



Sušenje i ekstrakcija lista sremuša (*Allium ursinum* L.) u cilju dobijanja funkcionalnih proizvoda sa bioaktivnim potencijalom

Doktorska disertacija

Alena Tomšik, master inženjer

Mentor: Dr Senka Vidović, vanredni profesor

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska publikacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Autor rada: AR	Alena Tomšik
Mentor: MN	Dr Senka Vidović, van. prof
Naslov rada: NR	Sušenje i ekstrakcija lista sremuša (<i>Allium ursinum</i> L.) u cilju dobijanja funkcionalnih proizvoda sa bioaktivnim potencijalom
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski/engleski
Zemlja publikovanja: ZP	R. Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2018.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Fizički opis rada: FO	6 poglavlja, 184 strana, 50 slika, 27 tabela, 291 literaturnih navoda
Naučna oblast: NO	Tehničko-tehnološke nauke
Naučna disciplina: ND	Farmaceutsko inženjerstvo
Predmetna odrednica/ključna reč: PO	Sremuš, <i>Allium ursinum</i> , sušenje, savremene metode ekstrakcije, bioaktivna jedinjenja, enkapsulacija

UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
Izvod/apstrakt: IA	<p>Cilj ove doktorske disertacije je bio odrediti niz tehnoloških postupaka koji bi omogućili iskorišćenje sremuša u prehrambene i farmaceutske svrhe u svežem ili suvom stanju, kao biljne droge za pripremu različitih formi ekstrakata bogatih bioaktivnim jedinjenjima izolovanih iz njega.</p> <p>List sremuša bere se u vrlo kratkom vremenskom periodu tokom proleća, a nakon branja njegovi listovi vrlo brzo venu i gube svoja senzorna, nutritivna i funkcionalna svojstva, zbog čega je dostupnost ove biljne sirovine vremenski vrlo ograničena. Zbog toga su ispitani uslovi skladištenja svežeg lista sremuša kako bi se sagledala trajnost sremuša za konzumiranje u svežem stanju, ali i mogućnost primene skladištenog sremuša za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja. Za dobijanje osušenog lista sremuša ispitan je uticaj različitih tehnika sušenja (konvektivno i vakuumsko sušenje) i temperature sušenja (40, 50, 60 i 70 °C) na sadržaj bioaktivnih komponenti u osušenom proizvodu. Primenom odgovarajuće tehnike sušenja, povećava se stabilnost i dostupnost listova sremuša za potrebe prehrambene i farmaceutske industrije. Primenom savremenih ekstrakcionih tehnika kao što je ekstrakcije superkritičnim ugljen-dioksidom, ekstrakcije subkritičnom vodom i ultrazvučne ekstrakcije, ispitan je uticaj procesnih parametara različitih ekstrakcionih tehnika, poput ultrazvučne ekstrakcije (temperatura, vreme ekstrakcije, snaga ultrazvuka, uticaj rastvarača) i ekstrakcije subkritičnom vodom (temperatura, vreme ekstrakcije, dodatak modifikatora), superkritične ekstrakcije ugljen-dioksidom (pritisak i temperatura), dok je maceracija kao konvencionalna tehnika ekstrakcije primenjena za poređenje efikasnosti modernih ekstrakcionih postupaka. U dobijenim ekstraktima ispitan je sadržaj polifenolnih komponenti, antioksidantna aktivnost i sadržaj sumpornih jedinjenja u cilju optimizacije ekstrakcionih parametara i radi utvrđivanja uslova ekstrakcije pri kojima se postiže najveći kvalitet ekstrakata u pogledu sadržaja ciljanih bioaktivnih komponenti. Za odabrane</p>

	<p>ekstrakte ispitan je antimikrobni potencijal na različite Gram pozitivne i Gram negativne bakterijske sojeve. Za dobijanje stabilnijih formi odabranih ekstrakata primenjena je enkapsulacija <i>spray drying</i> i <i>spray congeling</i> tehnikom. Enkapsuliranim ekstraktima su određene fizičko-hemijske osobine (hemijski sastav, sadržaj vlage, higroskopnost, moć rehidracije, WAI i WSI) i biološka aktivnost (antimikrobna i antioksidativna aktivnost).</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata: DO</p>	
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije: KO</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dr Senka Vidović, vanredni profesor 2. Dr Jasna Mistilović, vanredni profesor, naučni savetnik 3. Dr Branislava Nikolovski, vanredni profesor 4. Dr Branimir Pavlić, docent

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number: AO	
Indentification number: INO	
Document type: DT	Monographic publication
Type of record: TR	Printed textual material
Author: AU	Alena Tomšik
Mentor: MN	Senka Vidović, PhD, associate professor
Title: TI	Drying and extraction of the wild garlic leaves (<i>Allium ursinum</i> L.) in order to obtain functional products with bioactive potential
Language of text: LT	Serbian (Latin script)
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year:	2017
Publication place: PL	Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Physical description: PD	6 chapters, 184 pages, 55 figures, 27 tables, 291 references
Scientific field: SF	Tehcnical-tehnological sciences
Scientific discipline: SD	Pharmaceutical engineering
Subject/key words: SX	Wild garlic, <i>Allium ursinum</i> , drying, modern methods of extraction, bioactive compounds, encapsulation
UC	
Holding data: HD	Library of the Faculty of Technology Novi Sad

<p>Note: N</p>	<p>None</p>
<p>Abstract: AB</p>	<p>The aim of this doctoral dissertation was to determine various technological procedures that would enable the use of fresh and dried wild garlic leaves in foods and pharmaceutical industry, as a herbal drug or nutraceuticals.</p> <p>The availability period of fresh wild garlic is very short and only during the spring season. After harvest, the leaves are quite perishable, wither very quickly and lose their sensory, nutritive and functional properties. This makes the availability time of this herbal raw material very limited. Therefore, the conditions for storing the fresh leaves of wild garlic and the influences of storing conditions on composition of bioactive compounds were examined in order to extend their use in fresh state. In order to obtain dry herbal drug for extraction, influence of various drying techniques (convection and vacuum drying) and drying temperatures (40, 50, 60, 70 °C) were examined. The stability and availability of wild garlic in food and pharmaceutical industries was extended by drying. The influence of process parameters of different modern extraction techniques - ultrasonic extraction (temperature, extraction time, ultrasonic power, solvent effect) and subcritical water extraction , extraction time, modifier addition), supercritical carbon dioxide extraction (pressure and temperature) - was examined, while maceration (as a conventional extraction technique) was used to evaluate the efficiency of modern extraction methods. The obtained extracts were analysed in terms of the polyphenolic content, the antioxidant activity and the content of sulfur compounds in order to optimize the extraction parameters and determine the extraction conditions for achieving the highest quality of extracts in terms of the content of the target bioactive components. Antimicrobial potential for different Gram positive and Gram negative bacterial strains was tested for selected</p>

	<p>extracts. To obtain more stable forms of selected extracts encapsulation techniques - spray drying and spray congeling - were applied. Encapsulated extracts were evaluated in terms of physico-chemical properties (chemical composition, moisture content, hygrosopicity, rehydration power, WAI and WSI) and biological activity (antimicrobial and antioxidant activity).</p>
<p>Accepted on Senat on: AS</p>	
<p>Defended on: DE</p>	
<p>Thesis defends board: DB</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Senka Vidović, PhD, associate professor 2. Jasna Mistilović, PhD, associate professor, principal research fellow 3. Branislava Nikolovski, PhD, associate professor 4. PhD Branimir Pavlić, assistant professor

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Opšti deo.....	3
2.1. <i>Allium ursinum</i> L.....	3
2.2. Hemijski sastav sremuša	4
2.2.1. Sumporna jedinjenja sremuša	4
2.2.2. Fenolna jedinjenja sremuša.....	8
2.2.3. Ostala jedinjenja sremuša	9
2.3. Farmakološko delovanje sremuša	10
2.4. Tehnologije prerade lista sremuša.....	13
2.4.1. Skladištenje svežih proizvoda.....	13
2.4.2. Sušenje biljnog materijala.....	15
2.4.3. Ekstrakcija lekovitog bilja	19
2.4.4. Enkapsulacija	30
3. Materijal i metode.....	37
3.1. Specifične hemikalije i reagensi.....	37
3.2. Biljni materijal.....	38
3.3. Skladištenje svežeg lista sremuša.....	39
3.4. Sušenje lista sremuša.....	41
3.4.1. Konvektivno sušenje lista sremuša	41
3.4.2. Vakuumsko sušenje lista sremuša.....	42
3.4.3. Liofilizacija lista sremuša	43
3.5. Ekstrakcija lista sremuša	44
3.5.1. Konvencionalna čvrsto-tečna ekstrakcija lista sremuša.....	44
3.5.2. Ultrazvučna ekstrakcija lista sremuša, dizajn i statistička analiza eksperimenta ...	44
3.5.3. Ekstrakcije vodom u subkritičnom stanju.....	47
3.5.4. Ekstrakcija superkritičnim ugljen-dioksidom	50
3.6. Enkapsulacija	51
3.6.1. Enkapsulacija primenom <i>spray drying</i> tehnike.....	51

3.6.2.	Enkapsulacija primenom <i>spray congeling</i> tehnike	52
3.7.	Metodi za analizu hemijskih karakteristika biljnog materijala, tečnih i suvih ekstrakata 53	
3.7.1.	Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenola	53
3.7.2.	Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	54
3.7.3.	Određivanje aktivnosti alinaze u listu sremuša.....	55
3.7.4.	Određivanje ukupnih tiosulfinata u listu sremuša.....	56
3.7.5.	Određivanje sadržaja L-askorbinske kiseline u listu sremuša	58
3.7.6.	Određivanje polifenola tečnom hromatografijom (HPLC-DAD).....	58
3.7.7.	Određivanje sumpornih jedinjenja gasnom hromatografijom (GC-MS)	59
3.7.8.	Određivanje sumpornih jedinjenja tečnom hromatografijom (HPLC-DAD)	60
3.7.9.	Određivanje hidroksimetil furfurala (HMF) i furfurala (F) tečnom hromatografijom (HPLC-DAD)	61
3.8.	Metodi za analizu fizičkih karakteristika biljnog materijala, suvih i enkapsuliranih ekstrakata.....	61
3.8.1.	Instrumentalno određivanje boje.....	61
3.8.2.	Sadržaj vlage.....	63
3.8.3.	Senzorna analiza	63
3.8.4.	Higroskopnost	63
3.8.5.	Indeks rastvorljivosti u vodi i indeks apsorpcije vode.....	63
3.8.6.	Određivanje zapreminske mase	64
3.8.7.	Određivanje hemijskih promena pri proizvodnji enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta Furijeovom transformacijom sa infracrvenom spektroskopijom (FT-IR)	64
3.8.8.	Određivanje toplotnih svojstava enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (<i>differential scanning calorimetry</i> – DSC) ..	65
3.8.9.	Određivanje morfoloških karakteristika skenirajućim elektronskim mikroskopijom (<i>scanning electron microscopy</i> – SEM)	65
3.9.	Ispitivanje biološke aktivnosti određenih ekstrakata	66
3.9.1.	Određivanje antioksidativne aktivnosti na 1,1-difenil-pikril-hidrazil (DPPH) radikale	66
3.9.2.	Određivanje antioksidativne aktivnosti na 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfo katjon (ABTS ^{•+}) radikale	67

3.9.3.	Antimikrobno delovanje	68
3.10.	Optimizacija tehnoloških procesa i eksperimentalni dizajn	71
3.11.	Statistička analiza	72
4.	Rezultati i diskusija.....	73
4.1.	Skladištenje lista sremuša.....	73
4.2.	Sušenje lista sremuša.....	82
4.3.	Konvencionalna ekstrakcija	88
4.4.	Ultrazvučna ekstrakcija	90
4.4.1.	Provera modela	91
4.4.1.	Uticaj procesnih parametara ultrazvučne ekstrakcije	93
4.4.2.	Optimizacija procesnih parametara ultrazvučne ekstrakcije.....	100
4.5.	Ekstrakcija subkritičnom vodom.....	102
4.5.1.	Provera modela	103
4.5.2.	Uticaj procesnih parametara subkritične ekstrakcije	104
4.5.3.	Indikatori Maillardove reakcije.....	110
4.5.4.	Optimizacija procesnih parametara.....	112
4.6.	Poređenje hemijskog sastava odabranih ekstrakata	113
4.7.	Superkrična ekstrakcija ugljen-dioksidom.....	118
4.7.1.	Analiza sumpornih jedinjenja u ekstraktima dobijenim SF-CO ₂	121
4.8.	Enkapsulacija pomoću <i>spray drying</i> tehnike	126
4.8.1.	Fizičke osobine suvih ekstrakata	127
4.8.2.	Sadržaj bioaktivnih komponenti	134
4.9.	Enkapsulacija superkričnog ekstrakta lista sremuša <i>spray congealing</i> tehnikom	135
4.9.1.	Karakterizacija čestica praha dobijenog <i>spray congealing</i> tehnikom.....	136
4.9.2.	Sadržaj i stabilnost aktivnih komponenti unutar čestica dobijenih <i>spray congealing</i> tehnikom	140
4.10.	Antibakterijsko delovanje odabranih ekstrakata lista sremuša.....	142
4.10.1.	Antibakterijsko delovanje subkritičnog vodenog ekstrakta	142
4.10.2.	Antibakterijsko delovanje superkričnog ekstrakta i enkapsuliranog superkričnog ekstrakta.....	145
4.11.	Predlog tehnoloških procesa prerade lista sremuša	148

5. Zaključci	150
6. Literatura	154

1. Uvod

Poslednjih godina svetski trend u prehrambenoj industriji je proizvodnja funkcionalne hrane, koja pored nutritivnih, poseduje i lekovita svojstva. Rezultati bioloških, hemijskih i farmakoloških ispitivanja ukazali su na značajnu biološku aktivnost biljnih ekstrakata i omogućili izolovanje i karakterizaciju aktivnih komponenti od kojih se mnoge primenjuju u savremenoj farmakoterapiji (Simin, 2015). U polju farmaceutske industrije i to naročito u sferi proizvodnje dijetetskih suplemenata i biljnih lekova, značajno se uočava rast primene kako lekovitog bilja tako i biljnih ekstrakta. Primenom ekstrakata lekovitog bilja mogu se poboljšati i kvalitet i nutritivna vrednost hrane zbog čega je posebno aktuelna inkorporacija lekovitog bilja i biljnih ekstrakta u inovativne prehrambene i funkcionalne proizvode (Da Silva i sar., 2015; Łuczaj i Pieroni, 2016; Silva i sar., 2011). Danas je naročito je u porastu primena fitonutrijenata koji se mogu koristiti kao zamena za hemijske aditive sa antioksidativnim i antimikrobnim delovanjem (Kallel i sar., 2014; Rocha i sar., 2011). Ovo je naročito interesantno zbog toga što prehrambena i farmaceutska industrija intenzivno traže alternativne konzervanse koji mogu poboljšati bezbednost i kvalitet proizvoda. Jedinjenja koja se dobijaju iz prirodnih izvora, kao što su fenolna jedinjenja ili sumporna jedinjenja iz različitih vrsta luka, imaju potencijal da se koriste kao konzervansi zbog svojih antimikrobnih svojstava i svog širokog spektra delovanja na prehrambene patogene (Gyawali i Ibrahim, 2014).

Zahvaljujući intenzivnom tehnološkom razvoju i novim naučnim saznanjima u vezi sa mehanizmima izdvajanja jedinjenja iz složenih matriksa, ostvaren je značajan napredak u tehnologiji prerade lekovitog bilja i izolovanju farmakološki aktivnih jedinjenja prirodnog porekla, a primenom savremenih instrumentalnih metoda moguća je detaljna kvalitativna i kvantitativna analiza izolovanih komponenti (Harvey, 2008). Izbor odgovarajućeg rastvarača, ekstrakcione tehnike i parametara ekstrakcije su ključni prilikom izolovanja bioaktivnih komponenti i dobijanja ekstrakta visokog kvaliteta. Izabrana tehnika ekstrakcije može značajno da utiče na kvalitet i sadržaj željenih bioaktivnih jedinjenja u dobijenom biljnom preparatu-ekstraktu. Savremeni trendovi u farmaceutskoj i prehrambenoj tehnologiji se baziraju na

primeni ekstrakcionih tehnika koje se zasnivaju na korišćenju subkritičnih i superkritičnih fluida i procesima koji koriste bezbedne (eng. *Generally Recognised as Safe - GRAS*) rastvarače (etanol, voda, itd.), kao i primeni GRAS rastvarača u ultrazvučnom polju u cilju dobijanja ekstrakata sa povećanim sadržajem izolovanih bioaktivnih komponenti (Tomšik i sar., 2015). Ekstrakti dobijeni na ovakav način se mogu koristiti direktno kao poluproizvodi ili proizvodi u prehrambenoj i farmaceutskoj tehnologiji.

Širok spektar biološkog delovanja divljeg belog luka - sremuša (*Allium ursinum* L.), kao i prisustvo specifičnih i vrednih bioaktivnih jedinjenja čine ovu biljku dobrim kandidatom za razvoj novih biljnih ekstrakata, ali i inovativnih funkcionalnih proizvoda i dijetetskih suplemenata. Upravo zbog toga su sremuš i ekstrakti sremuša izabrani kao predmet istraživanja ove doktorske disertacije, pa je iz tog razloga eksperimentalni deo koncipiran tako da pokrije sve faze prerade sremuša, od skladištenja i sušenja svežeg biljnog materijala, do ekstrakcije i enkapsulacije dobijenih ekstrakata.

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su bazirana na optimizaciji postupaka skladištenja, sušenja i ekstrakcije sremuša sa aspekta očuvanja bioaktivnih svojstava jedinjenja sremuša i njegovih ekstrakata. U skladu sa tim, ciljevi doktorske disertacije su:

- Optimizacija postupka čuvanja svežeg lista sremuša u cilju produženja dostupnosti ove biljke, kao i optimalno očuvanje senzornih i nutritivnih svojstava;
- Optimizacija postupka sušenja lista sremuša u cilju očuvanja sadržaja bioaktivnih jedinjenja;
- Optimizacija procesa ekstrakcije u cilju povećanja efikasnosti ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja od interesovanja (fenoli, flavonoidi, sumporna jedinjenja);
- Analiza bioaktivnog delovanja dobijenih ekstrakata, sa ciljem definisanja potencijalne upotrebne vrednosti dobijenih ekstrakata, i
- Razvoj novih poluproizvoda ili proizvoda odgovarajućih formi za primenu u farmaceutskoj ili prehrambenoj industriji.

2. Opšti deo

2.1. *Allium ursinum* L.

Biljke roda *Allium* od davnina zauzimaju važno mesto u čovekovoј ishrani, kao i u tradicionalnoj i savremenoј medicini. *Allium* rod je najveći i najvažniji rod familije *Alliaceae* i obuhvata oko 450 različitih vrsta. Najpoznatije gajene vrste ovog roda su svakako beli luk (*Allium sativum* L.) i crni luk (*Allium cepa* L.). Ove vrste imaju široku primenu kao začinske, salatne i lekovite biljke i dobro su ispitane, kako sa aspekta hemijskog sastava, tako i u pogledu biološke aktivnosti (Simin, 2015). Pored poznatih vrsta belog i crnog luka, ovaj rod obuhvata i druge vrste. Tako u *Allium* rod spadaju sremuš (*Allium ursinum* L., slika 1), zimski luk (*Allium fistulosum* L.), praziluk (*Allium ampeloprasum* L.), vlašac (*Allium schoenoprasum* L.), kineski vlašac (*Allium tuberosum* L.).



Slika 1 *Allium ursinum* L., izvor www.ramsdale.org/ramsons

Sremuš predstavlja višegodišnju zeljastu biljku iz porodice lukova, koja prirodno raste u listopadnim šumama širom Evrope i severne Azije. U narodu je poznatiji pod imenom divlji luk, medveđi luk ili sremuš. Morfološke karakteristike sremuša su tipične za predstavnika roda *Allium* (Schmitt i sar., 2005). Iako izgledom jako liči na đurđevak (*Convallaria majalis* L.), razlikuje se svojim karakterističnim mirisom na beli luk. Period aktivnog rasta sremuša traje od 3,5 do 4 meseca, počevši od ranog proleća (kraj februara, početak marta). Sremuš formira guste populacije prekrivajući velike delove zemljišta. Lukovica je ravna i duguljasta, dugačka do 6 cm,

a stabljika je uspravna, trostrana, visoka do 40 cm. Na vrhu stabljike su cvetovi grupisani u višecvetne štitaste cvasti bele boje, koje počinju sa cvetanjem početkom aprila i cvetaju do kraja maja (Sobolewska i sar., 2013). Biljka razvija dva do tri lista sa drškom, koji su eliptično-kopljasti, glatki, pri vrhu zašiljeni i postepeno se sužuju prema peteljci. Seme je okruglo, crvenkasto-crno skupljeno u čauri (Błażewicz-Woźniak i sar., 2011).

U prehrambene svrhe najčešće se koristi sveži nadzemni deo biljke (*A. ursini herba recens*) ili sveža lukovica (*A. ursinum bulbosus*) kao dodatak salatama ili varivima. Nadzemni deo se bere u proleće, pre cvetanja sremuša, a lukovica u avgustu, pre sazrevanja semena, jer biljna vrsta rano završava vegetativni rast.

2.2. Hemijski sastav sremuša

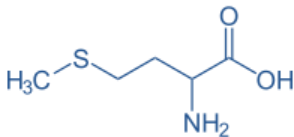
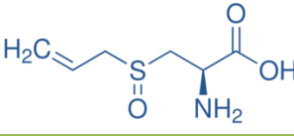
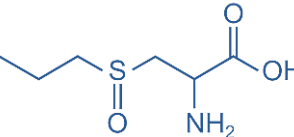
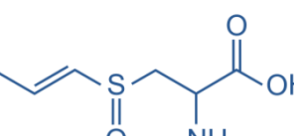
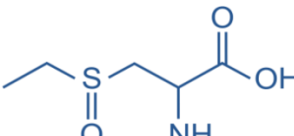
Bioaktivna jedinjenja prisutna u lukovima mogu se podeliti u dve glavne grupe. Prvu grupu predstavljaju jedinjenja koja u svojoj strukturi sadrže sumpor. Mnoge biološke aktivnosti koje se pripisuju vrstama ovog roda su upravo povezane sa sadržajem sumpornih jedinjenja u ovim biljkama. Alin i njegovi derivati, kao što su alicin i ajoeni, osim biološke aktivnosti, odgovorni su i za karakteristični ukus i miris sremuša. Druga velika grupa bioaktivnih jedinjenja od velikog značaja za ljudsku ishranu su polifenolna jedinjenja, kao što su tanini, flavonoidi i fenolne kiseline. Pored toga, u sremušu su detektovani i fitosteroli, karotenoidi i saponini (Lanzotti, 2006; Sobolewska i sar., 2013).

2.2.1. Sumporna jedinjenja sremuša

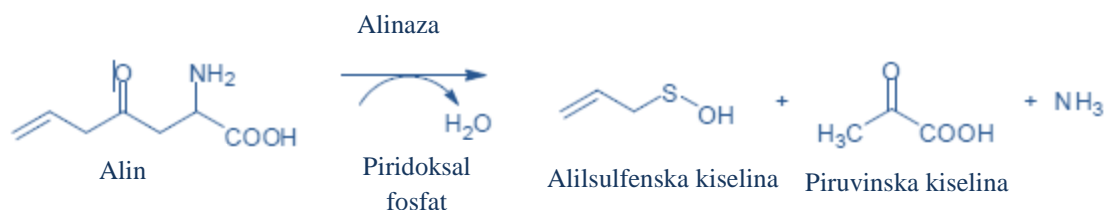
Karakterističan miris *Allium* vrsta, uključujući i sremuš, potiče od sumpornih jedinjenja. Sumporna jedinjenja su najvažnija jedinjenja hemijske karakterizacije sremuša i njegovog farmakološkog delovanja. Fitohemijskim analizama utvrđeno je da sastav i količina sumpornih jedinjenja variraju u zavisnosti od biljnog organa, faze ontogenetskog razvoja biljke, kao i uslova skladištenja (Block i sar., 2001). Glutamil peptidi i sulfoksidi se smatraju primarnim konstituentima *Allium* vrsta koje se odlikuju visokim sadržajem *S*-alk(en)il-*L*-cistein-sulfoksida.

Sulfoksidi su neisparljivi i bez mirisa, dok se njihovom enzimskom hidrolizom dobijaju sekundarna, isparljiva sumporna jedinjenja, kao što su tiosulfinati i (poli)sulfidi odgovorni za karakterističan miris. Sreмуš sadrži smešu primarnih sumpornih jedinjenja kao što su (+)-*S*-metil-L-cistein-sulfoksid (metin) i (+)-*S*-alil-L-cistein-sulfoksid (alin) (Schmitt i sar., 2005). U listu i lukovici sreмуša su takođe prisutni i izoalin i propin, a etin je prisutan u svežim listovima (Kubec i sar., 2000). Hemijske strukture ovih jedinjenja su prikazane u tabeli 1.

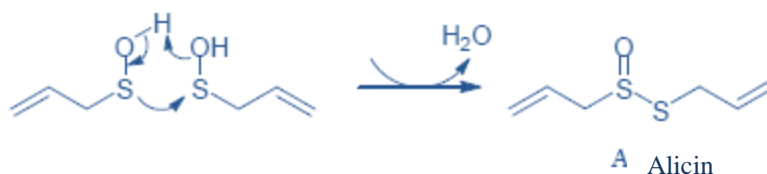
Tabela 1 Cistein sulfoksidi karakteristični za sreмуš

Trivijalni naziv	Hemijski naziv	Struktura
Metin	(+)- <i>S</i> -metil-L-cistein sulfoksid	
Alin	(+)- <i>S</i> -alil-L-cistein sulfoksid	
Propin	(+)- <i>S</i> -propil-L-cistein sulfoksid	
Izoalin	(+)- <i>S</i> -trans-(1-propenil)-L-cistein sulfoksid	
Etin	(+)- <i>S</i> -etil-L-cistein sulfoksid	

Kada sulfoksidi podležu enzimskoj hidrolizi dolazi do formiranja sekundarnih, isparljivih jedinjenja, koja daju karakteritičan miris biljci. Do formiranja ovih jedinjenja dolazi usled dejstva enzima alinaze (*C,S*-liaze), koja cepa C_{β} - S_{γ} veze sulfoksida. Cistein sulfoksidi se nalaze u citoplazmi, dok se hidrolitički enzim alinaza nalazi u vakuolama. Do enzimske reakcije dolazi kada dođe do oštećenja tkiva (drobljenjem, mlevenjem, sečenjem, žvakanjem ili u slučaju patološkog oštećenja) pri čemu se alin konvertuje u alicin (Benkeblia i Lanzotti, 2007). Narušavanjem ćelijske strukture, iz vakuola se oslobađa enzim alinaza, koji razlaže sulfokside na piruvinsku kiselinu, amonijak i alilsulfensku kiselinu (slika 2). Alinaza koja se nalazi u sremušu načešće reaguje sa alinom kao supstratom. Reakcija katalizovana alinazom odvija se mehanizmom β -eliminacije *S*-alk(en)il-sulfoksidne grupe iz supstrata, pri čemu nastaju piruvat, amonijak i alk(en)il-sulfenska kiselina, koja dalje, sa još jednim molekulom ove kiseline, gradi tiosulfinate, u ovom slučaju alicin (slika 3) (Ilić i sar., 2011).



