму у атмосфери N₂ (Nitrogen generator, MICRO, Italy) у воденом купатилу при температури воде од 60 °C. Екстракти су чувани на хладном и тамном месту.

5.2.3. Одређивање садржаја биолошки активних материја у семену пшенице, клијанцима, пшеничној трави и кексу

За одређивање концентрације фотосинтетичких пигмената, укупних фенола, флавоноида и антиоксидативне активности (применом DPPH- и ABTS-методе) примењена је UV/Vis спектрофотометрија, док је садржај α-токоферола одређен HPLC методом.

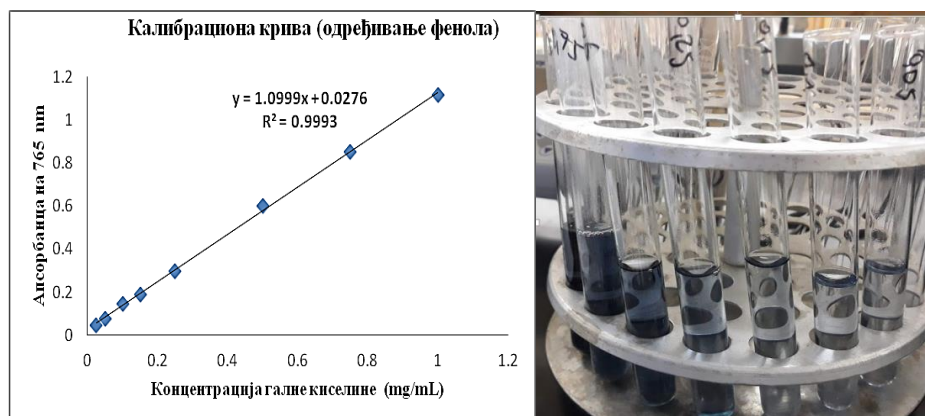
5.2.3.1. Одређивање укупних фенола

За одређивање садржаја укупних фенола у припремљеним узорцима коришћена је модификована колориметријска метода по Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965). Метода се заснива на оксидацији фенолних једињења помоћу реагенса, односно раствора Folin-Ciocalteu. Раствор Folin-Ciocalteu садржи смешу фосфоволфрамове и фосфомолибденске киселине. Овај реагенс оксидује фенолна једињења, а сам се редукује у смешу волфрам-оксида и молибден-оксида. Раствор постаје плаве боје, а интензитет раствора је сразмеран количини фенолних једињења, и мери се спектрофотометријски (Hudz et al., 2019).

Одређивање:

У стаклену епрувету одмерено је по 3,16 mL воде и микропипетом додато по 40 μL припремљеног узорка. Затим је додато по 200 μL Folin-Ciocalteu реагенса и добро мешано. Након 8 минута се додаје по 600 μL 20% воденог раствора Na₂CO₃ и добро промеша на вортексу. Смеша је остављана 2 сата на собној температури, а затим је мерена апсорбанца на 765 nm (референтни узорак је дестилована вода).

За израду калибрационе криве припремљен је основни раствор галне киселине, концентрације 5 mg mL⁻¹. Прављена је серија разређења (1 mg mL⁻¹ – 0,05 mg mL⁻¹), при чему је поступак био идентичан као код анализе узорка, уз додатак стандарда одређене концентрације уместо узорка.



Слика 24. Калибрациона крива за одређивање укупних фенола

Користећи калибрациону криву стандардног раствора галне киселине, а на основу измерених апсорбанци узорака, добијена је концентрација C (mg mL^{-1}) галне киселине у узорку из једначине праве (слика 24).

$$Y = 1.0999X + 0.0276, R^2 = 0.9993,$$

Y – апсорбанца при 765 nm,

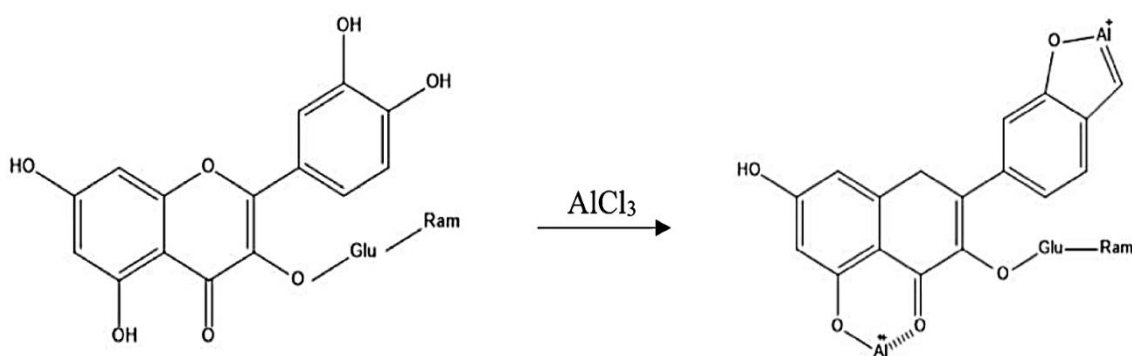
X – концентрација галне киселине (mg mL^{-1}),

R^2 – коефицијент детерминације.

Резултати су изражени у mg еквивалентима галне киселине (GAE) g^{-1} суве материје узорка у семену пшенице, клијанцима, трави или mg еквивалентима галне киселине (GAE) 100 g^{-1} суве материје у кексу. Спектрофотометријска мерења вршена су на UV-VIS спектрофотометру (Cary Series 300 Agilent Technologies).

5.2.3.2. Одређивање укупних флавоноида

Флавоноиди имају особину да са металима граде одговарајуће металне комплексе (Zhishen et al., 1999). Садржај укупних флавоноида одређиван је спектрофотометријском методом која се заснива на формирању комплекса између флавоноида и алуминијума (Ordonez et al., 2006). Посебно је значајан Al-комплекс приказан на слици 25.

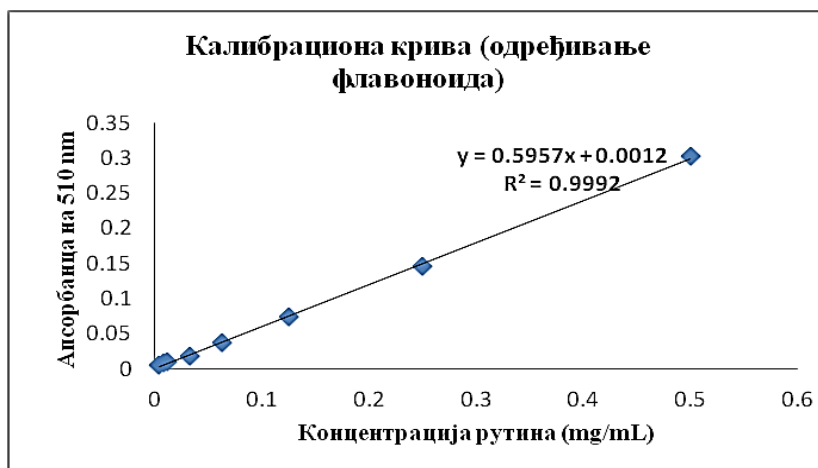


Слика 25. Структура рутина и његов комплекс са алуминијумом (кверцетин-3-О-рутинозидалуминат(III) комплекс)

Одређивање:

У 1 mL припремљеног узорка додавано је по 4 mL дестиловане воде, а након тога по 0,3 mL NaNO_3 (5%). После 5 минута додавано је по 0,3 mL AlCl_3 (10%), а минут касније по 2 mL 1M NaOH и допуњено дестилованом водом до 10 mL (2,4 mL). Све је добро мешано на вортексу. Апсорбанце су очитаване на 510 nm (референтни узорак био је дестилована вода).

За израду калибрационе криве (слика 26) припреман је основни раствор рутина, концентрације 1 mg mL^{-1} . Припремана је серија разређења ($1 \text{ mg mL}^{-1} - 0,08 \text{ mg mL}^{-1}$). На основу једначине калибрационе криве за рутин $Y = 0.595X + 0.0012$, $R^2 = 0.9992$, израчунаван је садржај (mg mL^{-1}) флавоноида у екстракционом раствору, који је превођен у садржај флавоноида у mg g^{-1} испитиваног узорка. Укупан садржај флавоноида изражен је као рутин еквивалент (mg RU g^{-1}).



Слика 26. Калибрациона крива за одређивање укупних флавоноида

5.2.3.3. Одређивање концентрације фотосинтетичких пигмената пшеничних изданака

Изолација хлорофила и каротеноида из зелених листова младе пшеничне траве вршена је по методи Lichtenthaler (1987). Екстракција је вршена 96% етанолом. Узорци од по 0,2 g исецканих свежих листова су потапани у по 10 mL етанола. Екстракција је вршена у воденом купатилу при $70\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1$, у трајању од 10 минута. Екстракције су вршене у три понављања. Садржај хлорофила и каротеноида одређиван је спектрофотометријски (слика 27). Забележене су вредности апсорбанце на три таласне дужине 470, 648 и 664 nm на UV-VIS спектрофотометру (Cary Series 300 Agilent Technologies).

Количина хлорофила и каротеноида у ($\mu\text{g mL}^{-1}$ раствора екстракта) израчунавана је помоћу одговарајућих формула.

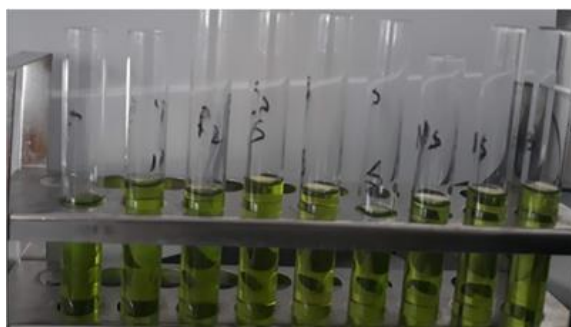
- 1) Укупна количина хлорофила:

$$C(a+b) = 5,24 \cdot A_{664} + 22,24 \cdot A_{648}$$
- 2) Количина хлорофила а:

$$C_a = 13,36 \cdot A_{664} - 5,19 \cdot A_{648}$$
- 3) Количина хлорофила б:

$$C_b = 27,43 \cdot A_{648} - 8,12 \cdot A_{664}$$
- 4) Укупна количина каротеноида:

$$C(x+c) = (100 \cdot A_{470} - 2,13 \cdot C_a - 97,64 \cdot C_b) / 209$$



Слика 27. Екстракција фотосинтетичких пигмената

Добјени резултати су представљени у mg g^{-1} суве материје.

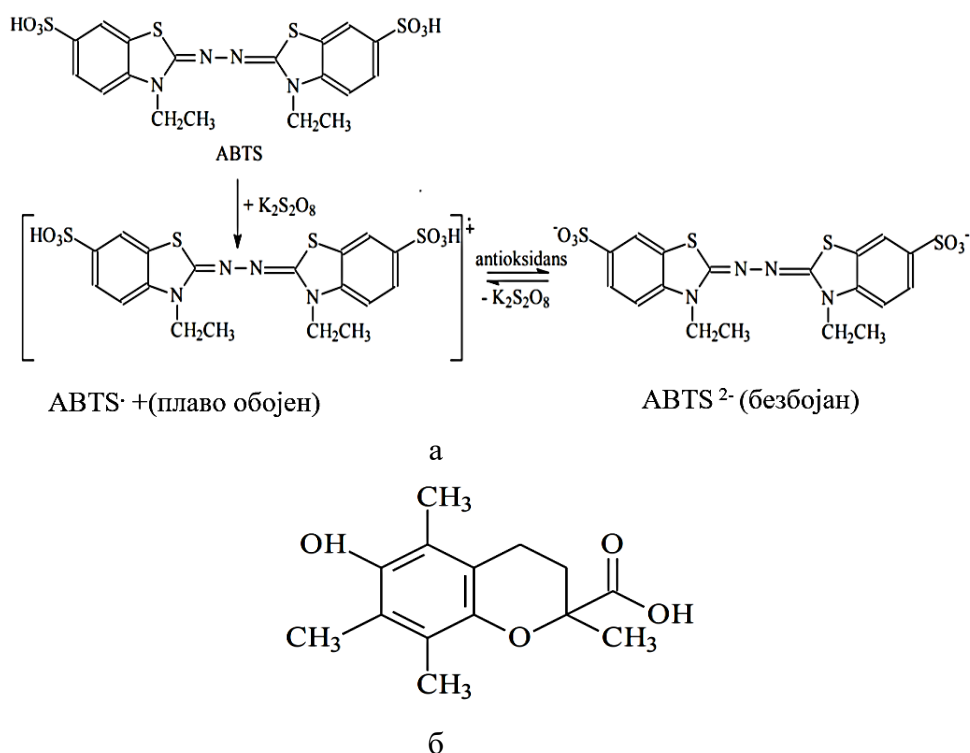
Однос хлорофила **a** и **b** израчунава се из количника вредности хлорофила **a** и хлорофила **b** (C_a/C_b), док се однос хлорофила и каротеноида израчунава из количника њихових укупних вредности $C(a+b)/C(x+c)$.

Однос масе зеленог материјала и етанола није константан, већ је препоручљиво да након екстракције хлорофила апсорбанца буде у одређеном опсегу, тј. треба водити рачуна да мерена апсорбанца не буде мања од 0,3, у том случају или концентровати узорак (упаравање) или користити већу масу биљног материјала, односно мању запремину растварача (Lichtenthaler, 1987).

5.2.3.4. Одређивање антиоксидативне активности

ABTS-метода

За одређивање антиоксидативне активности, применом ABTS-теста (*Total Equivalent Capacity assay*), коришћена је модификована метода (Re et al., 1999). Ова метода се заснива на „гашењу“ плаво-зеленог радикал-катјона 2,2'-азино-бис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонске киселине) ABTS-радикал катјон, који се формира хемијском или ензимском оксидацијом раствора ABTS-а. За оксидацију раствора ABTS-а коришћен је раствор калијум-персулфата. Удео ABTS-радикала који „гасе“ различити антиоксиданси у функцији је концентрације и времена и мери се праћењем апсорбанце ABTS радикала (слика 28a).



Слика 28a – механизам деловања ABTS-катјон радикала, б –Тролокс (6-хидрокси-2,5,7,8-тетрамтилхроман-2-карбоксилна киселина)

Основни раствор $\text{ABTS}^{\cdot+}$ је припремљен тако што се у водени раствор ABTS концентрације 7 mM, додавало онолико калијум-персулфата ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) колико је потребно

да би се добила концентрација $K_2S_2O_8$ од 2,45 mM. Пре употребе овај раствор је остављан да одстоји у мраку најмање 16 сати на собној температури и могао се користити у наредних пар дана. Овако припремљени основни раствор се разблаживао (око 80 пута) 95% етанолом, док није постигнута апсорбанца од $0,7 \pm 0,2$ на $\lambda=734$ nm, да би се добио радни раствор $ABTS^{+}$, при чему је референтни узорак дестилована вода. Ова вредност апсорбанце (АВ) је неопходна код каснијег прорачуна.

У припремљени радни $ABTS^{+}$ раствор (3 mL) додавано је по 30 μ L узорка који се хомогенизује мућкањем на вортексу у току 6 минута. Након тога је мерена апсорпција на 734 nm (референтни узорак је дестилована вода).

Израчунавање антиоксидативности

$$I(\%) = \frac{AB - AA}{AB} \cdot 100$$

где су:

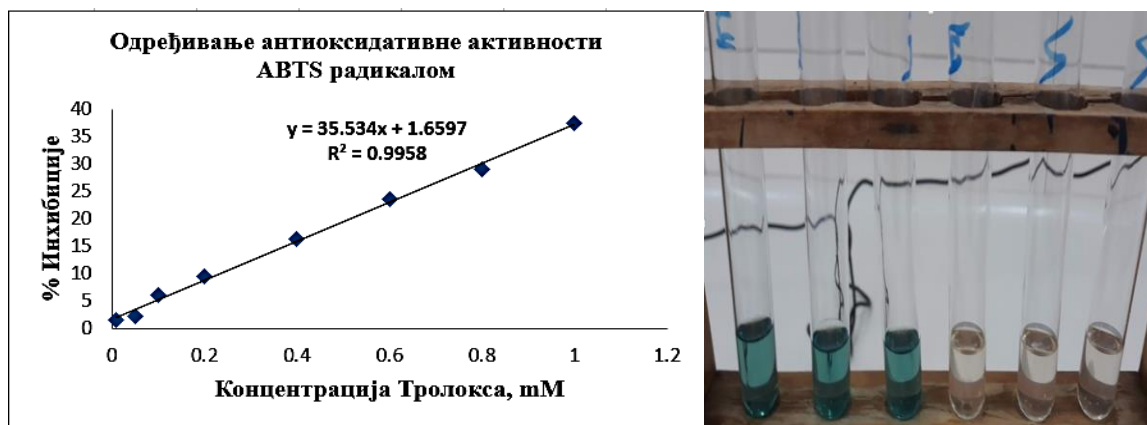
АВ – апсорбанца у времену $t=0$ min,

АА – апсорбанца након $t=6$ min,

I (%) – проценат инхибиције.

Добијена вредност I (%) је превођена у μ mol TE g^{-1} или μ mol TE $100g^{-1}$ анализираниог узорка.

За израду калибрационе криве (слика 29) припремљен је основни раствор Тролокса. По 30 μ L раствора Тролокса је мешано са по 3 mL $ABTS$ -раствора, а након хомогенизације мућкањем на вортексу у току 6 минута мерена је апсорбанца на 734 nm (Re et al., 1999).

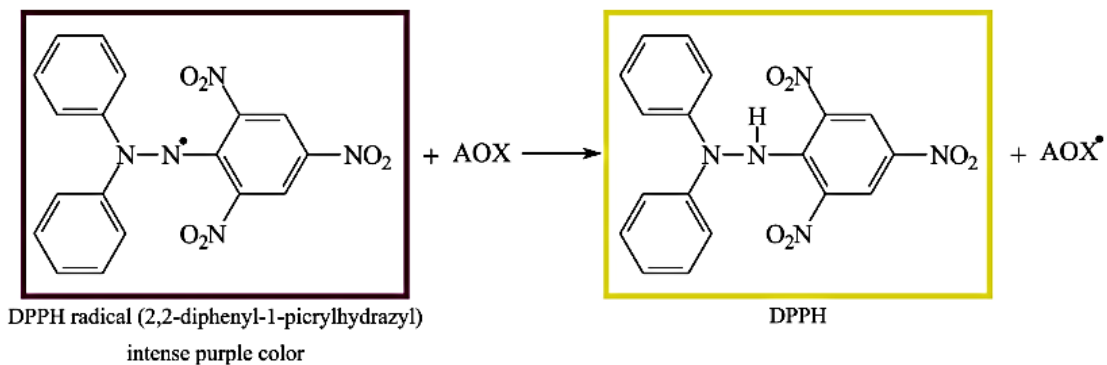


Слика 29. Калибрациона крива за одређивање антиоксидативне активности $ABTS$ радикалом

DPPH- метода, одређивање DPPH „скевинцер” активности

Капацитет хватања слободних радикала испитиваних узорака одређен је мерењем њихове способности да неутралишу DPPH- радикале (DPPH тест) (Brand-Williams et al., 1995).

Метода се заснива на праћењу трансформације љубичасто обојеног стабилног DPPH• радикала (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил) у редуковану жуто обојену форму DPPH-H (Sanchez-Moreno et al., 1998, 1999; Lacham et al., 2007; Turkoglu et al., 2007). Механизам промене боје приказан је на слици 30. Ниво смањења интензитета обојености раствора DPPH• радикала указује на „scavenging“ потенцијал антиоксидативних једињења.



Слика 30. Механизам неуталисања слободног радикала DPPH радикалом (Becker et al., 2019)

Припреман је раствор DPPH• у етанолу чија је концентрација била $6 \cdot 10^{-5} \text{M}$. У припремљени DPPH• раствор (3,9 mL) додавано је по 0,1 mL узорка и мешано на вортексу. Епрувете су остављане по 30 минута у мраку, након чега су мерене апсорбанце (AA) на 515 nm, а као референтни узорак користила се дестилована вода. Мерена је и апсорпција припремљеног DPPH• раствора без додатка узорка (AB).

Израчунавање антиоксидативности

Капацитет везивања слободних радикала (радикал „скевинцер“ капацитета) одређен је на основу следеће једначине:

$$I(\%) = \frac{AB - AA}{AB} \cdot 100$$

где су:

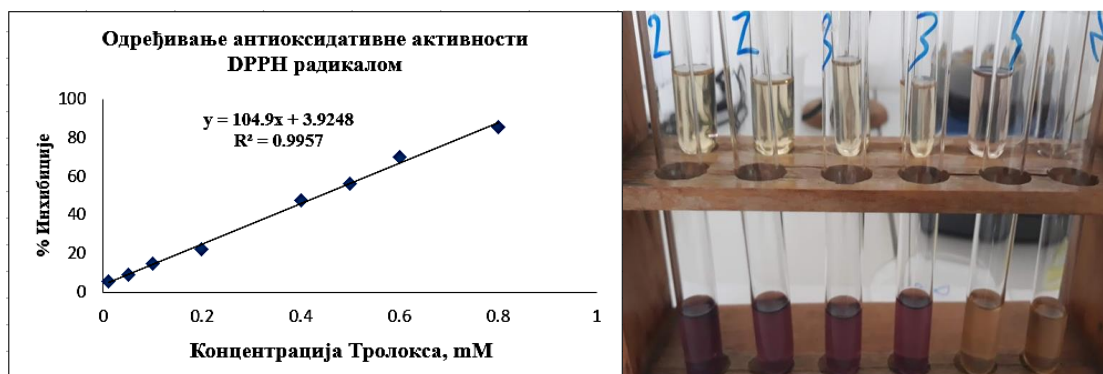
AB – апсорпција у времену $t=0$ минута,

AA – апсорпција након $t=30$ минута,

I (%) – проценат инхибиције.

Добијена вредност I (%) је превођена у $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ или $\mu\text{mol TE } 100\text{g}^{-1}$ одређиваног узорка.

За израду калибрационе криве припремљен је основни раствор Тролокса (слика 31).



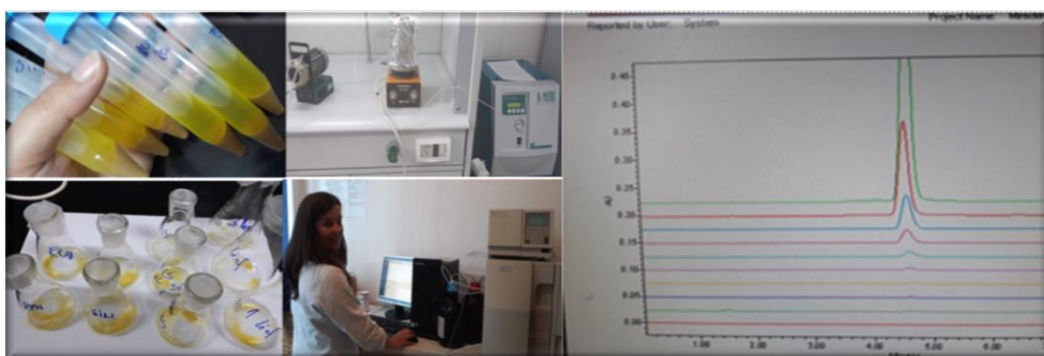
Слика 31. Калибрациона крива за одређивање антиоксидативне активности DPPH радикалом (лево) и промена боје из љубичасте у жуту након додавања узорка (десно)

По 0,1 mL разблаженог раствора Тролокса мешано је са по 3,9 mL DPPH• раствора, након хомогенизације на вортексу, епрувете су остављене у мраку 30 минута.

Апсорбанца је мерена на 734 nm, на UV-VIS спектрофотометру (Cary Series 300 Agilent Technologies).

5.2.3.5. Одређивање садржаја α -токоферола у семену пшенице, пшеничним клијанцима, пшеничној трави и кексу HPLC методом

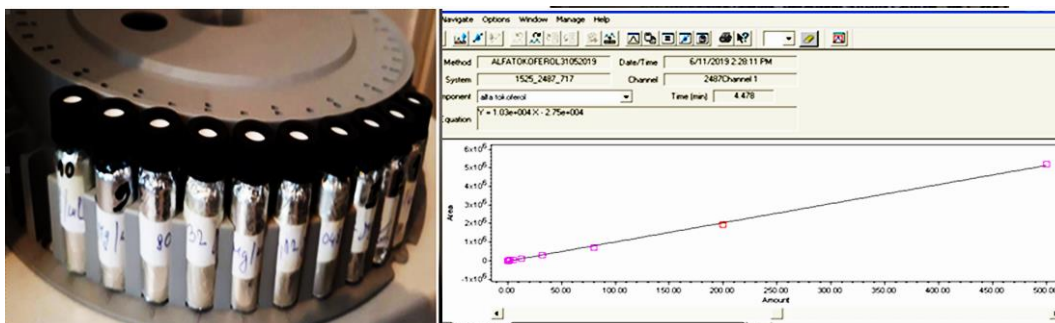
Припрема узорака за одређивање садржаја α -токоферола вршена је по методи Žilić i sar. (2014). Као екстракционо средство коришћен је *n*-хексан. Fino самлевени узорак семена пшенице и кекса, величине честице <500 μm и масе 1 g, помешан је са 10 mL *n*-хексана. Смеша је интензивно мешана при 2500 o/min (шејкер ИКА, Germany), на температури од $5\pm 1^\circ\text{C}$, 30 min. Узорци су затим центрифугирани 15 минута на 6000 o/min. Горњи слој је одвојан и упараван у атмосфери N_2 (Nitrogen generator, MICRO, Italy), одржавањем температуре од $70\pm 2^\circ\text{C}$ у воденом купатилу у одсуству светлости. Суви остатак након упаравања растворан је у 5 mL метанола и меша је интензивно мешана (шејкер ИКА, Germany) и центрифугирана 10 min на 5000 o/min. Припремљени раствори узорака у метанолу филтрирани су кроз најлонске филтре 0,45 μm (слика 32).



Слика 32. Припрема узорака и пикови стандарда α -токоферола концентрација од 0,13–500 mg mL^{-1}

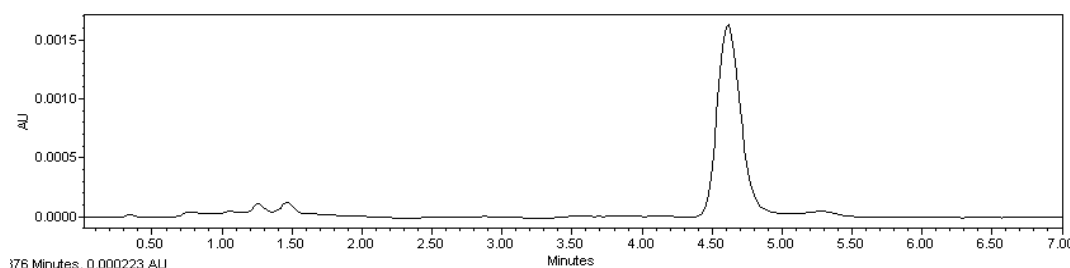
За припрему узорака пшеничних клијанаца и пшеничних изданака одмеравано је по 0,5 g прашкастих узорака који су мешани са 5 mL *n*-хексана. Мешање и центрифугирање вршено је као у поступку за припрему узорака семена пшенице. Након упаравања хексанског слоја, суви остатак је растворан у 2,5 mL метанола. Даљи третман био је исти као и код припреме узорака семена пшенице.

Садржај α -токоферола је одређен по методи Gimeno et al. (2000). Стандард α -токоферола растворен је у метанолу (HPLC чистоће) и чуван на -20°C у тамној вијали. Направљен је радни раствор ($c=500 \mu\text{g mL}^{-1}$), а од њега је прављена серија стандардних раствора у опсегу 0,13–500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Садржај α -токоферола је одређиван на HPLC (Waters, САД): binary pump 1525, Dual absorbance detector 2487, Autosampler 717, TCR3 Heater. Раздвајање је вршено на ODS2 Spherisorb колони (250x 4 mm, 5 μm), чија је температура одржавана на 45°C . Проток мобилне фазе износио је 2 mL min^{-1} (А: метанол, В: вода. А:В=96:4) у изократском моду. Детектовање α -токоферола вршено је на таласној дужини 292 nm. Калибрациона крива: $Y = 1,03e+0,04x - 2,75e+0,004$, $R^2=0.999$, приказана је на слици 33.

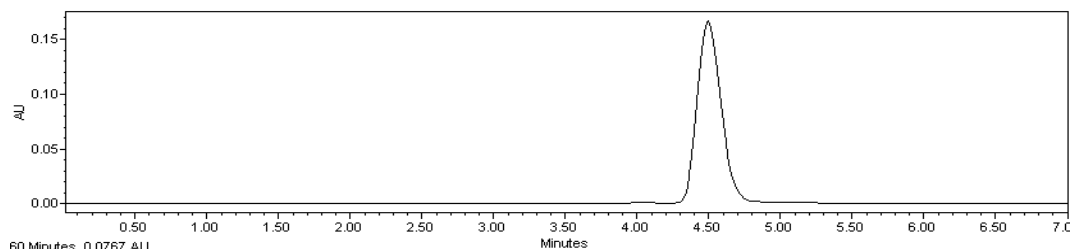


Слика 33. Постављање узорака у Autosampler и калибрациона крива

Подаци су обрађени помоћу софтверског пакета Empower. Пик стандарда се јављао између 4 и 5 минута (слика 34).



а



б

Слика 34. Хроматограми стандарда α -токоферола концентрације:
а – 2,048 mg mL⁻¹, б – 200 mg mL⁻¹

Садржај α -токоферола је изражен у $\mu\text{g g}^{-1}$ суве материје у семена пшенице, пшеничним клијанцима, пшеничној трави и у mg kg^{-1} суве материје у кексу.

5.2.4. Одређивање садржаја макро- и микроелемената у биљном материјалу

Садржај макро- и микроелемената одређен је у пшеничном семену сорти Ренесанса, Симонида и НС-40, као и њиховим клијанцима, добијеним наклијавањем у мраку на 20 °C, 120 сати/5 дана, и пшеничној трави, сеченој 8. дана од ницања.

Одмеравано је око 1 g биљног материјала. Након тога биљни материјал је разаран концентрованом HNO_3 и 30% H_2O_2 . Поступак се састојао у додавању 30 mL HNO_3 и два пута по 3 mL 30% H_2O_2 . Након разарања, раствор је цеђен и преношен у мерни суд од 50 mL који је допуњен дестилованом водом до црте (Kalra, 1997). Одређивање садржаја елемената је вршено техником Индуковане спрегнуте плазме на ICP AES-у Termo iCAP 6300 duo. Принцип методе се заснива на томе да узорак који се уводи у извор плазме испарава и разграђује се на слободне атоме и јоне. Сваки од присутних елемената у плазми се карактерише таласном дужином емисионе линије. Резултати су дати у mg kg^{-1} .

Садржај укупног азота (N) и угљеника (C) одређен је сувим спаљивањем у Elementar Vario EL III CNS. Садржај N и C је изражаван у %. Анализе су вршене у Институту за земљиште у Београду.

5.2.5. Микродилуциона метода одређивања минималне инхибиторне концентрације

Антибактеријска активност је тестирана одређивањем минималне инхибиторне концентрације (MIC), користећи микродилуциону методу, уз ресазурин као индикатор (Sarker et al., 2007). У сваки од 96 бунарчића микротитар-плоче унесено је по 50 μL Милер Хинтон хранљивог бујона (МНВ), а 50 μL раствора испитиваног екстракта је додато у први ред плоче. Затим је примењена метода двоструког разблажења. 10 μL разблажене бактеријске суспензије (концентрација бактерија од $5 \cdot 10^6$ CFU/mL) и 10 μL раствора ресазурин је додато у сваки бунарчић инокулисан бактеријама. Ресазурин је оксидационо-редукциони индикатор и користи се за процену раста микроба. То је плава нефлуоресцентна и нетоксична боја која постаје пинк и флуоресцентна када се редукује до ресоруфина оксидоредуктазама унутар живих ћелија (McNicholl et al., 2007). Инокулиране плоче су инкубирани на 37 °C током 24 h за бактерије. MIC је дефинисана као најмања концентрација испитиване супстанце која спречава промену боје ресазурин од плаве до пинк. Довицин (комерцијални антибиотик) је коришћен као позитивна контрола. Тест за растварач је изведен да проучи дејство растварача 10% DMSO на раст микроорганизама. Примењено је да 10% DMSO није инхибирао раст микроорганизама. Такође, концентрација DMSO је додатно смањена због двоструког серијског разблажења (радна концентрација је 5% и мања). Сваки тест укључује контролу раста и контролу стерилности. Сви тестови су изведени у дупликату и MIC су биле константне; у случају да су се разликовале примењен је строжији критеријум.

За испитивање антибактеријске активности екстракта коришћени су сојеви из ATCC колекције (American Type Culture Collection), који се и најчешће користе за испитивање ефикасности антимикуробних супстанци (*Gr*⁺ бактерије: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 43522, *Listeria ivanovii* ATCC 19119 и *Gr*⁻ бактерије: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 31488, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048).

5.2.6. Микробиолошка анализа кекса

Микробиолошка анализа кекса подразумевала је одређивање укупног броја аеробних мезофилних бактерија, укупног броја квасаца и плесни, укупног броја аеробних спорогених бактерија, као и присуства сулфиторедукујућих кластридија, *Escherichia coli* и *Salmonella* spp.

Микробиолошка анализа узорака кекса вршена је 48 сати након печења, а затим на сваких 30 дана у периоду од 7 месеци. Узорци за микробиолошку анализу су млевени у стерилним условима, до финог праха, а затим је припремано основно разблажење, мешањем 10 g узорка и 90 mL стерилног 0,85% NaCl. Након вортексирања - 5 минута на 3000 o/min, по 1 mL супернатанта је пренесено у 9 mL стерилног физиолошког раствора и тако редом до добијања одговарајућег разблажења.

За одређивање укупног броја аеробних мезофилних бактерија и укупног броја квасаца и плесни, узимано је по 1 mL из одговарајућег разблажења (основног и 10^{-1}), пренесено у стерилне Петри-шоље и наливено одговарајућом охлађеном агаризованом подлогом (45 °C).

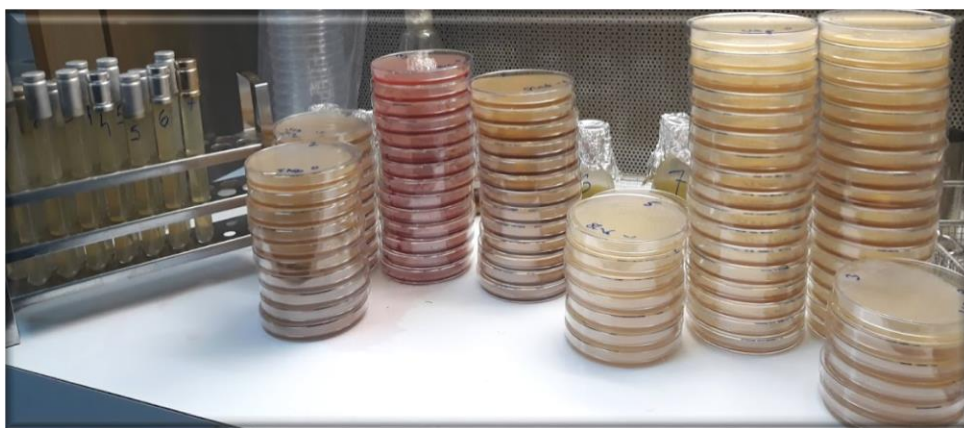
За одређивање броја спорогених бактерија основна разблажења узорка су загревана у воденом купатилу 10 минута на 80 °C, а затим је по 1 mL пренесено у Петри шоље и наливано охлађеним Хранљивим агаром (45 °C).

Одређивање присуства сулфиторедукујућих кластридија вршено је тако што су епрувете са 1 mL основног разблажења, загреване у воденом купатилу 10 min на 80 °C, а затим је у епрувете наливан сулфитни агар. Висина агара у епруветама је била > од 14 cm, а удаљеност агара од затварача < од 1 cm.

За одређивање присуства *Escherichia coli* и *Salmonella* spp. узето је по 1 mL из основног разблажења, унесено у стерилне Петри-шоље и наливано одговарајућом охлађеном агаризованом подлогом (45°C).

Након очвршћавања агара Петри-шоље су инкубиране у инкубатору:

- на 25 °C 3 до 5 дана за одређивање квасаца и плесни;
- на 37 °C, 24 h за одређивање *Escherichia coli* и укупног броја аеробних мезофилних бактерија;
- на 30 °C за одређивање укупног броја спорогених бактерија.



Слика 35. Микробиолошка анализа кекса

Резултати су изражени као број формираних колонија по граму узорка (CFU g⁻¹) за укупан број бактерија, плесни и квасаца. У случају *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. и сулфиторедукујућих кластридија, резултати се изражавају као присутно/одсутно у испитиваном узорку.

За одређивање укупног броја аеробних мезофилних и спорогених бактерија коришћен је хранљиви агар, за плесни и квасце Сабуро-декстрозни и сладни агар, за одређивање присуства *Escherichia coli* ендо-агар и *Salmonella* spp – СС агар. Све хранљиве подлоге су припремљене по произвођачкој спецификацији и изузев СС- агара, су стерилисане у аутоклаву на 121 °C у трајању од 20 минута.

5.2.7. Статистичка анализа резултата истраживања

Добијени резултати су обрађени методом анализе варијансе, једно- и двофакторијалног огледа (утицај трајања наклијавања на фитохемијска својства пшеничних клијанаца сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса), а значајност разлика одређена је LSD-тестом. Статистичке анализе су рађене коришћењем статистичког програма STATISTICA 12 (StatSoft, Inc. 2014) и GenStat 12. Корелациона анализа између садржаја укупних фенола и антиоксидативне активности кекса рађена је у Microsoft Excel-у. Добијени резултати у овом раду приказани су табеларно и графички.

6. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА И ДИСКУСИЈА

6.1. Хемијски састав семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса

У раду је анализиран хемијски састав семена три сорте пшенице – НС-40С, Симонида и Ренесанса ради њихове карактеризације. Хемијски састав је утврђиван на основу анализе садржаја протеина, сирових масти, скроба, пепела и суве материје (табела 3). Процентуално учешће протеина било је најмање код семена сорте НС-40С (13,21%), а највеће код семена сорте Симонида (13,80%). Садржај масти је био 1,52% код сорте НС-40С, 1,54% код сорте Симонида и 1,58% код сорте Ренесанса. У семену сорте Ренесанса је нађен најмањи (1,40%), а у семену сорте Симонида највећи садржај пепела (1,61%), односно минералних материја. Садржај скроба као најважнијег резервног полисахарида (Parker and Ring, 2001) и доминантне компоненте многих жита (McKevith, 2004; Goesaert et al., 2005) је варирао од 61,54 % код НС-40С до 63,47% код Ренесансе. Процентуално учешће укупних угљених хидрата било је највеће у семену сорте НС-40С (73,76), а најмање у семену сорте Симонида (72,54%).

Табела 3. Хемијски састав семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса

Компонента/садржај %	Семе пшенице		
	НС 40С	Симонида	Ренесанса
Влага	10,36	10,52	10,51
Протеини	13,21 _с	13,80 _а	13,50 _б
Липиди	1,52 _а	1,54 _а	1,58 _а
Пепео	1,55 _б	1,61 _а	1,40 _с
Скроб	61,54 _а	62,06 _а	63,47 _а
Угљени хидрати*	73,36	72,54	73,01

Подаци су изражени као средња вредност (n=2) у односу на суву материју.

Различито слово у истом реду значи да постоји статистички значајна разлика на нивоу ($\leq 0,05$) према LSD тесту. * 100 – (% влаге + % пепела + % протеина + % липида)

Генерално, семе сорте Симонида је имало значајно већи садржај протеина и минералних материја у поређењу са садржајем семена код остале две изучаване сорте пшенице. Испитиване сорте се нису статистички разликовале у садржају масти и скроба. Процентуално учешће скроба, укупних угљених хидрата и протеина у семену испитиваних сорти пшенице било је доминантно у односу на остале параметре њиховог квалитета и варирао је у оквиру граничних вредности, које наводе бројни други аутори (Belderok, 2000; Parker and Ring, 2001; McKevith, 2004; Goesaert et al., 2005; Šramková et al., 2009).

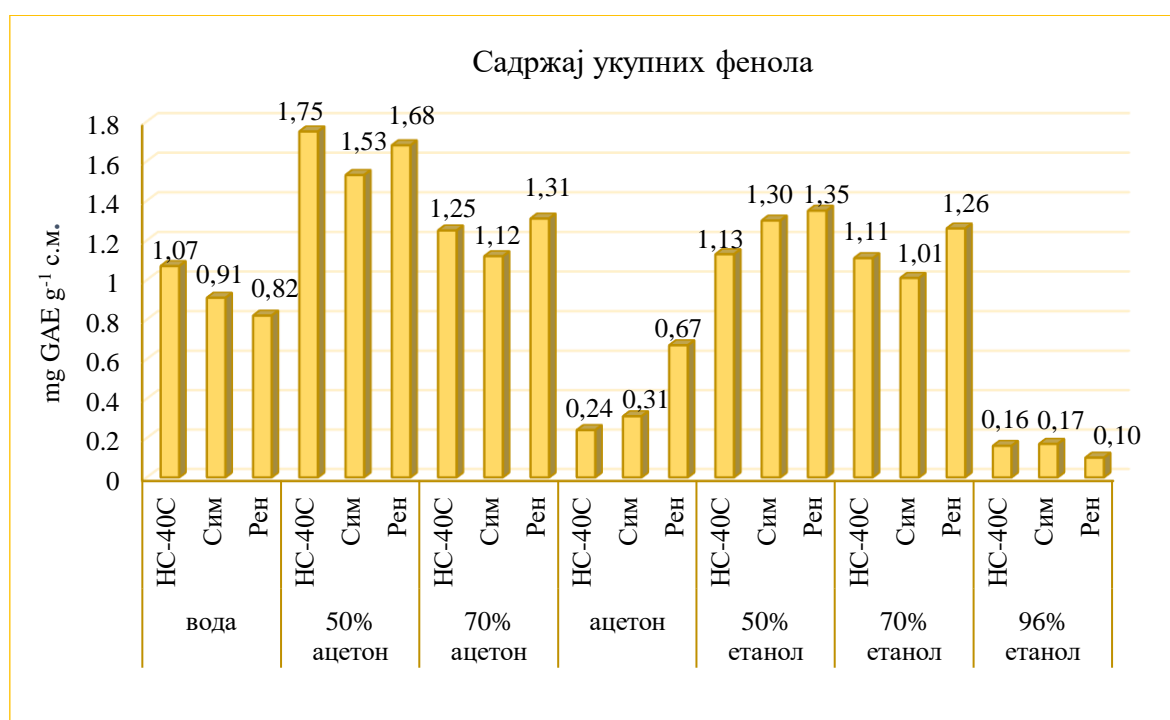
6.2. Утицај врсте растварача на ултразвучну екстракцију укупних фенола из семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса

Полифенолна једињења из биљног материјала могу се изоловати различитим поступцима екстракције. Поред начина екстракције, на количину изолованих једињења утиче и избор растварача (Moller et al., 1999). У овом експерименту примењена је ултразвучна екстракција, при чему су следећи параметри били константни: снага ултразвука, фреквенција ултразвучних таласа, трајање екстракције, температура, однос чврсте и течне фазе. Ради проучавања ефикасности екстракције различитих биолошки активних материја из семена пшенице (*Triticum aestivum*) сорти НС-40С, Симонида и

Ренесанса примењивани су различити растварачи: вода, 50%, ацетон, 70% ацетон, ацетон, 50% етанол, 70% етанол и 96% етанол.

