

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Милан З. Стојановић

**ОБРАДА ФЕРМЕНТИСАНЕ ПОКОЖИЦЕ  
ГРОЖЂА КАО СПОРЕДНОГ ПРОИЗВОДА У  
ПРОИЗВОДЊИ ВИНА У ЦИЉУ ДОБИЈАЊА  
ПОТЕНЦИЈАЛНИХ ФУНКЦИОНАЛНИХ  
ДОДАТАКА ЗА ПРЕХРАМБЕНУ  
ИНДУСТРИЈУ**

докторска дисертација

Београд, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF AGRICULTURE

Milan Z. Stojanović

**PROCESSING OF FERMENTED GRAPE SKINS  
AS A BY-PRODUCT FROM WINE  
PRODUCTION IN ORDER TO OBTAIN  
POTENTIAL FUNCTIONAL ADDITIVES FOR  
THE FOOD INDUSTRY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

**Ментор:**

**Др Малиша Антић, редовни професор**  
Универзитет у Београду  
Пољопривредни факултет

**Чланови комисије:**

**Др Зора Дајић-Стевановић, редовни професор**  
Универзитет у Београду  
Пољопривредни факултет

**Др Весна Антић, редовни професор**  
Универзитет у Београду  
Пољопривредни факултет

**Др Саша Матијашевић, ванредни професор**  
Универзитет у Београду  
Пољопривредни факултет

**Др Станислава Горјановић, научни саветник**  
Универзитет у Београду  
Институт за општу и физичку хемију

**Датум одбране:**

## Изјаве захвалности

Ово истраживање било је препознато и подржано од стране Европске комисије у оквиру „Erasmus Mundus SIGMA Agile” програма стипендирања који промовише развој науке и институционалну сарадњу између земаља Европске уније и земаља Западног Балкана. Захваљујем се Ерасмус тиму за додељену стипендију за 10 месеци истраживачког рада на Универзитету у Милану.

This research was recognized and supported by the European Commission within the framework of the “Erasmus Mundus SIGMA Agile” scholarship programme that aims at promoting development of science and institutional cooperation between the EU and the Western Balkans. I thank the Erasmus team for the scholarship awarded for 10 months of research at the University of Milan.

Највећу захвалност на искреној и несебичној помоћи при изради ове докторске дисертације дугујем професорки Вери Лавели са Универзитета у Милану у чијој је истраживачкој групи је и спроведен највећи део овог истраживања.

I am most grateful for the honest and selfless help in the preparation of this doctoral dissertation to Professor Vera Lavelli from the Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences, University of Milan, in whose research group carried out the largest part of this research.

Огромну захвалност дугујем јавној агенцији „Шведски институт” Краљевине Шведске за додељену стипендију и шестомесечни развој мојих истраживачких способности и вештина на Универзитету у Гетебургу, а у оквиру програма „Swedish Institute Scholarships for the Western Balkans”.

I owe a great gratitude to the Swedish governmental agency “Swedish Institute” for the awarded scholarship and six months development of my research skills and competences at the University of Gothenburg within the framework of the “Swedish Institute Scholarships for the Western Balkans”.

Искрено се захваљујем редовном професору Универзитета у Гетебургу, Хенрику Аронсону, на изградњи моје самосталности у истраживачком раду, повећању капацитета у раду у науци и препуштању одговорности надгледања два међународна студента. Нажалост, истраживања спроведена на Универзитету у Гетебургу нису директно предмет ове докторске дисертације али су свакако утицала на моју оспособљеност да је напишем.

My sincere thanks to the Professor at the University of Gothenburg and Head of Department of Biological and Environmental Sciences, Henrik Aronsson, for building my independence in research work, increasing the capacity of dealing in science and giving the responsibility of supervising his two international students. Unfortunately, the research conducted at the University of Gothenburg is not directly the subject of this doctoral dissertation, but certainly this mobility influenced my ability to write it.

Захваљујем се Заједници за знање и иновације из области климатских промена, Европског института за иновације и технологију за додељену стипендију за двомесечни боравак у компанији „Centre for Food Education and Research” у Португалији која се бави иновацијама у прехранбеној технологији са циљем смањења утицаја прехранбене индустрије на глобално загревање.

I would like to thank the European Institute of Innovation and Technology, Knowledge and Innovation Community (EIT Climate-KIC) for a two-month paid internship in a private company in Portugal (Centre for Food Education and Research - CFER) which deals with reducing impact of the food industry on global warming by introducing innovative sustainable food solutions.

Још једном желим да се захвалим Европском институту за иновације и технологију за додељену стипендију за таленте регионалне иновационе шеме у оквиру које сам провео 6

месеци на Институту за агрохемију и прехранбену технологију Шпанског већа за научна истраживања у Валенсији.

One more time I would like to thank the European Institute of Innovation and Technology for the awarded scholarship for talents of the regional innovation scheme (EIT Food RIS Talents 2020 fellowship) within which I spent 6 months at the Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA), Spanish Council for Scientific Research (CSIC), Valencia, Spain.

Испред Института за агрохемију и прехранбену технологију Шпанског већа за научна истраживања у Валенсији захвалност дугујем професору доктору Хозе Марији Лагарону Кабелу као и шефици његове истраживачке групе др Кристини Прието Лопез на подршци и дозволи да мимо предвиђених истраживања одрадим и допунска истраживања везана за ову докторску дисертацију.

On behalf of the Institute of Agrochemistry and Food Technology of the Spanish Council for Scientific Research in Valencia, I owe gratitude to Professor Dr. José María Lagarón Cabello, head of the novel materials and nanotechnology laboratory and the coordinator of his research group, Cristina Prieto López, PhD, for their support and permission to do additional research related to this doctoral dissertation.

Посебну захвалност дугујем докторанткињи Јулијани Васкез Гонзалес са Националног технолошког факултета Тепик, из Мексика (Tecnológico Nacional de México - Instituto Tecnológico de Tepic) на њеној несебичној помоћи да ме оспособи да у што краћем року почнем свој рад на апаратури коју до тада нисам користио и буде ми највећа подршка током мог боравка у Шпанији.

I owe a special thanks to the doctoral student Yuliana Vázquez González (Food Research Laboratory, National Technological Institute of Mexico - Technological Institute of Tepic, Nayarit, Mexico) for her selfless help to enable me to start my work on the equipment that I have never used before as soon as possible and for being my biggest support during my research stay in Spain.

Захваљујем се др Владану Угреновићу, некадашњем директору Пољопривредне стручне службе „Институт Тамиш” Панчево, који је својим саветима, у периоду док сам радио у ПСС Панчево, допринео изради ове докторске дисертације.

Посебну захвалност дугујем проф. др Зори Дајић Стевановић на преузимању велике одговорности вођења мог научног и личног развоја у најтежим, и могу слободно рећим критичним, моментима током докторских студија.

Посебно се захваљујем свом ментору, проф. др Малиши Антићу на професионалном и крајње посвећеном менторству, креирању програма истраживања и потпуно несебичној подршци током докторских студија. Његови конкретни потези и подршка су били кључни у имплементацији истраживања и реализацији ове докторске дисертације.

Захваљујем се и проф. др Миомиру Никшићу у чијем сам истраживачком тиму, на катедри за микробиологију, стекао прва сазнања о истраживачком раду и бављењу науком.

Велику захвалност дугујем и др Милету Вељовићу који је несебично помогао да се мој дипломски рад уз одређена додатна истраживања претвори у мој први научни рад.

Такође, захвалност дугујем и др Ђури Накаради и проф. др Милошу Мојовићу са Факултета за физичку хемију, Универзитета у Београду за уступање лабораторије и апаратуре за додатна истраживања која су постала део ове дисертације.

Најискреније се захваљујем великим пријатељима, научним истраживачима, широм света који су на посредан или непосредан начин суделовали у изради ове докторске дисертације, а ту бих пре свега издвојио: др Алина Храмова (Русија), Паола Маријани (Италија), др Хуан Мартин Д'Амброзио (Аргентина), др Јохана Летин (Шведска), Естери Витанен (Финска),

Борис Кануников (Немачка), Даниел Абегао (Португалија), др Зоран Евтоски (Италија), Стефан Колашинац (Србија) и Суданшу Пурвар (Индија).

I sincerely thank my great friends, scientific researchers, all over the world, who, directly or indirectly, supported preparation of this doctoral dissertation, and here I would first of all highlight: Alina Khramova PhD (Russia), Paola Mariani (Italy), Juan Martín D'Ambrosio PhD (Argentina), Johanna Lethin PhD (Sweden), Esteri Viitanen (Finland), Boris Kanunnikov (Germany), Daniel Abegão (Portugal), Zoran Evtoski PhD (Italy), Stefan Kolašinac (Serbia) and Sudhanshu Purwar (India).

Највећу захвалност за стрпљење и разумевање заслужују моја породица и пријатељи који су све ове године имали вере у мене и у оно што радим и били ми највећа подршка кроз овај леп али и веома интензиван и захтеван период живота. Весна Стојановић, Зоран Стојановић, Милош Стојановић, Димитрије Митковски, Милош Вуковић, Сретен Комленовић, Милош Антић и Александра Васиљевић – хвала вам!

# Обрада ферментисане покожице грозђа као споредног производа у производњи вина у циљу добијања потенцијалних функционалних додатака за прехранбену индустрију

## Сажетак

Предмет овог истраживања представљао је развијање микронизованих додатака за прехранбену индустрију из ферментисаних покожица грозђа (ПГ) италијанске сорте Барбера која заостаје као споредни производ у индустријској производњи црвених вина. Произведени додаци би се враћали у погон са циљем да обогате нутритивни профил нових прехранбених производа и суплемената сиромашних у садржају антиоксиданата и биљних влакана.

Пре свега циљ овог истраживања био је развијање технологије производње полутечних функционалних додатака, који нису претходно истражени у литератури, а који би представљали алтернативу прашкастим додацима који захтевају високе утрошке енергије при процесу сушења. Допаци добијени у форми полутечних дисперзија, са садржајем суве материје ПГ од 2 и 10%, добијени су тако што је ПГ подвргнута процесу бланширања, хомогенизације и пастеризације, док су додаци у форми праха добијени сушењем ПГ у струји ваздуха и млевењем.

Ефекти сваког процесног корака током обраде ПГ анализирани су поређењем са лиофилизованим ПГ које су коришћене као референтни узорак за обрачунавање степена очуваности садржаја антиоксиданата и редукујућег потенцијала. Као крајњи резултат предложена је шема оптималних услова добијања финалних додатка.

Производња додатака у форми полутечних дисперзија која је имала за циљ да омогући смањење времена обраде и утрошка електричне енергије у односу на прашкасти додаток, довела је до очувања праћених параметара  $> 60\%$ , док је код сушења у струји ваздуха очувано  $> 70\%$  укупног потенцијала. Полутечни и прашкасти додаци показали су различиту способност везивања воде и различито седиментационо понашање. На основу резултата закључено је да оба додатка представљају богат извор биљних влакана и антиоксидативног потенцијала, довољан да обогати велики број прехранбених производа на тржишту, а сам одабир форме додатка зависио би од специфичности технологије производње и организације логистике фабрике. Иста методологија се може користити и за друге сорте винове лозе, а прилагођена и за друге споредне производе настале индустријском прерадом воћа и поврћа.

Као допуна овом истраживању одређен је антиоксидативни потенцијал ферментисаних покожица три широко заступљене сорте винове лозе у индустријској производњи црвених вина у Србији: Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc и Прокупац. Коришћена је метода електронске парамагнетне резонантне спектроскопије, која је овде први пут примењена у анализи српске аутохтоне сорте Прокупац. Управо је Прокупац и показао највећу антирадикалску активност те је заједно са ферментисаним ПГ италијанске сорте Sangiovese коришћен у испитивањима инкапсулације екстракта ПГ кроз матрицу протеина кукуруза, зеина, методом електрораспршивања. Екстракти ПГ као и добијене нанокапсуле су детаљно окарактерисане, а на основу резултата је закључено да инкапсулисани екстракти ПГ, као функционални додаци, имају огроман потенцијал како у прехранбеној, тако и у фармацеутској и козметичкој индустрији.

**Кључне речи:** споредни производи, покожице грожђа, фенолна једињења, антиоксидативни потенцијал, бланширање, пастеризација, функционални додаци, полутечни додаци, инкапсулација, електрораспршивање

**Научна област:** Биотехничке науке

**Ужа научна област:** Хемија

**UDK:** 663.26:664-404(043.3)

# Processing of Fermented Grape Skins as a By-product from Wine Production in Order to Obtain Potential Functional Additives for Food Industry

## Abstract

The subject of this doctoral thesis was to develop micronized food additives from fermented grape skins (GS) of Italian variety Barbera, recovered from winemaking by-products. Obtained food additives would return back into the food industry with the aim of enriching the nutritional profile of new food products and food supplements poor in antioxidants and plant fiber.

First of all, the aim of the research was to develop the technology of production of semi-liquid functional food additives, which have not been previously reported in the literature, and which would represent an alternative to powder food additives that require high energy consumption during the drying process. Additives obtained in the form of semi-liquid dispersions, with a dry weight content of GS of 2 and 10%, were obtained by subjecting GS to the process of blanching, homogenization and pasteurization, while powdered food additives were obtained by air drying and grinding.

The effects of each processing step were analyzed by comparison with lyophilized GS which were used as a reference sample to calculate the degree of recovery of antioxidant content and reducing potential during processing of starting material. As a final result, a scheme of optimal processing conditions of obtaining final food additives was proposed.

The production of the additives in the form of semi-liquid dispersions, which aimed to reduce processing time and energy consumption compared to the powdered additive, led to the recovery of monitored parameters > 60%, while drying in air flow recovered > 70% of the potential. Semi-liquid and powdered additives showed different water-binding capacity and different sedimentation behavior. Based on the results, it was concluded that both additives represent a rich source of plant fibers and antioxidant potential, sufficient to enrich a large number of food products on the market, and the choice of the additive form would depend on the specifics of production technology and logistics of industry. The same methodology can be used for other grape varieties, and adapted for other by-products generated by industrial processing of fruits and vegetables.

In addition to this research, the antioxidant potential of fermented skins of three widely used grape varieties in the industrial production of red wines in Serbia (Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc and Prokupac) was determined. The method of electron paramagnetic resonance spectroscopy was used, which was applied here for the first time in the analysis of the Serbian autochthonous variety Prokupac. It was Prokupac who showed the greatest antiradical activity and, together with fermented GS of the Italian variety Sangiovese, was used in tests of encapsulation of GS extracts through the matrix of corn protein, zein, by electrospraying method. GS extracts as well as the obtained nanocapsules were characterized, and based on the results, it is concluded that encapsulated GS extracts, as functional additives, have a huge potential in the food, pharmaceutical and cosmetic industries.

**Key words:** by-products, grape skins, phenolic compounds, antioxidant potential, blanching, pasteurization, functional additives, semiliquid additives, encapsulation, electrospraying

**Scientific field:** Biotechnology

**Scientific subfield:** Chemistry

**UDK:** 663.26:664-404(043.3)

# САДРЖАЈ

	Стр.
1. УВОД:.....	1
2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО.....	4
2.1 Споредни производи прехранбене индустрије .....	4
2.1.1 Споредни производи винске индустрије .....	8
2.1.2 Сорте грожђа коришћене у овом овом истраживању.....	10
2.2 Функционална једињења споредних производа винске индустрије.....	12
2.3 Активност ензима полифенол оксидаза (РРО) и пероксидаза (РОД) у покожицама и грожђу ...	15
2.4 Обрада ферментисаних покожица грожђа .....	17
2.5 Употреба отпада и споредних производа из прехранбене индустрије у производњи хране.....	18
2.5.1 Потенцијал употребе споредних производа индустрије вина у развоју функционалих додатака за прехранбену индустрију .....	19
2.6 Електрохидродинамички процеси инкапсулације биоактивних једињења .....	21
3. НАУЧНИ ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА .....	24
4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ .....	26
4.1 Материјали .....	26
4.1.1 Хемикалије .....	26
4.1.2 Сировине.....	26
4.2 Методе .....	27
I Развијање технологија обраде ферментисаних ПГ до потенцијалних прашкастих и полутечних додатака за прехранбену индустрију .....	27
4.2.1 Бланширање.....	27
4.2.2 Хомогенизација .....	28
4.2.3 Пастеризација .....	29
4.2.4 Сушење у струји загрејаног ваздуха .....	29
4.2.5 Сушење лиофилизацијом .....	30
4.2.6 Садржај влаге, влакана, протеина, угљених хидрата и масти у ферментисаним ПГ .....	30
4.2.7 Одређивање расподеле величине честица .....	30
4.2.8 Одређивање активности ензима полифенол оксидазе (РРО) и пероксидазе (РОД) .....	31
4.2.9 Раствор за екстракцију узорака.....	31
4.2.10 Фенолна екстракција .....	32
4.2.11 НРЛС карактеризација.....	34
4.2.12 Укупан садржај фенолних једињења, садржај растворљивих проантоцијанидина и FRAP тест .....	34

4.2.13 Статистичка анализа података .....	34
II Оцењивања антиоксидативног потенцијала три широко заступљене сорте грожђа у производњи црвених вина у Србији: Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc и Прокупац .....	35
4.2.14 Припрема узорака за одређивање садржаја укупних полифенола и ЕПР мерења .....	35
4.2.15 Одређивање укупног садржаја фенола (Folin – Ciocâlтеu тест).....	35
4.2.16 Одређивање антирадикалске активности екстраката покожица грожђа употребом електронске парамагнетне резонантне (ЕПР) спектроскопије .....	36
III Оцењивање способности инкапсулације екстраката покожица грожђа сорте Прокупац и Sangiovese техником електрораспршивања кроз матрицу природног полимера као носача.....	37
4.2.17 Садржај влаге у ПГ .....	37
4.2.18 Припрема узорака .....	37
4.2.19 Екстракција.....	38
4.2.20 Одређивање садржаја укупних шећера у ПГ и екстрактима методом по Luff-Schoorl-у ....	39
4.2.21 Одређивање укупног садржаја фенола (Folin – Ciocâlтеu тест) екстраката ПГ и добијених капсула .....	40
4.2.22 Одређивање антиоксидативне активности (DPPH и АВTS тест).....	40
4.2.23 Карактеризација полимерних раствора.....	41
4.2.24 Инкапсулација електрораспршивањем .....	41
4.2.25 Морфолошка анализа добијених капсула помоћу скенирајуће електронске микроскопије (SEM) .....	43
4.2.26 Припрема узорака нанокапсула за анализу .....	43
4.2.27 Фуриерова трансформациона инфрацрвена спектроскопија (ATR-FTIR).....	44
4.2.28 Термогравиметријска анализа (ТГА) .....	44
4.2.29 HPLC-MS-MS анализа.....	44
4.2.30 Одређивање величине честица.....	45
4.2.31 Статистичка анализа.....	45
5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА .....	46
I Развијање технологија обраде ферментисаних ПГ до потенцијалних прашкастих и полутечних додатака за прехранбену индустрију .....	46
5.1 Главне компоненте ферментисане покожице грожђа .....	46
5.2 Активност ензима PPO и POD .....	46
5.3 Бланширање .....	49
5.4 Хомогенизација.....	52
5.5 Пастеризација.....	52
5.6 Сушење.....	52
5.7 Дистрибуција величине честица.....	53
5.8 Седиментационо понашање .....	56

5.9 Перспектива примене додатака добијених од покожица грожђа .....	56
II Оцењивања антиоксидативног потенцијала три најчешће коришћене сорте грожђа у производњи црвених вина у Србији, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc и Прокупац .....	60
5.10 Резултати одређивања укупног садржаја полифенолних једињења .....	60
5.11 Резултати одређивања антирадикалске активности екстраката покожица грожђа употребом електронске парамагнетне резонантне (ЕПР) спектроскопије .....	61
III Оцењивање способности инкапсулације екстраката покожица грожђа сорте Прокупац и Sangiovese техником електрораспршивања кроз матрицу природног полимера као носача.....	63
5.12 Одређивање садржаја укупних шећера у ПГ и екстрактима методом по Luff-Schoorl-у.....	63
5.13 Скенирајућа електронска микроскопија (СЕМ) и одређивање расподеле величине добијених капсула екстраката ПГ .....	63
5.14 Физичко-хемијска карактеризација полимерних раствора .....	68
5.15 Одређивање укупног садржаја растворљивих фенола (Folin – Ciocâlteu тест) и одређивање антиоксидативне активности (DPPH и ABTS тест) .....	69
5.16 Фуриерова трансформациона инфрацрвена спектроскопија (FTIR) .....	71
5.17 Термогравиметријска анализа (TGA) .....	72
5.18 LC-MS-MS анализа екстраката ПГ сорти Прокупац и Sangiovese.....	74
<b>6. ЗАКЉУЧАК .....</b>	<b>77</b>
<b>ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>81</b>
<b>БИОГРАФИЈА АУТОРА.....</b>	<b>90</b>
<b>ПРИЛОЗИ .....</b>	<b>91</b>
<b>Изјава о ауторству .....</b>	<b>91</b>
<b>Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада .....</b>	<b>92</b>
<b>Изјава о коришћењу.....</b>	<b>93</b>

## 1. УВОД:

Са наглом модернизацијом начина живота од почетка XXI века, проучавање утицаја састава хране на људско здравље добија све више на значају. Данас се испољава глобални тренд повећања интересовања потрошача за конзумирањем воћа и поврћа, као и хране обогаћене биоактивним једињењима природног порекла и другим додацима са позитивним дејством на људско здравље. Тако обогаћена храна се у савременој литератури означава као функционална храна.

Узимајући у обзир да индустријска прерада сировог биљног материјала води до нагомилавања огромних количина споредних производа и да често превенција њиховог настајања није могућа, споредне производе који садрже корисна једињења би требало сматрати као ресурсе (Galanakis, 2015). Према стратегијама Европске уније и САД које се баве управљањем отпада из прехранбене индустрије, превенција акумулације отпада представља најбоље решење, а затим следе поновна употреба и рециклажа, такозвана „хијерархија отпада“ (Galanakis, 2015).

Међу споредним производима прехранбене индустрије има још увек нутритивно вредних биоматеријала. Одређивање вредности (валоризација) таквих споредних производа и њихова употреба у виду функционалних прехранбених додатака представља веома занимљив концепт који нуди алтернативне начине управљања отпадом у односу на досадашњу праксу и употребу у исхрани животиња, ђубрењу земљишта и одлагања на депонијама (Kumar, 2018).

Међутим, употреба споредних производа се често ограничава законским регулативима, прихватљивошћу од стране потрошача али јако често и високом ценом трошкова обраде. Степен очуваности биоактивних једињења током обраде споредних производа прехранбене индустрије представља један од најважнијих фактора у комерцијализацији овог материјала. Закључује се да употреба споредних производа представља комплексан, али данас неопходан процес који мора бити оптимизиран у циљу максималног искоришћења материјала уз што је могуће ниже трошкове обраде и негативни утицај на животну средину (Kumar, 2018; Schieber *et al.*, 2001; Galanakis, 2012; Galanakis, 2015). Ове чињенице довеле су до повећања интересовања истраживача широм света према агро-индустријском отпаду биљног порекла. У том погледу, споредни производи винске индустрије се посебно истичу као изузетан извор биоактивних материја (Teixeira *et al.*, 2014).

Истраживања многих аутора указују на изразиту антиоксидативну активност покожица црвених сорти грожђа захваљујући присуству фенолних једињења која се у грожђу, у количини од чак 90%, налазе у слободној форми. Лако се може закључити да екстракти покожица црвених сорти грожђа оправдано представљају потенцијалне функционалне додатке у прехранбеној индустрији (Iriti and Faoro, 2009; Liu, 2007). Највећи део полифенола грожђа сконцентрисан управо у покожици (Liang *et al.*, 2008). У процесу индустријске производње вина добијају се велике количине споредних производа (до 30% коришћеног материјала), укључујући чврсти отпад, односно петелке, ферментисану покожицу и семенке грожђа (Teixeira *et al.*, 2014).

Са становишта прехранбене индустрије интересантна је употреба ових покожица како због богатог садржаја природних антиоксиданата, тако и као извора биљних влакана, али и пигмената пореклом од антоцијана. Током производње вина, само до око 30% ових једињења подлеже екстракцији и прелази у вино, док се већи део задржава у покожици у облику комине (Teixeira *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2016).

У пракси, након издвајања шире, преостала комина и петелке, које као такве не представљају високо профитабилни отпад, углавном се користе за компостирање или се

одлажу на отвореним површинама потенцијално узрокујући еколошке проблеме. У Француској се на пример између 700000 и 1000000 тона овакве комине произведе годишње (Rondeau *et al.*, 2013), док се у Србији та количина процењује између 5000 и 15000 тона годишње.

Поред тога што је већ речено да је у грозђу највећи удео фенолних једињења нађен је у покожицама, оне такође имају и висок садржај воде, између 75% и 80%, што представља повољне услове за развој микроорганизама и деградацију хемијских једињења (Torres *et al.*, 2010). Оно што је изузетно битно нагласити је и то да покожица садржи висок садржај ензима, међу којима су ензими из групе полифенол оксидазе и пероксидазе највреднији пажње. Ови ензими изазивају оксидацију фенолних једињења узрокујући процесе тамњења (Gonzales-Barrigó *et al.*, 2005). Стога, пре саме употребе ферментисане покожице грозђа као додатка у технологијама прехранбених производа, она прво мора бити стабилизована (Torres *et al.*, 2010). Конвективно сушење је метод који се најчешће користи ради спречавања хемијске модификације и губитка функционалних једињења током времена (Tseng and Zhao, 2012). Међутим, конвективно сушење има и негативних ефеката јер може изазвати промене у физичким, хемијским и биолошким особинама третираног материјала. Деградација полифенола је везана за комбинацију температуре и времена сушења те се квалитет осушене покожице процењује одређивањем утицаја услова сушења на биоактивни потенцијал (Torres *et al.*, 2010). Покожице грозђа осушене лиофилизацијом не показују висок пад у концентрацији полифенолних једињења (Teixeira *et al.*, 2015). Међутим, процес лиофилизације је превише скуп да би се индустријски примењивао, док се у процесу конвективног сушења троше велике количине електричне енергије.

Укупна светска производња вина за 2018. годину износила је 292 милиона хектолитара (International Organisation of Vine and Wine, 2019), док је према подацима Европске комисије Европска унија водећи светски произвођач вина. 2019. године годишња производња вина у Европској унији износила је око 160 милиона хектолитара, а највећи произвођачи били су Италија, Шпанија, Француска и Португалија (Eurostat).

У Србији је укупна годишња производња вина за 2019. годину износила око 290000 хектолитара, а оно што је занимљиво је да се број винарија у Србији константно повећавао од 2000. до 2019. године. Што се тиче укупне површине под виновом лозом она у Србији износи 21000 ha са укупном производњом грозђа од око 150000 t годишње (Републички завод за статистику Републике Србије). Око 76% од укупне површине под виновом лозом користи се за производњу грозђа за вино, док се око 24% користи за производњу стоног грозђа (Jakšić *et al.*, 2015). Према последњим доступним подацима објављеним од стране Организације за храну и пољопривреду Уједињених нација, Србија се сврстава међу 20 највећих произвођача вина у свету са оствареном годишњом производњом од 198183 тона у 2014. години (FAO 1).

Из свега наведеног намеће се закључак да би валоризација и употреба споредних производа из винарија имала позитиван како социо-економски, тако и еколошки ефекат у Србији. Све ово је такође и у складу са „Агендом 2030” Уједињених Нација о одрживом развоју (UN “2030 Agenda” for Sustainable Development) у оквиру другог и дванаестог од 17 дефинисаних циљева ове Агенде а који се односе на смањивање броја гладних у свету, безбедност хране, побољшање исхране и промовисање одрживе пољопривредне производње (циљ 2), односно обезбеђивање одрживости у конзумирању и производњи (циљ 12) (FAO 2).

Иако биоактивна својства фенолних једињења пореклом из споредних производа винске индустрије обезбеђују нови комерцијални потенцијал, у исто време је потребно развити адекватне технологије за ефикасну обраду и искоришћење ових споредних производа без негативног утицаја на структуру и физиолошка својства биоактивних једињења.

Предмет истраживања ове докторске дисертације представљао је утврђивање оптималних услова обраде ферментисаних покожица грожђа, пореклом из споредних производа винске индустрије, базираних на што је могуће већем очувању антиоксидативног потенцијала полазног материјала уз што мање трошкове обраде, а у циљу развијања потенцијалних функционалних додатака за прехранбену индустрију, како у чврстом стању у виду праха, тако и у виду полутечних дисперзија што представља новину у научној литератури. Као референтни узорак за процену утицаја обраде на очување биоактивног потенцијала коришћен је екстракт добијен из праха лиофилизоване покожице грожђа.

Крајњи циљ овог истраживања био је да се представи шема оптимизираних поступака обраде ферментисаних покожица грожђа и да се изврши детаљна карактеризација добијених производа, али и да се на основу добијених резултата дефинише њихова могућа употреба као функционалних додатака у прехранбеној индустрији.

Иницијална хипотеза овог истраживања допуњена је идејом која представља алтернативну употребу отпадних покожица грожђа на начин којим се избегава разградња полифенолних једињења узрокована обрадом. То се постиже инкапсулацијом којом се активно једињење инкорпорира кроз полимерну матрицу која настоји да повећа стабилност, биорасположивост и контролисано ослобађање инкапсулисаних биоактивних једињења (Fathi *et al.*, 2014; Pérez-Masiá *et al.*, 2014). Иновативна и еколошки пријатељска техника инкапсулације, коју је потребно додатно истражити када су могућности њене примене у питању, је свакако техника електрораспршивања, док су најшире коришћени биополимери у процесима капсулације прехранбених додатака полисахариди и протеини дозвољени за употребу у људској исхрани (González-Cruz *et al.*, 2020). Фокус овог истраживања био је на поређењу особина између неинкапсулисаних и на протеину кукуруза (зеину) инкапсулисаних екстраката ПГ. Коришћена су два типа екстракта ПГ. Један екстракт био је пореклом од ферментисане комине, као спореног производа винарије, док је други екстракт био пореклом од покожица сировог грожђа које је у маркету изгубило сензорне особине потребе за конзумирање у свежем стању.

## 2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО

Процењено је да се чак 1/3 глобално произведене хране за људску употребу не поједе, односно да се изгуби негде на путу од њиве до трпезе. Овај губитак укључује две категорије: прехранбене губитке (food loss) и прехранбени отпад (food waste). Прехранбени губици настају током производње и снабдевања храном као и због законских регулатива, док прехранбени отпад настаје у трговинама прехранбене робе и од стране крајњих потрошача. Ове две категорије такође укључују и губитке воде, земљишта као и других природних ресурса коришћених у њиховој производњи, што укупно узрокује приближно 4,4 гигатона емисије гасова са ефектом стаклене баште (еквиваленти CO<sub>2</sub>) годишње, сврставајући их као трећег највећег емитера на свету (Rezaei and Liu, 2017). Чињеница да је превенција настајања обе категорије губитака хране готово немогућа у већини случајева доводи до закључка да се морају изнаћи алтернативне технологије обраде ових материјала са циљем њиховог враћања у прехранбену индустрију у виду функционалних додатака.

У исто време долази до све мањег интересовања за хемијски конзервисаном храном од стране потрошача. Генерално, присутан је константан притисак на произвођаче да смање употребу хемијских додатака у производњи хране а уместо тога да више промовишу употребу природних додатака. Потрошачи се данас радују не само микробиолошки безбедним или нутритивно богатим прехранбеним производима, већ захтевају да производи буду природни и да њихова производња има што мањи негативан утицај на животну средину. Све већи интерес потрошача за функционалном храном доводи до пораста потражње на тржишту за природним функционалним додацима за прехранбену индустрију (Bharat Helkar *et al.*, 2016).

### 2.1 Споредни производи прехранбене индустрије

Последњих деценија бележи се константан раст капацитета прехранбене индустрије широм света, што због глобализације, што због пораста броја становника. Упоредо са повећањем обима производње повећавају се и захтеви потрошача те је стога данас неопходно понудити шири асортиман индустријских прехранбених производа који морају бити безбедни, нутритивно богати, приступачни и што је могуће више природни (Kumar, 2018; Bharat Helkar *et al.*, 2016).

Највећи број прехранбених индустрија широм света бави се прерадом воћа и поврћа, млека, меса, морских плодова и житарица (Kumar, 2018). Отпад настао прерадом материјала анималног порекла најчешће укључује делове трупаца животиња, крзно, кожу, копите, главе, перје, изнутрице, утробу, кости, масти, вишкове меса и крв, док се отпад из млечне прерађивачке индустрије углавном састоји од сурутке и млечног талога добијеног након процеса одвајања. Отпад добијен прерадом воћа и поврћа укључује љуске, покожице, стабљике, семенке, мекиње, али и комплексне споредне производа као што су разне комине добијене након издвајања вина, уља, скроба, сока или шећера из биљног материјала (Bharat Helkar *et al.*, 2016). При преради воћа, количина ових остатака некада чини и више од 50% свежег воћа, са нутритивним и функционалним потенцијалом већим од самог финалног прехранбеног производа (Ayala *et al.*, 2011).

Најновији биланси стања из сектора производње хране указују да највећи допринос у стварању споредних производа прехранбене индустрије има индустрија прераде биљног материјала, односно воћа и поврћа, и посебно грожђа у производњи вина (Слика 1), у поређењу са осталим прехранбеним категоријама попут житарица, уљарица, меса, рибе и морских плодова и млечних производа. У складу с тим, све веће интересовање влада за употребом

споредних производа пореклом од воћа, поврћа и посебно грожђа у виду функционалних додатака у развоју иновативних прехранбених производа. У корист овоме иде и чињеница да се прехранбени губици који се настају прерадом биљака углавном јављају пре употребе у домаћинствима, те их чини доступним за поновну употребу. Коришћење споредних производа у форми функционалних додатка у оквиру исте прехранбене индустрије, не само да повећава одрживост производње те индустрије, већ може умањити сензорне изазове приликом развоја нових производа обзиром на сличност прехранбених матрица (Mateos-Aparicio and Matias, 2019; Iriondo-DeHond *et al.*, 2018). Студије спроведене на тему развоја иновативних млечних производа користећи одрживе функционалне додатке, објављене у периоду између 2000. и 2018. године, указују на то да су чак у 88% случајева коришћени споредни производи биљног порекла (пореклом од воћа - 43%, пореклом од споредних производа винарија - 19% и пореклом од поврћа - 13%) (Iriondo-DeHond *et al.*, 2018).



Слика 1. Приказ процентуалне заступљености одређених прехранбених индустрија у стварању споредних производа. Преузето и прилагођено из литературе (Mateos-Aparicio and Matias, 2019)

Узимајући у обзир ову чињеницу да индустријска прерада сировог биљног материјала води до нагомилавања огромних количина споредних производа и да као што је већ речено превенција њиховог настајања често није могућа, ове споредне производе морамо сагледавати као алтернативне изворе нутритивних материја и развијати технологије обраде које би за резултат имале њихово враћање у ланац исхране. Протеклих деценија се и улажу велики напори да се споредни производи биљног порекла афирмишу као извор нутритивних и функционалних састојака, укључујући дијететска влакна, фенолна једињења, различите минерале, витамине, угљене хидрате, масти, протеине и пробавне ензиме, који су од виталног значаја за спречавање и контролу разних здравствених тегоба. Табела 1. илуструје садржај

различитих једињења неких од споредних производа из прехранбене индустрије пореклом од воћа и поврћа.

Табела 1. Садржај различитих једињења у споредним производима прераде одређеног воћа и поврћа. Преузето и прилагођено из литературе (Jozinović *et al.*, 2014).