Slika 2 Enzimaska transformacija alina u alilsulfensku kiselinu



Slika 3 Biosinteza alicina iz alilsulfenske kiseline

Najznačajniji tiosulfinati koji su nađeni u ekstraktima sremuša su alicin i metil-alil ili dimetil tiosulfinat. Alicin je po hemijskom sastavu tioestar sulfenske kiseline i najzastupljeniji je tiosulfinat kod sremuša. U čistom obliku je bezbojna do žućkasta, uljasta tečnost, karakterističnog mirisa na beli luk. Odlikuje se širokim spektrom delovanja na Gram pozitivne i

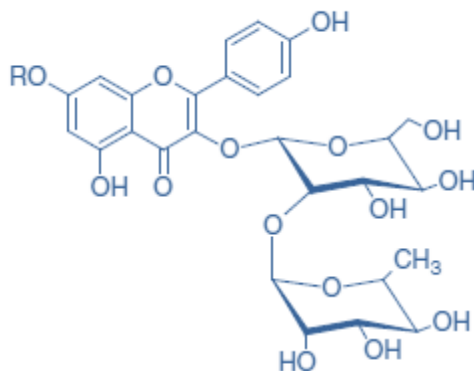
Gram negativne bakterije. Antimikrobni efekat alicina se pripisuje njegovoj interakciji sa enzimima koji u svojoj strukturi sadrže tiol (Ankri i sar., 1997). Pozitivna dejstva alicina su takođe zapažena i kod oboljenja kao što je infarkt (preventivna uloga) (Block i sar., 1986), koronarna tromboza (agregacija trombocita) (Fujisawa i sar., 2008), arterioskleroza (smanjenje stvaranje lipida, holesterola i kalcijuma u velikim i srednjim arterijama), hipertenzija (sniženje krvnog pritiska), malignia oboljenja (inhibicija rasta malignih ćelija i, u nekim slučajevima, njihova eliminacija (Miller, 2004).

Kako su tiosulfinati su nestabilna, reaktivna jedinjenja lako se raspadaju na polisulfide, ditine, ajoene i druga isparljiva i/ili neisparljiva jedinjenja. Međutim, i nakon degradacije neka jedinjenja zadržavaju farmakološko delovanje (Sobolewska i sar., 2013). Do degradacije najčešće dolazi tokom skladištenja, obrade u prisustvu organskog rastvarača ili usled povećane temperature. Vinilditini su ciklična jedinjenja koja predstavljaju grupu degradacionih proizvoda alicina. Ona nastaju kada se primenjuju rastvarači manje polarni od 2-propanola ili heksana. Takođe, mogu nastati i usled termalne degradacije alicina. Vinilditini su identifikovani kao komponente etarskog ulja izolovanog iz listova i cvetova sremuša (Gođevac i sar., 2008). Druga grupa proizvoda degradacije tiosulfinata su ajoeni, metil- i dimetil- ajoeni, identifikovani iz aceton-hloroformskih ekstrakta dobijenih iz lukovica sremuša (Benkeblia i Lanzotti, 2007). Zbog različitog sadržaja alicina u biljnim sirovinama, kao i njegove nestabilnosti i isparljivosti, izolovanje, određivanje i standardizacija alicina iz prirodnih izvora nosi niz poteškoća. Baš iz tog razloga razvijeno je i nekoliko metoda za njegovu sintezu (Ilić i sar., 2011). Da bi se povećala stabilnost alicina i očuvala njegova farmakološka aktivnost, razvijene su inkluzione metode alicina u komplekse sa β -ciklodekstrinima (Nikolić i sar., 2004) i karbamidima (Nikolić i sar., 2005).

Sremuš sadrži i etarsko ulje, ali u jako malim količinama (oko 0,07%). Rezultati kvalitativne analize etarskog ulja sremuša pokazale su razlike u sastavu uzrokovane različitim lokalitetima rasta biljke, različitim periodima branja i razlikama u primenjenim metodama analize (Sobolewska i sar., 2013). U etarskom ulju je detektovano preko 20 različitih sumpornih jedinjenja, od kojih su najzastupljeniji dialil disulfidi (57%), dialil trisulfidi (37%), tetrasulfidi (4,7%) i nesumporna jedinjenja (1%) (Gođevac i sar., 2008).

2.2.2. Fenolna jedinjenja sreмуša

Osim sumpornih jedinjenja sremuš predstavlja i dobar izvor fenolnih jedinjenja. Većina ovih jedinjenja se u biljkama javlja u formi glikozida, sa jednom ili više šećernih komponenti, povećavajući na taj način njihovu rastvorljivost u vodi. Sapunjieva i saradnici (2012.) su odredili sadržaj ukupnih fenola izražen kao ekvivalenti galne kiseline (EGK), 2,8 g EGK/100 g suve droge ekstrahovanih iz lista sremuša primenom 70% etanola kao ekstragensa. Pored galne kiseline, u sremušu su identifikovane i ferulna, vanilinska, *p*-kumarinska i *p*-hidroksibenzoeva kiselina (Djurđević i sar., 2004). Condrat i saradnici (2010) su utvrdili da sadržaj galne kiseline u ekstraktima sremuša varira (0,0076–0,0576 EGK mg/ml) u zavisnosti od primenjenog ekstragensa. Oszmiański i saradnici (2013) su identifikovali 21 fenolno jedinjenje, sa dominantnim učešćem derivata kemferola (slika 4). Dominantni flavonoidi detektovani u listu sremuša su različiti derivati kemferola kao što je: 3-*O*- β -neohesperidozid-7-*O*-[2-*O*-(*trans-p*-kumaroil)]- β -*D*-glukopiranozid, 3-*O*- β -neohesperidozid-7-*O*-[2-*O*-(*trans-p*-feruloil)]- β -*D*-glukopiranozid, 3-*O*- β -neohesperidozid-7-*O*-[2-*O*-(*trans-p*-kumaroil)]- β -*D*-glukopiranozid, 3-*O*- β -neohesperidozid-7-*O*- β -*D*-glukopiranozid i 3-*O*- β -neohesperidozid (slika 4) (Sobolewska i sar., 2013).



R=H; Kemferol 3-*O*- β -neohesperozid

R=Glc; Kemferol 3-*O*- β -neohesperozid-7-*O*- β -*D*-glukopiranoizid

Slika 4 Flavonoidi izolovani iz lista sremuša

2.2.3. Ostala jedinjenja sremuša

U ostala jedinjenja identifikovana u lukovici sremuša ubrajaju se steroidni glikozidi, koji su zastupljeni i u ostalim *Allium* vrstama. U lukovici i listu sremuša su identifikovani diosgenin-3-O- α -L-ramnopiranozil-(1-4)- α -L-ramnopiranozil-(1-4)-[α -L-ramnopiranozil-(1-2)]- β -D-glukopiranozid i (25R)-spirost-5,25(27)-dien-3 β -ol-3-O- α -L-ramnopiranozil-(1-4)- α -L-ramnopiranozil-(1-4)-[α -L-ramnopiranozil-(1-2)]- β -D-glukopiranozid. Međutim, zbog niskog sadržaja, listovi sremuša nisu prikladna sirovina za izolovanje diosgenina (Sobolewska i sar., 2006). Iz lukovice sremuša je takođe izolovan i pregnan glikozid: 3-hidroksi-pregnan-5,16-dien-20-on-3-O- α -L-ramnopiranozil-(1-4)- α -L-ramnopiranozil-(1-4)-[α -L-ramnopiranozil-(1-2)]- β -D-glukopiranozid (Sobolewska i sar., 2006). Iz svežeg lista sremuša ekstrahovan je β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozid (Sabha i sar., 2012). Ostale komponente koje su identifikovane u lukovici sremuša su lecitin, polisaharidi i veliki broj masnih kiselina, kao što su palmitinska, linolna, oleinska, palmitoleinska, α -linoleinska i miristinska kiselina (Sabha i sar., 2012). U vodenim ekstraktima lukovice sremuša su identifikovani i γ -glutamipeptid, kao i aminokiseline asparaginska kiselina, alanin, glicin i treonin, dok je u vodenim ekstraktima lista sremuša identifikovan 2-di-*O*- α -linoleil-3-*O*- β -galaktopiranozil-sn-glicerol (Sabha i sar., 2012). Listovi sremuša obiluju hlorofilom a i b. Sremuš je, takođe, bogat mineralima, a sadrži i magnezijum, mangan i gvožđe (Sobolewska i sar., 2013).

2.3. Farmakološko delovanje sremuša

Biljke roda *Allium* se često koriste u ishrani i lečenju (Benkeblia i Lanzotti, 2007). Jestivi delovi biljaka se koriste za lečenje i prevenciju velikog broja bolesti kao što su bolesti srca i krvnih sudova (Gorinstein i sar., 2007; Sabha i sar., 2012; Siegel i sar., 2004), kancerogena oboljenja (Sengupta i sar. 2004; Shukla i Kalra 2007), gojaznost, dijabetes, poremećaji gastrointestinalnog trakta, povišen nivo holesterola, kao i zapaljenska oboljenja (Hodge i sar., 2002; Kalayarasan i sar., 2009; Takahashi i Shibamoto, 2008).

Najveći deo preparata od sremuša u narodnoj medicini se priprema u formi vodeno-alkoholnog ekstrakta. Takvi preparati se u narodnoj medicini koriste kod poremećaja želudačno-crevnog trakta (infekcijske upale sluzokože), kao profilaktička sredstva protiv gripa i prehlade, za sniženje visokog krvnog pritiska i zbog povoljnog dejstva na kardiovaskularni sistem. Osušene lukovice najčešće služe za pripremu vodenog ekstrakta u formi čaja, dok se sveže lukovice koriste za dobijanje alkoholne tinkture (Sobolewska i sar., 2013). Moderna farmakološka istraživanja su potvrdila tradicionalnu upotrebu sremuša. Potvrđeno je da su flavonoidi koji se nalaze i u sremušu odgovorni za inhibiciju agregacije trombocita kod ljudi i da poseduju antioksidativnu aktivnost (Kumar i Pandey, 2013). Brojna istraživanja *in vitro* i *in vivo* su potvrdila da kempferol i njegovi glikozidi imaju širok spektar farmakoloških aktivnosti, uključujući antiinflamatorno, antimikrobno, antikancerogeno, kardioprotektivno i neuroprotektivno, antidijabetičko, antialergijsko i antiastmatično delovanje (Oszmiański i sar., 2013). Sumporna jedinjenja prisutna u sremušu su značajna zbog svoje bioaktivnosti. Jedinjenja, kao što su alicin, dialil sulfid, dialil disulfid i dialil trisulfid pokazala su antikancerogene aktivnosti (Sengupta i sar. 2004), a prepoznata su kao značajna i zbog svoje antimikrobne kardioprotektivne, antihipertenzivne i antiagregacione aktivnosti i ACE inhibicije (Djurđević i sar., 2004; Hiyasat i sar., 2009; Ivanova i sar., 2009; Rietz i sar., 1993; Štajner i sar., 2008). Antimikrobni potencijal roda *Allium* je generalno povezan sa sadržajem sumpornih jedinjenja, međutim i ostala jedinjenja mogu doprineti antimikrobnom efektu sremuša (Sobolewska i sar., 2013). Antimikrobno delovanje sremuša i njegovih ekstrakta dokazano je u nekoliko naučnih studija. Vodeni i metanolni ekstrakti lista sremuša inhibitorno deluju na sledeće bakterije: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*

enteritidis i plesni: *Cladosporium* spp., *Aspergillus niger*, *Rhizopus nigricans*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium expansum*, *Candida lipolytica*, *Mycoderma*, *Saccharomycopsis fibuligera* (Synowiec i sar. 2010, Sobolewska i sar., 2013). U istraživanju Sapunjieva i saradnika (2012) ispitivani vodeni ekstrakti lista sremuša su pokazali inhibitorno delovanje na *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*., *E. coli* i *Salmonela entirica*, a veće inhibitorno delovanje je zapaženo kod Gram pozitivnih bakterija (Sapunjjeva i sar., 2012). Komparativnom analizom etanolnog ekstrakta cvetova sremuša i lista sremuša na *A. niger*, *Botrytis cinerea*, *Botrytis paeoniae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae*, *Penicilium gladioli* i *Sclerotina sclerotiorum* utvrđeno je bolje delovanje ekstrakta cvetova sremuša, a autori ovo delovanje pripisuju većem sadržaju alicina u cvetovima, nego u listovima sremuša (Pârvu i sar., 2011). Ivanova i saradnici (2009) su ispitivali anitmikrobno delovanje različitih ekstrakata (acetonski, hloroformski, n-butanolni i vodeni) dobijenih iz svežih cvetova i svežih listova sremuša. Acetonski ekstrakt cvetova i listova sremuša, kao i hloroformski ekstrakt listova sremuša pokazali su inhibitorno delovanje na *S. aureus*, dok je hloroformski ekstrakt listova sremuša pokazao inhibitorno delovanje i na *Candida albicans*.

Mnoga *in vivo* i *in vitro* istraživanja su potvrdila da sremuš ima visok potencijal za primenu u lečenju i prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Naime, različiti ekstrakti dobijeni iz svežih listova sremuša su testirani *in vitro* na agregaciju trombocita (Hiyasat i sar., 2009). Rezultati ukazuju na značajnu inhibiciju agregacije adenzin difosfata etanolnim ekstraktima sremuša. Mehanizam delovanje je sličan mehanizmu leka sa kojim je vršeno poređenje, klopidogrelom (Hiyasat i sar., 2009). Pretpostavlja se da su aktivne komponente koje deluju na inhibiciju agregacije trombocita 1,2-di-*O*-D- α -linolenil-3-*O*- β -D-galaktopiranozil-sn-glicerol i β -sitosterol-3-*O*- β -D-glukopiranozid (Sabha i sar., 2012). Favonoidi prisutni u listovima sremuša su pokazali *in vitro* antiagregativna svojstva izazvana kolagenom (Carotenuto i sar., 1997). Utvrđeno je da ekstrakti lista sremuša dovode do inhibicije enzima acetilholinesteraze (ACE), a vodeni ekstrakti lista sremuša su pokazali veću *in vitro* inhibiciju ACE u poređenju sa ekstraktima belog luka. Pretpostavlja se da je izraženija inhibicija ekstrakata sremuša posledica razlike u sadržaju glutamil peptida ove dve biljne vrste (Sobolewska i sar., 2013). Gođevac i saradnici (2008) su ispitivali uticaj etarskog ulja sremuša na fluidnost membrana veštačkih lipozoma (niozoma), pri čemu je utvrđeno da se fluidnost membrana bliže površini nije značajno

promenila, dok se u dubljim slojevima povećala. *In vivo* eksperimenti na pacovima, hrana obogaćena sa 2% usitnjenog lista sremuša, kojom su hranjene ogledne životinje, pokazala je značajno smanjenje ACE aktivnosti plazme u odnosu na kontrolu, dok je primenom hrane obogaćene sa 1% usitnjenog lista sremuša nakon 45 dana došlo do značajnog smanjenja sistolnog pritiska u odnosu na kontrolu. Naime, u istraživanju Reuter i saradnika (1995) utvrđeno je da ishrana obogaćena sremušom smanjuje i povišen insulin i ukupan holesterol. Ovi rezultati se povezuju sa visokom koncentracijom glutamil peptida, adenzina ili fenolnih komponenti sremuša. Primenom hloroformskog i hloroform–acetonskog ekstrakta lukovica sremuša detektovana je inhibicija sinteze holesterola, dok je analizom delovanja pojedinačnih komponenti primenjenih ekstrakta utvrđeno da ajoen, metil ajoen, 2-vinil-4H-1,3-ditin i alicin ispoljavaju najjače delovanje u pogledu smanjenja holesterola (Sobolewska et al., 2013) (Reuter, 1995).

Ispitivanjem antioksidativnog potencijala lista sremuša utvrđeno je da antioksidativno delovanje sremuša nije povezano samo sa prisustvom fenolnih jedinjenja nego i sa aktivnošću antioksidativno delotvornih enzima kao što su katalaza i peroksidaza (Štajner i Varga 2003; Štajner i sar., 2008). Gođevac i saradnici (2010) ispitivali su antioksidativno delovanje etarskog ulja sremuša. Etarsko ulje sremuša je pokazalo slabu antioksidativnu aktivnost na DPPH⁺ i ABTS⁺ radikale u poređenju sa BHT (butilovani hidroksitoluen) i Trolox-om, dok je značajna aktivnost detektovana u β -karoten testu (Gođevac i sar., 2008). Neka jedinjenja izolovana iz ekstrakta sremuša pokazala su upečatljive antioksidativne osobine. Tako na primer dialil disulfid povećava intracelularni sadržaj redukovano glutationa u krvnim ćelijama pacova, dok dialil sulfid povećava aktivnost antioksidativnih enzima i aktivira delovanje Nrf2 proteina, što utiče na smanjenje upale citokina (Kalayarasan i sar., 2009). Sobolewska i saradnici (2006) utvrdili su da hloroformski ekstrakt cvetova i stabljika sremuša ispoljava citotoksično dejstvo. U radu Lai i saradnici (2012) utvrđeno je da dialil disulfid inhibira proliferaciju različitih ćelija raka, kao što su rak dojke, pluća, debelog creva, limfoma i neuroblastoma. Mehanizam delovanja podrazumeva zaustavljanje ciklusa rasta ćelija ili njihovo odumiranje, a dialil trisulfid izaziva odumiranje ćelija raka prostate PC-3 i DU-145 (Lai i sar., 2012).

2.4. Tehnologije prerade lista sremuša

Za preradu lista sremuša u cilju dobijanja proizvoda koji se dalje može primenjivati u prehrambenoj ili farmaceutskoj tehnologiji potrebno je primeniti niz različitih tehnoloških postupaka. Prerada aromatičnog, lekovitog i začinskog bilja ima više pravaca u zavisnosti od toga šta je finalni proizvod i za šta je namenjen. Samoniklo lekovito bilje se najvećim delom na tržištu nalazi u osušenom stanju, dok se neke biljne vrste beru i prodaju sveže, kao što je slučaj i kod sremuša. Listovi sremuša, ako nisu adekvatno čuvani, brzo venu i požute. Zbog sklonosti da brzo izgube svežinu, bitno je ustanoviti optimalne parametre čuvanja svežeg sremuša, kako bi se očuvale njegove bioaktivne komponente, senzorske i nutritivne karakteristike. Sušenjem sremuša se rešava problem sezonskog karaktera proizvoda i omogućava njegovo dalje korišćenje u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Kako se prirodnim sušenjem često dobija droga lošijeg kvaliteta, optimizacija tehnologije sušenja predstavlja bitan korak za dalju preradu sremuša. Na sledećem nivou prerade sprovode se postupci ekstrakcije i optimizacija ekstrakcije. Primenom različitih tehnika ekstrakcije dobijaju se ekstrakti različitog kvaliteta i karakteristika. Ekstrakti često mogu biti poluproizvodi (koriste se u finalnoj izradi farmaceutskih proizvoda), ili gotovi farmaceutski proizvodi. Zbog toga je bitno primeniti odgovarajuće tehnologije u cilju razvoja inovativnih proizvoda (Gupta i sar., 2012; Rocha i sar., 2011) na bazi biljnih ekstrakta.

2.4.1. Skladištenje svežih proizvoda

Sveži proizvodi biljnog porekla imaju značajnu ulogu u ishrani čoveka. Bioaktivne komponente u svežim proizvodima, nastale kao proizvodi metabolizma biljaka, imaju važnu ulogu u ljudskoj ishrani zbog povoljnog učinka na ljudsko zdravlje jer, primarno, štite organizam i jačaju imunitet. Stoga postupci i tehnologije koje se primenjuju nakon berbe, tokom skladištenja (eng. *postharvest technology*), imaju značajnu ulogu u proizvodnom lancu, s obzirom na to da direktno utiču na kvalitet i sadržaj bioaktivnih komponenti u proizvodu, kao i njegovo trajanje i dostupnost u svežem stanju (Rocha i sar., 2011). Osnovni cilj tehnologija skladištenja je očuvanje kvaliteta proizvoda od momenta branja do njegove upotrebe.

Adekvatnim skladištenjem pod optimalnim uslovima fizičko-hemijske i mikrobiološke promene se svode na minimum. Primenom ovih tehnologija stvaraju se uslovi za potrošnju sirovine u svežem stanju, a procesi degradacije kvaliteta se svode na minimum (Shin i sar., 2008).

Najbolje je da se skladištenje odvija u za to specijalno projektovanim skladištima, kako bi se očuvale karakteristike proizvoda. Pre svega, bitno je poznavati sirovinu, proizvod koji se skladišti, kako bi se odredili optimalni uslovi skladištenja. Uslovi skladištenja mogu uticati na profil i sadržaj bioaktivnih jedinjenja, najčešće sadržaj polifenola, organosumpornih jedinjenja i vitamina. Mehanička oštećenja prilikom rukovanja, kao što je sečenje, dovode do oksidacije i aktivacije nekih enzima. S druge strane, mehanička oštećenja mogu dovesti do povećanja sadržaja ukupnih fenola, jer njihovom sintezom biljka pokušava da se zaštiti od oštećenja (Bernaert i sar., 2013).

Faktori koji najviše utiču na promene u svežim proizvodima tokom skladištenja su temperatura i relativna vlažnost. Generalno, što je veća temperatura, kraći je rok trajanja proizvoda i veći su gubici. Poznato je da skladištenje na niskim temperaturama produžava rok upotrebe svežih proizvoda, tako što se usporavaju biohemijske i mikrobiološke promene. Međutim, jako niska temperatura može dovesti do smrzavanja i oštećenja, kao što je slučaj kod zelene salate, koja zbog visokog sadržaja vode (90–95%) mrzne na temperaturi $-0,5$ do -2°C (Agüero i sar., 2007). Tokom skladištenja, proizvodi podležu različitim fizičkim promenama, kao što su gubitak mase zbog isparavanja vode i propadanja biljke. Stoga se relativna vlažnost vazduha za skladištenje većine svežih proizvoda održava na 80–97%, a za one proizvode koji se konzumiraju u svežem stanju najčešće na 90–95% (Gladon, 2006; Yoo i sar., 2012).

Poslednjih godina, pakovanje u modifikovanoj atmosferi (eng. *modified atmosphere packaging*, MAP) je tehnika koja se koristi u cilju produženja roka trajanja svežih ili minimalno prerađenih namirnica, kao što je voće i povrće. Primenom ovakvog načina skladištenja, sastav atmosfere unutar upakovanog proizvoda se menja i usporava se degradacija upakovanog proizvoda. Voće i povrće su proizvodi čija respiracija traje i tokom skladištenja. Izborom odgovarajućeg ambalažnog filma (propustljivost za O_2 i CO_2) postiže se modifikovano ravnotežno stanje i dolazi do produženja trajanja upakovanog proizvoda (Sandhya, 2010).

U stručnoj i naučnoj literaturi ne postoje podaci koji se odnose na analizu skladištenja lista sremuša u cilju njegovog očuvanja u svežem stanju. Poznata je činjenica da se svež sremuš nakon branja prodaje na zelenim pijacama ili u marketima, najčešće u svežnjevima uronjenim u vodu, na temperaturi sredine ili u otvorenim frižiderima u marketima (10–15°C). Da bi se odredili odgovarajući uslovi skladištenja svežeg lista sremuša, eksperiment treba postaviti u skladu sa uslovima skladištenja odgovarajućim za lisnato povrće, kao što je na primer zelena salata ili neke slične sorte luka, kao što je vlašac (Agüero i sar., 2007; Gladon, 2006; Imahori i sar., 2007).

2.4.2. Sušenje biljnog materijala

Sušenje predstavlja značajnu tehnološku operaciju u preradi lekovitog i začinskog bilja. Sušenje se može uspešno primeniti kako bi se smanjile fizičke, biohemijske i mikrobiološke promene smanjenjem sadržaja vlage na odgovarajući nivo koji omogućava dug period skladištenja. Na taj način se rešava problem sezonskog karaktera proizvoda i omogućava njegovo dalje korišćenje u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Doymaz i Kocayigit, 2012; Julkunen-Tiitto i Sorsa, 2001). Sušenjem začinskog bilja, koje najčešće sadrži oko 75–80% vode (u zavisnosti od dela biljke), sadržaj vode se smanjuje ispod 15% kako bi se očuvao kvalitet i stabilnost dobijenog proizvoda (Pravilnik o kvalitetu začina, ekstrakata začina i mešavina začina, Službeni glasnik RS, 72/2014 i 23/2015).

Poznato je da kvalitet osušenih proizvoda značajno zavisi od uslova sušenja. Sušenjem se sprečava rast mikroorganizama i neželjene biohemijske promene, ali sušenje istovremeno može prouzrokovati promene fizičkih karakteristika sirovine, kao što su boja i struktura. Druge promene koje utiču na kvalitet osušenog proizvoda, kao što su promena ili izraženost arome, uzrokovane su isparavanjem ili formiranjem novih jedinjenja, kao rezultat odigravanja reakcija oksidacije i esterifikacije (Díaz-Maroto i sar., 2002; Ratti i sar., 2007). Osim nutritivnih promena, do kojih može doći tokom sušenja, promena boje je značajan indikator promene sastava proizvoda (karotenoidi, fenoli, flavonoidi, hlorofil) i direktno utiče na dopadljivost proizvoda potrošačima (Devahastin i Niamnuy, 2010). Određena bioaktivna jedinjenja, usled

izloženosti visokim temperaturama, kiseoniku i svetlosti na koje su osetljiva, mogu biti degradirana u proizvodu koji se suši, zbog čega se za sušenje ovakvih proizvoda mora odabrati odgovarajuća tehnika koja će omogućiti eliminaciju faktora koji mogu uticati na stabilnost ovako osetljivih komponenti. Promene do kojih dolazi tokom sušenja najviše zavise od matriksa koji se suši i primenjene tehnike sušenja. Izbor odgovarajuće tehnike sušenja često zavisi od karakteristika samog materijala koji se suši, od njegove osetljivosti na toplotu, osobina u vezi sa zadržavanjem kvaliteta ukusa, fizičke strukture, krajnje namene i što je često najvažnije, od troškova samog procesa. Zbog toga je odabir odgovarajuće tehnike sušenja i optimizacija procesnih parametara tokom sušenja izuzetno važna za dobijanje proizvoda sa željenim fizičkim i hemijskim karakteristikama (Rocha i sar., 2011).