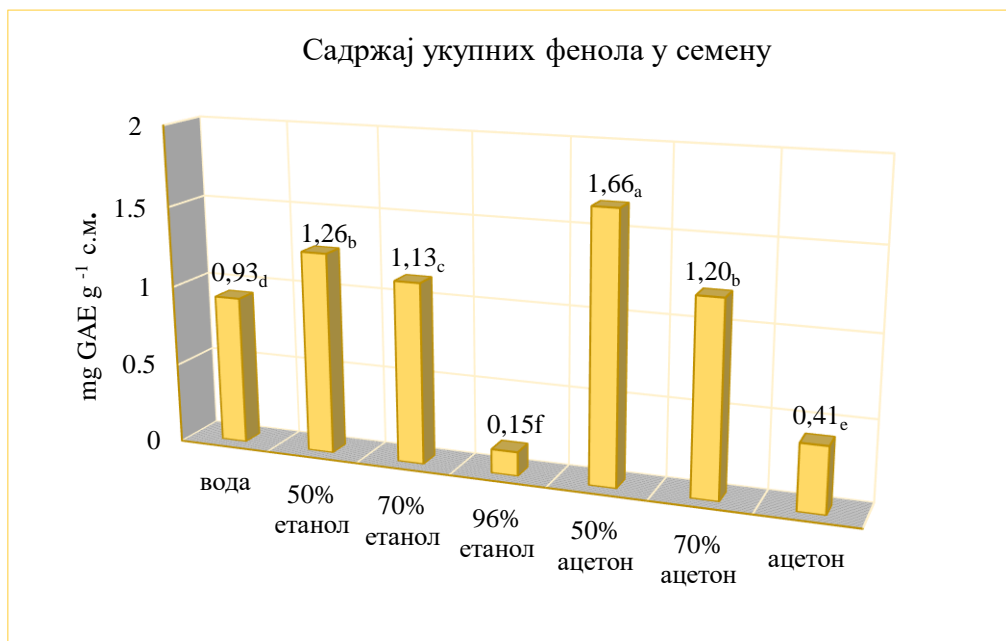
За квантитативно одређивање укупних фенола у биљном материјалу примењена је Фолинова метода, уз галну киселину као стандард (Singleton and Rossi, 1965). Добијени резултати су изражени у mg еквивалентима галне киселине (GAE) на грам суве материје (mg GAE g⁻¹ с.м), графикон 1а, 1б.

Из садржаја екстрахованих фенола из семена све три сорте пшенице (НС-40С, Симонида и Ренесанса) – графикон 1а, види се да је избор растварача имао значајан утицај на садржај екстрахованих фенола, при чему се као најбољи екстрагенс издвојио 50% ацетон (1,75; 1,53 и 1,68 mg GAE g⁻¹ с.м), затим 50% етанол (1,13; 1,30 и 1,35 mg GAE g⁻¹ с.м), 70% ацетон (1,25; 1,12 и 1,31 mg GAE g⁻¹ с.м), 70% етанол (1,11; 1,01 и 1,26 mg GAE g⁻¹ с.м), док су ацетон (0,24; 0,31 и 0,67 mg GAE g⁻¹ с.м) и 96% етанол (0,16; 0,17 и 0,10 mg GAE g⁻¹ с.м) испољили најмању ефикасност, мању и од воде као екстрагенса (1,07; 0,91; 0,82 mg GAE g⁻¹ с.м).



Графикон 1а. Утицај врсте растварача на ултразвучну екстракцију укупних фенола из семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса

Из графикона 1б, који приказује садржај просечно екстрахованих фенола из семена све три сорте пшенице, види се да је 50% ацетон био ефикаснији екстрагенс (1,66 mg GAE g⁻¹ с.м) од 50% етанола (1,26 mg GAE g⁻¹ с.м), 70% ацетона (1,20 mg GAE g⁻¹ с.м), 70% етанола (1,13 mg GAE g⁻¹ с.м), воде (0,93 mg GAE g⁻¹ с.м), ацетона (0,41 mg GAE g⁻¹ с.м) и 96% етанола (0,15 mg GAE g⁻¹ с.м), p<0,05.



Графикон 16. Просечне вредности укупних фенола екстрахованих са различитим растварачима из семена све три сорте пшенице

Из резултата ових истраживања види се да испитивани екстрагенси нису подједнако ефикасно екстраховали укупне феноле из семена пшенице, и да је додавање воде у коришћене раствараче (етанол и ацетон) условило већи интензитет екстракције укупних фенола, јер су водени растварачи ефикаснији у екстракцији укупних фенола у поређењу са њиховим одговарајућим апсолутним растварачима (Casace and Mazza, 2003; Othman et al., 2007; Li et al., 2012; Singh et al., 2012; Galanakis et al., 2013; D'Alessandro et al., 2014; Do et al., 2014; Dey и Kuhad., 2014; Abozed et al., 2014; Dahmoune et al., 2015; Smuda et al., 2018). Исто тако, физичке карактеристике растварача значајно утичу на укупан принос фенолних једињења.

Висока концентрација укупних фенола, екстрахованих 50% етанолом, могла би се објаснити тиме што ова врста растварача брже дифундује у поре биљног материјала и биљни материјал лакше испушта биоактивна једињења (Othman et al., 2007; López-Perea., 2019). Повећање концентрације етанола у етанолно-воденим смешама резултирало је повећањем екстракције фенолних једињења. Етанолно-водена смеша са 50% етанола (1,26 mg GAE g⁻¹ с.м), била је ефикаснија у односу на смешу са 70% етанола (1,13 mg GAE g⁻¹ с.м), и са даљим повећањем удела етанола у екстракционој смеси, садржај екстрахованих фенола се смањивао до 0,15 mg GAE g⁻¹ с.м. у 96% етанолу (графикон 16). Ова појава се објашњава чињеницом да повећање концентрације етанола, али само до одређеног нивоа, доводи до убрзаног продирања растварача кроз ћелијске мембране биљног ткива и веће ефикасности екстракције. Али, даље повећање садржаја етанола у смеси, мења поларност растварача, убрзава се екстракција примеса из биљног материјала, отежава се процес дифузије, а јавља се и коагулација протеина (Yang et al., 2009; Li et al., 2012). Сличан тренд у својим истраживањима су запазили Vucić-Kojić et al. (2009) и Drinić i sar. (2018).

6.3. Утицај примењеног екстракционог поступка на екстракцију укупних фенола из семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса

Ради испитивања утицаја екстракционог поступка на екстракцију укупних фенола из семена пшенице примењена су два начина екстракције који су испољили различиту ефикасност екстракције укупних фенола (табела 4).

Табела 4. Утицај екстракционог поступка на садржај екстрахованих укупних фенола из семена пшенице

Сорта	Садржај укупних фенола, mg GAE g ⁻¹ с.м.	
	Начини екстракције	
	Ултразвучна, 70% етанол	У воденом купатилу, 70 °С, 70% етанол
НС-40С	1,13 _б	3,44 _а
Симонида	1,01 _б	3,50 _а
Ренесанса	1,26 _б	2,88 _а
Просечно	1,13 _б	3,27 _а

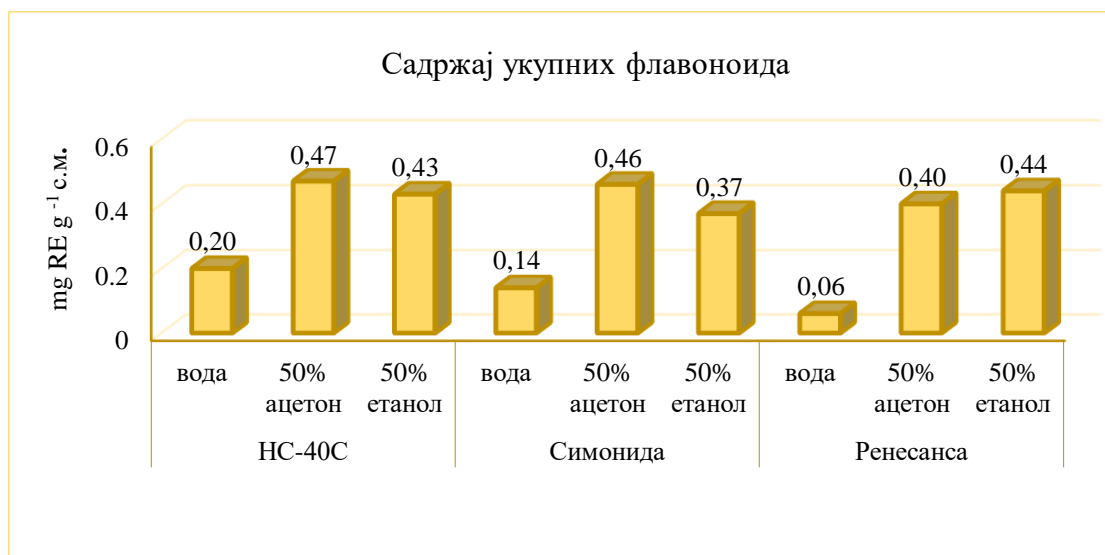
Резултати су приказани као средња вредност (n=3). Различито слово у истом реду, значи да постоји статистички значајна разлика на нивоу од p<0,01 према LSD тесту.

Из табеле се може видети да начин екстракције има значајан утицај на количину екстрахованих фенола, и да се екстракција у воденом купатилу на 70 °С, уз 70% етанол, показала као ефикаснији метод екстракције укупних фенола из семена свих сорти пшенице, у односу на ултразвучну екстракцију. При екстракцији у воденом купатилу садржај укупних фенола у семену пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса био је значајно већи (3,44; 3,50 и 2,88 mg GAE g⁻¹ с.м), него при ултразвучној екстракцији (1,13; 1,01 и 1,26 mg GAE g⁻¹ с.м), што је у складу са резултатима Zielinski and Troszinska (2000) који су утврдили да метода, трајање и температура екстракције утичу на садржај укупних фенола у семену житарица.

Анализом резултата је утврђено да је при екстракцији на 70 °С дошло до повећања садржаја фенолних једињења у екстракту, јер се са порастом температуре смањује вискозитет екстракционе смеше, растварач боље продире кроз биљни материјал у поре чврстог узорка, што резултира бржим преносом масе, растварањем једињења од интереса и побољшањем екстракције код дифузионо-зависних екстракционих процеса (Pavlić, 2017). Такође са порастом температуре јављају се и негативни ефекти, повећава се испарљивост растварача, а може доћи и до деградације фенолних једињења. Због тога је висина температуре лимитирана тачком кључања примењеног растварача и била је нижа од температуре кључања екстрагенса. С обзиром на то да се највећи део фенолних једињења у семену налази у везаном облику, загревање је довело до ослобађања дела везаних полифенолних једињења, што је условило прераспodelу односа слободних и везаних фенолних једињења и повећање садржаја екстрахованих фенола. Повећана температура доводи до нарушавања структуре ћелијске мембране и пуцања ћелијског зида, чиме се повећава екстрабилност полифенола везаних за компоненте мембране, ћелијског зида и ћелијског матрикса (Peleg et al., 1991; Dewanto et al., 2002; Jeong et al., 2004; Bucić-Kojić and cap., 2009; Blessington et al., 2010; Minatel et al., 2017).

6.4. Утицај врсте растварача на ултразвучну екстракцију укупних флавоноида из семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса

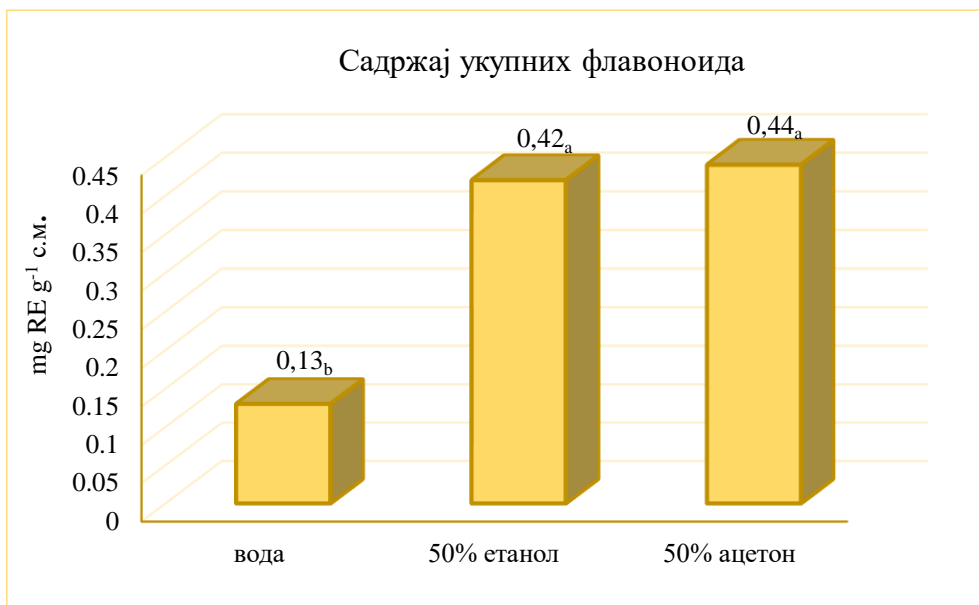
За квантитативно одређивање укупних флавоноида у семену пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса коришћена је метода са AlCl_3 , а резултати су изражени у mg RE g^{-1} с.м (графикон 2а, б)



Графикон 2а. Утицај врсте растварача, примењених при ултразвучној екстракцији, на количину екстрахованих флавоноида из семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса

Ултразвучна екстракција укупних флавоноида из семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса, уз примену 50% ацетона ($0,47$; $0,46$ и $0,40 \text{ mg RE g}^{-1}$ с.м) и 50% етанола ($0,43$; $0,37$ и $0,44 \text{ mg RE g}^{-1}$ с.м), била је значајно ефикаснија у односу на екстракцију помоћу воде ($0,20$; $0,14$ и $0,06 \text{ mg RE g}^{-1}$ с.м) – графикон 2а.

Сагледавајући просечне вредности садржаја укупних флавоноида, екстрахованих из семена свих сорти пшенице (графикон 2б) види се да су 50% ацетон и 50% етанол екстраховали приближно исте, али, у односу на воду као екстрагенс ($0,13 \text{ mg RE g}^{-1}$ с.м) значајно веће количине флавоноида ($0,44$; $0,42 \text{ mg RE g}^{-1}$ с.м). Ово стога, што се додавањем воде етанолу и ацетону повећава поларитет растварача и систем бива способан да екстрахује једињења ниске, средње и високе поларности, која чине велики део укупних флавоноида (Socaci et al., 2018).



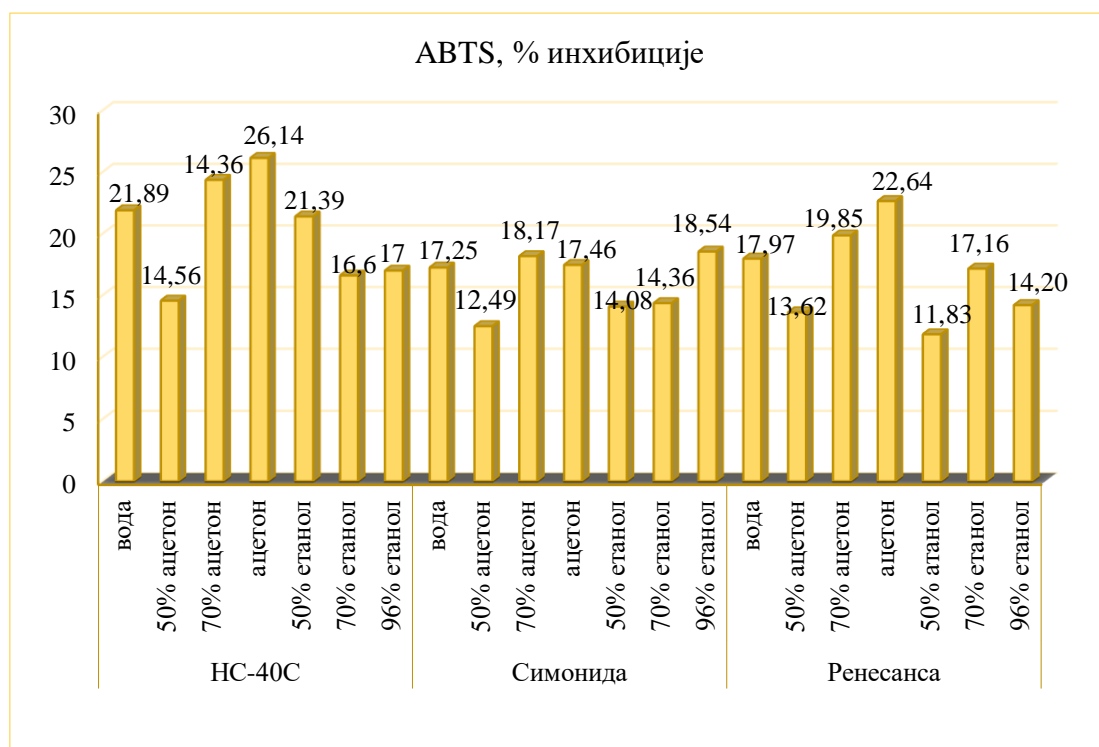
Графикон 2б. Утицај врсте растварача, примењених при ултразвучној екстракцији, на просечну количину екстрахованих флавоноида из семена све три сорте пшенице

6.5. Утицај растварача, примењених при ултразвучној екстракцији, на антиоксидативну активност екстраката из семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса

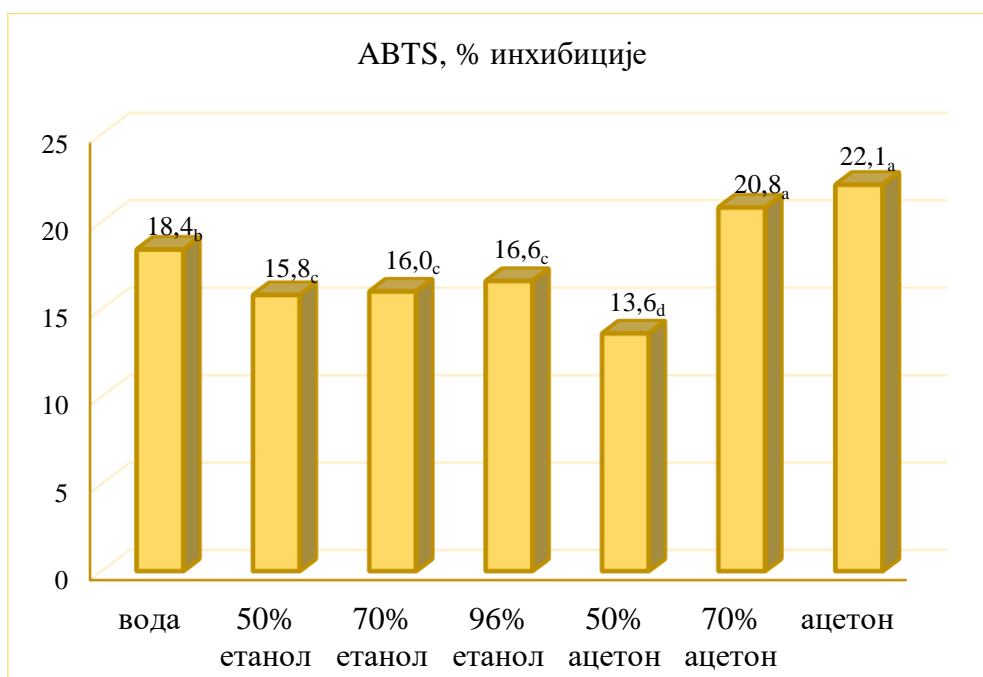
Антиоксидативна активност (АОА) екстраката, добијених из семена пшенице све три испитиване сорте пшенице, уз примену ултразвучне екстракције са различитим екстрагенсима одређивана је АВТС- (графикон 3а, 3б) и DPPH-тестом (графикон 4а, 4б).

Антиоксидативна активност екстраката семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса, уз примену АВТС-методе била је највећа у случају примене ацетона код сорти НС-40С (26,14%) и Ренесанса (22,64%) и 96% етанола код сорте Симонида (18,17%), а најмања при примени 50% ацетона код сорти НС-40С (14,56%) и Симонида (12,49%) и 50% етанола код сорте Ренесанса (11,83%). У случају примене DPPH-методе већа антиоксидативна активност екстраката семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса била је уз примену 96% етанола (5,20; 4,80 и 4,70%) у односу на ацетон (4,58; 4,30; 4,07%) – графикон 4а.

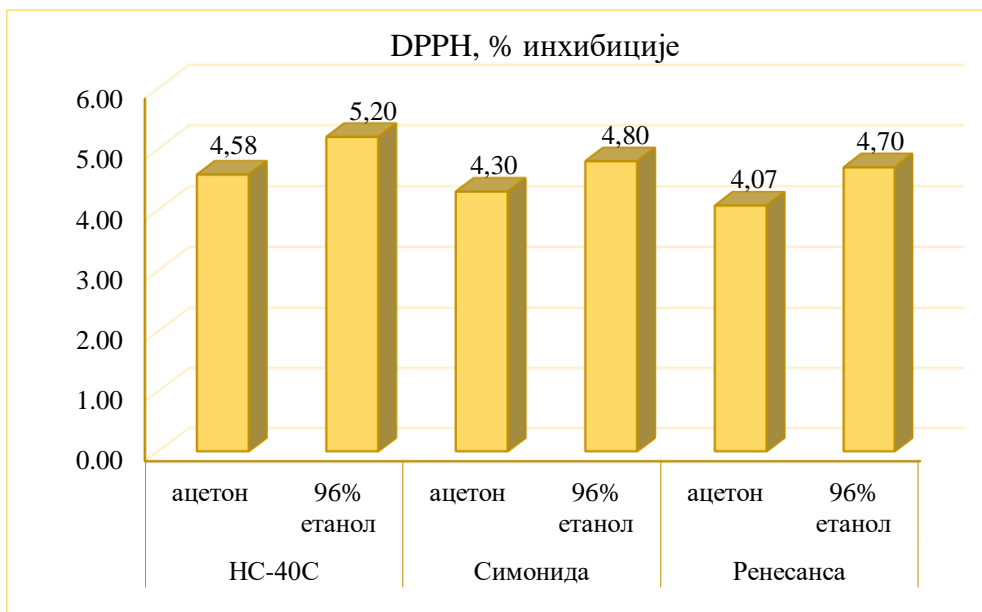
На основу просечних вредности антиоксидативне активности екстраката семена пшенице, испитиваних АВТС- и DPPH-методом (графикон 3б, 4б) може се констатовати да је антиоксидативна активност екстраката семена пшенице, мерена АВТС- методом, била највећа у екстрактима са применом ацетона (22,1%) и 70% ацетона (20,8%), а да је при примени DPPH-методе 96% етанолски екстракт испољио већу ефикасност (4,92%) од ацетонског екстракта (4,33%) – графикон 3б, 4б.



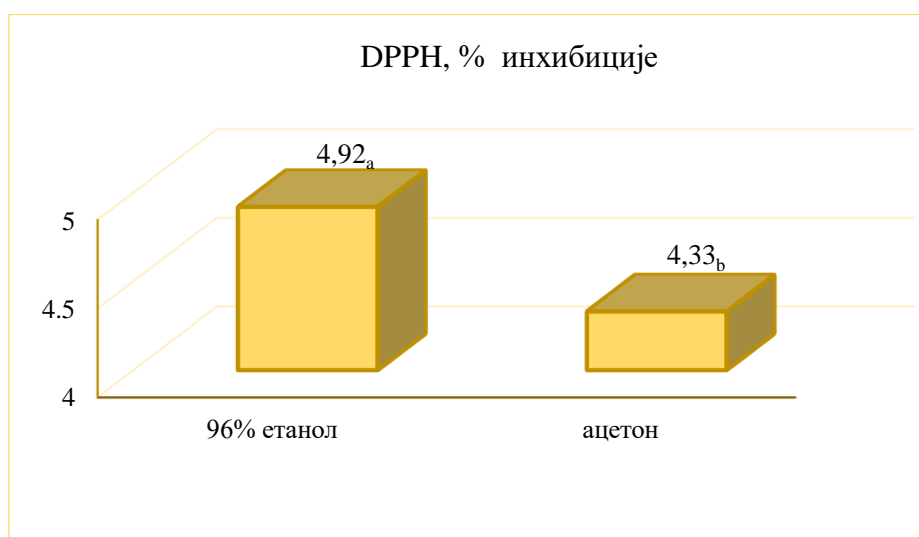
Графикон 3а. Утицај врсте растварача, примењених при ултразвучној екстракцији, на антиоксидативну активност семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса, мерену АВТS-тестом



Графикон 3б. Утицај врсте растварача, примењених при ултразвучној екстракцији, на просечне вредности антиоксидативне активности семена пшенице, мерене АВТS-тестом



Графикон 4а. Утицај врсте растварача, примењених при ултразвучној екстракцији, на антиоксидативну активност семена испитиваних сорти пшенице, мерене DPPH-методом



Графикон 4б. Утицај врсте растварача, примењених при ултразвучној екстракцији, на просечне вредности антиоксидативне активности семена пшенице, која је мерена DPPH-методом

Из добијених резултата се види да је антиоксидативна активност екстраката семена пшенице била већа при примени ABTS-методе, него при примени DPPH- методе, због тога што ABTS реагенс има већу реактивност и способност да реагује са широким спектром антиоксиданата (Kaneda et al., 1995; Stratil et al., 2007; Yang et al., 2007). ABTS метода је применљива на липофилне и хидрофилне антиоксиданте укључујући флавоноиде, хидроксицинамате и каротеноиде (Re et al., 1999), док се DPPH користи за процену антиоксидативне активности фенолних једињења. Фенолна једињења, у складу са хемијском структуром, различито се понашају у односу на радикале (Zhao et al., 2006), па отуда варијабилност антиоксидативне активности зависи од поларности фенолних

једињења и флавоноида. Kähkönen et al. (2001) су мишљења да укупан антиоксидативни потенцијал не зависи само од укупних фенола, већ и од других једињења, као што су токофероли, каротеноиди, аскорбинска киселина итд.

Потврду добијених резултата о утицају различитих растварача и типа екстракције на антиоксидативну активност налазимо и у радовима других аутора. С тим у вези резултати (Zhou and Yu, 2004; Pérez-Jiménez et al., 2008; Stefanello et al., 2018), указују да антиоксидативни потенцијал добијених биљних екстраката зависи од примењених растварача и антиоксидативног потенцијала једињења различите поларности, хемијске структуре, селективности и механизма деловања слободних радикала (Zhao et al., 2006; El-Sayed et al., 2008; Floegel et al., 2011; Lopez-Perea, 2019; Xu et al., 2019), синергистичке интеракције између фенола и једињења попут растворљивих угљених хидрата и протеина, као и синергизма између појединих антиоксиданата у матриксу (Vinson et al., 2001; Sun and Ho, 2005; Xu et al., 2019).

6.6. Садржај биоактивних материја у семену пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса

Из упоредног приказа садржаја укупних фенола, флавоноида, α -токоферола и антиоксидативне активности семена пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса (табела 5), екстрахованих уз 50% ацетон при ултразвучној екстракцији, види се да је садржај укупних фенола био од 1,53 mg GAE g⁻¹ с.м. у семену сорте Симонида, преко 1,69 mg GAE g⁻¹ с.м. у семену сорте Ренесанса, до 1,75 mg GAE g⁻¹ с.м. у семену сорте НС-40С.

Табела 5. Садржај укупних фенола, флавоноида, α -токоферола и антиоксидативне активности у семену пшенице сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса

Сорта	Укупни феноли, mg GAE g ⁻¹ с.м.	Укупни флавоноиди, mg RE g ⁻¹ с.м.	α -токоферол, μ g g ⁻¹ с.м.	ABTS, μ mol TE g ⁻¹ с.м.
НС-40С	1,75 _a	0,47 _a	18,77 _{ab}	3,97 _a
Симонида	1,53 _b	0,46 _a	16,83 _b	3,23 _b
Ренесанса	1,69 _{ab}	0,40 _b	20,60 _a	3,67 _{ab}
Просечно	1,66	0,44	18,70	3,62

Резултати су приказани као средње вредности (n=3). Вредности обележене различитим малим словима по колонама значајно се разликују на нивоу p<0,05 према LSD тесту.

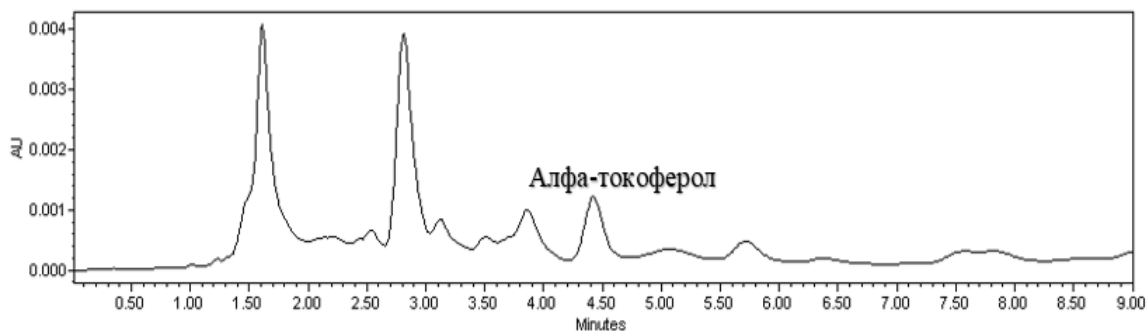
Садржаји укупних флавоноида у семену пшенице сорти НС-40С (0,47 mg RE g⁻¹ с.м) и Симонида (0,46 mg RE g⁻¹ с.м) нису се статистички значајно разликовали, док је њихов садржај у семену сорте Ренесанса био значајно мањи (0,40 mg RE g⁻¹ с.м).

Просечан садржај укупних фенола и флавоноида у семену све три сорте пшенице, екстрахованих 50% ацетоном, износио је 1,66 mg GAE g⁻¹ с.м., односно 0,44 mg RE g⁻¹ с.м., што је прилично високо, и резултат је, највероватније, присуства алеуронског слоја у семену (Liyana-Pathirana and Shahidi., 2007; Hung et al., 2009; Sharma and Gujral, 2010; Sedej et al., 2011).

У погледу садржаја укупних фенола и флавоноида у семену три испитиване сорте пшенице добијени резултати су у сагласности са резултатима других аутора (El-Sayed et al., 2008; Pasqualone et al., 2014; Yu and Beta, 2015; Durazzo et al., 2015), мада треба имати у виду да на њихово присуство у семену утичу и фактори околне средине (Reyes et al.,

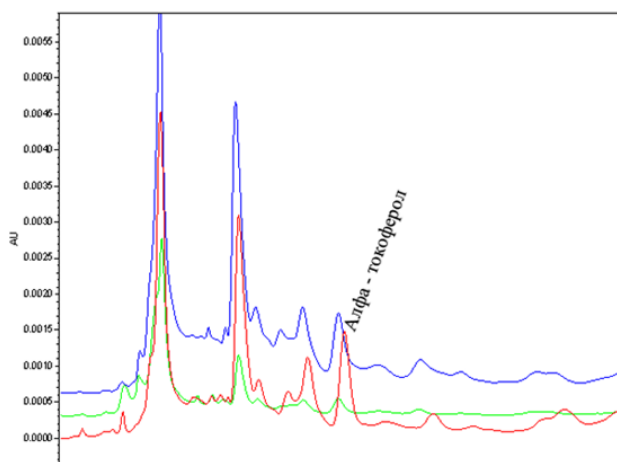
2003; Vaher et al., 2010) и генетичка основа (Hernández et al., 2011; Ragaee et al., 2012), као и њихова интеракција (López-Perea, 2019).

Садржај α -токоферола у семену испитиваних сората пшенице одређиван је течном хроматографском методом, уз UV детекцију на 292 nm, при чему се пик јављао при ретенционом времену од 4,5 min (слика 36). Просечан садржај α -токоферола у семену пшенице износио је $18,70 \mu\text{g g}^{-1}$ с.м., а у зависности од сорте кретао се од $16,83 \mu\text{g g}^{-1}$ с.м. код семена сорте Симонида, $18,77 \mu\text{g g}^{-1}$ с.м. у семену сорте НС-40С, до $20,60 \mu\text{g g}^{-1}$ с.м. у семену сорте Ренесанса (табела 5), што у великој мери зависи од великог броја фактора – генотипа, примењених агротехничких мера, складиштења семена итд. (Tiwari and Cummins., 2009).



Слика 36. Хроматограм алфа-токоферола у семену пшенице

Упоредни хроматограми датих сорти приказани су на слици 37.



Слика 37. Хроматограми α -токоферола у семену пшенице сорти Ренесанса – црвено, Симонида – зелено и НС-40С – плаво

Вредности садржаја α -токоферола у семену испитиваних сорти пшенице биле су у границама које су добили многи аутори (Ruibal-Mendieta et al., 2005; Hidalgo et al., 2006; Abdel-Aal and Rabalski., 2008; Lampi et al., 2008; Tiwari and Cummins., 2009; Hejtmankova et al., 2010; Öztürk et al., 2012; Hussain et al., 2012; Giambanelli et al., 2013; Jeong et al., 2017), али и нешто веће него што су утврдили Zielinski et al. (2001); El-Sayed et al. (2008); Копорка et al. (2012).

Антиоксидативни потенцијал 50% ацетонских екстраката семена испитиваних сората пшенице, као мера антиоксидативних компонената присутних у систему (укупни

феноли, флавоноиди, α -токофероли, каротеноиди итд), у просеку је износио $3,62 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ с.м., док су се његове вредности код појединих сората кретале од 3,23 за семе сорте Симонида до $3,97 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ с.м. за семе сорте НС-40С (табела 5), што је у сагласности са резултатима Lv et al. (2012) и Yu and Beta. (2015).

6.7. Утицај трајања и начина наклијавања на фитохемијска својства пшеничних клијанаца сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса

6.7.1. Утицај трајања наклијавања на фитохемијска својства пшеничних клијанаца сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса

У овом делу истраживања задатак је био да се утврди да ли ће разлика у трајању наклијавања довести до промена у садржају укупних фенола и α -токоферола у клијанцима који су добијени наклијавањем семена пшенице сорти НС-40С, Симонида, Ренесанса, у мраку на $20\text{ }^\circ\text{C}$ у току 5 и 6 дана и сушени у струји топлог ваздуха на $60\text{ }^\circ\text{C}$ (табела 6 и 7).

Ако се посматра садржај укупних фенола у клијанцима наклијаваним 120 h може се видети да се добијени клијанци сорти НС-40С и Симонида нису статистички разликовали ($13,9$; $14,3 \text{ mg GAE g}^{-1}$ с.м), док су клијанци сорте Ренесанса имали статистички значајно мањи ниво укупних фенола ($12,6 \text{ mg GAE g}^{-1}$ с.м). Исти тренд је био и код наклијавања у трајању од 144 h. Сорте је и овде испољила утицај, али ако се посматра садржај укупних фенола у оквиру исте сорте, али различите дужине трајања наклијавања, види се да су разлике у садржају укупних фенола статистички незначајне. Садржај укупних фенола у клијанцима добијеним наклијавањем 120 и 144 h износио је $13,9$ и $14,5 \text{ mg GAE g}^{-1}$ с.м. (НС-40С); $14,3$ и $14,4 \text{ mg GAE g}^{-1}$ с.м. (Симонида) и $12,6$; $12,7 \text{ mg GAE g}^{-1}$ с.м. (Ренесанса), односно, 24 сата дуже наклијавање није условило значајне промене у садржају укупних фенола (табела 6).

Табела 6. Садржај укупних фенола у клијанцима наклијаваним у мраку 120 и 144 h

Трајање наклијавања	Садржај укупних фенола, mg GAEg^{-1} с.м.			
	НС-40С	Симонида	Ренесанса	Просек време
120 h/5 дана	13,9 _a	14,3 _a	12,6 _b	13,6 _a
144 h/6 дана	14,5 _a	14,4 _a	12,7 _b	13,9 _a
Просек	14,2 _a	14,3 _a	12,7 _b	

Поредећи садржај α -токоферола у пшеничним клијанцима, добијеним у наведеним условима (наклијавање семена у мраку на $20\text{ }^\circ\text{C}$ у трајању од 120 и 144 сата) види се да је садржај α -токоферола у клијанцима, добијеним након 144 сати наклијавања, био статистички значајно већи код све три испитиване сорте (НС-40С, Симонида и Ренесанса) и износио је $70,7$; $59,7$ и $73,4 \mu\text{g g}^{-1}$ с.м. у односу на наклијавање које је трајало 120 h ($40,3$; $50,7$ и $63,4 \mu\text{g g}^{-1}$ с.м). Дакле, разлика у трајању наклијавања од 24 h имала је утицај на испољавање значајног повећања садржаја α -токоферола у пшеничним клијанцима (табела 7).

Табела 7. Садржај α -токоферола у пшеничним клијанцима наклијаваним у мраку 120 и 144 h

Трајање наклијавања	Садржај α -токоферола, $\mu\text{g g}^{-1}$ с.м.			
	НС-40С	Симонида	Ренесанса	Просек време
120 h/5 дана	40,3 _b	50,7 _c	53,4 _{bc}	48,1 _b
144 h/6 дана	70,7 _a	59,7 _b	73,4 _a	67,9 _a
Просек	55,5 _b	55,2 _b	63,4 _a	

Просечно повећање садржаја α -токоферола у клијанцима наклијаваним 144 h било је 3,63 пута веће, а у клијанцима добијеним наклијавањем 120 h 2,57 пута веће у односу на просечан садржај у семену $-18,7 \mu\text{g g}^{-1}$ (табела 5). Статистички значајно повећање садржаја α -токоферола са продужавањем времена наклијавања у складу је и са резултатима других аутора (Yang et al., 2001; Öztürk et al., 2012; Tarasevičienė et al., 2019).

6.7.2. Утицај начина наклијавања на фитохемијска својства пшеничних клијанаца сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса

У овом делу рада упоређивани су резултати садржаја одређених биоактивних материја (укупни феноли и флавоноиди, α -токоферол и антиоксидативна активност) у пшеничним клијанцима добијеним на два различита начина:

на први начин – пшенични клијанци су добијени наклијавањем пшеничног семена сорти Симонида, Ренесанса и НС-40С у режиму наклијавања, који се састојао из светлосног режима (16 h, при 25 °С) и тамног режима (8 h, при 20 °С) и укупном трајању наклијавања од 80 h, након чега је вршено сушење лиофилизацијом;

на други начин – пшенични клијанци су добијени наклијавањем семена пшенице у мраку (144 h при 20 °С) и сушени у струји топлог ваздуха (60 °С).

Табела 8. Садржај укупних фенола, флавоноида, α -токоферола и антиоксидативни потенцијал у пшеничним клијанцима добијеним по првом начину наклијавања

Први Начин	Укупни феноли, mgGAE g^{-1}	Укупни флавоноиди, mg RE g^{-1}	α - токоферол, $\mu\text{g g}^{-1}$	DPPH, %	DPPH, $\mu\text{mol TE g}^{-1}$	ABTS, %	ABTS, $\mu\text{mol TE g}^{-1}$
НС-40С	20,57 _b	9,91 _c	32,84 _b	83,39 _a	17,16 _a	97,20 _a	60,92 _a
Симонида	20,44 _b	11,98 _b	29,51 _c	78,50 _c	15,98 _c	94,69 _b	58,84 _c
Ренесанса	21,48 _a	13,59 _a	43,49 _a	80,39 _b	16,48 _b	94,32 _b	59,93 _b
Просек	20,83	11,83	35,30	80,76	16,54	95,40	59,57

Резултати су приказани као средња вредност (n=3). Различита слова у истој колони значи да постоји статистички значајна разлика на нивоу од $p < 0,05$, према LSD тесту.

Резултати анализа пшеничних клијанаца добијених првим начином (табела 8) показали су да се садржај укупних фенола у клијанцима кретао од 20,44 mg GAE g^{-1} с.м. код сорте Симонида до 21,48 mg GAE g^{-1} с.м. код сорте Ренесанса. Разлике у садржају укупних фенола за наведене сорте пшенице су биле статистички значајне. Садржај укупних флавоноида варирао је од 9,91 код сорте НС-40С до 13,59 mg RE g^{-1} с.м. код клијанаца сорте Ренесанса. Садржај α -токоферола је значајно варирао и кретао се од 29,51 $\mu\text{g g}^{-1}$ с.м. код клијанаца сорте Симонида до 43,49 $\mu\text{g g}^{-1}$ с.м. код клијанаца сорте Ренесанса. Клијанци сорте Ренесанса, добијени овим начином наклијавања, имали су највећи садржај укупних фенола, флавоноида и α -токоферола. Највећи антиоксидативни

потенцијал, мерен и АВТС- и DPPH-методом, имали су пшенични клијанци сорте НС-40С (% инхибиције 97,20 и 83,39).

Из резултата анализе пшеничних клијанаца, добијених на други начин (табела 9), види се да се клијанци сорти НС-40С и Симонида нису значајно разликовали у погледу садржаја укупних фенола (14,51 и 14,36 mg GAE g⁻¹ с.м), а да су клијанци сорте Ренесанса имали значајно мањи садржај укупних фенола (12,74 mg GAE g⁻¹ с.м) у односу на претходно наведене сорте пшенице.

Табела 9. Садржај укупних фенола, флавоноида, α-токоферола и антиоксидативни потенцијал у пшеничним клијанцима добијеним по другом начину наклијавања

Други начин	Укупни феноли, mg GAE g ⁻¹	Укупни флавоноиди, mg RE g ⁻¹	α-токоферол, μg g ⁻¹	DPPH, %	DPPH, μmol TE g ⁻¹	ABTS, %	ABTS, μmol TE g ⁻¹
НС-40С	14,51 _a	7,60 _b	70,70 _b	73,48 _b	14,49 _b	91,26 _a	50,43 _a
Симонида	14,36 _a	11,81 _a	59,70 _c	79,25 _a	15,93 _a	91,82 _a	50,75 _a
Ренесанса	12,74 _b	7,59 _b	73,40 _a	77,44 _a	15,24 _{ab}	84,18 _b	46,62 _b
Просек	13,87	9,00	67,9	76,73	15,22	89,09	49,27

Резултати су приказани као средња вредност (n=3). Различита слова у истој колони значи да постоји статистички значајна разлика на нивоу од p<0,05, према LSD тесту.

Садржај укупних флавоноида био је највећи у клијанцима сорте Симонида (11,81 mg RE g⁻¹ с.м), а у клијанцима сорти Ренесанса и НС-40С садржај флавоноида је био значајно мањи (7,59 и 7,60 mg RE g⁻¹ с.м). Клијанци сорте Ренесанса, у поређењу са клијанцима сорти Симонида и НС-40С, имали су значајно већи садржај α-токоферола (73,40 μg g⁻¹ с.м).

Клијанци добијени наклијавањем у условима дефинисаним првим начином (у комбинацији светлосног режима (16 h, при 25 °C) и тамног режима (8 h, при 20 °C) и укупном трајању наклијавања од 80 h) имали су већи просечни садржај укупних фенола, флавоноида и антиоксидативни потенцијал у односу на клијанце добијене наклијавањем дефинисаним другим начином. Добијене вредности представљају највероватније резултат утицаја светлосног режима и интензивније синтезе фенола, флавоноида и других биолошки активних супстанци, о чему својим истраживањима сведоче Liu et al. (2016), Xiang et al. (2017), Benincasa et al. (2019). Осим тога, лиофилизациони начин сушења, према првом начину, условио је повећану екстракцију различитих фитохемијских једињења (Chou and Chua, 2001; Asami et al., 2003; Devic et al., 2010; Goulas and Manganaris, 2012; Calín-Sánchez et al., 2013; Karaman et al., 2014). С друге стране, високе температуре дехидратације клијанаца, према другом начину, условиле су већи губитак фитохемијских једињења – фенола, флавоноида и др. (Orphanides et al., 2013).