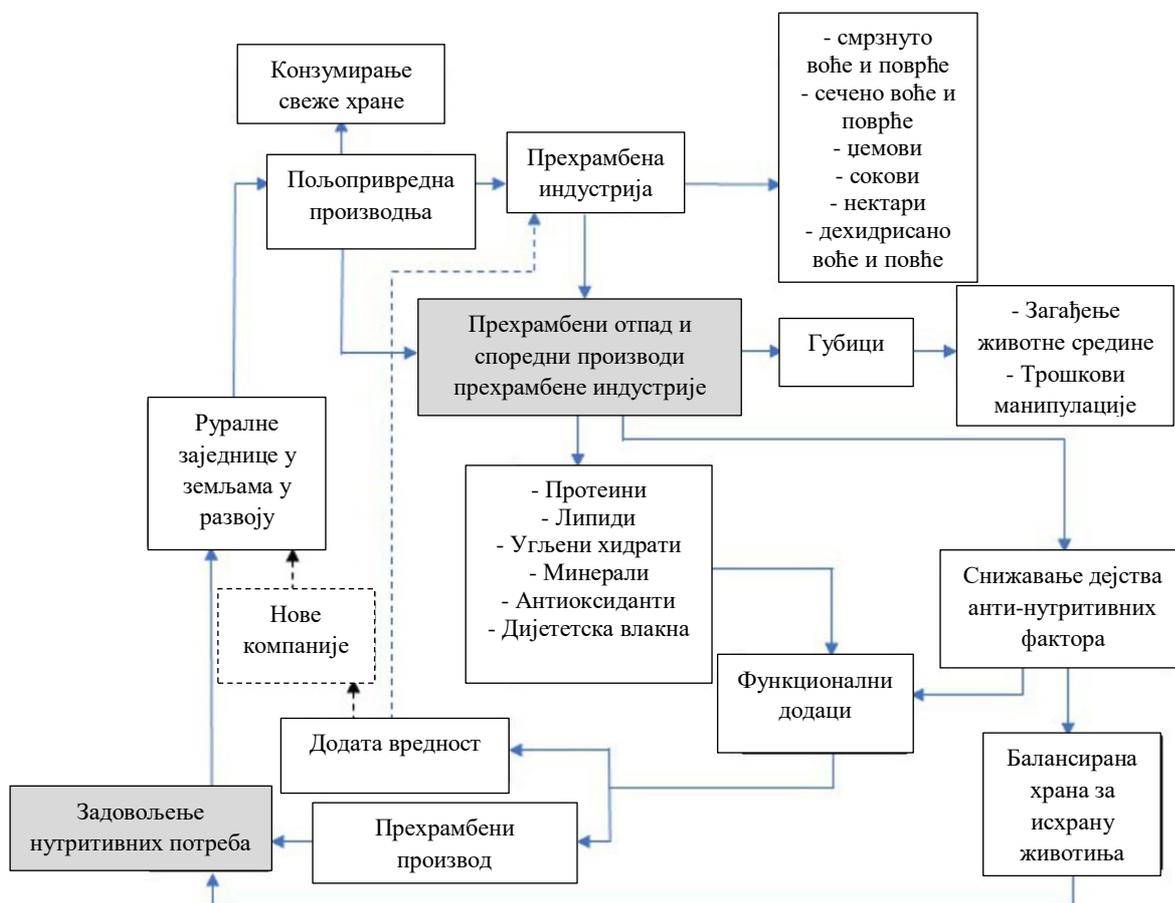
Група једињења	Садржај [% w/w]	Извор
Пектини	13 - 39	комина јубуке
	15 - 30	остаци шећерне репе
Укупан садржај влакана нерастворна влакна растворљива влакна	51,1	комина јубуке
	36,5	
	14,6	
	57	кора поморанце
	47,6	
	9,41	остаци шаргарепе
	63,6	
50,1		
13,5		
Протеини	27,5	језгра брескве
	20 - 25	језгра кајсије
	16,1	остаци карфиола
	20	житарице из пиварства

Научници су такође испитивали и могућност употребе споредних производа биљног порекла и отпадних вода из прехранбене индустрије као јефтених сировина за добијање различитих биополимера и биогорива (Routray and Orsat, 2017). Истраживачи све више испитују употребу ових споредних производа и из еколошких разлога и утицаја овог органског отпада на животну средину. Одлагање споредних производа прехранбене индустрије на отвореним просторима не погодује природном екосистему из више разлога, а пре свега због лоше биолошке и оксидативне стабилности, високе концентрације органских једињења, високе ензимске, микробиолошке и активности воде. Све ово може штетно утицати на животну средину и здравље људи. Негативан утицај се огледа и у високим трошковима управљања овим отпадом што представља додатни трошак за произвођаче хране. Прехранбена индустрија већ има ниску профитабилност те би се утицај додатних трошкова управљања овим отпадом јако негативно одразио како на саму прехранбену индустрију, пољопривредни сектор тако и на економију државе (Bharat Helkar *et al.*, 2016). Валоризација и употреба споредних производа у виду функционалних прехранбених додатака представља веома занимљив концепт који нуди алтернативне начине управљања отпадом у односу на досадашњу праксу и употребу у исхрани животиња, ђубрењу земљишта и одлагања на депонијама (Kumar, 2018; Routray and Orsat, 2017).

Прави изазов предтсавља интензивирање индустријске производње хране на глобалном нивоу у погледу побољшања безбедности хране, нутритивних потреба потрошача као и очувања животне средине. Са друге стране, веома је важно да концепт одрживих

функционалних прехранбених производа добије маркетиншку подршку и постане прихватљив за потрошаче чији су захтеви све комплекснији када је индустријска храна у питању. Пре свега ово се односи на цене прехранбених производа, задовољење навика и органолептичке прихватљивости од стране потрошача, као и поседовање биоактивних једињења са благотворним деловањем на здравље у самим производима (Iriundo-DeHond *et al.*, 2018).

Термин „прехранбени губици” (food loss) је 2014. године уведен од стране ФАО и означава смањење у количини и квалитету хране. Отпад пореклом из прехранбене индустрије сврстава се у категорију прехранбених губитака и односи се на одбацивање или алтернативну не-прехранбену употребу прехранбених производа који су нутритивно вредни и безбедни за исхрану људи. Губици хране настали услед пропадања у трговинама прехранбене робе и домаћинствима сматрају се прехранбеним отпадом (food waste). Обе категорије губитака хране представљају неравнотежу у доступности и приступачности прехранбених производа (Iriundo-DeHond *et al.*, 2018). На Слици 2. представљен је концептуални приказ одрживе употребе остатака и споредних производа из прехранбене индустрије у циљу добијања потенцијалних прехранбених функционалних додатака.



Слика 2: Концептуални приказ употребе остатака и споредних производа из прехранбене индустрије у циљу добијања потенцијалних прехранбених функционалних додатака. Преузето и прилагођено из литературе (Torres-León *et al.*, 2018).

Исцрпљивање ресурса, смањење површина обрадивог земљишта, континуирани раст светске популације и превелика акумулација остатака производње су фактори који оправдавају коришћење отпада и споредних производа из прехранбене индустрије. Споредни

производи из индустрије прераде јабука, јечма, грозђа, парадајза, шаргарепе представљају богат извор полифенола, влакана,  $\beta$ -глюкана, ликопена,  $\beta$ -каротена и многих других биоактивних једињења. Ово су само неки од примера споредних производа са великим потенцијалом примене у производњи обогаћене и функционалне хране (Jozinović *et al.*, 2014).

Из свега наведеног намеће се закључак да би валоризација и употреба споредних производа прехранбене индустрије имала директан позитиван утицај на смањење прехранбених губитака и отпада што може потенцијално довести до позитивних економских, друштвених и еколошких исхода, побољшавајући доступност и приступачност хране а истовремено оснажујући одрживи приступ употребе природних ресурса. Све ово је такође и у складу са „Агендом 2030” Уједињених Нација о одрживом развоју (UN “2030 Agenda” for Sustainable Development) у оквиру другог и дванаестог од 17 дефинисаних циљева ове Агенде а који се односе на смањивање броја гладних у свету, безбедност хране, побољшање исхране и промовисање одрживе пољопривредне производње (циљ 2), односно обезбеђивање одрживости у конзумирању и производњи (циљ 12) (FAO 2).

Примена напредних технологија за коришћење ових биоматеријала помоћи ће у решавању проблема исхране широм света, пре свега у развоју економичних начина очувања здравог начина живота и здравих навика које су повезане са исхраном. У својој књизи (Watson, 2008) приказује детаљан преглед здравствених проблема који се јављају са значајном учесталošћу код старијих особа а за које се предлаже да се лече помоћу функционалних прехранбених производа и суплемената, као допунска или алтернативна терапија. Један од највећих изазова употребе споредних производа прехранбене индустрије може да представља тај што технолошка решења за развој функционалних додатака за прехранбену индустрију још увек могу бити захтевна и скупа у поређењу са производњом конвенционалне хране, што захтева веома тесну сарадњу између истраживања и индустрије. Све ово треба узети у обзир уз податак да се тржишта функционалне хране непрестано мењају и повећавају (Iriundo-DeHond *et al.*, 2018).

### 2.1.1 Споредни производи винске индустрије

Грожђе се конзумира и као свежи и као прерађени производ, попут вина, џема, сока, желеа, екстракта семенки грозђа, сувог грозђа, сирћета и уља семенки грозђа. Према подацима FAO из 2013. године, годишња глобална производња грозђа износи преко 21,9 милиона тона. Око 31% светске производње грозђа намењено је понуди на тржишту у свежем стању, 67% за производњу вина и осталих алкохолних пића, док се око 2% суши. Од укупне производње грозђа чак 45,53% одлази у отпад, што је еквивалент 51,801 тона (Torres-León *et al.*, 2018).

Због велике заступљености у прерађивачким индустријама и високе нутритивне вредности, пре свега због високог садржаја дијететеских влакана и полифенолних једињења, споредни производи пореклом од грозђа већ дуже време изазивају посебну пажњу (Jozinović *et al.*, 2014). Највећи део дијететеских влакана и полифенола грозђа сконцентрисан је у покожици (Liang *et al.*, 2008). Истраживања многих аутора указују на изразиту антиоксидативну активност покожица црвених сорти грозђа захваљујући присуству фенолних једињења која се у грозђу, у количини од чак 90%, налазе у слободној форми. Лако се може закључити да екстракти покожица црвених сорти грозђа оправдано представљају материјал са великим потенцијалом у развоју функционалних додатака у прехранбеној индустрији (Iriti and Faoro, 2009; Liu, 2007).

У процесу индустријске производње вина добијају се велике количине споредних производа (до 30% коришћеног материјала), а највећи део чини чврсти отпад - комина,

односно петељке, ферментисана покожица и семенке грожђа Слика 3. Биоактивна једињења из ферментисаних покожица грожђа, пре свега полифеноли, показују интересантне биолошке ефекте попут превенције неуродегенеративних болести, кардиоваскуларних поремећаја и канцера (Teixeira *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2016), како у *in vitro* тако и у *in vivo* системима (Stockley *et al.*, 2012).



Слика 3. Састав комине грожђа исказан у 1000 kg комине. Слика преузета и прилагођена из литературе (Spinei and Oroian, 2021).

Са становишта прехранбене индустрије интересантна је употреба ових покожица због богатог садржаја природних антиоксиданата, али и као извора биљних влакана и пигмената пореклом од антоцијана. Током производње вина, само до 30% ових једињења подлеже екстракцији и прелази у вино, док се већи део задржава у покожици у облику комине (Teixeira *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2016). Поред покожица, све већу пажњу привлаче и екстракта семенки грожђа због своје антиоксидативне активности (Bharat Helkar *et al.*, 2016).

Семе грожђа је други споредни производ ферментисане комине вредан пажње, а који представља 5 до 6% од укупне масе грозда. Уље добијено из семенки грожђа одликује се високим садржајем линолне киселине (60 - 70%), али и токоферола који спречавају њену оксидацију. Уље семенки грожђа поседује важна биоактивна својства која поспешују здравље људи као на пример у погледу спречавања настанка атероматозних лезија, смањења холестерола и липидемија (Torres-León *et al.*, 2018).

У пракси, након издвајања шире, преостала комина и петељке које као такве не представљају високо профитабилни отпад се углавном користе за компостирање или се одлажу на отвореним површинама потенцијално узрокујући еколошке проблеме. У Француској се на пример између 700000 и 1000000 тона овакве комине произведе годишње (Rondeau *et al.*, 2013), док се у Србији та количина процењује између 5000 и 15000 тона годишње.

Укупна светска производња вина за 2018. годину износила је 292 милиона хектолитара (International Organisation of Vine and Wine, 2019) док је према подацима Европске комисије, Европска унија је водећи светски произвођач вина. 2019. године годишња производња вина у Европској унији износила је око 160 милиона хектолитара, а највећи произвођачи су Италија, Шпанија, Француска и Португалија (Eurostat). У Србији је укупна годишња производња вина за 2019. годину износила око 290000 хектолитара, а оно што је занимљиво је да је број винарија у Србији у константном порасту од 2000. до 2019. године. Што се тиче укупне површине под виновом лозом она у Србији износи 21000 ha са укупном производњом грожђа од око 150000 t годишње (Републички завод за статистику Републике Србије). Око 76% од укупне површине

под виновом лозом користи се за производњу грожђа за вино, док се око 24% користи за производњу стоног грожђа (Jakšić *et al.*, 2015). Према последњим доступним подацима објављеним од стране Организације за храну и пољопривреду Уједињених нација, Србија се сврстава међу 20 највећих произвођача вина у свету са оствареном годишњом производњом од 198183 тона у 2014. години (FAO 1).

### 2.1.2 Сорте грожђа коришћене у овом овом истраживању

У истраживањима спроведеним у оквиру ове докторске дисертације коришћене су ферментисане покожице грожђа сорте Барбера, Прокупац, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc и Sangiovese. Ове покожице спадају у категорију прехранбених губитака јер су настале као споредни производи винске индустрије. Такође, коришћена је и неферментисана покожица грожђа сорте Прокупац добијена из трговине прехранбених производа након губитка сензорних особина неопходних за конзумирање у свежег стању. Оваква покожица се сврстава у категорију прехранбеног отпада.

Барбера (Слика 4) је италијанска сорта црвеног грожђа која од 2000. године константно држи трећу позицију по заступљености у производњи црвених вина у Италији, одмах иза сорти Sangiovese и Montepulciano. Највише се гаји на северу Италије, а карактеришу је високи приноси и изразито тамна боја, низак садржај танина, висок садржај киселина и умерена аstringенција.



Слика 4. Изглед грожђа сорте Барбера. Слика преузета од (Agne27)

Прокупац (Слика 5) је српска аутохтона сорта грожђа која се користи за прављење ружичастих и црвених вина. У Србији уједно представља и најдоминантнију аутохтону сорту у производњи црвених вина. Карактерише је дебела покожица тамно-плаве боје, веома високи приноси као и високи садржај полифенолних једињења и шећера.



Слика 5. Изглед грозња сорте Прокупац. Слика преузета од (agromedia.rs)

Cabernet Sauvignon (Слика 6 лево) представља најзаступљенију сорту у производњи вина у готово свим земљама света, укључујући и Србију. Ову француску сорту карактеришу ситна плаво-црна зрна са дебелом покожицом, висок садржај танина, пријатна ароматичност и значајна киселост. У производњи вина Cabernet Sauvignon се често меша са сортом Мерло и сортом Cabernet Franc. Cabernet Franc (Слика 6 десно) такође представља једну од највише узгајаних сорти винове лозе за производњу црвених вина, како код нас, тако и у остатку света. Ова сорта је по карактеристикама јако слична сорти Cabernet Sauvignon, а главне разлике су светлија нијанса црвене боје и тања покожица у односу на сорту Cabernet Sauvignon.



Слика 6. Изглед грозња сорте Cabernet Sauvignon (лево) и Cabernet Franc (десно). Слика преузета од (Agne27)

Sangiovese (Слика 7) представља највише узгајану сорту винове лозе у Италији. Карактерише је тамно-плава боја и висок садржај киселина и танина.



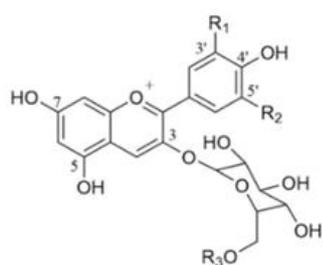
Слика 7. Изглед грозђа сорте Sangiovese. Слика преузета од (Francesco Sgroi)

## 2.2 Функционална једињења споредних производа винске индустрије

Функционална једињења грозђа углавном укључују фенолна односно полифенолна једињења која представљају једну од највећих и најраспрострањенијих група фитохемикалија у биљном свету. Полифеноли су секундарни метаболити од великог физиолошког и морфолошког значаја за биљке, јер играју важну улогу у пигментацији биљака, репродукцији, заштити од УВ зрачења, антиоксидативним процесима, као и пружању заштите од патогена и предатора (Kumar Anal, 2018). Познато је више од 8000 фенолних једињења која су према својој молекулској структури подељена у четири класе: једињења која садрже један фенолни прстен (циметне и бензоеве киселине), фенолна једињења која садрже два фенолна прстена (стилбени), три прстена (антоцијани, флавоноли и флаван-3-оли) и фенолна једињења која садрже сложени прстен (елагинске киселине). Антоцијанини, флавоноли и флаван-3-оли садрже молекулску структуру  $C_6-C_3-C_6$  и називају се још и флавоноиди, док хидроксибензоеве и хидроксициметне киселине, као и стибелни спадају у нефлавоноиде (Zhu *et al.*, 2012; Hornedo-Ortega *et al.*, 2020).

Већина ових једињења, одговорних за боју и мирис грозђа, смештена је у управо у pokožици грозђа због чега она представља функционално најбогатији део грозђа. На Слици 8 дат је преглед најзаступљенијих полифенолних једињења из грозђа. Ова једињења су пресудна и за квалитет вина јер од њих зависе сензорна својства попут боје, укуса, букеа, ароме, аstringенције и горчине (Hornedo-Ortega *et al.*, 2020). Многобројне студије су показале да се биоактивност фенолних једињења огледа како у њиховој израженој антиоксидативној способности и превенцији кардиоваскуларних и неуродегенеративних болести тако и у њиховој антиканцерогеној, анти-инфламаторној, антимикробној активности и активности успоравања старења (Xia *et al.*, 2010).

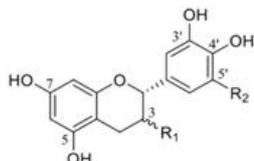
**Антоцијанини**



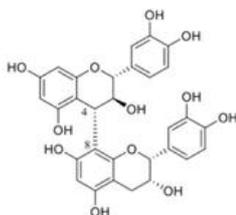
	R1	R2
цијанидин-3-О-глукозид	ОН	Н
делфинидин-3-О-глукозид	ОН	ОН
пеонидин-3-О-глукозид	ОСН <sub>3</sub>	Н
петунидин-3-О-глукозид	ОСН <sub>3</sub>	ОН
малвидин-3-О-глукозид	ОСН <sub>3</sub>	ОСН <sub>3</sub>



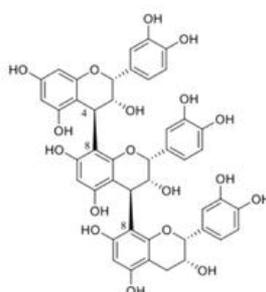
**Флаван-3-оли и проантоцијанидини**



	R1	R2
катехин	$\beta$ -ОН	Н
епикатехин	$\alpha$ -ОН	Н
епигалокатехин	$\alpha$ -ОН	ОН
епигалокатехин галат	$\alpha$ -O-gallyl	ОН
епикатехин галат	$\alpha$ -O-gallyl	Н



Процијанидин В4

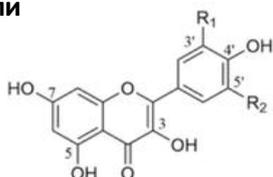


Процијанидин С1



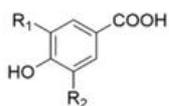
Процијанидински тетрамер

**Флавоноли**



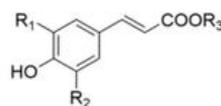
	R1	R2	R1	R2	
кверцетин	ОН	Н	ОСН <sub>3</sub>	Н	изорамнетин
мирицетин	ОН	ОН	ОСН <sub>3</sub>	ОН	ларицитрин
кемферол	Н	Н	ОСН <sub>3</sub>	ОСН <sub>3</sub>	сирингетин

**Фенолне киселине**



**Хидроксibenзоеве киселине**

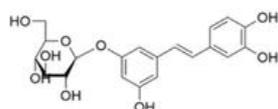
	R1	R2
<i>p</i> -хидроксibenзоева киселина	Н	Н
протокатехинска киселина	ОН	Н
ванилинска киселина	ОСН <sub>3</sub>	Н
гална киселина	ОН	ОН
сирингинска киселина	ОСН <sub>3</sub>	ОСН <sub>3</sub>



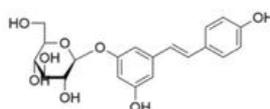
**Хидроксциметне киселине**

	R1	R2	R3
<i>p</i> -кумаринска киселина	Н	Н	Н
кафеинска киселина	ОН	Н	Н
ферулинска киселина	ОСН <sub>3</sub>	Н	Н
синапинска киселина	ОСН <sub>3</sub>	ОСН <sub>3</sub>	Н
<i>p</i> -кумароилтартарска киселина	Н	Н	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>
кафтаринска киселина	ОН	Н	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>
фертаринска киселина	ОСН <sub>3</sub>	Н	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>

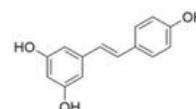
**Стилбени**



Е-астрингин



Е-пикеид



Е-ресвератрол

Слика 8. преглед најзаступљенијих полифенолних једињења из грожђа. Преузето и прилагођено из литературе (Hornedo-Ortega *et al.*, 2020).

Свака фенолна категорија садржи одређени број једињења која се разликују по степену хидроксилације и супституције хидроксилних група (метилација, гликозилација, ацилација). На пример, антоцијанини, црвени пигменти грожђа, представљају групу од шест агликона који могу бити моно- или ди-глукозиловани па затим ациловани сирћетном, *p*-кумаринском и кафеинском киселином, што даје велики број једињења. Флаван-3-оли из покожица грожђа такође показују велику разноликост. Садрже неколико мономера (катехин, епикатехин, галокатехин, епигалокатехин и епикатехин-3-галат) који предствљају саставне јединице олигомера и полимера (проантоцијанидини и кондензовани танини), са степеном полимеризације у распону од 2 до преко 100. Веома често, један или више остатака шећера су повезани са хидроксилним групама полифенола. Ови шећери могу бити присутни као моносахариди, дисахариди или олигосахариди, а могу се појавити и као функционални деривати попут естера и метил естера (Pinasseau *et al.*, 2017; Kumar Anal, 2018).

Како само грожђе, такође и комина грожђа, у којој доминира ферментисана покожица, поседује значајну антиоксидантивну активност због високог садржаја полифенола (Negro *et al.*, 2003). Антоцијанини, проантоцијанидини, гликозиди флавонола, фенолне киселине и стилбени најзаступљенија су фенолна једињења комине грожђа (Schieber *et al.*, 2001; Jozinović *et al.*, 2014).

**Флавоноиди** су најчешћа и најраспрострањенија група биљних фенола. То су једињења мале молекулске тежине, са C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> основним структурним скелетом у коме су две C<sub>6</sub> јединице (прстен А и прстен Б) фенолне природе. Флавоноиди се могу даље поделити у подгрупе попут флавонола (или катехинина), флаван-3-ола, флавона, флаванона, изофлавонола и антоцијанина. Флавоноиди се врло ретко појављују у биљкама као агликони, пошто обично постоје као гликозиди. Флавоноиди су важни антиоксиданти због свог високог редокс потенцијала (Kumar Anal, 2018; Milić *et al.*, 2000).

**Флавоноли** и њихови 3-хидроксил деривати **флавоноли**, јављају се форми гликозида, метоксида и ацилованих производа на сва три прстена и чине највећу подгрупу међу полифенолима. **Флаван-3-оли** (који се називају још и флаваноли и катехини) укључују једињења од једноставних мономера, катехина и епикатехина до олигомерних и полимерних проантоцијанидина, који су познати и као кондензовани танини. Катехин и епикатехин су мономерни флаваноли који се обично налазе у воћу, посебно у покожици грожђа, јабука и боровница. Ови мономери могу да формирају полимере, проантоцијанидине, јер цепање ових полимерних ланаца катализовано киселом средином ствара антоцијанидине (Kumar Anal, 2018).

**Антоцијанини** су најважнија група биљних пигмената. Растворљиви су у води и одговорни су за црвену, плаву и љубичасту боју у биљном свету. Антоцијанидин је основна структура ових једињења, а када се налазе у свом глукозидном облику (везани за шећерни део), називају се антоцијанини. Могу се јављати у ружичастој, црвеној, љубичастој или плавој боји, у зависности од рН средине у којој се налазе. Међутим, изоловани антоцијанини су врло нестабилни и подложни деградацији. Многи фактори, попут температуре складиштења, светлости, кисеоника, врсте растварача, присутних ензима и протеина могу утицати на њихову боју. Антоцијанини могу деловати као антиоксиданти донирајући водоник високо реактивним радикалима. Њихов антиоксидативни потенцијал зависи од броја и распореда хидроксилних група. Антоцијанини су потенцијална замена за забрањене прехранбене боје, пружајући додатне здравствене користи током њиховог конзумирања (Kumar Anal, 2018; Andersen and Jordheim, 2006). Америчка управа за храну и лекове (FDA - U.S. Food and Drug Administration) одобрила је употребу ових једињења као природних пигмената у технологијама неких категорија прехранбених производа.

У групу **нефлавоноида** који за разлику од флавоноида не садрже C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> структуру спадају **Фенолне киселине** које представљају отприлике једну трећину фенолних једињења из хране и које се у биљном свету јављају у слободним и везаним облицима. Фенолне киселине се састоје од две подгрупе, то јест хидроксициметне и хидроксибензоеле киселине. Хидроксициметне киселине укључују ароматична једињења са бочним ланцем са три угљеникова атома (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), а највише заступљени представници су кафеинска, ферулинска, *p*-кумаринска и синапинска киселина. Са друге стране, главни представници групе хидроксибензоеле киселине су *p*-хидроксибензоеле киселина, протокатехинска, ванилинска, сиригинска и гална киселина. Гална киселина је најрепрезентативнији представник ове групе са структуром C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (Kumar Anal, 2018; Hornedo-Ortega *et al.*, 2020).

**Стилбени** су знатно мање заступљени у људској исхрани међутим, сматрају се јако корисним за здравље људи. Најрепрезентативнији стилбен је ресвератрол, који се може појавити у својим *cis* и *trans* изомерним облицима, углавном у глукозилованим формама. Присутан је у грожђу и црвеном вину у количинама од 0,3–7 mg агликона / l, односно 15 mg гликозида / l. Због својих антицарциногенних својстава, детаљно је проучаван (Kumar Anal, 2018).

### 2.3 Активност ензима полифенол оксидаза (PPO) и пероксидаза (POD) у покожицама и грожђу

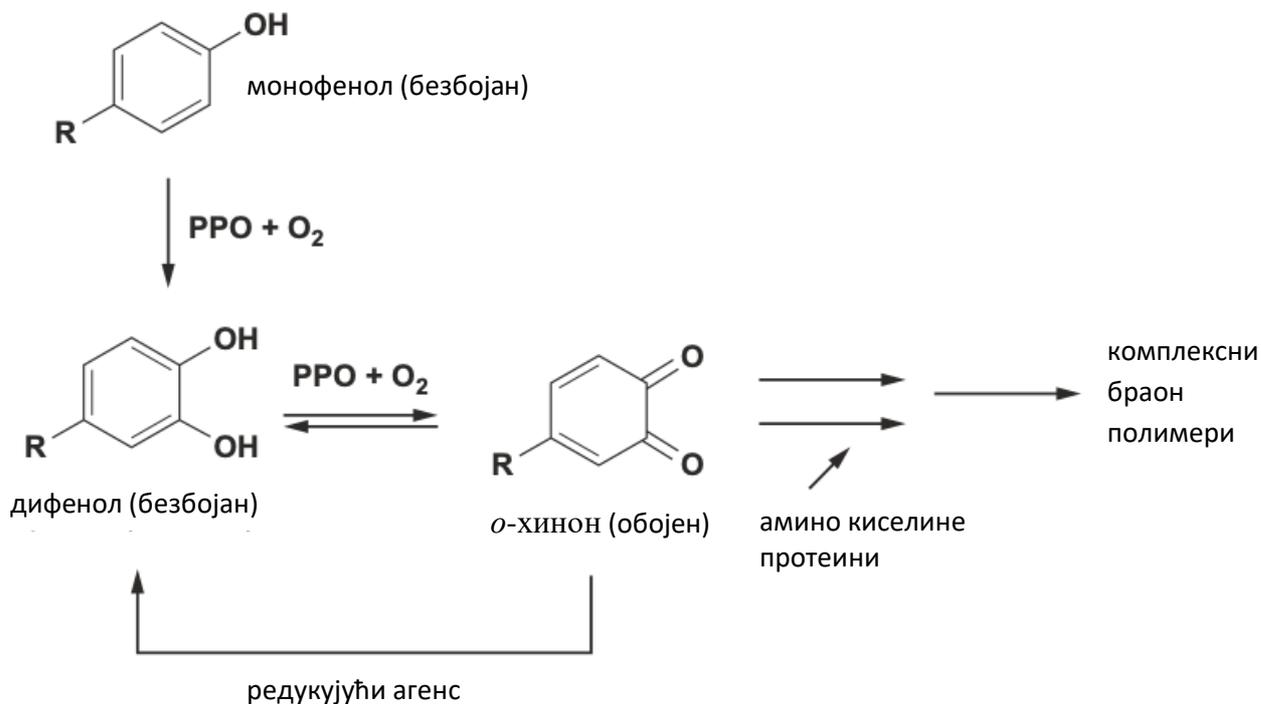
Када је у питању употреба покожица грожђа пореклом из споредних производа винске индустрије битно је нагласити и то да покожице садрже висок садржај ензима, међу којима су ензими из групе полифенол оксидазе (PPO) и пероксидазе (POD) највреднији пажње. Ови ензими изазивају оксидацију фенолних једињења узрокујући процесе тамњења (Gonzales-Barrío *et al.*, 2005). Ови ензими представљају природне метаболите грожђа.

Ензими из групе полифенол оксидазе (PPO) и пероксидазе (POD) реагују са кисеоником током старења или оштећења воћног ткива (Furumo and Furutani, 2008). Активност ових ензима је одговорна за губитак нутритивне вредности али и промене у боји и укусу код воћа (Jukanti, 2017). У присуству кисеоника ензими из групе полифенол оксидазе (PPO) оксидују фенолна једињења до *o*-хинона. *O*-хинони даље узрокују процесе тањења у реакцијама са аминокиселинама и протеинима (Taranto *et al.*, 2017). Шематски приказ активности ензима полифенол оксидазе (PPO) приказан је на Слици 9.

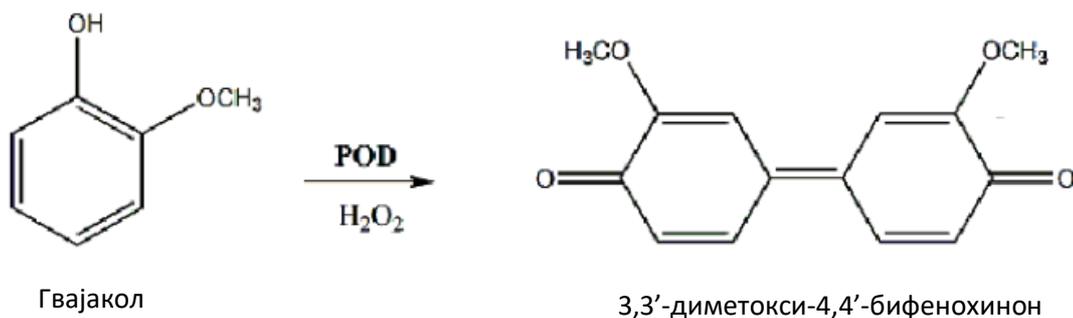
Пероксидаза (POD) је још један ензим који учествује у ензимским променама биљног ткива, јер може редуковати дифеноле а такође је укључен и у производњу лигнина. Иако је активност POD ограничена одсуством једињења као што су супероксидни радикали, водоник-пероксид и липидни пероксиди, забележено је учешће POD у ензимском тамњењу различитог воћа и поврћа (Zhang and Shao, 2016). Шематски приказ активности ензима пероксидаза (POD) приказан је на Слици 10.

Флаваноли су супстрати за обе класе ензима PPO и POD (Servili *et al.*, 2000). Флаваноли се такође могу оксидовати и са PPO и POD (Makris and Rossiter, 2002). Насупрот томе, проантоцијанидини нису супстрати за PPO, међутим ова једињења се могу оксидовати ензимски генерисаним *o*-хинонима кроз механизме купловане оксидације преко којих се они трансформишу у *o*-дифенолне супстрате (Cheynier and Ricardo da Silva, 1991). Оксидација проантоцијанидина узрокована активношћу ензима POD се не може искључити (Liu *et al.*, 2013). Kader *et al.* (2001) је показао да су антоцијанини такође погођени механизмима

купловане оксидације генерисањем *o*-хинона активношћу PPO. Додатно, Movahed *et al.* (2016) је доказао улогу POD у деградацији антоцијанина из грожђа.



Слика 9. Шематски приказ активности ензима полифенол оксидазе (PPO). Преузето и прилагођено из литературе (Jukanti, 2017).



Слика 10. Шематски приказ активности ензима пероксидаза (POD). Преузето и прилагођено из литературе (Furumo and Furutani, 2008).

Из свега наведеног лако је закључити да покожице грожђа пре саме употребе у циљу развијања функционалних додатака за прехранбену индустрију морају прво бити ензимски стабилизоване. Ово је потребно урадити да би се очувао што већи антиоксидативни потенцијал добијених додатака, који потиче од полифенолних једињења која представљају погодан супстрат за рад ензима PPO и POD.

## 2.4 Обрада ферментисаних покожица грожђа

Иако биоактивна својства фенолних једињења пореклом из споредних производа винске индустрије обезбеђују нови комерцијални потенцијал, у исто време је потребно развити адекватне технологије за ефикасну обраду и искоришћење ових споредних производа без негативног утицаја на структуру и физиолошка својства биоактивних једињења. Квалитет крајњих функционалних додатака за прехранбену индустрију не зависи само од примењених споредних производа и њихових функционалних особина већ и од самог процеса обраде овог материјала и способности да се у што већој количини очувају биоактивна једињења одговорна за његов функционални карактер. О овме углавном одлучује третман као и све појединачне операције током процеса обраде полазног материјала. Неки од уобичајених метода обраде споредних производа укључују сушење, млевање (влажно и суво млевање), бланширање, пастеризацију, зрачење и ензимску обраду.

Поред тога што је већ речено да је у грожђу највећи удео фенолних једињења пронађен у покожицама, оне такође имају и висок садржај воде, између 75% и 80%, што представља повољне услове за развој микроорганизама и деградацију хемијских једињења (Torges *et al.*, 2010). Када се узме у обзир и активност у покожици присутних ензима, полифенолоксидазе и пероксидазе, долази се до закључка да пре саме употребе ферментисаних покожица грожђа у форми функционалних додатка у технологијама прехранбених производа, оне прво морају бити ензимски и микробиолошки стабилизоване.

У циљу потпуног избегавања микробиолошких ризика, ефикасан и потпун поступак сушења основни је корак за гарантовање микробиолошке и физичко-хемијске стабилности ових биоматеријала (Torges-León *et al.*, 2018). Конвективно сушење је метод који се најчешће користи ради спречавања губитка функционалних једињења током времена (Tseng and Zhao, 2012). Међутим, конвективно сушење има и негативних ефеката јер може изазвати промене у физичким, хемијским и биолошким особинама третираног материјала. Деградација полифенола је везана за комбинацију температуре и времена сушења те се квалитет осушене покожице процењује одређивањем утицаја услова сушења на биоактивни потенцијал (Torges *et al.*, 2010). Међу различитим методама сушења, сушење замрзавањем се сматра као најбољи начин сушења у поређењу са многим другим, попут сушења у струји врућег ваздуха или вакуум сушења пре свега у погледу очувања нутритивних и функционалних својстава, нарочито фенолних једињења. Покожице грожђа осушене лиофилизацијом не показују висок пад у концентрацији полифенолних једињења (Teixeira *et al.*, 2015). Међутим, процес лиофилизације је превише скуп да би се индустријски примењивао, док се у процесу конвективног сушења троше велике количине електричне енергије, 3200 - 11500 kJ потрошене енергије по једном килограму испарене воде (Sanjuán *et al.*, 2014), у зависности од типа сушнице и самих услова сушења. Међутим, у поређењу са лиофилизацијом, сушење загрејаним ваздухом ниске температуре добило је предност у индустријској и комерцијалној прими. Када је у питању ензимска стабилност, у раду (Carranza-Concha *et al.*, 2012) доказано је да инактивација ензима PPO и POD процесом бланширања грожђа пре почетка производње сока доводи до боље очуваности садржаја полифенолних једињења.