Mnogi autori su istraživali uticaj različitih tehnika sušenja na kvalitet osušenog bilja. Kvalitet osušenog proizvoda je uglavnom definisan karakteristikama kao što su boja, sadržaj vlage, a_w vrednost, antioksidativni kapacitet i sadržaj fenolnih jedinjenja, ili specifičnim bioaktivnim komponentama značajnim za matriks koji se suši. Za sušenje materijala ovog tipa uglavnom su korišćene sledeće tehnike: konvektivno sušenje, sušenje pomoću mikrotalasa, vakuumsko sušenje ili sušenje smrzavanjem, odnosno liofilizacijom (Abascal i sar., 2005; Alibas, 2007; Ben Haj Said i sar., 2015; Chan i sar., 2009; Díaz-Maroto i sar., 2002; Hossain i sar., 2010; Díaz-Maroto i sar., 2003; Oliveira i sar., 2015; Ratti, 2001; Silva i sar., 2011).

2.4.2.1. Konvektivno sušenje

Tradicionalne tehnike sušenja, kao što su sušenje u hladu ili na suncu, imaju niz nedostataka zbog nemogućnosti rukovanja velikim kapacitetom, a karakteriše ih i nemogućnost postizanja visokih standarda kvaliteta koji se zahtevaju za lekovito bilje (Pravilnik o kvalitetu začina, ekstrakata začina i mešavina začina, Službeni glasnik RS, 72/2014 i 23/2015). Često tradicionalni način sušenja ne ispunjava tražene standarde ili zahteve potrošača. Za savladavanje ovih problema često se koristi sušenje vrućim vazduhom, u konvektivnim sušarama.

Većina tehnika sušenja je zasnovana na upotrebi toplog vazduha kao medijuma za konvektivni prenos toplote i uklanjanje isparene vode. Glavni mehanizam sušenja u ovom

slučaju je kretanje vlage iz unutrašnjosti do površine vlažnog materijala i isparavanje u okolni vazduh, dok se sam proces sušenja odvija u dve faze (Šumić, 2014). Prva faza sušenja se dešava na površini matriksa koji se suši konstantnom brzinom i slična je isparavanju vode. Druga faza sušenja se odvija sporije i zavisi od matriksa koji se suši. Brzina sušenja je funkcija nekoliko parametara, kao što su temperatura, vlažnost i brzina strujanja vazduha, sadržaj vode vlažnih i osušenih proizvoda, reološke karakteristike, specifična površina sušenja, geometrijske forme inicijalnog proizvoda, itd. (El-Sebaii and Shalaby, 2011).

2.4.2.2. Vakuumsko sušenje

Kod sušenja pod vakuumom toplota se uglavnom prenosi kontaktom, a rede zračenjem. Vakuum povećava prenos mase zbog povećanog gradijenta pritiska između unutrašnje i spoljašnje strane uzorka. Niži pritisak omogućava smanjenje temperature sušenja i onemogućava oksidacione promene sirovine, pri čemu se dobija proizvod boljih karakteristika (Jayeeta i sar., 2011). Ključne prednosti vakuumskog sušenja uključuju niže temperature procesa, manju potrošnju energije i samim tim veću energetska efikasnost i poboljšanje kinetike sušenja. Vakuumskim sušenjem se postiže bolji kvalitet proizvoda (boja, ukus) i maksimalno očuvanje termički osetljivih biološki aktivnih supstanci (Alibas, 2007). Sušenjem u vakuumu uspešno se suše osetljivi biljni materijal uz minimalne promene u zapremini, hemijskom sastavu i senzornim svojstvima. Zbog toga se vakuumsko sušenje uspešno primjenjuje za sušenje lekovitog i začinskog bilja, voća i povrća i drugih osetljivih matriksa (Alibas, 2007).

2.4.2.3. Liofilizacija

Liofilizacija ili sušenje smrzavanjem predstavlja poseban vid sušenja u vakuumu. U slučaju sušenja smrzavanjem sirovina je tokom celog procesa u smrznutom stanju, pa se ne narušava struktura ćelija. Izvorni oblik, boja i ukus sirovine zadržavaju se u većoj meri nego prilikom klasičnog sušenja u vakuumu, a značajno više u poređenju sa drugim postupcima sušenja (Šumić, 2014). U poređenju sa sušenjem vrućim vazduhom konvektivnom tehnikom, sušenje smrzavanjem može smanjiti gubitke aroma i osetljivih jedinjenja. Neželjene bihemijske i enzimske reakcije su zaustavljene prethodnim smrzavanjem i sušenje se odvija na niskim temperaturama (Huang i sar., 2012; Ratti i sar., 2007).

Proces liofilizacije se sastoji od sublimacije vode iz smrznute sirovine, na dovoljno niskoj temperaturi i pod dovoljno visokim vakuumom. Proces sušenja smrzavanjem sastoji se od tri osnovne faze: I - smrzavanja, II - primarnog i III - sekundarnog sušenja sirovine (Vračar, 2004). Pošto se proces sušenja smrzavanjem zasniva na sublimaciji, sirovina se prethodno mora smrznuti, odnosno mora se smrznuti slobodna voda u sirovini. Primarnim sušenjem se iz sirovine sublimacijom izdvaja tzv. slobodna voda. Primarno sušenje se smatra završenim kada u sirovini ostane 6–8% vode. Pretpostavlja se da posle ovoga u sirovini više nema slobodne vode, pa je proces sublimacije završen. Sekundarnim sušenjem se iz sirovine desorpcijom izdvaja tzv. vezana (nesmrznuta) voda. Uklanjanjem i tzv. vezane vode omogućava se uspešno čuvanje proizvoda i pri skladištenju na sobnoj temperaturi (Šumić, 2014).

Na našim prostorima, od sakupljača i dobavljača sremuša može se saznati da se sremuš najčešće suši tradicionalnom tehnikom sušenja u hladu, u provetrenim prostorijama nakon branja. U naučnoj literaturi nema podataka o načinu, odnosno tehnikama sušenja i parametrima sušenja, koji bi bili odgovarajući u cilju očuvanja bioaktivnih komponenti u listu sremuša. Pretpostavlja se da, kao i u većini slučajeva sušenja lekovitog ili začinskog bilja, treba primeniti umerenu temperaturu sušenja, kako ne bi došlo do degradacije bioaktivnih komponenti. Zbog svega navedenog, potrebno je sprovesti optimizaciju sušenja u pogledu odgovarajuće tehnike sušenja i temperature, kako bi se omogućila proizvodnja osušenog lista sremuša željenih karakteristika.

2.4.3. Ekstrakcija lekovitog bilja

Osnovni cilj ekstrakcije biljnog materijala je izolovanje željenih komponenti ili smeše ciljanih komponenti sa maksimalnim prinosom. Pored odgovarajuće pripreme biljnog materijala (sušenje, usitnjavanje), primenjena tehnika ekstrakcije značajno utiče na kvalitet i količinu izolovanih komponenti u proizvodnji ekstrakta. Stoga se, u zavisnosti od ciljnih komponenti koje se ekstrahuju, primenjuju različite tehnike ekstrakcije. Konvencionalne ekstrakcione tehnike zasnivaju se na primeni odgovarajućeg rastvarača na različitim temperaturama ekstrakcije uz mešanje. Iako efikasnost ekstrakcije i kvalitet dobijenih ekstrakata zavisi od više parametara, izbor odgovarajućeg rastvarača je jedan od najbitnijih. Konvencionalne ekstrakcione tehnike, kao što su maceracija, hidrodestilacija i *Soxhlet* ekstrakcija koriste različite rastvarače (voda, etanol, hlороform, etil acetat, metanol itd.), u zavisnosti od polarnosti komponenti koje se žele izolovati. Međutim, iako su konvencionalne tehnike i dalje zastupljene, mali prinos koji se ostvaruje njihovom primenom, dugo vreme ekstrakcije, velika potrošnja energije i upotreba velikih količina rastvarača koji mogu biti toksični, često ograničavaju njihovu upotrebu u prehrambenoj ili farmaceutskoj industriji (Tiwari, 2015). Poslednjih godina došlo je do značajnog napretka u razvoju novih ekstrakcionih tehnika i to posebno “zelenih” ekstrakcionih tehnika (eng. *green technology*), u kojima se primenjuju ekstragensi koji ne zagađuju životnu sredinu i koji omogućavaju proizvodnju zdravstveno bezbednih ekstrakata bez tragova toksičnih rastvarača. U cilju korišćenja što bezbednijih rastvarača, za ekstrakciju lekovitog bilja se najčešće primenjuje smeša alkohola i vode (Cvjetko Bubalo i sar., 2015). Variranjem udela vode i etanola u smeši menja se dielektrična konstanta rastvarača u širokom opsegu, što omogućava ekstrakciju velikog broja bioaktivnih komponenti. Primenom savremenih ekstrakcionih tehnika, kao što su ultrazvučna ekstrakcija (UE), mikrotalasna ekstrakcija (ME), ekstrakcije pod povišenim pritiskom (ekstrakcija fluidima u superkritičnom i subkritičnom stanju) i ekstrakcija pomoću enzima, značajno se povećava prinos i selektivnost prema određenim bioaktivnim komponentama. Ove brze, ekološki prihvatljive tehnike sa visokim prinosima imaju značajnu ulogu u dobijanju ekstrakata sa visokim sadržajem bioaktivnih komponenti (Azmir i sar., 2013; Gupta i sar., 2012).

2.4.3.1. Ultrazvučna ekstrakcija

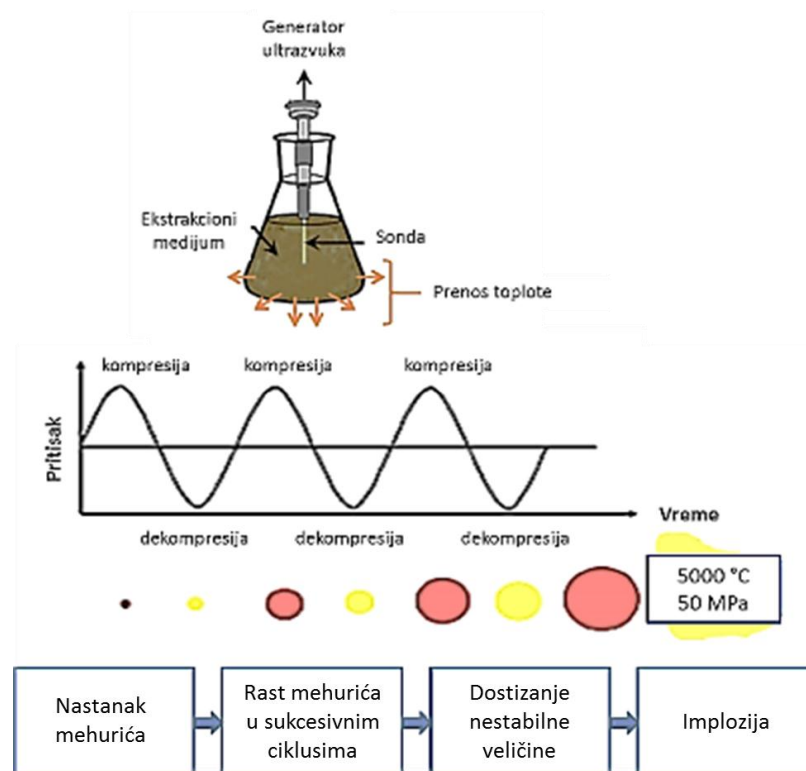
Ultrazvuk se primenjuje u različitim tehnologijama, a od nedavno ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka predstavlja odličnu alternativu konvencionalnoj ekstrakciji, jer omogućava dobijanje većeg prinosa ciljanih jedinjenja u ekstraktu, uz visoku reproduktivnost, manju potrošnju rastvarača, primenu niže temperature, kraće vreme ekstrakcije, lako rukovanje i rad tokom procesa, kao i bolju kinetiku i veće ukupne prinose ekstrakcije (Chemat i sar., 2011; Vinatoru, 2001). Širokoj primeni ultrazvuka za ekstrakciju iz različitih biljnih matriksa doprinosi činjenica da se ultrazvučni talasi prostiru kroz bilo koji medijum, te je izbor rastvarača koji se mogu uzeti u obzir kod ovog tipa ekstrakcije dosta širok. Veliki broj autora ukazuje na to da je ekstrakcija biljnog materijala pomoću ultrazvuka jedan od najefikasnijih, najjeftinijih i najjednostavnijih postojećih sistema za ekstrakciju, koji bi se mogli primenjivati i na industrijskom nivou (Kadam i sar., 2015; Khoddami i sar., 2013; Ramić i sar., 2015; Roselló-Soto i sar., 2016). Ultrazvučna ekstrakcija je primenjena za izolovanje sumpornih jedinjenja iz belog luka (Kimbaris i sar., 2006), fenolnih jedinjenja iz belog luka, crnog luka i sremuša (Gîtin i sar., 2012). U naučnoj i stručnoj literaturi nema podataka o optimizaciji ultrazvučne ekstrakcije i analizi uticaja različitih parametara ekstrakcije na prinos bioaktivnih komponenti izolovanih iz sremuša.

Prilikom ultrazvučne ekstrakcije dolazi do različitih fizičko-hemijskih fenomena, koji su odgovorni za celokupni ultrazvučni efekat (vibracije, pritisak, sile smicanja, kompresije, dekompresije, pojave mikromlaznica, kavitacija, mikromešanje, formiranje radikala) (Tiwari, 2015). Fenomen koji dominira u procesu ekstrakcije ultrazvukom jeste akustična kavitacija, koja nastaje prostiranjem ultrazvuka kroz neki medijum. Prolaskom ultrazvuka kroz ekstrakcioni medijum dolazi do niza naizmeničnih kompresija i dekompresija molekula, pri čemu dolazi do formiranja mehurića gasa usled promene pritiska i na kraju do njihovog pucanja-implozije. Pucanje mehurića prouzrokuje naglo lokalno povećanje temperature (oko 5000 K) i pritiska (oko 500 bara) (slika 5) (Xu i sar., 2017, Pavlić, 2017). Prilikom raspada kavitacionog mehurića u blizini ćelijskog zida dolazi do obrazovanja ultrazvučnih mikromlaznica, koje usmeravaju rastvarač prema ćelijskom zidu (Gil-Chávez i sar., 2013). Promene temperature i pritiska koje se javljaju usled ovih implozija uzrokuju smicanje i oštećenje ćelijskog zida i bolju penetraciju rastvarača u biljni materijal, povećavajući kontaktnu površinu između tečne i čvrste faze.

Implozija kavitacionih mehurića stvara turbulenciju na mikroskopskom nivou, te dolazi do sudara između čestica i agitacije u mikroporoznim ćelijama matriksa, što ubrzava difuziju i prelaz biokativnih jedinjenja iz biljnog materijala u rastvarač (Tiwari, 2015).

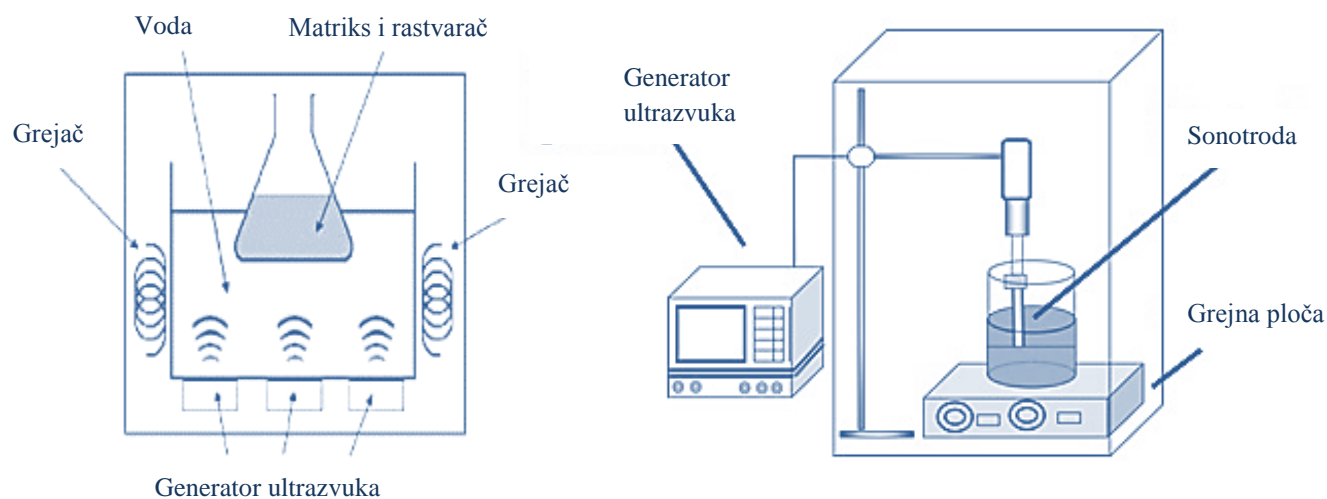
Ultrazvučni talasi olakšavaju hidrataciju i bubrenje matriksa povećavajući pore, čime ubrzavaju difuziju i prenos mase. Hidratacija usled ultrazvuka je naročito poželjna kada se za ekstrakciju koristi suvi biljni materijal (Chemat i sar., 2011; Romdhane, 2002).

Kao izvor ultrazvučnog zračenja za intenzifikaciju ekstrakcije koristi se piezoelektrični ili magnetostruktivni transdudktor, odnosno generatori ultrazvuka (Chemat i sar., 2017). Ekstrakcija se izvodi pomoću ultrazvučnih sonda, sonotroda ili ultrazvučnih kupatila. Postavljanje transdudktora ima bitnu ulogu u određivanju prinosa ekstrakcije jer direktno utiče na efikasnost ekstrakcije, intenzifikaciju procesa i gubitke energije. Ultrazvučno kupatilo se najčešće koristi za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih izvora na laboratorijskom nivou (slika 6) (Shirsath



Slika 5 Mehanizam nastanka i implozije mehurića prilikom ultrazvučne ekstrakcije (prilagođeno iz rada Chemat i sar., 2017)

i sar., 2012b). Njega odlikuje relativno niska cena i mogućnost ekstrakcije više uzoraka istovremeno. Pri primeni ultrazvučnog kupatila celokupna zapremina medijuma nije izložena fenomenu kavitacije, nego samo medijum u neposrednoj blizini ultrazvučnog generatora, tako da je potrebno obezbediti što je moguće bliži položaj generatora ultrazvuka i uzorka (Chemat i sar., 2017). Kao ekstraktor može da se koristi odgovarajući erlenmajer ili prilagođeni reaktor sa mešanjem, postavljen uvek na isto mesto u cilju bolje reproduktivnosti ekstrakcije (Pavlič, 2017). U poslednje vreme se za ultrazvučnu ekstrakciju uglavnom koriste uređaji na bazi ultrazvučne sonde. Naime, s obzirom na to da se snaga prenosi kroz manju površinu sonde, dobija se efikasniji prenos snage zračenja u zapreminu ekstraktora i veći prinos ekstrakcije. Međutim, da li će ekstrakcija biti efikasnija korišćenjem ultrazvučnog kupatila ili sonotrode, zavisi prvenstveno od matriksa i komponenti koje se žele izekstrahovati (Tiwari, 2015).

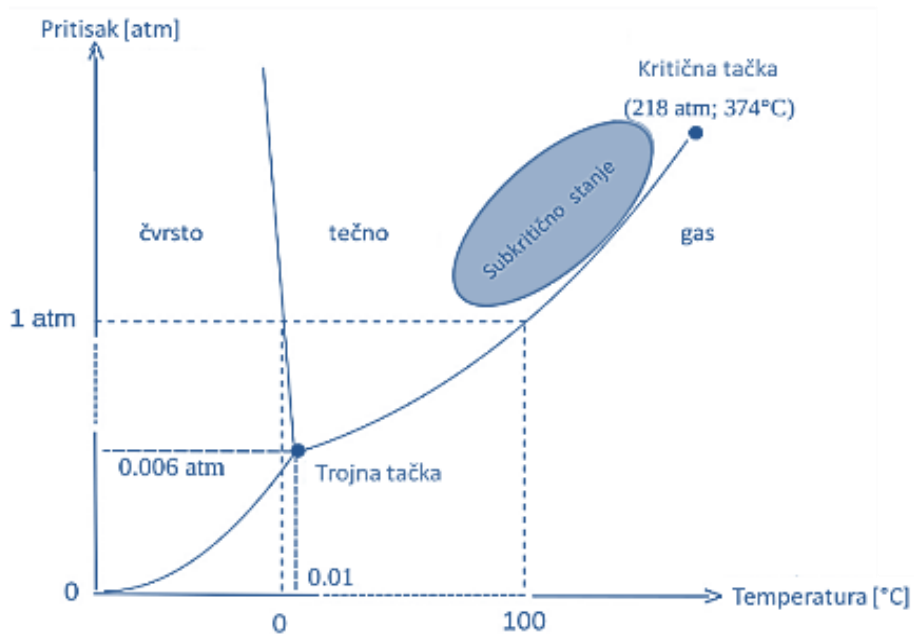


Slika 6 Aparatura za ultrazvučnu ekstrakciju (prilagođeno iz rada Samaram i sar., 2014 i Adilah Noor Md i sar, 2016)

2.4.3.2. Ekstrakcija subkritičnom vodom

U skladu sa principima “zelene hemije” sve više se pridaje značaju ekstrakcionim tehnikama u kojima se kao rastvarači ne koriste toksični organske supstance. Voda je rastvarač koji je lako dostupan, netoksičan i može se reciklirati ili ukloniti bez negativnih uticaja na životnu sredinu, te je zbog toga razvijena posebna tehnika ekstrakcije tečnostima pod pritiskom, ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju (eng. *subcritical water extraction*, SWE). Ova tehnika ekstrakcije poznata je i kao ekstrakcija pregrejanom vodom ili ekstrakcija vrelom vodom pod pritiskom (Herrero i sar., 2013). Ekstrakcija subkritičnom vodom koristi vodu zagrejanu do temperature iznad svoje temperature ključanja (100 °C na atmosferskom pritisku), a ispod kritične temperature (374 °C) i pod pritiskom čija je vrednost dovoljno visoka da je zadrži u tečnom stanju (Plaza i Turner, 2015). Tokom ekstrakcije subkritičnom vodom fizičko-hemijske osobine vode su znatno drugačije u poređenju sa njenim osobinama na sobnoj temperaturi. Kada se voda nalazi u subkritičnom stanju, dolazi do značajne promene njene polarnosti, često izražene preko dielektrične konstante (Alghoul i sar., 2017). Zbog toga se promena dielektrične konstante vode u subkritičnom stanju može smatrati jednim od najvažnijih promena tokom subkritične ekstrakcije. Naime, početna vrednost dielektrične konstante vode na ambijentalnim uslovima od 80 F/m na 25 °C smanjuje se na 27 F/m na 250 °C i na 50 bara, što je između vrednosti metanola ($\epsilon = 33$ F/m) i etanola ($\epsilon = 24$ F/m) (He i sar., 2012; Herrero i Ibáñez, 2014; Teo i sar., 2010). Sa povećanjem temperature na 300 °C (u blizini kritične tačke) dielektrična konstanta vode smanjuje se na 14,3 F/m, dok na 400 °C i pritisku od 500 bara (superkritična voda) ima još nižu vrednost dielektrične konstante, 12,16 F/m. U subkritičnoj oblasti s porastom temperature u intervalu od 100 do 374 °C (ispod kritične tačke) dolazi do postepenog i proporcionalnog smanjenja viskoziteta, gustine i površinskog napona, a do povećanja difuzivnosti (slika 7) (He i sar., 2012). Takođe, s povećanjem temperature vode dolazi do značajnijih promena konstante disocijacije vode, koja na sobnoj temperaturi iznosi $1,0 \times 10^{-14}$, a značajno se povećava sa porastom temperature vode u subkritičnom stanju do $4,0 \times 10^{-12}$ na 250 °C. Zbog povećane jonizacije subkritična voda se često koristi kao kiseli/bazni katalizator u organskim reakcijama (Alghoul i sar., 2017). S povećanjem temperature vode povećava se termička agitacija, smanjuje se jačina vodoničnih veza i dolazi do smanjenja vrednosti

dielektrične konstante. Smanjena je snaga vezivanja vodonika unutar molekula vode, a smanjena polarnost vode dovodi do povećanja rastvorljivosti hidrofobnih organskih jedinjenja u vodi (Carr i sar., 2011). Povećanje temperature vode u subkritičnom stanju dovodi do smanjenja dielektrične konstante čime se povećava ekstrakcija nepolarnih jedinjenja. Na taj način, menjanjem polarnosti vode može doći do rastvaranja i ekstrahovanja bioaktivnih komponenti različite polarnosti (Mazaheri i sar., 2010; Ravber i sar., 2015; Tomšik i sar., 2017). Polarna jedinjenja sa visokom rastvorljivošću u vodi se najefikasnije ekstrahuju na nižim temperaturama, dok umereno polarne i nepolarne komponente zahtevaju manje polarni medijum, što se postiže povećanjem temperature vode tokom subkritične ekstrakcije (Ahmadian-Kouchaksaraie i sar., 2016; Khuwijitjaru i sar., 2014; J. Lu i sar., 2014). Promenom temperature mogu se menjati solvativajuće osobine vode, kako bi se bolje uskladile sa polarnošću ciljnih jedinjenja koja se žele ekstrahovati, zbog čega se subkritična voda pod određenim pritiskom i temperaturom može smatrati vrlo efikasnim rastvaračem za ekstrakciju slabo polarnih i nepolarnih jedinjenja (Teo i sar., 2010).