Просечан садржај фенола у клијанцима, добијеним првим начином, износио је 20,83 mg GAE g⁻¹ с.м., а у клијанцима добијеним другим начином –13,87 mg GAE g⁻¹ с.м. (табела 8, 9). Међутим, без обзира на начин наклијавања, добијени пшенични клијанци су имали значајно већи садржај укупних фенола у поређењу са садржајем у семену пшенице – 1,66 mg GAE g⁻¹ с.м. (табела 5), што се може и визуелно сагледати (слика 38).



Слика 38. Обојења раствора чији је интензитет сразмеран количини фенолних једињења а који се мери на 760 nm: лево – семе пшенице, средина – клијанци наклијавани првим начином, десно – другим начином

Просечан садржај укупних флавоноида у клијанцима, добијеним у поступку на први начин био је $11,83 \text{ mg RE g}^{-1}$ с.м., а у клијанцима добијеним другим начином – 9 mg RE g^{-1} с.м. (табеле 8 и 9), док је у семену пшенице износио $0,44 \text{ mg RE g}^{-1}$ с.м (табела 5). Клијанци добијени у поступку на први начин (у комбинацији светлосног режима (16 h, при $25 \text{ }^\circ\text{C}$) и тамног режима (8 h, при $20 \text{ }^\circ\text{C}$) и укупном трајању наклијавања од 80 h) имали су већи антиоксидативни потенцијал ($59,57 \text{ } \mu\text{mol TE g}^{-1}$ с.м) у поређењу са клијанцима добијеним у поступку на други начин (наклијавање у мраку 144 h при $20 \text{ }^\circ\text{C}$) који је износио ($49,27 \text{ } \mu\text{mol TE g}^{-1}$ с.м). Једино је садржај α -токоферола био значајно већи у клијанцима добијеним на други начин (у мраку 144 h при $20 \text{ }^\circ\text{C}$). Генерално, током клијања значајно се повећао садржај α -токоферола у клијанцима добијеним на оба начина наклијавања код све три сорте пшенице (Симониде, Ренесансе и НС - 40С), с тим што је повећање било значајно веће код клијанаца добијених другим начином наклијавања. Садржај α -токоферола у семену пшенице се кретао у опсегу од 16,8 до $20,6 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ (табела 5), тј. просечна вредност α -токоферола је износила $18,7 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, а у клијанцима од 35,3 код првог начина до $67,9 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ с.м. код другог начина. Зависно од услова и времена наклијавања, просечан садржај α -токоферола у клијанцима је био од 1,89 пута већи при првом начину наклијавања, до 3,63 пута при другом начину наклијавања у односу на просечан садржај у семену пшенице. Садржај α -токоферола у испитиваним клијанцима био је знатно већи у клијанцима добијеним у мраку (на $20 \text{ }^\circ\text{C}$, у времену од 144 h) у односу на клијанце добијене после 80 h у наизменичном режиму наклијавања (светлост/мрак, $25/20 \text{ }^\circ\text{C}$). Међутим, у овом случају се не може говорити о утицају неког појединачног фактора, с обзиром на то да су и услови наклијавања и сушења били потпуно различити. На садржај α -токоферола у пшеничним клијанцима утичу и сорта и примењени режим наклијавања (трајање наклијавања, температура, присуство/одсуство светлости). Чињеница је да се при истим условима наклијавања (температура од $20 \text{ }^\circ\text{C}$, наклијавање у мраку, време од 120 и 144 h) садржај α -токоферола повећава са дужином трајања наклијавања, односно да је разлика у трајању наклијавања од 24 h резултирала повећањем садржаја α -токоферола (табела 7). То је у складу са тврдњом Lemmens et al. (2019) који тврде да садржај витамина у клијанцима житарица, па самим тим и садржај токола, односно α -токоферола, у највећој мери зависи од врсте житарице и услова наклијавања.

Просечна вредност антиоксидативног потенцијала екстраката клијанаца добијених на први начин и клијанаца добијених на други начин је висока (табела 8, 9), али је исти нешто већи код клијанаца добијених на први начин. Антиоксидативни потенцијал екстраката клијанаца, добијених на први начин (наклијаваних 80 сати и сушених лиофилизацијом) био је 80,76% (DPPH), односно 95,40% (ABTS), док је код екстраката клијанаца добијених на други начин (наклијаваних 144 сата у мраку и сушених у струји топлог ваздуха) износио 76,73% (DPPH), односно 89,09% (ABTS). Анализа вредности антиоксидативног потенцијала у $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ с.м. показује да су клијанци добијени на први начин (наклијавањем 80 сати, па лиофилизовани) имали за 8%, односно за 17,3% већи антиоксидативни потенцијал у односу на клијанце добијене наклијавањем на други начин – 144 h у мраку и сушене на 60 °C (DPPH, ABTS-тест). Наклијавање на први начин се вршило у режиму смене светлости и мрака, док је наклијавање на други начин било само у мраку. Фоторецептивни системи реагују на интензитет и квалитет светлости, као и на трајање и испрекиданост светлости, одређујући тако морфогенетске промене биљака, функционисање фотосинтетског апарата и тренд метаболичких путева (Samuolienė et al., 2011). Штавише, услови осветљења могу изазвати фотооксидативне промене у биљкама, што доводи до измењеног деловања антиоксидативног одбрамбеног система (Xu et al., 2019). Xiang et al. (2017) у свом истраживању наводе да је у поређењу са наклијавањем у мраку, излагање светлости стимулисало стварање фенолних киселина.

Ако се упореде садржаји укупних фенола може се видети да је садржај фенола у клијанцима добијеним у поступку на први начин, био већи (66%) и износио је 20,83 mg GAE g^{-1} с.м., у односу на клијанце добијене у поступку на други начин – 13,87 mg GAE g^{-1} с.м., али је просечан садржај α -токоферола у клијанцима, који такође доприносе укупном антиоксидативном потенцијалу, био значајно већи у клијанцима добијеним на други начин 67,90 $\mu\text{g g}^{-1}$, (скоро два пута већи у односу на просечну вредност у клијанцима добијеним на први начин – 35,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ с.м). Антиоксидативном потенцијалу екстраката клијанаца, добијених на први начин, доприноси садржај укупних фенола, флавоноида и α -токоферола, а антиоксидативном потенцијалу екстраката клијанаца добијених на други начин, сушених у струји топлог ваздуха, доприносе не само полифенолна једињења и α -токофероли, већ и продукти Мајарових (Maillard) реакција о чему говоре и резултати других аутора (Adam et al., 2000). Током клијања, као резултат активирања хидролитичких ензима, који разлажу сложене молекуле скроба, полисахарида и протеина, се повећава садржај једноставних шећера и аминокиселина (Yang et al., 2001). Услед повећаног садржаја слободних аминокиселина и редукујућих шећера, клијање може потенцијално промовисати Мајарове реакције (Abderrahim et al., 2012). Ове реакције су израженије код сушења топлим ваздухом (у сушници на 60 °C). То би се могло довести у везу и са бојом осушених клијанаца. Она је била потпуно различита – од светло-жуте, код клијанаца добијених на први начин, до браонкасто-смеђе – код клијанаца добијених на други начин (слика 16). Боја осушених клијанаца је последица начина сушења. Промена боје из светле у смеђу може се приписати реакцијама тамњења (Maillard), односно реакцијама између аминокиселина и шећера које настају током сушења (Adam et al., 2000). Развој Мајарових реакција често се догађа упоредо са другим реакцијама и процесима, што може допринети промени и боје и укупног антиоксидативног капацитета (Carabasa-Giribet and Ibarz-Ribas, 2000; Manzocco et al., 2001). До промене боје долази и услед активности полифенолоксидазе (Bahloul et al., 2009). Продукти Мајарових реакција су у значајној корелацији са садржајем једињења која поседују антиоксидативни капацитет (Jing and Kitts, 2000; Manzocco et al., 2001; El-Massry et al., 2003). Стварање и акумулација меланоидина, продуката Мајарових реакција, који имају различити степен антиоксидативне активности, може да допринесе повећању антиоксидативног капацитета (Que et al., 2008; Miranda et al., 2009). Сушење

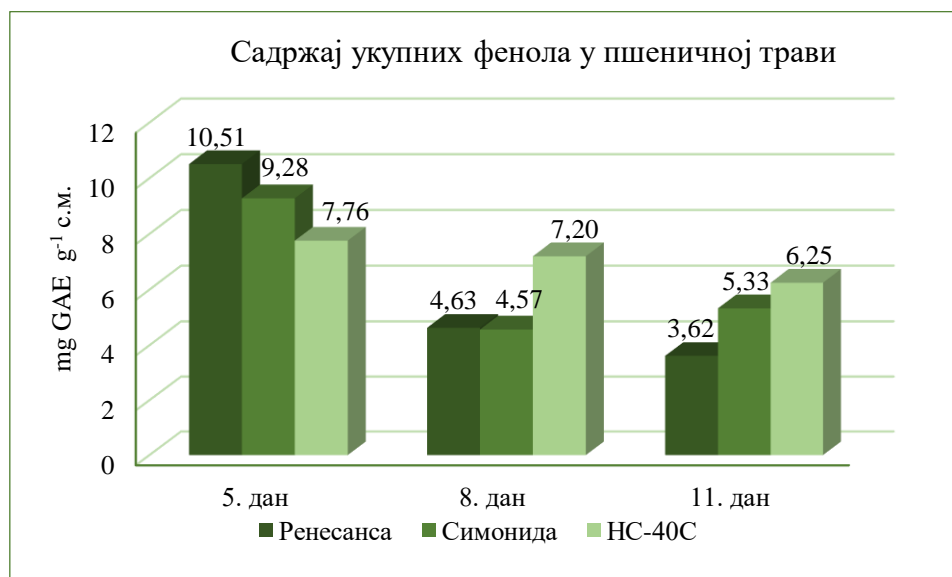
на температури од 60 °C, за разлику од сушења на 80–90 °C, захтева знатно дуже време, што може да утиче на смањење антиоксидативне активности и на губитак појединих компоненти, као што је витамин C, који доприноси антиоксидативном капацитету (Garau et al., 2007; Vega-Gálvez et al., 2009). Међутим, подаци о утицају сушења на антиоксидативни капацитет и садржај укупних фенола су контрадикторни, што је последица више фактора (методе сушења, типа екстракционог средства, примењеног антиоксидативног теста и интеракција унутар матрикса) – Manzocco et al. (2001), Que et al. (2008).

Резултати овог истраживања показују да се током клијања садржај фитохемијских једињења мења, и да је садржај укупних фенола, флавоноида, α -токоферола и антиоксидативног потенцијала у клијанцима значајно већи у односу на неклијало семе, што налази потврду у резултатима истраживања бројних аутора (Yang et al., 2001; Duenas et al., 2002; Liukkonen et al., 2003; Kim et al., 2004; Kaukovirta-Norja et al., 2004; Calzuola et al., 2004; Frias et al., 2005; Fernandez-Orozco et al., 2008; Bondia-Pons et al., 2009; Alvarez-Jubete et al., 2010; Hung et al., 2011; Donkor et al., 2012; Ravikuma et al., 2014; Chinma et al., 2015; Dziki et al., 2015; Sharma et al., 2016; Stagnari et al., 2017; Sytar et al., 2018; Feng et al., 2018).

6.8. Садржај биоактивних материја у пшеничној трави

У потрази за биоактивним једињењима из природних ресурса, у младој пшеничној трави, пожњевеној 5. 8. и 11. дана од ницања, одређиван је садржај укупних фенола, флавоноида и антиоксидативне активности, ради утврђивања на којем узрасном стадијуму је ова биљка најбољи извор поменутих једињења. За екстракцију биоактивних материја коришћен је 50% ацетон, а резултати су прерачунати на јединицу суве материје.

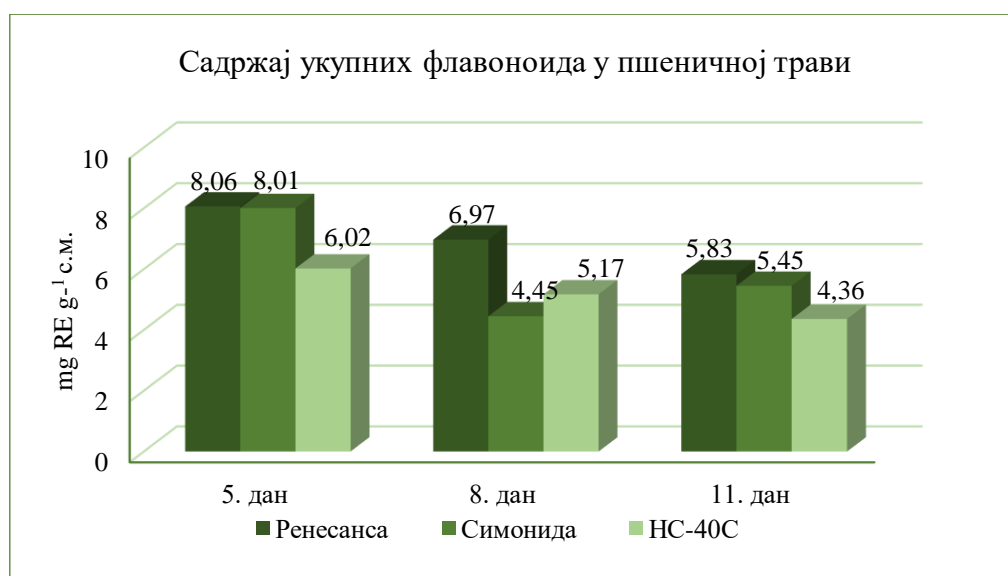
Без обзира на сорту, највећи садржај укупних фенола у младој пшеничној трави, утврђен је 5. дана од ницања (графикон 5).



Графикон 5. Садржај укупних фенола у младој пшеничној трави сорти Ренесанса, Симонида и НС-40С

Највећи садржај укупних фенола утврђен је 5. дана након ницања код младе пшеничне трава сорте Ренесанса (10,51 mg GAE g⁻¹ с.м), а затим следе сорте Симонида (9,28 mg GAE g⁻¹ с.м) и НС-40С (7,76 mg GAE g⁻¹ с.м). У поређењу са младом пшеничном травом узраста 5 дана од ницања, и у трави од 8 и 11 дана од ницања утврђен је значајно мањи садржај укупних фенола, и код сорте Ренесанса (4,63 и 3,62 mg GAE g⁻¹ с.м) и код сорте Симонида (4,57 и 5,33 mg GAE g⁻¹ с.м) и код сорте НС-40С (7,20 и 6,25 mg GAE g⁻¹ с.м). Сличне тренд налазимо и у радовима Kardas and Durucasu (2014).

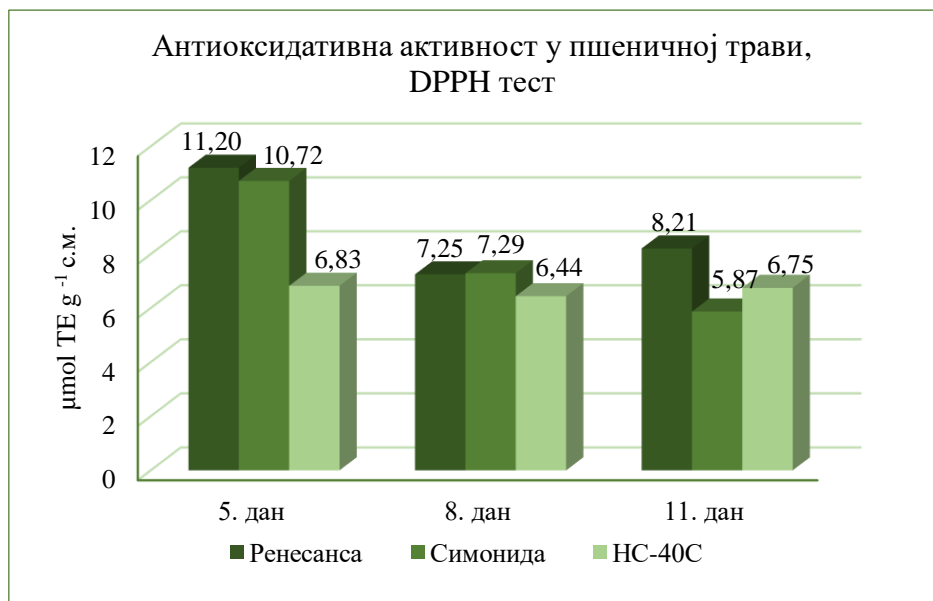
Садржај укупних флавоноида је такође био највећи у пшеничној трави 5. дана након ницања, при чему су сорте Ренесанса и Симонида имале приближно исти садржај укупних флавоноида (8,06, односно 8,01 mg RE g⁻¹ с.м), односно знатно више у односу на сорту НС-40С (6,02 mg RE g⁻¹ с.м). Садржај укупних флавоноида у пшеничној трави 8. (6,97; 4,45; 5,17 mg RE g⁻¹ с.м) и 11. дана након ницања (5,83; 5,45 и 4,36 mg RE g⁻¹ с.м) био је значајно мањи у поређењу са истим 5. дана након ницања (графикон 6).



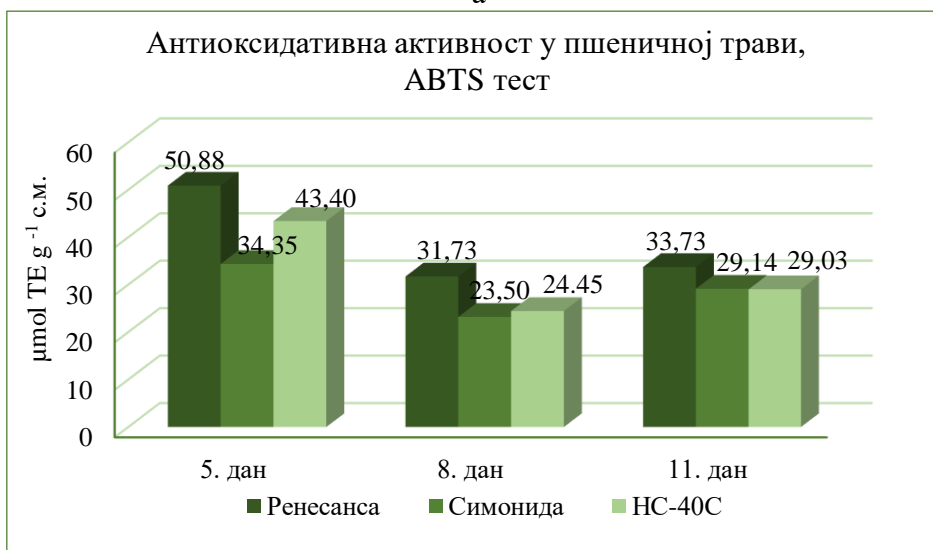
Графикон 6. Садржај укупних флавоноида у младој пшеничној трави

Антиоксидативни потенцијал пшеничне траве сорти Ренесанса, Симонида и НС-40С, мерен DPPH-тестом након 5 дана од ницања износио је 11,20; 10,72 и 6,83 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$, 8. дана – 7,25; 7,29 и 6,44 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$, а 11. дана – 8,21; 5,87 и 6,75 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$. Антиоксидативни потенцијал пшеничне траве истих сорти пшенице мерен ABTS-тестом, 5. дана од ницања износио је 50,88; 34,35 и 43,40 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$; 8. дана – 31,73; 23,50 и 24,45 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$, а 11. дана – 33,73; 29,14 и 29,03 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ (графикон 7а, б). Без обзира на узрастни стадијум младе пшеничне траве, код сорте Ренесанса утврђена је највећа антиоксидативна активност мерена помоћу оба теста.

Највећи антиоксидативни потенцијал, мерен и DPPH-тестом и ABTS-тестом, утврђен је у узорцима пшеничне траве 5. дана од ницања (графикон 7а, б), јер се у ранијим узрастним стадијумима младе пшеничне траве повећава концентрација фенолних киселина (ферулинске, ванилинске) и флавоноида, који су заслужни за јаку антиоксидативну активност (Hanninen et al., 1999; Sun et al., 2014; Zendehbad et al., 2014; Benincasa et al., 2015; Akbas et al., 2017). Тренд пада антиоксидативне активности од 5. до 11. дана резултат је и смањења садржаја фотосинтетичких пигмената у трави (Murali et al., 2016), што потврђују и резултати ове докторске дисертације који се односе на ту област (табела 10–12).



а



б

Графикон 7. Антиоксидативни потенцијал младе пшеничне траве (а – DPPH-метода и б – ABTS-метод)

Корелација између узрасног стадијума младе пшеничне траве и садржаја биоактивних материја у њој није довољно проучена, као ни могући учинак различитих услова клијања и узгоја пшеничне траве, као што су хранљиве материје, земљиште и могући фактори који су одговорни за уочене разлике у погледу хемијског састава, на шта скрећу пажњу Kulkarni et al. (2006).

6.9. Садржај фотосинтетичких пигмената у екстрактима пшеничне траве

Садржај фотосинтетичких пигмената: укупног хлорофила – $C(a+b)$, хлорофила a – C_a , хлорофила b – C_b , као и каротеноида – $C(x+c)$ у младој пшеничној трави, узраста 5, 8 и 11 дана, код сорти Ренесанса, Симонида и НС-40С, одређиван је спектрофотометријском методом и приказан у табелама 10–12.

Табела 10. Садржај фотосинтетичких пигмената у пшеничној трави сорте Ренесанса, узраста 5, 8 и 11 дана

Ренесанса	$C(a+b)$	C_a	C_b	$C(x+c)$	$C(a+b)/C(x+c)$
mg g ⁻¹ с.м.					
5 дана	6,09 _a	4,80 _a	1,28 _a	1,37 _a	4,44
8 дана	5,30 _b	4,09 _b	1,21 _a	1,08 _b	4,90
11 дана	5,03 _b	3,76 _b	1,07 _b	1,03 _b	4,70

Резултати су приказани као средња вредност $n=3$. Различита слова у истој колони значи да постоји статистички значајна разлика на нивоу од $p<0,05$, према LSD тесту.

У пшеничној трави сорте Ренесанса, при узрасту од 5 дана након ницања, утврђен је највећи садржај укупног хлорофила – 6,09 mg g⁻¹ с.м.; хлорофила a – 4,80 mg g⁻¹ с.м. и каротеноида – 1,37 mg g⁻¹ с.м. док је 8. (5,30; 4,09; 1,08 mg g⁻¹ с.м) и 11. дана (5,03; 3,76 и 1,03 mg g⁻¹ с.м.) садржај ових пигмената био значајно мањи (табела 10). Значајност наведених разлика се смањивала продужетком времена раста пшеничне траве са 8 на 11 дана.

Табела 11. Садржај фотосинтетичких пигмената у пшеничној трави сорте Симонида, узраста 5, 8 и 11 дана

Симонида	$C(a+b)$	C_a	C_b	$C(x+c)$	$C(a+b)/C(x+c)$
mg g ⁻¹ с.м.					
5 дана	4,40 _a	3,47 _a	0,93 _a	0,97 _a	4,54
8 дана	4,11 _a	3,23 _a	0,89 _a	0,90 _a	4,58
11 дана	3,12 _b	2,47 _b	0,67 _b	0,72 _b	4,33

Резултати су приказани као средња вредност $n=3$. Различита слова у истој колони значи да постоји статистички значајна разлика на нивоу од $p<0,05$, према LSD тесту.

Садржај свих одређиваних пигмената у пшеничној трави сорте Симонида није се статистички разликовао 5. и 8. дана, док је био значајно мањи у узрасту од 11 дана (табела 11). Садржај укупног хлорофила петог, односно 8. дана износио је 4,40 и 4,11 mg g⁻¹ с.м., а 11. дана 3,12 mg g⁻¹ с.м., хлорофила a – 3,47; 3,23 mg g⁻¹ с.м., а 11. дана 2,47 mg g⁻¹ с.м., хлорофила b – 0,93; 0,89 mg g⁻¹ с.м., а 11. дана 0,67 mg g⁻¹ с.м., а садржај каротеноида 0,97; 0,90 mg g⁻¹ с.м., а 11. дана – 0,72 mg g⁻¹ с.м.

Као и код пшеничне траве сорте Симонида, тако се и у пшеничној трави сорте НС-40С, садржај фотосинтетичких пигмената није разликовао при узрасту од 5 и 8 дана, док је код узраста од 11 дана био статистички значајно мањи ($p<0,05$). Садржај укупног хлорофила у пшеничној трави сорте НС-40С износио је: 5. дана 6,61; 8. дана 6,31 док је 11. дана износио 3,44 mg g⁻¹ с.м. Садржај хлорофила a је имао такође опадајући тренд: 5,28→4,90→2,69 mg g⁻¹ с.м. Садржај хлорофила b и каротеноида био је значајно нижи 11. дана и износио је 0,76 и 0,75 mg g⁻¹ с.м. у односу на 5. (1,33 и 1,32 mg g⁻¹ с.м) и 8. дан (1,41 и 1,35 mg g⁻¹ с.м).

Табела 12. Садржај фотосинтетичких пигмената у пшеничној трави сорте НС-40С, узраста 5, 8 и 11 дана

НС-40С	C(a+b)	C _a	C _b	C(x+c)	C(a+b)/C(x+c)
	mg g ⁻¹ с.м.				
5 дана	6,61 _a	5,28 _a	1,33 _a	1,32 _a	5,02
8 дана	6,31 _a	4,90 _a	1,41 _a	1,35 _a	4,68
11 дана	3,44 _b	2,69 _b	0,76 _b	0,75 _b	4,60

Резултати су приказани као средња вредност n=3. Различита слова у истој колони значи да постоји статистички значајна разлика на нивоу од p<0,05, према LSD тесту.

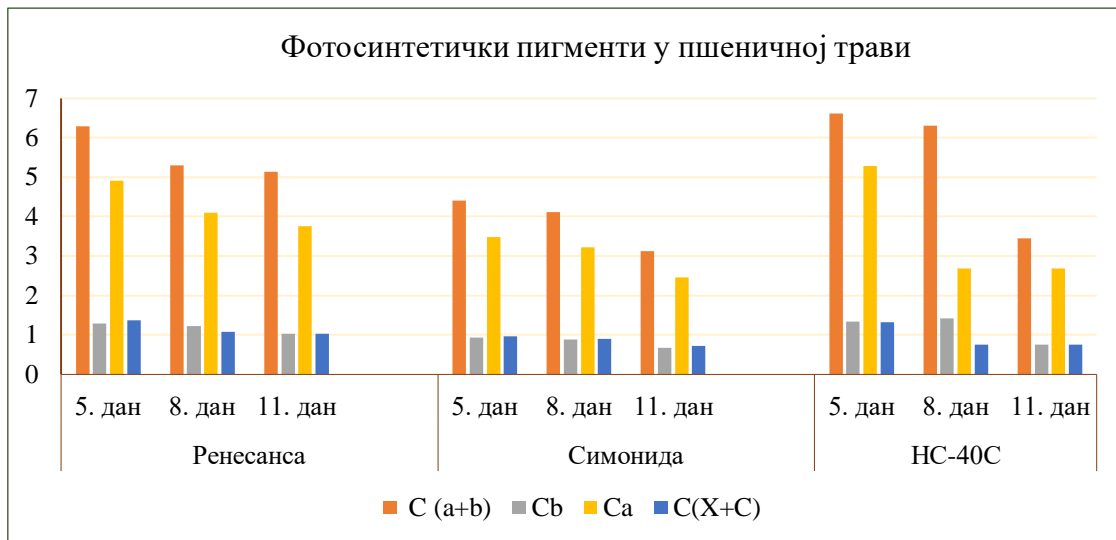
Код пшеничне траве узраста 5 дана, садржај укупног хлорофила износио је 6,61 mg g⁻¹ с.м., у пшеничној трави сорте НС-40С; 6,29 mg g⁻¹ с.м. код сорте Ренесанса и 4,40 mg g⁻¹ с.м. код сорте Симонида. Садржај хлорофила a износио је 5,28; 4,80 и 3,47 mg g⁻¹ с.м. у трави сорти НС-40С, Ренесанса и Симонида (табела 10–12). Сличне констатације су забележене и у радовима других аутора (Pallavi et al., 2016). У пшеничној трави старости 8 дана, садржај одређиваних пигмената је имао следећи тренд: НС-40С > Ренесанса > Симонида. Садржај укупног хлорофила пшеничне траве сорте Симонида износио је 4,11 mg g⁻¹ с.м. и био је мањи у односу на садржај у трави код сорти Ренесанса и НС-40С (5,30 и 6,31 mg g⁻¹ с.м), садржај хлорофила b износио је 1,41; 1,21 и 0,89 mg g⁻¹ с.м. у трави сорти НС-40С, Ренесанса и Симонида (табела 10–12). Исти тренд је забележен и у односу на садржај хлорофила a (4,90; 4,09 и 3,23 mg g⁻¹ с.м).

Пшенична трава сорте Симонида имала је најмањи садржај свих одређиваних пигмената у поређењу са травом осталих сорти, узраста од 8 дана, што је у корелацији и са садржајем Mg у биљном материјалу (табела 13). Наиме, садржај Mg у пшеничној трави сорте Симонида износио је 1886 mg kg⁻¹, што је значајно мање у односу на пшеничну траву сорти Ренесанса и НС-40С (2259; 2377 mg kg⁻¹ с.м). Пшенична трава сорте Симонида имала је најмањи садржај свих фотосинтетичких пигмената, у односу на друге сорте истог узраста (5, 8 и 11 дана) – графикон 8.

Садржај фотосинтетичких пигмената у пшеничној трави различитог узраста, са повећањем броја дана се смањивао, тј. 11. дана пшенична трава имала је најмањи садржај свих фотосинтетских пигмената.

Из резултата се види да је 11. дана садржај укупног хлорофила био 1,92; 1,41 и 1,15; хлорофила a – 1,96; 1,40 и 1,18; хлорофила b – 1,76; 1,40 и 1,14; а каротеноида 1,76; 1,35; 1,33 пута мањи у односу на садржај петог дана, код сорти НС-40, Симонида и Ренесанса што је усклађу са резултатима Murali и сар. (2016).

Резултати, показују да се масени однос укупног хлорофила према укупним каротеноидима C(a+b)/C(x+c) кретао од 4,2 до 5. Овај масени однос указује на чињеницу да биљке нису биле изложене стресу, јер мање вредности од наведеног масеног односа представљају показатељ старења, стреса, оштећења биљке и фотосинтетског апарата, бржег распада хлорофила него каротеноида, при чему листови постају жућкастозелени када је масени однос C(a+b)/C(x+c) мањи од 3,5 (Lichtenthaler and Buschmann, 2001).



Графикон 8. Садржај фотосинтетичких пигмената у пшеничној трави сорти Ренесанса, Симонида и НС-40С, узраста 5, 8 и 11 дана

Собзиром да на садржај хлорофила у биљкама утичу бројни фактори – положај листова, интензитет светлости, упоредни процеси синтезе и разградње хлорофила, нехомоген распоред хлорофила у мезофилу листа, минерална исхрана, температура, релативна влага, старост, генотип итд. (Pavlović i sar., 2010), то је истакнута варијабилност у овим истраживањима сасвим очекивана.

6.10. Садржај макро- и микроелемената у семену пшенице, клијанцима и трави

Семе три сорте пшенице (Симонида, Ренесанса и НС-40С), њихови клијанци, добијени наклијавањем у мраку (120 h), и млада пшенична трава, узраста од 8 дана, анализирани су на присуство макро- и микроелемената и тешких метала.

Резултати о укупном садржају макроелемената у семену ($\Sigma=P+K+Mg+Ca$) проучаваних сорти, који су се кретали од 11679 mg kg⁻¹ код сорте Симонида до 10396 mg kg⁻¹ код сорте Ренесанса (табела 13), слажу се са резултатима о просечном садржају пепела у семену пшенице ове три сорте – највећи садржај пепела имало је семе сорте Симонида (1,61%), а најмањи семе сорте Ренесанса (1,40%) – табела 3.

Семе пшенице сорте Симонида имало је највећи садржај P (5392 mg kg⁻¹), односно 12524 mg kg⁻¹ (P₂O₅) и K (4303 mg kg⁻¹), односно 5186 mg kg⁻¹ (K₂O), у односу на друге сорте, док је семе сорте Ренесанса садржало највише Ca (710 mg kg⁻¹) у односу на друге две сорте. Најмањи садржај Ca имало је семе сорте НС-40С. Садржај Mg се кретао од 1344 mg kg⁻¹ код сорте Симонида до 1454 mg kg⁻¹ код сорте НС-40С (табела 13). Концентрације минерала у пшеничном семену су углавном сортна карактеристика, али је одређена и типом земљишта, климом и обрадом, што објашњава значајне разлике у резултатима које су запазили и други аутори (Anglani, 1998).

Збирни садржај макроелемената (P, K, Mg и Ca) у пшеничним клијанцима био је најмањи код сорте НС-40С (23667 mg kg⁻¹), а највећи код сорте Симонида (27192 mg kg⁻¹).

Млада пшенична трава сорте Симонида имала је највише P (12959 mg kg⁻¹), а најмање Mg (1886 mg kg⁻¹) и Ca (2896 mg kg⁻¹). Пшенична трава сорте НС-40С имала је највиши садржај K (50447 mg kg⁻¹) и Mg (2377 mg kg⁻¹). Пшенична трава сорте Ренесанса је имала најмањи садржај P (9905 mg kg⁻¹), а највећи садржај Ca (3990 mg kg⁻¹) у односу на друге две сорте. Пшенична трава сорте Симонида имала је најмањи садржај Mg (1886 mg/kg), у односу на сорте Ренесанса (2259 mg kg⁻¹) и НС-40С (2377 mg kg⁻¹) – табела 13.

Табела 13. Садржај макроелемената у семену пшенице, пшеничним клијанцима и младој пшеничној трави сорти Симонида, НС-40С и Ренесанса

	P	P₂O₅	K	K₂O	Mg	Ca	Σ
mg kg ⁻¹							
Семе							
Ренесанса	4905	11393	3370	4061	1411	710	10396
Симонида	5392	12524	4303	5186	1344	640	11679
НС-40С	5170	12008	3880	4675	1454	550	11054
Клијанци							
Ренесанса	10638	24708	13612	16404	1437	455	26142
Симонида	11729	27242	13515	16288	1419	529	27192
НС-40С	9455	21961	12561	15138	1262	389	23667
Пшенична трава							
Ренесанса	9905	23005	46900	56521	2259	3990	63054
Симонида	12959	30095	47954	57791	1886	2896	65694
НС-40С	12459	28936	50447	60796	2377	3444	68727

Садржај елемената, као што су К, Mg и Zn, доводи се у везу са већим нивоом биолошке активности, јер је утврђена корелација између њиховог садржаја и вредности антиоксидативне активности екстракта пшеничне траве (Ghumman et al., 2017), а осим тога, Mg је присутан у молекулу хлорофила, једињења са значајном антиоксидативном активношћу.

Ради сагледавања количине макроелемената у семену пшенице, клијанцима и трави дате су њихове просечне вредности у табели 14.

Табела 14. Просечан садржај макроелемената у семену пшенице, пшеничним клијанцима и младој биљци (mg kg⁻¹)

Елемент	Семе	Клијанци	Пшенична трава
	mg kg ⁻¹		
P	5155±199,07 _b	10607±928,61 _a	11774±1337,19 _a
K	3851±381,45 _c	13229±474,24 _b	48433±1487,25 _a
Mg	1403±45,26 _b	1372±78,60 _b	2174±21,27 _a
Ca	633±65,49 _b	457 ±57,19 _b	3170±446,62 _a
Σ	11043±524 _c	25667±1478 _b	65825±2318 _a

Σ = P+K+Mg+Ca; Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (n=3). Различита слова у истом реду значе да постоји статистички значајна разлика на нивоу од p<0,05 и p<0,01, према LSD тесту.

Семе пшенице, клијанци и изданци/пшенична трава представљају добар извор P, K, Mg и Ca (табела 14). Пшенични клијанци су имали значајно већи садржај P (10607 mg kg⁻¹) и K (13229 mg kg⁻¹), у односу на семе пшенице (5155; 3851 mg kg⁻¹), док је пшенична трава била значајно богатија у садржају испитиваних макроелемената (P, K, Mg и Ca) у односу на семе пшенице, као и у садржају K, Mg и Ca од пшеничних клијанца. Редослед у заступљености појединих елемената био је следећи: у семену пшенице P > K > Mg > Ca, у пшеничним клијанцима и пшеничној трави K > P > Mg > Ca. Исти редослед у садржају макроелемената у семену *Triticum aestivum* утврдили су и Suchowilska et al. (2012) и Dolijanović et al. (2019).

Пшенични клијанци представљају богат извор макроелемената, што се најбоље види и на основу укупног садржаја Σ=P+K+Mg+Ca, који је био значајно већи у

пшеничним клијанцима (25667 mg kg⁻¹), него у семену пшенице (11043 mg kg⁻¹) – табела 14. Ово се може запазити сагледавајући и садржај појединих елемената у пшеничним клијанцима и семену. Наиме, просечан садржај P (10607 mg kg⁻¹) и K (13229 mg kg⁻¹) у пшеничним клијанцима био је значајно већи, него њихов просечни садржај у семену (5155 mg kg⁻¹; 3851 mg kg⁻¹), једино је просечан садржај Ca био мањи у пшеничним клијанцима (457 mg kg⁻¹) у односу на семе пшенице (633 mg kg⁻¹). Ови резултати су у складу са резултатима Danisova et al. (1994) и Plaza et al. (2003).

Пшенична трава је имала значајно већи садржај K, Ca и Mg у односу на пшеничне клијанце и семе пшенице (p<0,05; p<0,01), па она представља најбољи извор ових елемената (табела 14). Просечан збирни садржај ($\Sigma=P+K+Mg+Ca$) у пшеничној трави износио је 65825 mg kg⁻¹, што је значајно више него у клијанцима (25667 mg kg⁻¹) и семену (11043 mg kg⁻¹). Просечне вредности садржаја P у пшеничној трави, клијанцима и семену (11774 mg kg⁻¹; 10607 mg kg⁻¹; 5155,67 mg kg⁻¹); K (48433 mg kg⁻¹; 13229 mg kg⁻¹; 3851 mg kg⁻¹); Mg (2174 mg kg⁻¹; 1362 mg kg⁻¹; 1403 mg kg⁻¹) и Ca (3170 mg kg⁻¹; 457 mg kg⁻¹; 633 mg kg⁻¹) приказане су у табели 14.

У семену, клијанцима и пшеничној трави све три сорте испитиван је и садржај B, Cu, Fe, Mn, Ni, Zn, као и N и C (табела 15).

Табела 15. Садржај B, Cu, Fe, Mn, Ni, Zn, N и C у семену пшенице, пшеничним клијанцима и пшеничној трави

Сорте пшенице	B	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	N	C
	mg kg ⁻¹							%
Семе								
Ренесанса	2,59	2,40	30,50	42,70	0,12	24,80	1,89	41,39
Симонида	1,77	3,12	32,50	37,90	0,17	21,10	1,97	42,43
НС – 40С	2,29	2,66	27,30	40,70	0,08	16,80	1,84	41,03
Клијанци								
Ренесанса	2,07	4,89	35,70	26,20	0,15	32,00	5,05	42,75
Симонида	2,02	5,90	29,10	31,30	0,20	38,80	5,35	42,03
НС - 40С	2,88	4,74	34,00	23,00	0,24	27,20	4,80	42,18
Пшенична трава								
Ренесанса	8,70	4,49	83,50	44,10	0,84	27,30	4,63	41,47
Симонида	7,11	6,33	80,10	41,80	0,61	27,90	4,17	41,18
НС- 40	8,07	6,18	77,90	49,50	0,78	28,60	4,93	40,99

У семену, клијанцима и трави сорте Симонида садржај B је био најмањи (1,77; 2,02; 7,11 mg kg⁻¹), а у сорти Ренесанса – највећи (2,59; 2,07; 8,70 mg kg⁻¹) – табела 15.

Садржај B у семену пшенице се кретао од 1,77 mg kg⁻¹ код сорте Симонида до 2,59 mg kg⁻¹ (Ренесанса); у пшеничним клијанцима од 2,02 код сорте Симонида до 2,88 mg kg⁻¹ код НС-40С; а у пшеничној трави од 7,11 mg kg⁻¹ (Симонида) до 8,70 mg kg⁻¹ код сорте Ренесанса (табела 15). Сагледавајући вредности просечног садржаја у семену, клијанцима и пшеничној трави (2,22; 2,32 и 7,96 mg kg⁻¹) може се видети да је пшенична трава имала значајно већи садржај B (табела 16).

Садржај Cu у семену пшенице кретао се од 2,40 до 3,12 mg kg⁻¹, у пшеничним клијанцима од 4,74–5,90 mg kg⁻¹, док је у пшеничној трави износио од 4,49–6,33 mg kg⁻¹. И пшенични клијанци и пшенична трава су имали значајно већи просечан садржај Cu у односу на семе пшенице (p<0,95; p<0,99) – табела 16. Резултате са сличном тенденцијом добили су и други аутори (Plaza et al., 2003; Shar et al., 2004; Genc et al., 2005; Tang et al.,

2008; Al-Gahri and Almussali, 2008; Suchowilska et al., 2012; Kovacevic et al., 2013), с тим што су апсолутне вредности биле нешто варијабилније, а што је вероватно условљено сортом специфичношћу, климатским факторима, поднебљем, условима и трајањем наклијавања (Plaza et al., 2003; Suchowilska et al., 2012).

Просечна вредност садржаја Fe у пшеничној трави ($80,5 \text{ mg kg}^{-1}$) била је статистички значајно већа ($p < 0,95$; $p < 0,99$), тачније око 2,5 пута већа него у семену ($30,1 \text{ mg kg}^{-1}$) и клијанцима ($32,4 \text{ mg kg}^{-1}$) – табела 16. До сличних резултата дошли су и други аутори (Сакмак et al., 2000; Plaza et al., 2003; Liu et al., 2006; Tang et al., 2008; Kovacevic et al., 2013), мада има и оних који су утврдили већи садржај Fe у семену пшенице (Frossard et al., 2000; Al-Gahri and Almussali, 2008; Ficco et al., 2009).

Табела 16. Просечан садржај бора, бакра, гвожђа, мангана, N и C у пшеничном семену, пшеничним клијанцима и пшеничној трави

Елемент	Семе	Клијанци mg kg^{-1}	Пшенична трава
B	$2,22 \pm 0,34_b$	$2,32 \pm 0,39_b$	$7,96 \pm 0,65_a$
Cu	$2,73 \pm 0,30_b$	$5,18 \pm 0,52_a$	$5,67 \pm 0,83_a$
Fe	$30,10 \pm 2,14_b$	$32,94 \pm 2,80_b$	$80,5 \pm 2,30_a$
Mn	$40,43 \pm 1,97_a$	$26,84 \pm 3,42_b$	$45,13 \pm 3,22_a$
Ni	$0,12 \pm 0,04_b$	$0,20 \pm 0,04_b$	$0,74 \pm 0,09_a$
Zn	$20,90 \pm 3,27_b$	$32,67 \pm 4,76_a$	$27,93 \pm 0,53_b$
		%	
N	$1,90 \pm 0,05_c$	$5,07 \pm 0,22_a$	$4,58 \pm 0,31_b$
C	$41,62 \pm 0,6_a$	$42,32 \pm 0,31_a$	$41,21 \pm 0,20_a$

Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација ($n=3$). Различита слова у истом реду значи да постоји статистички значајна разлика на нивоу од $p < 0,05$ према, LSD тесту.

Садржај Zn у семену пшенице испитиваних сорти био је у опсегу од $16,8 \text{ mg kg}^{-1}$ (НС-40С) до $24,8 \text{ mg kg}^{-1}$ (Ренесанса), у пшеничним клијанцима од $27,2 \text{ mg kg}^{-1}$ (НС-40С) до $38,8 \text{ mg kg}^{-1}$ (Симонида), а у пшеничној трави од $27,3 \text{ mg kg}^{-1}$ (Ренесанса) до $28,6 \text{ mg kg}^{-1}$ (НС-40С), што је у сагласности са подацима из литературе (Сакмак et al., 2000; Frossard et al., 2000; Genc et al., 2005; Gao et al., 2012), мада су неки истраживачи добили значајно мање вредности Zn у семену пшенице (Kalkurni et al., 2009).