Екструзија се примењује у одређеним случајевима када су споредни производи богати дијететским влакнима и протеинима. Овај процес може довести до великих физичко-хемијских промена, укључујући промене у активности воде, денатурацију протеина, разградњу скроба и формирање комплекса између масти и амилозе. Екструдирани производи се примењују код категорија грицкалица или житарица за доручак, које су стабилни производи са дугачким роком трајања (Routray and Orsat, 2017).

У већини случајева обрада фенолима богатих покожица грожђа укључује сушење и млевење, сушење и екстракцију фенолних једињења, или сушење, екстракцију и инкапсулацију фенолних једињења кроз матрицу носача (Paini *et al.*, 2016; Duba *et al.*, 2015; García-Lomillo and González-SanJosé, 2017). У случајевима неких споредних производа, употреба комплетног материјала није практична, или је одређено биоактивно једињење присутно у споредном производу изоловано комерцијално прихватљивије. У овим случајевима екстракција биоактивних једињења представља први корак обраде, након чега евентуално следе пречишћавање и инкапсулација, у зависности од врсте производа и крајње примене (Routray and Orsat, 2017).

Предмет истраживања ове докторске дисертације представљао је утврђивање оптималних услова обраде ферментисаних покожица грожђа, пореклом из споредних производа винске индустрије, базираних на што је могуће већем очувању антиоксидативног потенцијала полазног материјала уз што мање трошкове обраде, а у циљу развијања потенцијалних прехранбених додатака, како у чврстом стању у виду праха, тако и у течном стању у виду полутечних дисперзија што представља новину у научној литератури. Као референтни узорак за процену утицаја обраде на очување биоактивног потенцијала коришћен је екстракт добијен из праха лиофилизоване покожице грожђа. У другом делу истраживања фокус је био на оптимизацији екстракције фенолних једињења из комине грожђа и процесу инкапсулације добијених екстраката на природном полимерном носачу.

## 2.5 Употреба отпада и споредних производа из прехранбене индустрије у производњи хране

Прехранбена индустрија непрестано настоји да успостави производњу која би искористишћавала што већи проценат полазних сировина, са што мање отпада и спорених производа који не могу бити употребљени. На овај начин индустрије се труде да се што више уклапају у модеран концепт одржаве производње и максималног искоришћења ресурса. У отпаду и споредним производима прехранбене индустрије се могу пронаћи високо нутритивне и функционалне компоненте попут полисахарида, витамина, минерала, дијететских влакана и биоактивних једињења као што су полифенолна једињења,  $\beta$ -каротен и ликопен. Неки од споредних производа поседују функционална својства попут способности повећања антиоксидативног потенцијала, способности задржавања и везивања воде као и способности гелирања и учвршћивања (Bharat Helkar *et al.*, 2016). Функционална храна може да буде дизајнирана тако да има физиолошке користи и/или смањи ризик од хроничних обољења мимо основних нутритивних функција. Може бити слична у изгледу са конвенционалном храном и конзумира се као део редовне исхране (USDA). Ово би се јако повољно одразило на потрошаче све више забринуте због остатака хемијских једињења у храни и који данас све више захтевају „чисту етикету” (clean label) која подразумева потпуно одсуство вештачких састојака и хемијских додатака (Irigondo-DeHond *et al.*, 2018).

Израз „валоризација отпада” односи се на било коју активност прерађивачке индустрије која има за циљ поновну употребу, рециклирање или компостирање споредних производа и отпада или њихову употребу као извора енергије. Валоризација отпада подразумева прераду великих количина индустријски произведених споредних производа и отпада који се разликују од отпада из домаћинства јер су много хомогенији и добијени у много већим количинама (Kabongo, 2013).

Савремени проблеми данашњег човека су гојазност, дијабетес, кардиоваскуларне болести, канцер и различити поремећаји уско повезани са неуравнотеженом исхраном. Пошто је

изузетно тешко утицати на навике и укус потрошача када су прехранбени производи у питању, прехранбена индустрија данас све више ради на развоју обогачених функционалних производа, попут хлеба, тестенина, грицкалица и других производа тражених од стране свих категорија потрошача. Ови производи се формулишу на начин да буду обогачени са састојцима који нису у довољним количинама заступљени у свакодневној исхрани (минерали, дијететска влакна, полифеноли, витамини,  $\beta$ -глукан...) (Jozinović *et al.*, 2014).

Употреба функционалих додатака за прехранбену индустрију регулисана је према смерницама „Codex Alimentarius”. Стога, споредни производи прехранбене индустрије који би се користили као природни додаци морају испуњавати важеће прописе и морају добити потребна одобрења за употребу (Irigondo-DeHond *et al.*, 2018). Технички и научни напори требају бити усмерени ка изналажењу ефикаснијих и јефтинијих решења која воде ка што већем искоришћењу спорених производа прехранбене индустрије са циљем добијања функционалних додатака за прехранбену индустрију као и самих функционалних прехранбених производа како би се на тај начин повећали приходи и омогућио одржив и стабилан економски раст прехранбене индустрије (Bharat Helkar *et al.*, 2016).

### **2.5.1 Потенцијал употребе споредних производа индустрије вина у развоју функционалих додатака за прехранбену индустрију**

Производња грозђа заузима важно место у светској биљној производњи, сматрајући се најраспрострањенијим воћем (García-Lomillo and González-SanJose, 2017; Zhu *et al.*, 2015). Око 50% укупне производње грозђа одлази у винску индустрију (International Organisation of Vine and Wine, 2019). У том смислу, винска индустрија генерише велику количину остатака, који се углавном користе као органско ђубриво, као састојци за сточну храну или се директно одлажу на депонију као отпад (Бао *et al.*, 2020; Caldas *et al.*, 2018). Међутим, ови остаци озбиљно могу угрозити животну средину јер имају ниску рН вредност, висок садржај органске материје и могу деловати фитотоксично уколико заврше у усевима или води за наводњавање (Lavelli *et al.*, 2017).

Покожице грозђа садрже важне полифеноле попут проантоцијанидина, флавоноида, фенолних киселина и стилбена (Iuga and Mironeasa, 2020). Показало се да ове врсте једињења обављају различите физиолошке активности у људском телу, као на пример антиоксидативне активности које показују позитиван ефекат у превенцији кардиоваскуларних болести, затим активност у инхибицији ензима који су укључени у оксидативни стрес, дијабетес типа 2, хипертензију и упалне процесе (Apostolidis *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2014).

Може се закључити да покожице грозђа имају потенцијал да се као функционални додаци користе у производњи прехранбених производа, пре свега за повећање садржаја фенолних једињења (Kwiatkowski *et al.*, 2020), али и дијететских влакана (Stojanovic *et al.*, 2018). Споредни производи прехранбене индустрије богати дијететским влакнима могу се користити као функционални додаци у форми праха (Torres-León *et al.*, 2018). Хемијски профил покожица грозђа потврђује могућност њихове употребе за побољшање нутритивних и функционалних вредности прехранбених производа. Према (Iuga and Mironeasa, 2020), огроман потенцијал покожица грозђа може се успешно искористити у развоју нових формулација производа као функционалне хране. У Табели 2. приказане су неке од до сада истражених примена покожица грозђа као функционалног додатка у прехранбеној индустрији.

Табела 2. Примена покожица грозђа у прехранбеној индустрији

Споредни производ	Прехранбени систем	Примена	Коришћена литература
Покожице и полифеноли покожице грозђа	Месо и рибљи производи	Антиоксидативно дејство	Sáyago-Ayerdi <i>et al.</i> , 2009; Sanchez-Alonso <i>et al.</i> , 2008; García-Lomillo <i>et al.</i> , 2016
Покожице и полифеноли покожице грозђа	Месо и рибљи производи	Антимикробно дејство	García-Lomillo <i>et al.</i> , 2014
Покожице и полифеноли покожице грозђа	Безалкохолна пића и желирани производи	Природне боје	Maier <i>et al.</i> , 2009; Lavelli <i>et al.</i> , 2016a
Покожице и полифеноли покожице грозђа	Безалкохолна пића и желирани производи	Средства за побољшање текстуре	Lavelli <i>et al.</i> , 2015
Покожице и полифеноли покожице грозђа	Млечни производи	Повећање садржаја дијететских влакана и полифенолних једињења	Tseng and Zhao, 2013; Marchiani <i>et al.</i> , 2015
Покожице и полифеноли покожице грозђа	Побољшање микроструктуре коагулата млека за производњу сира	Побољшање реолошких својстава	Han <i>et al.</i> , 2011
Покожице грозђа	Паста	Повећање укупног садржаја полифенола и антиоксидативне активности	Gaita <i>et al.</i> , 2020
Покожице грозђа	Пшенично брашно	Повећање садржаја минералних материја, смањење садржаја засићених масних киселина кратких ланаца и повећање укупног садржаја незасићених масних киселина	Orrea <i>et al.</i> , 2018
Покожице грозђа	Пшенично тесто за хлеб	Производња обогаћеног хлеба, побољшање и оптимизација реолошких својстава теста	Mironeasa and Mironeasa, 2019

Неколико студија је показало да се споредни производи винске индустрије могу користити против микробиолошког кварења и патогених бактерија без ометања млечних култура и

других микроорганизама укључених у процесу ферментације, осигуравајући одржавање квалитета финалних млечних производа. Додавање различитих споредних производа из винске индустрије попут праха и екстраката комине грозђа, ферментисаних покожица и семенки грозђа у матрице млечних производа није ометало корисне бактерије нити протеолизу сира (Iriondo-DeHond *et al.*, 2018). Са друге стране, доказано је антимикуробно деловање полифенола споредних производа винске индустрије против патогена који се преносе храном, а који могу да продру у ћелијски зид патогена узрокујући поремећај мембране, оштећење мембранских протеина и ензима и структурне промене које доводе до смрти бактерија (Iriondo-DeHond *et al.*, 2018).

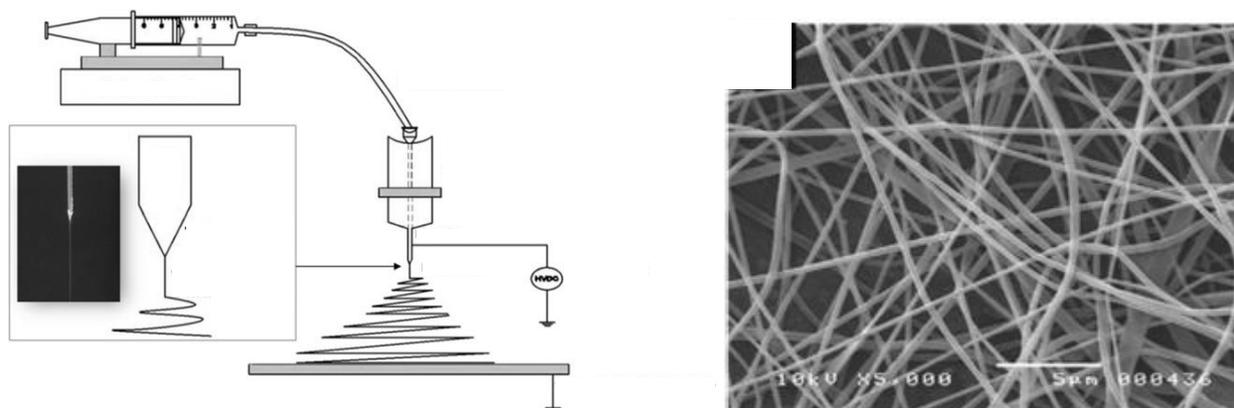
Све је већи тренд додавања дијететских влакана у прехранбене производе, као на пример у млечне и пекарске производе и производе од меса и готова јела. Влакнима богати споредни производи винске индустрије могу се уградити у прехранбене производе да би се побољшало задржавање воде и уља и побољшала својства емулговања, као и некалорична маса у циљу делимичне замене за масти, шећере или брашно (Kumar, 2018). Такође, све је већи тренд на тржишту и замена вештачких боја природним једињењима, мотивисана забринутошћу потрошача у погледу безбедности употребе синтетичких боја у исхрани, али и могућим здравственим користима природних пигмената. Антоцијани, који су носиоци црвене, плаве и љубичасте боје код грозђа, свакако испуњавају све услове да се користе као функционалне природне боје у прехранбеној индустрији.

Употребна вредност споредних производа индустрије вина је огромна, али са друге стране представља и веома изазован посао пре свега због стабилности споредних производа током њихове обраде до финалних функционалих додатака али и недостатка адекватних технолошких решења која би била примењива у индустријским условима производње. Такође се несмеју се занемарити ни фактори попут контаминације и безбедности употребе ових компонената у исхрани људи.

## **2.6 Електрохидродинамички процеси инкапсулације биоактивних једињења**

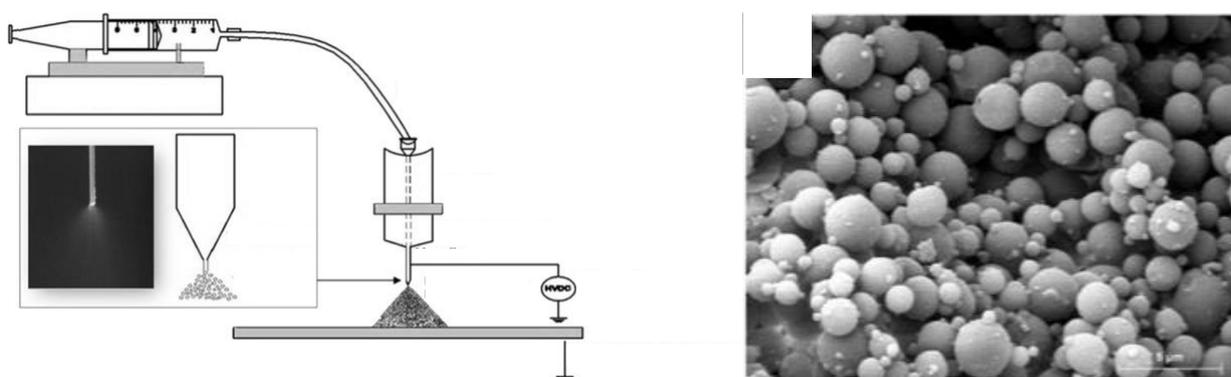
Електрохидродинамички процеси су у задње време од великог интереса због своје употребе у различитим областима. Деведесетих година прошлог века почело се са употребом ових процеса у наукама које се баве испитивањима материјала (Montini *et al.*, 2015). Процеси распршивања честица у електростатичком пољу (electrospraying и electrospinning) су најшире коришћене технике у нанотехнологији материјала. У основи, у обе технике, раствор полимера се под утицајем електростатичког поља високог потенцијала може распршити или заротирати у циљу добијања честица, односно влакана. Типична поставка за електроцентрифугирање (electrospinning) и електрораспршивања (electrospraying) састоји се од 4 главне компоненте: 1) извора високог напона (1 - 30 kV) који обично ради у режиму једносмерне струје, 2) капиларне игле од нерђајућег челика, 3) пумпе за шприц и 4) уземљеног колектора у виду равне плоче или ротирајућег бубња (Anu Bhushani and Anandharamakrishnan, 2014) Слика 11 и 12.

Разлика између техника електроцентрифугирања и електрораспршивања базира се на концентрацији раствора полимера. Када је концентрација раствора висока, млаз из Тејлоровог конуса је стабилан и његово издуживање се одвија увијањем Слика 11.



Слика 11. Типична лабораторијска поставка за процес електроцентрифугирања и слика добијених влакана. Преузето и пролагођено из литературе (Anu Bhushani and Anandharamakrishnan, 2014).

Ако је концентрација раствора ниска, због нестабилности полимерни млаз се дестабилизује у електричном пољу високог напона и тако настају ситне капљице (Anu Bhushani and Anandharamakrishnan, 2014) Слика 12.



Слика 12. Типична лабораторијска поставка за процес електрораспршивања и слика добијених капсула. Преузето и пролагођено из литературе (Anu Bhushani and Anandharamakrishnan, 2014).

Ове високо наелектрисане капљице се распршују у простору, чиме се спречава њихово накупљање и коагулација. У исто време, испаравање растварача доводи до скраћивања и очвршћавања капљица што резултира чврстим полимерним честицама накупљеним на уземљеном колектору. Обично овим електрохидродинамичким техникама добијамо влакна/честице у микронским ( $> 1 \mu\text{m}$ ), субмикронским или нано ( $10 - 1000 \text{ nm}$ ) размерама (Murashov and Howard, 2011).

Фокус овог истраживања био је на техници електрораспршивања из разлога што честице добијене поступком електрораспршивања показују одређене карактеристике погодније за употребу у прехранбеној и козметичкој индустрији у односу на друге технике. Неке од њих су: субмикронске и нано величине честица (широк спектар величина), контролисана морфологија честица, висок однос површине према запремини, порозна структура, могућност извођења поступка на собној температури, примена полимера дозвољених за употребу у

прехранбеној индустрији, висока ефикасност инкапсулације као и висока стабилност инкапсулисаних биоактивних супстанци (Anu Bhushani and Anandharamakrishnan, 2014).

Карактеристике методом електрораспршивања добијених капсула могу се контролисати подешавањем различитих параметара као што су системски параметри, параметри полимерног раствора, инструментални и амбијентални параметри. Системски параметри подразумевају молекулску масу и микроструктурне особине полимера. Врста и концентрација полимера као и употребљеног растварача одређују параметре раствора, а ту спадају рН вредност, проводљивост, вискозност и површински напон. Инструментални параметри подразумевају примењени електрични напон, брзину протока полимерног раствора криз систем, растојање између врха игле и колектора, а понекад и природу материјала од кога је колектор направљен. Амбијентални фактори као што су температура, влажност и брзина ваздуха у процесној комори заједно одређују брзину испаравања растварача из полимерног раствора који се распршује (Raghavan *et al.*, 2012).

Својства добијених честица чине електрораспршивање веома вредном техником у прехранбеној индустрији, јер омогућава стабилност биоактивних једињења осетљивих на спољашње услове (Faridi Esfanjani and Jafari, 2016; Jaworek, 2007; Khan *et al.*, 2012). У литератури постоји много студија везаних за инкапсулацију различитих биоактивних једињења, као на пример, инкапсулација фенола лишћа маслине у концентрату протеина сурутке (Soleimanifar *et al.*, 2020), инкапсулација ресвератрола у зеину (Jayan *et al.*, 2019), кверцетина у PLGA (poly lactic-co-glycolic acid) (Giannouli *et al.*, 2018), куркумина у желатину (Gómez-Estaca *et al.*, 2015), β-каротена у фруктану агаве (Ramos-Hernández *et al.*, 2018), између осталог.

Такође, неки аутори су инкапсулирали фенолна једињења као што су флавоноиди, антоцијанидини, хидроксициметне киселине и слично. Фенолна једињења су присутна у многим воћу и поврћу, у плодовима, корену, лишћу и другим деловима биљака. За ова једињења се везује неколико здравствено благотворних активности као што су антиинфламаторне, антимикробне, антиканцерогене и антиоксидативне способности (Rostamabadi *et al.*, 2021). Нека фенолна једињења су слабо растворљива у води, док друга имају слабу растворљивост у липидима. Међутим, различити фактори попут амбијенталних услова или дигестивне разградње могу довести до делимичног или чак потпуног губитка њихове биоактивности. Да би се спречила разградња и одржала биолошка активност, учињени су бројни покушаји да се ови биоактивни састојци инкапсулирају и заштите електрораспршивањем у микро/нано-капсуле полимерних носача.

### 3. НАУЧНИ ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ истраживања ове докторске дисертације био је оптимизирање услова обраде ферментисаних ПГ из споредних производа винске индустрије до потенцијалних функционалних прехранбених додатака. Као крајњи резултат представљен је шематски приказ обраде полазног материјала до крајњих производа у чврстом и полутечном стању. Ово се конкретно односи на добијање концентрованијег прашкастог и разблаженијег полутечног производа тачно дефинисаних димензија честица, полифенолног профила, антиоксидативног потенцијала, садржаја влакана и седиментационог понашања.

Оптимизација корака обраде ПГ била је базирана на што је могуће већем очувању антиоксидативног потенцијала полазног материјала уз што мањи утрошак енергије и времена обраде. Оптимизиран је такође и процес екстракције потребан за добијање екстраката из полазног материјала а након сваког корака обраде ради поређења са референтним узорком. Као референтни узорак за процену утицаја обраде на очување биоактивног потенцијала коришћен је екстракт добијен из праха лиофилизоване покожице грожђа. На основу поређења резултата израчунат је степен очуваности антиоксидативног потенцијала и појединачних фенолних једињења од интереса.

Од параметара након сваког корака обраде праћени су: садржај укупних фенолних једињења (Folin – Ciocâlteu тест), садржај проантоцијанидина (1-butanol / HCl метода), садржај индивидуалних фенолних једињења најзаступљенијих у покожици грожђа (HPLC метода) и *in vitro* способност редукције фери јона (FRAP метода). Од индивидуалних фенолних једињења праћена је количина: мономерних флаванола (катехин и епикатехин), антоцијана (делфинидин-глукозид, цијанидин-глукозид, петунидин-глукозид, пеонидин-глукозид, малвидин-глукозид, малвидин-паракумароил-глукозид), флавонола (кверцетин, кверцетин-глукозид и кемпферол), као и хидроксиметилфурфурала, јер сушење воћа изазива Мајлардове реакције које се обично процењују мерењем количине насталог хидроксиметилфурфурала. Сви ови параметри праћени су у свим фазама обраде биљног материјала.

Сушење и млевење коришћено је код добијања прашкастих додатака, док су бланширање, хомогенизација и пастеризација коришћени за добијање полутечних производа, који би требало да представљају алтернативу прашкастим производима. Анализирана је величина честица свих добијених додатака и поређена је са већ постојећим комерцијалним прашкастим производом покожица јабука.

Научни допринос ове докторске дисертације је што не постоје информације у литератури везане за могућност и ефекте обраде ферментисане ПГ до полутечних додатака за прехранбену индустрију који су интересантни пре свега што се избегава енергетски и временски захтеван корак сушења и што се отварају нове могућности примене. У том погледу предност полутечног производа се огледа у потенцијалној могућности да замени део или укупну количину технолошке воде у прехранбеним технологијама које захтевају велике количине воде.

Ради постизања ензимске стабилности полутечног производа користило се бланширање са циљем деактивације ензима из групе полифенол оксидаза и пероксидаза, а пастеризација ради постизања микробиолошке стабилности и безбедности крајњег производа. Из тог разлога, ефекти бланширања и пастеризације на очување фенолних једињења и антиоксидативног потенцијала представљају важне тачке овог истраживања.

Почетни циљ ове докторске дисертације проширен је истраживањима процене способности инкапсулације екстраката покожица грожђа техником електрораспршивања кроз матрицу протеина кукуруза (зеина) као носача. Сушење, екстракција и инкапсулација су кораци

коришћени за добијање нанокапсула екстраката ПГ. Ова техника је посебно интересантна из два разлога. Први разлог је тај што се техником електрораспршивања активна једињења инкорпорирају кроз полимерну матрицу која повећава стабилност, биорасположивост и контролисано ослобађање биоактивних једињења. Други разлог је тај што су се поред ферментисаних ПГ за инкапсулације користиле и покожице отпадног грождја из малопродајног објекта, а након губитка сензорних особина потребних за конзумирање у свежем стању. Ово такође представља новину у литератури.

Обављена је детаљна карактеризација свих крајњих производа, а на основу добијених резултата предложена је потенцијална употреба ових производа као прехранбених додатака. Предности употребе сваког од добијених додатака биле су дискутоване. Могућност примене прашкастих и полутечних производа као додатака прехранбеним производима разматрана је на основу поређења FRAP вредности са резултатима добијеним у опсежном истраживању спроведеног на Универзитету у Ослу у којем је измерена FRAP вредност преко 3100 најчешће конзумираних прехранбених производа и отворена могућност да се простим поређењем вредности види где добијени производи могу повећати антиоксидативну моћ намирнице. Могућност индустријске примене инкапсулисаних екстраката ПГ разматрана је на основу поређења резултата ових екстраката пре и после инкапсулације кроз матрицу полимерног носача.

Генерално, циљ овог рада био је да се развију иновативне технологије које би за циљ имале употребу споредних производа винске индустрије у циљу добијања потенцијалних функционалних прехранбених додатака. Ови функционални додаци би требало да обогате нове прехранбене производе у садржају антиоксидативног потенцијала и/или биљних влакана, а такође у појединим случајевима да послуже и као природне боје, обзиром на изражену црвено-љубичасту боју полифенолних једињења. Предложене технологије би представљале полазну основу за будућа истраживања везана за употребу и других споредних производа насталих током индустријске обраде биљног материјала.

## 4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

### 4.1 Материјали

#### 4.1.1 Хемикалије

За потребе анализирања ферментисаних покожица грозђа сорте Бербера и добијених потенцијалних додатака за прехранбену индустрију, стандарди флаванола (катехин и епикатехин), флавонола (кверцетин-3-О-глукозид и кверцетин агликон) и антоцијанина (делфинидин-3-О-глукозид, цијанидин-3-О-глукозид, петунидин-3-О-глукозид, пеонидин-3-О-глукозид, малвидин-3-О-глукозид) су купљени од Extrasynthese (Lyon, France). Све остале хемикалије су купљене од Sigma-Aldrich Italia (Milan, Italy).

#### 4.1.2 Сировине

За потребе развијања технологија обраде влажних, ферментисаних покожица грозђа до потенцијалних додатака за прехранбену индустрију, комина црвеног грозђа сорте Барбера набављена је из винарије са севера Италије (Слика 13). У винарији је комина грозђа пропуштена кроз сита величине пора од 5 mm да би се физички одвојиле покожице од семенки и евентуално петелки, а затим су издвојене покожице замрзнуте. Замрзнуте ПГ су потом транспортоване у лабораторију.



Слика 13. Изглед ферментисаних покожица грозђа сорте Барбера, као полазног материјала

Два комерцијална узорка дијететских влакана пореклом из покожица јабука набављена су са тржишта у циљу поређења са крајњим прашкастим производом који је добијен као резултат овог истраживања.

За потребе оцењивања антиоксидативног потенцијала три најзаступљеније сорте грозђа у производњи црвених вина у Србији, комине горжђа сорти Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc и Прокупац набављене су са Огледног добра Пољопривредног факултета Универзитета у

Београду „Радмиловац”. Из комине су уклоњене семенке и петељке након чега су ферментисане покожице транспортоване у лабораторију.

За потребе оцењивања способности инкапсулације екстраката покожица грожђа техником електрораспршивања кроз матрицу природног полимера зеина као носача, коришћена је осушена ферментисана комина (покожица + семенке) италијанске црвене сорте грожђа Sangiovese, као и лиофилизована сирова покожица српске аутохтоне сорте црвеног грожђа Прокупац, добијена из трговине, а након губитка сензорних особина неопходних за конзумирање у свежем стању.

## 4.2 Методе

### I Развијање технологија обраде ферментисаних ПГ до потенцијалних прашкастих и полутечних додатака за прехранбену индустрију

#### 4.2.1 Бланширање

Након што залеђене стигну у лабораторију, ПГ (са садржајем суве материје од око 20%) се одмрзавају и подвргавају третману бланширања у трајању од 1 и 2 минута. Бланширање је изведено воденом паром отпуштеном током загревања воде на 100 °С и наглим хлађењем у на 4 °С леду до амбијенталне температуре (25 °С) (Слика 14).



Слика 14. Бланширање ПГ у лабораторијским условима

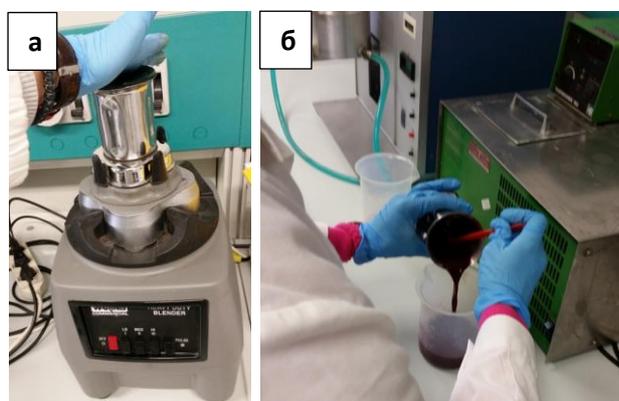
Узорци подвргнути третману бланширања у трајању од 2 минута показали су повећани степен очуваности антоцијанина, за које се сматра да је грожђе главни извор, а за која је доказано да поседује бројна здравствена својства (Clifford, M. N. 2000). Такође, узорци бланширани у трајању од 2 минута нису показали никакву активност ензима из групе PPO и POD и стога је истраживање настављено са тим узорцима, паралелно са небланшираном ПГ као контролним узорком.

#### 4.2.2 Хомогенизација

Бланширане и небланширане ПГ су разређене са 8,0 mM калијум цитратним пуфером, рН 3,0 у односу 1 : 10 (2% с. м.) и у односу 1 : 2 (10% с. м.) ради олакшавања млевења (влажно млевење). Пуфер за разређивање је изабран узимајући у обзир да је стабилност антоцијана максимална при рН 3,0 (Reyes and Cisneros-Zevallos, 2007).

Влажно млевење је обављено у уређају Waring Blender у трајању од 1 минута на 1700 грм (Слика 15а). Након влажног млевења са небланшираним узорцима ПГ није се наставило са даљим процесним корацима, док су бланширане ПГ даље хомогенизоване и пастеризоване.

Бланширани 10% ПГ узорци су даље хомогенизовани продуженим млевењем у уређају Waring Blender у трајању од 3,5 минута (Слика 15б).



Слика 15. а. Хомогенизација ПГ у хомогенизатору Waring Blender; б. Изглед бланшираног узорка након хомогенизације

Бланишаране 2% ПГ су у атмосфери азота претрпеле други степен хомогенизације помоћу хомогенизатора Ultra-Turrax у трајању од 1 минута на 15000 грм (Слика 16).



Слика 16. Хомогенизација бланшираних ПГ са 2% с. м. у атмосфери азота у хомогенизатору Ultra-Turrax

### 4.2.3 Пастеризација

Након обављеног бланширања и хомогенизације, оба (2% ПГ и 10% ПГ) узорка су била подвргнута процесу пастеризације (Слика 17) у циљу постизања шестостепене децималне редукције (6D) циљаног микроба *Alicyclobacillus acidoterrestris*, као што је претходно описано (Lavelli *et al.*, 2014).



Слика 17. Пастеризација узорка ПГ

### 4.2.4 Сушење у струји загрејаног ваздуха

Као алтернативни третман, део одмрзнутих ПГ био је осушен у струји топлог ваздуха загрејаног на температури 50 - 55 °C у трајању од приближно 3,5 часова, то јест све док резидуална влага није пала испод < 5% (Слика 18). Осушена ПГ је затим самлевена у уређају Waring Blender у трајању од 3,5 минута (узорак AD). Добијени прах је био просејан коришћењем Octagon Digital sieve shaker (Endecotts Ltd., London, UK), са сертификованим ситом пречника 500  $\mu\text{m}$ .



Слика 18. Сушење ПГ у струји загрејаног ваздуха

#### 4.2.5 Сушење лиофилизацијом

Самлевен, лиофилизован узорак (Слика 19) био је анализиран као референтан (FD), за рачунање степена очуваности фенолних једињења и редукујућег капацитета осталих, полутечних и прашкастих ПГ узорака. За лиофилизацију је коришћен лиофилизатор Edwards Minifast MFD 01 freeze- dryer, UK.



Слика 19. Лиофилизованани узорци ПГ

#### 4.2.6 Садржај влаге, влакана, протеина, угљених хидрата и масти у ферментисаним ПГ

Садржај влаге ферментисаних покожица грожђа је одређен сушењем у вакуум сушници на температури од 70 °C у трајању од 18 часова. рН вредност је одређена рН метром (Sartorius, Ravenna, Italy). Садржај протеина, масти, угљених хидрата и дијететских влакана је измерен у лиофилизованом узорку ПГ пратећи званичне методе предложене од стране Association of Official Analytical Chemists, (AOAC, 1990). Садржаји глукозе и фруктозе су одређени као што је претходно описано (Guerrieri *et al.*, 1997).

#### 4.2.7 Одређивање расподеле величине честица

Анализа расподеле величине честица (particle size distribution (PSD)) узорака ПГ и комерцијалних дијететских влакана јабуке је изведена пратећи спецификације објављене у међународном стандарду (ISO 13320, 2009) коришћењем Malvern 2000 ласерског гранулометра (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) опремљеног са монохроматским ласерским извором на таласној дужини  $\lambda = 633 \text{ nm}$ . Узорци су разређени са дејонизованом водом (у односу 1 : 500). Рачунање расподеле величине честица и њихов опис су спроведени подразумевајући сверичан облик честица са повећаном осетљивошћу прорачуна. Разматрани параметри су подразумевали средњу вредност површинског пондерисаног пречника ( $\mu\text{m}$ ), то јест,  $D[3,2]$ , такође познату као Саутеров средњи пречник (Sauter mean diameter) и средњу вредност пречника пондерисаног запреминског момента ( $\mu\text{m}$ ), или  $D[4,3]$ , који су дефинисани као:

$$D[3,2] = \frac{\sum_i n_i d_i^3}{\sum_i n_i d_i^2}$$

$$D[4,3] = \frac{\sum_i n_i d_i^4}{\sum_i n_i d_i^3}$$

Где  $d_i$  представља  $i$ -ту класу пречника док је  $n_i$  одговарајући број честица по јединици запремине. Ширина дистрибуције, то јест распон, дефинише се као:

$$\text{Span} = \frac{(d_{0.9} - d_{0.1})}{d_{0.5}}$$

Где  $d_{0.1}$ ,  $d_{0.5}$ , и  $d_{0.9}$  представљају 10, 50, и 90% квантила, респективно.

#### 4.2.8 Одређивање активности ензима полифенол оксидазе (PPO) и пероксидазе (POD)

Пре самог одређивања активности ензима PPO и POD у полазном материјалу, 50 g ПГ (са 20% с. м.) је додато у 500 ml McIlvaine пуфера са рН вредношћу од 6,5, 1M натријум хлорид, и 5% (w / w) поливинилполипиролідона. Смеша је хомогенизована у уређају Waring Blender у трајању од 1 минута на 1700 rpm а након тога центрифугирана (10000 xg у трајању од 10 минута). Узорци свежих јабука су коришћени као контрола. Ензимске активности су оцењиване у супернатанту.

Активност ензима PPO узорака ПГ је одређена пратећи методе објашњене у раду (Alvarez-Parrilla *et al.*, 2007) и изражена на бази свежје масе као произвољна јединица (arbitrary unit), то јест,  $\Delta A_{400 \text{ nm}} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Активност ензима POD узорака ПГ је одређена пратећи методе коришћене у раду (Ahn *et al.*, 2007) и изражена на бази свежје масе као бој pmol гвајакола  $\cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Моларни апсорциони коефицијент (екстинкциони коефицијент) гвајакола на таласној дужини 470 nm износи 26,6  $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.2.9 Раствор за екстракцију узорака

Растварач за фенолну екстракцију узорака добијен је мешањем метил алкохола, дестиловане воде и хлороводоничне киселине у односу 80 : 20 : 0,1 v / v / v. У балону смо помешали 800 ml метил алкохола, 200 ml дестиловане воде и 1 ml хлороводоничне киселине. Раствор за екстракцију има рН вредност 1 због додате хлороводоничне киселине у циљу постизања максималне стабилности узорака током чувања. Због тога узорке можемо чувати и на +4 °C али за дуже чување се ипак препоручује чување на -20 °C.