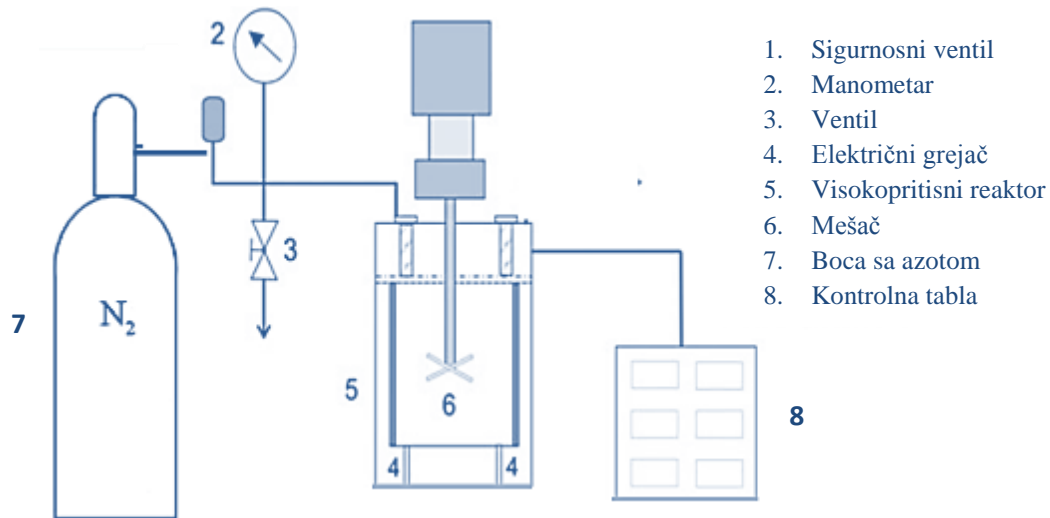


Slika 7 Fazni dijagram vode u zavisnosti od temperature i pritiska (prilagođeno iz rada Haghghi i Khajenoori, 2013)

Mehanizam delovanja i efikasnost ove ekstrakcione tehnike zasniva se na navedenim fizičko-hemijskim promenama nastalim usled povećanja temperature vode u subkritičnom stanju. Dominantni parametri koji utiču na efikasnost ekstrakcije subkritičnom vodom su svakako temperatura, pritisak, kao i dodatak modifikatora. Ekstrakcija subkritičnom vodom mora se izvoditi pod strogo kontrolisanim uslovima, a procesni parametri pažljivo izabrati i optimizovati, kako bi se izbegla degradacija bioaktivnih komponenti koje se ekstrahuju. Parametar o kome se posebno mora voditi računa jeste temperatura ekstrakcije. Primenom visokih temperatura poboljšava se efikasnost ekstrakcije na više načina. Sa modifikacijom svojstava vode na povišenoj temperaturi, kapacitet fluida za rastvaranje analita se povećava. Redukovana viskoznost i poboljšana difuzivnost vode omogućavaju bolje kvašenje i lakše prodiranje rastvarača u biljni materijal. Povećanjem temperature može se uticati na slabljenje veza između analita i matriksa, koje su uslovljene van der Valsovim silama, vodoničnim vezama i interakcijama dipola, a poboljšava se i transfer mase i tako doprinosi bržoj ekstrakciji i efikasnosti samog procesa (Mustafa i Turner, 2011; Teo i sar., 2010). Međutim, s povećanjem temperature tokom subkritične ekstrakcije može doći do degradacije bioaktivnih jedinjenja i povećanja rizika nastanka neželjenih reakcija, kao što su oksidacija ili hidroliza, s obzirom na to da je jonska jačina veća, a pH vrednost manja. Naime, neka jedinjenja, kao što su na primer antocijani, mogu preći u drugu formu u zavisnosti pH vrednosti sredine (He i sar., 2012). Prema istraživanjima Plaza i Turner (2015) s povećanjem temperature na oko 250 °C, pH vrednost vode se smanjuje sa 7 na 5,5, pri čemu dolazi do stvaranja H_3^+ jona i reakcije katalizovane nastalim jonima. Degradacija jedinjenja ne zavisi samo od temperature, već i od vremena trajanja procesa ekstrakcije. Što se tiče trajanja ekstrakcije subkritičnom vodom, ona je značajno kraća od bilo koje konvencionalne tehnike. Međutim, zbog primene visokih temperatura tokom ekstrakcije, neophodno je eksperimentalno utvrditi optimalnu temperaturu i vreme ekstrakcije za različite biljne materijale. Uticaj promene pritiska na efikasnost ekstrakcije je zanemarljiv i najčešće se njegova uloga svodi na održavanje vode u tečnom stanju (Mustafa i Turner, 2011).

Za ekstrakciju subkritičnom vodom najčešće se koriste se diskontinualni ekstraktori (slika 8). Proces ekstrakcije započinje dovođenjem vode na željene uslove pritiska i temperature. Željeni pritisak se postiže pumpom i primenom azota, kako bi se sprečila moguća oksidacija na

povišenoj temperaturi i pritisku u prisustvu kiseonika iz vazduha. Vrednost temperature podešava se prolaskom vode kroz grejač. Mešalica se koristi u cilju intenzifikacije prenosa mase i toplote i sprečavanja lokalnog pregrevanja na unutrašnjim zidovima ekstraktora. Nakon ekstrakcije, ekstraktor se hladi u ledenom kupatilu do sobne temperature i azot se ispušta kroz izlazni ventil (Pavlić i sar., 2016).



Slika 8 Shematski prikaz šaržne supkritične vodene ekstrakcije (prilagođeno iz rada Zeković i sar., 2014)

Jedan od načina za minimiziranje neželjenih hemijskih reakcija tokom subkritične ekstrakcije je korišćenje sistema sa kontinualnim i dovoljno visokim protokom rastvarača. Nakon dovođenja vode u subkritično stanje pod željenim uslovima, ona se uvodi u ekstraktor i pušta da pod pritiskom kontinualno protiče kroz sloj biljnog materijala, rastvarajući pritom željene komponente. Stalno dovođenje svežeg rastvarača koji dolazi u kontakt sa sirovinom dovodi do većeg koncentracionog gradijenta između rastvorka u čvrstoj i tečnoj fazi. Nakon prolaska kroz sloj vrši se dekompresija i hlađenje, a dobijeni ekstrakt se sakuplja u kolektorske posude (Chemat i sar., 2017).

Iako kao i svaka ekstrakciona tehnika ima svojih nedostataka, ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju se pokazala efikasnom za izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz različitih vrsta biljaka i algi (Zakaria i Kamal, 2015). Ekstrakti dobijeni ekstrakcijom subkritičnom vodom ne sadrže tragove toksičnih rastvarača i zbog toga nije potrebno dodatno razdvajanje ili

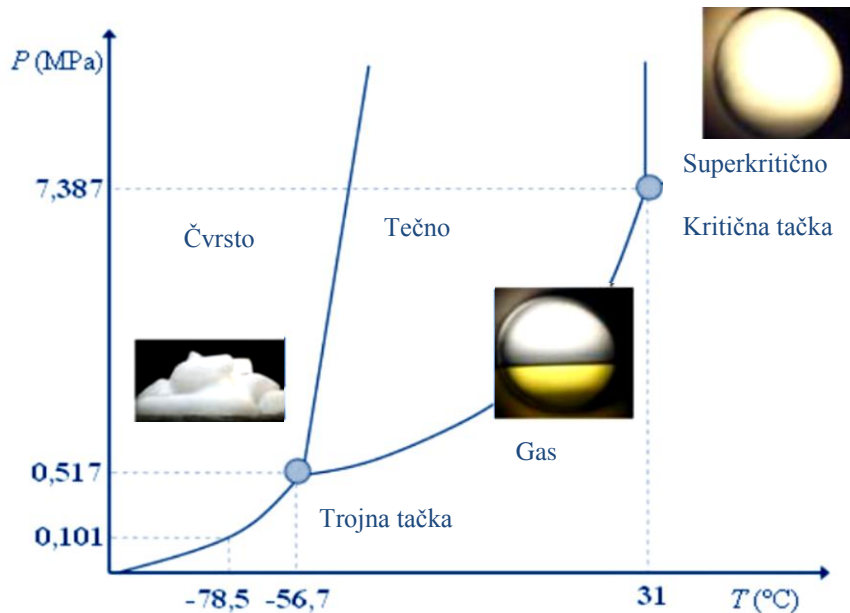
prečišćavanje. Sam proces ekstrakcije je brz i zahteva manju količinu ekstragensa (Zakaria i Kamal, 2015). Upravo iz ovog razloga dobijeni ekstrakti se mogu koristiti direktno kao poluproizvodi ili proizvodi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

2.4.3.3. Ekstrakcija superkritičnim ugljen-dioksidom

Superkritična ekstrakcija ugljen-dioksidom (SC-CO₂) poslednjih godina zauzima značajno mesto među ekstrakcionim tehnikama kao alternativa konvencionalnoj ekstrakciji (Barros i sar., 2017; Da Silva i sar., 2015; del Valle, 2014; Fernández-Ponce i sar., 2012). Tokom superkritične ekstrakcije kao rastvarač se koristi fluid u superkritičnom stanju, a princip ove ekstrakcije se zasniva na tome da pojedini gasovi postaju izuzetno moćni rastvarači kada se nađu u blizini svoje kritične tačke, odnosno u svojoj natkritičnoj oblasti (Lang i Wai, 2001). Fizičko-hemijske karakteristike fluida u superkritičnom stanju se nalaze između osobina gasova i tečnosti, što ih čini jako pogodnim rastvaračima. Fluidi u superkritičnom stanju se odlikuju dobrim solvacionim osobinama kao kod tečnosti, a transfer mase se odigrava brzo kao u gasovima. Nizak viskozitet i površinski napon i visoka difuzivnost omogućava fluidima u superkritičnom stanju da lako prodiru u pore biljnog matriksa, omogućujući bržu i efikasniju ekstrakciju bioaktivnih komponenti. (Anklam i sar., 1998). Tokom superkritične ekstrakcije rastvarač konstantno protiče kroz materijal koji se ekstrahuje, omogućujući bolju iscrpljenost uzorka (Sahena i sar., 2009). Moć solvatacije rastvarača se može menjati menjanjem temperature i/ili pritiska, pri čemu dolazi do promene gustine fluida i na taj način može se uticati na selektivnost ekstrakcije, što je naročito bitno za ekstrakciju kompleksnih uzoraka kao što je biljni materijal (Reverchon i De Marco, 2006).

Fluid koji se najčešće koristi za ekstrakciju biljnog materijala je superkritični ugljen-dioksid. Superkritični ugljen-dioksid se pokazao kao veoma poželjan ekstragens, s obzirom na to da je netoksičan, nezapaljiv, hemijski inertan, bez ukusa i mirisa, jeftin i lako dostupan u većim količinama sa visokim stepenom čistoće. Osim toga, ekstrakcija superkritičnim CO₂ spada u „čiste tehnologije“ jer nema sekundarnih proizvoda štetnih za okolinu, što CO₂ čini potpuno ekološki prihvatljivim rastvaračem (eng. *GRAS-Generally recognized as safe*) (Cvjetko Bubalo i

sar., 2015). Kritičnu tačku CO₂ definiše temperatura od 31 °C i pritisak od 7,38 MPa, a iznad ovih vrednosti CO₂ prelazi u superkritično stanje (slika 9).

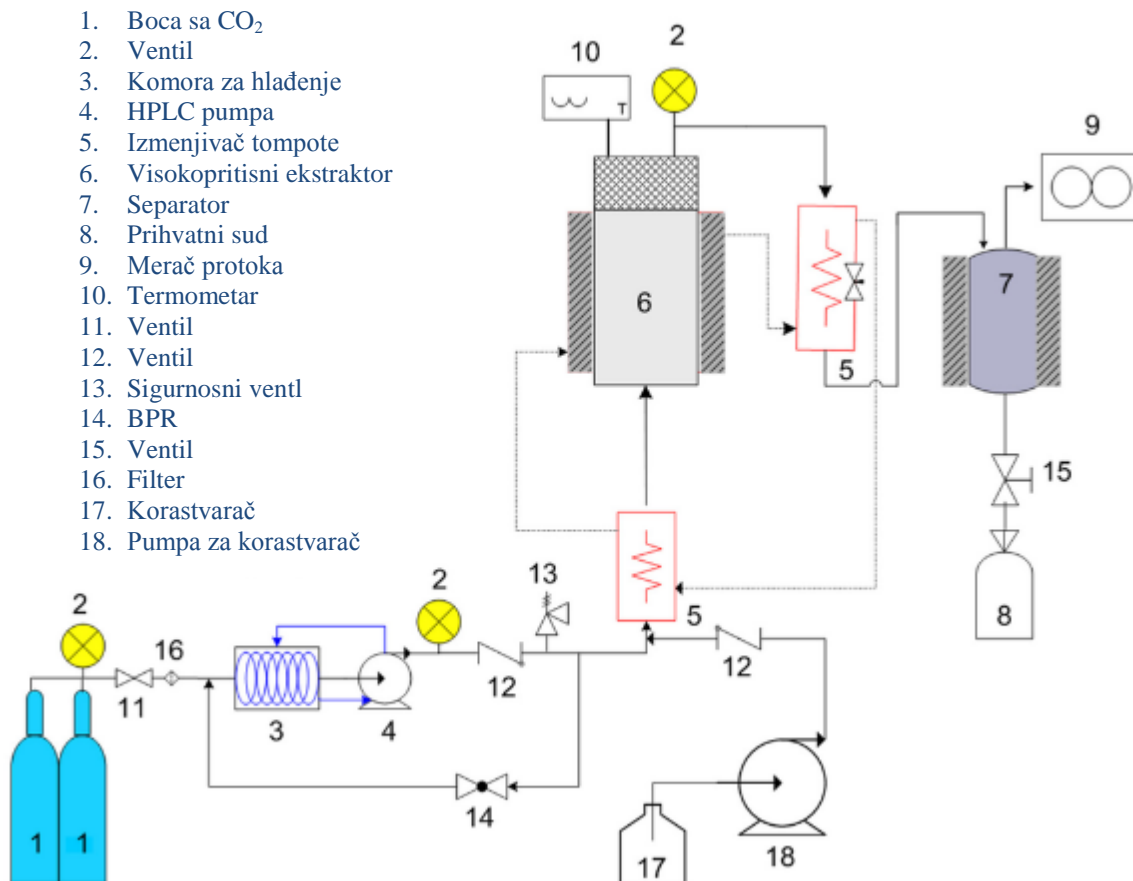


Slika 9 Fazni dijagram CO₂ u zavisnosti od temperature i pritiska (prilagođeno iz Barry i sar., 2006)

Rastvarač kao što je ugljen-dioksid lako se uklanja smanjenjem pritiska, pri čemu se CO₂ vraća u gasovito stanje, a ostaje visokokvalitetan ekstrakt bez zaostalog rastvarača. Takođe, ekstrakcija superkritičnim ugljen-dioksidom se uglavnom izvodi na niskim temperaturama, što je čini odličnom tehnikom kada se žele ekstrahovati termolabilna jedinjenja (Knez i sar., 2014; Pavlić i sar., 2015). CO₂ predstavlja dobar ekstragens za nepolarna jedinjenja. Često se koristi za ekstrakciju etarskih ulja, isparljivih komponenti, lipida (Cavero i sar., 2005; Larkeche i sar., 2015; Pourmortazavi i Hajimirsadeghi, 2007; Sahena i sar., 2009). Superkritična CO₂ ekstrakcija je korišćena za izolovanje sumpornih jedinjenja iz lukova, uglavnom samo iz belog i crnog luka (Calvey i sar., 1997; del Valle i sar., 2008; Rybak i sar., 2004). Glavno ograničenje SC-CO₂ je mali afinitet prema polarnim jedinjenjima, te se zbog toga koriste polarni modifikatori ili korastvarači, koji se u određenom udelu dodaju ugljen-dioksidu u procesu SC-CO₂ i utiču na polarnost rastvarača (Herrero i sar., 2010).

Proces superkritične CO₂ ekstrakcije je ilustrovan na slici 10. Uređaj se sastoji iz boce sa CO₂ i rezervoarom za korastvarač koji se pumpom (2) dovodi u kontakt sa ugljen-dioksidom i

zajedno se u kompresoru (1) komprimiraju na radni pritisak, koji se podešava sistemom ventila. Tokom ekstrakcije, rastvarač protiče kroz sloj biljnog materijala i rastvara rastvorljiva jedinjenja. Smeša rastvarača se odvaja u separatorima 1 i 2 menjanjem pritiska i temperature, najčešće brzim smanjenjem pritiska. Rastvarač se hladi, komprimuje i ponovo vraća u ekstrakcioni sistem. Kod savremenih sistema za superkritičnu ekstrakciju regulacija procesnih parametara (temperatura, pritisak i protok) se obično vrši softverski pomoću računara. U laboratorijskim uslovima se uglavnom koriste jednostavnije konfiguracije.



Slika 10 Shematski prikaz laboratorijskog postrojenja za superkritičnu ekstrakciju pomoću CO₂ (prilagođeno iz rada Sivagnanam i sar, 2015)

2.4.4. Enkapsulacija

Stabilnost bioaktivnih jedinjenja iz prirodnog izvora je kritičan parametar za njihovu implementaciju u različite prehrambene ili farmaceutske proizvode. Bioaktivna jedinjenja se često koriste kao sastojci u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji kako bi se obezbedili proizvodi sa funkcionalnim karakteristikama. Za prehrambene proizvode, naročito one funkcionalne, od presudnog značaja je očuvanje stabilnosti prisutnih bioaktivnih jedinjenja tokom procesa proizvodnje i skladištenja (Nedović, 2011). Pored toga, nakon konzumiranja biološke komponente su u organizmu podvrgnute brzom metabolizmu u gastrointestinalnom traktu i metabolizmu prvog prolaza, što dovodi do transformacije hemijske strukture i promene bioaktivnosti. Stoga je potrebno obezbediti stabilnost bioaktivnih komponenti u gastrointestinalnom traktu i omogućiti njihovo kontrolisano i ciljano oslobađanje. Pravovremeno i ciljano otpuštanje poboljšava efikasnost dodataka bioaktivnih komponenti hrane i osigurava njihovo optimalno doziranje (Đorđević i sar., 2015).

Enkapsulacija predstavlja moćnu tehniku koja omogućava da se prevaziđu ove poteškoće. Enkapsulacija se može definisati kao proces stvaranja zaštitnog omotača oko aktivne komponente koja se enkapsulira, pri čemu se sprečavaju neželjene hemijske interakcije enkapsulirane komponente sa nekim drugim jedinjenjima. Enkapsulirana komponenta se štiti od uticaja okruženja (temperatura, pH, enzimi i kiseonik) i omogućava se kontrolisano oslobađanje aktivne komponente pod određenim uslovima (Dias i sar., 2017). Enkapsulacija održava stabilnost enkapsuliranih komponenti, poboljšava njihovu bioraspoloživost, a poželjna je i za prekrivanje neprijatnog ukusa ili mirisa (Kanekanian, 2012). Enkapsulacijom se takođe smanjuje isparavanje i degradacija isparljivih komponenti. Enkapsulirati se mogu sva tri agregatna stanja. Ovo omogućava lakše rukovanje aktivnom komponentom, prevođenjem iz tečnog stanja (npr. ekstrakti bilja) u čvrsto stanje–prah (Nedović i sar., 2011). Ovako enkapsulirani sistemi igraju važnu ulogu u različitim oblastima, kao što su biotehnologija, medicina, poljoprivreda, hemijska, farmaceutska i prehrambena industrija (Zuidam i Nedović, 2010).

Za enkapsulaciju bioaktivnih komponenti mogu se koristiti različite tehnike enkapsulacije. Izbor najpogodnije tehnike enkapsulacije u suštini zavisi od vrste matriksa koji se

enkapsulira i karakteristika finalnog proizvoda u kome se primenjuje dobijeni proizvod. Pored toga, izbor materijala nosača ima veliki uticaj na osobine enkapsuliranih komponenti, a naročito na efikasnost enkapsulacije (Nedović et al., 2011).

Postoji veliki broj enkapsulacionih tehnika koje su našle svoju primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Tehnike enkapsulacije se mogu podeliti na one kod kojih se čestica formira usled delovanja fizičko-mehaničkih efekata (raspršivanjem, topljenjem, zamrzavanjem) i na tehnike kod kojih se čestica formira pod dejstvom fizičko-hemijskog tretmana (jonotropsko geliranje, polimerizacija, koacervacija i sl.). Međutim, nijedna od tehnika enkapsulacije se ne može smatrati univerzalnom za bioaktivne komponente zbog karakteristične molekularne strukture različitih bioaktivnih komponenti (Ray i sar., 2016). Ovaj razlog uslovio je da se detaljnije opišu neke od tehnika enkapsulacije, tj. one korišćene u okviru ove disertacije.

2.4.4.1. *Spray drying*

Spray drying tehnika (sušenje pomoću raspršivanja) se često koristi za sušenje prehrambenih proizvoda, farmaceutskih proizvoda i proizvoda koje su osetljivi na visoku temperaturu. Često se koristi za enkapsulaciju biljnih ekstrakata, etarskih ulja i različitih biološki aktivnih jedinjenja (Dias i sar., 2017). Zbog relativno niskih troškova, a visokog kvaliteta i stabilnosti dobijenog proizvoda, kao i mogućnosti standardizacije kvaliteta i osobina dobijenog proizvoda u pogledu sadržaja aktivnih komponenti, sadržaja vlage, nasipne mase, veličine čestica i drugih fizičko-hemijskih svojstava praha, *spray drying* predstavlja tehnologiju koja je zastupljena u više industrijskih grana uključujući prehrambenu, farmaceutsku, biotehnošku i hemijsku industriju (Ray i sar., 2016; Sosnik i Seremeta, 2015).

Spray drying tehnika se često koristi za dobijanje čvrstih formi biljnih ekstrakata, prvenstveno zbog pogodnosti sušenja termolabilnih komponenti koje mogu biti prisutne u tečnom ekstraktu. Osnovni princip mikrokapsulacije *spray drying* tehnikom se zasniva na rastvaranju ili dispergovanju matriksa koji se želi enkapsulirati u rastvoru nosača, koji se potom raspršuje u struji toplog vazduha. Na ovaj način se rastvarač brzo odstrani, a matriks koji se

enkapsulira je vrlo kratko izložen povišenoj temperaturi. Sam proces *spray drying*-a (shematski prikaz procesa je dat na slici 11) sastoji se od 4 glavne faze (Sosnik i Seremeta, 2015):

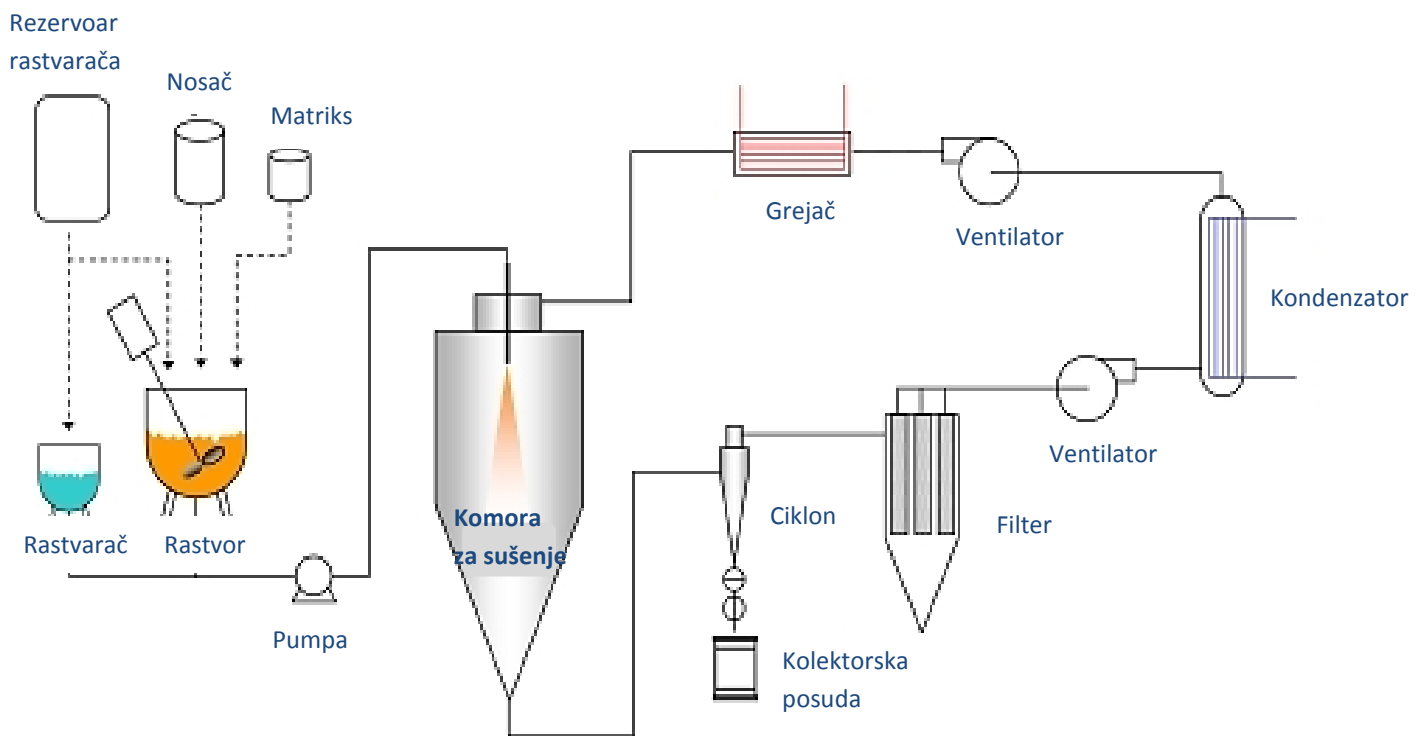
- Raspršivanje napojne smeše u kapljice
- Kontakt raspršenih kapljica i medijuma za sušenje
- Formiranje čvrstih osušenih čestica
- Odvajanje dobijenog suvog ekstrakta

Tokom prve faze bitno je da dođe do formiranja finih kapljica jednakih veličina kako bi transfer toplote prilikom sušenja bio ujednačen. U zavisnosti od koncentracije i viskoziteta napojne smeše, napojna masa se raspršuje kroz odgovarajući atomizer, kroz mlaznice pomoću komprimovanog gasa ili pomoću rotirajućeg diska pri velikim brzinama, čime se omogućuje ravnomerno raspršivanje napojne smeše. Ujednačenost raspršenih kapljica omogućava sušenje u veoma kratkom vremenu, bez narušavanja materijala koji se suši. Ova faza je jako bitna jer od načina raspršivanja zavise oblik, struktura, veličina i raspodela veličina čestica gotovog proizvoda (Gharsallaoui i sar., 2007; Sosnik i Seremeta, 2015). Tokom druge faze dolazi do mešanja raspršenih kapljica napojne smeše sa strujom vrelog vazduha u komori *spray dryera*. Temperatura vazduha je bitan parametar tokom sušenja, jer od vlažnosti i temperature vazduha zavisi efikasnost procesa sušenja (Mishra i sar., 2014). Kontakt između raspršenih kapljica i vrelog vazduha zavisi od konstrukcije samog uređaja, pa u zavisnosti od toga, najčešće po konstrukciji samog uređaja postoji istostrujno ili protivstrujno sušenje. Kod istostrujnog režima sušenja krajnji proizvod je u kontaktu sa najhladnijim vazduhom, pa je poželjan za sušenje materijala osjetljivih na toplotu. Kod protivstrujnog sušenja, suvi proizvod je u kontaktu sa najtoplijim vazduhom i zbog toga se ne preporučuje za sušenje termolabilnih materijala, ali je poželjno u smislu veće termičke efikasnosti, odnosno efikasnijeg iskorišćenja toplotne energije (Medina-Torres et al., 2013; Sosnik i Seremeta, 2015). Nakon formiranja suvih čestica, dobijeni suvi ekstrakt se od gasa odvaja u ciklonu. Separacija čestica zavisi od gustine čestica, veličine i njihove brzine taloženja unutar ciklona (Sosnik i Seremeta, 2015).