Садржај Mn у семену пшенице кретао се од $37,9 \text{ mg kg}^{-1}$ код сорте Симонида до $42,7 \text{ mg kg}^{-1}$ код сорте Ренесанса; у пшеничним клијанцима – од $23,0 \text{ mg kg}^{-1}$ код сорте НС-40С до $31,3 \text{ mg kg}^{-1}$ код сорте Симонида, а у пшеничној трави – од $41,8 \text{ mg kg}^{-1}$ код сорте Симонида до $49,5 \text{ mg kg}^{-1}$ код сорте НС-40С (табела 15). Из просечних вредности садржаја Mn у семену пшенице ($40,43 \text{ mg kg}^{-1}$), пшеничним клијанцима ($26,84 \text{ mg kg}^{-1}$) и пшеничној трави ($45,13 \text{ mg kg}^{-1}$) може се видети да је његова вредност у клијанцима била статистички значајно мања (табела 16), што је у сагласности са резултатима других аутора (Graham et al., 1999; Сакмак et al., 2000; Plaza et al., 2003; Welch, 2003; Ficco et al., 2009; Zhao et al., 2009; Hernández Rodríguez et al., 2011; Gao et al., 2012), али и значајно више од резултата истраживања до којих су дошли Suchowilska et al. (2012), Teklić et al. (2013) и други аутори.

Садржај Ni у испитиваним узорцима имао је тенденцију: семе \approx клијанаца $<$ пшеничне траве (табела 15). Најмањи садржај је забележен код семена сорте НС - 40С и износио је $0,08 \text{ mg kg}^{-1}$, док је највећи био код пшеничне траве сорте Ренесанса ($0,84 \text{ mg kg}^{-1}$), што је испод просечних вредности садржаја никла у биљном материјалу. Просечна вредност садржаја Ni у пшеничној трави ($0,74 \text{ mg kg}^{-1}$) је била значајно већа у односу на

садржај у пшеничним клијанцима ($0,20 \text{ mg kg}^{-1}$) и семену пшенице ($0,12 \text{ mg kg}^{-1}$), $p < 0,95$; $p < 0,99$ – табела 16.

Из приказаног може се закључити да је пшенична трава у поређењу са пшеничним клијанцима и семеном пшенице имала највећи садржај Ni, Fe и B (табела 15, 16).

Поред садржаја макро- и микроелемената у испитиваним узорцима, веома је важан и садржај тешких метала, јер они могу представљати значајне контаминенте хране, преко које доспевају у организам човека. Зато је испитиван њихов садржај у семену, клијанцима и трави испитиваних сорти пшенице (табела 17).

Табела 17. Садржај тешких метала у семену пшенице, пшеничним клијанцима и младој пшеничној трави сорти Симонида, НС-40С и Ренесанса

Сорте пшенице	Pb	As	Cd	Co	Cr
	mg kg ⁻¹				
Семе					
Ренесанса	8,52	н.д.	н.д.	1,58	н.д.
Симонида	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
НС – 40С	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Клијанци					
Ренесанса	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Симонида	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
НС - 40С	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Пшенична трава					
Ренесанса	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,20
Симонида	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,20
НС- 40	0,30	н.д.	н.д.	н.д.	0,40

н.д – испод границе детекције примењене методе

У семену пшенице сорте Ренесанса, у поређењу са семеном сорти Симонида и НС - 40 С, утврђен је највећи садржај Mn и Zn, као значајних микроелемената (табела 15), али су у њему детектовани и Co ($1,58 \text{ mg kg}^{-1}$) и Pb ($8,52 \text{ mg kg}^{-1}$) – табела 17. У семену пшенице сорти Симонида и НС-40С, као и свим узорцима пшеничних клијанаца и пшеничне траве садржај Co је био испод границе детекције. Висок садржај Pb у семену пшенице сорте Ренесанса ($8,52 \text{ mg kg}^{-1}$), може бити последица машинске обраде семена, близине саобраћајница, покривености земљишта вегетацијом, правца и интензитета ветрова и локалитета (Kastori, 1997). Садржај As и Cd је био испод границе детекције у свим испитиваним узорцима како семена, тако и клијанаца и изданака младе пшеничне траве. Садржај Cr у семену пшенице и клијанцима све три сорте био је испод границе детекције, а у младој пшеничној трави износио је $0,20\text{--}0,40 \text{ mg kg}^{-1}$, што је у границама просечних вредности за биљке (Kastori, 1997).

На основу анализе садржаја макро- и микроелемената може се закључити да семе пшенице, пшенични клијанци и пшенична трава представљају добар и потенцијалан извор макро- и микроелемената. Пшенични клијанци су бољи извор P и K од семена, а пшенична трава бољи извор P, K, Mg и Ca, у поређењу са семеном пшенице и клијанцима. Значајно је и то што пшенични клијанци и пшенична трава, добијени у наведеним условима, не представљају потенцијни извор штетних и токсичних елемената, као што су Pb и Cd, ако се користе у исхрани или као састојак неког прехранбеног производа.

6.11. Антибактеријска активност екстраката пшеничних клијанаца и пшеничне траве

Антибактеријска активност екстраката пшеничне траве и пшеничних клијанаца испитивана је применом микродилуционе методе, при чему су као објекат тестирања коришћене G^- (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*) и G^+ (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*) бактерије. Минималне инхибиторне концентрације (МИС) екстраката које доводе до инхибиције раста бактерија упоређиване су са антибиотиком довицином. Добијени резултати за МИС-вредности екстраката изражене су у mg mL^{-1} и приказане су у табели 18.

Табела 18. Антибактеријска активност екстраката пшеничних клијанаца, пшеничне траве и антибиотика довицина на проучаване сојеве Gr^+ и Gr^- бактерија

Сојеви бактерија	МИС вредности (mg mL^{-1})		МИС вредности ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	ЕК	ХК	ЕТ	довицин
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	5,00	0,325	10,00	0,49
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	5,00	0,625	10,00	0,24
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 31488	5,00	0,325	5,00	0,93
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	10,00	10,00	20,00	0,49
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	5,00	5,00	10,00	0,93
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 43522	5,00	5,00	10,00	0,93
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	5,00	0,625	5,00	0,49

Легенда: ЕК - етанолски екстракт пшеничних клијанаца; ХК - хексански екстракт пшеничних клијанаца; ЕТ - етанолски екстракт пшеничне траве

Оцена добијених резултата према скали коју наводи Kuete (2010), потврђује да су сви примењени екстракти (ЕК, ХК, ЕТ) испољили умерену до слабу антибактеријску активност у односу на испитиване сојеве бактерија. Према овој скали, само екстракти који показују минималну инхибиторну концентрацију мању од $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ могу се сматрати екстрактима који имају јаку антибактеријску активност, док екстракти од $0,1$ до $0,625 \text{ mg mL}^{-1}$ показују умерену активност, а свака концентрација већа од $0,625 \text{ mg mL}^{-1}$ сматра се концентрацијом екстракта са слабом активношћу. Такође, сви екстракти су испољили вишеструко слабије деловање у поређењу са антибиотиком, који је служио као позитивна контрола (табела 18).

Најрезистентнији бактеријски сој био је *Enterobacter aerogenes*. Генерално, сагледавајући антибактеријску активност екстраката, може се установити редослед екстракта од најјаче до најслабије антибактеријске активности, који је био следећи: хексански екстракти клијанаца > етанолски екстракти клијанаца > етанолски екстракти траве. У поређењу са етанолским екстрактима пшеничних клијанаца, хексански екстракти су испољили већу антибактеријску активност и деловали су у дозама од $0,325 \text{ mg mL}^{-1}$ према *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*, $0,625 \text{ mg mL}^{-1}$ према *Salmonella enteritidis* и *Listeria ivanovii*, 5 mg/mL према *Staphylococcus aureus* и *Listeria monocytogenes* и 10 mg mL^{-1} према *Enterobacter aerogenes*, о чему у својим истраживањима сведоче и Pallavi et al. (2011), Sundaresan et al. (2015), указујући да антимикробна активност зависи од употребљеног екстрагенса, концентрације екстракта, старости биљног материјала итд.

Пошто је хексан неполаран, коришћен је за екстракцију липофилних компоненти, што указује на снагу липофилног екстракта хексана. И у случају хексанског екстракта најотпорнији је био *Enterobacter aerogenes* (МИС= 10 mg mL^{-1}). Инхибиторно дејство биљних екстраката може се приписати хидрофобним особинама екстраката, који им

омогућавају да реагују са протеином бактеријске ћелијске мембране и митохондријама, нарушавајући њихову структуру и мењајући њихову пропустљивост (Mostafa et al., 2018). Акумулација одређених компоненти у ћелијској мембрани може довести до промена њене структуре и функције. Једна од врло важних промена је повећање површине мембране, услед њеног бубрења, које је израженије код хидрофобних компоненти, због накупљања липофилних једињења. Ово је вероватно последица разлике у типу хидрофобне интеракције са делом мембране где се налазе липофилна једињења. Хидрофобне супстанце могу да доведу до таложења липида ћелијске мембране, нарушавајући на тај начин њену организацију, при чему она постаје пропустљивија, док неке супстанце могу везати протеине ћелијске мембране – најчешће је то реакција липофилних једињења са хидрофобним деловима протеина (Sikkema et al., 1994). Као резултат хидрофобне интеракције са мембраном ремети се њена функција - повећана пропустљивост мембране за протоне (јоне) и протеине мембране (Sikkema et al., 1994).

Фитохемијске анализе екстракта траве *Triticum aestivum* показале су присуство биоактивних компоненти попут фенола, терпеноида, флавоноида, гликозида, алкалоида, танина и сапонина који доприносе његовом антимикробном деловању (Rajpurohit et al., 2015). У основи, верује се да је антимикробна активност одређених биљних врста последица присуства секундарних метаболита који делују појединачно или у заједници, тј. синергистички. Екстракт пшеничне траве има висок садржај биофлавоноида, који могу да доведу до антимикробних ефеката (Deshwal and Deepshikha, 2018), и хлорофила који поседује антибактеријски потенцијал (Jayavanth et al., 2011). Антимикробна природа фитохемијских једињења условљена је њиховим хемијским својствима, као што су растворљивост, испарљивост, хидрофобност/липофилност (Stratford and Eklund, 2003), мада ефикасност тих антимикробних једињења зависи од рода, врсте и соја циљног микроорганизма, почетног микробног оптерећења, али и од фактора окружења, као што су рН, активност воде, температура итд. (Negi, 2012).

Анализа дејства етанолских екстраката пшеничних клијанаца и пшеничне траве показује да су етанолски екстракти клијанаца испољили већу антимикробну активност. Етанолски екстракти клијанаца су деловали антибактеријски у концентрацијама од 5–10 mg mL⁻¹ у односу на етанолске екстракте пшеничне траве који су деловали у опсегу од 5–20 mg mL⁻¹. Етанолски екстракт пшеничних клијанаца инхибирао је раст *Enterobacter aerogenes* при концентрацији од 10 mg mL⁻¹, док је етанолски екстракт пшеничне траве исти ефекат изавао при концентрацији од 20 mg mL⁻¹. Такође, биле су потребне два пута веће концентрације екстракта пшеничне траве (10 mg mL⁻¹) да би инхибирале раст *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* и *Listeria monocytogenes* у поређењу са етанолским екстрактима пшеничних клијанаца (5 mg mL⁻¹). То се може довести у везу са садржајем фитохемијских једињења и антиоксидативном активношћу у коришћеном биљном материјалу, с обзиром на то да је већ утврђено да су узорци пшеничних клијанаца имали већи садржај укупних фенола, флавоноида и већу антиоксидативну активност у односу на пшеничну траву. Ово указује на повезаност полифенола и биолошке активности (антиоксидативне и антимикробне). Дејство фенолних компонената на бактеријске сојеве повезује се са присуством хидроксилних група у фенолним једињењима, које се могу везати за молекуле воде у бактеријској ћелији и, с једне стране, спречити динамичке процесе у ћелијама, а, с друге стране, фенолне киселине могу довести до коагулације протеина бактеријске ћелије и инактивације ензима значајних за синтезу аминокиселина неопходних за раст бактеријске ћелије (Cavalieri et al., 2005).

Антимикробна активност екстраката приписује се синергистичким ефектима различитих хемијских компонената присутних у екстрактима (Musa et al., 2015). Разлике у антибактеријском потенцијалу испитиваних екстраката могу се довести у везу са

различитим хемијским саставом употребљеног материјала, разликама у генетичким карактеристикама тестираних сојева и различитим екстрагенсом, јер се различита активност екстраката може довести у везу са изоловањем различитих активних једињења, уз употребу селективних растварача при екстракционом поступку. На то колико врста растварача утиче на антибактеријски потенцијал указују резултати Bussmann et al. (2010), који су испитивали антимикуробну активност 96% етанолних и водених екстраката 141 биљне врсте на комерцијално доступне бактеријске сојева. Етанолни екстракти су испољили јачу активност и много шири спектар деловања од водених екстраката. Међутим, тешко је упоређивати податке из литературе, јер су фактори који утичу на резултате променљиви: врста примењене екстракције, композиција екстракта, као и примењена метода антимикуробних тестова.

Различита ефикасност екстраката у односу на Gr^+ и Gr^- бактерије је у вези са специфичном структуром ћелијске мембране. Грађа ћелијског зида Gr^- бактерија је сложенија у односу на грађу Gr^+ бактерија, јер садржи танак слој пептидогљукана, окружен спољашњом мембраном коју чине липополисахариди, а код Gr^+ бактерија не постоји спољашња мембрана, већ дебео слој пептидогљукана (Silhavy et al., 2010). Управо је спољашња мембрана баријера која ограничава дифузију активних материја из агенса (Pierozan et al., 2009).

6.12. Примена пшеничних клијанаца и пшеничне траве у производњи кекса

Задатак овог дела истраживања је био да се утврди утицај супституције дела пшеничног брашна са пшеничним клијанцима и пшеничном травом у праху на хемијска, фитохемијска и антиоксидативна својства добијених производа – кекса.

6.12.1. Хемијска и фитохемијска анализа сировина за производњу кекса

Пшенични клијанци и пшенична трава у праху су се користили као делимични супституенти пшеничног брашна (2,5, 5 и 7,5 %). Ради тога је у коришћеним сировинама (пшенично брашно, пшенични клијанци и млада биљка/пшенична трава) одређиван садржај влаге, протеина, масти и минералних материја (табела 19).

Табела 19. Основни хемијски састав сировина које се користе за припрему кекса

Састојак	Влага, %	Протеини, %	Масти, %	Пепео, %
Брашно Т-500	8,58	9,50	1,30	0,50
Пшенични клијанци	10,82	32,90	3,60	3,79
Пшенична трава	8,30	35,68	1,44	15,32

Све вредности, изузев садржаја влаге, изражене су у % с.м.

Из података датих у табели 19 може се видети да је међу испитиваним сировинама највећи садржај укупних протеина и пепела (минералних материја) имала пшенична трава. Садржај протеина у пшеничној трави био је 35,68%, а у клијанцима 32,90%. Садржај минералних материја био је вишеструко већи у пшеничној трави (15,32%) него у пшеничним клијанцима (3,79%).

Поред основне хемијске анализе, извршена је и фитохемијска карактеризација пшеничних клијанаца и пшеничне траве, одређивањем садржаја укупних фенолних једињења, садржаја α -токоферола и антиоксидативне активности (табела 20).

Табела 20. Садржај укупних фенола, α -токоферола и антиоксидативни потенцијал суплемената пшеничних клијанаца и пшеничне траве

Састојак	Укупни феноли, mg GAE g ⁻¹ с.м.	α -токоферол, μ g g ⁻¹ с.м.	DPPH, % инхибиције	ABTS, % инхибиције
Пшенични клијанци	14,40 _a	60,05 _a	73 _a	91 _a
Пшенична трава	8,30 _b	14,70 _b	41 _b	57 _b

Различита слова у истој колони значе да постоји статистички значајна разлика на нивоу од $p < 0,01$ према LSD тесту.

Садржај укупних фенола у пшеничним клијанцима износио је 14,40 mg GAE g⁻¹ с.м., у пшеничној трави 8,30 mg GAE g⁻¹ с.м., а садржај α -токоферола 60,05, односно 14,70 μ g g⁻¹ с.м. Антиоксидативна активност пшеничних клијанаца и пшеничне траве, мерена DPPH-тестом износила је 73, односно 41%; а ABTS-тестом – 91, односно 57%. Пшенични клијанци су били значајно бољи извор укупних фенола и α -токоферола, а испољили су и већи антиоксидативни потенцијал у односу на пшеничну траву.

6.12.2. Утицај делимичне супституције пшеничног брашна са пшеничним клијанцима у праху на основна хемијска својства кекса

Анализе основних хемијских параметара кекса од пшеничног брашна, делимично супституисаног прашкастим формама пшеничних клијанаца, показале су да се добија кекс са повећаним садржајем протеина, масти, минералних материја и повећане енергетске вредности, али са смањеним садржајем укупних угљених хидрата у поређењу са контролним кексом – кексом без пшеничних клијанаца ($p < 0,05$) – табела 21.

Табела 21. Хемијска анализа кекса од пшеничног брашна, делимично супституисаног са прашкастим формама пшеничних клијанаца (g/100 g с.м.; ** kcal/100g с.м)

Варијанте	Протеини	Масти	Угљени хидрати*	Скроб	Пепео	Енергетска вредност**
Контрола	6,76 \pm 0,07 _d	17,74 \pm 0,04 _c	74,85 \pm 0,12 _a	36,64 \pm 0,46 _c	0,65 \pm 0,00 _d	486,08 \pm 0,20 _d
2,5% клијанаца	6,95 \pm 0,08 _c	18,27 \pm 0,04 _b	74,07 \pm 0,12 _b	38,37 \pm 0,37 _a	0,71 \pm 0,2 _c	488,53 \pm 0,24 _c
5% клијанаца	7,14 \pm 0,06 _b	19,09 \pm 0,05 _a	72,91 \pm 0,01 _c	37,29 \pm 0,43 _b	0,86 \pm 0,00 _b	492,01 \pm 0,24 _a
7,5% клијанаца	7,54 \pm 0,07 _a	18,97 \pm 0,07 _a	72,59 \pm 0,01 _d	34,72 \pm 0,42 _d	0,91 \pm 0,9 _a	491,21 \pm 0,32 _b

*угљени хидрати = сува материја – (протеини + масти + пепео); ** Енергетска вредност (kcal/100 g суве материје): 1 g протеина = 4 kcal; 1 g угљених хидрата = 4 kcal; 1 g масти = 9 kcal.

Резултати су приказани као средња вредност (n=3) \pm стандардна девијација. Различита слова у истој колони значе да постоји статистички значајна разлика на нивоу од $p < 0,05$ према LSD тесту.

Пораст удела супституента у укупној смеси брашна и праха пшеничних клијанаца довео је до пораста протеина у производу. Уношење 7,5% пшеничних клијанаца у замес условило је повећање садржаја протеина у кексу за 11% у односу на контролни кекс, тј. са 6,76% (контролни кекс) на 7,54% (табела 21). Ово статистички значајно повећање ($p < 0,05$) је последица делимичне супституције брашна са клијанцима, који представљају бољи извор протеина (32,90%) у односу на пшенично брашно (9,5%) (табела 19). Повећање садржаја протеина у клијанцима у односу на семе резултат је промена током клијања које се објашњавају ензимским и фитохормонским променама или променама композиције након разградње других састојака (Kim et al., 2012). Ензими

који настају током клијања могу довести до хидролизе одређених компоненти, што резултира повећањем учешћа фракција протеина (Bazaz et al., 2016). Клијање повећава садржај азота у семену, а то значи и садржај протеина, јер је он у директној вези са садржајем азота (Ohm et al., 2016). Садржај азота је значајно већи у пшеничним клијанцима у односу на брашно целог семена, па самим тим и у односу на пшенично бело брашно, што је показала хемијска анализа. Просечан садржај азота у целом пшеничном семену износио је 1,90%, а у пшеничним клијанцима 5,07% (табела 16).

Учешће пшеничних клијанаца резултирало је повећањем садржаја протеина у кексу, који имају већи афинитет према води у односу на угљене хидрате (Okeagu, 2001), па се висок ниво протеина може довести у везу и са ниским садржајем влаге у готовом производу. Клијање побољшава способност апсорпције воде/капацитет везивања воде код многих биљних врста, а то се приписује како повећању садржаја протеина, тако и промени квалитета протеина након клијања, а такође и раскидању веза у молекулима полисахарида. Све то доводи до повећања броја „места“ интеракције са водом, односно до већег задржавања воде (Gamel et al., 2006). Исти тренд запазили су Grossmann et al. (1998) код клијавог кукуруза. Према наводима Lorenz (1980) и Lukow and Bushuk (1984), пораст капацитета везивања воде током клијања настаје услед формирања једињења мање молекулске масе, захваљујући активности амилазе и протеазе. Ово може бити додатна предност за готови производ, у погледу боље стабилности и дужег рока трајања јер су преживљавање, раст и развој микроорганизама, који изазивају квар прехранбених производа у условима ниског садржаја влаге отежани.

Осим повећања садржаја протеина, супституција једног дела пшеничног брашна са пшеничним клијанцима довела је и до повећања садржаја минералних материја (табела 21). У поређењу са контролом (0,65%), супституцијом брашна са 7,5% праха клијанаца, садржај пепела се статистички значајно повећао – на 0,91% ($p < 0,05$). Другим речима, садржај минералних материја у кексу са 7,5% клијанаца био је за 38% већи у односу на контролни кекс (Ђуровић et al., 2021). То је последица учешћа клијанаца, у којима је садржај минералних материја био 3,79%, тј. значајно већи у односу на брашно које је садржало 0,50% пепела (табела 19). Утврђено је да пшенични клијанци садрже значајно већи ниво и С, N, K, P и Ca, у поређењу са садржајем ових елемената у целом пшеничном семену, а самим тим и у пшеничном брашну Т-500, које је знатно сиромашније у садржају минералних материја од целог семена (табела 14). Контролисано клијање семена повећава биорасположивост минералних елемената (Lemmens et al., 2018), а повећани садржај минералних елемената у клијанцима је последица активности ензима фитазе током клијања (Inyang and Zakari, 2008; Yaqoob et al., 2018). Ohm et al. (2016) такође истичу да клијање значајно повећава садржај пепела у семену.

У поређењу са контролом, у којој је садржај масти био 17,74%, замена пшеничног брашна са 5% пшеничних клијанаца имала је за последицу значајно повећање садржаја масти – 19,09% ($p < 0,05$), што је у сагласности са резултатима других истраживача (Hegstad, 2008; Kim et al., 2012; Yaqoob et al., 2018). При томе треба имати у виду да масти у кексу могу утицати на његову постојаност, јер се подвргавају оксидативној детериорацији, па је отуда већа вероватноћа да ће се кекс са већим садржајем масти брже покварити.

Делимична супституција пшеничног брашна са пшеничним клијанцима резултирала је смањењем садржаја угљених хидрата у кексу (табела 21). Садржај укупних угљених хидрата у кексу се смањивао са повећањем удела супституента, тако да је највеће смањење у односу на контролу (74,85%) било у кексу са 7,5% клијанаца (72,59%). Смањење садржаја угљених хидрата додатком клијанаца у поређењу са контролом може настати због повећања активности α - и β -амилаза током клијања и хидролизе скроба и других полисахарида, што резултира смањењем садржаја укупних

угљених хидрата (Үақооб et al., 2018). Смањење садржаја угљених хидрата у кексу је позитивна карактеристика с обзиром на чињеницу да у новије време расте потреба за природним прехранбеним производима са смањеним садржајем угљених хидрата.

У поређењу са контролним кексом, чија је енергетска вредност била 486 kcal, замена дела пшеничног брашна са 2,5, 5 и 7,5% пшеничним клијанцима, довела је до одговарајућег повећања енергетске вредности на 488,53; 492,01 и 491,21 kcal (табела 21). Ово повећање енергетске вредности кекса настаје због повећања садржаја протеина, а посебно масти, које имају два пута већу енергетску вредност у односу на протеине и угљене хидрате (Roday, 2007). Сличне резултате енергетске вредности у кексу наводе и Adeola and Ohizua (2018) испитивајући супституцију пшеничног брашна у кексу са брашном од банана и кромпира.

6.12.3. Утицај делимичне супституције брашна са пшеничним клијанцима у праху на фитохемијска својства кекса

У зависности од количине праха пшеничних клијанаца унесеног у замес, садржај укупних фенолних једињења је био од 180,0 до 245,5 mg GAE 100 g⁻¹ с.м., што је значајно више у односу на контролу (110,0 mg GAE 100 g⁻¹ с.м) – табела 22.

Табела 22. Садржај укупних фенола, α-токоферола и антиоксидативна активност у кексу са додатком прашкастих форми клијанаца

	Укупни феноли, mg GAE 100 g ⁻¹ с.м.	α-токоферол, mg kg ⁻¹ с.м.	DPPH, % инхибиције	DPPH, μmol TE 100 g ⁻¹ с.м.	ABTS, % инхибиције	ABTS, μmol TE 100 g ⁻¹ с.м.
Контрола	110,0±11,88 _c	32,46±0,21 _b	9,97±0,59 _d	59,1±4,92 _d	16,05±0,3 _d	411,0±9,40 _d
2,5% клијанаца	180,0±11,44 _b	33,74±0,50 _a	16,28±1,65 _c	117,8±16,25 _c	24,4±1,37 _c	648,0±39,02 _c
5% клијанаца	235,9±5,73 _a	34,56±0,16 _a	25,86±1,21 _b	214,8±11,96 _b	37,5±2,5 _b	1035,0±72,22 _b
7,5% клијанаца	245,5±18,14 _a	34,07±0,10 _a	39,60±1,92 _a	342,5±18,45 _a	47,5±2,11 _a	1325,0±62,28 _a

Резултати су приказани као средња вредност (n=3) ± стандардна девијација, осим у случају α-токоферола (n=2). Различита слова у истој колони значи да постоји статистички значајна разлика на нивоу од p<0,01 према LSD тесту.

Максимални садржај укупних фенолних једињења утврђен је код варијанте са 7,5% пшеничних клијанаца и износио је 245,5 mg GAE 100 g⁻¹ с.м., што је у поређењу са контролом (110,0 mg GAE 100 g⁻¹ с.м) 2,2 пута више (табела 22). Овај тренд се може сагледати и визуелано (слика 39). Уношење најмање количине пшеничних клијанаца (2,5%) значајно је утицало (p<0,01) на повећање садржаја укупних фенола (180,0 mg GAE 100 g⁻¹ с.м), што се може приписати чињеници да су клијанци богат извор фенолних једињења, о чему сведоче Zhou et al. (2011), Gawlik-Dziki et al. (2017), која настају током клијања, али и да се количина истих повећава током печења кекса (Gelinias and McKinnon, 2006; Dziki et al., 2014). Због промене хемијске структуре фенолних једињења током процеса печења, могуће полимеризације, смањене екстрабилности и оксидације често се добијају контрадикторни резултати (Cheynier, 2005; Leenhardt et al., 2006; Holtekjolen et al., 2008; Alton et al. 2009; Sompong et al., 2011; Sharma and Gujral, 2011).

У овом раду није испитиван садржај укупних фенола у тесту/замесу, тј. пре печења, па се не може говорити о томе да ли је процес печења утицао или не, тј. да ли се садржај фенола повећао или смањено. Али ако се упореде кекс са и без клијанаца, може се констатовати да је кекс са клијанцима имао значајно већи садржај укупних фенола, у

поређењу са кексом без клијанаца (контрола). Ово повећање, с једне стране, последица је додатка клијанаца, јер они представљају добар извор укупних фенола, а с друге стране, на садржај укупних фенола могу утицати и неки процеси у сложеном матриксу попут Мајарових реакција. Да су производи Мајарових реакција донекле укључени у укупну количину фенолних једињења тврде и Samaras et al. (2005). То је последица како топлотно-индукованих продуката Мајарових реакција (редуктона и меланоидина), производа оксидације полифенола, тако и производа карамелизације који, такође, могу утицати на укупан садржај фенола. Да једињења настала под утицајем топлоте и Мајарових реакција повећавају садржај укупних фенола указује и Holtekjolen et al. (2008).

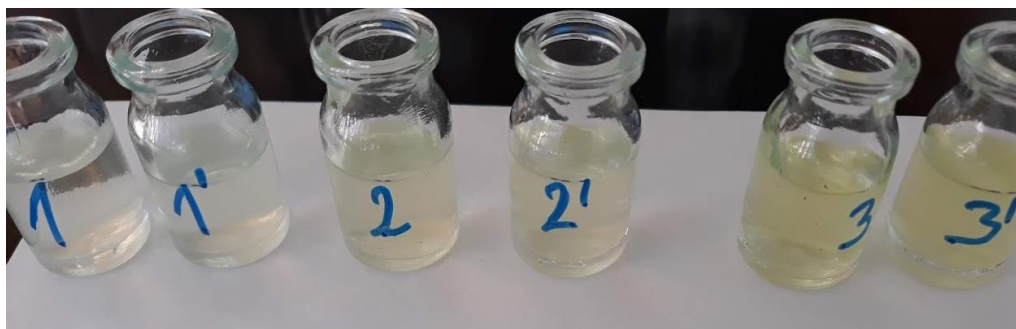


Слика 39. Обојења раствора чији је интензитет сразмеран количини фенолних једињења а који се мери на 760 nm: лево – контролни кекс, с лева на десно кекс са 2,5; 5 и 7,5% клијанаца

Контролни кекс је имао значајно мањи садржај α -токоферола ($p < 0,01$) у односу на кекс добијен од брашна са додатим клијанцима (табела 22). Највећи садржај α -токоферола био је у узорцима код којих је брашно супституисано са 5% клијанаца ($34,56 \text{ mg kg}^{-1}$), у поређењу са контролним кексом ($32,46 \text{ mg kg}^{-1}$). Производи са 2,5; 5 и 7,5% пшеничних клијанаца нису се међусобно разликовали у погледу садржаја α -токоферола на нивоу значајности од $p < 0,01$. На садржај α -токоферола у пекарским производима могу утицати различите интегралне житарице и плодови, што тврди Pasiás et al. (2018). Разлика у садржају α -токоферола у кексу са и без клијанаца, може бити последица коришћења пшеничних клијанаца у изради кекса. Резултати овог истраживања показују да клијанци, коришћени за израду кекса, представљају добар извор α -токоферола ($60,05 \mu\text{g g}^{-1}$, табела 20), а литературни наводи указују да је садржај α -токоферола у пшеничном брашну значајно нижи -10 mg kg^{-1} (Hejtmánková et al., 2010). На садржај токоферола утичу различити фактори. Постоје истраживања о утицају температуре и начина печења на садржај појединих антиоксиданата, између осталих и токоферола. Leenhardt et al. (2006) наводе да примењена температура током целокупног процеса производње кекса није испољила утицај на велики губитак витамина Е. С друге стране, постоје и истраживачи који тврде да се губици токола могу приписати директној оксидацији током прављења замеса и уништавању топлотом током печења. Wennermark and Jagerstad (1992) наводе да је израда теста резултирала смањењем садржаја токоферола и токотриенола од 20 до 60%. Разлог може бити уградња кисеоника у тесто, што олакшава оксидацију неестерификованих полинезасићених масних киселина, а крајњи резултат су оксидација липида и уништавање витамина Е (Nanditha and Prabhasankar., 2009).

У овом раду није испитиван садржај α -токоферола у замесу и након печења у кексу, дакле, не може се тврдити да ли је процес печења утицао или не, тј. да ли се садржај α -токоферола повећао или смањено. Може се констатовати да је кекс са клијанцима имао значајно већи садржај α -токоферола у односу на кекс без клијанаца, тј. контролни кекс

(табела 22), а интензитет жуте боје припремљених екстраката одговарао је повећању садржаја α -токоферола (слика 40). Извор токоферола у испитиваним узорцима је и маслац, али с обзиром на то да је његов удео у свим узорцима константан, претпоставка је да виши садржај α -токоферола у узорцима са клијанцима, у односу на узорке без клијанаца, потиче управо од клијанаца (Ђуровић et al., 2021). Наравно, треба имати у виду комплексност матрикса и међусобне интеракције унутар њега током процеса замеса теста и печења.



Слика 40. Узорци метанолног раствора, добијени након упаравања хексана из екстракта кекса, за одређивање α -токоферола (1–контрола; 2–кекс са 2,5% клијанаца и 3–кекс са 5% клијанаца)

У складу са Уредбом Европске Уније, бр. 1169/2011 Европског парламента и Савета о пружању информација о храни потрошачима (Regulation European Union – EU No. 1169/2011 of the European Parliament and of the Council on the provision of food information to consumers), значајна количина витамина у некој храни може се декларисати само ако храна садржи 15% референтних вредности хранљивих састојака наведених у тој регулативи. За витамин Е референтна вредност уноса је 120 mg kg^{-1} , односно 15% референтног уноса је 18 mg kg^{-1} . Садржај α -токоферола у добијеном кексу, са и без пшеничних клијанаца, био је виши од 18 mg kg^{-1} и кретао се у опсегу од 32,46 до $34,56 \text{ mg kg}^{-1}$, што представља скоро 28% од дневне вредности уноса. Највећи део токоферола потиче из маслаца коришћеног у припреми, а један део се може приписати додатим клијанцима, јер је кекс са клијанцима имао већи садржај α -токоферола, у односу на кекс без клијанаца, а садржај маслаца је у сваком замесу био константан (исти).

Према Уредби Комисије (ЕУ) бр. 432/2012, којом се успоставља листа дозвољених здравствених тврдњи у вези са храном, осим оних које се односе на смањење ризика од болести и на развој и здравље деце, следећа здравствена синтагма може се користити за намирнице које садрже ниво витамина Е већи од 15% референтног дневног уноса: „Витамин Е доприноси заштити ћелија од оксидативног стреса“ (Pasiás et al., 2018).

Кекс без клијанаца (контрола), као и кекс произведен делимичном заменом пшеничног брашна Т-500 са пшеничним клијанцима (2,5%, 5% и 7,5%), тестирани су ради одређивања њихове антиоксидативне активности, тј. на активност „чишћења“ радикала помоћу DPPH-теста. Резултати активности, изражени кроз % инхибиције или $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$, приказани су у табели 22. Може се видети да је делимична замена пшеничног брашна Т-500 са пшеничним клијанцима резултирала повећањем антиоксидативне активности кекса, тј. повећањем % инхибиције. Добијене вредности зависе од нивоа супституције и са повећањем нивоа супституције повећао се % инхибиције, тако да је кекс са 7,5% клијанаца показао антиоксидативну активност од 39,6% (DPPH-тест), односно 47,5% (ABTS-тест), тј. $342,5 \mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ и $1325 \mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$. И најнижи ниво супституције пшеничних клијанаца (2,5%) утицао је на пораст

антиоксидативног капацитета кекса и био је статистички значајно већи (648 $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$) у односу на контролни кекс (411 $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$, према ABTS-тесту). Такође, антиоксидативни потенцијал мерен и DPPH-методом, показао је исту тенденцију, односно супериорност кекса са 2,5% клијанаца у односу на кекс без клијанаца (контрола).

Појачана антиоксидативна активност кекса обогаћеног пшеничним клијанцима може се приписати знатно већем укупном уделу фенолних једињења у пшеничним клијанцима у поређењу са пшеничним брашном. Ово стога што у току процеса клијања оксидативни стрес доприноси да се у клијанцима развијају самоодбрамбени механизми попут интензивирања активности антиоксидативних ензима и брзине синтезе биоактивних једињења, као што су феноли и флавоноиди, што доводи до повећања антиоксидативне способности клијанаца и хране произведене на тој основи (Zhou et al., 2011; Xu et al., 2014). Активност уклањања радикала била је већа у кексу са клијанцима, него у контроли, што је последица већег садржаја фенолних компоненти у клијанцима. Постоји висока корелација, изражена коефицијентом корелације ($R^2=0,87$), између садржаја укупних фенола и % инхибиције мерене DPPH- методом. Такође, постоји висока корелација ($R^2=0,91$) између садржаја укупних фенола и ABTS (% инхибиције), што наводи на закључак да додавање клијанаца може утицати на антиоксидативну активност (Ђurović et al., 2021). Укупни феноли најчешће се сматрају маркером антиоксидативне активности. Међутим, узимајући у обзир различитости и/или интеракције унутар матрикса, ово је поједностављено гледиште. Корелација између антиоксидативне активности и садржаја укупних фенола документована је радовима Chlopicka et al. (2012), Carcho and Ferreira (2013). Gawlik-Dziki et al. (2017) су утврдили да присуство пшеничних клијанаца у хлебу повећава садржај антиоксиданата (ензимских и неензимских), као и антирадикалски потенцијал. Заменом дела пшеничног брашна са компонентама, као што су пшенична влакна, пшеничне мекиње итд., значајно се повећава антиоксидативна способности кекса и сродних производа (Bilgiçli et al., 2007).

Добијени резултати указују на то да огледне варијанте поседују „инхибиторе радикала“ или средства за уклањање радикала са могућношћу да делују као примарни антиоксиданти. Они могу реаговати са слободним радикалима, у првом реду са пероксидним радикалима, који су главни пропатори ланца аутооксидације масти (Sharma and Gujral, 2014).

Постојање веће количине шећера у огледним варијантама може довести до повећања антиоксидативне активности, јер растворљиви угљени хидрати могу синергистички деловати са фенолним једињењима и повећати антиоксидативну активност (Xu et al., 2019). Такође, López-Perea (2019) тврди да интеракције између фенола и једињења присутних у огледним варијантама, попут угљених хидрата и протеина, могу допринети повећању антиоксидативних активности, а постоје и истраживања која указују на већу повезаност између антиоксидативне активности и укупног фенолног садржаја током дехидратације (Deera et al., 2007).

Антиоксидативна активност пекарских производа може се модификовати са активним оксидативним ензимима који се користе у пекарској производњи или оксидацијом кисеоником из околне средине (Chlopicka et al., 2012).

Процес печења утиче на антиоксидативни капацитет производа, што се приписује хидросолубилним антиоксидантима (Horszwald et al., 2010). Могуће је да термичка обрада може довести до повећања биорасположивости фенола и антиоксидативне активности (Dziki et al., 2014). Ранија истраживања су показала да антиоксидативна активност у пекарским производима зависи од услова производње, као што су температуре печења, формирање непробављивих комплекса с протеинима хлеба/пекарских производа или са скробом и компонентама састојака из рецептуре (Dziki

et al., 2014). Печење утиче на повећање антиоксидативне активности (Somoza, 2005; Sharma and Gujral, 2014; Baba et al., 2014), што се може објаснити стварањем смеђих пигмената меланоидина, продуката Мајарових реакција који настају током термичке обраде/печења (Xu and Chang, 2008; Manzocco et al., 2011). Развој Мајарових реакција често се догађа упоредо са другим реакцијама и процесима. Поједини производи Мајарових реакција имају већу антиоксидативну активност у поређењу са прекурсорима (Nicoli et al., 1997; Sharma and Gujral, 2014). Продукти Мајарових реакција могу деловати као антиоксиданти и уклањати слободне радикале (Jing and Kitts, 2000; El-Massry et al., 2003), што доприноси бољој антиоксидативној активности пекарских производа. Наиме, кекс са максималним нивоом супституције брашна са клијанцима (од 7,5%), имао је најтамнију боју (слика 41) због стварања смеђих пигмената – меланоидина, а поседује и највећи антиоксидативни потенцијал, мерен DPPH- и ABTS-тестом. Запажа се, исто тако, да се садржаји укупних фенола у кексу са 5% (235,9 mg GAE 100 g⁻¹ с.м) и 7,5% клијанаца у праху (245,5 mg GAE 100 g⁻¹ с.м) нису статистички разликовали, али је антиоксидативни потенцијал мерен и DPPH- и ABTS-методом био значајно већи у варијанти са 7,5% клијанаца (табела 22). Томе доприносе, не само укупни феноли, α -токофероли већ и производи Мајарових реакција. Наиме, кекс-производи са 5% и 7,5 % пшеничних клијанаца, поред тога што се нису статистички значајно разликовали у погледу садржаја укупних фенола, нису се разликовали ни у погледу садржаја α -токоферола (који доприносе укупном антиоксидативном статусу), али су се статистички разликовали у антиоксидативном капацитету, тј. кекс са 7,5% пшеничних клијанаца имао је већи антиоксидативни капацитет, што би се могло довести у везу са производима Мајарових реакција и стварањем смеђих пигмената.

Производи Мајарових реакција су у јакој корелацији са садржајем једињења која поседују антиоксидативну способност (Jing and Kitts, 2000; Manzocco et al., 2011; El-Massry et al., 2003; Que et al., 2008; Miranda et al., 2009). Различите студије су указале на високу антиоксидативну способност меланоидина, који делују преко различитих механизма, као што су кидање ланаца, уклањање кисеоника, отклањање слободних радикала (Borrelli et al., 2003; Michalska et al., 2008).

Могло би се закључити да се укупни антиоксидативни потенцијал добијених производа не приписује само полифенолним једињењима, присуству токоферола, већ и производима Мајарових реакција, да и полифеноли и токофероли у кексу и пекарским производима потичу од природних састојака, који се користе у процесу припреме, а меланоидини се јављају током печења и имају антиоксидативне ефекте *in vitro*.

Може се закључити да је кекс са прашкастим формама пшеничних клијанаца имао значајно већи садржај протеина, минералних материја, укупних фенола, α -токоферола као и антиоксидативни потенцијал у односу на контролни кекс, тј. кекс без пшеничних клијанаца.

6.12.4. Сензорна својства кекса са пшеничним клијанцима

Што се тиче сензорних особина производа, запажено је да је њихова боја варирала од светло-жуте, златасте, па до тамно-смеђе, карамел боје (слика 41). Најсветлију боју производа имала је контролна варијанта кекса, односно кекс без клијанаца, а са порастом процента супституције пшеничног брашна са клијанцима, боја је постајала све тамнија.

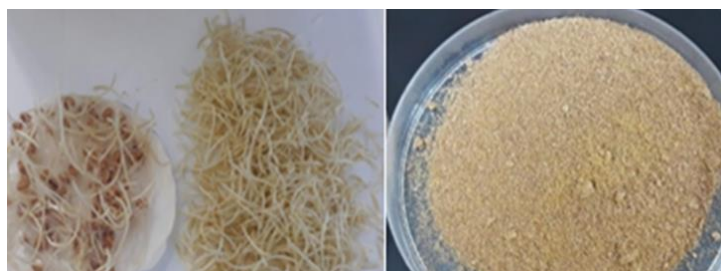
Боја производа је у корелацији и са садржајем протеина у производу (Chevallier et al., 2000). Најсветлија боја је била у контролном кексу са најмањим нивоом протеина, а најтамнију боју има кекс са највећим садржајем протеина и највећим нивоом

супституента (табела 21). Кекс са 2,5 и 5% клијанаца имао је пријатан укус и арому интензивнију од контролног кекса, док је кекс са 7,5% клијанаца, због опоријег укуса и ароме, био мање прихватљив за конзументе. До сличних запажања дошли су и други истраживачи (Gawlik-Dziki et al., 2017; Yaqoob et al., 2018). Због активирања амилолитичких ензима током процеса клијања, сложени молекули скроба се трансформишу у једноставне олигосахариде и моносахариде, што даје природну сласт производима са проклијалим семеном и клијанцима, чиме се смањује потреба за додатним уношењем шећера. Осим тога, ензимском разградњом протеина настају пептиди и аминокиселине, које у комбинацији са једноставним молекулима шећера, граде активна једињења која учествују у стварању мириса и укуса (Heiniö et al., 2001).