#### 4.2.10 Фенолна екстракција

Фенолна екстракција ферментисаних покожица грожђа обављена је са растварачем који се састоји из смеше метил алкохола, воде и хлороводоничне киселине (80 : 20 : 0,1, v / v / v). Ова метода изведена је као што је претходно описано у (Lavelli *et al.*, 2016a), а развијена је на истом одсеку на коме је и ово истраживање највећим делом спроведено, а у оквиру експеримената (Sri Narsha *et al.*, 2013). За сваки узорак извршене су дупле екстракције.

Ради поједностављења експерименталног рада, горе наведена метода је благо модификована у делу који се односи на количину биљног материјала коришћеног за екстракцију. Уместо 0,1 g, коришћени су аликвоти у количини од 1 g биљног материјала. Све друго је остало непромењено.

Сваки први од три степена екстракције обавили смо тако што смо измерили око 1 g самлевених покожица грожђа и додали их у епрувету са 8 cm<sup>3</sup> смеше метил алкохола, воде и хлороводоничне киселине (80 : 20 : 0,1, v / v / v), и пустили да се екстрахује у епрувети у трајању од 2 сата на собној температури при константном мешању на магнетној мешалици.

За екстракцију смо имали две опције, да је обавимо у уским или у широким епруветама. За пробу смо узели по 1 g узорка и по 8 cm<sup>3</sup> дестиловане воде и убацили у обе епрувете. Убацили смо у сваку епрувету по један мали магнет и епрувете пренели на магнетну мешалицу. Изабрали смо ужу епрувету јер је стуб течности у њој виши, боље се уочава боја узорка а и магнет се јаче врти, али је велики део узорка изнад магнета.

Метанол смо изабрали да буде доминантан растварач јер он екстрахује сва растворљива фенолна једињења те добијамо најпотпунију информацију, а заостају само полимери који су нерастворни али који су присутни у јако малим количинама и нису нам били од значаја.

У одабране епрувете смо додали по 1 g покожице, 8 ml растварача и један магнетић и затворили смо их запущачем. По шест епрувета премештамо у чашу, а чашу на магнетну мешалицу. Епрувете прекривамо алуминијумском фолијом и чекамо 2 сата да се обави екстракција фенолних једињења (Слика 20).



Слика 20. Екстракција фенолних једињења узорака покожица грожђа

Након 2 сата екстракције гасимо магнетну мешалицу, уклањамо магнете, враћамо затвараче и епрувете носимо на центрифугу. Центрифугирање се обавља на температури од 15 °C у трајању од 10 минута на 10000 xg (Слика 21).



Слика 21. Центрифугирање узорака након екстракције

На претходно припремљене тамне бочице од по 20 ml залепили смо налепнице на које смо написали ознаке узорака и датум (Слика 22).



Слика 22. Тамне бочице за чување екстракта ПГ

Изабрали смо бочице од 20 ml јер смо прву екстракцију радили са 8 ml растварача, а други и трећу екстракцију са по 6 ml растварача што претставља укупну количину од 20 ml. Након завршеног центрифугирања пажљиво, без нарушавања талога, епрувете из центрифуге пребацујемо на сталак, скидамо затвараче и супернатанте пажљиво пипетом пребацујемо у тамне бочице од 20 ml (Слика 23).



Слика 23. Изглед екстракта након центрифугирања

Ако при дну епрувете заостане мало супернатанта са честицама талога, остављамо га за наредну екстракцију да не би нарушили чистоћу узорка. У епрувете са талогом смо затим додали 6 ml растварача и цео поступак екстракције, центрифугирања и издвајања супернатанта идентично понављали још два пута. Приметили смо да је супернатант након сваке следеће екстракције све мање интензивне боје јер је концентрација антоцијана све нижа. На крају обављене треће екстракције сва три супернатанта комбинујемо у тамним бочицама запремине 20 ml па бочице преносимо на  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ради дужег чувања (узорци су стабилни на тој температури јер садрже метанол) или на  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  уколико их користимо на дневном нивоу.

Желим само да напоменем да се свака употреба метанола обављала у лабораторијском дигестору са укљученим аспиратором, а ради обезбеђења максималне стабилности полифенолних једињења у дигестору се радило са угашеним светлом.

#### 4.2.11 HPLC карактеризација

HPLC карактеризација је обављена као што је претходно описано у (Lavelli *et al.*, 2016a). За сваки узорак изведена је екстракција у дубликату, а резултати су изражени као број mg/kg производа и као % степен очуваности појединачних једињења у узорцима у односу на лиофилизовану узорак.

#### 4.2.12 Укупан садржај фенолних једињења, садржај растворљивих проантоцијанидина и FRAP тест

Folin – Ciocâlтеu тест и FRAP тест су изведени као што је претходно описано у (Lavelli *et al.*, 2016a). Укупан садржај фенолних једињења је изражен као број g еквивалената галне киселине (GAE) по kg производа. FRAP вредности су изражене као број mmol еквивалената Fe (II) сулфата по kg производа.

Растворљиви проантоцијанидини су измерени на начин који је претходно описан у (Lavelli *et al.*, 2016a). Укратко, 1 ml узорка екстракта разређеног са раствором метил алкохола, воде и хлороводоничне киселине (80 : 20 : 0,1, v / v / v) је додат у 6 ml *l*-бутанол : хлороводонична киселина (95 : 5, v / v) и 0,2 ml 2%  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  у 2 mol/dm<sup>3</sup> HCl. Хидролиза је изведена на температури од  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  у трајању од 40 минута. Реакционе смеше су охлађене и абсорбације мерене на таласној дужини 550 nm преко Jasco UVDEC-610 спектрофотометра (Jasco Europe, Cremella, Italy) у односу на слепу пробу направљену исто као и узорак али инкубирану на собној температури. За сваки узорак екстракта рађена су 2 - 4 разблажења у дубликату. Садржај растворљивих проантоцијанидина је изражен као број g по kg производа. Исте вредности су такође изражене и као % степена очуваности ових једињења у односу на лиофилизовану узорак.

#### 4.2.13 Статистичка анализа података

Експериментални подаци су анализирани преко једносмерне ANOVA статистичке анализе коришћењем најмање значајне разлике (least significant difference - LSD) у виду теста вишеструких интервала и анализама линеарне регресије коришћењем софтвера Statgraphics 5.1 (STCC Inc., Rockville, MD). Резултати су приказани као просечна вредност  $\pm$  стандардна грешка (SE).

## II Оцењивања антиоксидативног потенцијала три широко заступљене сорте грожђа у производњи црвених вина у Србији: Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc и Прокупац

Одлучено је да се у овом истраживању антирадикалска активност екстракта покожица грожђа одреди помоћу електронске парамагнетне резонантне спектроскопије (ЕПР), јер је ЕПР метода супериорнија у односу на друге спектроскопске методе због тога што код ове методе резултат не зависи од оптичких карактеристика узорака (није потребан индекс рефракције и није битно да ли је узорак обојен или није) и има веома високу осетљивост.

### 4.2.14 Припрема узорака за одређивање садржаја укупних полифенола и ЕПР мерења

Из узорака ферментисаних покожица најзаступљенијих винских сорти црвеног грожђа у Србији, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc и Прокупац уклоњене су семенке, након чега су покожице сушене у дехидратору на 60 °С, до постизања садржаја воде од 4% (установљено сушењем у сушници на 105 °С до константне масе).

Осушене покожице су самлеване у фини прах употребом млина у интервалима од 10 секунди са паузама од 30 секунди да би се избегло прегревање. Потом је прах просејан кроз сито величине пора од 100  $\mu\text{m}$ .

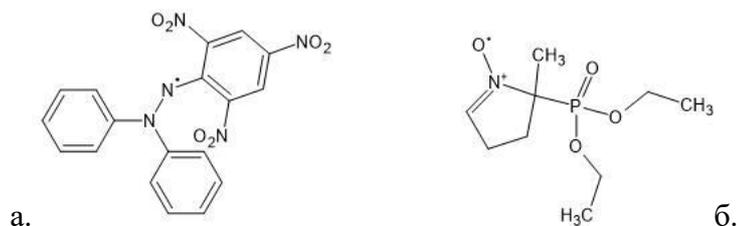
Екстракција активних компоненти из узорака извршена је у EtOH, односно MeOH у односу 1 / 10 (сува материја/растварач, масено) (Nakarada *et al.*, 2021). Након одмеравања масе узорака у ерленмајерима и додавања одговарајуће количине растварача, ерленмајери су затворени силиконским септумом, постављени на орбитални шејкер и унети у инкубатор. Екстракција је вршена 5 сати на температури од 40 °С, при чему је шејкер био подешен на 100 ротација у минути. Чврсти остатак је уклоњен филтрацијом кроз Бихнеров левак, након чега су филтрати центрифугирани 10 минута на 10000 ротација у минути. Супернатанти су одвојени, пропуштени кроз филтер од 0,2  $\mu\text{m}$  и чувани на -80 °С до даље употребе у експериментима.

### 4.2.15 Одређивање укупног садржаја фенола (Folin – Ciocâlteu тест)

У циљу одређивања укупног садржаја фенолних једињења у екстрактима ПГ, употребљена је процедура доступна у литератури (Stanković, 2011). У микроцентрифушкој тубици од 1,5 ml помешано је појединачно 100  $\mu\text{l}$  сваког анализираног екстракта са 500  $\mu\text{l}$  Folin – Ciocâlteu реагенса (концентрације 10%). Узорци су кратко вортексирани и инкубирани 3 минута на собној температури. Потом је у сваку тубицу додато по 500  $\mu\text{l}$  раствора NaHCO<sub>3</sub> (концентрације 7,5%). Тубице су вортексирани, па инкубирани 45 минута на температури од 45 °С. Након тога, мерена је апсорбанција сваког узорка на 765 nm. За конструисање калибрационе криве, уместо екстракта користи се 100  $\mu\text{l}$  раствора галне киселине различитих концентрација: 10, 20, 50, 70, 80, 100, 120, 140, 160 mg / l. Празно (бланк) представља нулту концентрацију, и припреман је додатком одговарајућег растварача (MeOH односно EtOH) уместо 100  $\mu\text{l}$  екстракта.

#### 4.2.16 Одређивање антирадикалске активности екстракта покожица грожђа употребом електронске парамагнетне резонантне (ЕПР) спектроскопије

Ефикасност екстракта покожица одабраних врста грожђа у елиминацији слободних радикала испитивана је спрам две радикалске врсте: хидроксилног ( $\cdot\text{OH}$ ) и 2,2-дифенил-1-пикрилхидразилског (DPPH) радикала (Слика 24а).  $\cdot\text{OH}$  радикал је једна од најреактивнијих кисеоничних радикалних врста, укључена у патофизиолошке процесе који доводе до појаве или даљег развоја многих болести, посебно неуродегенеративних. Пошто је ова радикалска врста краткоживећа, употребљена је ЕПР техника хватања спинова, где је 5-(диетоксифосфорил)-5-метил-1-пиридин-*N*-оксид (DEPMPO) (Слика 24б) послужио као хватач спинова. Ово једињење само по себи није ЕПР активно, али у реакцији са  $\cdot\text{OH}$  радикалима гради спински адукт који има карактеристичан ЕПР спектар. DPPH радикал нема биолошку релевантност јер не постоји у живим системима, али је општеприхваћен као стандард за испитивање антирадикалских активности. Пошто је ова радикалска врста изузетно стабилна, може бити директно детектована применом ЕПР метода.



Слика 24. а. Молекул DPPH радикала; б. DEPMPO молекул

За потребе испитивања анти-хидросил радикалске активности екстракта, узорци су за ЕПР снимања припремани по претходно утврђеном поступку (Nakarada *et al.*, 2020), на следећи начин: у микроцентрифушку тубицу одмерено је 2  $\mu\text{l}$  одговарајућег MeOH односно EtOH екстракта, додато је 24  $\mu\text{l}$  дејонизоване воде и 1  $\mu\text{l}$  DEPMPO (коначна концентрација 3,5 mM), након чега су  $\cdot\text{OH}$  радикали генерисани у Фентоновој реакцији, додатком 1  $\mu\text{l}$  раствора  $\text{FeSO}_4$  (коначна концентрација 0,15 mM) и 2  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (коначна концентрација 0,35 mM). Овако припремљен узорак увучен је у танко тефлонско црево, оно затим пренето у кварцну ЕПР кивету и постављено у ЕПР резонатор. Снимање је извршено 2 минута након генерирања  $\cdot\text{OH}$  радикала.

За потребе испитивања анти-DPPH активности екстракта, узорци су припреми према поступцима раније описаним у литератури (Nakarada *et al.*, 2021), тако што је у микроцентрифушкој тубици 1  $\mu\text{l}$  екстракта покожице додат у 29  $\mu\text{l}$  раствора DPPH у одговарајућем растварачу (коначна концентрација 210  $\mu\text{M}$ ). Овако припремљен узорак увучен је у танко тефлонско црево, које је потом унето у кварцну ЕПР кивету постављену у ЕПР резонатор. Снимање је извршено 2 минута након додавања екстракта у раствор DPPH.

ЕПР мерења вршена су при следећим експерименталним параметрима: центар магнетног поља 3500 G, снага микроталасног извора 10 mW, фреквенција микроталаса 9,85 GHz, модулациона фреквенција 100 kHz, модулациона амплитуда 1 G (за DPPH 2 G) на спектрометру модела Bruker ELEXSYS-II E540 operating in X-band (Слика 25). Као контрола при детекцији обе радикалске врсте запремина екстракта замењена је истом запремином одговарајућег растварача.



Слика 25: ЕПР спектрометар

III Оцењивање способности инкапсулације екстракта покожица грожђа сорте Прокупац и Sangiovese техником електрораспршивања кроз матрицу природног полимера као носача

#### 4.2.17 Садржај влаге у ПГ

Садржај влаге у узорцима ПГ одређен је сушењем у вакуум сушници. Три грама сваког од узорака пребачено је у Петријеву шољу и загревано на 100 °C до постизања константне масе. Сви узорци су рађени у дупликату (Слика 26).



Слика 26. Изглед осушених покожица грожђа

#### 4.2.18 Припрема узорака

Оба узорка су припремљена на начин да се обезбеди што је могуће већа додирна површина између биљног материјала и растварача. Узорак ферментисаних ПГ сорте Sangiovese је припремљен ситњењем у авану са тучком док је узорак неферментисаних ПГ сорте Прокупац, због високог садржаја шећера, морао да се уситни сецкањем маказама (Слика 27).



Слика 27. Ситњење узорака ПГ, лево Sangiovese, десно Прокупац

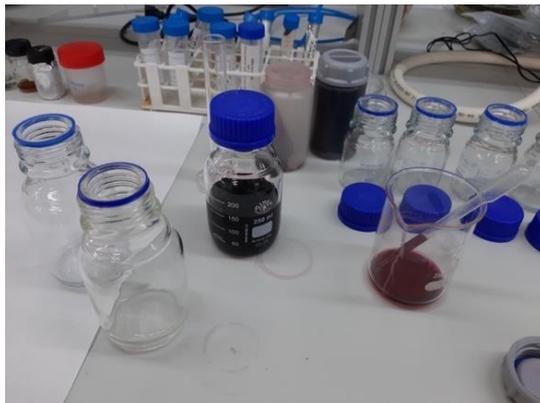
#### 4.2.19 Екстракција

Екстракција узорака покожица грожђа је била спроведена као што је описано у раду Romero-Díez *et al.*, 2019, под насловом 2.3.1.1. „конвенционална чврсто-течна екстракција”. Укратко, 1 грам узорка је додат у боцу са 10 ml растварача (1 : 10), боца се затим херметички затвара, обавија алуминијумском фолијом и оставља преко ноћи на магнетној мешалици да се обави екстракција (Слика 28). Као растварач коришћен је 70% етанол коме је хлороводничном киселином рН вредност подешена на 2,5 ради што веће стабилности добијених полифенолних екстраката.



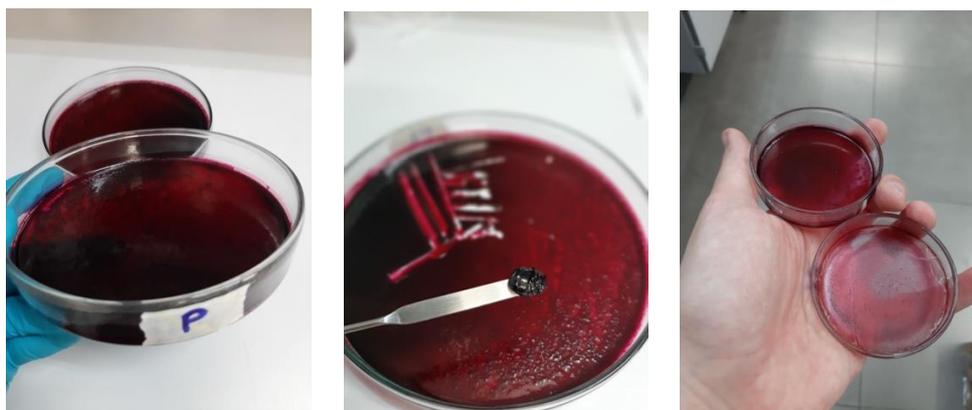
Слика 28. Екстракција узорака ПГ грожђа

Након извршене екстракције узорци су центрифугирани на 10000 rpm у трајању од 15 минута, а супернатант је пажљиво одвојен од талога који је јако нестабилан и потребно је водити рачуна да се не наруши (Слика 29). У неким случајевима потребно је било обавити поновно центрифугирање. Добијени екстракти се чувају у фрижидеру заштићени од утицаја светлости.



Слика 29. Одвајање супернатанта од талога након центрифугирања

Садржаја сувог остатка одређен је тако што је по 50 ml сваког екстракта пребачено у Петријеву шољу, а затим је растварач уклоњен испаравањем у лабораторијском дигестору до момента постизања константне масе. У мом случају, испаравање растварача из 50 ml екстракта трајало је 3 дана у лабораторијском дигестору и једну ноћ у вакуум сушници на 40 °C (Слика 30). Сваки од узорака је рађен у дупликату.



Слика 30. Изглед сувог остатка узорака екстракта ПГ Sangiovese и Прокупац

#### 4.2.20 Одређивање садржаја укупних шећера у ПГ и екстрактима методом по Luff-Schoorl-у

Одређивање садржаја укупних шећера методом по Luff-Schoorl-у обављено је као што је претходно описано у (Asquieri *et al.*, 2019) уз неколико модификација везаних за прилагођавање узорцима ПГ.

Чврст узорак ПГ се уситни и хомогенизује у тарионику са пистилом. Узорак се одмери, а потом се дода дестилована вода и греје 40 минута на температури од 50 °C. Садржај се филтрира у нормалном суду од 100 ml и допуни дестилованом водом. 50 ml овог раствора се пренесе у нормални суд од 250 ml и дода реагенс за бистрење Carez I и II, добро промућка, а потом нормални суд допуни дестилованом водом до црте, а потом филтрира. 50 ml филтрата се пренесе у нормални суд од 100 ml, дода 1 ml концентроване HCl и загрева 30 минута на 60 °C. Раствор се неутралише са 40% NaOH и допуни дестилованом водом. У ерленмајер се дода раствор узорка и Luff-ов раствор. Ерленмајер се загрева на пламену, повезан са вертикално

постављеним повратним кондензатором. У охлађени ерленмајер се дода KI, а потом и H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Издвојени јод се третира 0,1 М раствором натријум-тиосулфата (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) уз скроб као индикатор. На основу разлике броја милилитара натријум-тиосулфата утрошених за титрацију следеће пробе и анализе, из таблице за одређивање шећера се чита количина шећера у аликвоту, а затим се израчуна садржај шећера у узорку. Резултати представљају средњу вредност три независна мерења и изражавају се у % узорка (односно број mg шећера по 100 g узорка).

#### 4.2.21 Одређивање укупног садржаја фенола (Folin – Ciocâlțeu тест) екстраката ПГ и добијених капсула

Одређивање укупног садржаја фенола (УСФ) у екстрактима и капсулама ПГ обављено је помоћу спектрофотометријске методе, као што је описано у истраживању (Vázquez-González *et al.*, 2020). Реакционе смеше су се састојале од: 1 ml од сваког екстракта (разређење 1 : 100) је одмерено и додато у волуметријске тиквице (10 ml) у које је затим додато по 0,8 ml Folin – Ciocâlțeu 2 N фенолног реагенса (Sigma-Aldrich St. Lois, MO, USA) и смеша добро промешана. Након мешања додато је 0,2 ml 20% натријум карбоната (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Запремина је подешена на 10 ml са дестилованом водом. Смеше су потом инкубирани 90 минута у мраку, на собној температури. Након периода инкубације се приступило читавању апсорбанције на 760 nm на спектрофотометру UV4000 (Dinko Instruments, Barcelona, Spain).

Гална киселина је коришћена као стандард, а резултати су приказани као број mg еквивалената галне киселине (GAE) / g с. м. Калкулација извршена преко следеће једначине:

$$\text{УСФ}(\text{mg GAE} / \text{g с. м.}) = Z(\text{mg} / \text{ml}) \cdot V(\text{ml}) \cdot v(\text{ml}) / \text{с. м.}$$

Где Z представља концентрацију, V представља укупну запремину у волуметријској тиквици, док v представља запремину растварача.

#### 4.2.22 Одређивање антиоксидативне активности (DPPH и ABTS тест)

Антиоксидативна активност екстраката и капсула ПГ је одређена ATBS и DPPH методама као што је описано у (Ramos-Bell *et al.*, 2020). Метода је благо модификована и прилагођена узорцима ПГ. Спектрофотометар UV4000 (Dinko Instruments, Barcelona, Spain) је био коришћен за читање апсорбанције код обе методе.

Укратко, ABTS метод је изведен тако што се помеша 7 mM ABTS реагенс (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) са 2,4 mM калијум персулфат (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) у дестилованој води (0,180 g ABTS реагенса + 0,033 g K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> у 50 ml дестиловане воде). Раствор је инкубиран у мраку, на собној температури уз константно мешање на магнетној мешалици у трајању од 16 часова. ABTS раствор се након инкубације разређују са дестилованом водом док апсорбанција на 743 nm не буде 0,7 ± 0,02. Та вредност апсорбанције се забележи и у односу на њу се прати антиоксидативна активност узорака.

Када су у питању екстракти ПГ сорте Прокупац и Sangiovese, припремљена је серија разблажења екстраката са етил алкохолом: 10, 20, 30, 40 и 50 µl екстракта је разблажено са 990, 980, 970, 960 и 950 µl етил алкохола респективно. Након разблаживања по 50 µl од сваког разблаженог узорка се дода у 950 µl ABTS раствора, садржај добро измеша и остави 30 минута да одстоји у мраку. Након тога се приступа мерењу апсорбанције на 743 nm. Мерење је за сваки узорак извршено у трипликату.

Подаци су анализирани као проценат инхибиције АВТС радикала (% АВТС) у поређењу са контролним узорком (раствором без екстракта) преко следеће једначине:

$$\% \text{ АВТС инхибиције} = (A_0 - A_1) / A_0 \cdot 100$$

где  $A_0$  представља вредност абсорбанције контролног АВТС раствора, а  $A_1$  представља вредност абсорбанције раствора узорка. Резултат је изражен као концентрација екстракта при којој се остварује 50% АВТС инхибиције.

Одређивање антиоксидативне активноти екстракта и капсула ПГ DPPH методом одрађено је тако што се прво припремио DPPH раствор концентрације 0,04 g / l (8 mg DPPH реагенса (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) + 200 ml метил алкохола). Потом је DPPH раствор инкубиран у мраку 30 минута на собној температури. Потом се за екстракте ПГ сорте Прокупац и Sangiovese припрема серија разблажења екстракта са етил алкохолом: 10, 20, 30, 40 и 50  $\mu$ l екстракта је разблажено са 990, 980, 970, 960 и 950  $\mu$ l етил алкохола респективно. Након разблаживања по 0.1 ml од сваког разблаженог узорка се дода у 1,9 ml 0,094 mM DPPH раствора (0,04 g / l), садржај добро измеша и остави 30 минута да одстоји у мраку. Капацитет хватања слободних радикала је одређен мерењем абсорбанције на 517 nm. Контролни узорак је био чист DPPH раствор, а бланк узорак метил алкохол. Абсорбанције су морале да буду у рангу 0,2 до 0,8 да би се гарантовао Ламберт-Беров закон. Мерење је за сваки узорак извршено у трипликату.

Процент инхибиције DPPH радикала је израчунат преко следеће једначине:

$$\% \text{ DPPH инхибиције} = (A_{\text{контрола}} - (A_{\text{узорак}} - A_{\text{бланк}})) / A_{\text{контрола}} \cdot 100$$

где  $A_{\text{контрола}}$  представља вредност абсорбанције DPPH контролног раствора, док  $A_{\text{узорак}}$  представља вредност абсорбанције раствора узорка. Резултат је изражен као концентрација екстракта при којој се остварује 50% DPPH инхибиције.

#### 4.2.23 Карактеризација полимерних раствора

Карактеризација раствора извршена је у погледу електричне проводљивости, вискозности и површинског напона, као што је описано у раду (Vázquez-González *et al.*, 2021). Електрична проводљивост је анализирана помоћу мултипараметарског потенциометра, Hanna Instruments HI-4521 (Melrose, MA, USA). Сonda се урања у 20 ml узорка у Фалкон епрувети док се сензор комплетно не прекрије слојем узорка и вредност на екрану стабилизује, тада се читава вредност електричне проводљивости. Вискозност је измерена помоћу ротационог вискозиметра, Visco Basic Plus L (Fungilab S. A., Sant Feliu de Llobregat, Spain). Вретено тип L1 је постављено на вискозиметар, а 20 ml узорка је сипано у Фалкон епрувету, а потом у исту епрувету уроњено вретено и измерена вредност вискозности. Површински напон мерен је тензиометром силе модела K20 EasyDyne (Krüss GmbH, Hamburg, Germany), методом Вилхелм плоче (Wilhelmy plate). 20 ml узорка је стављено у кристализатор, затим је Вилхелм плоча очишћена пиролизом и обешена за клатно. Кристализатор са узорком је затим постављен на платформу за анализу узорка и мерење су силе интеракције Вилхелм плоче са узорком. Ова мерења су извршена у трипликату на собној температури.

#### 4.2.24 Инкапсулација електрораспршивањем

За инкапсулацију екстракта грожђа коришћен је изолат протеина кукуруза зеин, као зидни материјал. На основу информација из литературе (Miguel *et al.*, 2019), пробали смо мешање

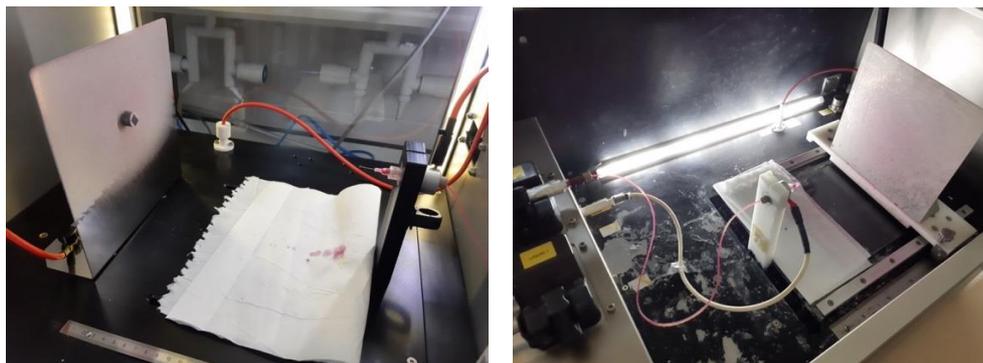
екстракта грозђа са 3 - 6% зеина у етанолу и најбоље се показао раствор екстракта са 6% зеина у 70% етанолу.

Екстракти грозђа су одложени у лабораторијски дигестор ради уклањања растварача испаравањем након чега се додаје 6% раствор зеина у запремини испареног растварача (раствор 6% зеина : екстракт = 10 : 1). Раствор је мешан преко ноћи у мраку на магнетној мешалици.

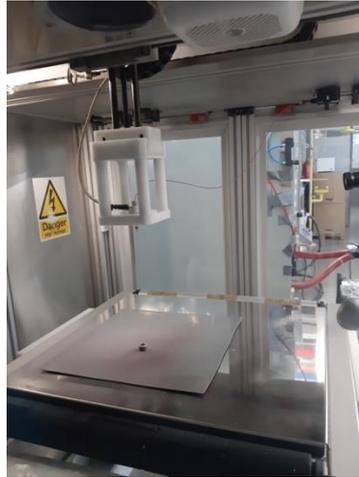
Процес електрораспршивања је изведен као што је претходно описано у раду (Vázquez-González *et al.*, 2021), уз одређене модификацију у циљу прилагођавања узорцима ПГ и зеину као зидном материјалу. Свеже припремљени полимерни раствор (екстракти ПГ + зеин) пребаци се у пластични шприц запремине 5 ml, а шприц потом повеже са специјално дизајнираном пумпом помоћу које се контролише брзина протока раствора. Затим се шприц повеже преко PTFE цевчице са иглом од нерђајућег челика која се налази на крају цевчице. Позитивна електрода високонапонског напајања се повезује на иглу, а негативна за колектор са друге стране. Затим се пумпа стартује и раствор контролисаном и константном брзином протока распршује у електричном пољу. Такође се контролише и удаљеност између врха игле и равног колектора, као и температура атмосфере, фактори од којих зависи брзина испаравања растварача. Празне капсуле зеина су такође припремљене, као контрола, коришћењем истих оперативних услова.

Испробано је више комбинација различитих фактора, укључујући величину отвора игле (тип игле), брзину протока раствора, примењени напон, удаљеност између врха игле и колектора као и температуру атмосфере. Дошло се до оптималних параметара за производњу нанокapsула зеина техником електрораспршивања: игла унутрашњег пречника отвора од 0,16 mm (мера 30 - боје лаванде), брзина протока раствора 300  $\mu\text{l/h}$ , примењени напон 14,5 kV и растојање између врха игле и колектора од 20 cm.

Да би се убрзала производња наночестица, за прикупљање узорака коришћена су сва три доступна модела уређаја за електрораспршивање Fluidnatek® Bioinicia S.L. (Валенсија, Шпанија): LE-500, LE-10 и SpinBox (Слике 31 и 32).



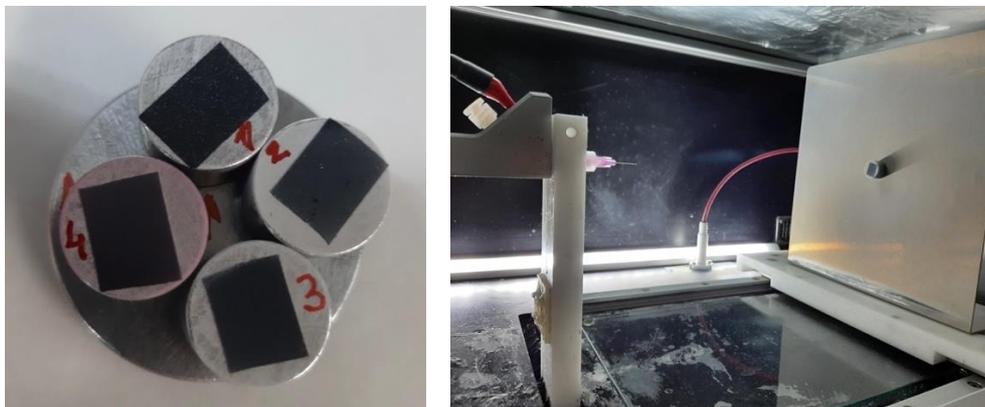
Слика 31. Електрораспршивачи SpinBox (лево) и LE-10 (десно)



Слика 32. Електрораспршивач LE-500

#### 4.2.25 Морфолошка анализа добијених капсула помоћу скенирајуће електронске микроскопије (SEM)

Морфологија добијених капсула одређивана је преко скенирајуће електронске микроскопије (SEM) на уређају Hitachi-S-4800 FE-SEM (Hitachi High-Technologies Corporation, Токуо, Јапан) са убрзањем снопа електрона 10 kV. Приближно 1,5 mg узорка је налепљено на двострану лепљиву траку на металном држачу узорка, а затим пресвучено слојем злато-паладијума Слика 33.



Слика 33. Прикупљање узорка за SEM анализу

#### 4.2.26 Припрема узорка нанокapsула за анализу

У циљу анализирања добијених нанокapsула, оне су пажљиво састругане пластичном шпатулом са површине колектора и пребачене у пластичне епруветица, а затим у ексикатор, како би се могућност оксидације инкапсулисаних полифенолних једињења svela на минимум (Слика 34).



Слика 34. Припрема добијених нанокапсула за анализу

#### 4.2.27 Фуриерова трансформациона инфрацрвена спектроскопија (ATR-FTIR)

Метода пригушене тоталне рефлексије (ATR-FTIR) (Bruker FTIR Tensor 37 equipment, Rheinstetten, Germany) коришћена је за процену могућих промена до којих долази у анализираним узорцима, капсуле чистог зеина, екстракт ПГ Прокупац, екстракт ПГ Sangiovese, капсуле зеин + Прокупац и капсуле зеин + Sangiovese. Узорци су постављени на врх дијамантског кристала уз обезбеђен одговарајући контакт употребом Golden Gate прибора за ATR узорковање ниске температуре (Specac Ltd., Orpington, UK).

Сви спектри су добијени при  $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$  срањавањем 10 скенова при резолуцији  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Анализа спектралних података извршена је коришћењем софтвера Origin Pro, Version 2019 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

#### 4.2.28 Термогравиметријска анализа (ТГА)

Термогравиметријске анализе полимера зеина, сувог остатка екстракта ПГ сорте Прокупац, сувог остатка екстракта ПГ сорте Sangiovese, празних капсула зеина, капсула зеина са екстракторм ПГ сорте Прокупац и капсула зеина са екстракторм ПГ сорте Sangiovese рађене су у три понављања, користећи опрему TGA-STDA 1600 equipment (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA).

Анализе су спроведене под следећим условима: 1 - 5 mg узорка, загревање од  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $600 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , динамика загревања  $5 \text{ }^{\circ}\text{C} / \text{минуто}$  и проток азота ( $50 \text{ ml} / \text{минуто}$ ).

#### 4.2.29 HPLC-MS-MS анализа

Екстракти су разређени растварачима мобилне фазе, растварач А (0,05% водени раствор мравље киселине) и растварач Б (метанол), претходно помешаних у односу 1 према 1, да би се добила коначна концентрација  $2 \text{ mg} / \text{ml}$ . Петнаест радних стандарда, у распону од  $1,53 \text{ ng} / \text{ml}$  до  $25,0 \cdot 10^3 \text{ ng} / \text{ml}$ , припремљено је серијским разблаживањем у односу 1 према 1 стандарда са растварачима А и Б (1 : 1). Узорци и стандарди су анализирани помоћу течног хроматографа високих перформанси Agilent Technologies 1200 Series упареног са Agilent Technologies 6410A

Triple Quad тандемским масеним спектрометром са електрораспишавајућим извором јона, контролисаним помоћу Agilent Technologies MassHunter Workstation софтвера – Data Acquisition (ver. B.03.01). 5  $\mu$ l је убризгано у систем, а једињења су раздвајана на Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 mm  $\times$  4,6 mm, 1,8  $\mu$ m) колони брзе резолуције на 50 °C. Мобилна фаза испоручена је брзином протока од 1 ml по минути у градијентном режиму (0. минут 30% растварач Б, 6. минут 70% растварач Б, 9. минут 100% растварач Б, 12. минут 100% растварач Б, време поновне еквилибрације 3 минута). Елуирана једињења су детектована масеним спектрометром следећих параметара извора јона: притисак небулизационог гаса (N<sub>2</sub>) 40 psi, проток гаса за сушење (N<sub>2</sub>) 9 l по минути и температура 350 °C, капиларни напон 4 kV, негативни поларитет. Подаци су прикупљани у динамичком MRM режиму, користећи оптимизоване параметре специфичне за једињење (време задржавања, прекурсорски јон, јон производа, напон фрагментора, напон судара) и представљени у раду (Orčić *et al.*, 2014, Табела 1). За сва једињења површине испод врхова мерене су помоћу Agilent MassHunter Workstation Software – Qualitative Analysis (ver. B.03.01). Нацртане су калибрационе криве и израчунате концентрације узорака помоћу софтвера OriginLabs Origin Pro (ver. 8.0).