Primenom *spray drying* tehnike najčešće se dobijaju čestice sfernog oblika, a veličina čestica varira od 10 do 100 μm . Na veličinu dobijenih čestica suvog ekstrakta utiče vrsta mlaznica, viskozitet napojne smeše i brzina raspršivanja. Kontrolisanjem temperature ulaznog

vazduha (najčešće u opsegu 120–220 °C) i temperature na izlazu (50–80 °C), brzine protoka napojne smeše i brzine raspršivanja obezbeđuje se dobijanje suvih ekstrakta visokog kvaliteta i dobrih fizičko-hemijskih osobina (Dobry i sar., 2009; Đorđević i sar., 2015; Zuidam i Shimoni, 2010).

Prilikom sušenja *spray drying* tehnikom može doći do poteškoća kada je u pitanju sušenje biljnih ekstrakta ili sokova sa visokim sadržajem šećera (Goula i Adamopoulos, 2010). Naime, usled niske temperature prelaska u staklasto stanje (eng. *glass transition temperature*, T_g) komponenti kao što su šećeri i organske kiseline prisutnih u matriksu, može doći do problema sa lepljivošću. Da bi se ovaj problem rešio i da bi se dobio proizvod sa željenim fizičko-hemijskim karakteristikama, koriste se nosači (kao sredstva za sušenje) sa visokom temperaturom prelaska u staklasto stanje. Prilikom *spray drying* procesa, kao nosači se najčešće koriste guma arabika, maltodekstrin i modifikovani skrobovi. Takođe se često koriste proteini, hidrokoloidi i različiti hidrolizovani skrobovi. Dodatak maltodekstrina rezultira smanjenjem lepljivosti do koje može doći prilikom sušenja, i na taj način poboljšava efikasnost sušenja (Wang i Langrish, 2009).



Slika 11 Shema uređaja za *spray drying* (prilagođeno iz rada Dobry i sar., 2009)

Mešanjem maltodekstrina (60%) sa guma arabikom (40%) postignuta je bolja stabilnost proizvoda i pogledu sadržaja antocijana i procijanida (Robert i sar., 2010). Korišćenje smeše maltodekstrina, skroba i silike kao nosača pokazalo se efikasnim u smanjenju degradacije enkapsuliranih polifenolnih jedinjenja i očuvanju antioksidativne aktivnosti (Krishnaiah i sar., 2004).

2.4.5.2. *Spray congealing*

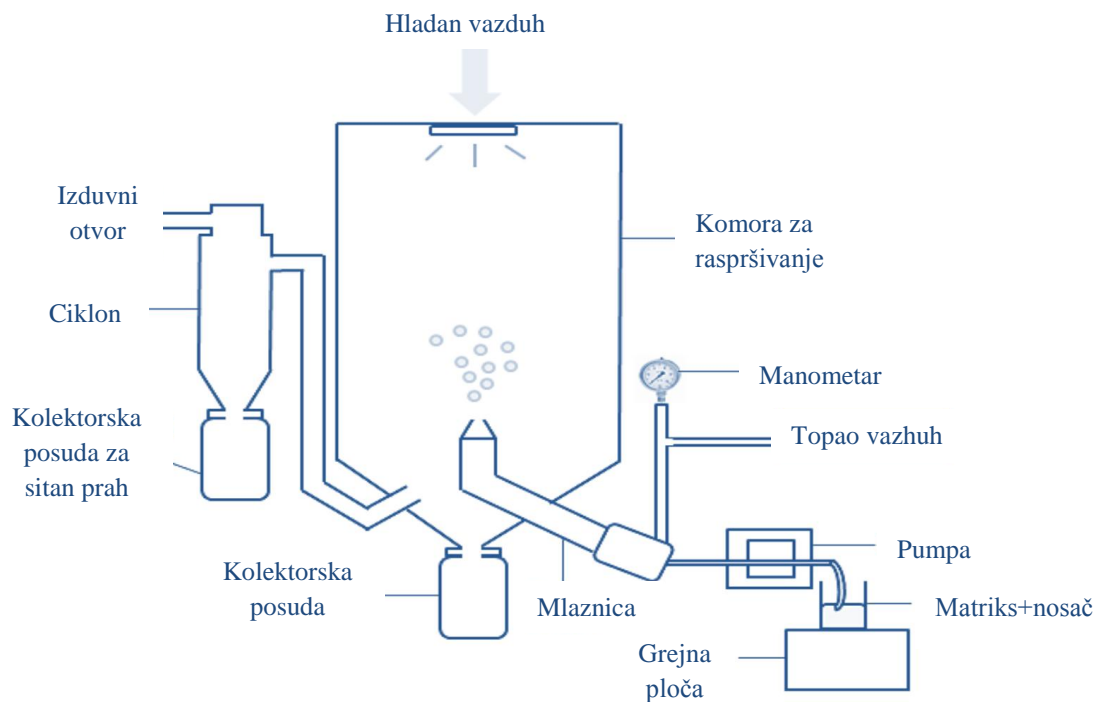
Spray congealing nalazi sve veću primenu poslednjih godina jer ne zahteva upotrebu vodenih ili organskih rastvarača, što ovu metodu čini ekološki prihvatljivom i manje vremenski i energetski zahtevnom u poređenju sa drugim tehnikama, kao što je na primer *spray drying*. Za razliku od *spray drying*-a, *spray congealing* se zasniva na atomizaciji smeše matriksa koji se želi enkapsulirati u otopljenom lipidnom nosaču u komori sa temperaturom ispod tačke topljenja nosača (Alvim i sar., 2016; Martins i sar., 2012). Kao tehnika mikrokapsulacije, *spray congealing* je pogodna tehnika za dobijanje mikročestica sa ciljanim delovanjem. S obzirom na to da se čestice dobijene *spray congealing* tehnikom sastoje od matriksa koji se nalazi unutar nosača, mogu se koristiti za poboljšanje stabilnosti, prikrivanje neprijatnog ukusa i smanjenje gastrointestinalne iritacije prouzrokovane lekovima (Albertini i sar., 2008a; Almeida i sar., 2012; Passerini i sar., 2003; Sachan i sar., 2006).

Spray congealing obično podrazumeva primenu jestivih lipida sa različitim tačkama topljenja kao nosačem aktivnih komponenti koje su tipično hidrofilne. Primena lipida kao nosača omogućava oslobađanje enkapsulirane komponente nakon varenja, kada dolazi do njegovog oslobađanja nakon razgradnje lipida iz mikročestica u crevima. Na taj način se postiže bolja bioraspoloživost enkapsulirane komponente. Brzina otpuštanja aktivne komponente iz mikročestice se može podesiti odabirom odgovarajućeg nosača ili dodatkom aditiva. Korišćenjem lipofilnih nosača, kao što su karnauba vosak, tristearin, gliceril behenat, hidrogenovano biljno ulje, stearinska kiselina i mikrokristalni vosak, dobijaju se mikročestice sa sporijim otpuštanjem aktivnih komponenti (Almeida i sar., 2012; Ribeiro i sar., 2012; Passerini i sar., 2016; Wong i sar., 2015). Sa druge strane, hidrofilni materijali, kao što su polietilen glikoli viših molekulskih masa, poloksameri i geluciri, koriste se kao nosači za bolju rastvorljivost u

vodenoj sredini. Stoga se *spray congealing* metoda odabira kada se želi poboljšati rastvorljivost i brzina rastvaranja aktivnih komponenti slabo rastvorljivih u vodi (Ilić i sar., 2009; Passerini i sar., 2012; Passerini i sar., 2002a).

Korišćenjem *spray congealing* tehnike enkapsulacije dobija se proizvod koji odlikuje pravilan oblik dobijenih mikročestica, ujednačene veličine, dobre protočnosti, koji se može koristiti kao gotov proizvod ili za dalje procese, kao što su tabletiranje i punjenje kapsula. Specifične morfološke osobine, kao što su veličina i raspodela čestica, kao i oslobađanje matriksa i nosača najviše zavise od procesnih parametara, kao što su temperatura gasa prilikom raspršivanja, pritisak prilikom raspršivanja, tip mlaznice i protok napojne smeše (Albertini i sar., 2009; Duarte i sar., 2016).

Aparatura za *spray congealing* (slika 12) je slična aparaturi za *spray drying*, ali ovde nema rastvarača koji isparava prilikom procesa. Prilikom *spray congealing* procesa nosač se zagreva do temperature od oko 10 do 20° C iznad njegove tačke topljenja. Matriks, odnosno aktivna komponenta se disperguje, emulguje ili rastvara u otopljenom nosaču i tako dobijena napojna smeša se doprema peristaltičkom pumpom u zagrejanu mlaznicu i raspršuje u komoru koja je najčešće na sobnoj temperaturi, gde dolazi do očvršćavanja i formiranja čestica usled kontakta sa hladnim vazduhom. Formirane čestice se skupljaju u kolektorsku posudu, a jako sitne čestice skupljaju se u posebnom ciklonu. Ceo proces je vrlo brz, odnosno mikročestice se dobijaju u roku od nekoliko sekundi nakon raspršivanja (Oriani i sar., 2016; Zuidam i Shimoni, 2010).



Slika 12 Shematski prikaz spray congeling procesa (prilagodeno iz rada Duarte i sar., 2016)

3. Materijal i metode

Eksperimentalni deo istraživanja u okviru ove doktorske disertacije je urađen u laboratoriji za farmaceutsko inženjerstvo Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, laboratorijama Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu i laboratorijama Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, kao i u laboratoriji za farmaceutsku hemiju i tehnologiju Univerziteta u Bolonji u Italiji.

U okviru ove doktorske disertacije su primenjeni i analizirani različiti tehnološki procesi u cilju očuvanja senzornih svojstava i bioaktivnih jedinjenja sremuša u cilju proizvodnje novih, visokokvalitetnih poluproizvoda i proizvoda. U cilju dobijanja optimalnih parametara procesa skladištenja, sušenja, načina ekstrakcije i enkapsulacije dobijenih ekstrakata primenjene su metode optimizacije jedan po jedan faktor (one-factor-at-a-time) ili optimizacija pomoću metode odzivne površine (*Response surface methodology, RSM*).

3.1. Specifične hemikalije i reagensi

U ovoj doktorskoj disertaciji korišćene su sledeće hemikalije:

Folin-Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka), (±)-katehin (Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka), 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil-hidrat (DPPH·) (Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijumova so (ABTS) (Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka), Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilnakiselina) (Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka), 5,5-ditio-bis (2-nitrobenzoic acid) Elmanov reagens (DTNB) (Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka), Hapes pufer-natrijumova so (Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka), (±)-catechin (Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka), galna kiselina (Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka), dialil trisulfid (Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka), dialil disulfid (Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka), alil sulfid (Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka), trihlorsirćetna kiselina, askorbinska kiselina (Lach-Ner, Češka), kalijum dihidrogen fosfat (Lach-

Ner, Češka), alicin (ChromaDex, Inc., SAD), *S*-metil ester metantiosulfonske (MMTS₂) (abcr, Nemačka), ugljen-dioksid (>99,98% čistoće) (Messer, Srbija).

3.2. Biljni materijal

Biljni materijal korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji je list sreмуša u svežem stanju i list sremuša u suvom stanju. Svež list sremuša sakupljen je tokom 2016. i 2017. godine na teritoriji Fruške Gore. Za potrebe istraživanja, suvi list sremuša je doniran od proizvođača čajeva Fructus, Baška Palanka (Srbija). Suvi list sremuša je korišćen u eksperimentima koji su se bavili ispitivanjem ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja je osušen prirodno na suncu.

U suvom listu sremuša određen je sadržaj vlage standardnom metodom, sušenjem uzorka na temperaturi od 105 °C do konstantne mase (*Ph. Eur. 9*), a rezultat je izražen u procentima (%).

Srednji prečnik usitnjenog biljnog materijala određen je prosejavanjem kroz set sita različitih veličina otvora (Scientific Instruments s.r.l., Italija i Erweka, Nemačka) na vibracionoj tresilici (Octagon Digital, Endecotts, Velika Britanija). Nakon merenja mase frakcija zaostalih na situ i mase koja je prošla kroz sito, izračunat je srednji prečnik čestica po sledećoj jednačini:

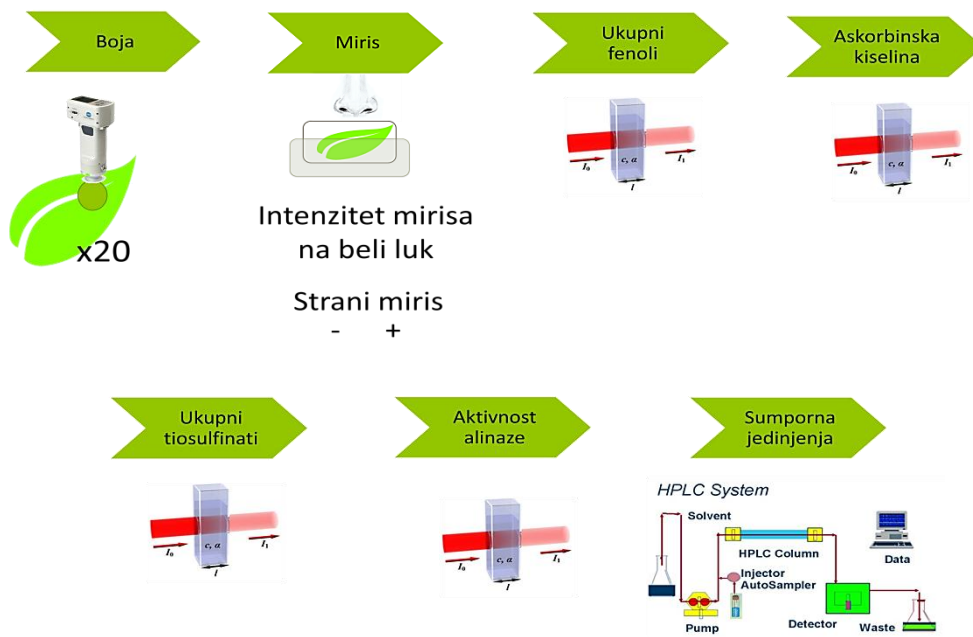
$$\frac{100}{d} = \sum \frac{m_i}{d_i} \quad (1)$$

gde je m_i maseni udeo frakcije i , a d_i srednji prečnik frakcije i . Merenja su izvršena u dva ponavljanja.

3.3. Skladištenje svežeg lista sremuša

U cilju sagledavanja uticaja uslova skladištenja na održivost lista sremuša sa aspekta prihvatljivosti za konzumiranje u svežem stanju, kao i sagledavanja promena u sastavu lista tokom skladištenja u zavisnosti od uslova skladištenja, svež list sremuša je skladišten uz primenu različitih uslova pripreme za skladištenje i temperatura skladištenja. Za analizu uticaja uslova skladištenja na karakteristike lista sremuša, korišćeni su samo zdravi i neoštećeni listovi. Donji delovi stabljike su odsečeni (1–2 cm) u cilju očuvanja vodenog režima. Listovi su skladišteni na dva različita načina, vezani u snopiće i uronjeni u vodu, tri različite temperature (4, 11 i 18 °C), uz održavanje relativne vlažnosti vazduha na nivou 90–95% u rashladnim komorama sa mogućnošću regulacije vlažnosti (Frigožika, Ruma, Srbija). Snopići su formirani od po 20 listova, donji deo snopića (2–3 cm) zatim je stavljen u sud sa česmenskom vodom. Za analizu uticaja pakovanja u modifikovanoj atmosferi po 20 listova je stavljeno u plastičnu posudu i upakovano u visokobarijernu sedmoslojnu foliju (180 x 400 x 0,15 mm) pri niskom vakuumu od 40% vakuumskom pakericom sa opcijom modifikovane atmosfere (Henkelman boxer 42, Henkelman, Holandija).

Na ovako pripremljenim uzorcima urađena je senzorna analiza (prisustvo i jačina mirisa na sremuš i prisustvo stranog mirisa, svežina listova sremuša, prisustvo žute boje), fizička analiza (instrumentalno merenje boje), hemijske analize (ukupni fenoli, hlorofil i karotenoidi, sadržaj askorbinske kiseline, aktivnost alinaze, sadržaj sumpornih jedinjenja) nakon 3, 6 i 15 dana skladištenja (slika 13). Opis metoda koje su primenjene za ispitivanje senzornih, fizičkih i hemijskih karakteristika skladištenog lista sremuša dat je u daljem tekstu u poglavlju br 3.8. 3.9.



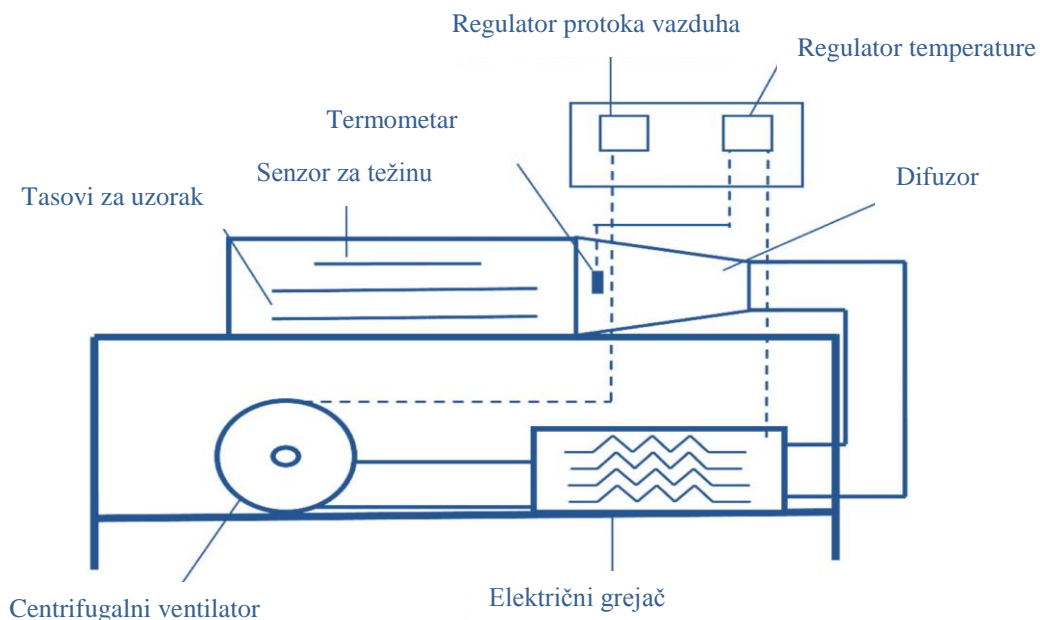
Slika 13 Shematski prikaz analiza lista sremuša nakon skladištenja

3.4. Sušenje lista sremuša

Sveže sakupljeni listovi sremuša sušni su primenom dve različite tehnike sušenja: konvektivnim sušenjem i vakuumskim sušenjem. Pored toga listovi svežeg sremuša osušeni su i primenom liofilizacije. Nakon sušenja urađene su fizičke analize (sadržaj vlage, instrumentalno merenje boje) i hemijske analiza (sadržaj ukupnih fenola, tiosulfinata i DPPH test).

3.4.1. Konvektivno sušenje lista sremuša

Ispitivanje uticaja temperature konvektivnog procesa sušenja je sprovedeno primenom eksperimentalne laboratorijske sušnice (projektovan na Poljoprivrednom fakultetu, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija) shematski prikazane na slici 14 (Pavkov, 2012). List sremuša je sušen na temperaturama 40, 50, 60 i 70 °C, koje su podešene i kontrolisane pomoću kontrolne jedinice koja se nalazi odvojena od komore za sušenje. Električni grejač (6,4 kW) je korišćen za postizanje zadate temperature koja je kontrolisana temperaturnim sensorima unutar komore. Listovi sremuša su uniformno složeni u tankom sloju na perforirane ploče (440 × 290 mm). Masa lista sremuša je bila konstanta nezavisno od temperature sušenja i iznosila je 300 g. Brzina

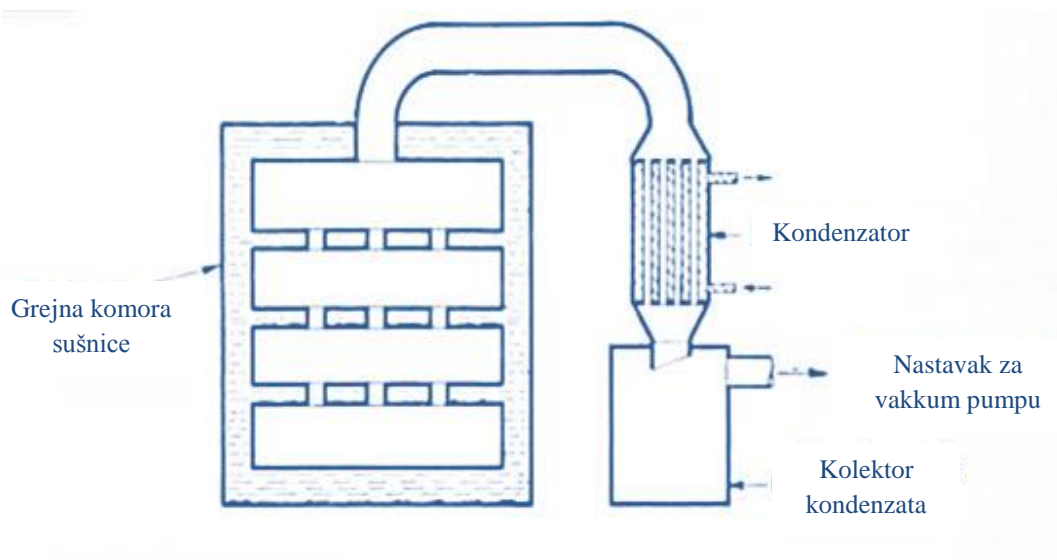


Slika 14 Shematski prikaz konvektivne sušnice (prilagođeno iz Pavkov, 2012)

strujanja toplog vazduha (1 m/s) i pritisak (atmosferski) su bili konstantni tokom celog procesa sušenja. Biljni materijal je sušen do konstantne mase. Nakon sušenja, osušeni listovi sremuša su spakovani u polietilenske kesice sa zatvaračem i čuvani na suvom i tamnom mestu na sobnoj temperaturi do momenta analize.

3.4.2. Vakuumsko sušenje lista sremuša

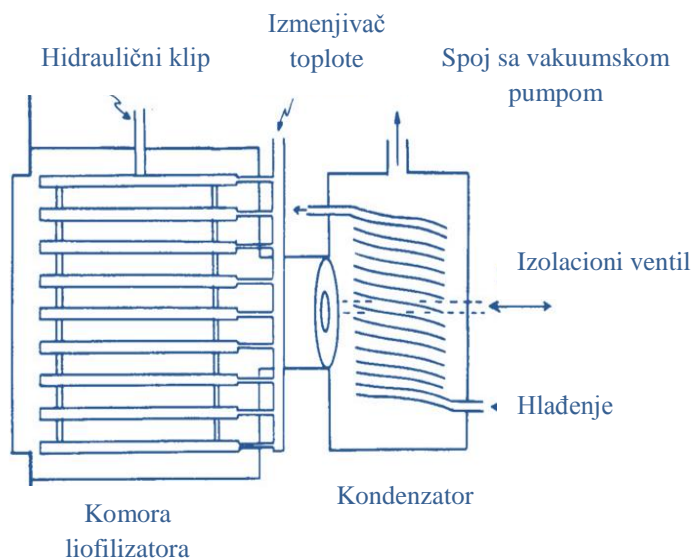
List sremuša sušen je u vakuumskoj sušnici (VC 115, Binder, Nemačka) na temperaturama 40, 50, 60 i 70 ° C. Shematski prikaz sušnice dat je na slici 15. Nivo vakuuma unutar komore bio je podešen na maksimalan nivo, koji se postiže unutar vakuumske komore i održavan je na 0 (+ 1) kPa. Sušnica je pre uključivanja vakuumske pumpe prethodno zagrejana do radne temperature, kako bi se postigao željeni pritisak u komori. Polazna masa uzorka bila je konstantna za sve primenjene temperature sušenja i iznosila je 300 g. Listovi sremuša su uniformno složeni u tankom sloju na ploče unutar komore i sušeni do konstantne mase. Nakon sušenja osušeni listovi sremuša su spakovani u polietilenske kese sa zatvaračem i čuvani na suvom i tamnom mestu na sobnoj temperaturi do momenta analize.



Slika 15 Shematski prikaz vakuumske sušnice (prilagodeno www.slideshare.net)

3.4.3. Liofilizacija lista sremuša

Svež list sremuša osušen je u liofilizatoru (Christ, Nemačka), shematski prikazanom na slici 16. Najvažnije tehničke karakteristike liofilizatora u kome je sušen list sremuša su sledeće: opseg radne temperature (-40 do 40 °C), osetljivost senzora ($\pm 0,3$ °C), maksimalno opterećenje vage (500 g) i njena rezolucija (0,1 g), te opseg radnog pritiska (0,01–1000 mbar). Uzorak je osušen na -30 °C i na pritisku od 0,01 mbar. Biljni materijal je ravnomerno raspoređen u tankom sloju, a masa uzorka u ovom eksperimentu je iznosila 200 g. Pritisak je bio konstantan tokom procesa sušenja. Parametri, kao što su jačina vakuuma, temperatura, vreme sušenja i masa uzorka, podešeni su i kontrolisani pomoću kontrolne jedinice liofilizatora.