Слика 41. Печени кекс и одговарајући узорци млевеног кекса, слева на десно растући садржај супституента. 2 – 2,5%; 3 – 5%; 4 – 7,5% клијанаца (оригинал В. Ђуровић)

Велике разлике у боји кекса могу бити последица употребљених састојака и процентуалног учешћа супституента, тј. клијанаца, јер клијанци имају тамнију боју (слика 42), па је и боја замеса у рецептури са клијанцима била тамнија од боје замеса без клијанаца.



Слика 42. Сирови, осушени и самлевени клијанци коришћени у припреми кекса (оригинал В. Ђуровић)

Поред тога, црвенкасто-смеђа пигментација је резултат Мајарових реакција или неензимског смеђег обојења које зависи од садржаја редукујућих шећера и аминокиселина или протеина, температуре и трајања печења (Pereira et al., 2013). Са повећањем процента клијанаца, интензивирају се и реакције тамњења. Високи ниво протеина, шећера и фенола и у клијанцима и у кексу са клијанцима доводи се у везу са променом боје производа, односно тамнија боја кекса је последица и Мајарових реакција (меланоидини) и активности ензима полифенолооксидазе (Secchi et al., 2011; Taranto et al., 2012; Jan et al., 2016). Taranto et al. (2012) указују на високу корелацију између

активности полифенолоксидазе и садржаја протеина у пшеници, мељави, и да то значајно утиче на тамњење/посмеђивање замеса и производа. На реакције смеђег тамњења утичу и други фактори, као што су: активност воде, рН, температура, шећери, врста и однос аминокиселина итд. (Sharma и Gujral, 2014; Jan et al., 2016).

6.12.5. Утицај делимичне супституције пшеничног брашна са прашкастим формама младе пшеничне траве на хемијска и фитохемијска својства кекса

Кекс са изданцима пшеничне траве имао је већи садржај протеина, масти, минералних материја и већу енергетску вредност у односу на контролни кекс ($p < 0,05$) (табела 23).

Табела 23. Хемијски састав (g/100g с.м) и енергетска вредност (kcal/100g с.м) кекса од пшеничног брашна са различитим количинама пшеничне траве

	Протеини	Масти	Угљени хидрати*	Скроб	Пепео	Енергетска вредност**
контрола	6,76±0,07 _d	17,74±0,04 _c	74,85±0,12 _a	36,64±0,46 _c	0,66±0,0 _d	486,08±0,20 _d
2,5% пш.траве	6,99±0,05 _c	18,96±0,04 _b	73,13±0,01 _b	37,08±0,71 _a	0,92±0,0 _c	491,08±0,22 _c
5% пш.траве	7,46±0,06 _b	19,31±0,05 _a	72,12±0,11 _b	33,93±0,65 _b	1,11±0,0 _b	492,14±0,28 _b
7,5% пш.траве	7,74±0,05 _a	18,71±0,05 _a	72,19±0,10 _d	33,52±0,37 _d	1,36±0,0 _a	488,10±0,26 _a

*угљени хидрати = сува материја – (протеини + масти + пепео); Резултати су приказани као средња вредност (n=3) ± стандардна девијација. Различита слова у истој колони значи да постоји статистички значајна разлика на нивоу од $p < 0,05$, према LSD тесту.

У кексу са 7,5% младе пшеничне траве садржај протеина се повећао за 14,5%. С обзиром на то да је садржај сирових протеина у пшеничној трави био 35,68%, а у пшеничном брашну 9,5% (табела 20) пораст садржаја протеина у кексу је очекиван – од 6,76% у контролном кексу до 7,74% у кексу са 7,5% праха пшеничне траве, што је нашло потврду у резултатима истраживања неких аутора, као што су Alam et al. (2014).

Садржај укупних минералних материја у кексу са 7,5% пшеничне траве био је дупло већи у односу на контролни кекс (табела 23), јер је и садржај пепела у пшеничној трави износио 15,32%, а у пшеничном брашну само 0,5% (табела 19), па је, самим тим, и делимична замена пшеничног брашна са пшеничном травом довела до повећања садржаја минералних материја у кексу. Већи садржај протеина и минералних материја у кексу са изданцима пшеничне траве директна је последица супституције дела брашна са изданцима пшеничне траве. Садржај пепела у узорцима кекса повећавао се са порастом саржаја праха пшеничне траве који је коришћен као супституент. У контролном кексу садржај пепела је износио 0,66%, док га је највише било у кексу са 7,5% пшеничне траве (1,36%), дакле два пута више. Садржај пепела је мерило садржаја минерала у узорцима хране (Mishra et al., 2011; Agrahar-Murugkar et al., 2015). Минерали су веома битни састојци у исхрани јер помажу и учествују у важним метаболичким функцијама и представљају саставни део молекула одговорних за функционисање организма (хемоглобин, аденозин трифосфат), тврде Essuman et al. (2016) и Ibidapo et al. (2017). Резултати анализе остатака минералних материја (пепела) указују на то да кекс, делимично супституисан са изданцима пшеничне траве, садржи више минерала у односу на контролни кекс, тј. кекс без супституената, што је у складу са резултатима истраживања Alam et al. (2014), Pasha et al., 2018.

Садржај масти у кексу без додатка пшеничне траве (контрола) био је најмањи (17,74%), а у кексу са 5% пшеничне траве највећи –19,31% (табела 23). Сличне вредности садржаја масти у кексу (15,1–18,1%) добили су и други истраживачи (Eneche, 1999; Chinma et al., 2011; Asif-Ul-Alam et al., 2014; Silky and Tiwari, 2014). Садржај масти био је знатно испод 25%, тј. критичне вредности која би довела до ужеглости и стварања непријатних мирисних једињења у кексу (Okpara et al., 2013; Ikuomola et al., 2017). Масти учествују у структури, реолошким особинама и општем квалитету производа, зато су и веома важне. Већи садржај масти у производу је у корелацији са већом калоријском вредношћу производа. Поред тога што су богат извор енергије, масти су неопходне као „носиоци“ витамина растворљивих у мастима, попут витамина А, D, Е и К (Omeire and Ohambele, 2010) и есенцијалних масних киселина. Присуство ниског садржаја масти (а тиме и незасићених масних киселина) је корисно јер може да осигура дужи рок трајања прехранбених производа (Okpara and Okoli, 2014).

Садржај укупних угљених хидрата се смањивао са повећањем процентуалног учешћа супституента – праха пшеничне траве (табела 23). До сличних резултата дошли су и Rahman et al. (2015), који су проучавали утицај нивоа супституције пшеничног брашна у мафинима са прахом пшеничне траве (2,5 до 7,5%) и констатовали да се са повећањем процентуалног учешћа пшеничне траве повећава садржај протеина, силових влакана и минералних материја, док се садржај угљених хидрата смањује.

Варијанте кекса са пшеничном травом имале су већу енергетску вредност у поређењу са контролним кексом, што се може приписати већем садржају протеина и масти, јер је енергетска вредност неког прехранбеног производа у функцији садржаја масти, протеина и угљених хидрата, при чему масти имају дуго већу енергетску вредност у односу на протеине и угљене хидрате.

Делимична замена пшеничног брашна са прашкастим формама младе пшеничне траве резултирала је повећањем садржаја укупних фенола и антиоксидативног потенцијала кекса ($p < 0,01$) – табела 24.

Табела 24. Садржај укупних фенола, α -токоферола и антиоксидативни потенцијал у кексу са додацима прашкастих форми пшеничне траве

	Укупни феноли, mg GAE 100 g ⁻¹ с.м.	α -токоферол, mg kg ⁻¹ с.м.	DPPH, % инхибиције	DPPH, μ mol TE 100 g ⁻¹ с.м.	ABTS, % инхибиције	ABTS, μ mol TE 100 g ⁻¹ с.м.
Контрола	110,00 \pm 11,8 _c	32,46 \pm 0,2 _b	9,97 \pm 0,59 _d	59,10 \pm 4,92 _d	16,05 \pm 0,30 _e	410,9 \pm 9,24 _c
2,5% пш.траве	155,00 \pm 6,12 _b	29,66 \pm 0,27 _c	14,78 \pm 0,28 _c	105,80 \pm 3,84 _c	23,14 \pm 1,07 _b	612,9 \pm 29,59 _b
5% пш.траве	183,2 \pm 4,79 _a	29,57 \pm 0,12 _c	18,91 \pm 0,39 _a	140,70 \pm 2,36 _a	30,47 \pm 0,98 _a	804,8 \pm 15,91 _a
7,5% пш.траве	174,30 \pm 9,59 _{ab}	33,89 \pm 0,60 _a	17,17 \pm 0,43 _b	127,60 \pm 2,76 _b	24,71 \pm 0,66 _b	660,3 \pm 18,80 _b

Резултати су приказани као средња вредност ($n=3$) \pm стандардна девијација, осим у случају α -токоферола ($n=2$). Различита слова у истој колони значе да постоји статистички значајна разлика на нивоу од $p < 0,01$, према LSD тесту.

Делимична супституција пшеничног брашна у најнижем нивоу (2,5%) довела је до значајног повећања укупних фенола (155,00 mg GAE 100 g⁻¹ с.м) у односу на 110,00 mg GAE 100 g⁻¹ с.м. у контролном кексу. Највећи садржај укупних фенола био је у кексу са 5% пшеничне траве и износио је 183,20 mg GAE 100 g⁻¹ с.м. Ово повећање је настало због додавања пшеничне траве, која је добар извор фенолних једињења, што у резултатима својих истраживања констатују и Rahman et al. (2015) и Pasha et al. (2018). Количина

фитохемијских једињења у неком производу зависи и од њиховог садржаја у компонентама које се користе за његову производњу.

Повећању садржаја укупних фенола у кексу допринеле су и многе реакције и интеракције које се дешавају унутар матрикса и пре и током термичке обраде, пре свега реакције карамелизације, и производи Мајарових реакција које значајно утичу на садржај укупних фенола у готовом производу (Borrelli et al., 2003; Samaras et al., 2005). Осим тога, постоји могућност стварања различитих комплекса преко вишеструких водоничних веза између хидроксилних група полифенолних једињења и карбоксилних група из пектинских полисахарида прехранбених влакана или пептида. Дуже излагање производа високој температури током печења може уништити комплексе формиране између везаних фенола и компонената које потичу из других додатих састојака, што потенцијално изазива и повећање садржаја екстрахованих фенола (Reis et al., 2012). Да током процеса печења долази до повећања слободних фенолних једињења услед разградње коњугованих полифенола у пекарским производима сматрају и Abdel-Aal and Rabalski (2013). Могуће је да термичка обрада повећава садржај екстрахованих фенола тврде Dżiki et al. (2014), док Gelinias and McKinnon (2006) повећање садржаја полифенола у кори белог хлеба приписују Мајаровим реакцијама. Како ће утицати процес печења на садржај фенола у производу зависи од примењене температуре и трајања печења, који значајно утичу на укупан садржај фенола, што не мора нужно да значи и смањење њихове вредности. Сложеност интеракција које се одвијају током замеса и у току печења могу бити разлог смањења садржаја укупних фенола ($174,30 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1} \text{ с.м}$) у производу са највећим уносом коришћеног супституента (пшеничне траве) $-7,5\%$ (табела 24).

Садржај α -токоферола у кексу са 2,5% и 5% био је мањи ($29,66; 29,57 \text{ mg kg}^{-1}$) у односу на контролу ($32,46 \text{ mg kg}^{-1}$), а кекс са 7,5% супституисаног брашна имао је највећи садржај α -токоферола $- 33,80 \text{ mg kg}^{-1}$ (табела 24). Претпоставља се да највећи део α -токоферола потиче из маслаца, који је коришћен у производњи кекса, јер је хемијска анализа садржаја α -токоферола у праху пшеничне траве показала да га у њој има $14,7 \mu\text{g g}^{-1}$ (табела 20), што одговара подацима из литературе о његовом садржају у целом пшеничном семену (Tiwarí and Cummins., 2009; Jeong et al., 2017). Сложени процеси који се дешавају током замеса и печења, као и кисеоник, могу да утичу на укупан садржај токоферола. Губитке који се могу десити током замеса Nanditha et al. (2009) приписују директној оксидацији.

Антиоксидативна активност, мерена и DPPH- и ABTS-тестом, била је већа у кексу са пшеничном травом, у односу на контролни кекс (табела 24). Највећа антиоксидативна активност, мерена DPPH-методом ($18,91\%$, односно $140,7 \mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1} \text{ с.м}$) и ABTS-тестом ($30,47\%$, односно $804,8 \mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1} \text{ с.м}$) била је у кексу са 5% пшеничне траве. Иста варијанта имала је и највећи садржај укупних фенола $- 183,2 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ ($p < 0,01$). Постоји високи ниво корелације између садржаја укупних фенола и % инхибиције мереног DPPH-методом ($R^2 = 0,94$) и ABTS-методом ($R^2 = 0,90$), што указује на изражени антиоксидативни капацитет фенола и подударање примењених метода. И ранија истраживања су показала да антиоксидативни капацитет зависи од својстава биоактивних једињења присутних у испитиваним узорцима (Takashima et al., 2012), тј. да антиоксидативни потенцијал пшеничне траве потиче од присутних фенолних једињења и флавоноида (Akbas et al., 2017; Pasha et al., 2018).

Као што је већ наведено и појашњено у делу утицаја термичке обраде на антиоксидативни капацитет кекса са пшеничним клијанцима, и овде треба истаћи да различите интеракције и услови утичу на антиоксидативни потенцијал производа.

Делимична супституција пшеничног брашна са изданцима пшеничне траве довела је до повећања и нутритивних и функционалних својстава кекса у оквиру анализираних параметара. Међутим, поред нутритивних и функционалних својстава, као веома

значајних карактеристика производа, треба задовољити и сензорна, односно органолептичка својства, пре свега, укус и мирис производа, који за кориснике представљају значајан фактор при њиховом одабиру.

6.12.6. Сензорна својства кекса са пшеничном травом

На боју добијеног кекса утицала је делимична замена брашна са прахом пшеничне траве. За зеленкасту боју кекса са пшеничном травом одговоран је пре свега, хлорофил, док је смеђа боја последица Мајарових реакција и реакција карамелизације (слика 43). Друго објашњење за промену боје кекса може бити у вези са чињеницом да су током печења пигменти пшеничне траве и полифенолна једињења подвргнута реакцијама оксидације (Rahman et al., 2015). Стога је први и највидљивији ефекат замене брашна пшеничним изданцима – боја кекса, тј. сензорна карактеристика, а други ефекат је функционална карактеристика, тј. обogaћење производа и позитиван ефекат на конзументе, мада је познато да током Мајарових реакција може доћи до смањења нутритивне вредности производа, услед реакција између угљених хидрата и аминокиселина.



Слика 43. Замес, печени кекс и млевени узорци кекса са и без праха пшеничне траве: 1 – контрола; 2 – 2,5%; 3 – 5%; 4 – 7,5% праха пшеничне траве (оригинал, В. Ђуровић)

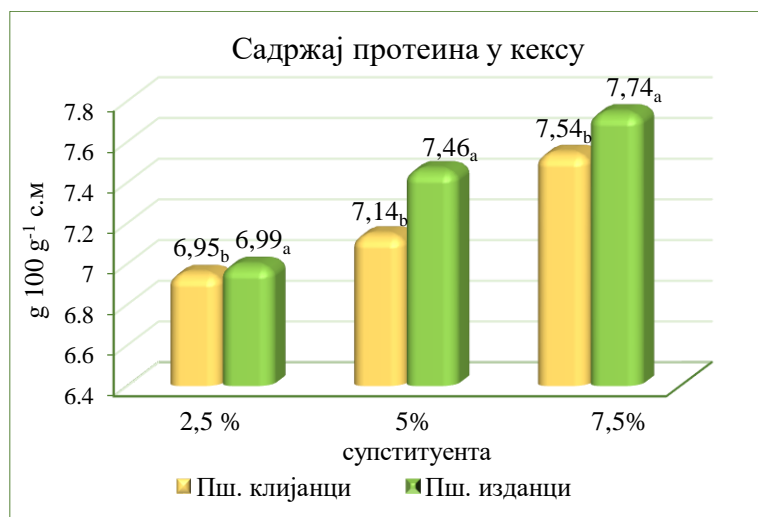
Прихватљивост и пријемчивост производа зависи од интензитета ароме, али и од склоности и навика потрошача. Кекс са 2,5% пшеничне траве није утицао на промену укуса кекса, али кекс са већом количином пшеничне траве (5 и 7,5%) имао је мирис и укус попут спанаћа и траве, који потичу од употребљене сировине. Са повећањем процента пшеничне траве, интензитет укуса се повећавао, па је најинтензивнији био у кексу са 7,5% пшеничне траве, што је у корелацији са налазима Pasha et al. (2018), који тврде да се додавање пшеничне траве одражава и на неке од физичких карактеристике кекса (тврдоћу, пречник и ломљивост кекса). Тврдоћа као један од физичких параметара доводи се у везу са садржајем влакана у пшеничној трави (Rahman et al., 2015), а додавање влакана повећава тврдоћу печених производа (Lee and Lin, 2008). Протеини и влакна у биљном материјалу везују слободну воду у тесту и тиме повећавају тврдоћу производа. Dordoni et al. (2019) тврде да структурне и хемијске карактеристике влакана имају важну улогу у везивању воде. Cheng and Bhat (2016) тврдоћу кекса доводе у везу са повећањем садржаја протеина и њиховом интеракцијом са другим материјама током припреме замеса.

Изгледа да је за потрошаче најприхватљивије ако се примени 5% пшеничне траве, уз препоруку да би суплементи, као што су млеко у праху или прах поморанџе маскирали „травнат“ укус производа, па је стога њихово додавање чак и пожељно (Jain and Borah., 2017). У случају максималног нивоа супституције пшеничног брашна са пшеничним изданцима, нека од сензорних својстава се погоршавају.

6.12.7. Компаративна анализа садржаја органских, минералних и биоактивних материја у кексу са различитим количинама пшеничних клијанаца и изданака

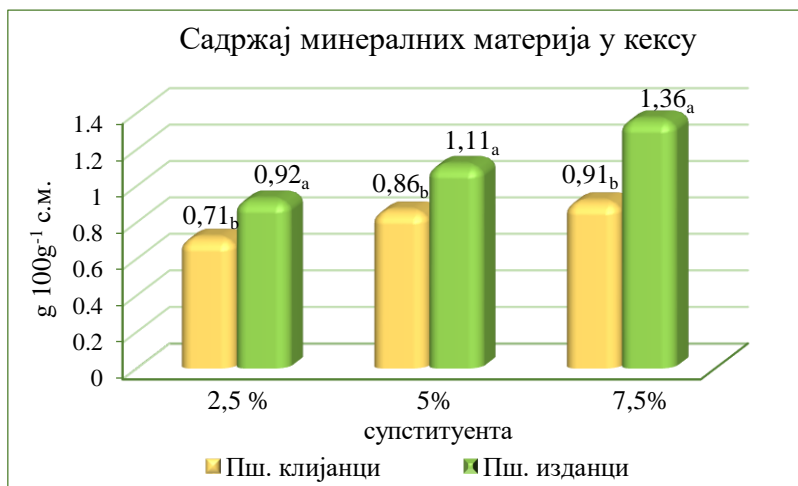
На основу добијених резултати може се извршити компарација производа добијених од пшеничних клијанаца и изданака у истом нивоу супституције (2,5; 5 и 7,5%) ради утврђивања разлика у погледу садржаја органских, минералних и биоактивних материја, што је приказано на графиконима 9–16.

Ако се упореди садржај протеина и минералних материја у кексу са пшеничним клијанцима и у кексу са изданцима пшеничне траве, може се запазити да је кекс са прахом изданака младе пшеничне траве имао већи садржај протеина и минералних материја (пепела) у односу на кекс са истим процентом пшеничних клијанаца, на свим нивоима супституције ($p < 0,05$) – графикон 9, 10.



Графикон 9. Упоредни приказ садржаја протеина у кексу са истим количинама пшеничних клијанаца и пшеничне траве

То је, донекле, и очекивано, ако се узму у обзир резултати основне хемијске анализе супституената, која је показала да је садржај укупних протеина и минералних материја у пшеничној трави већи у односу на пшеничне клијанце (табела 19). Осим тога, из хемијске анализе извршене ИСП- методом (део 6.10) види се да је садржај Mn, Fe, Cu, Ni, Ca, Mg, K, B и P био значајније већи у изданцима пшеничне траве, него у пшеничним клијанцима, док је садржај Zn био нешто већи у пшеничним клијанцима (табела 13, 15).



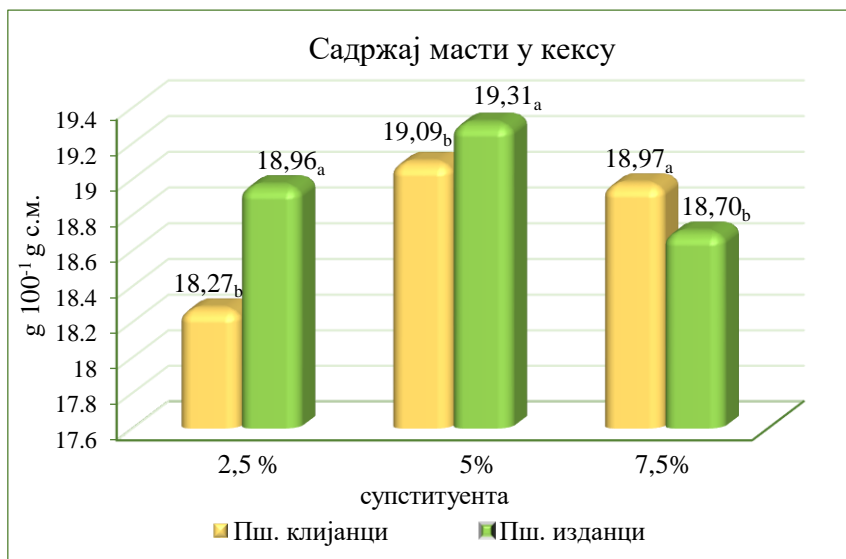
Графикон 10. Упоредни приказ садржаја минералних материја у кексу са истим количинама пшеничних клијанаца и пшеничне траве

Кекс са пшеничним клијанцима имао је већи садржај угљених хидрата него кекс са пшеничним изданцима, без обзира на количину унесених супституената (графикон 11)



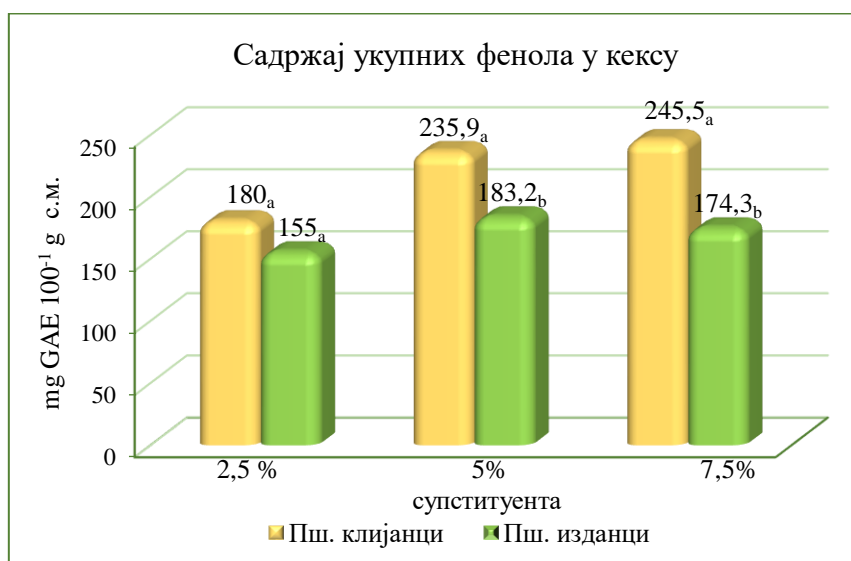
Графикон 11. Упоредни приказ садржаја угљених хидрата у кексу са истим количинама пшеничних клијанаца и пшеничне траве

Што се тиче садржаја масти у кексу са пшеничним клијанцима и изданцима, запажа се да је он највећи у варијанти са 5% супституената. За разлику од варијаната са 2,5 и 5 % супституената, у варијанти са 7,5 % супституената, учешће масти било је веће у кексу са пшеничним клијанцима (18,97%), него у кексу са пшеничним изданцима (18,7%) – графикон 12.



Графикон 12. Упоредни приказ садржаја масти у кексу са истим количинама пшеничних клијанаца и пшеничне траве

Садржај укупних фенолних једињења и α -токоферола у кексу припремљеном заменом дела белог пшеничног брашна са пшеничним клијанцима и изданцима приказан је на графиконима 13–14.

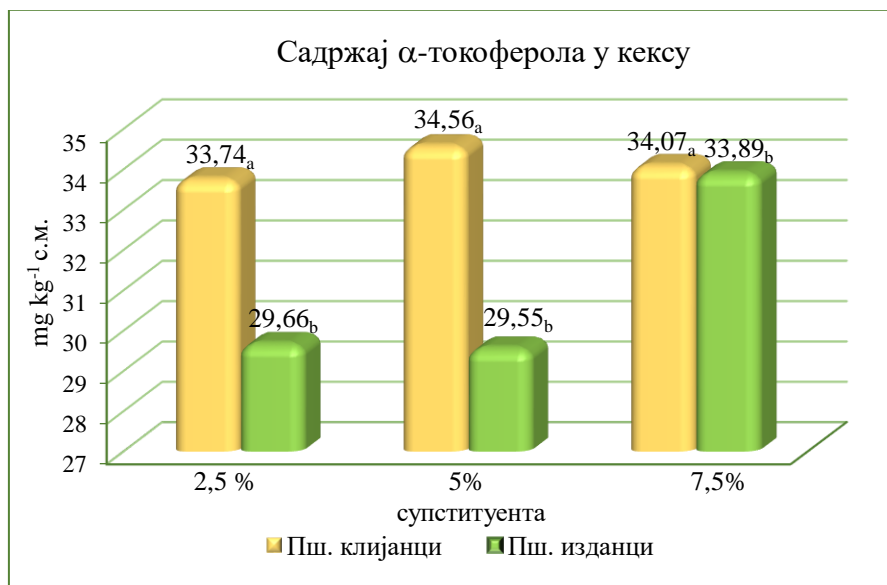


Графикон 13. Упоредни приказ садржаја укупних фенола у кексу са истим количинама пшеничних клијанаца и пшеничне траве

Садржај укупних фенола у кексу супституисаном са 2,5% пшеничних клијанаца и кексу са 2,5% пшеничних изданца није се статистички разликовао ($p < 0,05$; $p < 0,01$), док је кекс са 5% пшеничних клијанаца имао статистички значајно већи садржај укупних фенола у односу на кекс са истом количином изданца пшеничне траве ($p < 0,01$). Иста закономерност је добијена и у случају кекса са 7,5% пшеничних клијанаца у односу на кекс са 7,5% изданца пшеничне траве (графикон 13). То би могла бити последица како већег садржаја укупних фенола у пшеничним клијанцима ($14,40 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ с.м.}$), него у

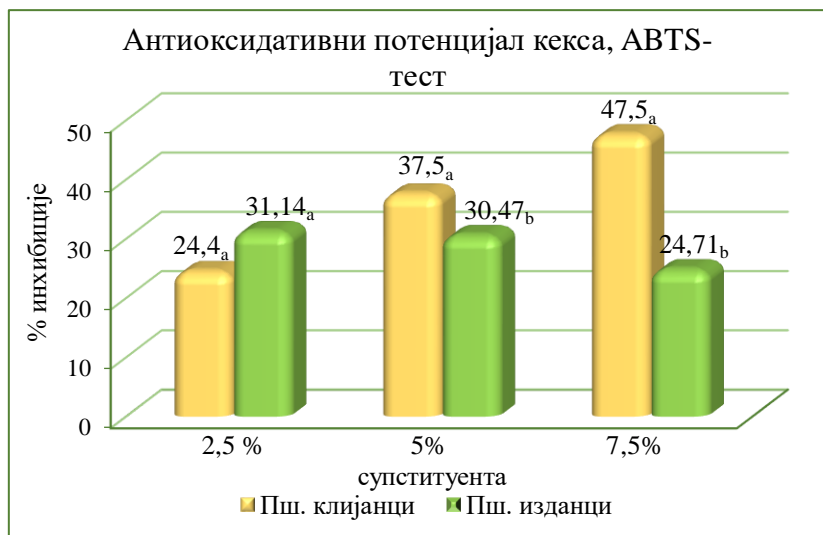
пшеничној трави ($8,30 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ с.м}$), тако и утицаја Мајарових реакција, које су доминантније у току процеса печења са клијанцима (Abderrahim et al., 2012).

Садржај α -токоферола на свим нивоима супституције био је већи у кексу са пшеничним клијанцима, него у кексу са пшеничним изданцима. То је, донекле, и очекивано, јер је почетном анализом састојака коришћених у изради кекса утврђен значајније већи садржај α -токоферола ($60,5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1} \text{ с.м}$) у клијанцима, него у пшеничним изданцима – $14,7 \text{ } \mu\text{g g}^{-1} \text{ с.м}$. (табела 20), што је последица већег садржаја уља у пшеничним клијанцима, него у пшеничној трави које је носилац липосолубилног α -токоферола.

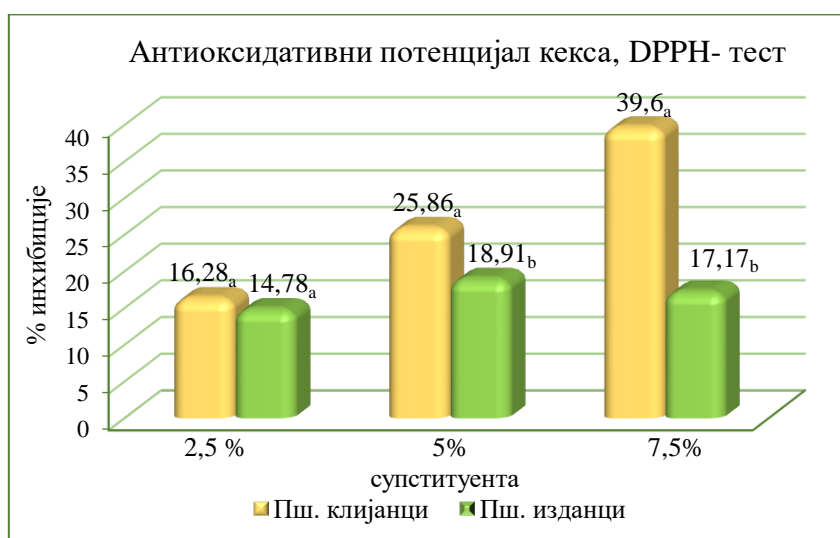


Графикон 14. Упоредни приказ садржаја α -токоферола у кексу са истим количинама пшеничних клијанаца и пшеничне траве

Антиоксидативни потенцијал кекса супституисаног са 2,5% клијанаца и кекса са истим уделом пшеничних изданака није се статистички разликовао. Кекс са 5 и 7,5% пшеничних клијанаца имао је статистички значајно већи антиоксидативни потенцијал, мерен и DPPH- и ABTS- методом, у односу на кекс истог нивоа супституције са изданцима младе пшеничне траве ($p < 0,01$) – граф. 15, 16. Ово се може довести у везу и са садржајем укупних фенола, α -токоферола и са антиоксидативним потенцијалом супституената коришћених у изради кекса. Наиме, укупан садржај фенола и α -токоферола у пшеничним клијанцима у праху био је већи у односу на пшеничну траву, и антиоксидативни потенцијал, мерен DPPH-тестом у пшеничним клијанцима износио је 73%, а у пшеничној трави 41% (табела 20).



Графикон 15. Упоредни приказ антиоксидативног потенцијала кекса са истим количинама пшеничних клијанаца и пшеничне траве (АВТС-метода)



Графикон 16. Упоредни приказ антиоксидативног потенцијала кекса са истим количинама пшеничних клијанаца и пшеничне траве (DPPH-метода)

И резултати о антиоксидативном потенцијалу, мерени АВТС-методом, такође су показали да су пшенични клијанци имали значајно већи антиоксидативни потенцијал (91%) у односу на пшеничну траву (57%) – табела 20. Поред значајног доприноса фенолних једињења, већ је наведено да антиоксидативном потенцијалу доприносе и производи Мајарових реакција. С обзиром да клијање утиче на Мајарове реакције, претпоставља се да су оне израженије у кексу супституисаном пшеничним клијанцима, у поређењу са пшеничном травом.

Делимичном супституцијом пшеничног брашна са пшеничном травом добијен је производ са већим садржајем протеина и минералних материја и мањим садржајем угљених хидрата, у односу на производ добијен делимичном супституцијом брашна са пшеничним клијанцима. Сви ови параметри су пожељни, с обзиром на то да је циљ да се

добије производ обogaћен протеинима и минералима, а са мањим садржајем угљених хидрата.

Делимичном супституцијом пшеничног брашна са пшеничним клијанцима добијен је производ са већим садржајем укупних фенола, α -токоферола и бољим антиоксидативним својствима у односу на производ са изданцима пшеничне траве. Дакле, делимичном супституцијом пшеничног брашна са изданцима пшеничне траве добијен је производ са бољим нутритивним вредностима, а делимичном супституцијом пшеничног брашна са пшеничним клијанцима добијен је производ са бољим функционалним својствима у оквиру испитиваних параметара.

6.12.8. Садржај укупних фенола и антиоксидативни потенцијал кекса након 210 дана складиштења

Садржај укупних фенола и антиоксидативни потенцијал мерени су након 210 дана складиштења (собна температура, тама, полиетиленска амбалажа), да би се видело да ли и у којој мери долази до промена ових параметара. Изглед контролног кекса и кекса са супституентима дат је на слици 44.



Слика 44. Кекс са клијанцима и кекс са изданцима након 210 дана складиштења (В. Ђуровић)

У табелама 25 и 26 приказане су вредности садржаја укупних фенола и антиоксидативни потенцијал кекса са пшеничним клијанцима и изданцима.

Табела 25. Садржај укупних фенола и антиоксидативни потенцијал у кексу са пшеничним клијанцима након 210 дана складиштења

Складиштење, 210 дана	Укупн феноли, mg GAE 100 g ⁻¹ с.м.	ABTS, %	ABTS, μmol TE 100 g ⁻¹ с.м.
Контрола	82,50±4,68 _d	11,24±0,77 _d	273,70±21,91 _d
2,5% клијанаца	129,90±9,64 _c	16,90±0,83 _c	434,30±23,52 _c
5% клијанаца	194,80±9,48 _b	23,46±0,66 _b	629,70±19,14 _b
7,5% клијанаца	235,80±10,78 _a	41,43±1,31 _a	1127,10±37,15 _a

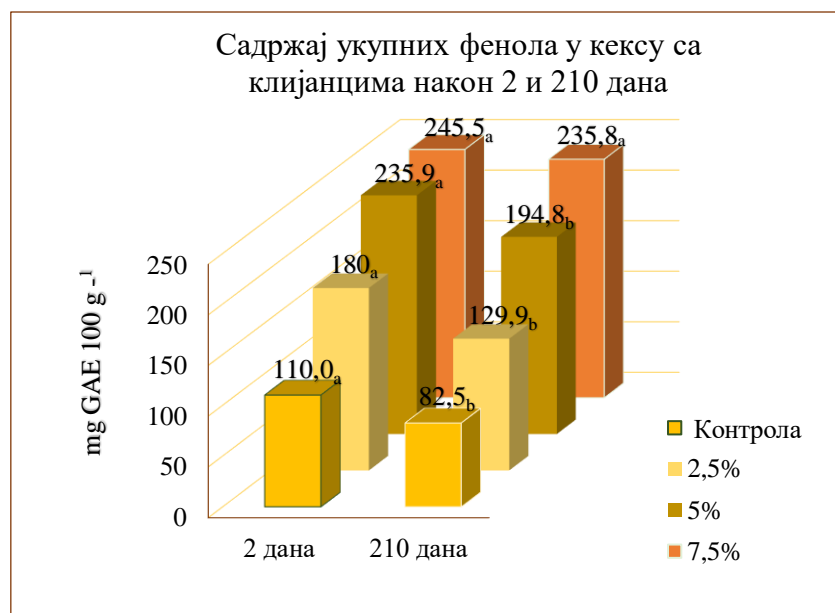
Резултати су приказани као средња вредност (n=3) ± стандардна девијација. Различита слова у истој колони значе да постоји статистички значајна разлика на нивоу од p<0,01, према LSD тесту.

Након 210 дана складиштења кекс са пшеничним клијанцима и даље је имао већи садржај укупних фенола у односу на кекс без супституената – контрола (табела 25).

Утврђена је статистички значајна разлика између контролног кекса, тј. кекса без клијанаца и кекса са клијанцима, као и између кекса са 2,5; 5 и 7,5% клијанаца ($p < 0,01$). После 210 дана складиштења кекс са 5% клијанаца имао је 2 пута већи садржај укупних фенола ($194,80 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$), док је кекс са 7,5% клијанаца имао три пута већи садржај укупних фенола ($235,80 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$) у односу на контролни кекс ($82,50 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$).

Слична тенденција је утврђена и у погледу антиоксидативног потенцијала. Наиме, након 210 дана складиштења кекс са пшеничним клијанцима и даље је имао већи антиоксидативни потенцијал у односу на кекс без клијанаца (табела 25). Између кекса без клијанаца и кекса са клијанцима утврђена је статистички значајна разлика у односу на њихов антиоксидативни потенцијал, као и међусобно између кекса са 2,5; 5 и 7,5% клијанаца ($p < 0,01$). После 210 дана складиштења кекс са 5 % клијанаца имао је 2,3 пута већи антиоксидативни потенцијал ($629,70 \text{ } \mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1} \text{ с.м}$), док је кекс са 7,5 % клијанаца имао 4,1 пута већи антиоксидативни потенцијал ($1127,1 \text{ } \mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1} \text{ с.м}$), у односу на контролни кекс ($273,70 \text{ } \mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1} \text{ с.м}$) – табела 25.

Садржај укупних фенола и антиоксидативни потенцијал свих варијанти кекса након 210 дана складиштења био је мањи у односу на њихове вредности након печења, тј. 48 сати складиштења (табела 22, 25). Садржај укупних фенола се након дуготрајног складиштења значајно смањило, и то са $110 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ на $82,5 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ у контролном кексу, затим са $235,9 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ на $194,8 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ у кексу са 5% клијанаца, и са 180 на $129,9 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ у кексу са 2,5% клијанаца ($p < 0,05$). Најмање промене су забележене у кексу са највећим процентом супституције, где је садржај након печења био $245,5 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$, а након 210 дана складиштења $235,8 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ с.м. (графикон 17).

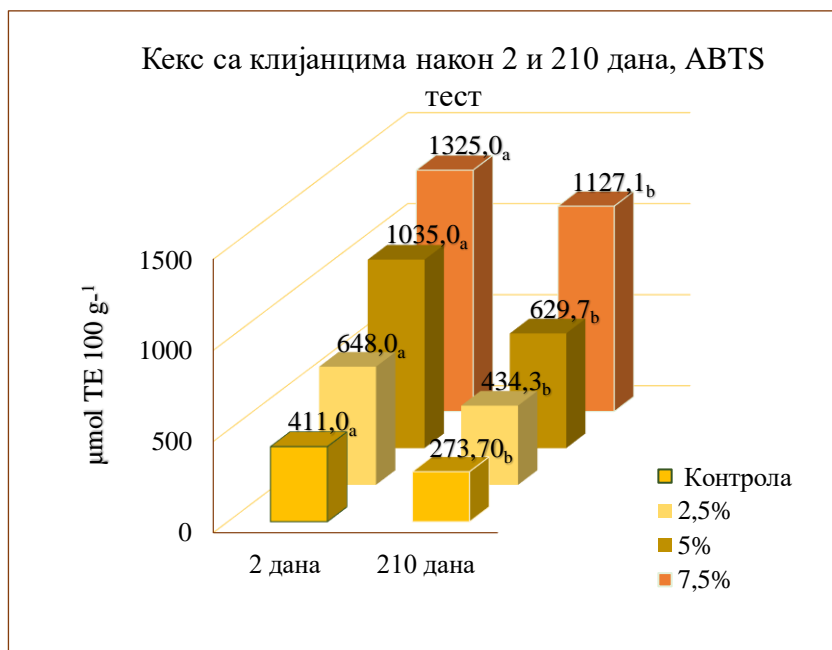


Графикон 17. Упоредни приказ садржаја укупних фенола у кексу са пшеничним клијанцима два дана након печења и складиштења од 210 дана

Смањење садржаја укупних фенола у кексу било је 25% за контролни кекс, 17,4% за кекс са 2,5 % клијанаца, 27% за кекс са 5% клијанаца, а само 4% за кекс са 7,5% клијанаца (табела 22, 25; графикон 17).

Антиоксидативни потенцијал у свим варијантама кекса након 210 дана складиштења био је значајно мањи у поређењу са антиоксидативним потенцијалом кекса

непосредно након печења ($p < 0,05$). У контролном кексу антиоксидативни потенцијал се смањило са 411 на 273,7, у кексу са 2,5% клијанаца са 648,0 на 434,3, у кексу са 5% клијанаца са 1035,0 на 629,7, док се у кексу са максималним нивоом супституције од 7,5% клијанаца антиоксидативни потенцијал смањило са 1325,0 $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ с.м. на 1127,1 у $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ с.м. (табела 22, 25; графикон 18).



Графикон 18. Упоредни приказ антиоксидативне активности у кексу са пшеничним клијанцима два дана након печења и складиштења од 210 дана

Као и у случају кекса са клијанцима, утврђене су сличне тенденције и код кекса са пшеничном травом. Кекс са пшеничном травом, након 210 дана складиштења, имао је већи садржај укупних фенола и јачи антиоксидативни потенцијал у односу на контролни кекс (табела 26).