#### 4.2.30 Одређивање величине честица

Одређивање расподеле величине честица на основу пречника структура извршено је помоћу софтвера Image J Launcher v1.41 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) са најмање 100 извршених мерења по узорку.

#### 4.2.31 Статистичка анализа

Подаци су анализирани ANOVA статистичком анализом са  $P$ -вредношћу  $< 0,05$ . Фишеров тест је коришћен за поређење средњих вредности употребом софтвера STATISTICA 10 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

## 5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

I Развијање технологија обраде ферментисаних ПГ до потенцијалних прашкастих и полутечних додатака за прехранбену индустрију

### 5.1 Главне компоненте ферментисане покожице грожђа

Главне компоненте влажне, ферментисане покожице грожђа као споредног производа винске индустрије (са садржајем суве материје од 20%) су: дијететска влакна,  $112 \pm 2$  g / kg; протеини,  $18 \pm 1$  g / kg; пепео,  $18 \pm 1$  g / kg; масти,  $15 \pm 1$  g / kg; растворљиви угљенихидрати,  $7,4 \pm 0,2$  g / kg.

Проантоцијанидини су били преовлађујућа класа антиоксиданата, са садржајем од  $3,5 \pm 0,2$  g / kg. Садржај мономерних флаванола, антоцијанина и флавонола (рачунат као сума садржаја једињења појединачних класа идентификованих HPLC методом) износио је  $61 \pm 1$ ,  $130 \pm 20$ ,  $110 \pm 2$  mg / kg, респективно.

### 5.2 Активност ензима PPO и POD

У влажној ПГ измерена је активност POD од  $109 \pm 9$  nmol гвајакола  $\cdot$  g<sup>-1</sup>  $\cdot$  минут<sup>-1</sup>. Иако се присуство POD у ферментисаним ПГ генерално занемарује, уочена активност POD у овом истраживању нашла се у опсегу вредности типичних за воће погођено ензимским тамњењем, тачније за јабуку код које износи 39 - 599 nmol гвајакола  $\cdot$  g<sup>-1</sup>  $\cdot$  минут<sup>-1</sup> (Ahn *et al.*, 2007). Измерена активност ензима PPO влажне ПГ износила је  $0,075 \pm 0,001$   $\Delta$ A<sub>400nm</sub>  $\cdot$  g<sup>-1</sup>  $\cdot$  минут, и била је такође слична вредности добијеној за свежу јабуку која је коришћена као контрола. У раду (Carranza-Concha *et al.*, 2012) доказано је да инактивација активности ензима PPO и POD процесом бланширања грожђа пре почетка производње сока доводи до боље очуваности садржаја полифенолних једињења.

Након млевења узорака небланширане ПГ дошло је до пада у садржају свих класа фенолних једињења (Табела 4). Код узорака са 10% ПГ, проценат очуваности садржаја укупних фенолних једињења био је нижи него код узорака са 2% ПГ, указујући да су оксидативне реакције биле убрзане повећаном концентрацијом суве материје. Флаваноли су супстрати за обе класе ензима PPO и POD (Servili *et al.*, 2000). Флавоноли се такође могу оксидовати и са PPO и POD (Makris and Rossiter, 2002). Насупрот томе, проантоцијанидини нису супстрати за PPO, међутим ова једињења се могу оксидовати ензимски генерисаним *o*-хинонима кроз механизме купловане оксидације преко којих се они трансформишу у *o*-дифенолне супстрате (Cheynier and Ricardo da Silva, 1991). Оксидација проантоцијанидина узрокована активносћу ензима POD се не може искључити (Liu *et al.*, 2013). Kader *et al.* (2001) је показао да су антоцијанини такође погођени механизмима купловане оксидације генерисањем *o*-хинона активносћу PPO. Додатно, Movahed *et al.* (2016) је доказао улогу POD у деградацији антоцијанина из грожђа.

Табела 3: Степен очуваности садржаја укупних фенолних једињења, проантоцијанидина, FRAP вредности, антоцијанина, флавонола и мономерних флаванола након различитих третмана бланширања ПГ, узимајући у обзир лиофилизован узорак (FD) као референтан.\* Преузето и прилагођено из сопственог рада кандидата (Stojanovic *et al.*, 2018).

	% Очуваности					
	Укупни феноли	Проантоцијанидини	Мономерни флаваноли**	Антоцијанини**	Флавоноли**	FRAP вредност
<i>Полутечне ПГ, 2% с. м.</i>						
U	66 <sup>b</sup> ± 3	51 <sup>b</sup> ± 3	82 <sup>c</sup> ± 5	54 <sup>d</sup> ± 1	71 <sup>d</sup> ± 3	78 <sup>a</sup> ± 5
1B	78 <sup>a</sup> ± 2	84 <sup>a</sup> ± 2	150 <sup>b</sup> ± 3	66 <sup>b</sup> ± 1	97 <sup>c</sup> ± 3	68 <sup>b</sup> ± 3
2B	71 <sup>b</sup> ± 3	51 <sup>b</sup> ± 1	167 <sup>a</sup> ± 8	80 <sup>a</sup> ± 6	123 <sup>a</sup> ± 5	77 <sup>a</sup> ± 4
4B	62 <sup>b</sup> ± 2	47 <sup>b</sup> ± 1	68 <sup>d</sup> ± 4	58 <sup>c</sup> ± 1	104 <sup>b</sup> ± 1	65 <sup>b</sup> ± 3
<i>Осушене ПГ</i>						
FD	100 ± 3	100 ± 8	100 ± 5	100 ± 6	100 ± 6	100 ± 5

\*Вредности представљају средњу вредност ± стандардна грешка. \*\*Суме садржаја једињења идентификованих преко HPLC. Различита слова у оквиру исте колоне указују на значајне разлике међу вредностима (LSD,  $p < 0,05$ ). U: небланширани, самлевени узорак; 1B: један минут бланширани, самлевени узорак; 2B: два минута бланширани, самлевени узорак; 4B: четири минута бланширани, самлевени узорак.

Табела 4: Степен очуваности садржаја укупних фенолних једињења, проантоцијанидина, FRAP вредности, антоцијанина, флавонола и мономерних флаванола након обраде ПГ, узимајући у обзир лиофилизован узорак (FD) као референтан.\* Преузето и прилагођено из сопственог рада кандидата (Stojanovic *et al.*, 2018).

	% Очуваности					FRAP вредност
	Укупни феноли	Проантоцијанидини	Мономерни флаваноли**	Антоцијанини**	Флавоноли**	
<i>Полутечне</i>						
<i>ПГ, 2% с. м.</i>						
U	66 <sup>ef</sup> ± 3	51 <sup>e</sup> ± 3	82 <sup>f</sup> ± 5	54 <sup>d</sup> ± 1	71 <sup>f</sup> ± 3	78 <sup>bc</sup> ± 5
B	71 <sup>cde</sup> ± 3	51 <sup>e</sup> ± 1	167 <sup>b</sup> ± 8	80 <sup>b</sup> ± 6	123 <sup>c</sup> ± 5	77 <sup>bc</sup> ± 4
H	76 <sup>cd</sup> ± 1	50 <sup>e</sup> ± 2	204 <sup>a</sup> ± 1	81 <sup>b</sup> ± 1	128 <sup>c</sup> ± 1	85 <sup>b</sup> ± 5
P	66 <sup>ef</sup> ± 6	37 <sup>f</sup> ± 4	120 <sup>d</sup> ± 6	63 <sup>cd</sup> ± 5	179 <sup>a</sup> ± 8	75 <sup>bcd</sup> ± 2
<i>Полутечне</i>						
<i>ПГ, 10% с. м.</i>						
U	54 <sup>g</sup> ± 3	46 <sup>ef</sup> ± 5	25 <sup>g</sup> ± 2	50 <sup>d</sup> ± 1	70 <sup>f</sup> ± 3	46 <sup>f</sup> ± 5
B	70 <sup>def</sup> ± 2	59 <sup>d</sup> ± 2	23 <sup>g</sup> ± 2	81 <sup>b</sup> ± 4	130 <sup>c</sup> ± 7	70 <sup>cde</sup> ± 3
H	77 <sup>cd</sup> ± 3	67 <sup>c</sup> ± 4	28 <sup>g</sup> ± 1	95 <sup>a</sup> ± 1	131 <sup>c</sup> ± 4	78 <sup>bc</sup> ± 3
P	63 <sup>ef</sup> ± 3	49 <sup>e</sup> ± 4	30 <sup>g</sup> ± 1	63 <sup>cd</sup> ± 6	158 <sup>b</sup> ± 11	59 <sup>e</sup> ± 4
<i>Осушене ПГ</i>						
AD	85 <sup>b</sup> ± 1	80 <sup>b</sup> ± 2	142 <sup>c</sup> ± 8	70 <sup>bc</sup> ± 2	92 <sup>de</sup> ± 2	85 <sup>b</sup> ± 3
FD	100 <sup>a</sup> ± 3	100 <sup>a</sup> ± 8	100 <sup>e</sup> ± 5	100 <sup>a</sup> ± 6	100 <sup>d</sup> ± 6	100 <sup>a</sup> ± 5

\*Вредности представљају средњу вредност ± стандардна грешка. \*\*Суме садржаја једињења идентификованих преко HPLC. Различита слова у оквиру исте колоне указују на значајне разлике међу вредностима (LSD,  $p < 0,05$ ). U: небланширани, самлевени узорак; B: два минута бланширани, самлевени узорак; H: хомогенизовани узорак; P: пастеризовани узорак; AD: у струји ваздуха осушени узорак; FD: лиофилизован узорак.

### 5.3 Бланширање

Третман бланширања на 100 °С испробан је у трајању од 1, 2 и 4 минута. На основу степена очуваности једињења од интереса, третман бланширања у трајању од 2 минута је изабран као најбољи са њим је настављено истраживање (Табела 3).

Након 2 минута бланширања, није примећена никаква активност ензима PPO и POD у ПГ. Као што је приказано у Табели 4, у узорцима са 2% ПГ очуваност растворљивих проантоцијанидина након 2 минута бланширања била је иста као и за небланширани узорак ПГ и износила је само 50% у поређењу са лиофилизованом узорком ПГ. Овај резултат указује на то да влажно млевење може промовисати формирање проантоцијанидинских комплекса са матриksom ПГ, узрокујући пад у растворљивости. Заправо, молекуларне интеракције дешавају се између проантоцијанидина високих молекулских маса и протеина, то јест долази до стварања водоничних веза или хидрофобне интеракције, узрокујући формирање нерастворних полифенол-протеин агрегата (Lavelli *et al.*, 2016a). Међутим, током бланширања такође долази до делимичне деградације проантоцијанидина. Заправо, садржај мономерних флаванола (сума катехина и епикатехина) био је виши код бланшираних него код небланшираних ПГ па чак и виши у поређењу са лиофилизованом узорком. Ово је вероватно резултат хидролизе проантоцијанидина подстакнуте загревањем у киселој средини. Битно је напоменути, као што је претходно приказано, да је количина растворљивих проантоцијанидина у ПГ ~ 60 пута виша од количине мономерних флаванола. Стога, умерен степен хидролизе проантоцијанидина резултира значајним повећањем количине мономерних флаванола. Насупрот томе, у 10% ПГ степен очуваности растворљивих проантоцијанидина након бланширања био је умерено виши у односу на небланширане ПГ, али је степен очуваности мономерних флаванола био врло низак и код бланшираних и код небланшираних ПГ. Овакав резултат указује да је у концентрованијем медијуму степен хидролизе проантоцијанидина био нижи него у разблаженом медијуму. Проенти релативног садржаја катехина и епикатехина, 61 и 39, респективно били су једнаки како у бланшираном тако и у лиофилизованом узорку ПГ (Табела 5).

Садржај флавонола у узорцима са 2% и 10% суве материје ПГ након бланширања био је већи него код лиофилованих узорака, највероватније због повећања екстракције ових једињења из ћелијских зидова након термичког третмана. Поредџи појединачне релативне садржаје флавонола, агликон кверцетина, који је био заступљен са 21% у укупним флавонолима у лиофилованом узорку ПГ, након бланширања његов садржај је порастао на 43%, док је заступљеност кверцетин глукозида опала са 79% на 57%, указујући на појаву хидролизе и/или повишен степен екстракције агликона код оба, 2% и 10% ПГ узорка (Табела 5).

Степен очуваности укупних антоцијанина након бланширања износио је 80%, у оба 2% и 10% ПГ узорка, што је било више него код небланширане ПГ (Табела 4). Релативни садржај индивидуалних антоцијанина остао је исти као и у лиофилованом узорку ПГ (Табела 6).

Табела 5: Садржај индивидуалних флаванола и флавонола (mg / kg) и релативни садржај (% укупног садржаја, у заградама) у ПГ након обраде.\* Преузето и прилагођено из сопственог рада кандидата (Stojanovic *et al.*, 2018).

	Флаваноли		Флавоноли	
	С mg / kg (%)	Е mg / kg (%)	Q mg / kg (%)	Q-glc mg / kg (%)
<i>Полутечне</i>				
<i>ПГ, 2% с. м.</i>				
В	6,0 <sup>b</sup> ± 0,3 (60)	4,0 <sup>b</sup> ± 0,2 (40)	5,3 <sup>b</sup> ± 0,2 (43)	7,1 <sup>a</sup> ± 0,3 (57)
Н	7,5 <sup>a</sup> ± 0,1 (61)	4,8 <sup>a</sup> ± 0,1 (39)	5,4 <sup>b</sup> ± 0,1 (43)	7,3 <sup>a</sup> ± 0,1 (57)
Р	4,5 <sup>c</sup> ± 0,3 (63)	2,7 <sup>c</sup> ± 0,1 (38)	10,3 <sup>a</sup> ± 0,5 (58)	7,6 <sup>a</sup> ± 0,3 (42)
<i>Полутечне</i>				
<i>ПГ, 10% с. м.</i>				
В	4,2 <sup>b</sup> ± 0,5 (58)	3,0 <sup>a</sup> ± 0,2 (42)	29 <sup>ab</sup> ± 2 (42)	40 <sup>ab</sup> ± 2 (58)
Н	5,6 <sup>ab</sup> ± 0,1 (64)	3,2 <sup>a</sup> ± 0,1 (36)	20 <sup>b</sup> ± 1 (29)	50 <sup>a</sup> ± 1 (71)
Р	6,3 <sup>a</sup> ± 0,1 (67)	3,1 <sup>a</sup> ± 0,1 (33)	43 <sup>a</sup> ± 9 (52)	40 <sup>b</sup> ± 3 (48)
<i>Осушене ПГ</i>				
AD	262 <sup>a</sup> ± 16 (60)	174 <sup>a</sup> ± 10 (40)	116 <sup>a</sup> ± 3 (24)	373 <sup>a</sup> ± 10 (76)
FD	185 <sup>b</sup> ± 10 (60)	122 <sup>b</sup> ± 3 (40)	110 <sup>a</sup> ± 8 (21)	424 <sup>a</sup> ± 25 (79)

\* Вредности представљају средњу вредност ± стандардна грешка. За сваку групу узорака (полутечне ПГ, 2% с. м.; полутечне ПГ, 10% с. м. и осушене ПГ) различита слова у оквиру исте колоне указују на значајне разлике међу вредностима (LSD,  $p < 0,05$ ). С: катехин; Е: епикатехин; Q: кверцетин; glc: глукозид; В: два минута бланширани, самлевени узорак; Н: хомогенизовани узорак; Р: пастеризовани узорак; AD: у струји ваздуха осушени узорак; FD: лиофилизовани узорак.

Табела 6: Садржај индивидуалних антоцијанина (mg / kg) и релативни садржај (% укупног садржаја, у заградама) у ПГ након обраде.\*  
Преузето и прилагођено из сопственог рада кандидата (Stojanovic *et al.*, 2018).

		Антоцијанини											
		Dp-glc		Cy-glc		Pt-glc		Pn-glc		Mv-glc		Mv- <i>pc</i> -glc	
		mg / kg	(%)	mg / kg	(%)	mg / kg	(%)	mg / kg	(%)	mg / kg	(%)	mg / kg	(%)
<i>Полутечне</i>													
<i>ПГ, 2% с. м.</i>													
	В	17,0 <sup>a</sup> ± 1,3	(18)	8,0 <sup>a</sup> ± 0,6	(8)	20,2 <sup>a</sup> ± 1,5	(21)	9,9 <sup>ab</sup> ± 0,7	(10)	40,3 <sup>a</sup> ± 2,5	(42)	1,07 <sup>a</sup> ± 0,09	(1)
	Н	17,1 <sup>a</sup> ± 0,1	(18)	8,2 <sup>a</sup> ± 0,1	(8)	20,3 <sup>a</sup> ± 0,2	(21)	10,2 <sup>a</sup> ± 0,1	(10)	41,2 <sup>a</sup> ± 0,4	(42)	1,11 <sup>a</sup> ± 0,01	(1)
	Р	12,4 <sup>b</sup> ± 1,1	(16)	6,6 <sup>b</sup> ± 0,4	(9)	15,6 <sup>b</sup> ± 1,2	(21)	8,0 <sup>c</sup> ± 0,6	(11)	32,4 <sup>b</sup> ± 2,1	(43)	1,01 <sup>a</sup> ± 0,16	(1)
<i>Полутечне</i>													
<i>ПГ, 10% с. м.</i>													
	В	88 <sup>a</sup> ± 5	(16)	47 <sup>ab</sup> ± 2	(9)	112 <sup>ab</sup> ± 6	(21)	58 <sup>ab</sup> ± 3	(11)	231 <sup>ab</sup> ± 13	(43)	6,7 <sup>b</sup> ± 1	(1)
	Н	84 <sup>a</sup> ± 1	(13)	56 <sup>a</sup> ± 1	(9)	134 <sup>a</sup> ± 2	(21)	71 <sup>a</sup> ± 2	(11)	280 <sup>a</sup> ± 5	(44)	9,0 <sup>a</sup> ± 0,2	(1)
	Р	56 <sup>b</sup> ± 5	(13)	38 <sup>b</sup> ± 5	(9)	87 <sup>b</sup> ± 8	(21)	47 <sup>b</sup> ± 5	(11)	183 <sup>b</sup> ± 20	(44)	6,0 <sup>b</sup> ± 0,7	(1)
<i>Осушене ПГ</i>													
	AD	723 <sup>b</sup> ± 44	(16)	388 <sup>b</sup> ± 10	(8)	984 <sup>b</sup> ± 21	(21)	511 <sup>b</sup> ± 13	(11)	1964 <sup>b</sup> ± 39	(42)	56 <sup>b</sup> ± 1	(1)
	FD	1235 <sup>a</sup> ± 66	(19)	581 <sup>a</sup> ± 44	(9)	1412 <sup>a</sup> ± 93	(21)	704 <sup>a</sup> ± 52	(11)	2630 <sup>a</sup> ± 160	(40)	83 <sup>a</sup> ± 5	(1)

\* Вредности представљају средњу вредност ± стандардна грешка. За сваку групу узорака (полутечне ПГ, 2% с. м.; полутечне ПГ, 10% с. м. и осушене ПГ) различита слова у оквиру исте колоне указују на значајне разлике међу вредностима (LSD,  $p < 0,05$ ). Dp: делфинидин; Cy: цијанидин; Pt: петунидин; Pn: пеонидин; Mv: малвидин; glc: глукозид; *pc*: *p*-coumaroyl; В: два минута бланширани, самлевени узорак; Н: хомогенизовани узорак; Р: пастеризовани узорак; AD: у струји ваздуха осушени узорак; FD: лиофилизован узорак (Stojanovic *et al.*, 2018).

Садржај укупних фенолних једињења и FRAP вредност у узорцима са 2% суве материје ПГ износили су ~ 70% од вредности забележене у лиофилизованом узорку ПГ, како у бланшираном, тако и у небланшираном узорку. Ово је вероватно резултат значајне деградације проантоцијанидина, чак и када је бланширање било примењено. У узорку са 10% суве материје ПГ, степен очуваности укупних фенолних једињења и FRAP вредности износили су такође ~ 70%, док су у небланшираном узорку са 10% с. м. ПГ ове вредности биле значајно ниже.

## 5.4 Хомогенизација

Са технолошке тачке гледишта, хомогенизација је неопходна ради побољшања дисперзије ових додатака у матрицу прехранбених производа. Као што је приказано у Табели 4, хомогенизација бланшираних узорака ПГ није променила степен очуваности фенолних једињења, осим што је примећен благи пораст степена очуваности мономерних флаванола у бланшираном узорку са 2% с. м. ПГ, као и антоцијанина и растворних проантоцијанидина у бланшираном узорку са 10% с. м. ПГ, што није утицало на FRAP вредности.

## 5.5 Пастеризација

Након постизања шестостепене децималне редукције циљаног микроорганизма *Alicyclobacillus Acidoterrestris* третманом пастеризације, односно постизања микробиолошке стабилности, садржај фенолних једињења се генерално смањило како код узорка са 2% с. м. ПГ тако и код узорка са 10% с. м. ПГ, изузев садржаја флавонола који је порастао, вероватно као резултат повишене растворљивости (Табела 4). Садржај кверцетина повећао се у односу на кверцетин глукозид (Табела 5), указујући на појачану екстракцију агликона, као што је уочено и током бланширања. Релативна заступљеност антоцијанина није се мењала након третмана пастеризације (Табела 6), што указује да ова једињења имају сличну термичку стабилност. За пастеризовани узорак са 2% с. м. ПГ FRAP вредност је износила 75% вредности добијене за лиофилизован узорак ПГ (Табела 4), што одговара вредности од  $4,1 \pm 0,1 \text{ mmol Fe(II) eq / kg}$  и што је у опсегу вредности добијених за сокове од грожђа (Moreno-Montoro *et al.*, 2015). Иако је за пастеризоване узорке са садржајем суве материје ПГ од 10% FRAP вредност износила само 59% од вредности код лиофилизованог узорка ПГ (Табела 4), она је такође била у опсегу вредности добијених за сокове од грожђа, код којих је износила  $1,9 - 13,5 \text{ mmol Fe(II) eq / kg}$ .

Хидроксиметилфурфурал и његови деривати (5-хлорометил и 5-сулфидметилфурфурал) су показали да поседују цитотоксична, генотоксична, мутагена и канцерогена својства (Gurkan and Altunay, 2015). Ово једињење се генерално јавља у пастеризованим воћним производима у количинама у опсегу  $0,13 - 0,32 \text{ mg / l}$  (Lavelli *et al.*, 2009a). Насупрот томе, у узорцима ПГ није пронађен (праг детекције је био  $0,02 \text{ mg / l}$ ), вероватно због ниског саржаја редукујућих шећера у ферментисаним ПГ.

## 5.6 Сушење

Сушење ПГ у струји ваздуха најчешће се изводи у температурном опсегу  $40 - 80 \text{ }^\circ\text{C}$  (Planinic *et al.*, 2015). У овој студији, сушење ПГ у струји ваздуха изведено је на  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  у трајању

од 3,5 часова. Наведено сушење узроковало је код узорка ПГ пад, како у садржају укупних фенолних једињења тако и у садржају растворљивих проантоцијанидина, антоцијанина и FRAP вредности, са степеном очуваности ових параметара од 85, 80, 70 и 85%, респективно (Табела 4).

Садржај мономерних флаванола се повећао толико да је релативни садржај био за чак 42% виши него код референтног лиофилизованог узорка, вероватно због хидролизе проантоцијана, док је релативни садржај мономерних флаванола био исти као и код лиофилизованог узорка ПГ. Са друге стране, степен очуваности укупних флавонола није се значајно разликовао од референтног узорка. Међутим, постојао је мали пораст у релативном садржају кверцетина у односу на кверцетин глукозид, указујући на појаву хидролизе која међутим није била толико наглашена као она која се дешавала током пастеризације (Табела 5). Planinic *et al.*, (2015) је открио да сушење ПГ у температурном опсегу од 60 - 80 °C током 1,5 - 3 часа узрокује смањење садржаја укупних фенолних једињења, укупних флавоноида, укупних екстрактивних проантоцијанидина и антиоксидативне активности за 13,2%, 43,1%, 15,3% и 21,0%, респективно. Ове вредности су у опсегу губитака откривених у овој студији. Веће губитке антиоксиданата током сушења ПГ на 60 °C уочен је у раду Torres *et al.*, (2010), посебно када су у питању били антоцијанини. Међутим, трајање процеса сушења је такође било дуже (24 часа). Сушење воћа промовише Мајлардову реакцију, чији се интензитет процјењује мерењем количине насталог хидроксиметилфурфурала (Lavelli and Vantaggi, 2009b). Хидроксиметилфурфурал није био детектован у узорцима ПГ осушеним у струји ваздуха. С друге стране, ово једињење је пронађено у сувом грожду осушеном на сунцу у концентрационом опсегу од 1,7 - 57 mg / kg (Çaglarırmak, 2006). То може бити последица или ниског садржаја шећера у ферментисаним ПГ или последица примене краћег процеса сушења у односу на сушење на сунцу.

## 5.7 Дистрибуција величине честица

Дистрибуција величине честица узорка ПГ анализирана је у односу на комерцијална влакна пореклом од коре јабуке. Површински пондерисани средњи пречник, тј.  $D [3,2]$  за оба узорка (2% и 10% с. м. ПГ) износио је 23,8  $\mu\text{m}$ , што је била мања вредност од оне која је примећена код комерцијалног производа од коре јабука (Табела 7).

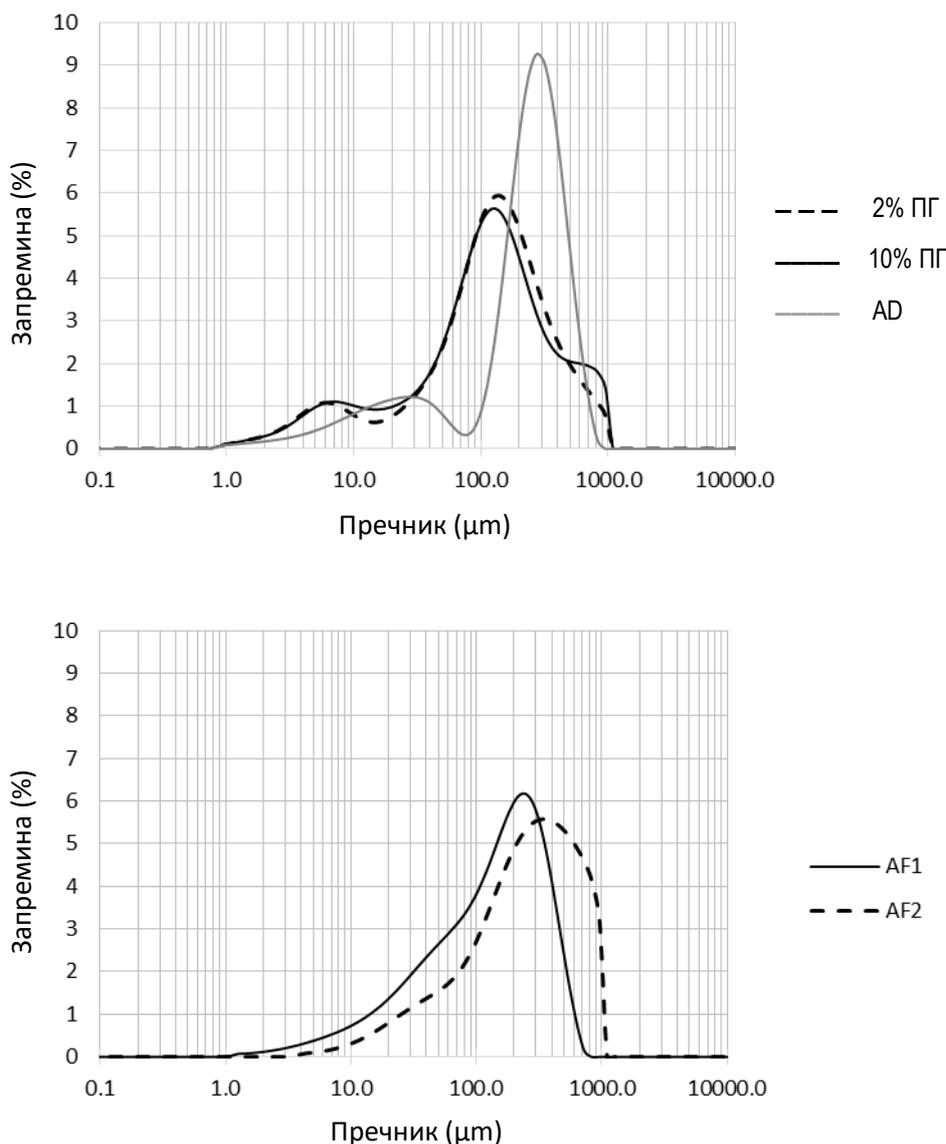
За комерцијална влакна пореклом из јабуке, бамбуса, овса и пшенице диспергованих у води,  $D [3,2]$  био је у опсегу 14,4 – 34,6  $\mu\text{m}$  (Rosell *et al.*, 2009).

Табела 7: Дистрибуција величине честица предложених осушених и полутечних додатака за прехранбену индустрију добијених од отпадне ПГ винске индустрије, и комерцијалних влакана покожица јабука\* Преузето и прилагођено из сопственог рада кандидата (Stojanovic *et al.*, 2018).

	D [3, 2] μm	D [4, 3] μm	Span
<i>Полутечне ПГ, 2% с. м.</i>			
P	23,90 <sup>a</sup> ± 0,19	159,24 <sup>b</sup> ± 0,95	3,19 <sup>b</sup> ± 0,02
<i>Полутечне ПГ, 10% с. м.</i>			
P	23,82 <sup>a</sup> ± 0,18	174,21 <sup>a</sup> ± 2,16	4,16 <sup>a</sup> ± 0,07
<i>Осушене ПГ</i>			
AD	37,19 <sup>b</sup> ± 0,20	231,94 <sup>c</sup> ± 1,41	1,88 <sup>c</sup> ± 0,01
<i>Влакна покожица јабука</i>			
AF1	39,86 <sup>c</sup> ± 0,07	163,13 <sup>b</sup> ± 0,76	2,51 <sup>d</sup> ± 0,00
AF2	91,02 <sup>d</sup> ± 0,38	298,02 <sup>d</sup> ± 1,60	2,65 <sup>e</sup> ± 0,01

\* Вредности представљају средњу вредност ± стандардна грешка. За сваку групу узорак (полутечне ПГ, 2% с. м.; полутечне ПГ, 10% с. м.; осушене ПГ и комерцијалне узорке покожица јабука) различита слова у оквиру исте колоне указују на значајне разлике међу вредностима (LSD,  $p < 0,05$ ). P: пастеризовани узорак; AD: у струји ваздуха осушени узорак; AF1: и AF2: два комерцијална узорка влакана покожица јабука.

Са друге стране, вредност пречника пондерисаног запреминског момента, то јест  $D$  [4,3], за узорак са 10% суве материје ПГ износио је 174  $\mu\text{m}$ , нешто више од узорка са 2% ПГ, 159  $\mu\text{m}$ , упадајући тако у опсег комерцијалних влакана. Овај резултат указује да узорак са 10% с. м. ПГ садржи већу количину крупнијих честица од узорка са 2% с. м. ПГ. Заиста, распон дистрибуције величине честица је такође био већи код узорка са 10% ПГ него код узорка са 2% ПГ, указујући да је хомогенизација довела до најужег распона дистрибуције величине честица у најразређенијем узорку ПГ (Слика 35).



Слика 35: Дистрибуција величине честица полутечних (2% и 10% с. м. ПГ) и у струји ваздуха осушених (AD) додатака (горња слика) и комерцијалних узорака влакана пореклом од љуски јабука (AF1 и AF2) (доња слика). Преузето и прилагођено из сопственог рада кандидата (Stojanovic *et al.*, 2018).

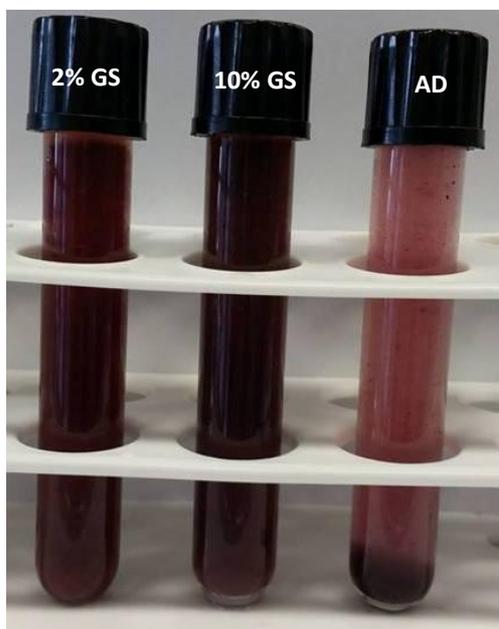
Као и полутечни узорци ПГ, у струји ваздуха осушене ПГ су такође биле самлеване у циљу олакшавања дисперзије ових производа у матрицу прехранбених производа. Вредности за  $D$

[3,2] и D [4,3] узорак ПГ осушених у струји ваздуха биле су веће него код поутечних производа са 2% и 10% с. м. ПГ, док је опсег био нижи, указујући на ужу дистрибуцију величине честица (Табела 7, Слика 36).

## 5.8 Седиментационо понашање

Узорци са 2% ПГ нису разређивани, док су узорци са 10% ПГ и прашкасти узорци, непосредно пред анализу били разређени са 8,0 mM калијум цитратним пуфером, рН 3,0 у циљу постизања 2% суве материје ПГ, као што је случај са разређеним полутечним узорком.

Полутечни производи ПГ формирали су стабилну суспензију у води, док су се производи ПГ сушени у струји ваздуха брзо таложили (Слика 36). Према томе, полутечни производи ПГ могу бити погоднији од производа ПГ осушених у струји ваздуха за употребу у полутечним и желираним прехранбеним производима.



Слика 36: Седиментационо понашање полутечних производа са садржајем суве материје ПГ од 2% и 10% (2% GS и 10% GS), и у струји ваздуха осушених ПГ (AD). Преузето и прилагођено из сопственог рада кандидата (Stojanovic *et al.*, 2018).