Slika 16 Shematski prikaz liofilizatora (prilagodeno iz www.slideshere.net)

3.5. Ekstrakcija lista sremuša

Nekoliko različitih tehnika ekstrakcije (konvencionalna ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija subkritičnom vodom i ekstrakcija superkritičnim ugljen-dioksidom) primenjeno je za analizu ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz lista sremuša. Detaljan opis primenjenih tehnika ekstrakcije dat je u daljem tekstu. Za analizu procesa ekstrakcije primenjen je suv i usitnjen list sremuša dobijen od proizvođača čajeva Fructus d.o.o. Nakon ekstrakcije urađena je hemijska analiza dobijenih ekstrakata (sadržaj fenolnih jedinjenja, flavonoida i sumpornih jedinjenja) kao i analiza biološke aktivnosti ekstrakata (antioksidativna i antibakterijska aktivnost) a opis ovih metoda dat je u poglavlju 3.8 i 3.9.

3.5.1. Konvencionalna čvrsto-tečna ekstrakcija lista sremuša

Ekstrakti suvog lista sremuša pripremljeni su konvencionalnim postupkom ekstrakcije—maceracijom u trajanju od 24 h. Ekstrakcija se odvijala na sobnoj temperaturi uz konstantno mešanje. Odnos droge i rastvarača je bio konstantan (1:5, m/v). Kao rastvarači su primenjeni: voda, 30%, 50%, 70% i 90% etanol.

3.5.2. Ultrazvučna ekstrakcija lista sremuša, dizajn i statistička analiza eksperimenta

Za ultrazvučnu ekstrakciju lista sremuša korišćeno je ultrazvučno kupatilo (EUP540A, Euinstruments, Francuska, slika 17) sa konstantnom frekvencijom od 40 Hz. Ekstrakcije su rađene u erlenmajeru zapremine 100 ml, koji je u svakom eksperimentu bio postavljen na istom rastojanju od ultrazvučne sonde. Refluksni hladnjak je postavljen na erlenmajer da bi se sprečilo isparavanje rastvarača i da bi se održao konstantan odnos droge i rastvarača (1:5, m/v). Ispitivani parametri, uključujući snagu ultrazvuka (19,2, 28,8 i 38,4 W/l), temperaturu (40, 60 i 80 °C) i vreme ekstrakcije (40, 60 i 80 min) podešeni su i kontrolisani pomoću kontrolne table

ultrazvučnog kupatila. Nakon ekstrakcije, ekstrakti su profiltrirani kroz filter papir (4–12 μm , Schleicher and Schuell, Nemačka) primenom vakuum pumpe (V-700, Büchi, Švajcarska), sakupljeni u staklene bočice i čuvani na 4 °C do analize.

Uticaj ekstrakcionih parametara ultrazvučne ekstrakcije (koncentracija etanola, temperatura, vreme ekstrakcije i snage ultrazvuka) na izolovanje bioaktivnih jedinjenja (ukupnih fenola, ukupnih flavonoida) i antioksidativnu aktivnost ispitan je primenom metode odzivne površine (RSM) i centralno-kompozitnog (*central composite, face centered*) dizajna. Ovaj dizajn se sastojao od 29 različitih eksperimenata sa 5 ponavljanja u centralnoj tački (tabela 2).



Slika 17 Ekstrakcija pomoću ultrazvučnog kupatila

Ispitivane vrednosti parametara ekstrakcije (temperature, koncentracija etanola vreme ekstrakcije, vreme ekstrakcije i snaga ultrazvuka) u zavisnosti i njihove kodirane vrednosti su prikazane u tabeli 2, dok je celokupni dizajn eksperimenta, kodirane i stvarne vrednosti ultrazvučne ekstrakcije prikazan u tabeli 3.

Tabela 2 Eksperimentalni dizajn ultrazvučne ekstrakcije sa realnim i kodiranim vrednostima ispitivanih parametara

Ispitivani parametri	Kodirane i stvarne vrednosti		
	-1	0	1
Temperatura ekstrakcije, X_1 (°C)	40	60	80
Koncentracija etanola, X_2 (%)	30	50	70
Vreme ekstrakcije, X_3 (min)	40	60	80
Snaga ultrazvuka, X_4 (W/l)	19,2	28,8	38,4

Tabela 3 Eksperimentalni dizajn ultrazvučne ekstrakcije sa realnim i kodiranim vrednostima ispitivanih parametara za svaku pojedinačnu ekstrakciju

Redni broj	Nezavisne promenljive			
	Temperatura (°C)	Koncentracija etanola (%)	Vreme ekstrakcije (min)	Snaga ultrazvuka (W/l)
1	0 (60)	0 (50)	0 (60)	0 (28,8)
2	0 (60)	0 (50)	1 (80)	-1(19,2)
3	1 (80)	0 (50)	1 (80)	0 (28,8)
4	-1 (40)	0 (50)	1 (80)	0 (28,8)
5	0 (60)	1 (70)	0 (60)	-1(19,2)
6	1 (80)	-1 (30)	0 (60)	0 (28,8)
7	0 (60)	0 (50)	0 (60)	0 (28,8)
8	0 (60)	-1 (30)	0 (60)	1 (38,4)
9	0 (60)	0 (50)	0 (60)	0 (28,8)
10	1 (80)	1 (70)	0 (60)	0 (28,8)
11	0 (60)	-1 (30)	-1 (40)	0 (28,8)
12	1 (80)	0 (50)	0 (60)	1 (38,4)
13	0 (60)	0 (50)	0 (60)	0 (28,8)
14	-1 (40)	-1 (30)	0 (60)	0 (28,8)
15	0 (60)	-1 (30)	1 (80)	0 (28,8)
16	0 (60)	1 (70)	0 (60)	1 (38,4)
17	0 (60)	0 (50)	-1 (40)	1 (38,4)
18	-1 (40)	0 (50)	0 (60)	-1(19,2)
19	0 (60)	-1 (30)	0 (60)	-1(19,2)
20	1 (80)	0 (50)	0 (60)	-1(19,2)
21	0 (60)	0 (50)	1 (80)	1 (38,4)
22	1 (80)	0 (50)	-1 (40)	0 (28,8)
23	0 (60)	1 (70)	-1 (40)	0 (28,8)
24	0 (60)	1 (70)	1 (80)	0 (28,8)
25	0 (60)	0 (50)	-1 (40)	-1(19,2)
26	-1 (40)	0 (50)	0 (60)	1 (38,4)
27	-1 (40)	1 (70)	0 (60)	0 (28,8)
28	-1 (40)	0 (50)	-1 (40)	0 (28,8)
29	0 (60)	0 (50)	0 (60)	0 (28,8)

Dizajn eksperimenta ultrazvučne ekstrakcije i analiza višestruke linearne regresije su urađeni pomoću softvera Design-Expert v.10 Trial (Stat-Ease, Minneapolis, USA). Rezultati su statistički testirani analizom varijanse (ANOVA) sa nivoom značajnosti od 0,05. Adekvatnost modela je ispitana pomoću koeficijenta determinacije (R^2), koeficijenta varijacije (CV), p -vrednosti za modele i nedostatka prilagođavanja (*lack of fit*).

Optimalni uslovi ekstrakcije su određeni primenom željene funkcije, D (*desirability function*). Za potvrdu numeričke optimizacije predviđenih vrednosti odziva izvršena je validacija analizom ekstrakta pripremljenog na optimalnim vrednostima ekstrakcionih parametara. Dobijene vrednosti odziva su poređene sa predviđenim vrednostima uz primenu 95% interval poverenja.

3.5.3. Ekstrakcije vodom u subkritičnom stanju

Ekstrakcija subkritičnom vodom je rađena u diskontinualnom ekstraktoru pod visokim pritiskom (Parr Instrument Company, SAD, slika 18), zapremine 450 ml, sa maksimalnim radnim pritiskom od 200 bar i temperaturom 350 °C, povezanim sa regulatorom temperature. Za postizanje radnog pritiska korišćen je azot, dok je temperatura ekstraktora održavana pomoću toplotnog omotača, a merena i kontrolisana preko kontrolne table, povezane sa temperaturnom sondom u ekstraktoru. Pre svakog eksperimenta ekstrakciona ćelija je zagrevana određeno vreme u zavisnosti od željene temperature. Vreme potrebno za postizanje željene temperature ekstrakcije (120, 160 i 200 °C) iznosilo je 20, 25 i 30 minuta, respektivno. Da bi se sprečilo lokalno pregrevanje na zidovima ekstraktora korišćena je magnetna mešalica (1000 rpm). Sve ekstrakcije su



Slika 18 Subkritični ekstraktor

urađene pod izobarskim uslovima na 36 bara. Odnos droga-rastvarač bio je konstantan u svim eksperimentima i iznosio je 1:10 (m/v). Temperatura ekstrakcije (120, 160, 200 °C), vreme ekstrakcije (10, 20, 300 min) i dodatak HCl (0, 0,75, 1,5%) su varirani u zavisnosti od željenih eksperimentalni uslova. Nakon ekstrakcije ekstraktor je hlađen u vodenom kupatilu sa ledom do sobne teperature. Posle hlađenja, ekstrakti su odmah filtrirani kroz filter papir (veličina pora 4–12 µm, Schleicher and Schuell, Nemačka) pomoću vakuum pumpe (V-700, Büchi, Švajcarska) i skladišteni na 4 ° C do daljih analiza.

Uticaj ekstrakcionih parametara, kao što su temperatura, vreme ekstrakcije i dodatak hlorovodonične kiseline, na ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja i biološku aktivnost ekstrakata, odnosno na različite odzive (ukupne fenole, ukupne flavonoide i antioksidativnu aktivnost) analiziran je primenom metode odzivne površine (RSM) i Box-Behnken (BBD) eksperimentalnog dizajna (tabela 4), a celokupan dizajn i uslovi pojedinačnih ekstrakcija prikazan je u tabeli 5.

Dizajn eksperimenta ekstrakcije subkritičnom vodom i analiza višestruke linearne regresije su urađeni primenom softvera Design-Expert v. 9 i v. 10 Trial (Stat-Ease, Minneapolis, Minnesota, USA). Dizajn eksperimenta se sastojao od 15 ekstrakcija, pri čemu su tri ekstrakcije urađene na istim uslovima (centralna tačka) kako bi se analizirale eksperimentalne greške.

Tabela 4 Eksperimentalni dizajn ekstrakcije subkritičnom vodom sa realnim i kodiranim vrednostima ispitivanih parametara

Ispitivani parametri	Kodirane i stvarne vrednosti		
	-1	0	1
Temperatura ekstrakcije, X_1 [°C]	120	160	200
Vreme ekstrakcije, X_2 [min]	10	20	30
Dodatak HCl, X_3 [%]	0,75	1	1,5

Optimalni uslovi ekstrakcije su određeni primenom željene funkcije, D (*desirability function*). Rezultati su statistički testirani analizom varijanse (ANOVA) sa nivoom značajnosti od 0,05. Adekvatnost modela je ispitana pomoću koeficijenta determinacije (R^2), koeficijenta varijacije (CV), p -vrednosti za modele i nedostatak prilagođavanja (*lack of fit*).

Da bi se potvrdile predviđene vrednosti odziva na optimalnim uslovima ekstrakcije, urađena je validacija pripremom ekstrakta na određenim optimalnim uslovima ekstrakcije i eksperimentalno dobijene vrednosti odziva su poređene sa 95% intervalom poverenja za predviđene vrednosti.

Tabela 5 Eksperimentalni ekstrakcije subkritičnom vodom sa realnim i kodiranim vrednostima ispitivanih parametara za svaku pojedinačnu ekstrakciju

Redni broj	Nezavisna promenljiva		
	Temperatura (°C)	Vreme ekstrakcije (min)	Dodatak HCl (%)
1	0 (160)	-1 (10)	1 (1,5)
2	1(120)	0 (20)	-1 (0)
3	0 (160)	-1 (10)	0 (0,75)
4	0 (160)	0 (20)	0 (0,75)
5	0 (160)	0 (20)	0 (0,75)
6	1 (200)	-1 (10)	0 (0,75)
7	1 (200)	1 (30)	0 (0,75)
8	0 (160)	0 (20)	0 (0,75)
9	1 (200)	0 (20)	-1 (0)
10	1 (200)	0 (20)	1 (1,5)
11	0 (160)	1 (30)	-1 (0)
12	0 (160)	- 1 (10)	-1 (0)
13	-1 (120)	0 (20)	1 (1,5)
14	0 (160)	1 (30)	1 (1,5)
15	-1 (120)	1 (30)	0 (0,75)

3.5.4. Ekstrakcija superkričnim ugljen-dioksidom

Superkrična ekstrakcija suvog list sremuša izvršena je na uređaju za visokopritisnu ekstrakciju (HPEP, NOVA – Swiss, Švajcarska, slika 19) primenom ugljen-dioksida kao ekstragenta pri sledećim uslovima ekstrakcije:

- pritisak ugljen-dioksida 150, 200, 250, 300, 350 i 400 bar,
- temperatura 40, 50 i 60 °C,
- ukupno vreme ekstrakcije 5 h
- konstantan protok ugljen-dioksida od 0,194 kg/h.

Radni pritisak ekstrakcije je postignut pomoću kompresora, a održavan pomoću regulacionih ventila. Radne temperature su postignute pomoću izmenjivača toplote i regulisane pomoću ultratermostata. Parametri su tokom procesa praćeni na kontrolnoj tabli uređaja. Vreme ekstrakcije je bilo isto u svim eksperimentima, a prinos ekstrakcije praćen je nakon svakih 30 minuta tokom prvih dva sata ekstrakcije, a zatim merenjem mase dobijenog ekstrakta na svakih sat vremena do ukupno 5 sati ekstrakcije. Separacija dobijenog ekstrakta od ugljen-dioksida je postignuta na pritisku od 15 bar i temperaturi od 24 °C. Ukupni prinos ekstrakcije je izražen kao masa ekstrakta (g) na 100 g droge (% m/m). Nakon ekstrakcije ekstrakti su preneti u staklene bočice i skladišteni u zamrzivaču na temperaturi -18 °C, kako bi se sprečila njihova moguća degradacija.



Slika 19 Ekstraktor za ekstrakciju superkričnim CO₂

3.6. Enkapsulacija

3.6.1. Enkapsulacija primenom *spray drying* tehnike

Za izradu suvog ekstrakta lista sremuša primenjen je tečni ekstrakt suvog lista sremuša dobijen ekstrakcije subkritičnom vodom na optimalnim uslovima (120 °C, 10 min, 0,75% HCl). Dobijeni tečni ekstrakt je sušen *spray drying* tehnikom na poluindustrijskom uređaju Anhydro spray dryer (APV Anhydro AS, Danska).

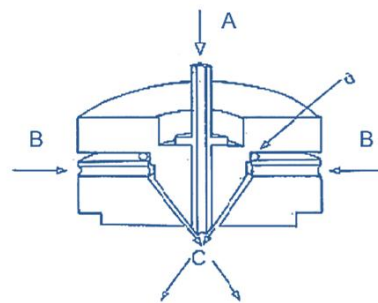
U procesu sušenja kao agens za sušenje i nosač primenjen je maltodekstrin (DE 19,7) u koncentraciji od 0, 10, 40 i 80% u odnosu na suvi ostatak tečnog ekstrakta. Napojna smeša pripremljena je homogenizacijom rastvora maltodekstrina u vodi i tečnog ekstrakta lista sremuša. Prva napojna smeša predstavlja čist tečni ekstrakt lista sremuša. Dok su ostale napojne smeše pripremljene dodatkom maltodekstrina u koncentraciji 10% (u odnosu na suvi ostatak), odnosno 40 i 80% maltodekstrina. Pomoću peristaltičke pumpe (FH100 Series, Thermo Scientific, USA) napojna smeša je dovedena u komoru za sušenje *spray drying* tehnikom uz konstantan protok od 1,36 l/h. Ukupna zapremina napojne smeše za svako pojedinačno sušenje je iznosila 1 l. Brzina atomizera je iznosila 20,000–21,000 o/min. Ulazna temperatura vazduha (T_u) je bila 120 i 140 °C, dok je izlazna temperatura (T_i) bila 80 °C u svakom pojedinačnom sušenju.

Dobijeni suvi ekstrakti su sakupljeni u staklene posude i čuvani zaštićeni od uticaja vazduha i vlage, na sobnoj temperaturi u eksikatoru, do dalje analize.

Nakon dobijanja suvih ekstrakta dobijenih sušenjem *spray drying* tehnikom određena je efikasnost sušenja. Efikasnost predstavlja odnos mase dobijenog suvog ekstrakta i očekivane teorijske mase izražen u procentima (%). U laboratorijskim uslovima, proces sušenja se smatra efikasnim ukoliko je efikasnost veća od 50% (Vidović i sar., 2014).

3.6.2. Enkapsulacija primenom *spray congeling* tehnike

Superkritični ekstrakt lista sreмуša dobijen na temperaturi od 50 °C i pritisku od 200 bara je enkapsuliran primenom *spray congeling* tehnike, korišćenjem aparature shematski prikazane na slici 12 i mlaznice (slika 20) (projektovane u laboratorija za farmaceutsku hemiju i tehnologiju, Univerzitet u Bolonji, Bolonja, Italija). Gelucire® 53/10 (Gattefossè, Francuska), izabrani nosač je otopljen na temperaturi od 60 °C. U otopljen nosač je dodato 5% ekstrakta



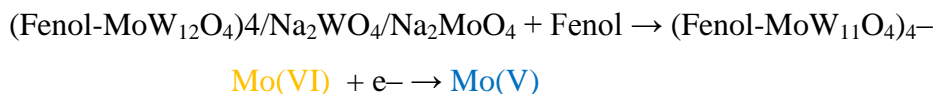
Slika 20 Shematski prikaz pneumatske mlaznice kod *spray congeling* aparature (prilagodeno iz rada Albertini i sar., 2009)

(m/m) i smeša je mešana na magnetnoj mešalici do potpune homogenizacije. Ovako homogena smeša je sipana u napojni rezervoar, koji je zagrejan na 65 °C da ne bi došlo do očvršćavanja čestica. Pneumatska mlaznica sa širokim otvorom kroz koju se raspršuje rastvor sastoji se od atomizera za dva fluida, što omogućava mešanje fluida i spoljašnjeg gasa pri izlasku iz otvora mlaznice. Za raspršivanje čestica korišćen je pritisak od 3 bara. Proces enkapsulacije je rađena na sobnoj temperaturi. Prilikom raspršivanja formiraju se čestice koje očvršćavaju na sobnoj temperaturi. Komora za raspršivanje služi ujedno i kao kolektor čestica. Nakon procesa enkapsulacije, određen je prinos dobijenih mikročestice enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta u odnosu na početnu količinu otopljenog nosača i ekstrakta, izražen u %. Dobijene mikročestice enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta su skladištene na 4 °C u polietilenskim bočicama.

3.7. Metodi za analizu hemijskih karakteristika biljnog materijala, tečnih i suvih ekstrakata

3.7.1. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola u dobijenim ekstraktima, je određen spektrofotometrijskom metodom po Folin–Ciocalteu (Singleton i Rossi, 1965). Metoda po Folin-Ciocalteu je zasnovana na merenju redukujućeg kapaciteta polifenolnih jedinjenja, čijom disocijacijom nastaje proton i fenoksidni anjon. Nastali fenoksidni anjon redukuje Folin-Ciocalteu reagens do plavo obojenog jona:



Odgovarajuće razblaženje tečnog ekstrakta ili metanolnog rastvor suvog ekstrakta (0,1 ml) je pomešano sa 7,9 ml destilovane vode, 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 ml 20% Na₂CO₃. U pripremi slepe probe je umesto 0,1 ml uzorka dodato 0,1 ml destilovane vode ili odgovarajuće smeše etanol-voda koja je korišćena kao ekstragens u Č/T ekstrakciji. Reakciona smeša je inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi i nakon toga apsorbanca je izmerena na spektrofotometru (Janway 6300, Bibby Scientific, France) na 750 nm.

Sadržaj ukupnih fenola u svežem listu sremuša rađen je po modifikovanoj Folin-Ciocalteu metodi (Kang i Saltveit, 2002). Samleveni sveži list sremuša (2 g) je ekstrahovan sa 20 ml smeše etanol:voda (70:30 v/v) 10 minuta na ultrazvučnom kupatilu, dobijeni ekstrakt je profiltriran kroz filter papir, a ostatak biljnog materijala je ekstrahovan sa dodatnih 20 ml smeše etanol:voda na orbitalnoj tresilici (300 o/min) 1 h. Nakon ekstrakcije, dobijeni ekstrakt je profiltriran i dopunjen rastvaračem do 50 ml u odmernom sudu. Dobijeni ekstrakt (1 ml) je pomešan sa 7 ml destilovane vode, 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 ml 20% Na₂CO₃. Reakciona smeša je inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi i apsorbanca uzorka je izmerena na 750 nm. Kao slepa proba korišćena je smeša u koju je umesto uzorka identične zapremine (1 ml) dodata ista količina rastvarača (destilovana voda ili odgovarajuća smeša etanol-voda).

Sadržaj fenola izračunat je na osnovu kalibracione krive standardnog rastvora galne kiseline. Sadržaj ukupnih fenola (UF) dobijen u postupcima Č/T ekstrakcije je izražen kao ekvivalent galne kiseline u 100 g lista sremuša (g EGK/100 g), dok je sadržaj ukupnih fenola u suvim ekstraktima izražen u mg EGA/g suvog ekstrakta (mg EGK/g SE).

3.7.2. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida određen je kolorimetrijskom metodom po Markham-u (Harborne, 1989). Ukupni sadržaj flavonoida je određen u svežem i suvom listu, kao i tečnim i suvim ekstraktima. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida zasnovano je na njihovoj sposobnosti da sa metalima grade odgovarajuće metalo-organske komplekse.

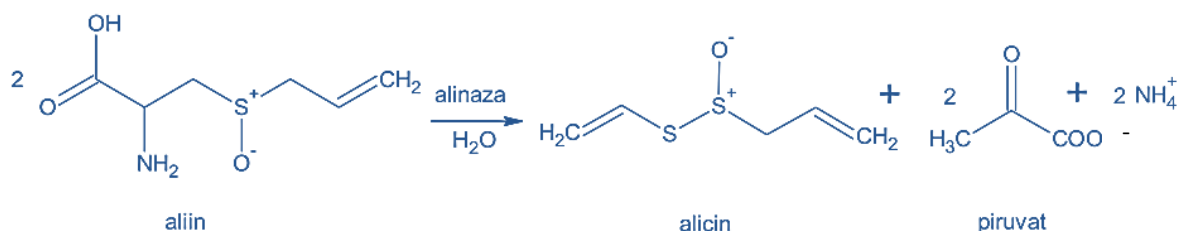
Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 1 ml uzorka (odgovarajućih ekstrakta) sa 4 ml destilovane vode i 0,3 ml 5% natrijum nitrita (NaNO_2). Dobijena smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 6 minuta. Nakon inkubacije u reakcionu smešu je dodato 0,3 ml aluminijum hlorid heksahidrata ($\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) i 5 minuta kasnije 2 ml 1 M natrijum hidroksida (NaOH). Dobijena smeša je dopunjena destilovanom vodom do ukupne zapremine od 10 ml. Apsorbanca uzorka je merena na spektrofotometru (model 6300, Jenway, Velika Britanija) na talasnoj dužini 510 nm.

Za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u svežem listu sremuša korišćen je isti ekstrakt kao i za određivanje sadržaja ukupnih fenola opisan u 3.8.1. Metoda je modifikovana za svež list sremuša, tako što je reakciona smeša dobijena mešanjem 4 ml ekstrakta i 1 ml 5% natrijum nitrita (NaNO_2). Dobijena reakciona smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 6 minuta. Nakon inkubacije u reakcionu smešu je dodato 2,5 ml aluminijum hlorid heksahidrata ($\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) i 5 minuta kasnije 2,5 ml 1 M natrijum hidroksida (NaOH). Nakon 10 minuta apsorbanca uzorka je merena na 510 nm.

Sadržaj ukupnih flavonoida izračunat je na osnovu kalibracione krive standardnog rastvora katehina. Sadržaj ukupnih flavonoida je izražen kao ekvivalent katehina (KE) u 100g lista sremuša (g KE/100 g) dok je sadržaj ukupnih flavonoida u suvim ekstraktima izražen u mg KE/g suvog ekstrakta (mg KE/g SE). Analiza je rađena u tri ponavljanja.

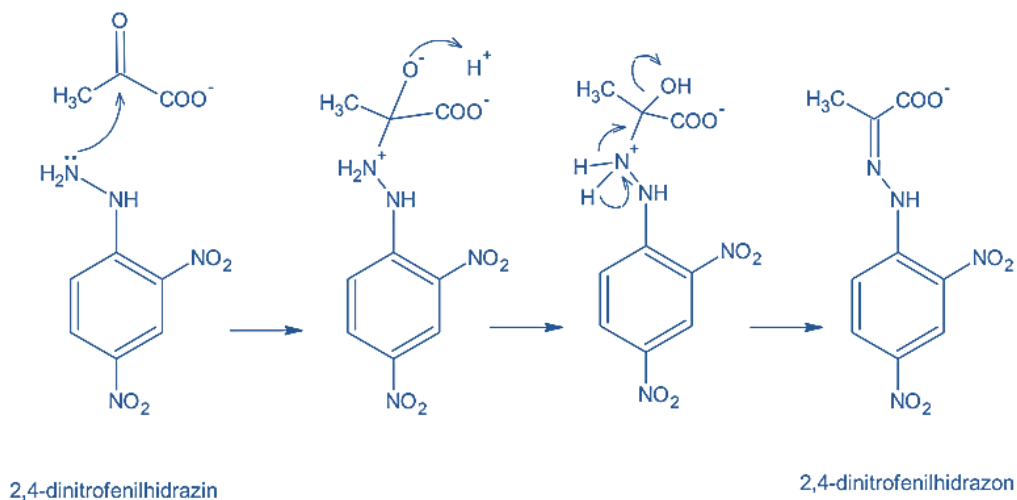
3.7.3. Određivanje aktivnosti alinaze u listu sremuša

Aktivnost enzima alinaze određena je spektrofotometrijskom metodom (Anthon i Barrett, 2003; Schwimmer i Weston, 1961), koja se zasniva na merenju sadržaja nastalog piruvata. Piruvat nastaje delovanjem alinaze na *S*-alk(en)il-L-cistein sulfokside (slika 21) kada dođe do mehaničkog oštećenja, narušavanja ćelijske strukture i oslobađanja enzima iz vakuola.