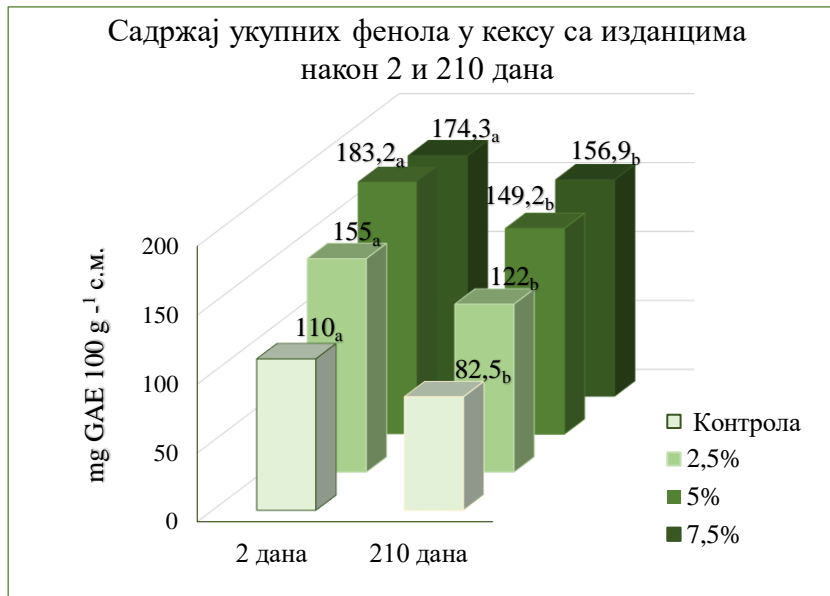
Табела 26. Садржај укупних фенола и антиоксидативни потенцијал кекса са пшеничном травом након 210 дана складиштења

Складиштење, 210 дана	Укупни феноли, $\text{mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ с.м.	ABTS, %	ABTS, $\mu\text{mol TE}$ 100 g^{-1} с.м.
Контрола	$82,50 \pm 4,68_c$	$11,24 \pm 0,77_c$	$273,70 \pm 21,91_c$
2,5% пш.траве	$122,00 \pm 5,05_b$	$16,87 \pm 1,04_b$	$430,40 \pm 29,40_b$
5% пш.траве	$149,20 \pm 5,77_a$	$21,23 \pm 0,90_a$	$556,40 \pm 25,63_a$
7,5% пш.траве	$156,90 \pm 4,25_a$	$20,32 \pm 1,05_a$	$532,50 \pm 30,78_a$

Резултати су приказани као средња вредност ($n=3$) \pm стандардна девијација. Различита слова у истој колони значе да постоји статистички значајна разлика на нивоу од $p < 0,01$, према LSD тесту

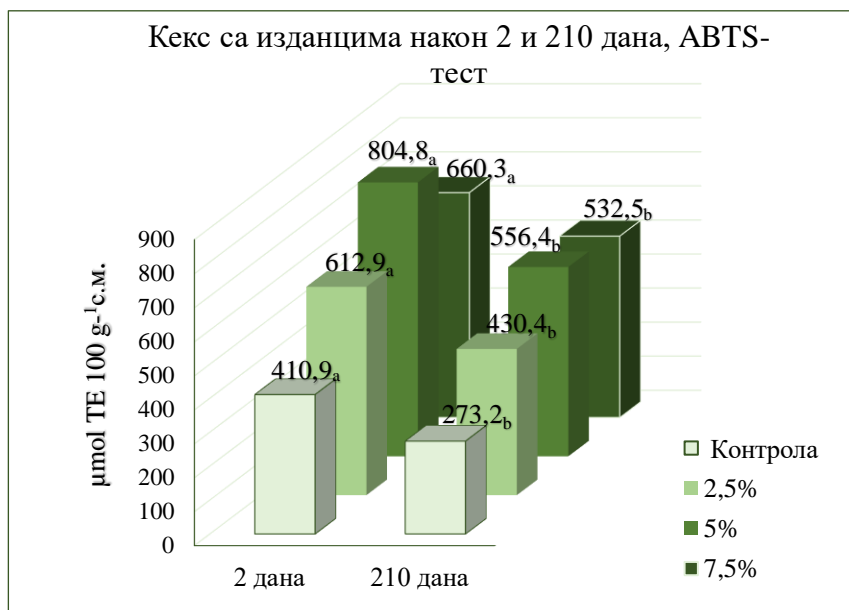
Садржај укупних фенола у кексу са 7,5% пшеничне траве био је $156,9 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$, што је два пута више у односу на контролни кекс ($82,50 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$). И кекс са 2,5% пшеничне траве имао је значајно већи садржај укупних фенола у односу на контролни кекс, док се кекс са 5 и 7,5% пшеничних изданака нису међусобно разликовали (табела 26). Садржај укупних фенола у свим варијантама био је значајно

мањи у односу на садржај након печења ($p < 0,05$). Након 210 дана складиштења садржај укупних фенола у кексу са 2,5% пшеничне траве био је $122,00 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$, док је у тек печеном кексу износио $155,00 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$, што представља умањење од 21,3%, у кексу са 5% пшеничне траве износио је $149,20 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ у поређењу са $183,20 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$, колико је било у кексу након печења (табела 23, 26), а то је смањење од 18,6% (графикон 19).



Графикон 19. Упоредни приказ садржаја укупних фенола у кексу са пшеничном травом два дана након печења и складиштења од 210 дана

Сличан тренд, као и у случају укупних фенола, утврђен је и за антиоксидативни потенцијал кекса са и без супституената. Антиоксидативни потенцијал свих узорака био је мањи након 210 дана складиштења, али је и након 210 дана кекс са пшеничном травом имао већи антиоксидативни потенцијал у односу на контролни кекс (табела 26, графикон 20).



Графикон 20. Упоредни приказ антиоксидативног капацитета кекса са пшеничном травом два дана након печења и складиштења од 210 дана

Дуготрајно складиштење производа утиче на смањење садржаја укупних фенола и антиоксидативног потенцијала у њима, што је у складу са подацима из литературе (Dag et al., 2016; Sakač et al., 2016; Starowicz and Zieliński, 2019).

На основу добијених резултата може се констатовати да су пшенични клијанци и изданци не само добар извор полифенолних једињења, већ и да то својство задржавају и када су део неког од прехранбених производа.

Без обзира на то што се садржај наведених биоактивних материја у производима са пшеничним клијанцима и изданцима током времена делимично смањује, ипак је њихов садржај значајно већи у кексу са, него у кексу без супституената.

6.12.9. Микробиолошка анализа кекса са пшеничним клијанцима и изданцима

Микроорганизми значајно утичу на рок трајања прехранбених производа и најчешће су одговорни за здравствену безбедност и хигијенску норму употребљивости многих намирница. Микробиолошко кварење хране може бити главни фактор који ограничава рок трајања пекарских производа. Поред тога, микробиолошки квар узрокује економски губитак за произвођаче и представља опасност по здравље потрошача. Стога је, поред хемијских карактеристика производа, потребно пратити и њихов микробиолошки квалитет.

У раду је испитиван микробиолошки квалитет кекса без супституената (контролни кекс), као и кекса добијеног заменом дела пшеничног брашна са прашкастим формама пшеничних клијанаца и младе пшеничне траве. Коришћени супституенти нису микробиолошки испитивани, јер су адекватно складиштени са ниским садржајем влаге. Осим тога, мала дебљина производа (4 mm) и примењени услови печења (180 °C, 20 минута) обезбеђују високу температуру и у средишњем делу производа, која је довољна за инактивацију већине микроорганизама. Микробиолошка анализа је обухватила одређивање укупног броја аеробних мезофилних и аеробних спорогених бактерија,

укупан број плесни и квасаца, као и присуство сулфито-редукујућих клостридија, *Escherichia coli* и *Salmonella* spp.

С обзиром на то да се резултати микробиолошке анализе нису значајно разликовала током 210 дана, биће приказани само резултати анализа након 30, 120 и 210 дана складиштења (табеле 27–29).

Табела 27. Микробиолошка анализа кекса након 30 дана складиштења (CFU g⁻¹)

Кекс са клијанцима и травом	Ук. бр. аер. мез. бакт.	Ук. бр. аер. спор. бакт.	Ук. бр. плесни	Ук. бр. квасаца	<i>E.coli</i>	Сулф. ред. кластр.	<i>Salmonella</i> spp.
Контрола	10	<10	<10	<10	н.д.	н.д.	н.д.
2,5% клијанаца	10	<10	<10	<10	н.д.	н.д.	н.д.
5,0% клијанаца	10	<10	<10	<10	н.д.	н.д.	н.д.
7,5% клијанаца	<10	<10	<10	<10	н.д.	н.д.	н.д.
2,5% пш.траве	20	<10	<10	<10	н.д.	н.д.	н.д.
5,0% пш.траве	20	<10	<10	<10	н.д.	н.д.	н.д.
7,5% пш.траве	<10	<10	<10	<10	н.д.	н.д.	н.д.

н.д. – није детектовано

Табела 28. Микробиолошка анализа кекса након 120 дана складиштења (CFU g⁻¹)

Кекс са клијанцима и травом	Ук. бр. аер. мез. бакт.	Ук. бр. аер. спор. бакт.	Ук. бр. плесни	Ук. бр. квасаца	<i>E.coli</i>	Сулф. ред. кластр.	<i>Salmonella</i> spp.
Контрола	90	20	<10	<10	н.д.	н.д.	н.д.
2,5% клијанаца	25	20	<10	<10	н.д.	н.д.	н.д.
5,0% клијанаца	50	<10	20	<10	н.д.	н.д.	н.д.
7,5% клијанаца	80	10	10	<10	н.д.	н.д.	н.д.
2,5% пш.траве	130	30	<10	<10	н.д.	н.д.	н.д.
5,0% пш.траве	40	<10	20	<10	н.д.	н.д.	н.д.
7,5% пш.траве	30	10	<10	<10	н.д.	н.д.	н.д.

н.д. – није детектовано

Табела 29. Микробиолошка анализа кекса након 210 дана складиштења (CFU g⁻¹)

Кекс са клијанцима и травом	Ук. бр. аер. мез. бакт.	Ук. бр. аер. спор. бакт.	Ук. бр. плесни	Ук. бр. квасаца	<i>E.coli</i>	Сулф. ред. кластр.	<i>Salmonella spp.</i>
Контрола	900	30	<10	<10	н.д.	н.д.	н.д.
2,5% клијанаца	10	<10	<10	<10	н.д.	н.д.	н.д.
5,0% клијанаца	<10	<10	<10	<10	н.д.	н.д.	н.д.
7,5% клијанаца	<10	<10	<10	<10	н.д.	н.д.	н.д.
2,5% пш.траве	20	<10	<10	<10	н.д.	н.д.	н.д.
5,0% пш.траве	20	<10	<10	<10	н.д.	н.д.	н.д.
7,5% пш.траве	10	<10	<10	<10	н.д.	н.д.	н.д.

н.д. – није детектовано

Микробиолошке анализе су показале да ни у једном од испитиваних варијанти кекса (2,5; 5%; 7,5% пшеничних клијанаца и пшеничне траве) није утврђено присуство *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, сулфито-редукујућих кластридија, као ни у контролном кексу, током седмомесечног складиштења.

У испитиваним варијантама кекса бројност припадника фамилије *Enterobacteriaceae*, као и број квасаца и плесни био је мањи од дозвољене вредности, прописане у „Водичу за примену микробиолошких критеријума за храну“ из 2011. године. Број аеробних мезофилних бактерија био је низак током свих периода евалуације. Веома је важно да је овај број био знатно мањи од граничних вредности датих за микробиолошке критеријуме, који су утврђени домаћим законодавством. Ово представља позитиван резултат, јер мезофилни аероби могу изазвати кварење хране, нарочито прерађених производа, а висок ниво броја аеробних мезофила био би индикатор мешовите популације, међу којима би се могли наћи и мигроорганизми који изазивају квар хране (Olaoye et al., 2007).

Такође, детектовани број плесни и квасаца био је знатно мањи од граничних вредности током периода складиштења. То нам указује да је кекс произведен уз употребу висококвалитетних сировина, у хигијенским условима, као и да није дошло до контаминације током производње, паковања и складиштења, што гарантује микробиолошку сигурност производа.

Бројност испитиваних група микроорганизама није се много разликовала током периода евалуације, изузев броја аеробних мезофилних бактерија којих је након периода од 210 дана у контролном кексу (900 CFU g⁻¹) било нешто више, у односу на остале варијанте кекса са клијанцима и изданцима (табела 29). Рок трајања и контролног кекса и кекса са пшеничним клијанцима и изданцима био је исти.

Ови резултати указују да је кекс произведен делимичном супституцијом пшеничног брашна са пшеничним клијанцима, као и изданцима младе пшеничне траве (у нивоима од 2,5 до 7,5%), био микробиолошки стабилан на собној температури дужи временски период, ако је ускладиштен у адекватној амбалажи. У прилог томе може се навести чињеница да је припремљени кекс и након 7 месеци складиштења био у складу са микробиолошким критеријумима, предвиђеним за кекс и сродне производе, и да је апсолутно безбедан за потрошаче.

Потребно је истаћи да је припремљени кекс, како контролни, тако и кекс супституисан са пшеничним клијанцима и изданцима младе пшеничне траве у праху, имао низак садржај влаге (< 3%), и у оквиру препоручених граница од 0–10% за складиштење кекса (Singh et al., 2000). Кекс на биљној бази има мањи садржај влаге од „обичног“ кекса (Alam et al., 2014). То би се могло довести у везу и са чињеницом да су употребљене сировине (пшенични клијанци и пшенична трава) садржале знатно више протеина (у односу на пшенично брашно), који имају већи афинитет према води у односу на угљене хидрате (Okeagu, 2001), што је могло утицати на ниво влаге у готовом производу. Поред тога, влакна из употребљених састојака, посебно од клијанаца и пшеничне траве, не само да обогаћују производ, већ имају велику способност везивања воде. Све ово има додатну вредност и предност за готови производ, јер је преживљавање, раст и развој микроорганизама, који изазивају квар прехрамбених производа, у тим условима отежано, па самим тим и трајност и рок производа је продужен. Bertagnolli et al. (2014) и Vesković i Đukić (2017) тврде да производи са ниским садржајем влаге имају дужи рок трајања, што се дешава ако су ускладиштени под контролисаним условима (у одговарајућем паковању, тј. амбалажи која је отпорна на влагу, гасове, итд.).

Делимична супституција пшеничног брашна са прахом пшеничних клијанаца или траве није значајно утицала на микробиолошки квалитет производа. Врло је важно истаћи да је добијени кекс, поред тога што је био побољшане нутритивне и функционалне вредности, био и микробиолошки стабилан и безбедан за конзументе у оквиру испитиваних параметара. Врло повољни резултати микробиолошке анализе резултат су доброг квалитета коришћених сировина, ефекта термичке обраде, као и добре произвођачке праксе примењене током припреме и руковања, тј. паковања и складиштења производа.

7. ЗАКЉУЧАК

На основу проучавања микробиолошких, хемијских и фитохемијских карактеристика семена, клијанаца и траве три дивергентне хлебне сорте пшенице (НС-40С, Симонида, Ренесанса) и добијеног кекса могу се извести следећи закључци:

- у семену изучаваних сорти пшенице било је доминантно учешће укупних угљених хидрата и протеина у односу на остале параметре њиховог квалитета;
- семе сорте Симонида има највећи садржај протеина (13,80%) и минералних материја (1,61%), док се садржај скроба и укупних масти у семену три изучаване сорте није значајно разликовао;
- установљена антиоксидативна активност екстраката пшеничног семена испитиваних сорти пшенице је била већа при примени АВТС- него DPPH- методе;
- просечна антиоксидативна активност семена код испитиваних сорти пшенице НС-40С, Симонида и Ренесанса, мерена АВТС-методом, била је највећа у екстрактима са 70% ацетоном код сорти НС-40С (26,14%) и Ренесанса (22,64%), и са 96% етанолом код сорте Симонида (18,17%);
- применом DPPH-методе у екстрактима са 96% етанолом као екстрагенсом је установљена највећа антиоксидативна активност код семена сорти НС-40С, Симонида и Ренесанса;
- висока вредност просечног садржаја укупних фенола (1,75; 1,53 и 1,68 mg GAE g⁻¹ с.м) и флавоноида (0,47; 0,46 и 0,40 mg RE g⁻¹ с.м) у 50% ацетонском екстракту је највећа код семена сорти НС-40С, Симонида, Ренесанса;
- разлика у трајању наклијавања од 24 h имала је утицај на испољавање значајно повећања садржаја α -токоферола, али не и на садржај укупних фенола у пшеничним клијанцима;
- услови наклијавања семена су утицали на просечни садржај укупних фенола, флавоноида и антиоксидативну активност, при чему су највеће вредности утврђене код клијанаца добијених наклијавањем семена у наизменичном режиму (светло/мрак; 80 h) који су сушени лиофилизацијом, док је садржај α -токоферола био најмањи;
- установљени садржај фитохемијских једињења (укупних фенола, флавоноида, α -токоферола) у клијанцима је био већи него у семену;
- укупан садржај макроелемената код пшеничне траве је био значајно већи него код клијанаца а код њих значајно већи него код семена пшенице;
- према квантитативном садржају макроелементи у семену пшенице су заступљени у редоследу P>K>Mg>Ca а у пшеничним клијанцима и пшеничној трави K>P >Mg>Ca;
- укупан садржај макроелемената (P, K, Mg и Ca) у пшеничним клијанцима био је најмањи код сорте НС-40С (23667 mg kg⁻¹), а највећи код сорте Симонида (27192 mg kg⁻¹);

– просечан садржај P (10607 mg kg⁻¹) и K (13229 mg kg⁻¹) у пшеничним клијанцима био је значајно већи, него њихов просечни садржај у семену (5155 mg kg⁻¹; 3851 mg kg⁻¹), једино је просечан садржај Ca био мањи у пшеничним клијанцима (457 mg kg⁻¹) у односу на семе пшенице (633 mg kg⁻¹);

– пшенична трава је имала значајно већи садржај макро- и микроелемената, изузев Zn, у односу на пшеничне клијанце и пшенично семе;

– пшенични клијанци и изданци (трава) не садрже токсичне дозе тешких метала, па се могу примењивати у исхрани – појединачно или као састојци неких прехранбених производа;

– највећи садржај укупних фенола (10,51 mg GAE g⁻¹ с.м), флавноида (8,06 mg RE g⁻¹ с.м) и највећа антиоксидативна активност (11,20 μmol TE g⁻¹ – DPPH тест, односно 50,88 μmol TE g⁻¹ – ABTS тест) утврђени су код пшеничне траве сорте Ренесанса 5. дана од ницања;

– пшенична трава сорте НС-40С на узрасту од 5 дана имала је највећи садржај свих фотосинтетичких пигмената;

– хексански екстракти пшеничних клијанаца испољили су већу антибактеријску активност у поређењу са етанолским екстрактима пшеничних клијанаца и пшеничне траве;

– испитивани екстракти су испољили умерену до слабу антибактеријску активност у односу на циљне бактерије;

– међу тестираним бактеријама најрезистентнији сој, без обзира на врсту екстракта била је *Gr* бактерија *Enterobacter aerogenes*;

– пшенична трава је бољи извор протеина и минералних материја у односу на пшеничне клијанце, који се карактеришу већим садржајем укупних фенола, α-токоферола и израженијом антиоксидативном активношћу у односу на пшеничну траву;

– делимична супституција пшеничног брашна са прашкастим формама пшеничних клијанаца и пшеничних изданака има значаја за добијање производа са повећаним садржајем протеина, масти, минералних материја, енергетске вредности, укупних фенола и антиоксидативне активности, као и у смањењу садржаја укупних угљених хидрата у односу на контролни кекс;

– изданци пшеничне траве су погодан супституент брашна за добијање производа (кекса) са већим садржајем протеина и минералних материја, а мањим садржајем угљених хидрата;

– установљено је да се пшенични клијанци могу успешно користити као замена дела пшеничног брашна (делимичну супституцију брашна) за добијање производа са већим садржајем укупних фенола, α-токоферола и израженијом антиоксидативном активношћу;

– производ бољих функционалних својстава у оквиру испитиваних параметара је добијен при делимичној супституцији брашна са пшеничним клијанцима, док је

производ бољих нутритивних својстава добијен при делимичној супституција брашна са пшеничним изданцима;

– супституција брашна са пшеничним клијанцима и изданцима у нивоу од 7,5% довела је до делимичног погоршања сензорних својстава (изгледа и укуса) кекса;

– након 210 дана складиштења садржај укупних фенола и антиоксидативна активност кекса били су мањи у односу на кекс непосредно после печења;

– микробиолошки квалитет кекса (са наведеним суплементима), након 210 дана складиштења, био је у складу са стандардима квалитета датим за кекс и сродне производе.

8. ЛІТЕРАТУРА

- Abdel-Aal ESM., Hucl P., Sosulski FW., Graf R., Gillott C., Pietrzak L. (2001): Screening Spring Wheat for Midge Resistance in Relation to Ferulic Acid Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3559–3566, doi:10.1021/jf010027h.
- Abdel-Aal ESM., Rabalski I. (2008): Bioactive compounds and their antioxidant capacity in selected primitive and modern wheat species. *Open Agric. J.*, 2, 7–14.
- Abdel-Aal ESM., Rabalski I. (2013): Effect of baking on free and bound phenolic acids in wholegrain bakery products. *Journal of Cereal Science*, 57(3), 312–318, doi:10.1016/j.jcs.2012.12.001.
- Abdel-Aal ESM., Young JC., Rabalski I. (2006): Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple and red cereal grains. *J Agric Food Chem.* 54, 4696–4704.
- Abdel-Aal ESM., Young JC., Rabalski I., Frégeau-Reid J., Hucl P. (2007): Identification and quantification of seed carotenoids in selected wheat species. *J Agric Food Chem.*, 55, 787–794.
- Abdel-Aal ESM., Young JC., Wood PJ., Rabalski I., Hucl P., Frégeau Reid J. (2002): Einkorn: A potential candidate for developing high lutein wheat. *Cereal Chem.*, 79, 455–457.
- Abderrahim F., Huanatico E., Repo-Carrasco-Valencia R., Arribas SM., Gonzalez MC., Condezo-Hoyos L. (2012): Effect of germination on total phenolic compounds, total antioxidant capacity, Maillard reaction products and oxidative stress markers in canihua (*Chenopodium pallidicaule*). *Journal of Cereal Science*, 56(2), 410–417, <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.04.013>.
- Abozed SS., El-Kalyoubi M., Abdelrashid A., Salama MF. (2014): Total phenolic contents and antioxidant activities of various solvent extracts from whole wheat and bran. *Annals of Agricultural Sciences*, 59(1), 63–67, doi:10.1016/j.aos.2014.06.009.
- Acosta-Estrada BA., Lazo-Vélez MA., Nava-Valdez Y., Gutiérrez-Urbe JA., Serna-Saldívar SO. (2014): Improvement of dietary fiber, ferulic acid and calcium contents in pan bread enriched with nejayote food additive from white maize (*Zea mays*). *Journal of Cereal Science*, 60(1), 264–269, doi:10.1016/j.jcs.2014.04.006.
- Adam E., Mühlbauer W., Esper A., Wolf W., Spiess W. (2000): Quality changes of onion (*Allium cepa* L.) as affected by the drying process. *Die Nahrung*, 44, 32–37.
- Addai ZR., Abdullah A., and Mutalib S. (2013): Effect of extraction solvents on the phenolic content and antioxidant properties of two papaya cultivars. *Journal of Medicinal Plants Research.*, 7(47), 3354–3359, doi:10.5897/JMPR2013.5116.
- Adeola AA., Ohizua ER. (2018): Physical, chemical, and sensory properties of biscuits prepared from flour blends of unripe cooking banana, pigeon pea, and sweet potato. *Food Sci Nutr.*, 6, 532–540, <https://doi.org/10.1002/fsn3.590>.
- Adom KK., Liu RH. (2002): Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (21), 6182–6187.
- Adom KK., Sorrells ME., Liu R H. (2003): Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7825–7834.
- Afify A., El-Beltagi HS., El-Salam SMA., and Omran AA. (2011): Bioavailability of iron, zinc, phytate and phytase activity during soaking and germination of white sorghum varieties. *PLoS One*, 6(10), e25512–, doi:10.1371/journal.pone.0025512.
- Agrahar-Murugkar D., Gulati P., Kotwaliwale N., Gupta C. (2015): Evaluation of nutritional, textural and particle size characteristics of dough and biscuits made from composite flours containing sprouted and malted ingredients. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 5129–5137.

- Agu HO., Okoli NA. (2014): Physico-chemical, sensory, and microbiological assessments of wheat-based biscuit improved with beniseed and unripe plantain. *Food science & nutrition*, 2(5), 464–469, <https://doi.org/10.1002/fsn3.135>.
- Aguilera Y., Díaz MF., Jiménez T., Benítez V., Herrera T., Cuadrado, C., Martín-Pedrosa M., Martín-Cabrejas MA. (2013): Changes in nonnutritional factors and antioxidant activity during germination of nonconventional legumes. *J Agric Food Chem.*, 61(34), 8120–5.
- Akbas E., Kilercioglu M., Onder ON., Koker A., Soyler B., Oztop MH. (2017): Wheatgrass juice to wheat grass powder: Encapsulation, physical and chemical characterization. *Journal of Functional Foods*, 28, 19–27, doi:10.1016/j.jff.2016.11.010.
- Alam AM., Alam JM., Hakim AM., Huq AKO., Moktadir SMG. (2014): Development of fiber enriched herbal biscuits: A preliminary study on sensory evaluation and chemical composition. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(4), 246–250.
- Al-Bakri AG., Afifi FU. (2007): Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological Methods*, 68(1), 19–25, doi:10.1016/j.mimet.2006.05.013.
- Al-Gahri MA., Almussali MS. (2008): Microelement content of locally produced and imported wheat grains in Yemen. *E-Journal Chem.*, 5 (4), 838–843.
- Alton A., McCarthy KL., Maskan M. (2009): Effect of extrusion process on antioxidant activity, total phenolics and β -glucan content of extrudates developed from barley– fruit and vegetable by-products. *Int J Food Sci Technol.*, 44, 1263–1271, doi:10.1111/j.1365-2621.2009.01956.x.
- Alvarez-Jubete L., Wijngaard H., Arendt EK., and Gallagher E. (2010): Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chem.*, 119(2), 770–778, doi:10.1016/j.foodchem.2009.07.032.
- Andrews JM. (2006): BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 5), *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(3), 511–529, <https://doi.org/10.1093/jac/dkl277>.
- Anglani C. (1998): Wheat minerals – A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 52, 177–186.
- Anson NM., Van den Berg R., Havenaar R., Bast A., Haenen GRMM. (2009): Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility. *Journal of Cereal Science*, 49, 296–300.
- Anthony J., Fontana J. (2007): Minimum water activity limits for growth of microorganisms. In: Barbosa-Cánovas, G. V., Fontana, A. J., Schmidt, S. J., Labuza, T. P. (eds.), *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*. Blackwell Publishing Ltd, Ames, Iowa, p. 435. ISBN: 0813824087, 9780813824086.
- Aprodu I., Banu I. (2012): Antioxidant properties of wheat mill streams. *Journal of Cereal Science*, 56(2), 189–195, doi:10.1016/j.jcs.2012.05.005
- Aqil F., Ahmad I. (2007): Antibacterial properties of traditionally used Indian medicinal plants. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.*, 229(2), 79–92, doi:10.1358/mf.2007.29.2.1075347.
- Arakawa H., Maeda M., Okubo S., Shimamura T. (2004): Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechin. *Biol. Pharm. Bull.*, 27(3), 277–281, doi:10.1248/bpb.27.277.
- Arranz S., Calixto SF. (2010): Analysis of polyphenols in cereals may be improved performing acidic hydrolysis: A study in wheat our and wheat bran and cereals of the diet hydrolysates. *Journal of Cereal Science* 51 (3), 313–318, doi: 10.1016/j.jcs.2010.01.006.
- Arshad MU., Anjum FM., & Zahoor T. (2007): Nutritional assessment of cookies supplemented with defatted wheat germ. *Food Chemistry*, 102, 123–128, doi:10.1016/j.foodchem.2006.04.040.
- Asami DK., Hong YJ., Barrett DM., Mitchell AE. (2003): Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn

- grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J Agric Food Chem.*, 51, 1237–41, doi: 10.1021/jf020635c.
- Ashok SA. (2011): Phytochemical and Pharmacological Screening of Wheatgrass Juice (*Triticum aestivum* L.) *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 9, 159–164.
- Asif-Ul-Alam SM., Islam MZ., Hoque MM., Monalis K. (2014): Effect of drying on the physicochemical and functional properties of green banana (*Musa sapientum*) flour and development of baked product. *American Journal of Food Science and Technology*, 2, 128–133, <https://doi.org/10.12691/ajfst-2-4-4>.
- Aydos O., Avci A., Ozkan T., Karadag A., Gurleyik E. (2011): Antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) extract on CML (K562) cell line. *Turkish Journal of Medical Science*, 41(4), 657–663, <http://dx.doi.org/10.3906/sag-0912-425>.
- Azeke MA., Egielewa SJ., Eigbogbo MU., and Ihimire IG. (2011): Effect of germination on the phytase activity, phytate and total phosphorus contents of rice (*Oryza sativa*), maize (*Zea mays*), millet (*Panicum miliaceum*), sorghum (*Sorghum bicolor*) and wheat (*Triticum aestivum*). *J. Food Sci. Technol.*, 48, 724–729, doi:10.1007/s13197-010-0186-y.
- Aziz NH., Farag SE., Mousa LAA., Abo-Zaid MA. (1998): Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds, *Microbios*, 93, (374), 43–54.
- Baba N., Rashid I., Shah A., Ahmad M., Gani A., Masoodi FA. (2014): Effect of microwave roasting on antioxidant and anti-cancerous activities of barley flour. *J Saudi Soc Agric Sci.*, 27, 143–154.
- Bahloul N., Boudhrioua N., Kouhila M., Kechaou N. (2009): Effect of convective solar drying on colour, total phenols and radical scavenging activity of olive leaves (*Olea europaea* L.) *Int J Food Sci Tech.*, 44, 2561–7, doi:10.1111/j.1365-2621.2009.02084.x.
- Bajaj S., Urooj A., Prabhasankar P. (2006): Effect of Incorporation of Mint on Texture, Colour and Sensory Parameters of Biscuits. *International Journal of Food Properties*, 9(4), 691–700, doi:10.1080/10942910600547632.
- Bala A., Gul K., Riar CS. (2015): Functional and sensory properties of cookies prepared from wheat flour supplemented with cassava and water chestnut flours. *Cogent Food & Agriculture*, 1, 1. 1019815, <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1019815>.
- Balouiri M., Sadiki M., Ibensouda SK. (2016): Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79, doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- Baranowski JD., Davidson PM., Nagel CW., and Branen AL. (1980): Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by naturally occurring hydroxycinnamates. *Journal of Food Science* 45(3), 592–594, doi:10.1111/j.1365-2621.1980.tb04107.x.
- Barron C., Surget A., Rouau X. (2007): Relative amounts of tissues in mature wheat (*triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. *Journal of Cereal Science*, 45, 88–96.
- Basuny AM., Nasef SL., Mahmoud EAM., Arafat SM (2011): Use of medicinal and aromatic plants for increasing quality of some bakery products. *Banat's J. Biotech.* 4:76.
- Baublis AJ., Lu C., Clydesdale FM., Decker EA. (2000): Potential of wheat-based breakfast cereals as a source of dietary antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 19 (sup3), 308S–311S, <https://doi.org/10.1080/07315724.2000.10718965>.
- Bazaz R., Baba WN., Masoodi FA., Yaqoob C. (2016): Formulation and characterization of hypo allergic weaning foods containing potato and sprouted green gram. *J Food Measurement and Characterization*, 10(3), 453–465, doi:10.1007/s11694-016-9324-1.
- Becker F. (2013): Tocopherols in wheat and rye. *Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för livsmedelsvetenskap*, 381. <http://stud.epsilon.slu.se>

- Becker M., Nunes G., Ribeiro D., Silva F., Catanante G., Marty JL. (2019): Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(5), 1108–1114, doi:10.21577/0103-5053.20190003.
- Belderok B., Mesdag J., Donner DA. (2000): *Bread-Making Quality of Wheat: A Century of Breeding in Europe*. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands.
- Belitz HD., Grosch W., and Schieberle P. (2009): Cereals and cereal products. In: *Food Chemistry* (4th). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, 670–745.
- Belobrajdic DM., Bird AR. (2013): The potential role of phytochemicals in wholegrain cereals for the prevention of type-2 diabetes. Review. In *Nutrition Journal*, 12 (62), 62–73, doi:10.1186/1475-2891-12-62.
- Benincasa P., Falcinelli B., Lutts S., Stagnari F., and Galieni A. (2019): Sprouted Grains: A Comprehensive Review Nutrients, 11(2), 421, doi:10.3390/nu11020421.
- Benincasa P., Galieni A., Manetta AC., Pace R., Guiducci M., Pisante M., Stagnari F. (2015): Phenolic compounds in grains, sprouts and wheatgrass of hulled and non-hulled wheat species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(9), 1795–1803, doi:10.1002/jsfa.6877.
- Benincasa P., Tosti G., Farneselli M., Maranghi S., Bravi E., Marconi O., Guiducci M. (2020): Phenolic content and antioxidant activity of einkorn and emmer sprouts and wheatgrass obtained under different radiation wavelengths. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(1), 68–76, doi:10.1016/j.aos.2020.02.001.
- Bertagnolli SMM., Silveira MLR., Fogaça ADO., Umann L., & Penna, N. G. (2014): Bioactive compounds and acceptance of cookies made with Guava peel flour. *Journal of food science Technology*, 34(2), 303–308, <https://doi.org/10.1590/fst.2014.0046>.
- Beta T., Nam S., Dexter JE., and Sapirstein HD. (2005): Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and rollermilled fractions. *Cereal Chemistry*, 82(4), 390–393, <https://doi.org/10.1094/CC-82-0390>.
- Beuchat LR. (1981): Microbial stability as affected by water activity. *Cereal Foods world*. 26(7), 345–349.
- Bilgiçli N., İbanoğlu Ş., Herken E.N. (2007): Effect of dietary fibre addition on the selected nutritional properties of cookies. *Journal of Food Engineering*, 78, 86–89, doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.09.009
- Blessington T., Nzaramba MN., Scheuring DC., Hale AL., Reddivari L., Miller JC. (2010): Cooking methods and storage treatments of potato: Effects on carotenoids, antioxidant activity, and phenolics. *Am J Potato Res.* 87, 479–491, doi:10.1007/s12230-010-9150-7.
- Blumenthal M., Busse WR., Goldberg A., et al. (1999): *The Complete German Commission E Monographs*. American Botanical Council, 685p. ISBN 096555550X.
- Boeing JS., Barizão ÉO., e Silva BC., Montanher PF., de Cinque Almeida V., Visentainer JV. (2014): Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal*, 8(1), doi:10.1186/s13065-014-0048-1.
- Bohn L., Meyer AS., Rasmussen SK. (2008): Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *J Zhejiang Univ Sci B.*, 9(3), 165–91, doi:10.1631/jzus.B0710640.
- Bondia-Pons I., Aura AM., Vuorela S., Kolehmainen M., Mykkänen H., Poutanen K. (2009): Review: rye phenolics in nutrition and health. In *Journal of Cereal Science*, 49(3), 323–336, doi:10.1016/j.jcs.2009.01.007
- Borges A., Saavedra MJ., Simões M. (2012): The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling.*, 28, 755–767, doi:10.1080/08927014.2012.706751.

- Borrelli RC., Mennella C., Barba F., Russo M., Russo GL., Krome K., Erbersdobler HF., Faist V., Fogliano. (2003): Characterization of coloured compounds obtained by enzymatic extraction of bakery products. *Food Chem. Toxicol.*, 41, 1367–1374, doi:10.1016/s0278-6915(03)00140-6.
- Borris RP. (1996): Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J. Ethnopharmacol.*, 51, 29–38, doi:10.1016/0378-8741(95)01347-4.
- Bourne LC., Rice-Evans C. (1998): Bioavailability of ferulic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253, 222–227, doi:10.1006/bbrc.1998.9681.
- Boutigny AL., Barreau C., Atanasova-Penichon V., Verdal-Bonnin MN., Pinson-Gadais L., Richard-Forget F. (2009): Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. In *Mycological Research*, 113(6–7), 746–753, doi:10.1016/j.mycres.2009.02.010
- Boz H. (2015): Ferulic acid in cereals – a review. *Czech J. Food Sci.*, 33, 1–7, doi:10.17221/401/2014-CJFS
- Brand-Williams W., Cuvelier ME, Berset C. (1995): Use of the radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie*, 28, 25–30, [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Bucić-Kojić M., Planinić M., Tomas S., Jakobek L., Šeruga M. (2009): Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2394–2401, doi:10.1111/j.1365-2621.2008.01876.x
- Bunzel M., Ralph J., Martia JM., Hatfield RD., Steinhart H. (2001): Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 653–660.
- Bussmann RW., Malca-García G., Glenn A., Sharon D., Chait G., Díaz D., Pourmand K., Jonat B., Somogy S., Guardado G., Aguirre C., Chan R., Meyer K., Kuhlman A., Townesmith A., Effio-Carbajal J., Frías-Fernandez F., and Benito M. (2010): Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *J Ethnopharmacol.*, 132(1), 101–108, doi:10.1016/j.jep.2010.07.048
- Cacace JE., Mazza G. (2006): Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol, *Journal of Food Science*, 68, 240–248, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb14146.x>
- Cahoon EB., Hall SE., Ripp KG., Ganzke TS., Hitz WD., Coughlan SJ. (2003): Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nat Biotechnol.*, 21 (9), 1082–1087, doi:10.1038/nbt853
- Cakmak I., Ozkan HJ., Braun R., Welch M., Römheld V. (2000): Zn and Fe concentrations in seed of wild, primitive and modern wheats. *Food Nutr. Bull.*, 21, 401–403.
- Călinoiu LF., Vodnar DC. (2018): Whole Grains and Phenolic Acids: A Review on Bioactivity, Functionality, Health Benefits and Bioavailability. *Nutrients*, 10(11), 1615, doi:10.3390/nu10111615.
- Calín-Sánchez Á., Figiel A., Hernández F., Melgarejo P., Lech K., Carbonell-Barrachina ÁA. (2013): Chemical composition, antioxidant capacity, and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) arils and rind as affected by drying method. *Food Bioprocess Technol.*, 6, 1644–54, doi:10.1007/s11947-012-0790-0.
- Calín-Sánchez Á., Figiel A., Lech K., Szumny A., Carbonell-Barrachina ÁA. (2013): Effects of Drying Methods on the Composition of Thyme (*Thymus vulgaris*L.) Essential Oil. *Drying Technology*, 31(2), 224–235, doi:10.1080/07373937.2012.725686
- Calzuola I., Marsili V., and Gianfranceschi G. (2004): Synthesis of antioxidants in wheat sprouts. *J. Agric. Food Chem.*, 52(16), 5201–5206, doi:10.1021/jf0307752.

- Carabasa-Giribet M., Ibarz-Ribas A. (2000): Kinetics of colour development in aqueous glucose systems at high temperatures. *J Food Eng.*, 44, 181–9, doi:10.1016/S0260-8774(00)00027-3.
- Carocho M., and Ferreira ICFR. (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(1), 15–25.
- Carson CF., Mee BJ., Riley TV. (2002): Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1914–1920, doi:10.1128/aac.46.6.1914-1920.
- Cavaliere et al. (2005): Manual of antimicrobial susceptibility testing. Coordinating Editor Marie B. Coyle, 241 p. ISBN 1-55581-349-6.
- Centeno C., Viveros A., Brenes A., Canales R., Lozano A., and de la Cuadra C. (2001): Effect of several germination conditions on total P, phytate P, phytase, and acid phosphatase activities and inositol phosphate esters in rye and barley. *J. Agric. Food Chem.*, 49(7), 3208–15, doi:10.1021/jf010023c.
- Cevallos-Casals BA., Cisneros-Zevallos L. (2010): Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species. *Food Chem.*, 119, 1485–1490.
- Chan KW., Ismail M. (2009): Supercritical carbon dioxide fluid extraction of *Hibiscus cannabinus* L. seed oil: A potential solvent-free and high antioxidative edible oil. *Food Chem.*, 114, 970–975.
- Chan KW., Khong NMH., Iqbal S., Chang SE., Babji AS. (2012): Preparation of Clove buds Deodorized Aqueous Extract (CDAE) and evaluation of its potential to improve oxidative stability of chicken meatballs in comparison to synthetic and natural food antioxidants. *J. Food Quality*, 35, 190–199.
- Chemat F., Rombaut N., Sicaire AG., Meullemiestre A., Fabiano-Tixier AS., Abert-Vian M. (2017): Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason Sonochem.*, 34, 540–560, doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.035.
- Cheng YF., Bhat R. (2016): Functional, physicochemical and sensory properties of novel cookies produced by utilizing underutilized jering (*Pithecellobium jiringa* Jack.) legume flour. *Food Biosci.*, 14, 54–61, doi:10.1016/j.fbio.2016.03.002.
- Cheyrier V. (2005): Polyphenols in foods are more complex than often thought. *America Journal of Clinical Nutrition*, 81(1): 223S-229S. doi:10.1093/ajcn/81.1.223S.
- Chevallier S., Colonna P., Della Valle G., Lourdin D. (2000): Contribution of Major Ingredients during Baking of Biscuit Dough Systems. *Journal of Cereal Science*, 31(3), 241–252, doi:10.1006/jcrs.2000.0308.
- Chinma CE., Anuonye JC., Simon OC., Ohiare R O., Danbaba N. (2015): Effect of germination on the physicochemical and antioxidant characteristics of rice flour from three rice varieties from Nigeria. *Food Chemistry*, 185, 454–458, doi:10.1016/j.foodchem.2015.04.010.
- Chinma CE., James S., Imam H., Ocheme OB., Anuonye JC., & Yakubu CM. (2011): Physicochemical and sensory properties and in-vitro digestibility of biscuits made from blends of tigernut (*Cyperus esculentus*) and pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Nigerian Journal of Nutritional Sciences*, 32, 55–62.
- Chlopicka J., Pasko P., Gorinstein S., Jedryas A., Zagrodzki P. (2012): Total phenolic and total flavonoid content, antioxidant activity and sensory evaluation of pseudocereal breads. *LWT-Food Science and Technology*, 46, 548–555, doi:10.1016/j.lwt.2011.11.009.
- Chou SK., Chua KJ. (2001): New hybrid drying technologies for heat sensitive foodstuffs. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 359–369.

- Chung OK., Ohm J., Ram M., Park S., Howitt C. (2009): Wheat Lipids. In: Khan, K., Shewry, P.R. (Eds.), *Wheat: Chemistry and Technology*, fourth ed. AACC International, St. Paul, MN, USA, 363–393.
- Clifford MN. (1999): Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 362–372.
- CLSI, (2012): *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 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.
- Cornell H. (2003): In: Cauvain SP (ed) *Bread Making: Improving Quality*. Woodhead Publishing, Cambridge. ISBN: 1855735539
- Cowan MM. (1999): Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–582.
- D’Alessandro LG., Dimitrov K., Vauchel P., Nikov I. (2014): Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes, *Chemical Engineering Research and Design*, 92(10), 1818–1826.
- Dahmoune F., Navak B., Moussi K., Remini H., Madani K. (2015): Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves, *Food Chemistry*, 166, 585–595.
- Dailey A., Quan V., Vuong I., Yildiz F. (2015): Effect of extraction solvents on recovery of bioactive compounds and antioxidant properties from macadamia (*Macadamia tetraphylla*) skin waste. *Cogent Food & Agriculture*, 1, 1, doi:10.1080/23311932.2015.1115646.
- Danisova C., Holotnakova E., Hozova B., and Buchtova V. (1994): Effect of germination on a range of nutrients of selected grains and legumes. *Acta Alimentaria*, 23(3), 287–298.
- Dar BN., Sharma S., Ahmad NG. (2016). Effect of storage period on physiochemical, total phenolic content and antioxidant properties of bran enriched snacks. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10(4), 755–761, doi:10.1007/s11694-016-9360-x.
- Das A., Raychaudhuri U., Chakraborty R. (2012): Antimicrobial effect of edible plant extract on the growth of some foodborne bacteria including pathogens. *Nutrafoods*, 12, 83–88, <http://dx.doi.org/10.1007/s13749-012-0033-z>.
- Davin-Regli A., Pagès JM. (2015): *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol.*, 6, 392, doi:10.3389/fmicb.2015.00392.
- De Morais PM., Caliari M., Harumi Nabeshima E., Rodrigues Batista J.E., Hidalgo Campos M.R., Soares M.S. (2018): Storage stability of sweet biscuit elaborated with recovered potato starch from effluent of fries industry. *Food Science and Technology*, 38(2), 216–222, doi:<https://doi.org/10.1590/fst.32916>.
- Deepa N., Kaura C., George B., Singh B., Kapoor H. (2007): Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annum* L.) genotypes during maturity. *LWT: Food Science and Technology*, 40(1), 121–129.
- Delgado-Andrade C., Conde-Aguilera JA., Haro A., de la Cueva S. P., Rufian-Henares, JA. (2010): A combined procedure to evaluate the global antioxidant response of bread. *J. Cereal Sci.*, 52, 239–246.
- Desai TR (2005): Investigation into the mechanism of action of *Triticum aestivum* (wheat) grass. Ph.D. dissertation. Saurashtra University, Rajkot, Gujarat, India.