## 5.9 Перспектива примене додатака добијених од покожица грожђа

Низ потенцијалних примена добијених ПГ производа у форми додатака у прехранбеној индустрији приказан је у Табели 8., где су циљани прехранбени производи груписани у два кластера. Кластер 1 укључује безалкохолна пића и хладне десерте, који раније нису до сада били узимани у обзир као циљна група прехранбених производа за побољшање функционалности са ПГ. У оквиру категорије безалкохолних пића, енергетска пића са и без шећера, негазирана ароматизована вода и пића обогаћена витаминима имају веома ниску или чак нерегистровану антиоксидативну активност (Carlesn *et al.*, 2010). Сви производи из Кластера 1 могу да достигну FRAP вредност сока од поморанце (0,4 mmol Fe (II) / kg) кроз

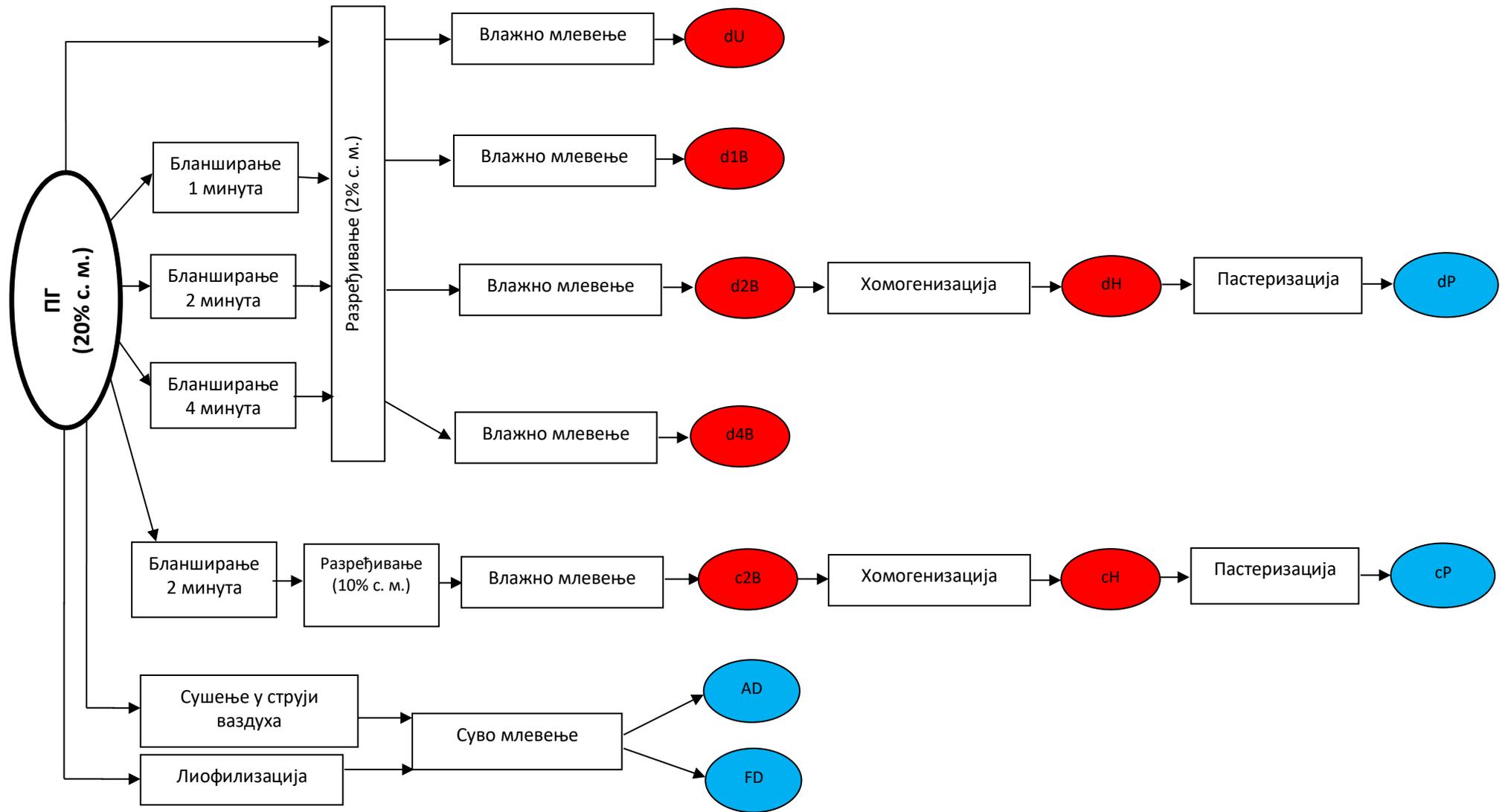
формулацију са додатком производа са 2% с. м. ПГ. Кластер 2 укључује хлеб и друге пекарске производе, који су већ предложени као интересантни прехранбени системи за додавање осушене ПГ (Mildner-Szkudlarz *et al.*, 2011; Lavelli *et al.*, 2016b). Додавање полутечног ПГ производа директно у производњи теста уместо осушене ПГ може имати предности у подледу скраћивања укупног процесног времена обраде ПГ до финалних производа, и смањивања утрошка енергије. Редукујући капацитет хлеба и пекарских производа може се повећати и до 10 пута додавањем полутечног додатка са садржајем суве материје ПГ од 10%.

На Слици 37. приказана је комплетна шема технологија обраде ферментисаних покожица грожђа сорте Барбера до крајњих производа овог дела истраживања. Тачке узорковања за аналитичку карактеризацију приказане су сверичним облицима. Узорци означени црвеном бојом представљају међупроизоде, док узорци означени плавом бојом представљају стабилизоване, крајње производе. Ознаке dU, d1B, d2B, d4B, dH, dP, c2B, cH, cP, AD и FD, стоје иза небланшираног узорака са садржајем с. м. ПГ од 2%, један минут бланшираног узорака са садржајем с. м. ПГ од 2%, два минута бланшираног узорака са садржајем с. м. ПГ од 2%, четири минута бланшираног узорака са садржајем с. м. ПГ од 2%, хомогенизованог узорака са садржајем с. м. ПГ од 2%, пастеризованог узорака са садржајем с. м. ПГ од 2%, два минута бланшираног узорака са садржајем с. м. ПГ од 10%, хомогенизованог узорака са садржајем с. м. ПГ од 10%, пастеризованог узорака са садржајем с. м. ПГ од 10%, у струји ваздуха осушеног и лиофилизованог узорка респективно.

Табела 8: Потенцијална способност осушених и полутечних додатака пореклом од ПГ као споредног производа винске индустрије у повећању FRAP вредности (mmol FeII eq / kg) различитих прехранбених производа\*. Преузето и прилагођено из сопственог рада кандидата (Stojanovic *et al.*, 2018).

Прехранбени систем	ПГ додаток	FRAP вредност (mmol FeII eq / kg)
<b>Кластер 1: Безалк. пића и хладни десерти</b>		
Енергетска пића са и без шећера		
Без додатка ПГ	-	није детектована
Обогаћено са ПГ (1:10)	2% GS	0,41
Негазирана ароматизована вода		
Без додатка ПГ	-	није детектована
Обогаћено са ПГ (1:10)	2% GS	0,41
Безалк. газирана пића		
Без додатка ПГ	-	0,04 – 0,08
Обогаћено са ПГ (1:10)	2% GS	0,44 – 0,48
Хладни десерти		
Без додатка ПГ	-	0,00 – 0,09
Обогаћено са ПГ (1:10)	2% GS	0,41 – 0,49
<b>Кластер 2: Хлеб и пекарски производи</b>		
Хлеб		
Без додатка ПГ	-	0,31 – 0,53
Обогаћено са ПГ (1:10)	10% GS	1,83 – 1,85
Вафли		
Без додатка ПГ	-	0,08 – 0,20
Обогаћено са ПГ (1:10)	10% GS	1,87 – 1,98
Мафини		
Без додатка ПГ	-	0,37 – 0,46
Обогаћено са ПГ (1:10)	10% GS	2,13 – 2,21
Бисквити		
Без додатка ПГ	-	0,01 – 0,33
Обогаћено са ПГ (1:10)	10% GS	1,81 – 2,01

\*FRAP вредности прехранбених производа приказане су другом раду (Carlesn *et al.*, 2010). FRAP вредности полутечних додатака са 2% и 10% ПГ износе 4,1 и 18 mmol FeII eq / kg, респективно. FRAP вредности прехранбених производа обогаћених ПГ додацима рачунати су на основу претходно приказаних вредности узимајући у обзир употребу ПГ додатака у односу на прехранбени производ од 1 : 10.

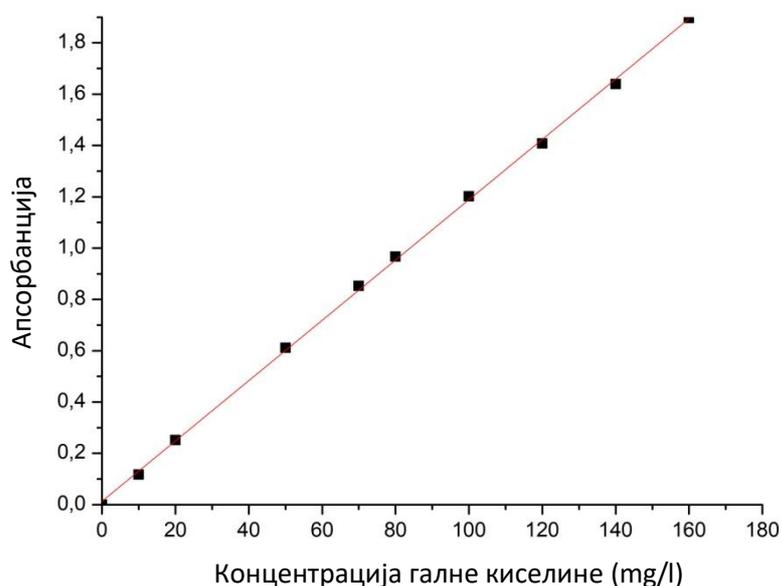


Слика 37: Шематски приказ технологија обраде ферментисаних покожица грожђа сорте Барбера до крајњих производа

II Оцењивања антиоксидативног потенцијала три најчешће коришћене сорте грожђа у производњи црвених вина у Србији, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc и Прокупац

### 5.10 Резултати одређивања укупног садржаја полифенолних једињења

Калибрациона крива конструисана употребом раствора галне киселине као стандарда дата је на Слици 38. Коефицијент корелације износио је  $R^2 = 0,9995$ .



Слика 38. Калибрациона крива за одређивање укупног садржаја полифенолних једињења

У Табели 9 приказан је садржај полифенолних једињења у екстрактима покожица грожђа, изражен у g еквивалената галне киселине у 100 g масе узорка. Сви експерименти рађени су у трипликату, па су у табели приказане средње вредности.

Табела 9. Укупан садржај полифенолних једињења у покожицама одабраних сорти грожђа\*

Сорта грожђа	g еквивалената галне киселине у 100 g узорка	
	MeOH	EtOH
Cabernet Sauvignon	8,46 ± 0,08	10,28 ± 0,10
Cabernet Franc	10,9 ± 0,05	11,22 ± 0,03
Прокупац	9,71 ± 0,06	13,72 ± 0,09

\* EtOH – етанолни екстракти; MeOH метанолни екстракти

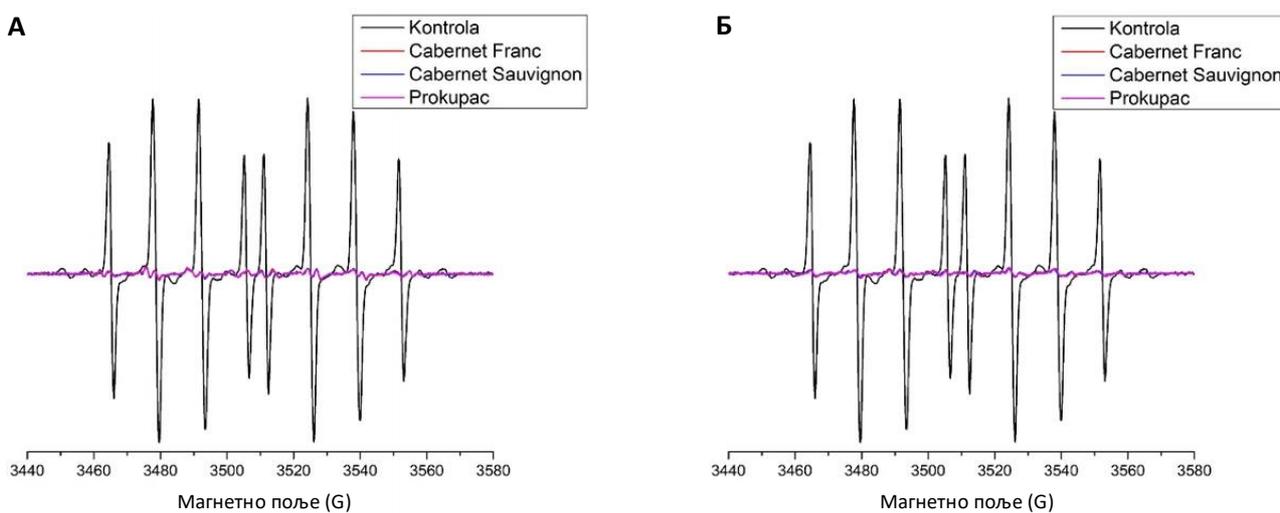
Вредности садржаја укупних полифенолних једињења приказане у Табели 7 налазе у оквиру вредности добијених за ферментисане покожице грожђа описаних у литератури (Rockenbach *et al.*, 2011). На основу добијених резултата може се закључити да ЕтОН екстракти покожица поседују већи садржај полифенолних једињења у односу на МеОН екстракте. МеОН екстракт покожица сорте Cabernet Franc најбогатији је полифенолним једињењима, док је код ЕтОН екстраката то случај са узорком сорте Прокупац. Етанолни екстракт ПГ сорте Прокупац је уједно показао највећи садржај укупних полифенолних једињења од свих узорака.

### 5.11 Резултати одређивања антирадикалске активности екстраката покожица грожђа употребом електронске парамагнетне резонантне (ЕПР) спектроскопије

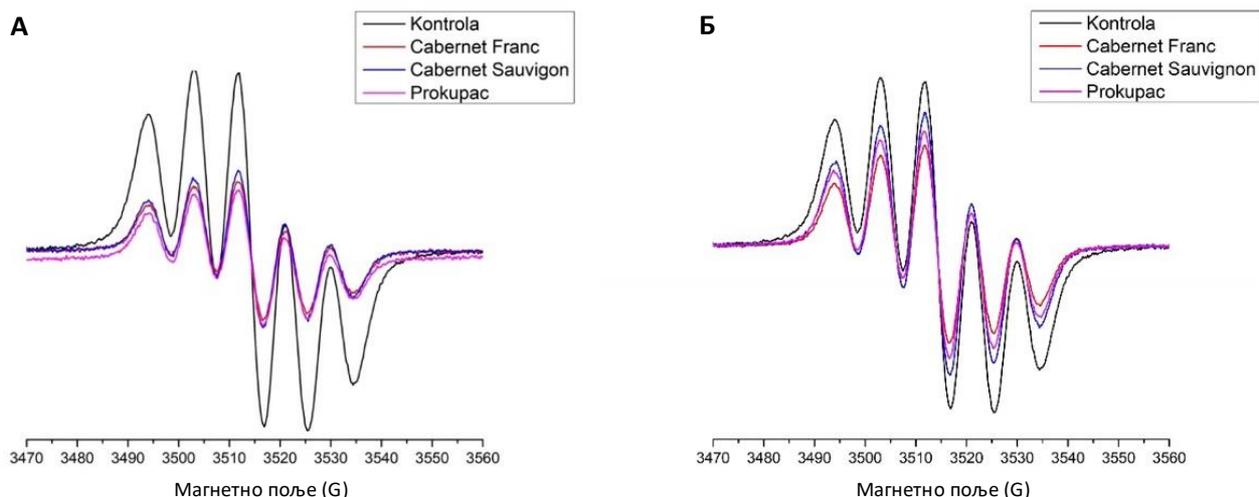
На основу ЕПР мерења ефикасности екстраката покожица одабраних сорти грожђа у уклањању  $\cdot\text{OH}$  и  $\text{DPPH}$  радикала 2 минута од интеракције са овим врстама, добијени су ЕПР спектри приказани на Сликама 39 и 40. На основу површине испод сигнала, одређена је антирадикалска активност сваког узорка, према следећој једначини:

$$AA = \frac{I_k - I_u}{I_k} 100 (\%)$$

где  $I_k$  и  $I_u$  представљају површине испод сигнала контроле и узорка, респективно. Добијени резултати приказани су у Табели 10.



Слика 39. ЕПР спектри анти-хидроксил радикалске активности етанолних (А) и метанолних (Б) екстраката покожица грожђа



Слика 40. ЕПР спектри анти-DPPH активности етанолних (А) и метанолних (Б) екстраката покожица грожђа

Табела 10. Антирадикалска активност екстраката покожица грожђа према  $\cdot\text{OH}$  и DPPH радикалима\*

Сорта грожђа	Редукција ЕПР сигнала $\cdot\text{OH}$ радикала (%)		Редукција ЕПР сигнала DPPH радикала (%)	
	MeOH	EtOH	MeOH	EtOH
Cabernet Sauvignon	97,81 ± 0,04	81,10 ± 0,05	19,23 ± 0,21	55,41 ± 0,27
Cabernet Franc	97,64 ± 0,04	81,29 ± 0,05	39,14 ± 0,21	60,94 ± 0,27
Прокупац	97,87 ± 0,04	83,83 ± 0,05	30,03 ± 0,21	61,59 ± 0,27

\* EtOH – етанолни екстракти; MeOH метанолни екстракти

На основу резултата ЕПР мерења, може се закључити да су сви узорци показали већу активност према  $\cdot\text{OH}$  радикалима, него према DPPH радикалима. Сви EtOH екстракти показали су снажнију антирадикалску активност према DPPH радикалима у односу на MeOH екстракте. Код антирадикалске активности према  $\cdot\text{OH}$  радикалима овај тренд је супротан. MeOH екстракти имали су убедљиво највећу способност уклањања  $\cdot\text{OH}$  радикала. Посебно је занимљиво то да су екстракти покожица сорте Прокупац готово увек најефикасније уклањали обе врсте радикала, у поређењу са друге две сорте у оквиру овог истраживања. То је посебно значајно имајући у виду да је Прокупац српска аутохтона сорта винског грожђа. Разлика у антирадикалској активности екстраката највероватније је условљена разликом у саставу активних компонената сваког од узорака. То се посебно може уочити у изузетној корелацији резултата одређивања садржаја укупних полифенолних једињења и резултата анти-DPPH активности. Због тога би било пожељно другим методама (на пример HPLC) установити тачан хемијски састав екстраката. Резултати ЕПР експеримената говоре у прилог томе да покожице имају значајан потенцијал употребе у прехранбеној, фармацеутској и козметичкој индустрији, и да не представљају искључиво отпадни производ.

III Оцењивање способности инкапсулације екстраката покожица грожђа сорте Прокупац и Sangiovese техником електрораспршивања кроз матрицу природног полимера као носача

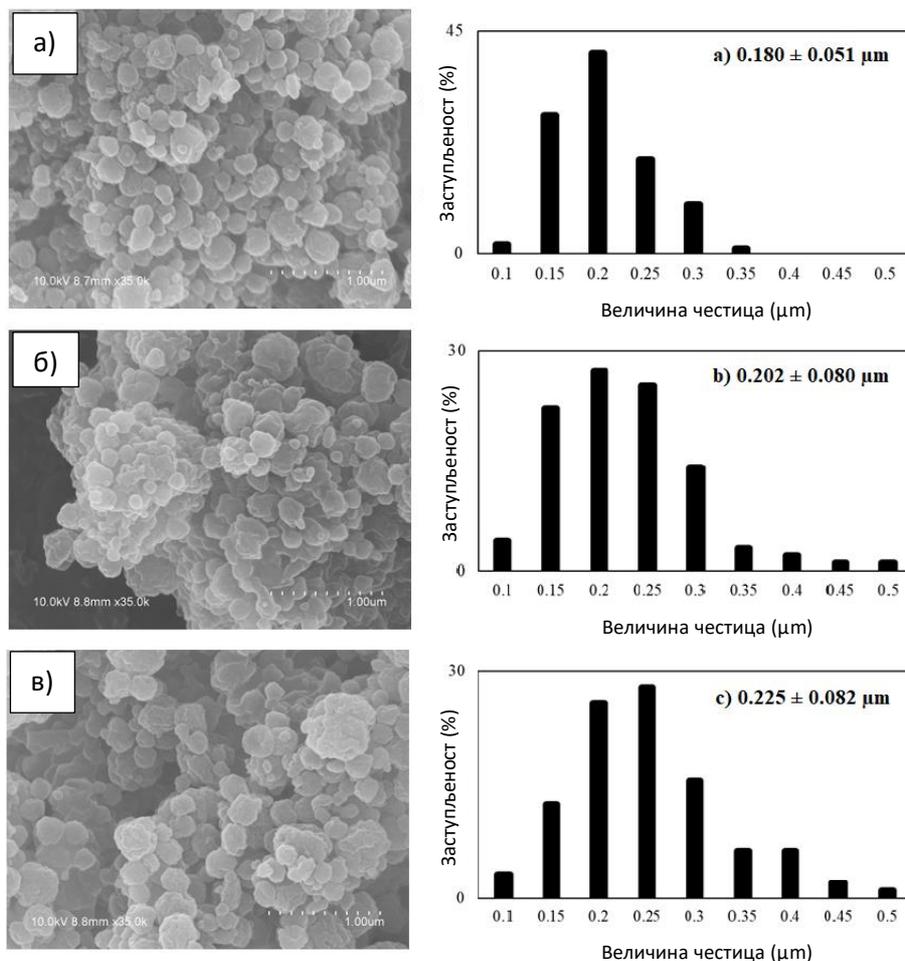
### 5.12 Одређивање садржаја укупних шећера у ПГ и екстрактима методом по Luff-Schoorl-у

Обзиром да полазни материјали у овом истраживању представљају два различита система иако оба спадају у отпадни материјал пореклом од грожђа. Један узорак је претрпео алкохолну ферментацију а други не, те је веома било интересантно измерити садржај шећера у ова два материјала.

Методом по Luff-Schoorl-у измерен је садржај укупних шећера од  $51 \pm 2\%$  за ПГ сорте Прокупац, односно  $< 1\%$  за ПГ сорте Sangiovese. Ово је и било очекивано обзиром да су ПГ сорте Sangiovese претрпеле потпуну алкохолну ферментацију у винарији, док су ПГ сорте Прокупац издвојене неферментисане.

### 5.13 Скенирајућа електронска микроскопија (СЕМ) и одређивање расподеле величине добијених капсула екстраката ПГ

Нанокapsуле зеина са екстрактом ПГ сорте Прокупац, зеина са екстрактом ПГ Sangiovese и само зеина, (Слика 41а, б, в), нису показале значајну разлику у погледу морфологије и расподеле величине капсула. Обзиром на то да није постојала значајна разлика, све капсуле су показале просечну величину од  $0,202 \mu\text{m}$ . Све капсуле су показале полусферичан облик, грубу површину и порозну природу (Слика 41). Сличне резултате приказали су Raza *et al.*, (2020) и Miguel *et al.*, (2019). У раду Raza *et al.*, (2020) окарактерисане су микро- и нано-конструкције природног полимера зеина као и мултифункционалност терапеутске примене у системима оралног давања лекова. У раду Miguel *et al.* (2019) оцењени су оксидативна стабилност и физичка својства мајонеза обогаченог нанокapsулама зеина са риблим уљем, добијених процесом електрораспршивања. Порозна природа капсула може утицати на ослобађање биоактивних једињења. Полимер зеин је отпоран и робуснији према растворљивости због хидрофобне природе, те је погодан материјал за развој микросфера са контролисаним ослобађањем биоактивних једињења. Оваква природа капсула зеина уз додатак фенолима богатих екстраката покожица грожђа отвара могућност за различите примене ових капсула како у прехранбеној, тако и у фармацеутској и козметичкој индустрији.



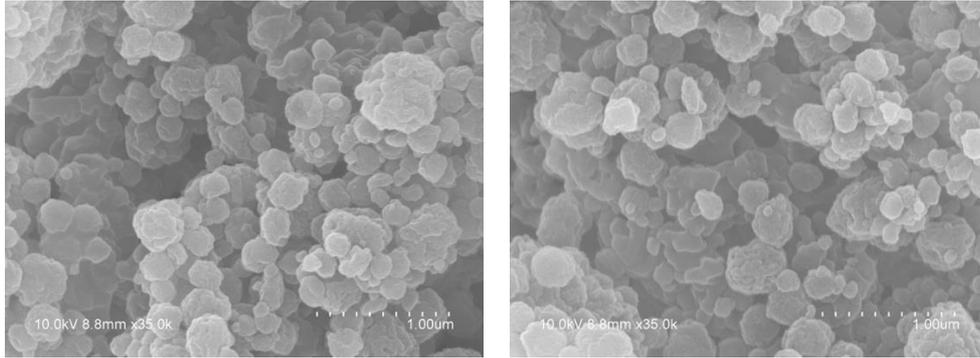
Слика 41: Приказ нанокapsула: а) Зеин + Прокупац, б) Зеин + Sangiovese, в) Зеин

У циљу добијања што је могуће бољих микрографа, благо измењени услови су били примењивани за добијање капсула за снимања на скенирајућем електросном микроскопу у поређењу са условима примењеним за накупљање узорака капсула за остале анализе.

У наставку ће бити представљени неки од најуспешнијих услова под којима су се производеле капсуле методом електрораспршивања, као и добијени микрографи:

- 1) Полимерни раствор: зеин (6%).  
Растварач: етанол : вода (70 : 30).

Услови: уређај Bioipicia, модел LE-10, брзина протока  $250 \mu\text{l} / \text{h}$ , удаљеност од врха игле до колектора 21 cm, примењени напон 14,5 kV, врста игле боје лаванде, дужина трајања накупљања узорка 30 минута (Слика 42).

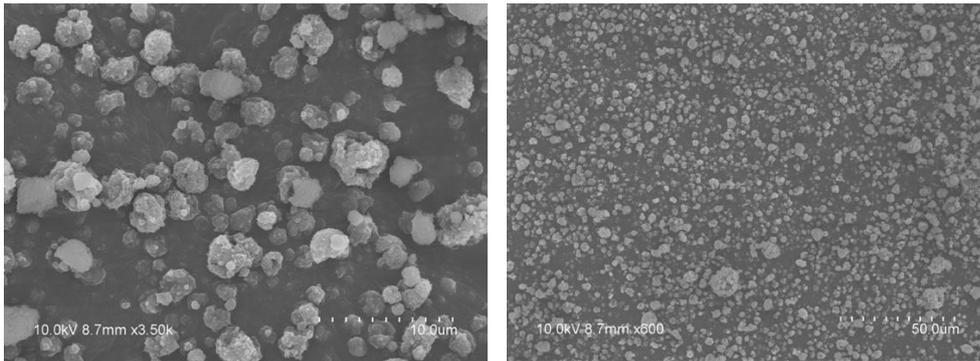


Слика 42. Приказ нанокapsула зеина

2) Полимерни раствор: зеин (6%).

Растварач: етанол : вода (70 : 30).

Услови: уређај Bioinicia, модел SpinBox, брзина протока 300 µl / h, удаљеност од врха игле до колектора 21 cm, примењени напон 14,5 kV, врста игле боје лаванде, дужина трајања накупљања узорка 30 минута (Слика 43).

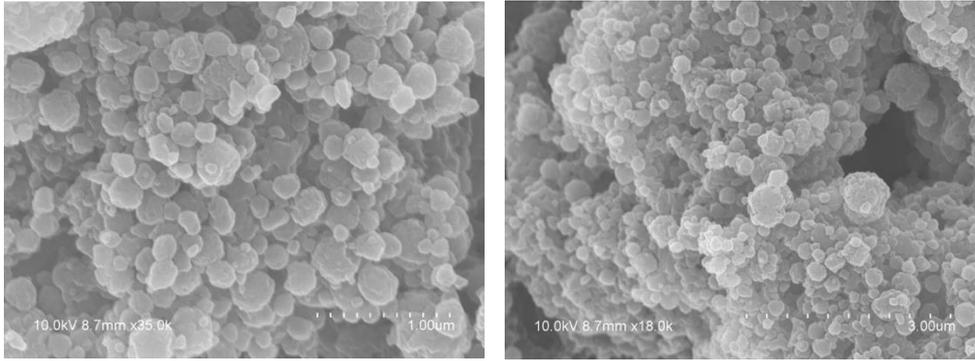


Слика 43. Приказ нанокapsула зеина

3) Полимерни раствор: зеин (6%) + екстракт ПГ сорте Sangiovese.

Растварач: етанол : вода (70 : 30).

Услови: уређај Bioinicia, модел LE-10, брзина протока 250 µl / h, удаљеност од врха игле до колектора 21 cm, примењени напон 14,5 kV, врста игле боје лаванде, дужина трајања накупљања узорка 30 минута (Слика 44).

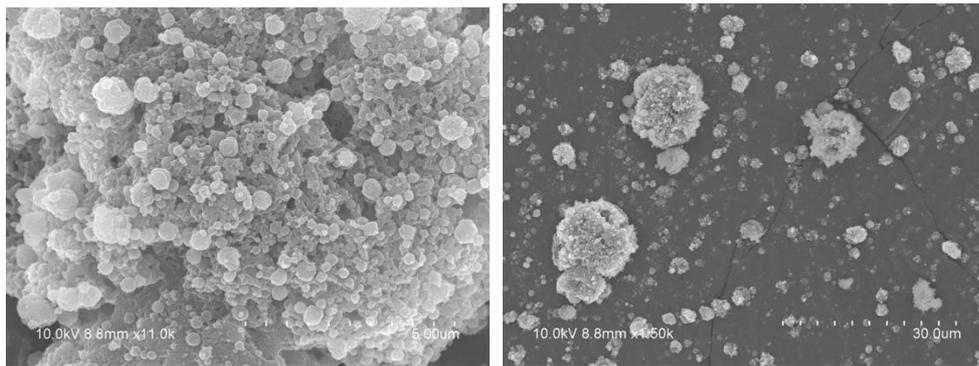


Слика 44. Приказ нанокапсула зеина са екстрактом ПГ сорте Sangiovese

4) Полимерни раствор: зеин (6%) + екстракт ПГ сорте Sangiovese.

Растварач: етанол : вода (70 : 30).

Услови: уређај Bioinicia, модел LE-10, брзина протока 200 µl / h, удаљеност од врха игле до колектора 21 cm, примењени напон 20,0 kV, врста игле боје лаванде, дужина трајања накупљања узорка 30 минута (Слика 45).

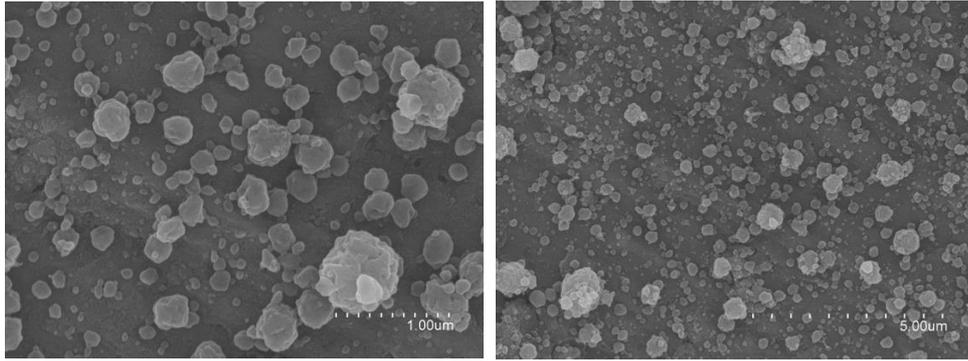


Слика 45. Приказ нанокапсула зеина са екстрактом ПГ сорте Sangiovese

5) Полимерни раствор: зеин (6%) + екстракт ПГ сорте Sangiovese.

Растварач: етанол : вода (70 : 30).

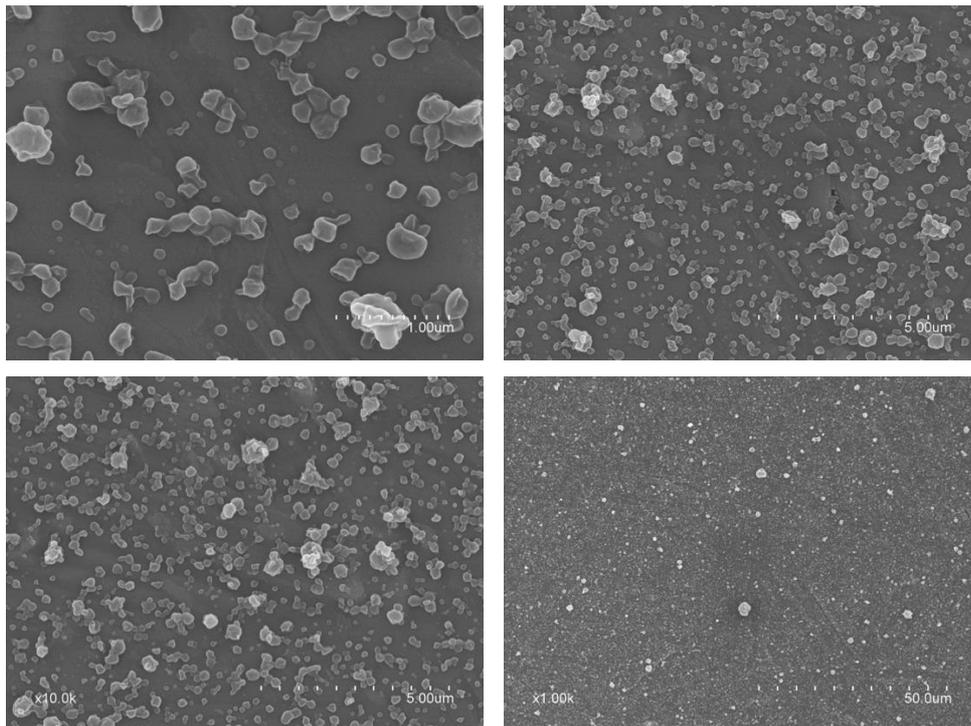
Услови: уређај Bioinicia, модел LE-500, брзина протока 150 µl / h, удаљеност од врха игле до колектора 21 cm, примењени напон 20,0 kV, температура 35 °C, врста игле боје лаванде, дужина трајања накупљања узорка 30 минута (Слика 46).



Слика 46. Приказ нанокапсула зеина са екстрактом ПГ сорте Sangiovese

б) Полимерни раствор: зеин (концентрација 6%) + екстракт ПГ сорте Прокупац.  
Растварач: етанол : вода (70 : 30).

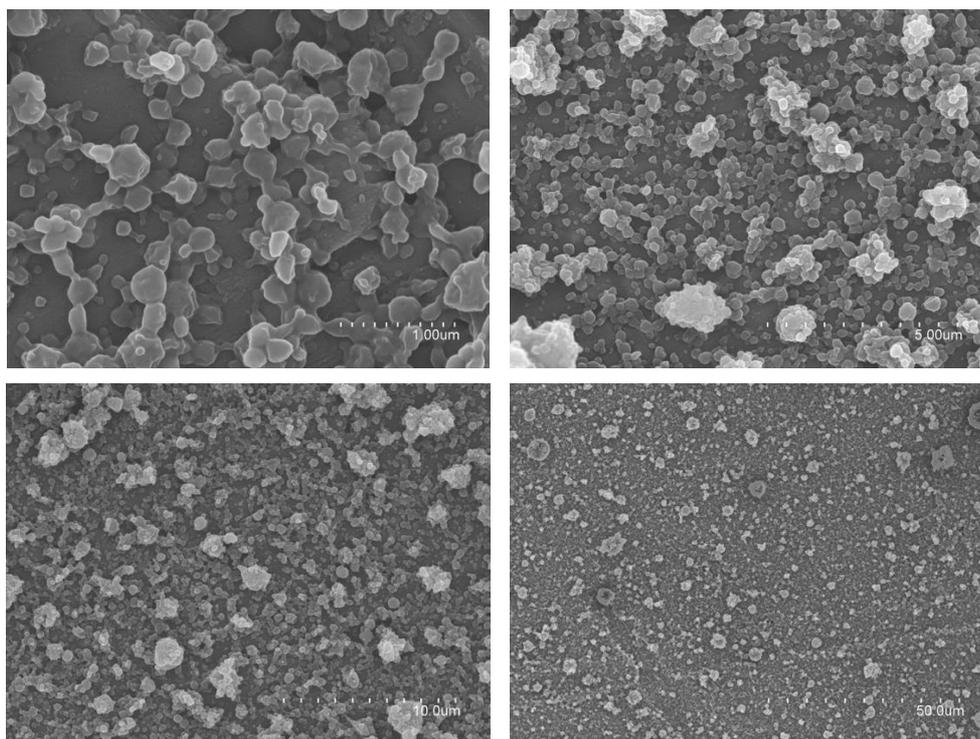
Услови: уређај Bioinicia, модел LE-500, брзина протока 150 µl / h, удаљеност од врха игле до колектора 21 cm, примењени напон 14,5 kV, температура 35 °C, врста игле боје лаванде, дужина трајања накупљања узорка 30 минута (Слика 47).



Слика 47. Приказ нанокапсула зеина са екстрактом ПГ сорте Прокупац

7) Полимерни раствор: зеин (концентрација 6%) + екстракт ПГ сорте Прокупац.  
Растварач: етанол : вода (70 : 30).