Slika 21 Prevođenje alina u alicin dejstvom enzima alinaze

Nastali piruvat u reakciji sa 2,4-dinitrofenilhidrazinom u kiseloj sredini daje talog dinitrofenilhidrazona (slika 22), koji se u baznoj sredini rastvara, dajući braon obojeni rastvor, čija se apsorbancija meri na 445 nm.



Slika 22 Reakcija piruvata sa 2,4-dinitrofenilhidrazinom

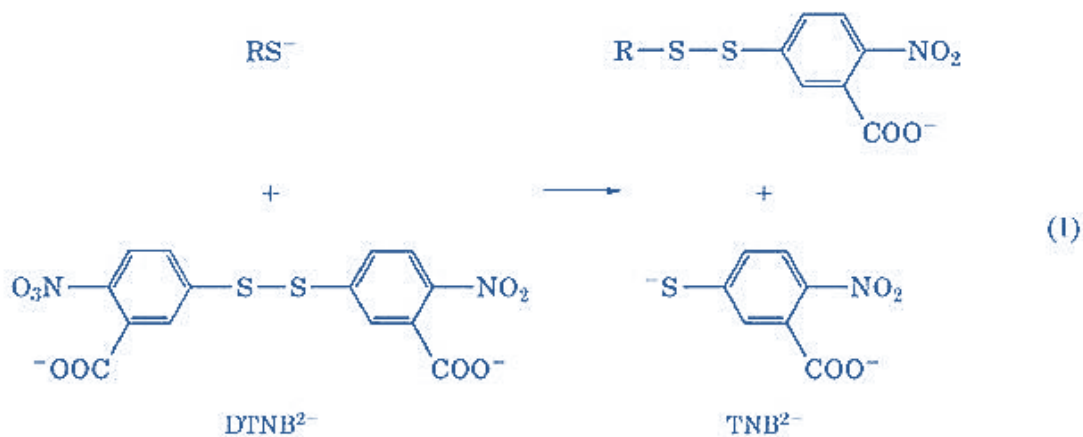
Ova metoda je veoma brza i često se koristi za merenje jačine arome luka. Međutim, pošto je 2,4-dinitrofenilhidrazin nespecifičan reagens i reaguje sa svim karbonilnim jedinjenjima, neophodno je izvršiti korekciju sa uzorkom kod koga je prethodno inaktivirana alinaza.

Za određivanje aktivnosti alinaze, 2,5 g lista sremuša, koji je prethodno usitnjen mlevenjem, ekstrahovano je sa 20 ml vode na orbitalnoj mućkalici 20 minuta na 300 o/min. Nakon 20 min inkubacije, reakcija je zaustavljena dodatkom 5 ml 0,2 g/ml trihlorsirćetne kiseline. Nakon 1 h supernatant se odvaja nakon centrifugiranja tokom 10 min na 10000 o/min, filtrira i dopunjava vodom do 50 ml u odmernom sudu. Od ovako pripremljenih rastvora pipetirano je 0,5 ml u erlenmajer i dodato 1,5 ml H₂O i 1 ml 2,4-dinitrofenilhidrazina, DNPH, (1,5 g/ml rastvor 2,4-dinitrofenilhidrazina rastvoreno u 2 M HCl). Nakon 10 min u reakcionu smešu je dodato i 5 ml 0,6 M NaOH nakon čega je apsorbancija merena na 445 nm. Slepa proba sadržala je 2 ml destilovane vode i 1 ml DNPH reagensa. Za korekciju su pripremljeni ekstrakti dobijeni na isti način, ali sa listovima sremuša kod kojih je prethodno inaktivirana alinaza zagrevanjem u mikrotalasnoj pećnici (NN-E201W, Panasonic, Japan) tokom 5 min.

Za konstrukciju kalibracione krive korišćen je standardni rastvor piruvinske kiseline. Koncentracija piruvata u svakom ekstraktu očitana je sa kalibracione krive i preračunata na masu uzorka. Rezultati su izraženi u mg pirodroždane kiseline na 100 g u listu sremuša (mg PK /100 g).

3.7.4. Određivanje ukupnih tiosulfinata u listu sremuša

Za određivanje ukupnih tiosulfinata korišćena je modifikovana metoda prikazana u radu Lawsona i saradnika (1995). Ova indirektna metoda se zasniva na reakciji tiosulfinata sa L-cisteinom, pri čemu L-cistein u višku reaguje sa 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzeva kiselina), DTNB. Ukupni tiosulfinati se određuju iz indirektna reakcije L-cisteina u višku i DTNB. Nastalo jedinjenje jonizuje u neutralnoj do alkalnoj sredini dajući žuto obojenje (slika 23). Ukupni tiosulfinati su u korelaciji sa nastalim jonizovanim 2-nitro-5-tiobenzoatom (TNB²⁻).



Slika 23 Reakcija DTNB sa tiolnom grupom L-cisteina u višku

Usitnjeni list sremuša (2,5 g) je ekstrahovan sa 20 ml HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetanesulfonska kiselina) pufera (50 mM, pH 7,5) uz mešanje na orbitalnoj mućkalici (300 o/min) 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon ekstrakcije, ekstrakt je centrifugiran (10 min na 10000 o/min) i profiltriran. Dobijeni ekstrakt (1 ml) je pomešan sa 1 ml L-cisteina (5 mM u HEPES puferu). Dobijena reakciona smeša je razblažena do 50 ml i ostavljena 15 min na sobnoj temperaturi. Ovako dobijena smeša (9 ml) reaguje sa 1 ml rastvora DTNB (1,5 mM u HEPES puferu). Apsorbanca je očitana nakon 15 minuta na 412 nm. Za slepu probu umesto ekstrakta korišćen je čist rastvarač (HEPES pufer).

Dobijeni rezultati su izraženi kao ekvivalent alicina (AC) na 100 g svežeg uzorka, izračunato po sledećoj formuli:

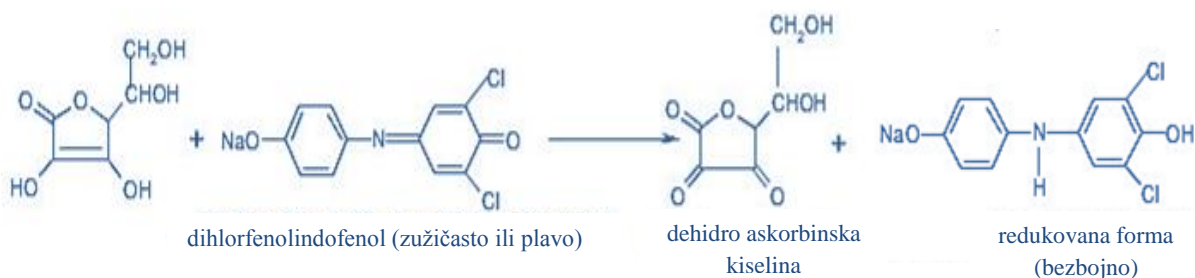
$$C_{\text{tiosulfinati}} = (\Delta A * 100) / (2 * 14150) \quad (2)$$

ΔA —razlika apsorbance slepe prope i probe, 14150—molarni ekstincioni koeficijent za DTNB, 2—broj mola cisteina potrebnih za nastajanje tiosulfinata

3.7.5. Određivanje sadržaja L-askorbinske kiseline u listu sremuša

Sadržaj L-askorbinske kiseline (vitamina C) u svežem listu sremuša određen je oksidacijom sa 2,6-*p*-dihlorofenolindofenolom, DIF (Trajković i sar., 1983). Metoda se zasniva na redukciji DIF reagensa, koja se vizuelno može pratiti promenom boje iz plave u alkalnoj sredini do ružičaste u kiseloj sredini (slika 24).

Usitnjeni list svežeg sremuša (3 g) je ekstrahovan sa 3% metafosfornom kiselinom (10 ml) pripremljenoj u 8% sirćetnoj kiselini, uz mešanje na vortex mešalici i centrifugiran (5 min na 1000 o/min). U dobijeni supernatant (1 ml) je dodato 8 ml fosfatnog pufera (pH 4,5) i 1 ml DIF reagensa. Promena boje je detektovana spektrofotometrijski na 515 nm. Analiza je rađena u tri ponavljanja. Rezultat je izražen kao sadržaj askorbinske kiseline u 100 g svežeg lista sremuša.



Slika 24 Reakcija određivanja askorbinske kiseline

3.7.6. Određivanje polifenola tečnom hromatografijom (HPLC-DAD)

Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih jedinjenja tečnih ekstrakta rađena je po metodi Mišan i saradnika (2011), visokopritisnom tečnom hromatografijom na uređaju (Agilent 1200 series, Paolo Alto, CA, SAD), koristeći Agilent, Eclipse XDB-C18 kolonu (1,8 μ m, unutrašnji prečnik 4,6 \times 50 mm; veličina punjenja 1,8 μ m) mm kolonu i detektor sa nizom dioda (Agilent, SAD). Tokom analize primenjen je linearni gradijent rastvarača sa protokom 1.00 ml/min. Početni odnos rastvarača: rastvarač A (metanol) i rastvarač B (1% mravlja kiselina) iznosio je 85% B; 0–6,2 min, 85% B; 6,2–8 min, 85–75% B; 8–13 min, 75–61% B; 13–15 min, 61% B; 15–20 min, 61–40% B; 20–25 min, 40–0% B. Vreme analize bilo je 25 min, a vreme

ispiranja kolone 10 min. Temperatura kolone je iznosila 30 °C. Uzorak (5 µl) je injektovan pomoću automatskog autosemlera. Spektar je podešen za snimanje u rasponu 190–400 nm, a hromatogram je sniman na 280, 330 i 350 nm. Za kvantifikaciju je korišćena metoda spoljašnjeg standarda. Fenolna jedinjenja su identifikovana na osnovu retencionog vremena i spektralnih karakteristika u poređenju sa standardima katehina i galne kiseline (Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka).

Uzorak za analizu je pripremljen rastvaranjem prethodno uparenog ekstrakta u koncentraciji u 2 mg/ml u smeši metanol i 1% mravlje kiseline (50:50 v/v) na ultrazvučnom kupatilu 10 min. Uzorak je nakon toga filtriran kroz membranski filter regenerisane celuloze 0,45 µm (Agilent, Paolo Alto, CA, SAD) i ubrizgan za analizu.

3.7.7. Određivanje sumpornih jedinjenja gasnom hromatografijom (GC-MS)

Za određivanje sumpornih jedinjenja u ekstraktima sremuša dobijenih superkritičnom ekstrakcijom gasnom hromatografijom korišćen je gasni hromatograf sa masenim detektorom (Agilent Technologies 7890A; MSD Agilent 5975C, SAD), autosemlerom i kapilarnom kolonom (HP-5MS UI, dužine 30 m, širine unutrašnjeg prečnika 0,25 mm i debljine unutrašnjeg filma 0,25 µm). Kao gas nosač korišćen je helijum protoka 2 ml/min. Uslovi analize su bili podešeni: temperatura injektora iznosila je 100 °C u *splitless* modu, protok na injekcionom ventilu je iznosio 15 ml/min na 3 min, a temperaturni režim od 35 °C do 150 °C sa korakom od 3 °C/min. Parametri masenog detektora su bili sledeći: jonizacija 70 eV, temperatura jonskog izvora 150 °C, a opseg skeniranja m/z 50450 e. Kvalitativna identifikacija sumpornih jedinjenja izvršena je na osnovu poklapanja sa Wiley9 bazom i literaturnim podacima.

3.7.8. Određivanje sumpornih jedinjenja tečnom hromatografijom (HPLC-DAD)

Sumpornih jedinjenja u određenim ekstraktima i mikročesticama dobijenim *spray* *congel*ing tehnikom određena su na tečnom hromatografu (Agilent 1100 series, Paolo Alto, CA, SAD), koristeći CORTECS C18 kolonu (unutrašnji prečnik 100 x 4,6 mm, veličina punjenja 2,7 mm), sa Waters VanGuard pretkolonom (unutrašnji prečnik 5 x 3,9 mm; veličina punjenja 2,7 mm) i detektor sa nizom dioda (Agilent, SAD) u stacionarnom režimu. Protok rastvarača je bio podešen na 1 ml/min, a injekciona zapremina je iznosila 50 µl. Kao mobilna faza je korišćena smeša fosfatnom pufera (20 mM, pH 4,5), 95% i acetonitrila 5%. Hromatogrami su snimani na talasnoj dužini od 210 nm. Kvantifikacija je određena integracijom dobijenih pikova i poređenjem rezultata sa serijom standarda poznatih koncentracija (alicin, AC (ChromaDex, Inc., SAD), alil sulfid, AS (Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka), dialil sulfid, DADS (Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka) i *S*-metilestar metantiosulfonske kiseline (MMTS₂) kreiranjem kalibracione krive.

Neposredno pre analize, ispitivane mikročestice su prethodno rastvorene u vodi (5 mg/ml), uz pomoću ultrazvučnog kupatila u trajanju od 30 min. Tako dobijen rastvor je filtriran kroz filter regenerisane celuloze, RC (0,2 µm).

Kvalitativna i kvantitativna analiza sumpornih jedinjenja u uzorcima iz eksperimenta skladištenja svežih listova sremuša je sprovedena visokopritisnom tečnom hromatografijom, korišćenjem Poroshell 120 kolone (EC-18 unutrašnji prečnik 3 x 100 mm; veličina punjenja 2,7 µm) i DAD detektora. Tokom analize primenjen je linearni gradijent rastvarača sa protokom od 0,8 ml/min. Početni odnos rastvarača A (fosfatni pufer 20 mM, pH 4,5) i rastvarača B (acetonitril) iznosio je 95% B; 0–5 min, 5–50% B; 5–15 min, % B; 15–20 min, 50% B; 20–22 min, 50–80% B; 22–25 min, 80% B; 25–30 min, 80–5% B. Vreme analiza iznosilo je 30 min, dok je vreme ispiranja kolone bilo 3 min. Temperatura kolone je podešena na 30 °C. Uzorak od 5 µl je ubrizgan pomoću automatskog ubrizgivača. Spektar je podešen za snimanje u rasponu 190–400 nm, dok je hromatogram sniman na 210 i 240 nm. Jedinjenja kao sto su alicin, alil sulfid, dialil sulfid, i *S*-metilestar metantiosulfonske kiseline su identifikovana na osnovu retencionog vremena i spektralnih karakteristika standarda.

3.7.9. Određivanje hidrosimetil furfurala (HMF) i furfurala (F) tečnom hromatografijom (HPLC-DAD)

Kvantitativno određivanje hidrosimetil furfurala (HMF) i furfurala (F) je urađeno po metodi Ariffina i saradnika (2014). Analize su rađene na tečnom hromatografu Agilent 1200 sa detektorom sa nizom dioda (DAD) (Agilent Technologies), koristeći XDB Zorbax Eclipse C-18 kolonu (unutrašnji prečnik $50 \times 4,6$ mm; veličina punjenja $1,8 \mu\text{m}$). Kao mobilna faza korišćena je izokratska smeša metanola i vode (0.1% mravlje kiseline), u odnosu 10:90 (v:v) pri konstantnom protoku 0,75 ml/min. Injekciona zapremina je iznosila 2 μl a temperatura kolone 30 °C. Pre ubrizgavanja na kolonu, ekstrakti su filtrirani kroz 0,45 μm najlonski filter (Rotilabo-Spritzenfilter 13 mm, Roth, Karlsruhe, Germany). Ova analiza urađena je u ekstraktima dobijeni ekstrakcijom subkritičnom vodenom.

3.8. Metodi za analizu fizičkih karakteristika biljnog materijala, suvih i enkapsuliranih ekstrakata

3.8.1. Instrumentalno određivanje boje

Objektivno određivanje parametara boje podrazumeva primenu instrumentalnih metoda određivanja. Instrumentalno merenje boje se zasniva na definisanju boje pomoću sistema numeracije boje. Standardni CIE sistem je jedan od najpoznatijih sistema za definisanje boje (CIE, 1976). CIE $L^*a^*b^*$ koordinate površinske boje ispitivanih uzoraka izmerene su pomoću kolorimetra (Minolta Chroma Meter CR-400 Konica Minolta Sensing Inc., Japan). Rezultati su izraženi prema CIE $L^*a^*b^*$ sistemu boja kao stepen svetloće (L^* – gde 0 označava crno, a 100 belo), udeo crvene/zelene boje ($a^* > 0$ označava crvenu i $a^* < 0$ označava zelenu boju), udeo žute/plave boje ($b^* > 0$ označava žutu i $b^* < 0$ označava plavu boju). Pre merenja izvršena je kalibracija standardom bele boje. Boja listova svežeg i suvog sremuša je merena pomoću hromametra (CR-400 Konica Minolta Sensing Inc., Japan), korišćenjem cevi za zaštitu izvora svetlosti CR-A33f, dok je boja tečnih ekstrakata (dobijenih ekstrakcijom subkritičnom vodenom) izmerena u staklenoj kivetici sa dužinom puta svetlosti od 10 mm (CM-A98), montiranoj na nosač

za merenje boje tečnih uzoraka (CR-A505) (slika 25). Boja svih uzoraka izmerena je u pet ponavljanja.

Ukupna promena boje (ΔE) izračunata je prema sledećoj formuli (Barreiro i sar., 1997):

$$\Delta E = \sqrt{(L_2^* - L_1^*)^2 + (a_2^* - a_1^*)^2 + (b_2^* - b_1^*)^2} \quad (3)$$

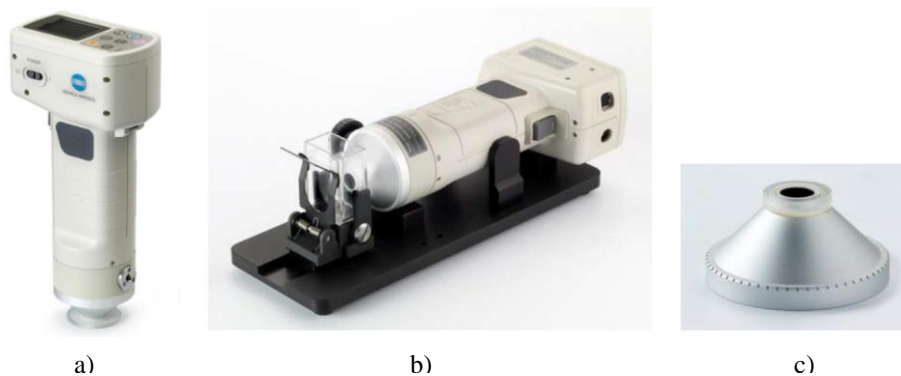
Indeks tamnjenja (BI) je korišćen da bi se opisala promena boje tokom ekstrakcije subkritičnom vodom u zavisnosti od parametara same ekstrakcije (Helou i sar., 2016). Indeks tamnjenja je računat po jednačini:

$$BI = \frac{(x - 0,31)}{0,172} \times 100 \quad (4)$$

gde se x računa iz sledeće formule:

$$x = \frac{a_t + 1,75L_t}{5,645L_t + a_0 - 3,012b_t} \quad (5)$$

a gde je a_0 početna boja merenja kalibracione bele ploče, a L_t , a_t i b_t predstavljaju boju ekstrakata dobijenih na različitim uslovima ekstrakcije.



Slika 25 Instrumentalno merenje boje: a) merni instrument Konica Minolta, b) nastavak za merenje boje tečnih uzoraka, c) nastavak CR-A33f sa konkavnim zaštitnim staklom (www.konicaminolta.com)

3.8.2. Sadržaj vlage

Sadržaj vlage u suvim ekstraktima dobijenim *spray drying* tehnikom određen je standardnom metodom, sušenjem uzorka na temperaturi od 105 °C do konstantne mase (*Ph. Eur.* 9), a rezultat je izražen u procentima (%).

3.8.3. Senzorna analiza

Panel od tri ocenjivača je ocenjivao skladištene svežeg lista sremuša tokom trajanja skladištenja. Ocenjivani parametri su bili miris (nakon otvaranja pakovanja), izgled i tekstura skladištenog sremuša. Miris je ocenjivan kao intenzitet mirisa na beli luk 0-5 (0-odsustvo, 5-najjači intenzitet) i strani miris (-odsustvo, 5-najjači intenzitet). Izgled je karakterisan korišćenjem uvenulosti i sparšenosti.

3.8.4. Higroskopnost

Higroskopnost je određena merenjem promene mase suvih ekstrakta dobijenih *spray drying* tehnikom, u eksikatoru u koji je prethodno stavljen zasićen rastvor natrijum hlorida (Vidović i sar., 2014). Zasićen rastvor natrijum hlorida služi da bi povećao relativnu vlažnost vazduha u eksikatoru. Higroskopnost je merena nakon 48 h, a rezultat je izražen u procentima (%).

3.8.5. Indeks rastvorljivosti u vodi i indeks apsorpcije vode

Indeks rastvorljivosti u vodi (*water solubility index*, WSI) i indeks apsorpcije vode (*water absorption index*, WAI) su određeni tako što je 1,0 g suvih ekstrakta dobijenih *spray drying* tehnikom pomešan sa 10 ml destilovane vode u kiveti za centrifugiranje i smeša je inkubirana tokom 15 minuta u vodenom kupatilu na 30 °C. Nakon inkubacije smeša je centrifugirana 15 minuta na 5000 o/min. Supernatant je sakupljen u prethodno izmerene petri ploče, sušen u sušnici na 105 °C do konstantne mase.

Indeks rastvorljivosti u vodi predstavlja odnos mase osušenog supernatanta i ukupne suve materije u prvobitnom uzorku (1,0 g), izražen u procentima (%). Indeks apsorpcije vode predstavlja odnos mase čvrstih peleta zaostalih nakon centrifugiranja i ukupne suve materije u prvobitnom uzorku (1,0 g), izražen u procentima (Phoungchandang i Sertwasana, 2010; Vidović i sar., 2014).

3.8.6. Određivanje zapreminske mase

Prilikom određivanja zapreminske mase 5 g suvih ekstrakta dobijenih *spray drying* tehnikom je stavljeno u stakleni cilindar zapremine 25 ml. Cilindar sa uzorkom je, potom, podvrgnut petominutnoj vibraciji na 300 o/min. Nakon isteka vremena očitana je zapremina praha u cilindru i zapreminska masa izražena u mg/ml (Vidović i sar., 2014).

3.8.7. Određivanje hemijskih promena pri proizvodnji enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta Furijeovom transformacijom sa infracrvenom spektroskopijom (FT-IR)

Infracrvena spektroskopija predstavlja važnu metodu za karakterizaciju hemijske i fizičke prirode različitih matriksa zbog visoke osetljivost na promene u dipolnim momentima pojedinih vibracionih grupa. Neke od molekulskih vibracija su karakteristične za molekul kao celinu, dok su druge odraz prisustva određenih funkcionalnih grupa u njima (Radusin, 2015). Da bi se odredilo da li je došlo do nekih promena prilikom enkapsulacije *spray congealing* tehnikom, uzorci su analizirani disk metodom sa kalijum bromidom (KBr) pomoću Furierove transformacije sa infracrvenom spektroskopijom (FT-IR) (Di Sabatino i sar., 2012). Uzorak je dodat u KBr u odnosu 1:15, usitnjen i izmešan. Dobijena smeša je komprimovana ručnom presom, pritiskom od 7 t/cm^2 u trajanju od 3 min. Dobijeni diskovi (10 mm prečnik, 3 mm debljina) su analizirani u opsegu $400\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$ brzinom $0,20 \text{ cm/s}$.

3.8.8. Određivanje toplotnih svojstava enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (*differential scanning calorimetry* – DSC)

Termalne karakteristike ekstrakta dobijenog superkritičnom ekstrakcijom na 50 °C i pritisku od 200 bara, smeše dobijene rastvaranjem superkritičnog ekstrakta u nosaču i enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta su ispitane diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija je bazirana na merenju razlike sadržaja toplote u uzorku i kontrolnog materijala–čistog nosača, u funkciji temperature i/ili vremena i omogućava praćenje promena fizičkih i hemijskih transformacija uzorka. Uzorci (3 mg), zatvoreni u hermetičke aluminijske čuniće, analizirani su na temperaturama od 20 do 180 °C brzinom zagrevanja od 10 °C/min (Matos-Jr i sar., 2015).

3.8.9. Određivanje morfoloških karakteristika skenirajućim elektronskim mikroskopijom (*scanning electron microscopy* – SEM)

Oblik i površina čestica dobijenih enkapsulacijom superkritičnog ekstrakta dobijenog *spray congealing* tehnikom ekstraktom su analizirani skenirajućim električnim mikroskopom (SEM) sa ulaznim naponom od 2,0 kV. Prethodno, uzorci su naneti na nosač dvostranom lepljivom trakom i prevučeni slojem Ag/Pd u atmosferi argona pomoću visoko-vakuumskog isparivača (Albertini i sar., 2004).

3.9. Ispitivanje biološke aktivnosti određenih ekstrakata

3.9.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti na 1,1-difenil-pikril-hidrazil (DPPH) radikale

Antiradikalna aktivnost ispitivanih ekstrakata je analizirana indirektnom spektrofotometrijskom DPPH metodom (Espín i sar., 2000). Ova metoda je brza i jednostavna i stoga se primenjuje za analizu širokog spektra uzoraka (Chen i sar., 2012).

DPPH metoda se zasniva na praćenju konverzije stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH[•]), intenzivno ljubičaste boje u žuto obojenu redukovanu formu DPPH-H u prisustvu antioksidanta (slika 26). Pojava žute boje objašnjava se sposobnošću pojedinih



Slika 26 Promena boje DPPH radikala u prisustvu antioksidansa

komponentata da deluju kao donori vodonika ili elektrona, pri čemu DPPH[•] prelazi u redukovani neutralni DPPH-H. Reakcija je praćena promenom apsorbancije na 517 nm (Sánchez-Moreno, 2002).

Različite zapremine ekstrakta su pomešane sa metanolom (95%) i 90 μ M 2,2- difenil-1-pikril-hidrazilom (DPPH[•]) u cilju dobijanja serije finalnih koncentracija ispitivanog ekstrakta. Apsorbanca je merena spektrofotometrom (Jenway 6300 VIS, Velika Britanija na 517 nm nakon 60 minuta stajanja na sobnoj temperaturi.