- Deshwal VK and Deepshikha D. (2018): Antimicrobial investigation of Wheat grass (*Triticum aestivum* L.) against *Escherichia coli*. *European Journal of Molecular Biology and Biochemistry*, 5(1), 9–12. e - ISSN - 2348-2206.
- Devic E., Guyot S., Daudin JD., Bonazzi C. (2010): Kinetics of polyphenol losses during soaking and drying of cider apples. *Food Bioprocess Technol.*, 3, 867–77, doi:10.1007/s11947-010-0361-1.
- Dewanto V., Wu X., Liu RH. (2002): Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem.*, 50, 4959–4964, doi:10.1021/jf0255937.
- Dey TB., Kuhad RC. (2014): Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid-state fermentation wheat *Rhizopus oryzae* RCK2012, *Biotechnology Reports*, 4, 120–127.
- Di Gioia F., Santamaria P. (2015): Microgreens: novel fresh and functional food to explore all the value of biodiversity. *ECO-logica srl, Bari*.
- Dixon RA., Paiva NL. (1995): Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *Plant Cell*, 7, 1085–1097.
- Djordjevic TM., Šiler-Marinkovic SS., Dimitrijevic-Brankovic SI. (2011): Antioxidant Activity and Total Phenolic Content in Some Cereals and Legumes. *Int. J. Food Prop.*, 14(1), 175–184, <http://www.tandfonline.com/loi/ljfp20>.
- Do Q., Angkawijaya A., Tran-Nguyen P., Huynh L., Soetaredjo F., Ismadji S., Ju Y. (2014): Effect of Extraction Solvent on Total Phenol Content, Total Flavonoid Content, and Antioxidant Activity of *Limnophila Aromatica*. *J. Food Drug Anal.*, 22, 296–302, doi:10.1016/j.jfda.2013.11.001.
- Dolijanović Ž., Roljević Nikolić S., Kovačević D., Djurdjić S., Miodragović R., Jovanović Todorović M., Popović Djordjević J. (2019): Mineral profile of the winter wheat grain: effects of soil tillage systems and nitrogen fertilization. *Applied Ecology And Environmental Research*, 17(5), 11757–11771.
- Donkor ON., Stojanovska L., Ginn P., Ashton J., Vasiljevic T. (2012): Germinated grains-sources of bioactive compounds. *Food Chem.* 1;135(3), 950-9, doi: 10.1016/j.foodchem.
- Dordoni R., Garrido GD., Marinoni L., Torri L., Piochi M., Spigno G. (2019): Enrichment of Whole Wheat Cocoa Biscuits with Encapsulated Grape Skin Extract. *International Journal of Food Science Volume 2019*, 1–11, <https://doi.org/10.1155/2019/9161840>.
- Drinić Z., Vidović S., Vladić J., Koren A., Kiproviski B., and Sikora. V (2018): Effect of extraction solvent on total polyphenols content and antioxidant activity of *Cannabis sativa* L. *Lekovite sirovine*, (38), 17–21.
- Duenas M., Hernandez T., Estrella I. (2002): Phenolic composition of the cotyledon and the seed coat of lentils (*Lens culinaris* L.). *European Food Research and Technology*, 215, 478–483.
- Durazzo A, Casale G, Melini V, Maiani G., and Acquistucci R. (2015): Evaluation of Antioxidant Properties in Cereals: Study of Some Traditional Italian Wheats. *Foods*, 4(3), 391–399, doi:10.3390/foods403039.
- Dziki D., Gawlik-Dziki U., Kordowska-Wiater M., and Doman-Pytka M. (2015): Influence of Elicitation and Germination Conditions on Biological Activity of Wheat Sprouts. *Journal of Chemistry*, article ID 649709, 8 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/649709>.
- Dziki D., Różyło R., Gawlik-Dziki U., Świeca M. (2014): Current trends in the enhancement of antioxidant activity of wheat bread by the addition of plant materials rich in phenolic compounds. *Trends in Food Science and Technology*, 40(1), 48–61, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.010>.
- Đorđević TM., Marinković SS., Branković SD. (2010): Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chemistry*, 119, 957–963, doi:10.1016/j.foodchem.2009.07.049.

- Đukić D., Mandić G., Stanojković A. (2010): *Praktikum iz mikrobiologije*. Budućnost, Novi Sad, 428 strana. SBN 978-86-7780-084-0.
- Đurović MV. (2018): Antibacterial activity and total phenol content in Wheat extracts. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых „Ломоносов“, Lomonosov, Moskva. Conference “Ломоносов 2018” - Секция Микробиология, 09–13.04.2018. ISBN 978-5-317-05800-5. 5. Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.
- Đurović V., Radovanović M., Mandić L., Knežević D., Zornić V., Đukić D. (2021): Chemical and microbial evaluation of biscuits made from wheat flour substituted with wheat sprouts. *Food Science and Technology International*, 27(2), 172–183, doi:10.1177/10820132209424411.
- EFSA, (2015): Scientific opinion on dietary reference values for vitamin E as α -tocopherol. *EFSA Journal*, 13, 4149–4220.
- Elisha IL., Botha FS., McGaw LJ., Eloff JN. (2017): The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 133, <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1645-z>.
- El-Massry K., Farouk A., El-Ghorab A. (2003): Volatile constituents of glutathione – ribose model system and its antioxidant activity. *Amino Acids*, 24(1-2), 171–177, doi:10.1007/s00726-002-0318-4.
- Eloff JN., Masoko P., Picard J. (2007): Resistance of animal fungal pathogens to solvents used in bioassays. *South African J Bot.*, 73, 667–9.
- El-Sayed M. Abdel-Aal and Rabalski I. (2008): Bioactive Compounds and their Antioxidant Capacity in Selected Primitive and Modern Wheat Species. *The Open Agriculture Journal*, 2, 7–14.
- Embuscado ME. (2015): Spices and herbs: natural sources of antioxidants- a mini review. *J. Funct. Foods*, 18, 811.
- Eneche EH. (1999): Biscuit-making potential of millet/pigeon pea flour blends. *Plant Foods for Human Nutrition*, 54, 21–27, <https://doi.org/10.1023/A:1008031618117>.
- Essuman E. K., Osei J. A., Gyimah V. (2016): Proximate composition and sensory qualities of chips produced from ackee aril flour. *American Journal of Food Science and Technology*, 4, 38-42.
- Ewers E. (1908): Die polarimetrisch Analyse des Stärkegehaltes. *Zeitschrift für öffentliche Chemie*, 14, 150–157.
- Falcioni G., Fedeli D., Tiano L., Calzuola I., Mancinelli L., Marsili V. et al. (2002): Antioxidant activity of wheat sprouts extract in vitro: inhibition of DNA oxidative damage. *J Food Sci.*, 67, 2918–2922.
- FAO (2009): FAOSTAT database. <http://www.faostat.fao.org>.
- Fardet A. (2010): New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre? *Nutr Res Rev.*, 23(1), 65–134, doi:10.1017/S0954422410000041.
- Fazary AE., Ju YH. (2007): Feruloyl esterases as biotechnological tools: current and future perspectives. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39, 811–828.
- Feldman M. (2001): Origin of cultivated wheat. In: Bonjean AP, Angus WJ, eds. *The world wheat book: a history of wheat breeding*. Lavoisier Publishing, Paris, France, 3–56.
- Feldman M., Smart TJ., Simmonds NW. (1995): *Wheats, Evolution of crop plants*, Harlow, 185–192.
- Feng H., Nemzer B., Devries J. (2018): *Sprouted Grains - Nutritional Value, Production, and Applications*. Publisher: Woodhead Publishing and AACC International Press; 1st edition (October 11, 2018), 267p. ISBN: 0128115254.

- Ferguson LR., Lim IF., Pearson AE., Ralph J., Harris PJ. (2003): Bacterial antimutagenesis by hydroxycinnamic acids from plant cell walls. *Mutation Research*, 542, 49–58.
- Fernandez MT, Hayward WS, August JT. (1972): Bacterial proteins required for replication of phage Q ribonucleic acid. Purification and properties of host factor I, a ribonucleic acid-binding protein. *J Biol Chem.*, 247(3), 824–31.
- Fernandez-Orozco R., Frias J., Zielinski H., Piskula MK., Kozłowska H., & Vidal Valverde C. (2008): Kinetic study of the antioxidant compounds and antioxidant capacity during germination of *Vigna radiata* cv. emmerald, *Glycine max* cv. jutro and *Glycine max* cv. merit. *Food Chemistry*, 111(3), 622–630.
- Ferruzzi MG., Bohm V., Courtney PD., Schwartz SJ. (2002): Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *J. Food Sci.*, 67, 2589–2595.
- Ficco DBM., Riefolo C., Nicastro G. De Simone V., Di Gesù, A M., Beleggia R., et al. (2009): Phytate and mineral elements concentration in a collection of Italian durum wheat cultivars. *Field Crops Res.*, 111, 235–242, doi:10.1016/j.fcr.2008.12.010.
- Floegel A., Kim DO., Chung SJ., Koo SI., Chun OK. (2011): Comparison of ABTS/DPPH Assays to Measure Antioxidant Capacity in Popular Antioxidant-Rich. US Foods. *J. Food Compos. Anal.*, 24, 1043–1048, doi:10.1016/j.jfca.2011.01.008.
- Frias J., Miranda M.L., Doblado R., Vidal-Valverde C. (2005): Effect of germination and fermentation on the antioxidant vitamin content and antioxidant capacity of *Lupinus albus* L. var. Multolupa. *Food Chemistry*, 92(2), 211–220
- Frossard E., Bucher M., Mächler F., Mozafar A., and Hurrell R. (2000): Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn and Ca in plants for human nutrition. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 861–879.
- Galanakis CM., Goulas V., Tsakona S., Manganaris GA., Gekas VA. (2013): Knowledge Base for the Recovery of Natural Phenols with Different Solvents. *Int. J. Food Prop.*, 16(2), 382–396, doi:10.1080/10942912.2010.522750.
- Gamel TH., Linssen JP., Mesallam AS., Damir AD., Lila A., Shekib LA. (2006): Seed treatments affect functional and antinutritional properties of amaranth flours. *Journal of the science of food and agricultures*, 86(7), 1095–1102, <https://doi.org/10.1002/jsfa.2463>
- Gani A., Wani SM., Masoodi FA., Hameed G. (2012): Whole grain cereal bioactive compounds and their health benefits: a review. *Journal of Food Processing and Technology*, 3, 1–10, <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7110.1000146>
- Gao X., Lukow OM. and Grant CA. (2012): Grain concentrations of protein, Fe and Zn and bread making quality in spring wheat as affected by seeding date and nitrogen fertilizer management. *J. Geochem. Explor.*, 121, 36–44, doi:10.1016/j.gexplo.2012.02.005.
- Garau MC., Simal S., Roselló C., Femenia A. (2007): Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. *Canoneta*) by-products. *Food Chemistry*, 104, 1014–1024.
- Gawlik-Dziki U., Dziki D., Pietrzak W., Nowak R. (2017): Phenolic acids prolife and antioxidant properties of bread enriched with sprouted wheat flour. *Journal of Food Biochemistry*, 41(4), e12386, <https://doi.org/10.1111/jfbc.12386>
- Geissman TA. (1963): Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds, p.265, 1963. In M. Florkin and E. H. Stotz (ed.), *Pyrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituents*, vol. 9. Elsevier, New York, N.Y.
- Gelinas P., McKinnon CM. (2006): Effect of wheat variety, farming site, and bread-baking on total phenolics. *International Journal of Food Science and Technology* 41(3), 329–332.
- Gene Y., Humphries JM., Lyons GH., Graham RD. (2005): Exploiting genotypic variation in plant nutrient accumulation to alleviate micronutrient deficiency in populations. *Journal of*

- Trace Elements in Medicine and Biology, 18(4), 319–324, doi:10.1016/j.jtemb.2005.02.005.
- Ghumman A., Singh N., Kaur A. (2017): Chemical, nutritional and phenolic composition of wheatgrass and pulse shoots. *International Journal of Food Science & Technology*, <https://doi.org/10.1111/ijfs.13498>.
- Giambanelli E., Ferioli F., Kocaoglu B., Jorjadze M., Alexieva I., Darbinyan, N., Antuono F. (2013): A comparative study of bioactive compounds in primitive wheat populations from Italy, Turkey, Georgia, Bulgaria and Armenia. *J. Sci. Food Agric.*, 93, 3490–3501.
- Gimeno E., Castellote AI., Lamuela-Raventos RM., de la Torre MC. (2000): Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography *Journal of Chromatography A*, 881, 251–254.
- Goesaert H., Brijs K., Veraverbeke WS., Courtin CM., Gebruers K., Delcour JA. (2005): Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 12–30.
- Goulas V., Manganaris G.A. (2012): Towards an efficient protocol for the determination of triterpenic acids in olive fruit: A comparative study of drying and extraction methods. *Phytochemical Analysis*, 23, 444–449.
- Graham R., Senadhira D., Beebe S., Iglesias C., and Monasterio I. (1999): Breeding for micronutrient density in edible portions of staple food crops: conventional approaches. *Field Crops Res.*, 60, 57–80.
- Grange JM., Davey RW. (1990): Antibacterial properties of propolis (bee glue), *J R Soc Med.*, 83, 159–160.
- Grossmann M., Mandarino J., Yabu M. (1998): Chemical composition and functional properties of malted corn flours. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 41. doi. 10.1590/S1516-89131998000200003.
- Gruenwald J. (2009): Novel botanical ingredients for beverages. *Clin Dermatol.*, 27, 210–216. doi:10.1016/j.clindermatol.2008.11.003.
- Gunenc A., HadiNezhad M., Farah I., Hashem A., and HosseinianF. (2015): Impact of supercritical CO₂ and traditional solvent extraction systems on the extractability of alkylresorcinols, phenolic profile and their antioxidant activity in wheat bran. *Journal of Functional Foods*, 12, 109–119.
- Guo W., Beta T. (2013): Phenolic acid composition and antioxidant potential of insoluble and soluble dietary fibre extracts derived from select whole-grain cereals. *Food Research International*, 51, 518–525.
- Hammer KA., Carson CF., Riley TV. (1999): Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. - *Journal of applied microbiology*, 86(6), 985–990.
- Hanninen O., Rauma AL., Kaartinen K., Nenonen M. (1999): Vegan diet in physiological health promotion. *Acta Physiol Hung* 86, 171–180.
- Harvey A. (2000): Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products *Drug Discov Today*, 5(7), 294–300, doi:10.1016/s1359-6446(00)01511-7.
- Hayat K., Hussain S., Abbas S., Farooq U., Ding D., Xia S., Jia C., Zhang X., Xia W. (2009): Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro, *Separation and Purification Technology*, 70(1), 63–70.
- Hegstad HG. (2008): Nutritional and health benefits of soybean. Soy protein quality evaluation report. Food and Nutrition Paper No. 71. FAO, Rome, Italy.
- Heiniö RL., Oksman-Caldentey KM., Latva-Kala K., Lehtinen P., and Poutanen K. (2001): Effect of drying treatment conditions on sensory profile of germinated oat. *Cereal Chemistry Journal*, 78(6), 707–714, doi:10.1094/cchem.2001.78.6.707.

- Hejtmánková K., Lachman J., Hejtmankova A., Pivec V., Janovska D. (2010): Tocols of selected spring wheat (*Triticum aestivum* L.), einkorn wheat (*Triticum monococcum* L.) and wild emmer (*Triticum dicoccum* Schuebl [Schrank]) varieties. *Food Chem.*, 123, 1267–1274.
- Hernández L., Afonso D., Rodrigues EM., Diaz C. (2011): Phenolic compounds in wheat grain cultivars. In *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(4), 408–415, doi:10.1007/s11130-011-0261-1.
- Hernández Rodríguez L., Desireé DA., Rodríguez Rodríguez E; Romero CD. (2011): Minerals and trace elements in a collection of wheat landraces from the Canary Islands, 24(8), 1081–1090, doi:10.1016/j.jfca.2011.04.016 .
- Hidalgo A., Brandolini A., Pompei C., and Piscozzi R. (2006): Carotenoids and tocopherols of einkorn wheat (*Triticum monococcum* ssp. *Monococcum*). *Journal of Cereal Science*, 44, 182–193.
- Holtekjolen AK., Baevere AB., Rodbotten M., Berg H., Knutsen SH. (2008): Antioxidant properties and sensory profiles of breads containing barley flour. *Food Chem.*, 110, 414–421.
- Horszwald A., Morales J.F., Del Castillo D.M., Zielinski H. (2010): Evaluation of antioxidant capacity and formation of processing contaminants during rye bread making. *Journal of Food and Nutrition Research*, 49(3), 149–159.
- Hudz N., Yezerska O., Shanaida M., Sedláčková VH., Wieczorek PP. (2019): Application of the Folin-Ciocalteu method to the evaluation of *Salvia sclarea* extracts. *Pharmacia*, 66(4), 209–215, <https://doi.org/10.3897/pharmacia.66.e38976>.
- Hung PV., Hatcher DW., and Barker W. (2011): Phenolic acid composition of sprouted wheats by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and their antioxidant activities. *Food Chem.*, 126(4), 1896–1901, doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.015.
- Hung PV., Maeda T., Miyatake K., Morita N. (2009): Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. *Food Research International*, 42(1), 185–190, doi:10.1016/j.foodres.2008.10.005.
- Hussain A., Larsson H., Olsson M.E., Kuktaite R., Grausgruber H., Johansson E. (2012): Is organically produced wheat a source of tocopherols and tocotrienols for health food? *Food Chem.*, 132, 1789–1795.
- Ibidapo O., Ogunji A., Akinwale T., Owolabi F., Akinyele DO., Efuribe N. (2017): Development and Quality Evaluation of Carrot Powder and Cowpea Flour Enriched Biscuits. *International Journal of Food Science and Biotechnology*, 2(3), 67–72, doi:10.11648/j.ijfsb.20170203.15.
- Ikigai H., Nakae T., Hara Y., Shimamura T. (1993): Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1147, 132–136.
- Ikuomola DS., Otut OL., Oluniran DD. (2017): Quality assessment of cookies produced from wheat flour and malted barley (*Hordeum vulgare*) bran blends. *Cogent Food & Agriculture*, 3(1), <https://doi.org/10.1080/23311932.2017.1293471>.
- Inyang C.U., Zakari U.M. (2008): Effect of germination and fermentation of pearl millet on proximate, chemical and sensory properties of instant “fura” – a Nigerian cereal food. *Pak J Nutr.*, 7(1), 9–12.
- Iqbal S., Bhanger M., Anwar F. (2007): Antioxidant properties and components of bran extracts from selected wheat varieties commercially available in Pakistan. *LWT-Food Sci. Technol.*, 40, 361–367.
- Ismail HI., Chan KW., Mariod AA., Ismail M. (2010): Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*Cucumis melo*) methanolic extracts. *Food Chem.*, 119, 643–647.
- Ismail M., Al-Naqeep G., Chan KW. (2010): *Nigella sativa* thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats. *Free Radic. Biol. Med.*, 48, 664–672.

- Itagaki S., Kurokawa T., Nakata C., Saito Y., Oikawa, S., Kobayashi, M., Hirano T., Iseki K. (2009): In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid: a comparative study with other natural oxidation inhibitors. *Food Chemistry*, 114, 466–471.
- Jain P., Borah SK. (2017): Effect of nutritional, physiochemical and sensory properties on the development of bread with incorporation of wheat grass powder. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 2(6), 109–114, ISSN: 2455–4898.
- Jākobsone I., Kantāne I., Zute S., Jansone I., Bartkevičs V. (2015): Macro-Elements and Trace Elements in Cereal Grains Cultivated in Latvia. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences.*, 69(4), 152–157, doi:10.1515/prolas-2015-0022.
- Jan R., Saxena, D. C., Singh, S. (2016): Physico-chemical, textural, sensory and antioxidant characteristics of gluten – Free cookies made from raw and germinated *Chenopodium* (*Chenopodium album*) flour. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 281–287, doi:10.1016/j.lwt.2016.04.001.
- Jayavanth P., Kaur K. and Junainah AH. (2011): Antibacterial efficacy of chitosan, Manuka honey and chlorophyll against *Klebsiella Pneumoniae*. *Journal of Natural Products*, 4, 94–99.
- Jed WF, Katherine KS, Dinkova-Kostova AT, Egner PA, Kensler TW, Talalay P (2005): Chlorophyll, chlorophyllin and related tetrapyrroles are significant inducers of mammalian phase 2 cytoprotective genes. *Carcinogenesis*, 26(7), 1247–1255, doi:10.1093/carcin/bgi068.
- Jensen S., Ostdal H., Skibsted LH. and Thybo AK. (2011): Antioxidants and shelf life of whole wheat bread. *J. Cereal Sci.* 53:291. *Ital. J. Food Sci.*, vol. 31, 2019 – 263.
- Jeong BG., Chun J., Jung J., Islam MA., Sharmin F., Quines V., Choi, SG. (2017): Variations in vitamin E, phenolic content, and antioxidant properties of different wheat cultivars of South Korea. *CyTA - Journal of Food*, 15(4), 646–650, doi:10.1080/19476337.2017.132540.
- Jeong SM., Kim SY., Kim DR., et al. (2004): Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *J Agric Food Chem.*, 52, 3389–3393, doi:10.1021/jf049899k.
- Jeong YC., Jae HM., Keun HP. (2000): Isolation and identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid from hot water extracts of *Hovenia dulcis* Thumb and confirmation of their antioxidative and antimicrobial activity. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 32, 1403–1408.
- Jhanji S., Sekhon NK. (2017): Evaluation of potential of portable chlorophyll meter to quantify chlorophyll and nitrogen contents in leaves of wheat under different field conditions. *Indian journal of Experimental biology*, 56, 750–758.
- Jing H., Kitts DD. (2000): Comparison of the antioxidative and cytotoxic properties of glucose-lysine and fructose-lysine Maillard reaction products. *Food Research International*, 33, 509–516.
- Jonnala RS., Irmak S., MacRitchie F., & Bean SR. (2010): Phenolics in the bran of waxy wheat and triticale lines. *Journal of Cereal Science*, 52(3), 509–515, doi:10.1016/j.jcs.2010.07.013.
- Kadariya J., Smith TC., Thapaliya D. (2014): *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *Biomed Res Int.*, 2014: 827965, doi:10.1155/2014/827965.
- Kähkönen MP., Hopia AI., Heinonen M. (2001): Berry phenolics and their antioxidant activity. *J Agric Food Chem.*, 49, 4076–4082.
- Kalra Y. (1997): *Handbook of Reference Methods for Plant Analysis* (1st ed.). CRC Press, <https://doi.org/10.1201/9780367802233>.

- Kaluđerški G., Filipović N. (1998): Metode ispitivanja kvaliteta žita, brašna i gotovih proizvoda. Izdavač: Tehnološki fakultet. Mesto: Novi Sad.
- Kandil A., Li J., Vasanthan T., Bressler DC. (2012): Phenolic acids in some cereal grains and their inhibitory effect on starch liquefaction and saccharification. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60, 8444–8449, doi:10.1021/jf3000482.
- Kaneda H., Kobayashi N., Furusho S., Sahara H., Koshino S. (1995): Reducing Activity and Flavor Stability of Beer. *Tech QE Master Brew Assoc. Am.*, 32, 90–94.
- Kapsak WR., Rahavi EB., Childs NM., White C. (2011): Functional foods: consumer attitudes, perceptions, and behaviors in a growing market. *Journal of the American Dietetic Association*, 111(6), 806.
- Karabegović I., Nikolova M., Veličković D., Stojičević S., Veljković V., Lazić M. (2011a): Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanolic Extracts of the *Artemisia* sp. Recovered by Different Extraction Techniques. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19(3), 504–511.
- Karacabey E., Mazza G. (2010): Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology, *Food Chemistry*, 119(1), 343–348.
- Karamać M., Bucinski A., Pegg R.B., Amarowicz R. (2005): Antioxidant and antiradical activity of ferulates. *Czech Journal of Food Sciences*, 23, 64–68.
- Karaman S., Toker OS., Çam M., Hayta M., Döğan M., Kayacier A. (2014): Bioactive and physicochemical properties of persimmon as affected by drying methods. *Drying Technol.*, 32, 258–67, doi:10.1080/07373937.2013.821480.
- Kardas AT., Durucasu I. (2014): A new analytical method for the determination of phenolic compounds and their antioxidant activities in different wheat grass varieties. *Ekoloji*, 23(90), 73–80, <http://dx.doi.org/10.5053/ekoloji.2014.909>.
- Karele I. (2001): Chlorophyll content distribution in leaves, stems, and ears in winter wheat. *Plant Nutrition*, 720–721, doi:10.1007/0-306-47624-x_349.
- Karklina D., Gedrovica I., Reča M., Kronberga M. (2012): Production of biscuits with higher nutritional value. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, 66, 113–116.
- Kashian S., Fathivand AA. (2015): Estimated daily intake of Fe, Cu, Ca and Zn through common cereals in Tehran, Iran. *Food Chem.*, 176, 193–196.
- Kastori R. (1997): Teški metali u životnoj sredini, Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad.
- Kastorin CM., Milionis HJ., Esposito K., Giugliano D., Goudevenos JA. (2011): Panagiotakos, D.B. The effect of Mediterranean diet on metabolic syndrome and its components: A meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 57, 1299–1313.
- Kaukovirta-Norja A., Wilhelmsson A., Germination PK. (2004): A Means to Improve the Functionality of Oat. *Agricultural Food Sciences*, 13, 100–112.
- Kaur C., Kapoor HC. (2002): Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Inter J Food Sci Tech.*, 37, 153–161.
- Kaur N., Singh DP. (2017): Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: A literature review. *Appetite*, 112, 167–187.
- Kazazić SP. (2004): Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida: a review. *Arh Hig Rada Toksikol.*, 55, 279–290.
- Keriere I, Mankevičiene A, Bliznikas S, Jablonskyte-Rašče D, Maikštenien S., Česnulevičevi R. (2015): Biologically active phenolic compounds in buckwheat, oats and winter spelt wheat. *Zemdirbyste-Agriculture*, 102(3), 289–296, ISSN 1392-3196 / e-ISSN 2335-8947 doi:10.13080/z-a.2015.102.037.
- Khan KM., Abert-Vian M., Fabiano-Tixier A.S., Dangles O., Chemat F. (2010): Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel, *Food Chem.*, 119, 851–858.

- Khattak AB., Zeb A., Bibi N., Khalil SA., Khattak MS. (2007): Influence of germination techniques on phytic acid and polyphenols content of chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts. *Food chemistry*, 104(3), 1074–1079.
- Kim HJ., Chen F., Wang X., Choi JH. (2006): Effect of methyl jasmonate on phenolics, isothiocyanate, and metabolic enzymes in radish. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7263–7269, doi:10.1021/jf060568c.
- Kim HY., Hwang IG., Kim TM., Woo KS., Park DS., Kim JH., et al (2012): Chemical and functional components in different parts of rough rice (*Oryza sativa* L.) before and after germination. *Food Chem.*, 134, 288–293.
- Kim SL., Kim SK., and Park CH. (2004): Introduction and nutritional evaluation of buckwheat sprouts as new vegetable. *Food Res Int.*, 7, 319–327.
- Kinsella JE., Frankel E., German B., Kanner J. (1993): Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technol.*, 47(4), 85–89.
- Knežević M. (2007): *Sistematika bilja, Sveučilište u Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek*, 87.
- Koehler P., Hartmann G., Wieser H., Rychlik M. (2007): Changes of folates, dietary fiber, and proteins in wheat as affected by germination. *J Agric Food Chem.*, 13, 55(12), 4678–83, doi:10.1021/jf0633037.
- Konopka I., Tańska M., Faron A., Stępień A., Wojtkowiak K. (2012): Comparison of the Phenolic Compounds, Carotenoids and Tocochromanols Content in Wheat Grain under Organic and Mineral Fertilization Regimes. *Molecules*, 17(10), 12341–12356, doi:10.3390/molecules171012341.
- Kotze M., Eloff JN. (2002): Extraction of antibacterial compounds from *Combretum microphyllum* (Combretaceae). *South African J Bot.*, 68, 62–7.
- Kovacevic V., Kadar I., Rastija M., and Iljkic D. (2013): Response of maize and winter wheat to liming with hydrated lime. 12th Alps-Adria Scientific Workshop Opatija, Doberdò, Venezia – Croatia – Italy. *Növénytermelés*, 62, 47 –50.
- Kroon PA., Faulds CB., Ryden P., Robertson JS., Williamson G. (1997): Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 661–667.
- Kuete V. (2010): Potential of Cameroonian Plants and Derived Products against Microbial Infections: A Review. *Planta Medica*, 76(14), 1479–1491, doi:10.1055/s-0030-1250027.
- Kulkarni SD., Acharya R., Rajurkar NS., Reddy AVR. (2009): Bioaccessibility of some elements from wheatgrass (*Triticum aestivum*L.) by in-vitro gastrointestinal digestion combined with neutron activation analysis using ammonium bicarbonate as an alternate base. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 279(3), 713–718, doi:10.1007/s10967-008-7284-6.
- Kulkarni SD., Tilak JS., Acharya R., Rajurkar NS., Devasagayam TPA., and Reddy AVR. (2006): Evaluation of the Antioxidant Activity of Wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) as a Function of Growth under Different Conditions. *Phytotherapy Research*, 20, 218–227. Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com) doi:10.1002/ptr.1838.
- Lachman J., Šulc M., Schilla M. (2007): Comparison of the total antioxidant status of Bohemian wines during the wine – making process, *Food Chem.*, 103, 802–807.
- Lalošević V., Jarak M., Vidić B., Pašić Š., Mihajlović Ukropina M. Jelesić Z., Kulauzov M., Boboš S. (2011): *Mikrobiologija za studente veterinarske medicine*. Novi Sad: Mala knjiga. 272 str. ISBN 978-86-7520-214-1.
- Lampi AM., Nurmi T., Ollilainen V., and Piironen V. (2008): Tocopherols and Tocotrienols in Wheat Genotypes in the HEALTHGRAIN Diversity Screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9716–9721.

- Larsson M., Sandberg AS. (1992): Phytate Reduction in Oats during Malting. *Journal of Food Science*, 57(4), 994–997, doi:10.1111/j.1365-2621.1992.tb14340.x.
- Lee CC., Lin SD. (2008): Effect of GABA tea on quality characteristics of chiffon cake. *Cereal Chemistry*, 85 (1), 31–38.
- Leenhardt F., Lyan B., Rock E., Boussard A., Potus J., Chanliaud E., Remesy C. (2006): Wheat Lipoygenase Activity Induces Greater Loss of Carotenoids than Vitamin E during Breadmaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1710–1715, doi:10.1021/jf052243m.
- Lemmens E., Moroni AV., Pagand J., Heirbaut P., Ritala A., Karlen Y., Delcour JA. (2018): Impact of Cereal Seed Sprouting on Its Nutritional and Technological Properties: A Critical Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol.18, doi:10.1111/1541-4337.12414.
- Lešić R., Herak Ćustić M., Poljak M., Romić M. (2004): Povrćarstvo. Zrinski, Čakovec.
- Li H., Deng Z., Wu T., Liu R., Loewen S., Tsao R. (2012): Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes, *Food Chemistry*, 130, 928–936.
- Li L., Shewry PR., Ward JL. (2008): Phenolic acids in wheat varieties in the Healthgrain diversity screen. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 9732–9739, doi:10.1021/jf801069s.
- Li X., Thwe AA., Park NI., Suzuki T., Kim SJ., Park SU. (2012): Accumulation of phenylpropanoids and correlated gene expression during the development of tartary buckwheat sprouts. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 5629–5635.
- Liang H., Xing Y., Chen J. et al. (2012): Antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Ophiopogon japonicus* (Liliaceae). *BMC Complement Altern Med.*, 12, 238, <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-238>.
- Lichtenthaler HK. (1987): [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350–382, doi:10.1016/0076-6879(87)48036-1.
- Lichtenthaler HK., and Buschmann C. (2001): Chlorophylls and Carotenoids: UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* Universitaet Karlsruhe Karlsruhe, Germany, <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>
- Lim PO, Kim HJ, Nam HG. (2007): Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 115–136.
- Liu H., Chen Y., Hu T., Zhang S., Zhang Y., Zhao T., Yu H., Kang Y. (2016): The influence of light-emitting diodes on the phenolic compounds and antioxidant activities in pea sprouts. *J. Funct. Foods.*, 25, 459–465, doi:10.1016/j.jff.2016.06.028.
- Liu Q. and Yao H. (2007): Antioxidant activities of barley seeds extracts. *Food Chem.*, 102, 732–737.
- Liu Q., Qiu Y., Beta T. (2010): Comparison of antioxidant activities of different colored wheat grains and analysis of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 9235–9241.
- Liu RH. (2007): Whole grain phytochemicals and health. *J Cereal Sci.*, 46, 207–219.
- Liu S., Willett WC., Manson JE., Hu FB., Rosner B., Colditz G. (2003): Relation between changes in intakes of dietary fiber and grain products and changes in weight and development of obesity among middle-aged women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 920–927.
- Liu Y., Qian C., Ding S., Shang X., Yang W., Fang S. (2016): Effect of light regime and provenance on leaf characteristics, growth and flavonoid accumulation in *Cyclocarya paliurus* (Batal) Iljinskaja coppices. *Botanical studies*, 57(1), 28, doi:10.1186/s40529-016-0145-7.
- Liu ZH., Wang HY., Wang XE., Zhang GP., Chen PD., and Liu DJ. (2006): Genotypic and spike positional difference in grain phytase activity, phytate, inorganic phosphorus, Fe, and

- Zn contents in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Cereal Sci.*, 44, 212–219, doi:10.1016/j.jcs.2006.06.001.
- Liukkonen KH., Katina K., Wilhelmsson A., Myllymaki O., Lampi A M., Kariluoto S., Piironen V., Heinonen SM., Nurmi T., Adlercreutz H., Peltoketo A., Pihlava JM., Hietaniemi V., Poutanen K. (2003): Process-Induced Changes on Bioactive Compounds in Whole Grain Rye. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 117–122.
- Liyana-Pathirana CM., and Shahidi F. (2007): The antioxidant potential of milling fractions from breadwheat and durum. *Journal of Cereal Science*, 45 (3), 238–247.
- Lloyd BJ., Siebenmorgen TJ., Beers KW. (2000): Effect of commercial processing on antioxidants in rice bran. *Cereal Chemistry*, 77, 551–555.
- Lo HH., Chung JG. (1999): The effects of plant phenolics, caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid on arylamine N-acetyltransferase activities in human gastrointestinal microflora. *Anticancer Research*, 19, 133–139.
- Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. (2010): Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health, *Pharmacogn. Rev.*, 4, 118–126, <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902> PMID: 22228951
- López-Perea P., Guzmán-Ortiz FA., Román-Gutiérrez AD., Castro-Rosas J., Gómez-Aldapa CA., Rodríguez-Marín M, Falfán-Cortés RN., González Olivares LG., Torruco-Uco JG. (2019): Bioactive compounds and antioxidant activity of wheat bran and barley husk in the extracts with different polarity. *International Journal of Food Properties*, 22 (1), 646–658, <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1600543>.
- Lorenz K. (1980): Cereal sprouts: composition, nutritive value, food applications. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 13(4), 353-85. doi:10.1080/10408398009527295.
- Lukow and Bushuk (1984): *Cereal Chemistry*, 61, 336–339.
- Luque-Garcia JL., & De Castro ML. (2003): Ultrasound: A powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (1), 41–47.
- Lv J., Yu L., Lu Y., Niu Y., Liu L., Costa J., Yu L. (2012): Phytochemical compositions, and antioxidant properties, and antiproliferative activities of wheat flour. *Food Chem.*, 135(2), 325–331, doi:10.1016/j.foodchem.2012.04.141.
- Ma D., Sun D., Zuo Y., Wang C., Zhu Y., Guo T. (2014): Diversity of Antioxidant Content and Its Relationship to Grain Color and Morphological Characteristics in Winter Wheat Grains. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(6), 1258–1267, doi:10.1016/s2095-3119(13)60573-0.
- Mackevic A. (2010): The effect of different pH during steeping on avenanthramide content in germinated oats. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 17 p.
- Malila N., Virtamo J., Virtanen M., Albanes D., Tangrea JA., and Huttunen JK. (1999): The effect of alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation on colorectal adenomas in middle-aged male smokers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 8, 489-493.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004): Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747.
- Manzocco L., Calligaris S., Mastrocola D., Nicoli M., Lericci C. (2001): Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 340–346.
- Marín L., Miguélez E.M., Villar C.J., Lombó F. (2018): Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties, (accessed on 29 August 2018); <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/905215/abs/>
- Martin A, Morcillo N, Lemus D, et al. (2005): Multicenter evaluation of colorimetric assays using MTT and resazurin for rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs, *Int J Tuberc Lung Dis*, 9, 901–6.
- Martinez-Ballesta RC., Dominguez-Perles R., Moreno DA., Muries B., Alcaraz-Lopez C., Bastias E., Garcia-Viguera C., Carvajal M. (2009): Minerals in plant food: effect of

- agricultural practices and role in human health. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 30 (2010) 295–309 c INRA, EDP Sciences, doi:10.1051/agro/2009022.
- Martínez-Tomé M, Murcia MA, Frega N, et al. (2004): Evaluation of antioxidant capacity of cereal brans. *J Agric Food Chem.*, 52, 4690–4699.
- Martini N., Eloff JN. (1998): The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *J Ethnopharmacol.*, 62, 255–63.
- Marwaha RK, Bansal D., Kaur S., Trehan A. (2004): Wheat grass juice reduces transfusion requirement in patients with thalassemia major: a pilot study. *Indian Pediatr.*, 41, 716–720.
- Mathew S., Abraham TE. (2004): Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 24, 59–83.
- Mattila P., Pihlava JM., Hellstrom J. (2005): Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8290–8295, doi:10.1021/jf051437z
- McKevith B. (2004): Nutritional aspects of cereals. British Nutrition Foundation, *Nutrition Bulletin*, 29, 111–142.
- McNicholl BP., McGrath JW., Quinn JP. (2007): Development and application of a resazurin-based biomass activity test for activated sludge plant management. *Water Res.*, 41(1), 127–33, doi:10.1016/j.watres.2006.10.002.
- Meydani M. (1999): Dietary antioxidants modulation of aging and immune-endothelial cell interaction. *Mechanisms of Ageing and Development*, 111(2-3), 123–132.
- Michalska A., Amigo-Benavent M., Zieliński H., Del Castillo MD. (2008): Effect of bread making on formation of Maillard reaction products contributing to the overall antioxidant activity of rye bread. *Journal of Cereal Science*, 48, 123–132.
- Mikulajová A., Takácsová M., Rapta P., Brindzová L., Zalibera M., Németh K. (2007): Total phenolic contents and antioxidant capacities of cereal and pseudocereal genotypes *Journal of Food and Nutrition Research*, 46 (4), 150–157.
- Miladinović D., Ilić B., Mihajilov-Krstev T., Nikola D., Nikolić N., Milosavljević V., Nikolić D. (2012): Antibakterijski potencijal etarskog ulja *Sideritis montana* L. (Lamiaceae). *UDK Hem. Ind.*, 66 (4), 541–545, doi:10.2298/HEMIND111003001M
- Minatel IO., Borges CV., Ferreira MI., HA, Chen CO., Lima GPP. (2017): Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability. doi:10.5772/66368
- Mir SA., Shah MA., & Mir MM. (2016): Microgreens: Production, shelf life and bioactive components. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(12), doi:10.1080/10408398.2016.1144557.
- Miranda M., Maureira H., Rodriguez K., Vega-Gálvez A. (2009): Influence of temperature on the drying kinetics, physicochemical properties, and antioxidant capacity of Aloe Vera (*Aloe Barbadensis* Miller) gel. *Journal of Food Engineering*, 91(2), 297–304.
- Mishra A., Sharma A., Jhalani A., Sharma MS., Bhandari A. (2011): Wheatgrass: A new era of dietary supplements. *International Journal of Phytopharmacy Research*, 2, 48–53.
- Mokrani A., Madani K. (2016): Effect of Solvent, Time and Temperature on the Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Peach (*Prunus Persica* L.) Fruit. *Sep. Purif. Technol.*, 162, 68–76, doi:10.1016/j.seppur.2016.01.043.
- Moller JKS., Madsen HL., Aaltonen T., Skibsted LH. (1999): Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants, *Food Chem.*, 64, 215–219.
- Montoro E., Lemus D., Echemendia M., et al. (2005): Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, *J Antimicrob Chemother*, 55, 500–5.

- Moongngarm A., and Saetung N. (2010): Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice. *Food Chem.*, 122(3), 782–788, doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.053.
- Morad MM., and Rubenthaler GL. (1983): Germination of soft white wheat and its effect on flour fractions, breadbaking, and crumb firmness. *Cereal Chemistry*, 60, 413–417.
- Morita N., Maeda T., Miyazaki M., Yamamori M., Miura H., Ohtsuka I. (2002): Dough and baking properties of high-amylose and waxy wheat flours. *Cereal Chemistry*, 79, 491–495.
- Mostafa AA., Abdulaziz A., Al-Askara AA., Almaarya KS., Dawouda TM., Sholkamya EN., Bakric MM. (2018): Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 361–366, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.02.004>
- Mpofu A., Sapirstein HD, Beta T. (2006): Genotype and environmental variation in phenolic content, phenolic acid composition, and antioxidant activity of hard spring wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1265–1270, doi: 10.1021/jf052683d.
- Murali M., Nair AS., Kumar NS. (2016): In vitro antimicrobial activities of wheat grass. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 5 (6), doi:10.7897/2277-4572.05641
- Murali M., Raj MA., Akhil SA., Liji RS., Kumar S Sruthy., Nair M Anju., Kumar S Neethu. (2016): Preliminary Phytochemical Analysis of Wheat Grass Leaf Extracts. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 40(1), 56, 307–312, ISSN 0976 – 044X.
- Musa AM., Ibrahim MA., Aliyu AB., Abdullahi MS., Tajuddeen N., Ibrahim H., & Oyewale AO. (2015): Chemical composition and antimicrobial activity of hexane leaf extract of *Anisopus mannii* (Asclepiadaceae). *Journal of intercultural ethnopharmacology*, 4(2), 129–133, <https://doi.org/10.5455/jice.20150106124652>.
- Nackz M., Shahidi F. (2004): Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 95–111.
- Nanditha B., Prabhasankar P. (2009): Antioxidants in Bakery Products: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(1), 1–27. URL: ISSN:1040-8398, <http://dx.doi.org/10.1080/10408390701764104>
- Ndolo VU., Beta T. (2014): Comparative studies on composition and distribution of phenolic acids in cereal grain botanical fractions. *Journal of Cereal Chemistry*, 91, 522–530.
- Negi PS. (2012): Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. *Int J Food Microbiol.*, 156(1), 7–17, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006
- Nelson K., Stojanovska L., Vasiljevic T., & Mathai M. (2013): Germinated grains: a superior whole grain functional food? *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 91(6), 429–441, doi:10.1139/cjpp-2012-0351
- Nguefack J., Leth V., Amvam Zollo PH., & Mathur SB. (2004): Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 329–334, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.017.
- Nicoli MC., Anese M., Parpinel M., Franceschi S., Lerici C.R. (1997): Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. *Cancer Lett.*, 114, 71–74.
- Ning J., Hou GG., Sun J., Wan X., and Dubat A. (2017): Effect of green tea powder on the quality attributes and antioxidant activity of whole- wheat flour pan bread. *LWT- Food Sci. Tech.*, 74, 342–348.
- Noor Aziah AA., Mohamad Noor AY., & Ho LH. (2012): Physicochemical and organoleptic properties of cookies incorporated with legume flour. *International Food Research Journal*, 19, 1539–1543.
- Nyireddy S. (2004): Separation strategies of plant constituents—current status, *Journal of Chromatography B*, 812, 35–51.