Услови: уређај Bioinicia, модел LE-500, брзина протока 150 µl / h, удаљеност од врха игле до колектора 21 cm, примењени напон 20,0 kV, температура 35 °C, врста игле боје лаванде, дужина трајања накупљања узорка 30 минута (Слика 48).



Слика 48. Приказ нанокapsула зеина са екстрактом ПГ сорте Прокупац

### 5.14 Физичко-хемијска карактеризација полимерних раствора

Ради што бољег разумевања материјала од којих ће се производити капсуле методом електрораспршивања, одређене су физичко-хемијске особине полимерних раствора (зеина, зеина са екстрактом ПГ сорте Sangiovese и зеина са екстрактом ПГ сорте Прокупац), а резултати приказани у Табели 11.

Измерене вредности вискозности, површинског напона и проводљивости полимерних раствора биле су испод максималних вредности предложених за успешан процес добијања капсула електрораспршивањем (Jaworek, 2007; Librán *et al.*, 2017). Ови параметри су важни јер директно утичу на стабилност Тејлоровог конуса и морфологију добијених структура.

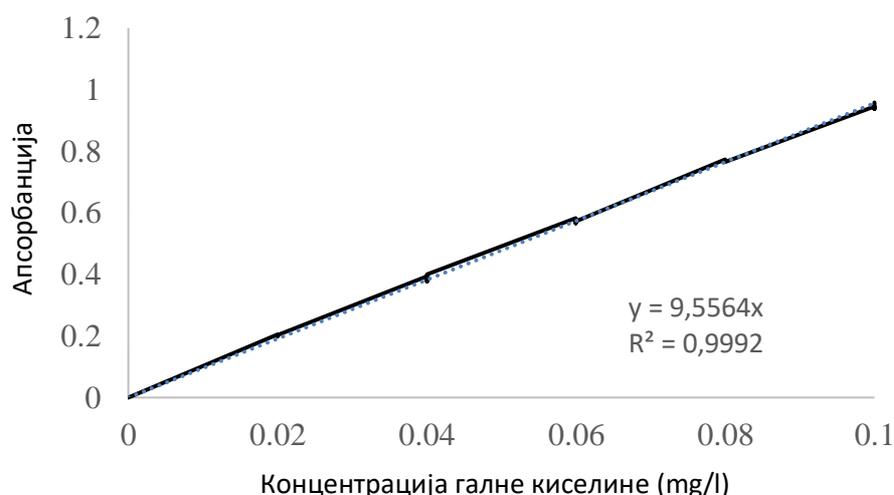
Табела 11. Физичко-хемијске особине полимерних раствора коришћених за производњу нанокapsула.\*

Полимерни раствор	Вискозност (сР)	Површински напон (mN / m)	Проводљивост (mS / cm)
Зеин	5,85 <sup>b</sup> ± 0,01	27,20 <sup>a</sup> ± 0,00	0,70 <sup>c</sup> ± 0,00
Зеин + Sangiovese	5,80 <sup>b</sup> ± 0,04	26,70 <sup>a</sup> ± 1,13	1,05 <sup>b</sup> ± 0,00
Зеин + Прокупац	7,04 <sup>a</sup> ± 0,04	27,30 <sup>a</sup> ± 0,00	1,57 <sup>a</sup> ± 0,00

\*Свака колона представља средњу вредност ± стандардна девијација три независна мерења. Различита слова у свакој колони указују на статистички значајну разлику између измерених вредности ( $p < 0,05$ )

### 5.15 Одређивање укупног садржаја растворљивих фенола (Folin – Ciocâlteu тест) и одређивање антиоксидативне активности (DPPH и ABTS тест)

Калибрациона крива конструисана употребом раствора галне киселине као стандарда дата је на Слици 49. Коефицијент корелације износио је  $R^2 = 0,9992$ .



Слика 49. Калибрациона крива за одређивање укупног садржаја полифенолних једињења

Резултати укупног садржаја растворљивих полифенола у екстрактима и капсулама приказани су у Табели 12. Садржај укупних растворљивих полифенола у екстракту ферментисаних ПГ сорте Sangiovese износио је  $5,82 \pm 0,4$  g GAE / 100 g с. м., док је у екстракту неферментисаних ПГ сорте Прокупац износио  $1,09 \pm 0,0$  g GAE / 100 g с. м. Ове вредности налазе у оквиру вредности добијених за ферментисане покожице грожђа описаних у литератури (Rockenbach *et al.*, 2011), односно вредности добијене за неферментисане покожице грожђа описаних у литератури (Castro-Lopez *et al.*, 2019). Када су у питању капсуле, садржај укупних растворљивих фенола за капсуле зеина са екстрактом ПГ сорте Sangiovese износио је  $21,66 \pm 0,1$  g GAE / 100 g с. м., док је за капсуле зеина са екстрактом ПГ сорте Прокупац износио  $16,73 \pm 0,1$  g GAE / 100 g с. м. Из овога могу да се изведу три закључка. Први да ферментисана покожица грожђа представља концентрованији извор укупних растворљивих фенолних једињења од неферментисане ПГ. Други закључак је да је капацитет пуњења капсула зеина био знатно виши код инкапсулације екстракта неферментисане ПГ. Овај закључак је изведен на основу тога што је садржај укупних растворљивих фенолних једињења био преко пет пута већи код ферментисаних ПГ у односу на неферментисане ПГ када су екстракти у питању, док је овај параметар код капсула био већи само за око 30% код ферментисаних ПГ у односу на неферментисане ПГ (Табела 12). Трећи закључак који се може извести је да се посматрано на суву материју садржај укупних растворљивих полифенола значајно повећао након инкапсулације кроз матрицу зеина, те је код екстракта сорте Sangiovese био 3,7 пута већи, док је код екстракта сорте Прокупац био скоро 20 пута већи. Узимајући у обзир да капсуле зеина обезбеђују и оксидативну стабилност инкапсулисаним

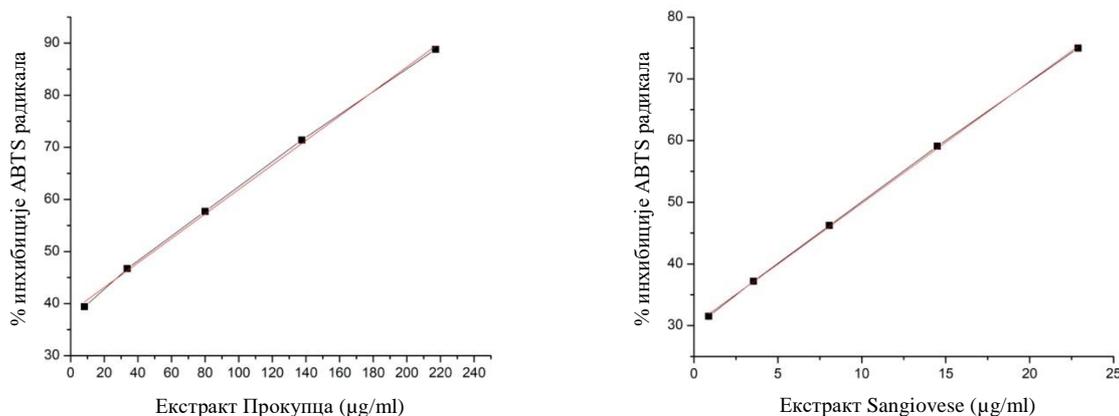
биоактивном једињењу што је доказано у раду (Miguel *et al.*, 2019), долазимо до закључка да инкапсулација оба типа екстракта кроз матрицу протеина кукуруза зеина има одличну перспективу индустријске примене.

Табела 12. Резултати садржаја укупних растворљивих полифенола и антиоксидативне активности (исказани као концентрација при којој се остварује 50% инхибиције ABTS односно DPPH радикала) у капсулама и екстрактима ПГ сорти Sangiovese и Прокупац\*

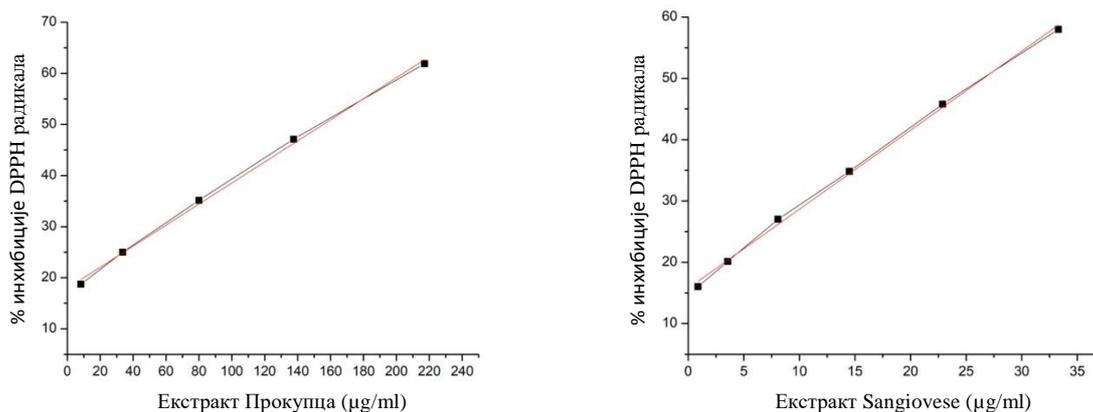
Узорак		Укупан садржај фенола (g GAE / 100 g с. м.)	ABTS ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ за 50%инх.)	DPPH ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ за 50%инх.)
Тип узорка	Сорта грозђа			
Екстракт ПГ	Sangiovese	$5,82^{\text{u}} \pm 0,4$	$10,8^{\text{d}} \pm 0,3$	$26,1^{\text{u}} \pm 0,5$
	Прокупац	$1,09^{\text{d}} \pm 0,0$	$55,0^{\text{a}} \pm 1,2$	$164,8^{\text{b}} \pm 2,1$
Раствор нанокапсула	Sangiovese	$21,66^{\text{a}} \pm 0,1$	$22,1^{\text{u}} \pm 0,7$	$22,3^{\text{d}} \pm 0,4$
	Прокупац	$16,73^{\text{b}} \pm 0,1$	$31,6^{\text{b}} \pm 0,9$	$281,6^{\text{a}} \pm 3,6$

\*Свака колона представља средњу вредност  $\pm$  стандардна девијација три независна мерења. Различита слова у свакој колони указују на статистички значајну разлику између измерених вредности ( $p < 0,05$ )

Вредности добијене за антирадикалску активност екстракта приказане су у Табели 10 и биле су у оквирима вредности приказаних у раду (Castro-Lopez *et al.*, 2019). Када је у питању антирадикалска активност екстракта према ABTS и DPPH радикалима, примећен је потпуно идентичан тренд као и код садржаја укупних растворљивих полифенола. Антирадикалска активност капсула, супротно садржају укупних растворљивих полифенола, није толико варијабилна и била је у опсегу до  $\pm 2$  пута у односу на активност екстракта. Антирадикалска активност капсула са екстрактом ферментисаних ПГ према DPPH радикалу није се много променила у односу на чист екстракт, док је код капсула са екстрактом неферментисаних ПГ била значајно слабија у односу на екстракт. Комплетна динамика инхибиције ABTS, односно DPPH радикала приказана је на Сликама 50 и 51.



Слика 50. Приказ динамике инхибиције ABTS радикала екстрактима ПГ сорте Прокупац, односно Sangiovese



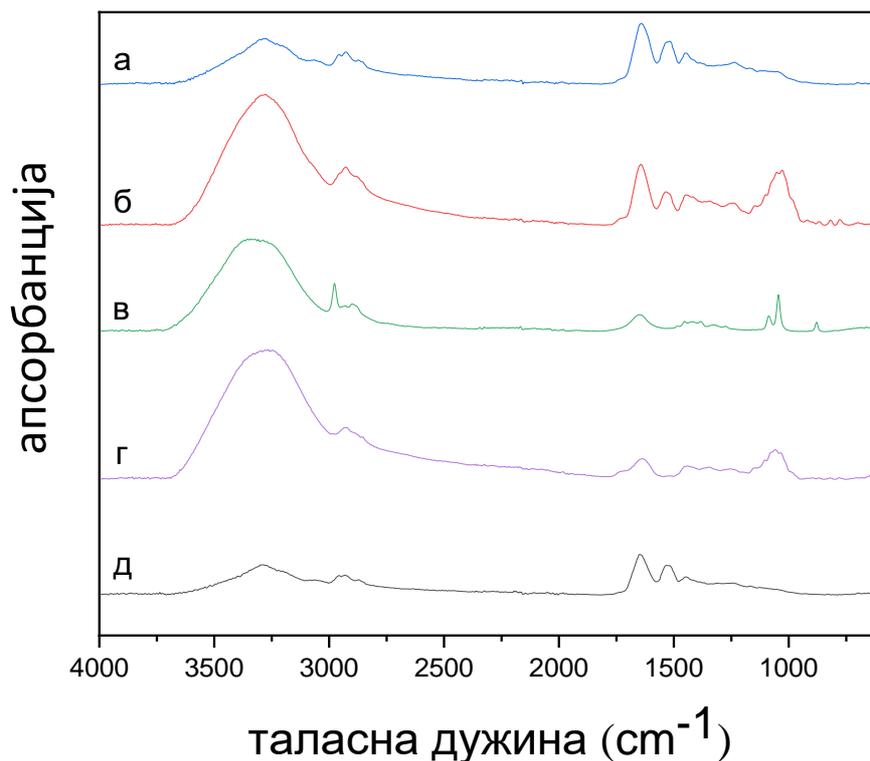
Слика 51. Приказ динамике инхибиције DPPH радикала екстрактима ПГ сорте Прокупац, односно Sangiovese

## 5.16 Фуриерова трансформациона инфрацрвена спектроскопија (FTIR)

FTIR спектар зеина (Слика 52д) показује карактеристичан апсорпциони максимум (траку) у опсегу од  $3200 - 3769 \text{ cm}^{-1}$  који може бити повезан са N-H и O-H истезањем аминокиселина. Апсорпциони максимуми на  $3022$  и  $2936 \text{ cm}^{-1}$  представљају вибрације истезања C-H веза метила. Поред тога, јаке апсорпционе везе имиња, амида (II) и амида (III) приказане су на  $1682$ ,  $1569$  и  $1318 \text{ cm}^{-1}$ , респективно (Ghorbani *et al.*, 2020). FTIR спектри екстракта ПГ сорте Прокупац и сорте Sangiovese показали су апсорпционе максимуме на око  $3327 \text{ cm}^{-1}$  (Слика 52в и 52г), што одговара истезању O-H веза полисахарида и кутина (Nogales-Bueno *et al.*, 2017). FTIR спектар екстракта ПГ сорте Прокупац показао је један сигнал на око  $2920 \text{ cm}^{-1}$ , што одговара истезању  $\text{CH}_2$  функционалних група воскова, кутина и липида. Оба екстракта су показала по један апсорпциони максимум на око  $1620 \text{ cm}^{-1}$ , који одговара истезању COO-функционалних група пектина (Nogales-Bueno *et al.*, 2017). Апсорпциони максимуми на  $1060 \text{ cm}^{-1}$  одговарају истезању C-O веза полисахарида. Чак и са овом анализом приметили смо сигнал који одговара фенолним једињењима јер апсорпциони максимум на око  $1520 \text{ cm}^{-1}$  одговара истезању C-C ароматичних веза.

Занимљив резултат овог истраживања односио се на молекулску интеракцију између полимера зеина и екстракта ПГ сорте Прокупац (Слика 52б), јер смо приметили један нови максимум на око  $1031 \text{ cm}^{-1}$ . Примећени су и сигнали на око  $3327 \text{ cm}^{-1}$  и  $2920 \text{ cm}^{-1}$ . Ови апсорпциони максимуми одговарају екстракту ПГ сорте Прокупац (Слика 52г). Неочекивани резултат показао је да капсуле полимера зеина са екстрактом ПГ сорте Sangiovese (Слика 52а) нису показале никакав сигнал који одговара екстракту ПГ сорте Sangiovese (Слика 52в). Појавио се само слаб сигнал на око  $1053 \text{ cm}^{-1}$ , поред сигнала који одговарају капсулама зеина. То значи да је био низак степен инкапсулације екстракта ПГ сорте Sangiovese у полимерној матрици зеина.

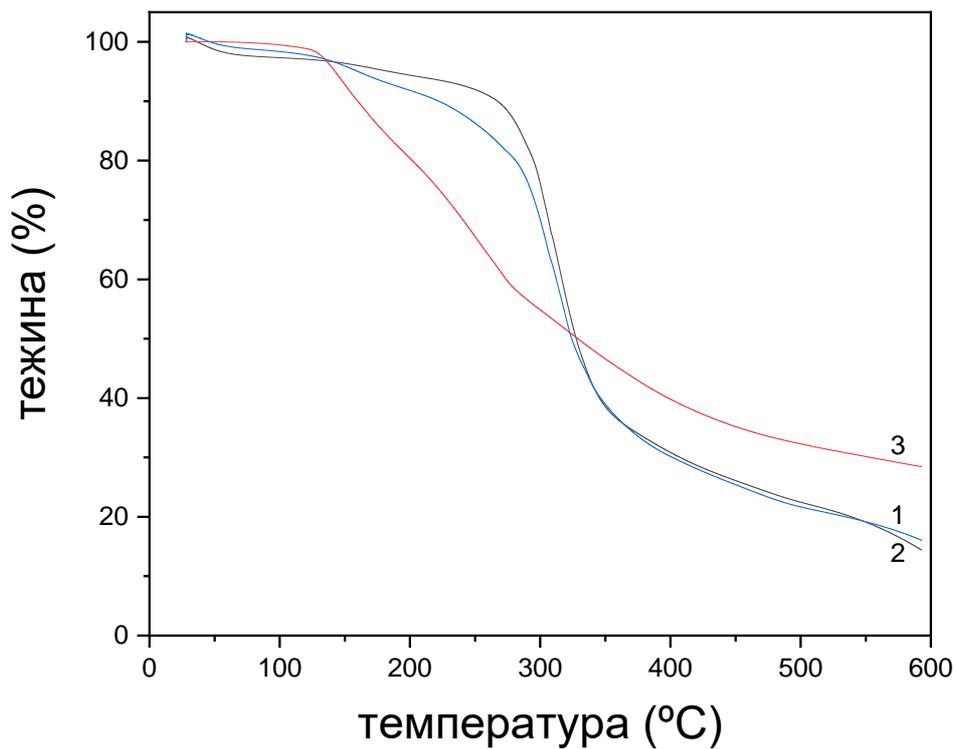
Знатно веће присуство шећера у екстракту ПГ сорте Прокупац, у односу на екстракт ПГ сорте Sangiovese, могло је да побољша интеракције са полимером зеином, међутим, то такође може утицати и на количину укупних фенолних једињења. О томе ћемо разговарати у делу који се односи на садржај укупних фенолних једињења.



Слика 52. FTIR спектри: а) Капсуле: зеин + екстракт ПГ сорте Sangiovese; б) Капсуле: зеин + екстракт ПГ сорте Прокупац; в) Екстракт ПГ сорте Sangiovese; г) Екстракт ПГ сорте Прокупац; д) Капсуле зеина.

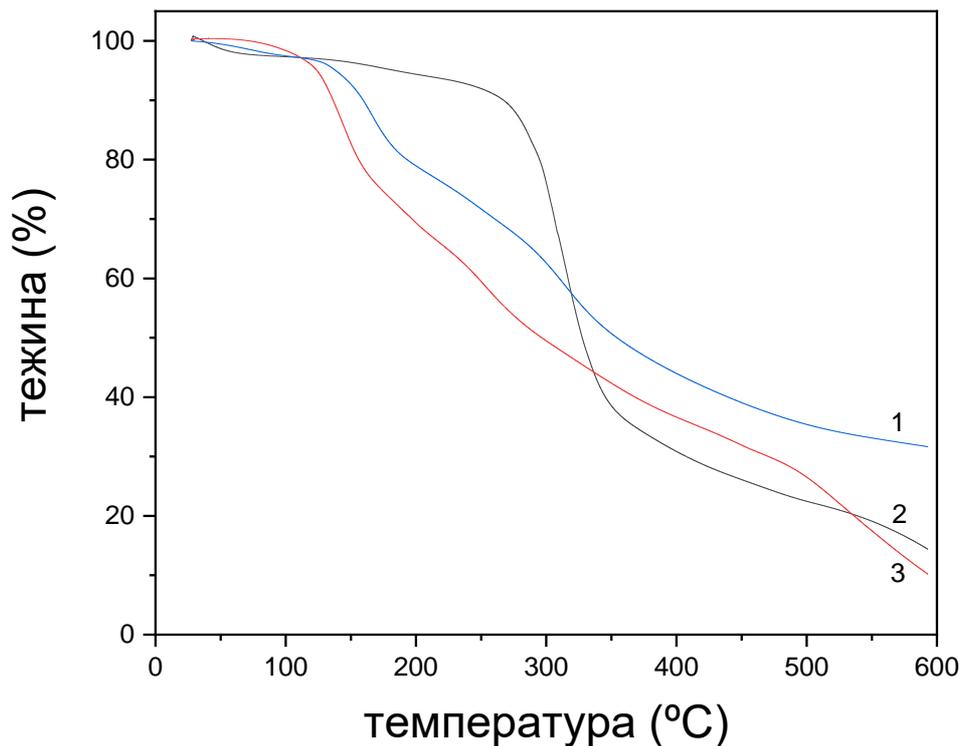
### 5.17 Термогравиметријска анализа (ТГА)

Капсуле зеина показале су значајан губитак масе од 74% између 147 °C и 506 °C (Слика 53.1), који се може приписати термичкој разградњи полимерних ланаца (Ghorbani *et al.*, 2020). Екстракт ПГ сорте Sangiovese показао је значајан губитак масе између 100 °C и 500 °C са укупним губитком масе од 64% (Слика 53.3), а након тога забележен је постепени пад. Овај постепени губитак масе настао је услед карбонизације полимерног материјала, а чак може указивати и на присуство минералних једињења у екстрактима. Капсуле зеина са додатком екстракта ПГ сорте Sangiovese показале су слично понашање као код капсула зеина, јер је примећен значајан губитак масе између 147 °C и 504 °C са укупним губитком од 75% (Слика 53.2). Поређењем крива термичке разградње долазимо до закључка да су капсуле зеина побољшале термичку стабилност екстракта ПГ сорте Sangiovese у смислу да је тек при вишој температури дошло до интензивирања термичке разградње.



Слика 53. TGA спектри: 1) Капсуле: зеин + екстракт ПГ сорте Sangiovese; 2) Капсуле зеина; 3) Екстракт ПГ сорте Sangiovese.

Екстракт ПГ сорте Процупац показао је значајан губитак масе између 88 °C и 503 °C, што одговара укупном губитку од 73% (Слика 54.3). Док су капсуле зеина са екстрактом ПГ сорте Процупац показале пад за 10% нижи, што одговара укупном губитку масе од 63% између 90 °C и 504 °C. То значи да су капсуле зеина давале термичку заштиту екстракту између 10 °C и 600 °C.



Слика 54. TGA спектри: 1) Капсуле: зеин + екстракт ПГ сорте Прокупац; 2) Капсуле зеина; 3) Екстракт ПГ сорте Прокупац.

Поређењем ова два термограма долазимо до закључка да су капсуле зеина имале бољу интеракцију са екстрактом ПГ сорте Прокупац него са екстрактом ПГ сорте Sangiovese обзиром да је термичка разградња капсула зеина са екстрактом ПГ сорте Прокупац показала сличан тренд као код термичке разградње екстракта ПГ сорте Прокупац. До боље интеракције између капсула зеина и екстракта ПГ сорте Прокупац дошло је вероватно због већег садржаја шећера у екстракту ПГ сорте Прокупац, односно због већег садржаја шећера у неферментисаном отпаду грожђа пореклом из трговина у односу на ферментисане ПГ у виду споредних производа винске индустрије. Хидроксилне групе из зеина стварају боље интеракције, преко водоничних веза, са угљеником (C) из шећера. Захваљујући овом понашању капсула оне могу бити погодне за многе индустријске примене, пре свега у производњи прехранбених и козметичких производа.

### 5.18 LC-MS-MS анализа екстраката ПГ сорти Прокупац и Sangiovese

У циљу што детаљније карактеризације екстраката ПГ сорти Прокупац и Sangiovese, одрађена је LC-MS-MS анализа на присуство укупно 44 фенолна једињења (Табела 13). У узорку екстракта ПГ сорте Sangiovese идентификована су укупно 24 фенолна једињења, док је присуство осталих 20 једињења било испод прага детекције (LoQ) у односу на коришћени стандард. Када је у питању узорак екстракта ПГ сорте Прокупац, присуство чак 39 једињења било је испод прага детекције у односу на коришћени стандард, док су идентификована укупно 5 фенолна једињења: гална киселина, катехин, хиперозид, аментофлавон и рутин, од којих су катехин и хиперозид били најдоминантнији. Када је у питању екстракт ПГ сорте Sangiovese, најдоминантнија фенолна једињења била су катехин, кверцетин, изорамнетин, епикатехин, гална киселина, протокатехинска киселина, ванилинска киселина, кемферол и мирицетин.

Нека од ових једињења приказана су и у раду (Gómez-Alonso *et al.*, 2007), у којем су HPLC методом анализирани покожице грожђа. Значајна разлика у полифенолном профилу приписује се различитој природи полазних материјала, односно чињеници да је екстракт ПГ сорте Sangiovese добијен из ферментисане комине грожђа као споредног производа винарије, док је екстракт ПГ сорте Прокупац добијен од свеже покожице грожђа са садржајем шећера од око 50%.

Табела 13. Резултати LC-MS-MS анализе екстраката ПГ сорте Sangiovese и Прокупац\*

Једињење	Сорта грожђа	
	Sangiovese	Прокупац
	ng/ml	
<i>p</i> -хидрокси-бензоева киселина	36,01	<3,05
циметна киселина	<97,50	<97,50
протокатехинска киселина	589,63	<3,05
2,5-дихидроксибензоева киселина	<6,10	<6,10
умбелиферон	<3,05	<3,05
<i>p</i> -кумаринска киселина	37,54	<1,53
<i>o</i> -кумаринска киселина	<6,10	<6,10
ванилинска киселина	475,29	<97,50
гална киселина	1192,51	7,43
ескулетин	11,84	<3,05
кафена киселина	14,98	<6,10
хинска киселина	139,83	<12,20
скополетин	<6,10	<6,10
ферулна киселина	12,52	<12,20
сирингинска киселина	<12,20	<12,20
3,4-диметоксициметна киселина	<48,80	<48,80
синапинска киселина	<24,40	<24,40
даидзеин	<48,80	<48,80
апигенин	<12,20	<12,20
генистеин	<12,20	<12,20
бајкалеин	<97,50	<97,50
нарингенин	28,58	<12,20
лутеолин	10,77	<12,20
кемферол	361,25	<97,50
катехин	3356,44	122,31
епикатехин	1368,10	<12,20
кризоериол	3,62	<1,53
кверцетин	2625,27	<390,50
изорамнетин	1992,50	<97,50
мирицетин	274,07	<195,50
хлорогенска киселина	<3,05	<3,05
матаирезинол	<48,80	<48,80
секоизоларицирезинол	<24,40	<24,40
витексин	<3,05	<3,05
апигенин-7- <i>o</i> -глукозид	<1,53	<1,53
бајкалин	<3,05	<3,05
кемферол-3- <i>o</i> -глукозид	<3,05	<3,05
лутеолин-7- <i>o</i> -глукозид	35,11	<6,10
кверцитрин	15,85	<6,10
епигалокатехин галат	21,28	<12,20
хиперозид	132,98	147,50
аментофлавон	7,33	7,97
апиин	<1,53	<1,53
рутин	4,62	9,53

\*Знак „<” указује на то да је концентрација једињења испод прага детекције (Limit of Detection - LoQ) у односу на коришћени стандард.

Резултати LC-MS-MS анализе такође потврђују претходно изведени закључак да ферментисана ПГ представља концентрованији извор фенолних једињења у односу на неферментисану ПГ, обзиром да је однос присуства одабраних фенолних једињења износио чак 40 : 1 у користи ферментисане ПГ.

## 6. ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата и чињеница изложених у дисертацији могу се извести следећи закључци:

1. Са садржајем дијететских влакана од  $112 \pm 2$  g / kg и садржајем полифенолних једињења од преко 3,8 g / kg, влажна, ферментисана покожица грожђа сорте Барбера, као споредни производ винске индустрије, представља вредан материјал који има потенцијал да обогати велики број категорија индустријски произведених прехранбених производа.

2. У влажној, ферментисаној покожици грожђа измерена је активност ензима полифенол оксидазе и пероксидазе слична активности ових ензима код свеже јабуке што је довело до закључка да је овај материјал неопходно ензимски стабилизovati пре потенцијалне примене у производњи прехранбених додатака.

3. Мерењем ензимске активности узорака бланширане и небланширане ПГ, након влажног мљења, дошло се до закључка да је процес бланширања довољно ефикасан да обави ензимску стабилност материјала јер је код небланшираног узорка дошло до знатно већег пада у садржају свих класа фенолних једињења у односу на бланширани узорак.

4. Ради постизања ензимске стабилности, третман бланширања на 100 °C у трајању од 2 минута се показао најефикаснијим.

5. Након влажног мљења код узорака са 10% суве материје ПГ, проценат очуваности садржаја укупних фенолних једињења био је нижи него код узорака са 2% суве материје ПГ, указујући да су оксидативне реакције биле убрзане повећаном концентрацијом суве материје.

6. Степен очуваности проантоцијанидина код небланшароних и бланшираних узорака са садржајем суве материје од 2%, након влажног мљења, износио је 50% у односу на референтни, лиофилизован узорак указујући на то да влажно мљење може промовисати формирање проантоцијанидинских комплекса са матрицом ПГ, узрокујући пад у растворљивости.

7. Садржај мономерних флаванола (сума катехина и епикатехина) био је виши код бланшираних него код небланшираних узорака ПГ па чак и виши у поређењу са лиофилованим узорком, што указује да је ово вероватно резултат хидролизе проантоцијанидина подстакнуте загревањем у киселој средини током процеса бланширања.

8. И код бланшираних и код небланшираних узорака са садржајем суве материје ПГ од 10% степен хидролизе проантоцијанидина био је нижи него у разблаженом медијуму, а самим тим и степен очуваности мономерних флаванола је био врло низак.

9. Садржај флавонола у узорцима са садржајем суве материје ПГ од 2% и 10% након бланширања био је већи него код лиофилованих узорака, највероватније због повећања екстракције ових једињења из ћелијских зидова након термичког третмана.

10. Након бланширања садржај агликона кверцетина је порастао са 21% на 43%, док је заступљеност кверцетин глукозида опала са 79% на 57%, указујући на појаву хидролизе и/или повишен степен екстракције агликона код оба (2% и 10% с. м. ПГ) узорка.

11. Степен очуваности укупних антоцијанина након бланширања износио је 80%, код оба (2% и 10% с. м. ПГ) узорка, што је било више него код небланширане ПГ.

12. Садржај укупних фенолних једињења и FRAP вредност у узорцима са садржајем суве материје ПГ од 2% износили су ~ 70% од вредности забележене код референтног, лиофилизованог узорка ПГ, како у бланшираном, тако и у небланшираном узорку.

13. У узорку са садржајем суве материје ПГ од 10%, степен очуваности укупних фенолних једињења и FRAP вредности износили су такође ~ 70%, док су у небланшираном узорку са 10% ПГ ове вредности биле значајно ниже.

14. Са технолошке тачке гледишта, хомогенизација је неопходна ради побољшања дисперзије добијених додатака у матрицу прехранбених производа. Хомогенизација бланшираних узорака ПГ није променила степен очуваности фенолних једињења, осим што је примећен благи пораст степена очуваности мономерних флаванола у бланшираном узорку са 2% с. м. ПГ, као и антоцијанина и растворних проантоцијанидина у бланшираном узорку са 10% с. м. ПГ, што није утицало на FRAP вредности.

15. Микробиолошка стабилност додатака постигнута је третманом пастеризације, односно постизањем шестостепене децималне редукације циљаног микроорганизма *Alicyclobacillus Acidoterrestris*.

16. Након пастеризације, садржај фенолних једињења се генерално смањио како код узорка са 2% с. м. ПГ, тако и код узорка са 10% с. м. ПГ, изузев садржаја флавонола који је порастао, вероватно као резултат повишене растворљивости услед загревања. Садржај кверцетина повећао се у односу на садржај кверцетин глукозида, указујући на појачану екстракцију агликона, као што је уочено и током бланширања.

17. Релативна заступљеност антоцијанина није се мењала након третмана пастеризације, што указује да ова једињења имају сличну термичку стабилност.

18. За пастеризовани узорак са 2% с. м. ПГ FRAP вредност је износила 75% вредности добијене за референтни, лиофилизован узорак ПГ, што одговара вредности од  $4,1 \pm 0,1$  mmol Fe(II) eq / kg и што је у опсегу вредности добијених за воћне сокове.

19. Иако је за пастеризоване узорке са садржајем суве материје ПГ од 10% FRAP вредност износила само 59% од вредности код лиофилизованог узорка ПГ, она је такође била у опсегу вредности добијених за сокове од грожђа, код којих је износила 1,9 - 13,5 mmol Fe(II) eq / kg.

20. Хидроксиметилфурфурал и његови деривати који се генерално јављају у пастеризованим воћним производима, у узорцима ПГ у овом истраживању нису детектовани вероватно због ниског саржаја редукујућих шећера у ферментисаним ПГ.

21. Код прашкастих додатака, процес сушења узроковао је пад како у садржају укупних фенолних једињења, тако и у садржају растворљивих проантоцијанидина, антоцијанина и FRAP вредности, са степеном очуваности ових параметара од 85, 80, 70 и 85%, респективно.

22. Садржај мономерних флаванола код осушеног узорка ПГ се повећао толико да је био за чак 42% виши него код референтног лиофилизованог узорка, највероватније због хидролизе проантоцијанина. Са друге стране, степен очуваности укупних флавонола није се значајно разликовао од референтног узорка.

23. Код осушеног узорка је примећен мали пораст у релативном садржају кверцетина у односу на кверцетин глукозид, указујући на појаву хидролизе која међутим није била толико наглашена као она која се дешавала током пастеризације полутечног узорка.

24. Резултати одређивања дистрибуције величине честица добијених додатака ПГ показала је да су пречници честица оба узорка (2% и 10% с. м. ПГ) били нешто мањи од пречника примећеног код комерцијалног производа од коре јабука. Пречник узорка са садржајем суве материје ПГ од 10% износио је 174  $\mu\text{m}$ , нешто више од узорка са садржајем суве материје ПГ од 2%, 159  $\mu\text{m}$  указујући да узорак са 10% с. м. ПГ садржи већу количину крупнијих честица од узорка са 2% с. м. ПГ, али и већи распон дистрибуције величине честица.

25. Величине честица узорака ПГ осушених у струји ваздуха биле су веће него код полутечних производа са 2% и 10% с. м. ПГ, док је опсег био нижи указујући на ужу дистрибуцију величине честица.

26. Добијени полутечни додаци ПГ показали су стабилну суспензију у води, док су се ПГ додаци осушени у струји ваздуха брзо таложили. Према томе, полутечни ПГ додаци могу бити погоднији од осушених ПГ додатака за употребу у полутечним и желираним прехранбеним производима.

Предложена шема обраде ферментисане ПГ заснована на бланширању, пастеризацији и хомогенизацији ради добијања полутечних додатака за прехранбену индустрију, као и већ

предложени поступак за добијање прашкастог додатка сушењем у струји ваздуха и млевењем, резултирала је високим степеном очуваности антиоксидативног потенцијала полазног материјала, са нижим утрошком електричне енергије код полутечног у поређењу са прашкастим производом. Добијени полутечни производи могу да обезбеде повећање редукујућег капацитета (до 10 пута) широком спектру прехранбених производа, укључујући безалкохолна пића, хладне послатице, хлеб и друге пекарске производе.