- Oh MM., Rajashekar CB. (2009): Antioxidant content of edible sprouts: effects of environmental shocks. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(13), 2221–2227. doi:10.1002/jsfa.3711.
- Ohm JB., Lee CW., Cho K. (2016): Germinated Wheat: Phytochemical Composition and Mixing Characteristics. *Cereal. Chem.*, 93(6), 612–617.
- Okafor JN., Ozumba AU., Solomon HM. (2002). Production and acceptability of chinchin fortified with oyster mushroom. *Nigeria Food Journal*, 18, 19–20.
- Okarter N., Liu C., Sorrells ME., Liu RH. (2010): Phytochemical content and antioxidant activity of six diverse varieties of whole wheat. *Food Chem.*, 199, 249–257.
- Okeagu NJ. (2001): Pp. 15 in Extraction and comparison of the two varieties of beniseed oil. (HND project) Department of Food Science and Technology, Federal Polytechnic Bauchi, Bauchi State, Nigeria.
- Okpala L., Okoli E., Udensi E. (2013): Physico-chemical and sensory properties of cookies made from blends of germinated pigeon pea, fermented sorghum, and cocoyam flours. *Food Science and Nutrition*, 1, 8–14.
- Okpala LC., Okoli EC. (2014): Development of cookies made with cocoyam, fermented sorghum and germinated pigeon pea flour blends using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 2671–2677.
- Olaoye OA., Onilude AA., Oladoye CO. (2007): Breadfruit flour in biscuit making. *African Journal. Food Sci.*, 20–23.
- Omeire GC., Ohambele FI. (2010): Production and evaluation of biscuits from composite wheat/defatted cashew nut flours. *Nigerian food journal*, 28 (2), 401– 406.
- Onyeneho SN., & Hettiarachchy NS. (1992): Antioxidant activity of durum wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9), 1496–1500
- Ordóñez A., Gómez J., Vattuone M., Lslá, M. (2006): Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chemistry*, 97(3), 452–458, doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.024
- Orphanides A., Goulas V., Gekas V. (2013): Effect of drying method on the phenolic content and antioxidant capacity of spearmint. *Czech J. Food Sci.*, 31, 509–513.
- Osborne TB. (1907): The proteins of wheat kernel. Washington DC: Carnegie Institute.
- Othman A., Ismail A., Ghani NA., Adenan I. (2007): Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Cocoa Beans. *Food Chem.*, 100, 1523–1530, doi:10.1016/j.foodchem.2005.12.021
- Ou S., Kwok KC. (2004): Ferulic acid: Pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1261–1269.
- Öztürk I., Sağdıç O., Hayta M., Yetim H. (2012): Alteration in alpha- tocopherol, some minerals, and fatty acid contents of wheat through sprouting: Chemistry of natural compounds, 47, 876-879, doi:10.1007/s10600-012-0092-9.
- Paczosa MK., Mecsas J. (2016): *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 80, 629 –661, doi:10.1128/MMBR.00078-15.
- Padalia S., Drabu S., Raheja I., Gupta A., Dhamija M. (2010): Multitude potential of wheatgrass juice (green blood): an overview. *Chron Young Sci.*, 1(2), 23–28.
- Pagand J., Heirbaut P., Pierre A., Pareyt B. (2017): The Magic and Challenges of Sprouted Grains. *Cereal foods world*, 62(5), 221–226.
- Pallavi K., Kumarswamy G. and Shruthi. (2011): Pharmacognostic investigation and antibacterial activity of *Triticum aestivum*. *Journal of Pharmacy Research*, 4, 3355–3359.
- Pallavi S., Shikha S., Bhawna S and Shikha S. (2016): Nutritional composition of wheat grass powder as affected by different drying process. *Int. J. of Adv. Res.*, 4, 902–905, ISSN 2320-5407. www.journalijar.com.

- Pan X., Niu G., Liu H. (2003): Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 42(2), 129–133, doi:10.1016/s0255-2701(02)00037-5.
- Panfili G., Fratianni A., Irano M. (2003): Normal phase high performance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *J Agric Food Chem.*, 51, 3940–3944.
- Parađiković N. (2009): Opće i specijalno povrćarstvo. Poljoprivredni fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera, Osijek.
- Parker R., and Ring SG. (2001): Aspects of the Physical Chemistry of Starch. *Journal of Cereal Science*, 34, 1–17.
- Pasha I., Nuzhat Huma N., Chughtai MFJ., Samra Jan S., Ahmad S., Manzoor MS and Ahmed F. (2018): Biochemical, Nutritional and End Use Perspectives of Wheat Grass as Potential Dietary Supplement. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 21(1), 1–13, ISSN: 2231-086X, doi: 10.9734/IJBCRR/2018/39539.
- Pasias IN., Kiriakou IK., Papakonstantinou L., Proestos C. (2018): Determination of Vitamin E in Cereal Products and Biscuits by GC-FID. *Foods*, 7(3), doi:10.3390/foods7010003.
- Pasqualone A., Delvecchio LN. Mangini G., Taranto F., Blanco A. (2014): Variability of total soluble phenolic compounds and antioxidant activity in a collection of tetraploid wheat. *Agricultural and food science*, 23, 307–316.
- Pavlić B. (2017): Valorizacija sporednog proizvoda žalfije (*Salvia officinalis* L.) u cilju dobijanja bioaktivnih jedinjenja savremenim tehnikama ekstrakcije - Doktorska Disertacija – Универзитет у Новом Саду. 173 стране.
- Pavlović D., Nikolić B, Pfaf-Dolovac E, Marisavljević D, Milićević Z, Đurović S (2010): Hlorofil Kao Indikator Reakcije Biljaka Na Herbicide. *Zaštita Bilja*. 61 (2), № 272, 67–86, Beograd, Pregledni Rad.
- Payal C., Kaur D., Sunaina G., ShahG., Chawla A., Dhawan R.K. (2015): Wheat grass: a review on pharmacognosy and pharmacological aspects. *International Journal of Phytopharmacology*, 6(2), 80-85, e- ISSN 0975 – 9328 Print ISSN 2229 – 7472.
- Peleg H., Naim M., Rouseff RL., Zehavi U. (1991): Distribution of bound and free phenolic acids in oranges (*Citrus sinensis*) and grapefruits (*Citrus paradisi*). *J Sci Food Agric.*, 57, 417–426, doi:10.1002/jsfa.2740570312.
- Pelegrini DD., Tsuzuki JK., Amado CAB., Cortez DAG. & Ferreira ICP. (2008): Biological activity and isolated compounds in *Sapindus saponaria* L. and other plants of the genus *Sapindus*. *Latin American Journal of Pharmacy* 27(6), 922–927.
- Pereira D., Correia PM., Guine RP. (2013): Analysis of the physical-chemical and sensorial properties of maria type cookies. *Acta Chim. Slovaca*, 6, 269–280.
- Pérez-Jiménez J, Arranz S, Taberner M, Díaz-Rubio ME, Serrano J, Goñi I, Saura-Calixto F. (2008): Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3), 274–285, doi:10.1016/j.foodres.2007.12.004.
- Pérez-Serradilla JA., Luque de Castro MD. (2011): Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract, *Food Chemistry*, 124(4), 1652–1659.
- Petronijević BŽ. (2000): Opšta i primenjena enzimologija. Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet, Leskovac.
- Pierozan MK., Pauletti GF., Rota L., Santos AC. A. dos, Lerin LA., di Luccio, M., Oliveira JV. (2009): Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *salvia* L. species. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(4), 764–770, doi:10.1590/s0101-20612009000400010.

- Pinto E., Almeida AA., Aguiar .A., Ferreira Implvo. (2015): Comparison between the mineral profile and nitrate content of microgreens and mature lettuces. *Journal of Food Composition and Analysis*, 37, 38–43, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.06.018>.
- Plaza L., de Ancos B., Cano PM. (2003): Nutritional and health-related compounds in sprouts and seeds of soybean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa*) treated by a new drying method. *Eur. Food Res. Technol.*, 216, 138–144, doi:10.1007/s00217-002-0640-9.
- Plum LM., Rink L., Haase H. (2010): The Essential Toxin: Impact of Zinc on Human Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(4), 1342–1365, doi:10.3390/ijerph7041342.
- Pokhrel N. (1999): Use of natural foods in preventing bone marrow depression in cancer patients who are Research report. Institute of Medicine, Tribhuvan University, Kathmandu.
- Prescott LM. (2002): Microbiology, 5th edition, The McGraw–Hill Companies, ISBN: 0-07-282905-2.
- Pryor WA. (1991): The antioxidant nutrients and disease prevention - what do we know and what do we need to find out? *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 391–393.
- Que F., Mao L., Fang X., Wu T. (2008): Comparison of hot air-drying and freeze-drying on the physicochemical properties and antioxidant activities of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) flours. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(7), 1195–1201, doi:10.1111/j.1365-2621.2007.01590.x
- Qureshi AA., Burger WC., Peterson DM., and Elson CE. (1986): The structure of an inhibitor of cholesterol biosynthesis isolated from barley. *J. Biol. Chem.*, 261, 10544.
- Radulović Z., Petrušić M. (2011): Mikrobiološke metode analize hrane. Poljoprivredni fakultet Beograd. 154 str.
- Raederstorff D., Elste V., Aebischer C., Weber P. (2002): Effect of either γ -tocotrienol or α -tocotrienol mixture on the plasma lipid profile in hamsters. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 46, 17–23.
- Rafiee Z., Jafari SM., Alami M., Khomeiri M. (2011): Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration, *Journal of Animal and Plant Science*, 21(4), 738–745.
- Ragaee S., Guzar I., Abdel-Aal ESM., Seetharaman K. (2012): Bioactive components and antioxidant capacity of Ontario hard and soft wheat varieties. In *Canadian Journal of Plant Science*, 92 (1), 19–30, doi:10.4141/cjps2011-100.
- Rahman R., Hiregoudar S., Veeranagouda M., Ramachandra CT., Nidoni U., Roopa RS., Kowalski RJ., Ganjyal GM. (2015): Effects of Wheat Grass Powder Incorporation on Physicochemical Properties of Muffins. *International Journal of Food Properties*, 18, 785–795, <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.908389>.
- Rajković J., Mirić M., Baras J. (1983): Analiza životnih namirnica, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Rajoria A., Mehta A., Mehta P., Ahirwal L. (2016): Quantitative Estimation of Chlorophyll and Carotene Content in *Triticum aestivum* Hexane Extract and Antimicrobial Effect against *Salmonella*, *FPI 1* (1), 8–14. ISSN Online: 2456-4192.
- Rajpurohit L., Mehta N., Ankola AV., Gadiyar A. (2015): Evaluation of the anti-microbial activity of various concentration of wheat grass (*Triticum aestivum*) extract against Gram-positive bacteria: An in vitro study. *J Dent Res Rev.*, 2, 70–2.
- Rana S., Kamboj J.K., Gandhi V. (2011): Living life the natural way–Wheatgrass and health. *Functional Foods in Health and Disease*, 11, 444–456.
- Ranhotra GS., Loewe RJ., Lehmann TA. (1977): Breadmaking quality and nutritive value of sprouted wheat. *Journal of Food Science*, 42, 1373–1375.

- Ravikumar P., Shalini G., Jeyam M. (2014): Phytochemical analysis and antioxidant activity of wheat grains and seedlings. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation (JPSI)*, 3(4), 319–323.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Evans CR. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231–1237, doi:10.1016/s0891-5849(98)00315-3.
- Réblová Z. (2012): Effect of temperature on the antioxidant activity of phenolic acids. *Czech Journal of Food Sciences*, 30, 171–177.
- Recommended dietary allowance, Year of estimate, 2009, Available in: <http://www.anyvitamins.com/rda.htm>.
- Reddy V., Urooj A., Kumar A. (2005): Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application in biscuits, *Food Chemistry*, 90, 317–321.
- Reis SF., Rai DK., Abu-Ghannam N. (2012): Apple pomace as a potential ingredient for the development of new functional foods, *International Conference on Food Safety, Quality and Nutrition (ICFSQN)*, Manchester, UK, 61–66, 11–13 April 2012.
- Reuter S., Gupta SC., Chaturvedi MM., Aggarwal BB. (2010): Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.*, 49(11),1603–1616, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
- Reyes FL., Cisneros-Zevallos L. (2003): Wounding stress increases the phenolic content and antioxidant capacity of purple-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 5296–5300.
- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. (1997): Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152–159, doi:10.1016/s1360-1385(97)01018-2
- Rimsten L., Stenberg T., Andersson R., Andersson A., Aman P. (2003): Determination of beta-glucan molecular weight using SEC with calcofluor detection in cereal extracts. *Cereal Chemistry*, 80(4), 485–490.
- Rios JL, Recio MC., Villar A. (1998): Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J Ethnopharmacol.*, 23(2-3),127–49, doi:10.1016/0378-8741(88)90001-3.
- Ripari V., Bai Y., Gänzle MG. (2019): Metabolism of phenolic acids in whole wheat and rye malt sourdoughs. *Food Microbiol.*, 77, 43–51, doi:10.1016/j.fm.2018.08.009.
- Rocha LD., Monteiro MC., Teodoro AJ. (2012): Anticancer properties of hydroxycinnamic acids – a review. *Cancer and Clinical Oncology*, 1, 109–121.
- Roday S. (2007): *Food science and nutrition*. Oxford University Press, New Delhi.
- Rodriguez NR., DiMarco NM., Langley S. (2009): Position of the American dietetic association, dietitians of Canada, and the American college of sports medicine: nutrition and athletic performance. *Journal of the American Dietetic Association*, 109(3), 509–527.
- Roselló-Soto E., Galanakis CM., Brnčić M., Orlien V., Trujillo F J., Mawson R., Knoerzer K., Tiwari BT., Barba FJ. (2015): Clean recovery of antioxidant compounds from plant foods, by-products and algae assisted by ultrasounds processing. *Modeling approaches to optimize processing conditions*. *Trends in Food Science & Technology*, 42(2), 134–149.
- Routray W., Orsat V. (2014): MAE of phenolic compounds from blueberry leaves and comparison with other extraction methods, *Industrial Crops and Products*, 58, 36–45.
- Ruibal-Mendieta NL., Delacroix DL., Mignolet E., Pycke JM., Marques C., Rozenberg, R., Petitjean G., Habib-Jiwan JL., Meurens M., Quetin-Leclercq J., Delzenne NM., 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. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2751–2759.
- Ruibal-Mendieta NL., Rozenberg R., Delacroix DL., Petitjean G., Dekeyser A., Baccelli, C., Marques C., Delzenne NM., Meurens M., Habib-jiwan JL., QuetinLeclercq J. (2004): Spelt

- (*Triticum spelta* L.) and winter wheat (*Triticum aestivum* L.) wholemeals have similar sterol profiles, as determined by quantitative liquid chromatography and mass spectrometry analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4802–4807.
- Ryan L., Thondre PS., Henry CJK. (2011): *J. Food Compost. Anal.*, 24, 929.
- Sakač M., Pestorić M., Mandić A., Mišan A., Nedeljković N., Jambrec D., Jovanov P., Lazić V., Pezo L. and Sedej I. (2016): Shelf-life prediction of gluten-free rice-buckwheat cookies. *J. Cereal Sci.*, 69, 336.
- Saman P., Vázquez JA., Pandiella SS. (2008): Controlled germination to enhance the functional properties of rice. *Process Biochemistry*, 43(12), 1377–1382.
- Samaras, TS, Camburn, PA, Chandra, SX, Gordon, MH, Ames, JM (2005): Antioxidant properties of kilned and roasted malts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 8068–8074.
- Samuolienė G., Urbonavičiūtė A., Brazaitytė A., Šabajevienė G., Sakalauskaitė J., Duchovskis P. (2011): The impact of LED illumination on antioxidant properties of sprouted seeds. *Cent. Eur. J. Boil.*, 6, 68–74, doi: 10.2478/s11535-010-0094-1.
- Sánchez-Maldonado AF., Schieber A., Gänzle MG. (2011): Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, 111, 1176–1184, doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05141.x.
- Sanchez-Moreno C., Larrauri JA., Saura-Calixto F. (1998): A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76 (2), 270–276.
- Sanchez-Moreno J., Larrauri JA., Saura-Calixto F. (1999): Free radical scavenging capacity of selected red, rose and white wines, *J. Agric. Food Chem.*, 79, 1301–1304.
- Santamaria AB. (2008): Manganese exposure, essentiality & toxicity. *Indian J Med Res.*, 128(4), 484–500.
- Saranraj P., and Geetha M. (2012): Microbial Spoilage of Bakery Products and Its Control by Preservatives. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3(1), 38–48.
- Sarker SD., Nahar L., & Kumarasamy Y. (2007): Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42(4), 321–324, doi:10.1016/j.ymeth.2007.01.006.
- Scheibmeir HD., Christensen K, Whitaker SH., Jegaethesan J, Clancy R., and Pierce JD. (2005): A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive and Critical Care Nursing*, 21(1), 24–28.
- Secchi N., Stara G., Anedda R., Campus M., Piga A., Roggio, T., Catzeddu P. (2011): Effectiveness of sweet ovine whey powder in increasing the shelf life of Amaretti cookies. *LWT Food Science and Technology*, 44, 1073–1078.
- Sedej I., Sakač M., Mandić A., Mišan A., Pestorić M., Šimurina O., Čanadanović-Brunet J. (2011): Quality assessment of gluten-free crackers based on buckwheat flour, *LWT - Food Science and Technology*, 44, 694–699.
- Selitrennikoff CP. (2001): Antifungal Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2883–2894, doi:10.1128/aem.67.7.2883–2894.200.
- Sevgi K., Tepe B., Sarikurkcü C. (2015): Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food Chem. Toxicol.*, 77, 12–21.
- Shah K., Sheth D., Tigar P., Desai T. (2011): Antiulcer activity of *Triticum aestivum* on ethanol induced mucosal damage (cytoprotective activity) in wistar rats. *Pharmacologyonline*, 2, 929–935.
- Shahidi F., Naczki M. (1995): *Food Phenolics: sources, Chemistry, Effects, Applications*. Technomic Publishing Company Inc., USA.

- Shahidi F., Yeo J., Shahidi F., Yeo J. (2018): Bioactivities of Phenolics by Focusing on Suppression of Chronic Diseases: A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 1573.
- Shar GQ., Kazi TG., and Sahito S. (2004): Estimation of essential trace and toxic elements in different wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties and their flour. *J. Chem. Soc. Pak.*, 26, 48–51.
- Sharma P., Gujral HD. (2010): Antioxidant and polyphenol oxidase activity of germinated barley and its milling fractions. *Food Chemistry*, 120, 673–678.
- Sharma P., Gujral HS. (2011): Effect of sand roasting and microwave cooking on antioxidant activity of barley. *Food Res Int.*, 44, 235–240, doi:10.1016/j.foodres.2010.10.030.
- Sharma P., Gujral HS. (2014): Cookie making behavior of wheat-barley flour blends and effects on antioxidant properties. *LWT Food Science and Technology*, 55, 301–307, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.08.019>.
- Sharma S., Dharmesh C., Saxena C., Riar S. (2016): Analyzing the Effect of Germination on Phenolics, Dietary Fibres, Minerals and Γ -Amino Butyric Acid Contents of Barnyard Millet (*Echinochloa frumentacea*). *Food Bioscience*, 13, 60–68.
- Shewry PR. (2009): Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60(6), 1537–1553, doi:10.1093/jxb/erp058.
- Shewry PR., Hey S. (2015): Do “ancient” wheat species differ from modern bread wheat in their contents of bioactive components? *Journal of Cereal Science* 65, 236–243, doi:10.1016/j.jcs.2015.07.014.
- Shurtleff W., Aoyagi A., Clive M., McCay CM., and McCay JB (2009): *History of Work with Soyfoods, the New York State Emergency Food Commission, Improved Bread, and Extension of Lifespan (1927-2009)*. Soyinfo Center, Lafayette, CA.
- Sikkema J., de Bont JA., Poolman B. (1994): Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem.*, 269(11), 8022–8028.
- Silhavy TJ., Kahne D., Walker S. (2010): The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2 (5):a000414. doi:10.1101/cshperspect.a000414.
- Silky MPG., & Tiwari A. (2014): Development of high protein biscuits using pigeon pea broken flour. *International Journal of Engineering and Innovative Technology*, 4, 84–89.
- Silva NCC., Fernandes Júnior A. (2010): Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16(3), 402–413. ISSN 1678-9199.
- Singh B., Sharma HK., Sarkar BC. (2012): Optimization of extraction of antioxidants from wheat bran (*Triticum* spp.) using response surface methodology. *Journal of food science and technology*, 49(3), 294–308, <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0276-5>
- Singh P. (2016): Evaluation of anti-oxidant properties of wheat grass powder as affected by different drying processes- *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research IJPSR*, 7(2), 852–855. E-ISSN: 0975–8232.
- Singh R., Singh G., Chauhan GS. (2000): Nutritional evaluation of soy fortified biscuits. *J. Food Sci. Technol.*, 37, 162–164
- Singh U., Devaraj S., Jialal I. (2005): Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annual Review of Nutrition*, 25(1), 151–174, doi:10.1146/annurev.nutr.24.012003.132446
- Singleton VL., Rossi JA. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Sitaram N., Nagaraj R. (1999): Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochim Biophys Acta*. 1462(1-2), 29–54, doi: 10.1016/s0005-2736(99)00199-6.
- Smith MM., Hartley RD. (1983): Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharides in graminaceous plants. *Carbohydrate Research*, 118, 65–80.

- Smuda SS., Mohsen SM., Olsen K., & Aly MH. (2018): Bioactive compounds and antioxidant activities of some cereal milling by-products. *Journal of Food Science and Technology*, 55(3), 1134–1142, doi:10.1007/s13197-017-3029-2.
- Socaci SA., Fărcaș AC., Diaconeasa ZM., Vodnar DC., Rusu B., Tofană M. (2018): Influence of the extraction solvent on phenolic content, antioxidant, antimicrobial and antimutagenic activities of brewers' spent grain. *Journal of Cereal Science*, 80, 180–187, doi:10.1016/j.jcs.2018.03.006.
- Somoza V. (2005): Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49(7), 663–72, <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500034>.
- Sompong R., Siebenhandel-Ehn S., Berghofer E., Schoenlechner R. (2011): Extrusion cooking properties of white and colored rice varieties. *Starch/Stärke*, 63, 55–63.
- Sperber WH. (2009): Introduction to the microbiological spoilage of foods and beverages. In: W. Sperber & M. Doyle (Eds.). *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages* (pp. 1–40). Griffin: Springer, http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1_1.
- Springett B. (2001): Effect of agronomic factors on grape quality for wine production. In: *Raw Ingredient Quality in Processed Foods*, Springett, M.B. (Ed.), Maryland: Aspen Publishers, pp. 125–146.
- Srinivasan M., Sudheer A.R., Menon V.P. (2007): Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 40, 92–100.
- Stagnari F., Galieni A., D'Egidio S., Falcinelli B., Pagnani G., Pace R., Pisante M., Benincasa P. (2017): Effects of sprouting and salt stress on polyphenol composition and antiradical activity of einkorn, emmer and durum wheat. *Ital. J. Agron.*, 12, 848, doi:10.4081/ija.2017.848.
- Starowicz M and Zieliński H. (2019): Changes in the antioxidant capacity and polyphenols content of rye-buckwheat cakes fortified with spices during their long-term storage *Ital. J. Food Sci.*, 31, 253 –263.
- StatSoft, Inc. (2014). STATISTICA верзија 12. Доступно на: www.statsoft.com
- Stefanello FS., dos Santos CO., Bochi VC., et al. (2018): Analysis of polyphenols in brewer's spent grain and its comparison with corn silage and cereal brans commonly used for animal nutrition. *Food Chem.*, 239, 385–401, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.06.130.
- Strain JJS., Cashman KD. (2009): Minerals and trace elements, In: Gibney MJ, Lanham-New SA, Cassidy A, Vorster H, editors. *Introduction in human nutrition*. 2nd ed. Wiley-Blackwell. pp. 188–237.
- Stratford M., Eklund, T. (2003): Organic acids and esters. In: Russell, N.J., Gould, G.W. (Eds.), *Food Preservatives*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, London, pp. 48–84.
- Stratil P., Klejdus B., Kuban V. (2007): Determination of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Fruits and Cereals. *Talanta*. 71, 1741–1751, doi:10.1016/j.talanta.2006.08.012.
- Suchowilska E., Wiwart M., Kandler W., Krska R. (2012): A comparison of macro- and microelement concentrations in the whole grain of four Triticum species, *Plant Soil Environ.*, 58 (3), 141–147.
- Suma PF., and Urooj A. (2014): Influence of germination on bioaccessible iron and calcium in pearl millet (*Pennisetum typhoideum*). *J. Food Sci. Technol.*, 51(5), 976-981, doi:10.1007/s13197-011-0585-8.
- Sun T., Ho CT. (2005): Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chem.*, 90, 743–749.
- Sun TY., Li JS., Chen C. (2014): Effects of blending wheatgrass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant activities of traditional kombucha beverage. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(4), 709–718, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2015.01.009>.

- Sundaresan A., Selvi A., and HK. Manonmani HK. (2015): The Anti-Microbial Properties of *Triticum aestivum* (Wheat Grass) Extract. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 4, 84-91. ISSN: 1927-3037/15.
- Sytar O., Boško P., Živčák M., Brestic M., Smetanska I. (2018). Bioactive Phytochemicals and Antioxidant Properties of the Grains and Sprouts of Colored Wheat Genotypes. *Molecules*, 23(9), 2282, doi:10.3390/molecules23092282.
- Škrbic B., Filipcev B. (2007): Element intakes through the consumption of different types of bread by Serbian population, *Acta Alimentaria*, 36(2), 217–229.
- Škrbić B., Cvejanov J. (2011): The enrichment of wheat cookies with high-oleic sunflower seed and hull-less barley flour: Impact on nutritional composition, content of heavy elements and physical properties, *Food Chemistry*, 124, 1416–1422.
- Šramková Z., Gregováb E., Šturdíka E. (2009): Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca*, 2(1), 115–138.
- Tabaraki R., Nateghi A. (2011): Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18 (6), 1279–1286.
- Taguri T., Tanaka T., Kouno I. (2006): Antibacterial Spectrum of Plant Polyphenols and Extracts Depending upon Hydroxyphenyl Structure. *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 2226–2235, doi: 10.1248/bpb.29.2226.
- Taiz L., Zeiger, E. (1998): *Stress Physiology*. U: *Plant Physiology* (Bressan, R.A., Lacy R.B., ured.), Sinauer Associates, Sunderland, p. 591–614.
- Takashima M., Horie M., Shichiri M., Hagihara Y., Yoshida Y., Niki E. (2012): Assessment of antioxidant capacity for scavenging free radicals in vitro: A rational basis and practical application, *Free Radical Biology and Medicine*, 52(7), 1242–1252, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.010>
- Tang J., Zou C., He Z., Shi R., Ortiz-Monasterio I., Qu Y., et al. (2008): Mineral element distributions in milling fractions of Chinese wheats. *J. Cereal Sci.*, 48, 821–828.
- Taranto F., Delvecchio LN., Mangini G., Del Faro L., Blanco A., & Pasqualone A. (2012): Molecular and physico-chemical evaluation of enzymatic browning of whole meal and dough in a collection of tetraploid wheats. *Journal of Cereal Science*, 55(3), 405-414.
- Tarasevičienė Ž., Viršilėb A., Danilčenko H., Duchovskisa P., Paulauskienė A. and Gajewskic M. (2019): Effects of germination time on the antioxidant properties of edible seeds. *Journal of food*. 17/1, 447–454, <https://doi.org/10.1080/19476337.2018.1553895>
- Tchatchouang CDK., Fri J., De Santi M., Brandi G., Fiorella Schiavano GF., Amagliani G., and Ateba C. (2019): Listeriosis Outbreak in South Africa: A Comparative Analysis with Previously Reported Cases Worldwide. *Microorganisms*, 8, 135, doi:10.3390/microorganisms8010135.
- Teklić T., Lončarić Z., Kovačević V., Singh B. R. (2013): Metallic trace elements in cereal grain - a review: how much metal do we eat? *Food and Energy Security*, 2(2), 81–95, doi:10.1002/fes3.24.
- Theriault A., Chao JT., Wang Q., Gapor A., Adeli K. (1999): Tocotrienol: a review of its therapeutic potential. *Clin Biochem.*, 32, 309–319.
- Tiwari U., and Cummins E. (2009): Nutritional importance and effect of processing on tools in cereals. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 511–520.
- Tizazu S., Urga K., Belay A., Abuye C., and Retta N. (2011): Effect of germination on mineral bioavailability of sorghum-based complementary foods. *Afr. J. Food Agric. Nutr. Dev.*, 11, 5083–5095.
- Toth N., Fabek S., Benko B., Žutić I., Radman S., Zehner S. (2012): Učinak abiotskih čimbenika, gustoće sjetve i višekratne berbe na prinos rige u plutajućem hidroponu. *Glasnik zaštite bilja*, 35(5), 24–34.

- Treadwell DD., Hochmuth R., Landrum L., Laughlin W. (2010): Microgreens: A new specialty crop. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. <<http://edis.ifas.ufl.edu>>.
- Tsou MF., Hung CF., Lu HF., Wu LT., Chang SH., Chang HL., Chen GW., Chung JG. (2000): Effects of caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid on growth and arylamine N-acetyltransferase activity in *Shigella sonnei* (group D): *Microbios*, 101, 37–46.
- Turkoglu A., Duru ME., Mercan N., Kivrak I., Gezer K. (2007): Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus Sulphurens* (Bull.) Murrill, *Food Chem.*, 101, 267–273.
- Tydeman EA, Parker ML, Faulks RM, Cross KL, Fillery-Travis A, Gidley MJ, Rich GT, Waldron KW. (2010): Effect of carrot (*Daucus carota*) microstructure on carotene bioaccessibility in the upper gastrointestinal tract. 2. In vivo digestions. *J Agric Food Chem.* 8; 58(17), 9855–60, doi: 10.1021/jf1010353. PMID: 20806973.
- Vaher M., Matso K., Levandi T., Helmja K., Kaljurand M. (2010): Phenolic compounds and the antioxidant activity of the bran, flour and whole grain of different wheat varieties. *Procedia Chemistry*, 2(1), 76–82, doi:10.1016/j.proche.2009.12.013.
- Vale P., Cidade H., Pinto M. Oliveira MB. (2014): Effect of sprouting and light cycle on antioxidant activity of *Brassica oleracea* varieties. *Food Chemistry*, 165, 379–387.
- Van Hung P., Hatcher DW., and Barker W. (2011): Phenolic acid composition of sprouted wheats by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and their antioxidant activities. *Food Chem.*, 126:1896.
- Vega-Gálvez A., Di Scala K., Rodríguez K., Lemus-Mondaca R., Miranda M., López J., Perez-Won M. (2009): Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, antioxidant capacity, colour and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annuum*, L. var. Hungarian). *Food Chemistry*, 117(4), 647–653, doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.066
- Vesković MS, Đukić DA. (2017): Sanitarna mikrobiologija, Agronomski fakultet u Čačku, Čačak, 473s.
- Vesković MS., Đukić DA. (2015): Bioprotektori u proizvodnji hrane, Agronomski fakultet u Čačku, Čačak, 378 s.
- Vinatoru M. (2001): An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrason. Sonochem.* 8, 303–313.
- Vinatoru M., Toma M., Radu O., Filip PI., Lazurca D., & Mason TJ. (1997): The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4 (2), 135–139.
- Vinson JA., Su X., Zubik L., Bose P. (2001): Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J Agric Food Chem.*, 49(11), 5315–21, doi:10.1021/jf0009293.
- Wakeham Patrick (2013): The medicinal and pharmacological screening of wheatgrass juice (*Triticum aestivum* L.): an investigation into chlorophyll content and antimicrobial activity *The Plymouth Student Scientist*, 6(2), 20–30.
- Wang L., Weller CL. (2006): Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17 (6), 300–312.
- Wang L., Yao Y., He Z., Wang D., Liu A., Zhang Y. (2013): Determination of phenolic acid concentrations in wheat flours produced at different extraction rates. *Journal of Cereal Science*, 57, 67–72.
- Wangcharoen W., Phimphilai S. (2016): Chlorophyll and total phenolic contents, antioxidant activities and consumer acceptance test of processed grass drinks. *J Food Sci Technol.*, 53, 4135–4140, <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2380-z>.
- Wangensteen H., Samuelsen AB., Maltrud KE. (2004): Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food Chem.*, 88, 293–297.

- Wani SH., Gull A., Allaie F., Safapuri TA. (2015): Effects of incorporation of whey protein concentrate on physicochemical, texture, and microbial evaluation of developed cookies. *Cogent Food & Agriculture*, 1, 1092406.
- Watanabe K., Kawanishi-Asaoka M., Myojin C., Awata S., Ofusa K., Kodama K. (2014): Amino acid composition, oxidative stability, and consumer acceptance of cookies made with quinoa flour. *Food Sci. Technol. Res.*, 20, 687–691.
- Weidner S., Amarowicz R., Karamać M., Dąbrowski G. (1999): Phenolic acids in caryopses of two cultivars of wheat, rye and triticale that display different resistance to pre-harvest sprouting. *European Food Research and Technology*, 210, 109–113.
- Welch RM. (2003): Pp. 1–24 in *Farming for nutritious foods: agricultural technologies for improved human health*. IFA-FAO Agriculture Conference “Global food security and the role of sustainable fertilization”, 26–28 March Rome, Italy.
- Wennermark B., and Jagerstad M. (1992): Breadmaking and storage of various wheat fractions affect vitamin E. *Journal of Food Science* 57, 1205–1209, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb11300.x>
- Wigmore A. (1985): *The wheatgrass book*. Avery Publishing, New Jersey (12), 4135–4140, doi:10.1007/s13197-016-2380-z.
- Willows RD. (2004): *Chlorophylls. U: Plant Pigments and their Manipulation* (Davies, K. ured.), Blackwell Publishing, Oxford, str. 23–56.
- World Health Organization report – WHO-2018: *Prevention and Control of Noncommunicable Diseases in the European Region: A Progress Report*. Available online: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/ncd-backgroundinformation/prevention-and-control-of-noncommunicable-diseases-in-the-european-region-a-progressreport> (accessed on 10 September 2018).
- Xiang N., Guo X., Liu F., Li Q., Hu J., Brennan CS. (2017): Effect of Light- and Dark-Germination on the Phenolic Biosynthesis, Phytochemical Profiles, and Antioxidant Activities in Sweet Corn (*Zea mays* L.) Sprouts. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1246, <https://doi.org/10.3390/ijms18061246>.
- Xiao Z., Lester GE., Luo Y., Wang Q. (2012): Assessment of vitamin and carotenoid concentrations of emerging food products: Edible microgreens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7644–7651, doi:10.1021/jf300459b.
- Xu B., Chang SKC. (2008): Total phenolics, phenolic acids, isoflavones, and anthocyanins and antioxidant properties of yellow and black soya beans as affected by thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7165–7175, <https://doi.org/10.1021/jf8012234>.
- Xu FY., Gao QH., Ma YJ., Guo XD., Wang M. (2014): Comparison of Tartary Buckwheat Flour and Sprouts Steamed Bread in Quality and Antioxidant Property. *Journal of Food Quality*, 37(5), 318–328. <https://doi.org/10.1111/jfq.12101>.
- Xu M., Rao J., Chen B. (2019): Phenolic Compounds in Germinated Cereal and Pulse Seeds: Classification, Transformation, and Metabolic Process. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1–20, doi:10.1080/10408398.2018.1550051.
- Xu Y., Liang Y., Yang M. (2019): Effects of Composite LED Light on Root Growth and Antioxidant Capacity of *Cunninghamia lanceolata* Tissue Culture Seedlings. *Scientific Reports*, 9(1), 9766, doi:10.1038/s41598-019-46139-2.
- Yang D., Wang Q., Ke L., Jiang J. and Ying T. (2007): Antioxidant activities of various extracts of lotus (*Nelumbo nuficera* Gaertn) rhizome. *Asia Pac J Clin Nutr.*, 16 (Suppl 1), 158–163.
- Yang F., Basu TK., Ooraikul B. (2001): Studies on germination conditions and antioxidant contents of wheat grain. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52, 319–330.

- Yang L., Jiang J., Li W., Chen J., Wang D., Zhu L. (2009): Optimum extraction process of polyphenols from the bark of *Phyllanthus emblica* L. based on the response surface methodology. *J Sep Sci.*, 32, 1437–1444, doi: 10.1002/jssc.200800744.
- Yaqoob S., Baba WN., Masoodi F. A., Shafi M., Bazaz R. (2018): Effect of sprouting on cake quality from wheat–barley flour blends. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(2), 1253–1265, doi:10.1007/s11694-018-9739-y.
- Yashin A., Yashin Y., Xia X. and Nemzer B. (2017): Antioxidant activity of spices and their impact on human health: areview. *Antioxidants (Basel)*. 6(3), 70. doi:10.3390/antiox6030070.
- Yu L., and Beta T. (2015): Identification and antioxidant properties of phenolic compounds during production of bread from purple wheat grains. *Molecules*, 20(9),15525–15549.
- Yu L., Haley S., Perret J., Harris M. (2002): Antioxidant properties of hard wheat extracts. *Food Chem.*,78, 457–461.
- Yu L., Haley S., Perret J., Harris M. (2004): Comparison of wheat flours grown at different locations for their antioxidant properties. *Food Chem.*, 86, 11–16.
- Yu L., Haley S., Perret J., Harris M., Wilson J., Qian M. (2002): Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1619–1624.
- Yuan N, Yuan S, Li Z, Zhou M, Wu P, Hu Q, Mendu V, Wang L, Luo H. (2018): Stress induced factor 2, a Leucine-Rich Repeat Kinase Regulates Basal Plant Pathogen Defense. *Plant Physiol.*, 176(4), 3062-3080, doi: 10.1104/pp.17.01266.
- Zendehbad SH., Mehran M J., Malla S. (2014): Flavonoids and phenolic content in wheat grass plant (*Triticum aestivum*). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 7(4), 184–187.
- Zengin FK., and Munzuroglu O. (2005): Effects of Some Heavy Metals on Content of Chlorophyll, Proline and Some Antioxidant Chemicals in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seedlings. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47, 157–164.
- Zhang J., Ding Y., Dong H., Hou H., and Zhang X. (2018): Distribution of Phenolic Acids and Antioxidant Activities of Different Bran Fractions from Three Pigmented Wheat Varieties *Journal of Chemistry*. Article ID 6459243, 9 pages, <https://doi.org/10.1155/2018/6459243>.
- Zhao FJ., Zhaoa FJ., Sua YH., Dunhama SJ., Rakszegib M., Bedob Z., et al. (2009): Variation in mineral micronutrient concentrations in grain of wheat lines of diverse origin. *J. Cereal Sci.*, 49, 290–295, 10.1016/J.JCS.2008.11.007.
- Zhao H., Dong J., Lu J., Chen J., Li Y., Shan L., Lin Y., Fan W., Gu G. (2006): Effects of Extraction Solvent Mixtures on Antioxidant Activity Evaluation and Their Extraction Capacity and Selectivity for Free Phenolic Compounds in Barley (*Hordeum Vulgare* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7277–7286, doi:10.1021/jf061087w.
- Zhao Z., Moghadasian MH. (2008): Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review. *Food Chemistry*, 109, 691–702.
- Zheng W., Shiow Y. (2001): Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5165–5170.
- Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. (1999): The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559, doi:10.1016/s0308-8146(98)00102-2
- Zhou K., and Yu L. (2004): Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation,” *LWT - Food Science and Technology*, 37(7), 717–721, doi:10.1016/j.lwt.2004.02.008.
- Zhou S., Yu L. (2004): Phytochemicals and antioxidant properties in wheat bran. *J Agric Food Chem.*, 52, 6108–6114.
- Zhou XL., Cheng SN., Yang YL., Zhou Y., Tang W., Zhang XJ., Wang Q., LI ZJ. (2011): Toward a novel understanding of buckwheat self-defensive strategies during seed

- germination and preliminary investigation on the potential pharmacological application of its malting production. *J. Med.Plants Res.*, 5, 6946–6954.
- Zhu KX., Huang S., Peng W., Qian, HF. Zhou HM. (2010): Effect of ultrafine grinding on hydration and antioxidant properties of wheat bran dietary fiber. *Food Res. Int.*, 43, 943–948.
- Zielinski H., Ciska E., Kozłowska H. (2001): The cereal grains: focus in vitamin E. *Czech J. Food. Sci.*, 19(5), 182–188.
- Zieliński H., del Castillo MD., Przygodzka M., Ciesarová Z., Kukurová K. and Zielińska D. (2012): Changes in chemical composition and antioxidative properties of rye ginger cakes during their shelf-life. *Food Chem.*, 135(4), 2965–73. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.009.
- Zielinski H., Troszynska, A. (2000). Antioxidant capacity of raw and hydrothermal processed cereal grains. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 9(50), 79–83.
- Zielinski H., Kozłowska H. (2000): Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *JAgric Food Chem.*, 48, 2008–2016.
- Žilić S., Basić Z., Hadži-Tašković Šukalović V., Maksimović V., Janković M., Filipović, M. (2014): Can the sprouting process applied to wheat improve the contents of vitamins and phenolic compounds and antioxidant capacity of the flour? *International Journal of Food Science & Technology*, 49(4), 1040–1047, doi:10.1111/ijfs.12397 ts.
- Žilić S., Tašković - Šukalović VH., Dodig D., Maksimović V., Kandić V. (2013): Soluble free phenolic contents and antioxidant capacity of bread and durum wheat genotypes. *Genetika*, 45(1), 87–100, doi:10.2298/GENSR1301087Z, UDC 575:633.11.

ВЕСНА М. ЂУРОВИЋ, БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ

Весна М. Ђуровић је рођена 06.05.1985. године у Ужицу. Основну школу и Гимназију завршила је у Ивањици. Основне академске студије уписала је школске 2004/2005. године на Пољопривредном факултету у Београду, на Одсеку за прехранбену технологију, група Технологија биљних производа и исте завршила 2009. године, са просечном оценом 9,08. Докторске академске студије на Агрономском факултету у Чачку, уписала је школске 2014/2015. године. Положила је све испите са оствареном просечном оценом 9,67.

У периоду од 01.06.2011–30.11.2012. године радила је на пројекту „Ариљска малина“ у Иновационом центру за пољопривреду у Ариљу као QMS менаџер.

Од 1. априла 2015. године засновала је радни однос на одређено време на Агрономском факултету у Чачку, на радном месту сарадник на пројекту под називом „Изучавање генетичке основе побољшања приноса и квалитета стрних жита у различитим еколошким условима - ТР 31092“ код Министарства просвете, науке и технолошког развоја РС. У звање истраживач сарадник на Агрономском факултету у Чачку изабрана је 11.02.2021. године. У оквиру програма MUSA (Mobilità Universitaria Sport e Alimentazione) и MOBIS (Mobilità Incoming Studio) Весна Ђуровић је била стипендиста Апулија Региона (Transnational Mobility Actions of the Universities in the Apulia Region) и као ERASMUS+ студент боравила је у Фођи (Universita degli Studi di Foggia - Dipartimento di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente, Foggia - Department of the Agricultural, Food and Environmental Sciences, Laboratory of Industrial Microbiology, University of Foggia) у летњем семестру 2017/18. академске године.

До сада је, у сарадњи са другим истраживачима, публиковала по један рад из категорије M22, M23 и M24, 10 радова категорије M33, 7 радова категорије M34, један рад категорије M52 и 13 радова категорије M63.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Весна М. Ђуровић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Антибактеријска и фитохемијска својства пшеничних клијанаца и њихов утицај на квалитет кекса

која је одбрањена на Агрономском факултету у Чачку Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Чачку, 2.3.2021. године,

Весна Ђуровић
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Весна М. Ђуровић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Антибактеријска и фитохемијска својства пшеничних клијанаца и њихов
утицај на квалитет кекса

која је одбрањена на Агрономском факултету у Чачку

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Чачку _____, 2.3.2021. године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>