Када су у питању трошкови енергије за производњу прашкастих додатака, важно је напоменути да је сушење једна од енергетски најзахтевнијих операција у прехранбеним технологијама. Са друге стране, код технологије добијања полутечних производа, процеси бланширања и пастеризације су такође енергетски захтевне операције али су примењене јако кратко у односу на процес сушења. Такође, ту су и трошкови транспорта који су свакако већи него код прашкастих додатака. Стога, употреба било прашкастих или полутечних ПГ додатака носи своје специфичне предности и недостатке и треба бити одабрана на основу специфичности технологије производње производа и логистике фабрике.

27. Метанолни екстракт ПГ сорте Cabernet Franc био је најбогатији полифенолним једињењима, док је код етанолних екстраката то био случај са узорком ПГ сорте Прокупац. Етанолни екстракт ПГ сорте Прокупац је уједно показао и највећи садржај укупних полифенолних једињења од свих узорака.

28. На основу резултата ЕПР мерења, може се закључити да су сви узорци показали већу активност према  $\cdot\text{OH}$  радикалима, него према DPPH радикалима. Сви етанолни екстракти показали су снажнију антирадикалску активност према DPPH радикалима у односу на метанолне екстракте. Код антирадикалске активности према  $\cdot\text{OH}$  радикалима овај тренд је супротан.

29. Екстракти ПГ сорте Прокупац готово су увек најефикасније уклањали обе врсте радикала, у поређењу са друге две сорте у оквиру овог истраживања.

Резултати одређивања садржаја укупних полифенолних једињења и ЕПР експеримената говоре у прилог томе да покожице грожђа, сорти које су у Србији веома заступљене у производњи црвеног вина, имају значајан потенцијал употребе у прехранбеној и фармацеутској индустрији, и да не представљају искључиво отпадни, споредни производ винске индустрије. На основу добијених резултата, међу овим сортама посебно се истиче српска аутохтона сорта Прокупац.

30. Методом по Luff-Schoorl-у одређен је садржај укупних шећера од  $51 \pm 2\%$  за ПГ сорте Прокупац, односно  $< 1\%$  за ПГ сорте Sangiovese. Ово је и било очекивано обзиром да су ПГ сорте Sangiovese претрпеле потпуну алкохолну ферментацију у винарији, док су ПГ сорте Прокупац издвојене неферментисане.

31. Добијене капсуле нису показале значајну разлику у погледу морфологије и расподеле величине капсула. Све капсуле су показале просечну величину од  $0,202 \mu\text{m}$ , полусферичан облик, грубу површину и порозну природу.

32. Измерене вредности вискозности, површинског напона и проводљивости полимерних раствора биле су испод максималних вредности предложених за успешан процес добијања капсула електрораспршивањем.

33. Доказано је да ферментисане ПГ представљају концентрованији извор укупних растворљивих полифенолних једињења од неферментисаних ПГ, али да је капацитет пуњења капсула зеина био знатно виши код инкапсулације екстракта неферментисаних ПГ.

34. Посматрано на суву материју садржај укупних растворљивих полифенола значајно се повећао након инкапсулације кроз матрицу зеина, те је код екстракта сорте Sangiovese био 3,7 пута већи, док је код екстракта сорте Прокупац био скоро 20 пута већи.

35. Антирадикалска активност екстракта према АВТS и DPPH радикалима показала је потпуно идентичан тренд као и код садржаја укупних растворљивих полифенола. Антирадикалска активност капсула, супротно садржају укупних растворљивих полифенола, није толико варијала и била је у опсегу до  $\pm 2$  пута у односу на активност екстракта.

36. Поређењем крива термичке разградње долазимо до закључка да су капсуле зеина побољшале термичку стабилност екстракта ПГ сорте Sangiovese у смислу да је тек при вишој температури дошло до интензивирања термичке разградње.

37. Капсуле зеина имале бољу интеракцију са екстрактом ПГ сорте Прокупац него са екстрактом ПГ сорте Sangiovese. До боље интеракције између капсула зеина и екстракта ПГ сорте Прокупац дошло је вероватно због већег садржаја шећера у екстракту ПГ сорте Прокупац. Хидроксилне групе из зеина стварају боље интеракције, преко водоничних веза, са угљеником из шећера.

Порозна структура капсула полимера зеина и његова отпорност према растворљивости због хидрофобне природе сврставају га у веома погодан материјал за развој микросфера за контролисано ослобађање биоактивних једињења. Узимајући у обзир да капсуле зеина обезбеђују оксидативну стабилност што је доказано у раду (Miguel *et al.*, 2019) као и термичку заштиту инкапсулисаним биоактивним једињењима али и да одлично везују полифенолна једињења из покожица грожђа, долазимо до закључка да инкапсулација оба типа екстракта кроз матрицу протеина кукуруза, зеина, има одличну перспективу индустријске примене. Неопходна су даља истраживања у смеру развоја технологија за инкорпорирање ових инкапсулисаних биоактивних једињења у матрицу одређених прехранбених производа.

Представљање иновативних технологија предложених у овој тези отворило би једну потпуно нову димензију у прехранбеној индустрији у Србији која би са собом донела еколошки пријатељско управљање отпадом и споредним производима из прехранбене индустрије уз истовремено подстицање развоја нових функционалних прехранбених производа и повећање профита. Смањено би се губитак произведене хране а самим тим максимизирала би се употреба свих ресурса потребних у њеној производњи, док би потрошачи имали већи избор нутритивно богатијих производа. Овај модел еколошког управљања отпадом из индустрије прераде биљних сировина који у исто време представља и модел одрживе производње хране би се уз одређене модификације и прилагођавања могао применити и на друге биљне материјале.

## ЛИТЕРАТУРА

Agne27 - Own work, CC BY-SA 3.0:

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=19214757>

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4170890>

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3534060>

Agromedia.rs:

<https://www.agromedia.rs/agro-teme/vinogradarstvo/prokupac-povratak-stare-slave-autohtonosti-sorti-srbije/>

Ahn, T., Paliyath, G. and Murr, D. P. 2007. Antioxidant enzyme activities in apple varieties and resistance to superficial scald development. *Food Research International*, 40(8), 1012-1019.

Alvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L. A., Rodrigo-García, J., Escobedo-González, R., Mercado-Mercado, G., Moyers-Montoya, E., Vázquez-Flores, A. and González-Aguilar, G. A. 2007. Dual effect of  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) on the inhibition of apple polyphenol oxidase by 4-hexylresorcinol (HR) and methyl jasmonate (MJ). *Food Chemistry*, 101(4), 1346-1356.

Andersen, O. M. and Jordheim, M. 2006. The Anthocyanins. In: Andersen, O. M. and Markham, K. R., Eds., *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications*, CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, 471-551.

Anu Bhushani, J. and Anandharamakrishnan, C. 2014. Electrospinning and electrospaying techniques: Potential food based applications. *Trends in Food Science and Technology*, 38(1), 21-33.

Apostolidis, E., Kwon, Y.-I. and Shetty, K. 2007. Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type-2 diabetes and hypertension. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 46–54.

Asquieri, E. R., de Moura e Silva, A. G., de Cássia Sousa Mendes, D. and Batista, R. D. 2019. Comparison of titulometric and spectrophotometric approaches towards the determination of total soluble and insoluble carbohydrates in foodstuff. *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, 11(3), 69-79.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis*. Washington, DC, USA, 1990.

Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodriguez, J. A., Siddiqui, M. W., Dávila-Aviña, J. E. and González-Aguilar, G. A. 2011. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44(7), 1866–1874.

Bao, Y., Reddivari, L. and Huang, J-Y. 2020. Enhancement of phenolic compounds extraction from grape pomace by high voltage atmospheric cold plasma. *LWT- Food Science and Technology*, 133, 109970.

Bharat Helkar, P., Sahoo, A. and Patil, N. J. 2016. Review: Food Industry By-Products used as a Functional Food Ingredients. *International Journal of Waste Resources*, 6(3).

Çağlarirmak, N. 2006. Ochratoxin A, hydroxymethylfurfural and vitamin C levels of sun-dried grapes and sultanas. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30(5), 549-562.

Caldas, T. W., Mazza, K. E. L., Teles, A. S. C., Mattos, G. N., Brígida, A. I. S., Conte-Junior, C. A., Borguini, R. G., Godoy, R. L. O., Cabral, L. M. C. and Tonon, R. V. 2018. Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 111, 86–91.

- Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bøhn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., Willey, C., Senoo, H., Umezono, Y., Sanada, C., Barikmo, I., Berhe, N., Willett, W. C., Phillips, K. M., Jacobs Jr, D. R. and Blomhoff, R. 2010. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal*, 9(1), 1-11.
- Carranza-Concha, J., del mar Camacho, M. and Martinez-Navarrete, N. 2012. Effects of blanching on grapes (*Vitis vinifera*) and changes during storage in syrup. *Journal of Food Processing Preservation*, 36(1), 11-20.
- Castro-Lopez, L., Castillo-Sanchez, G., Diaz-Rubio, L. and Cordova-Guerrero, I. 2019. Total content of phenols and antioxidant activity of grape skins and seeds cabernet sauvignon cultivated in Valle de Guadalupe, Baja California, Mexico. 42<sup>nd</sup> World Congress of Vine and Wine, BIO Web of Conferences 15, 04001 (2019).
- Cheynier, V. and Ricardo Silva, J. M. 1991. Oxidation of grape procyanidins model solutions containing trans-caffeoyl tartaric acid and polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(6), 1047-1049.
- Clifford, M. N. 2000. Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1063-1072.
- Cruz, L., Clemente, G., Mulet, A., Ahmad-Qasem, M. H., Barrajon-Catalan, E. and Garcia-Perez, J. V. 2016. Air-borne ultrasonic application in the drying of grape skin: Kinetic and quality considerations. *Journal of Food Engineering*, 168, 251-258.
- Duba, K. S., Casazza, A. A., Mohamed, H. B., Perego, P. and Fiori, L. 2015. Extraction of polyphenols from grape skins and defatted grape seeds using subcritical water: Experiments and modeling. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 29-38.
- Eurostat: <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/edn-20201119-2>
- FAO 1: <http://www.fao.org/faostat/en/#search/wine>
- FAO 2: <http://www.fao.org/sustainable-development-goals/goals/goal-1/en/>
- Faridi Esfanjani, A. and Jafari, S. M. 2016. Biopolymer nano-particles and natural nano-carriers for nano-encapsulation of phenolic compounds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 532–543.
- Fathi, M., Martín, Á. and McClements, D. J. 2014. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 39(1), 18-39.
- FDA: U.S. Food and Drug Administration:  
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=73.170>
- Francesco Sgroi: Francesco Sgroi - Francesco Sgroi (Original text: originally posted to Flickr as La vigna di sangiovese), CC BY 2.0: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5591318>
- Furumo, N. C. and Furutani, S. 2008. A Simple Method for Assaying Total Protein, Polyphenol Oxidase and Peroxidase Activity from ‘Kaimana’ Litchi chinensis Sonn. *Journal of Hawaiian and Pacific Agriculture*.
- Gaita, C., Alexa, E., Moigradean, D., Conforti, F. and Poiana, M-A. 2020. Designing of high value-added pasta formulas by incorporation of grape pomace skins. *Romanian Biotechnological Letters*, 25(3), 1607-1614.
- Galanakis, C. M. 2015. *Food waste recovery: Processing technologies and industrial techniques*. Academic Press, Elsevier. ISBN 9780128003510.

Galanakis, C. M. 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology* 26(2), 68-87.

García-Lomillo, J. and González-SanJosé, M. L. 2017. Applications of wine pomace in the food industry: Approaches and functions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 3-22.

García-Lomillo, J., González-SanJosé, M. L., Skibsted, L. H. and Jongberg, S. 2016. Effect of skin wine pomace and sulfite on protein oxidation in beef patties during high oxygen atmosphere storage. *Food and Bioprocess Technology*, 9(3), 532-542.

García-Lomillo, J., González-SanJosé, M. L., Del Pino-García, R., Rivero-Pérez, M.D. and Muñoz-Rodríguez, P. 2014. Antioxidant and antimicrobial properties of wine byproducts and their potential uses in the food industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(52), 12595-12602.

Ghorbani, M., Mahmoodzadeh, F., Yavari Maroufi, L. and Nezhad-Mokhtari, P. 2020. Electrospun tetracycline hydrochloride loaded zein/gum tragacanth/poly lactic acid nanofibers for biomedical application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 1312–1322.

Giannouli, M., Karagkiozaki, V., F.Pappa, Moutsios, I., C.Gravalidis and Logothetidis, S. 2018. Fabrication of quercetin-loaded PLGA nanoparticles via electrohydrodynamic atomization for cardiovascular disease. *Materials Today: Proceedings*, 5(8), 15998–16005.

Gómez-Alonso, S., García-Romero, E. and Hermosín-Gutiérrez, I. 2007. HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(7), 618–626.

Gómez-Estaca, J., Gavara, R. and Hernández-Muñoz, P. 2015. Encapsulation of curcumin in electrosprayed gelatin microspheres enhances its bioaccessibility and widens its uses in food applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 29, 302–307.

Gonzales-Barrio, R., Salmenkallio-Marttila, M., Tomas-Barberan, F. A., Cantos, E. and Espin, J. C. 2005. Etiology of UV-C-Induced Browning in Var. Superior White Table Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 5990-5996.

González-Cruz, E. M., Calderón-Santoyo, M., Barros-Castillo, J. C. and Ragazzo-Sánchez, J. A. 2020. Evaluation of biopolymers in the encapsulation by electrospraying of polyphenolic compounds extracted from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) variety Biloxi. *Polymer Bulletin*.

Guerrieri, N., Eynard, L., Lavelli V. and Cerletti, P. 1997. Interactions of protein and starch studied through amyloglucosidase action. *Cereal Chemistry Journal*, 74(6), 846-850.

Gürkan, R. and Altunay, N. 2015. Quantification of 5-hydroxymethylfurfural in honey samples and acidic beverages using spectrophotometry coupled with ultrasonic-assisted cloud point extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, 42, 141-151.

Han, J., Britten, M., St-Gelais, D., Champagne, C. P., Fustier, P., Salmieri, S. and Lacroix, M. 2011. Effect of polyphenolic ingredients on physical characteristics of cheese. *Food Research International*, 44(1), 494-497.

Hornedo-Ortega, R., González-Centeno, M. R., Chira, K., Jourdes, M. and Teissedre, P-L. 2020. Phenolic Compounds of Grapes and Wines: Key Compounds and Implications in Sensory Perception. *Chemistry and Biochemistry of Winemaking, Wine Stabilization and Aging*.

International Organisation of Vine and Wine, 2019. 2019 Statistical Report on World Vitiviniculture.

- Iriondo-DeHond, M., Miguel, E. and del Castillo, M. 2018. Food Byproducts as Sustainable Ingredients for Innovative and Healthy Dairy Foods. *Nutrients*, 10(10), 1358.
- Iriti, M. and Faoro, F. 2009. Health-promoting effects of grape bioactive phytochemicals. *Complementary and Alternative Therapies and the Aging Population*, 445-474.
- ISO 13320:2009. Particle size analysis-laser diffraction methods. Geneva, CH: International Standard Organization, 2009.
- Iuga, M. and Mironeasa, S. 2020. Potential of grape byproducts as functional ingredients in baked goods and pasta. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(5), 2473–2505.
- Jakšić, D., Ivanišević, D., Đokić, V. and Brbaklić Tepavac, M. 2015. *Vinski atlas*. Beograd: Republički zavod za statistiku Republike Srbije.
- Jaworek, A. 2007. Electrospray droplet sources for thin film deposition. *Journal of Materials Science*, 42(1), 266-297.
- Jayan, H., Maria Leena, M., Sivakama Sundari, S. K., Moses, J. A. and Anandharamakrishnan, C. 2019. Improvement of bioavailability for resveratrol through encapsulation in zein using electrospraying technique. *Journal of Functional Foods*, 57, 417-424.
- Jozinović, A., Šubarić, D., Ačkar, Đ., Miličević, B., Babić, J., Jašić, M. and Valek Lendić, K. 2014. Food industry by-products as raw materials in functional food production. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*, 3(1), 22-30.
- Jukanti, A. 2017. Polyphenol Oxidase(s): Importance in Food Industry. *Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants*, 93–106.
- Kabongo, J. D. 2013. Waste Valorization. *Encyclopedia of Corporate Social Responsibility*, 2701–2706.
- Kader, F., Irmouli, M., Nicolas, J. P. and Metche, M. 2001. Proposed mechanism for the degradation of pelargonidin 3-glucoside by caffeic acid *o*-quinone. *Food Chemistry*, 75(2), 139-144.
- Khan, K., Schutyser, M., Schroën, K. and Boom, R. 2012. The potential of electrospraying for hydrophobic film coating on foods. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 410-416.
- Kumar Anal, A. 2018. *Food processing by-products and their utilization*. John Wiley & Sons Ltd.
- Kwiatkowski, M., Kravchuk, O., Skouroumounis, G. K. and Taylor, D. K. 2020. Microwave-assisted and conventional phenolic and colour extraction from grape skins of commercial white and red cultivars at veraison and harvest. *Journal of Cleaner Production*, 275, 122671.
- Lavelli, V., Sri Harsha, P. S. C., Laureati, M. and Pagliarini, E. 2017. Degradation kinetics of encapsulated grape skin phenolics and micronized grape skins in various water activity environments and criteria to develop wide-ranging and tailor-made food applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 39, 156–164.
- Lavelli, V., Sri Harsha, P. S. C. and Spigno, G. 2016a. Modelling the stability of maltodextrin-encapsulated grape skin phenolics used as a new ingredient in apple puree. *Food Chemistry*, 209, 323-331.
- Lavelli, V., Sri Harsha, P. S. C., Ferranti, P., Scarafoni, A., and Iametti, S. 2016b. Grape skin phenolics as inhibitors of mammalian  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase - effect of food matrix and processing on efficacy. *Food & Function*, 7(3), 1655-1663.
- Lavelli, V., Sri Harsha, P. S. C., Torri, L. and Zeppa, G. 2014. Use of winemaking by-products as an ingredient for tomato puree: The effect of particle size on product quality. *Food Chemistry*, 152, 162-168.

- Lavelli, V., Pompei, C. and Casadei, M. A. 2009a. Quality of nectarine and peach nectars as affected by lye-peeling and storage. *Food Chemistry*, 115(4), 1291-1298.
- Lavelli, V. and Vantaggi, C. 2009b. Rate of antioxidant degradation and color variations in dehydrated apples as related to water activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4733-4738.
- Liang, Z., Wu, B., Fan, P., Yang, C., Duan, W., Zheng, X., Liu, C. and Li, S. 2008. Anthocyanin composition and content in grape berry skin in *Vitis* germplasm. *Food Chemistry* 111(4): 837-844.
- Librán, C. M., Castro, S. and Lagarón, J. M. 2017. Encapsulation by electrospray coating atomization of probiotic strains. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 39, 216–222.
- Liu, R. H. 2007. Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 207-219.
- Liu, Y.-C., Chen C.-J., Lee, M.-R., Li, M., Hsieh, W.-T., Chung, J.-G. and Ho, H.-C. 2013. Peroxidase as the major protein constituent in areca nut and identification of its natural substrates. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-12.
- Maier, T., Fromm, M., Schieber, A., Kammerer, D. R. and Carle, R. 2009. Process and storage stability of anthocyanins and non-anthocyanin phenolics in pectin and gelatin gels enriched with grape pomace extracts. *European Food Research and Technology*, 229(6), 949-960.
- Makris, D. P. and Rossiter, J. T. 2002. Hydroxyl Free Radical-Mediated Oxidative Degradation of Quercetin and Morin: A Preliminary Investigation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(1), 103-113.
- Marchiani, R., Bertolino, M., Belviso, S., Giordano, M., Ghirardello, D., Torri, L., Piochi, M. and Zeppa, G. 2016. Yogurt enrichment with grape pomace: Effect of grape cultivar on physicochemical, microbiological and sensory properties. *Journal of Food Quality*, 39(2), 77-89.
- Marchiani, R., Bertolino, M., Ghirardello, D., McSweeney, P. L. H. and Zeppa, G. 2015. Physicochemical and nutritional qualities of grape pomace powder-fortified semi-hard cheese. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 1585-1596.
- Mateos-Aparicio, I. and Matias, A. 2019. The Role of Alternative and Innovative Food Ingredients and Products in Consumer Wellness. Academic Press, Chapter 9, 239-281.
- Miguel, G. A., Jacobsen, C., Prieto, C., Kempen, P. J., Lagaron, J. M., Chronakis, I. S. and García-Moreno, P. J. 2019. Oxidative stability and physical properties of mayonnaise fortified with zein electrosprayed capsules loaded with fish oil. *Journal of Food Engineering*, 263, 348–358.
- Mildner-Szkudlarz, S., Zawirska-Wojtasiak, R., Szwengiel, A. and Pacyński M. 2011. Use of grape by-product as a source of dietary fibre and phenolic compounds in sourdough mixed rye bread. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(7), 1485-1493.
- Milić, B., Đilas, S., Čanadanović-Brunet, J. and Sakač M. 2000. Biljni polifenoli. Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Mironeasa, S. and Mironeasa, C. 2019. Dough bread from refined wheat flour partially replaced by grape peels: Optimizing the rheological properties. *Journal of Food Process Engineering*, 42(6), 1–14.
- Montini, F., Cortez, P. R. and Gustavo, A. 2015. Nanofibras electrohiladas para usos terapéuticos. In *Biomateriales aplicados al diseño de sistemas terapéuticos avanzados*, page 387. ISBN 978-989-26-0880-8.

Moreno-Montoro, M., Olalla-Herrera, M., Gimenez-Martinez, R., Navarro-Alarcon, M. and Rufian-Henares, J. A. 2015. Phenolic compounds and antioxidant activity of Spanish commercial grape juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 38,19-26.

Movahed, N., Pastore, C., Cellini, A., Allegro, G., Valentini, G., Zenoni, S., Cavallini, E., D'Inca, E., Battista Tornielli, G. and Filippetti, I. 2016. The grapevine VviPrx31 peroxidase as a candidate gene involved in anthocyanin degradation in ripening berries under high temperature. *Journal of Plant Research*, 129(3), 513-526.

Murashov, V. and Howard, J. 2011. *Nanotechnology Standards. Nanostructure Science and Technology*. ISBN 978-1-4419-7852-3.

Nakarada, Đ., Marković, S., Popović, M., Dimitrijević, M., Rakić, A. and Mojović, M. 2021. Redox Properties of Grape Wine Skin Extracts from The Šumadija Region - An Electron Paramagnetic Resonance Study. *Hospital Pharmacology*, 8(1), 1004-1013.

Nakarada, Đ., Pejin, B., Tommonaro, G. and Mojović, M. 2020. Liposomal integration method for assessing antioxidative activity of water insoluble compounds toward biologically relevant free radicals: example of avarol. *Journal of Liposome Research*, 30(3), 218-226.

Negro, C., Tommasi, L. and Miceli, A. 2003. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extract. *Bioresource Technology*, 87(1), 41-44.

Nogales-Bueno, J., Baca-Bocanegra, B., Rooney, A., Miguel Hernández-Hierro, J., José Heredia, F. and Byrne, H. J. 2017. Linking ATR-FTIR and Raman features to phenolic extractability and other attributes in grape skin. *Talanta*, 167, 44–50.

Oprea, O. B., Apostol, L., Bungau, S., Cioca, G., Samuel, A. D., Badea, M. and Gaceu, L. 2018. Researches on the chemical composition and the rheological properties of wheat and grape epicarp flour mixes. *Revista de Chimie*, 69(1), 70–75.

Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M. and Mimica-Dukić, N. 2014. Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chemistry*, 143, 48-53.

Paini, M., Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Perego, P., Binello, A. and Cravotto G. 2016. Influence of ethanol/water ratio in ultrasound and high-pressure/high-temperature phenolic compound extraction from agri-food waste. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(2), 349-358.

Pérez-Masiá, R., Lagaron, J. M. and Lopez-Rubio, A. 2014. Morphology and stability of edible lycopene-containing micro- and nanocapsules produced through electrospraying and spray drying. *Food and Bioprocess Technology*, 8(2), 459-470.

Pinasseau, L., Vallverdú-Queralt, A., Verbaere, A., Roques, M., Meudec, E., Le Cunff, L., Péros, J-P., Ageorges, A., Sommerer, N., Boulet, J-C., Terrier, N and Cheynier, V. 2017. Cultivar Diversity of Grape Skin Polyphenol Composition and Changes in Response to Drought Investigated by LC-MS Based Metabolomics. *Frontiers in Plant Science*, 8.

Planinić, M., Aliakbarian, B., Perego, P., Greganić, K., Tomas, S. and Bucić-Kojić, A. 2015. Influence of Temperature and Drying Time on Extraction Yield of Phenolic Compounds from Grape Pomace Variety "Portogizac". *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29(3), 343-350.

Raghavan, P., Lim, D.-H., Ahn, J.-H., Nah, C., Sherrington, D. C., Ryu, H.-S. and Ahn, H.-J. (2012). Electrospun polymer nanofibers: the booming cutting-edge technology. *Reactive and Functional Polymers*, 72(12), 915-930.

Ramos-Bell, S., Calderón-Santoyo, M., Barros-Castillo, J. C. and Ragazzo-Sánchez, J. A. 2020. Characterization of submicron emulsion processed by ultrasound homogenization to protect a bioactive extract from sea grape (*Coccoloba uvifera* L.). Food Science and Biotechnology.

Ramos-Hernández, J., Ragazzo-Sánchez, J., Calderón-Santoyo, M., Ortiz-Basurto, R., Prieto, C. and Lagaron, J. 2018. Use of Electrospayed Agave Fructans as Nanoencapsulating Hydrocolloids for Bioactives. Nanomaterials, 8(11), 868.

Raza, A., Hayat, U., Bilal, M., Iqbal, H. M. N. and Wang, J. Y. 2020. Zein-based micro- and nano-constructs and biologically therapeutic cues with multi-functionalities for oral drug delivery systems. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 58.

Republički zavod za statistiku Republike Srbije:

<https://www.stat.gov.rs/oblasti/industrija/proizvodnja-industrijskih-proizvoda-1/>

Reyes, L. F. and Cisneros-Zevallos, L. 2007. Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple- and red-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). Food Chemistry, 100(3), 885-894.

Rezaei, M. and Liu, B. 2017. Food Loss and Waste in the Food Supply Chain. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), <http://www.fao.org/3/bt300e/bt300e.pdf>.

Ribeiro, B., Cardoso, C., Silva, H. A., Serrano, C., Ramos, C., Santos, P. C. and Mendes R. 2012. Effect of grape dietary fibre on the storage stability of innovative functional seafood products made from farmed meagre (*Argyrosomus regius*). International Journal of Food Science & Technology, 48(1), 10-21.

Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Gonzaga, L. V., Caliari, V., Genovese, M. I., Gonçalves, A. E. de S. S. and Fett, R. 2011. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. Food Chemistry, 127(1), 174–179.

Romero-Díez, R., Matos, M., Rodrigues, L., Bronze, M. R., Rodríguez Rojo, S., Cocero, M. J. and Matias, A. A. 2019. Microwave and ultrasound pre-treatments to enhance anthocyanins extraction from different wine lees. Food Chemistry, 272, 258-266.

Rondeau, P., Gambier, F., Jolibert, F. and Brosse, N. 2013. Compositions and chemical variability of grape pomaces from French vineyard. Industrial Crops and Products, 43, 251-254.

Rosell, C. M., Santos, E. and Collar, C. 2009. Physico-chemical properties of commercial fibres from different sources: A comparative approach. Food Research International, 42(1), 176-184.

Rostamabadi, H., Falsafi, S. R., Rostamabadi, M. M., Assadpour, E. and Jafari, S. M. (2021). Electrospaying as a novel process for the synthesis of particles/nanoparticles loaded with poorly water-soluble bioactive molecules. Advances in Colloid and Interface Science, 290, 102384.

Routray, W. and Orsat, V. 2017. Food Bioconversion (Handbook of Food Bioengineering). Academic Press, Chapter 8, 279-315.

Sanchez-Alonso, I., Jimenez-Escrig, A., Saura-Calixto, F. and Borderias A. J. 2008. Antioxidant protection of white grape pomace on restructured fish products during frozen storage. LWT - Food Science and Technology, 41(1), 42-50.

Sanjuán, N., Stoessel, F. and Hellweg, S. 2014. Closing Data Gaps for LCA of Food Products: Estimating the Energy Demand of Food Processing. Environmental Science & Technology, 48(2), 1132-1140.

- Sáyago-Ayerdi, S. G., Brenes, A. and Goñi, I. 2009. Effect of grape antioxidant dietary fiber on the lipid oxidation of raw and cooked chicken hamburgers. *LWT - Food Science and Technology*, 42(5), 971-976.
- Schieber, A., Stintzing, F. C. and Carle, R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12(11), 401-413.
- Servili, M., De Stefano, G., Piacquadio, P. and Sciancalepore, V. 2000. A novel method for removing phenols from grape must. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 357-361.
- Soleimanifar, M., Jafari, S. M. and Assadpour, E. 2020. Encapsulation of olive leaf phenolics within electrosprayed whey protein nanoparticles; production and characterization. *Food Hydrocolloids*, 101, 105572.
- Spinei, M. and Oroian, M. 2021. The Potential of Grape Pomace Varieties as a Dietary Source of Pectic Substances. *Foods* 2021, 10, 867.
- Sri Harsha, P. S. C., Gardana, C., Simonetti, P., Spigno, G. and Lavelli, V. 2013. Characterization of phenolics, *in vitro* reducing capacity and anti-glycation activity of red grape skins recovered from winemaking by-products. *Bioresource Technology*, 140, 263-268.
- Stanković, M. 2011. Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac Journal of Science*, 33, 63-72.
- Stockley, C., Teissedre, P. L., Boban, M., Di Lorenzo, C. and Restani P. 2012. Bioavailability of wine-derived phenolic compounds in humans: a review. *Food & Function*, 3(10), 995-1007.
- Stojanovic, M., Marinoni, L., Cabassi, G., Antic, M. and Lavelli, V. 2018. Development of Semiliquid Ingredients from Grape Skins and Their Potential Impact on the Reducing Capacity of Model Functional Foods. *Journal of Food Quality*, 2018, 1-9.
- Taranto, F., Pasqualone, A., Mangini, G., Tripodi, P., Miazzi, M., Pavan, S. and Montemurro, C. 2017. Polyphenol Oxidases in Crops: Biochemical, Physiological and Genetic Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 377.
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. and Garcia-Viguera, C. 2014. Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), 15638-15678.
- Teixeira Barcia, M., Becker Pertuzatti, P., Rodrigues, D., Caetano Bochi, V., Hermosín-Gutiérrez, I. and Teixeira Godoy, H. 2015. Effect of drying methods on the phenolic content and antioxidant capacity of Brazilian winemaking byproducts and their stability over storage. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(8), 895-903.
- Torres, C., Diaz-Maroto, M. C., Hermosin-Gutierrez, I. and Perez-Coello, M. S. 2010. Effect of freeze-drying and oven-drying on volatiles and phenolics composition of grape skin. *Analytica Chimica Acta*, 660(1-2), 177-182.
- Torres-León, C., Ramírez-Guzman, N., Londoño-Hernandez, L., Martinez-Medina, G. A., Díaz-Herrera, R., Navarro-Macias, V., Alvarez Pérez, O. B., Picazo, B., Villarreal-Vázquez, M., Ascacio-Valdés, J. A., Aguilar, C. N. 2018. Food Waste and Byproducts: An Opportunity to Minimize Malnutrition and Hunger in Developing Countries. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2, 1-17.
- Tseng, A. and Zhao, Y. 2013. Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chemistry*, 138(1), 356-365.

Tseng, A. and Zhao, Y. 2012. Effect of different drying methods and storage time on the retention of bioactive compounds and antibacterial activity of wine grape pomace (Pinot Noir and Merlot). *Journal of Food Science*, 77(9), H192–H201.

USDA: US Department of Agriculture, Agricultural Research Service. July 2010. Functional Foods Research in ARS:

<https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/00000000/NPS/FinalFunctionalFoodsPDFReadVersion6-25-10.pdf>

Vázquez-González, Y., Prieto, C., Filizoglu, M. F., Ragazzo-Sanchez, J. A., Calderón-Santoyo, M., Furtado, R. F., Cheng, H. N., Biswas, A. and Lagaron, J. M. 2021. Electrospayed cashew gum microparticles for the encapsulation of highly sensitive bioactive materials. *Carbohydrate Polymers*, 264, 118060.

Vázquez-González, Y., Ragazzo-Sánchez, J. A. and Calderón-Santoyo, M. 2020. Characterization and antifungal activity of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) leaf extract obtained using conventional and emerging technologies. *Food Chemistry*, 330, 127211.

Watson, R. R. 2008. *Complementary and Alternative Therapies and the Aging Population: An Evidence-Based Approach*. Academic Press, Elsevier. ISBN 9780123742285.

Xia, E.-Q., Deng, G.-F., Guo, Y.-J. and Li, H.-B. 2010. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 622–646.

Zhang, X. and Shao, X. 2016. Characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase and the role in browning of loquat fruit. *Czech Journal of Food Sciences*, 33(2), 109–117.

Zhu, F., Du, B., Zheng, L. and Li, J. 2015. Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. *Food Chemistry*, 186, 207–212.

Zhu, L., Zhang, Y. and Lu, J. 2012. Phenolic Contents and Compositions in Skins of Red Wine Grape Cultivars among Various Genetic Backgrounds and Originations. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3492–3510.

## БИОГРАФИЈА АУТОРА

Милан Стојановић је рођен 07.12.1987. године у Панчеву, Република Србија. Средњу Хемијско-прехранбenu школу биотехнолошког усмерења завршио је у родном граду. Основне академске студије на Одсеку за прехранбenu технологију биљних производа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду завршио је школске 2011/12. године са просечном оценом 8,72. Докторске студије на истом одсеку уписао је школске 2012/13. године.

Током докторских студија Милан Стојановић је био корисник пет европских стипендија и провео преко две године на усавршавању у иностранству. Истраживачки рад у оквиру Ерасмус стипендије програма стипендирања Европске Комисије у трајању од 10 месеци, обавио је на Универзитету у Милану (University of Milan). Преко стипендије јавне агенције „Шведски институт” Краљевине Шведске провео је 6 месеци на Универзитету у Гетебургу (University of Gothenburg). Преко стипендија Европског института за иновације и технологију провео је 2 месеца у Центру за истраживања из области прехранбене технологије „CFER Labs” у Португалији и 6 месеци на Институту за агрохемију и прехранбenu технологију Шпанског већа за научна истраживања „IATA-CSIC” у Валенсији. Преко Horizon2020 „EthnoHERBS” пројекта провео је месец и по дана у Португалији у компанији „ТесМинхо” која се бави патентирањем научних проналазака и део је Универзитета Мињо (University of Minho).

Године 2016. добија звање истраживач-приправник. Током докторских студија био је четири пута ангажован од стране Пољопривредне стручне службе „Институт Тамиш” Панчево у саветодавном раду и три пута ангажован од стране удружења SECRA на имплементацији препорука ЕУ које се тичу унапређења пољопривредне производње.

Члан је Удружења инжењера прехранбене струке Србије, Мреже алумниста Западног Балкана, Глобалне мреже будућих лидера Шведског Института, Асоцијације италијанских и српских научника и истраживача као и Школског одбора Основне школе „Мирослав Мика Антић” из Панчева. Служи се течно енглеским и италијанским језиком.

## ПРИЛОЗИ

### Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Милан Стојановић

Број индекса ТХ12/34

#### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Обрада ферментисане покожице грожђа као споредног производа у производњи вина у циљу добијања потенцијалних функционалних додатака за прехранбену индустрију

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

**Потпис аутора**

У Београду, 03.09.2021

---

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милан Стојановић

Број индекса ТХ12/34

Студијски програм Прехрамбена технологија

Наслов рада Обрада ферментисане покожице грожђа као споредног производа у производњи вина у циљу добијања потенцијалних функционалних додатака за прехранбену индустрију

Ментор Проф. Др Малиша Антић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањења у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 03.09.2021

---

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Обрада ферментисане покожице грожђа као споредног производа у производњи вина у циљу добијања потенцијалних функционалних додатака за прехранбену индустрију

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, 03.09.2021