Antiradikalna aktivnost (%RSC) je računata prema jednačini:

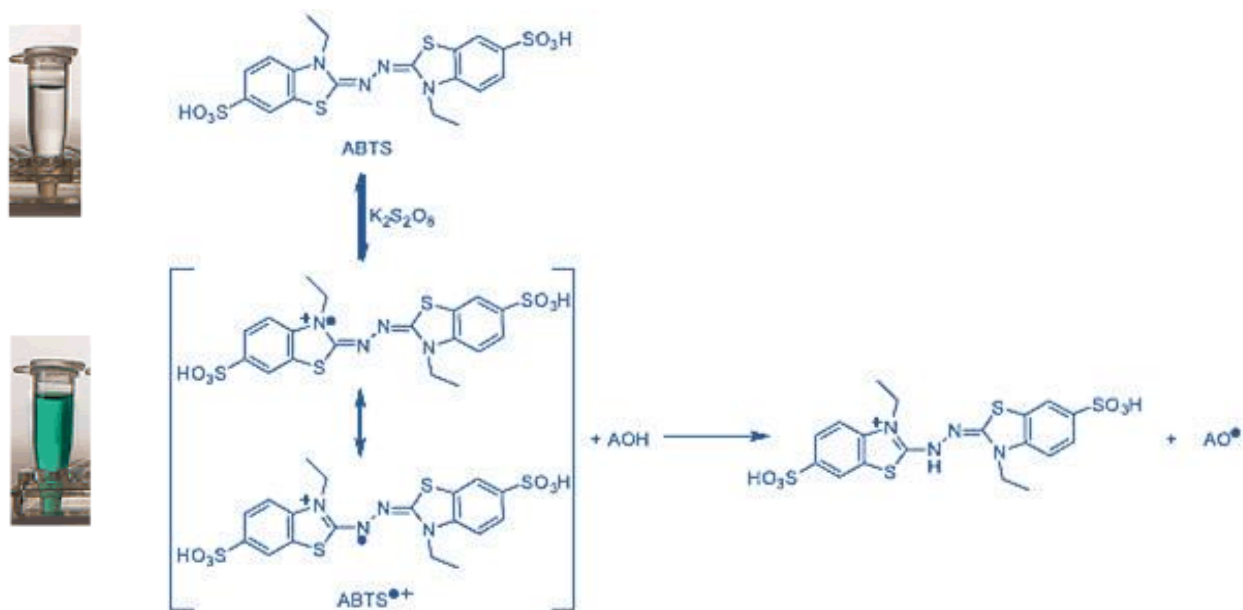
$$\% RSC = 100 - \frac{A_{uzorka} \times 100}{A_{slepeprobe}} \quad (6)$$

Antioksidativna aktivnost iskazana je kao IC_{50} (mg/ml), koja predstavlja koncentraciju ispitivanog ekstrakta koja je potrebna da neutrališe 50% slobodnih radikala u model sistemu. Svako ispitivanje je sprovedeno u 3 ponavljanja.

3.9.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti na 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfo katjon ($ABTS^{\bullet+}$) radikale

Sposobnost neutralizacije $ABTS^{\bullet+}$ radikala je određena spektrofotometrijskom metodom (Re i sar., 1999). 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina (ABTS) je jedinjenje koje oksidacijom sa kalijum-peroksidisulfatom ($K_2S_2O_8$) daje plavi katjon radikal ($ABTS^{\bullet+}$) sa maksimumom apsorpcije na 734 nm. U prisustvu antioksidanta rastvor se obezbojava pošto antioksidanti redukuju katjon radikal do ABTS, a obezbojavanje rastvora je u korelaciji sa antioksidativnom aktivnošću ispitivanih ekstrakata. Prikaz reakcije dat je na slici 27.

Rastvor ABTS reagensa je pripremljen mešanjem 7 mM vodenog rastvora diamonijumove soli 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline (ABTS) i 2,45 mM kalijum persulfata u odnosu 1:1 (v/v) i inkubacijom na sobnoj temperaturi tokom 16 h u odsustvu svetlosti. ABTS



Slika 27 Promena boje $ABTS^{\bullet+}$ radikala u prisustvu antioksidansa

reagens je razblažen acetatnim puferom (pH 3,3) kako bi se apsorbanca na 734 nm podesila na $0,70 \pm 0,02$. Serija razblaženja tečnih i suvih ekstrakata (0,1 ml) se pomeša sa ABTS reagensom (2,9 ml) i inkubira na sobnoj temperaturi tokom 300 min u odsustvu svetlosti. Apsorbanca se meri na 734 nm. U cilju konstruisanja kalibracione krive korišćen je sveže pripremljeni vodeni rastvor Trolox-a (0–0,8 mM). Rezultati su izraženi u mM ekvivalentima Trolox-a po 100 g droge (mM Trolox/100 g droge).

3.9.3. Antimikrobno delovanje

3.9.3.1. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti vodenog ekstrakta sremuša

Test mikroorganizmi

Za ispitivanje antibakterijske aktivnosti vodenog ekstrakta sremuša dobijenog na optimalnim uslovima ekstrakcije subkritičnom vodom korišteni su sledeći bakterijski sojevi:

- *Escherichia coli* ATCC 10536,
- *Escherichia coli* ATCC 8739,
- *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076,
- *Listeria monocytogenes* ATCC 19111,
- *Proteus hauseri* ATCC 13315 i
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Odabrani sojevi *E. coli*, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, *P. mirabilis* i *E. faecalis* pripadaju američkoj kolekciji bakterijskih kultura. Komercijalni sojevi nabavljeni u liofilizovanom stanju su do momenta aktiviranja čuvani u frižideru. Nakon otvaranja pakovanja, pripremane su subkulture u skladu sa uputstvima proizvođača i skladištene na kosom hranljivom agaru (Himedia, Indija) u frižideru na +4 °C. Jednom nedeljno su kulture osvežavane presejavanjem na novi kosi hranljivi agar (Himedia, Indija), da bi nakon isteka jednog meseca one bile bezbedno uklanjane. Nakon toga, otvarano je novo komercijalno pakovanje i prethodno

opisani postupak je ponavljan. Radne kulture su pripravljene od pripadajućih subkultura zasejavanjem na hranljivi agar (Himedia, India) i inkubiranjem na 37 °C, tokom 18–24 h.

Veštačka kontaminacija

Deo materijala sa radne kulture test mikroorganizma je pod aseptičnim uslovima, pomoću mikrobiološke eze, prenet u epruvetu sa sterilnim slanim rastvorom i suspendovan intenzivnim mućkanjem na vorteksu (Marshall Scientific, Velika Britanija). Gustina suspenzije je pomoću denzitometra (DEN-1, Biosan, Letonija) podešena tako da odgovara vrednosti 0,5 *McFarland* standarda. Od osnovne suspenzije test mikroorganizma pripremljena je serija decimalnih razblaženja u slanom rastvoru. Određena zapremina inokulata iz odgovarajućeg decimalnog razblaženja je zasejana u 1 ml hranljivog bujona (Himedia, Indija) sa ekstraktom dobijenim na optimalnim uslovima ekstrakcije subkritičnom vodom. odgovarajuće koncentracije (5, 10, 15, 20, 25 i 30 mg/ml), kako bi se dobili željeni nivoi kontaminacije (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 i 10^6 cfu/ml). Svaki uzorak je odvojeno kontaminiran pojedinačnim test mikroorganizmom. Kao pozitivna kontrola korišćen je hranljivi bujon, veštački kontaminiran test mikroorganizmima u 5 pomenutih nivoa kontaminacije, dok je neinokulisani hranljivi bujon sa dodatim subkritičnim vodenim ekstraktom sremuša upotrebljen kao negativna kontrola.

Antibakterijski test

Kontaminirani uzorci subkritičnog (vodenog ekstrakta sremuša) su inkubirani 24 h na 37 °C, u hranljivom bujonu pod aerobnim uslovima. Nakon završetka inkubiranja, broj test mikroorganizama u ispitivanim uzorcima je određivan primenom *drop plate* metode (Reed i Reed, 1948). U tu svrhu je korišten *Plate count agar* (Himedia, Indija), a isti postupak je primenjen na pozitivnim i negativnim kontrolama. Sva ispitivanja su izvršena u tri ponavljanja. Rezultat je izražen kao logaritamski broj bakterija u ml ispitivanog uzroka (log cfu/ml).

3.9.3.2. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakta dobijenog superkritičnom ekstrakcijom i enkapsuliranog ekstrakta dobijenog superkritičnom ekstrakcijom

Antibakterijska aktivnost ekstrakta dobijenog superkritičnom ekstrakcijom na temperaturi od 50 °C i pritisku od 200 bara, kao i enkapsuliranog ekstrakta sremuša *spray congealing* tehnikom ispitivana je na četiri Gram negativne (*Salmonella Typhimuirum* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Proteus hauseri* ATCC 13315, *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076) i tri Gram pozitivne (*Listeria monocitogenes* ATCC 19111, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) bakterije. Sojevi u liofilizovanom stanju su do momenta aktiviranja čuvani u frižideru. Nakon otvaranja pakovanja, pripremane su subkulture u skladu sa uputstvima proizvođača i skladištene na kosom hranljivom agaru (Himedia, Indija) u frižideru na +4 °C. Posle 24 h inkubacije na hranljivom agaru (Himedia, Indija) na 37 °C, izolovane kolonije testiranih bakterija su inokulirale u 0,1% slani peptonski rastvor (Himedia, Indija) i intenzivno mućkane na vorteksu (Marshall Scientific, Velika Britanija).. Gustina bakterijske suspenzije je prilagođena da odgovara 0,5 *McFarland* standardu pomoću denzitometra (DEN-1, Biosan, Letonija). Od početne suspenzije potom su pripremana decimalna razblaženja u 0,1% slanom peptonskom rastvoru.

Antimikrobna aktivnost enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta je ispitana odmah nakon enkapsulacije a zatim i nakon 3 meseca njihovog skladištenja na 5 °C. Antibakterijski test je urađen po modifikovanoj metodi (Jothi, 2009): 100 mg superkritičnog ekstrakta i enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta dodato je u 300 ml bakterijske suspenzije (10^5 cfu/ml), homogenizovano na vorteksu i inkubirano 24 h na 25 °C na orbitalnoj mućkalici (200 o/min) (Biosan, Litvanija). Broj test mikroorganizama u ispitivanim uzorcima je određivan primenom *drop plate* metode. U tu svrhu je korišten *Plate count agar* (Himedia, Indija), a isti postupak je primenjen na pozitivnim (prazan mikročestice, bez ekstrakta) i negativnim kontrolama (bez uzorka). Kao negativna kontrola korišćene su prazne mikročestice. Sva ispitivanja su rađena u tri ponavljanja. Rezultat je izražen kao logaritamski broj bakterija u ml ispitivanog uzorka (log cfu/ml).

3.10. Optimizacija tehnoloških procesa i eksperimentalni dizajn

U okviru ove doktorske disertacije za matematičku analizu tehnoloških postupaka primenjena je metoda optimizacije jedan po jedan faktor (one-factor-at-a-time). U ovoj metodi ispitan je uticaj svakog pojedinačnog odabranog parametra procesa, dok su ostali parametri bili konstantni. Ovakav način matematičke analize i optimizacije procesa je primenjen prilikom analize procesa skladištenja, sušenja, prilikom konvencionalne Č/T ekstrakcije i superkritične ekstrakcije pomoću CO₂.

Za analizu uticaja procesnih parametara kod ultrazvučne i ekstrakcije subkritičnom vodom lista sremuša za matematičku analizu i optimizaciju procesa ekstrakcije je primenjena metoda odzivne površine zbog njene mogućnosti primene i ispitivanja odziva pod uticajem nekoliko promenljivih veličina istovremeno (Montgomery, 2005). Ova metoda koristi kvantitativne podatke iz odgovarajućeg eksperimentalnog dizajna kako bi se odredio i istovremeno rešio problem sa više promenljivih. Jednačine opisuju uticaj ispitivanih parametara na ispitivane odzive, određuju međusobne odnose između ispitivanih parametara i predstavljaju kombinovani efekat svih ispitivanih parametara. Ovakav pristup omogućava efikasniju postavku samog eksperimenta i bolje tumačenje dobijenih rezultata (Erbay i Icier, 2009).

Ispitivani odzivi se fituju kvadratnim polinomom prema jednačini (Ferreira i sar., 2007):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_{ii}^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (7)$$

gde su Y odziv, X_i i X_j stvarne ili kodirane nezavisno promenljive, a β_0 , β_i , β_{ii} , i β_{ij} regresioni koeficijenti za srednju vrednost, linearne, kvadratne i članove interakcije.

U cilju normalizacije parametara i izostavljanja uticaja mernih jedinica, nezavisne promenljive, odnosno parametri procesa, primenjuju se u kodiranom obliku po jednačini 2 (Baş i Boyacı, 2007).

$$X = (x_i - x_0)/\Delta x \quad (8)$$

gde X predstavlja kodiranu vrednost, x_i realnu vrednost, x_0 realnu vrednost u centralnoj tački i Δx razliku maksimalne i centralne vrednosti nezavisne promenljive.

3.11. Statistička analiza

Rezultati za ispitivane parametre dobijeni su merenjem u tri ponavljanja, a izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Za poređenje rezultata osušenih uzoraka sremuša, kao i tečnih i suvih ekstrakata dobijenih primenom različitih tehnoloških procesa korišćene su statističke metode jednofaktorske i dvofaktorske analize varijanse (ANOVA). Značajne statističke razlike su identifikovane primenom *Tuckey* post-hoc testa (*Statistica 10, Minitab 17*).

4. Rezultati i diskusija

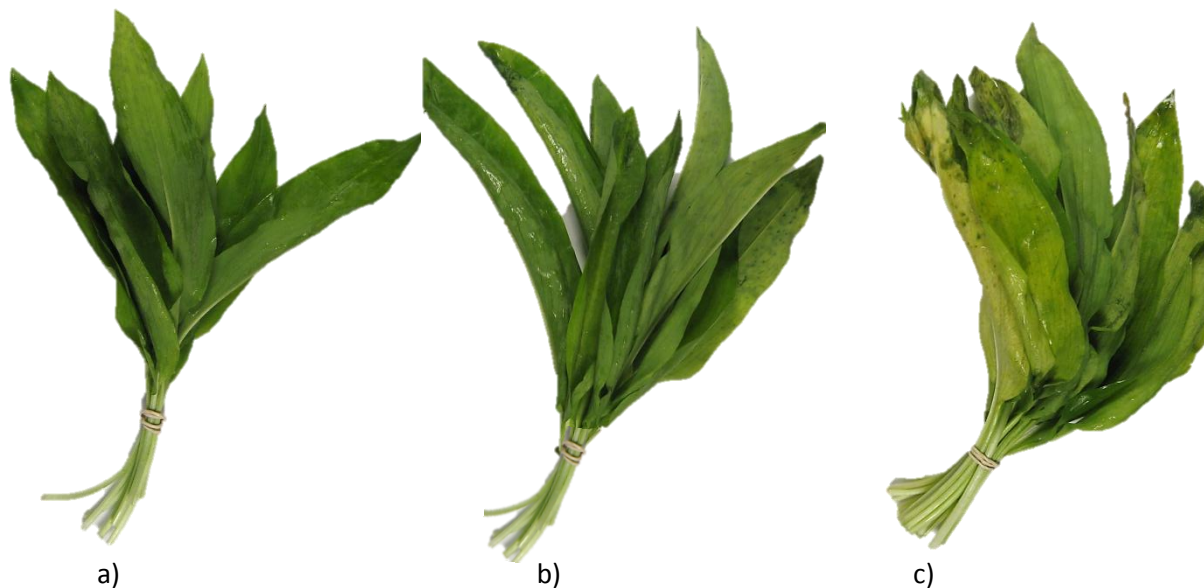
4.1. Skladištenje lista sremuša

Na proleće, tokom sezone branja, listovi sremuša se najčešće prodaju na zelenim pijacama u svežnjevima, zaronjenim u vodu, na temperaturi sredine, a odnedavno se sremuš može naći i u nekim od marketa, u otvorenim frižiderima (10–15 °C). Kao i ostalo lisnato povrće, listovi sremuša, ako nisu adekvatno čuvani, brzo venu i požute. Zbog sklonosti da brzo izgube svežinu, bitno je ustanoviti optimalne parametre čuvanja svežeg sremuša, kako bi se očuvale njegove bioaktivne komponente, senzorne i nutritivne karakteristike. Kako bi se sagledala trajnost sremuša za konzumiranje u svežem stanju, ali i mogućnost primene skladištenog sremuša za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja postavljen je eksperiment u okviru koga je ispitan uticaj temperature skladištenja, dužine trajanja skladištenja i načina pakovanja sremuša fizičke i hemijske karakteristike svežeg sremuša.

Pakovanje svežeg povrća pod modifikovanom atmosferom je jedna od novih tehnologija pakovanja hrane, koja omogućava produženje roka trajanja proizvoda smanjenjem njegove stope respiracije (Jacxsens i sar., 2002). Na osnovu rezultata postignutih kod drugog lisnatog povrća (Oliveira i sar., 2015; Sandhya, 2010), pretpostavka je da bi se trajnost sremuša mogla produžiti primenom pakovanja u modifikovanoj atmosferi zbog čega je analiziran i ovakav način skladištenja svežeg sremuša.

U postavljenom eksperimentu temperature skladištenja su odabrane tako da simuliraju uslove u kojima bi sremuš mogao da se prodaje na pijacama na temperaturi okoline tokom prolećnih meseci (18 °C), u marketima u otvorenim rashladnim sistemima (11 °C) i u hladnjačama (4 °C). Senzorske i hemijske karakteristike ovako skladištenog sremuša su analizirane prvi dan, nakon branja, kao kontrola i nakon 3, 6, 9 i 15 dana, odnosno do isteka roka trajanja za konzumiranje u svežem stanju, utvrđenog na osnovu senzorskih svojstava. Senzorski je ocenjivano prisustvo karakterističnog mirisa na sremuš i eventualno prisustvo/odsustvo stranog mirisa, kao i uopšteno stanje skladištenog sremuša.

Potrošači obično kupuju svež proizvod na osnovu njegovih vizuelnih svojstava, dok se druge komponente kvaliteta registruju tek naknadno, prilikom korišćenja. Iz tog razloga praćena je i vizuelna promena sremuša skladištenog u svežnjevima zaronjenim u vodi i u modifikovanoj atmosferi. Detektovane promene prikazane su na slikama 28 i 29, dok je promene boje, određena instrumentalno, a izražena preko $L^*a^*b^*$ parametra prikazana u tabeli 6.



Slika 28 Vizuelne promene svežeg lista sremuša detektovane tokom skladištenja sremuša na 18 °C : a) prvi dan, b) treći dan, c) šesti dan



Slika 29 Vizuelne promene svežeg lista sremuša detektovane tokom skladištenja sremuša u modifikovanoj atmosferi na 18 °C : a) prvi dan, b) deveti dan

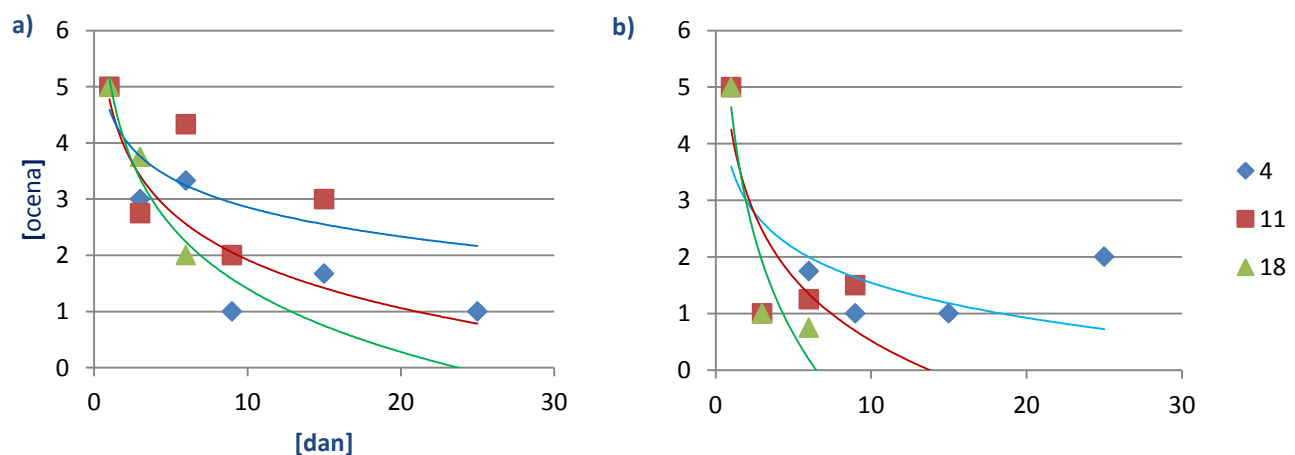
Promena boje je često prvi indikator starenja i propadanja svežeg voća i povrća i može umanjiti njegovu ekonomsku vrednost. Kod listova svežeg sremuša skladištenog u svežnjevima uronjenim u vodu već nakon trećeg dana došlo je do vidljivih promena boje listova sremuša, dok je značajna promena bila vidljiva nakon šestog dana (slika 28). U pakovanju sa modifikovanom atmosferom ove promene su bile znatno sporije (slika 29). Na osnovu dobijenih rezultata, utvrđeno je da je na vizuelne promene skladištenih listova svežeg sremuša najviše je uticala temperatura skladištenja.

Tabela 6 Promena parametara boje svežeg lista sremuša u zavisnosti od uslova skladištenja

Temperatura (°C)	Vreme skladištenja (dan)	$L^*(D65)$	$a^*(D65)$	$b^*(D65)$
Početni uzorak		36,82	-14,37	17,37
Skladištenje u modifikovanoj atmosferi				
4	3	40,28	-15,64	19,28
	6	37,63	-14,28	16,93
	9	37,77	-14,85	18,87
	15	38,33	-15,45	19,41
11	3	42,25	-16,02	21,41
	6	39,35	-15,37	18,81
	9	39,05	-15,38	20,48
	15	37,06	-14,29	17,34
18	3	38,21	-14,91	18,22
	6	39,21	-14,30	17,54
	9	37,89	-15,24	19,05
Skladištenje u svežnjevima				
4	3	38,04	-15,75	19,37
	6	38,99	-14,81	18,75
	9	38,47	-15,85	20,62
	15	38,58	-16,09	20,93
11	3	38,40	-15,29	19,31
	6	38,38	-14,41	17,56
	9	39,48	-16,36	22,17
	15	42,94	-16,01	25,55
18	3	37,89	-14,41	17,93
	6	45,19	-14,96	24,53

Na temperaturi od 18 °C došlo je do najbržeg propadanja lista svežeg sremuša što se manifestovalo pojavom žute boje na listovima i gubitkom svežine listova (slika 28). Maksimalna dužina čuvanja sremuša na ovoj temperaturi je bila 6 dana, dok je sremuš pakovan u modifikovanoj atmosferi (MAP) bio otporniji u pogledu vizuelnih karakteristika i njegov rok trajanja je iznosio maksimalno 9 dana. Na nižim temperaturama degradativne promene su se odvijale sporije, pri čemu je pakovanje u modifikovanoj atmosferi pri ovim temperaturnim uslovima dalo najbolje rezultate, obzirom da su listovi ovako pakovanog sremuša izgledali najsvježije, a promena boje/razvoj žute boje je najmanje izražen. Maksimalno vreme skladištenja na temperaturi 11 i 4 °C bilo 15 i 25 dana za svežnjeve uronjene u vodu i za sremuš pakovan u modifikovanoj atmosferi, redom. Za slične proizvode, odnosno za lisnato povrće, period skladištenja i prodaje je uglavnom do šest dana. Ovaj period može da varira u zavisnosti od vrste i same sorte proizvoda, a dužina trajanja svežeg i sveže sečenog povrća (salate i mešane salate) je obično od 7 do 14 dana (Ferrante i sar., 2004).

Senzorskom ocenom mirisa sremuša skladištenog u svežnjevima zaronjenim u vodu i pakovanim u modifikovanoj atmosferi ustanovljeno je da je došlo do bržeg gubitka karakterističnog mirisa na beli luk u pakovanju sa modifikovanom atmosferom u odnosu na sremuš skladišten na vazduhu, uronjen u vodu. Gubitak karakterističnog mirisa je bio znatno brži na višim temperaturama nezavisno od načina skladištenja (slika 30).



Slika 30 Senzorska ocena intenziteta mirisa lista sremuša u zavisnosti od trajanja i uslova skladištenja (a- svežanj, b- MAP)

Pakovanje lisnatog povrća u modifikovanoj atmosferi može usporiti proces propadanja i pojavu žute boje, ali nedostatak ovog načina skladištenja predstavlja mogućnost degradacije tkiva usled respiracije, fermentacije ili kisele degradacije tkiva usled čega dolazi do pojave stranog mirisa (Løkke i sar., 2013; Nielsen i sar., 2008). Rezultati postavljenog eksperimenta pokazuju da je duže čuvanje sremuša u modifikovanoj atmosferi dovelo do stvaranja stranog mirisa, koji je detektovan neposredno nakon otvaranja pakovanja (tabela 7), što je u skladu sa prethodno navedenom tvrdnjom. Detektovani miris je okarakterisan kao nakiseo, miris na alkohol i miris na početak fermentacije i on se razlikovao u zavisnosti od trajanja skladištenja i temperature čuvanja. Pojavu stranog mirisa su detektovali i Neilsen i saradnici (2008) prilikom skladištenja rukole, kao i Imahori i saradnici (2007) prilikom skladištenja vlašca. Imahori i saradnici (2007) su karakterističan miris na alkohol i fermentaciju pripisali anaerobnim uslovima pakovanja i nakupljanju fermentacionih proizvoda, kao i visokom sadržaju CO₂ unutar pakovanja.

Tabela 7 Senzorska ocena pojave stranog mirisa u zavisnosti od trajanja i uslova skladištenja lista sremuša

Temperature/dani	1	3	6	9	15	25
Skladištenje u svežnjevima potopljenim u vodu						
4 °C	0	0	0	0	0,67	1
11 °C	0	0	0	0	1,33	
18 °C	0	0	2			
Skladištenje u modifikovanoj atmosferi						
4 °C	0	0	0	blago kiseo	blago kiseo	blago kiseo
11 °C	0	0	malo nakiseo	kiselo		
18 °C	0	nakiseo	fermentacija			

0-odsustvo stranog mirisa, 5-najjači intenzitet stranog mirisa. Nakon evaluacije uzorci koji su ocenjeni sa više od 0,5 boda definisani su kao neprihvatljivi.

Radi potpune analize uticaja načina i parametara skladištenja na kvalitet lista svežeg sremuša, pored analize senzorskih i vizuelnih promena, urađena je i analiza sadržaja, odnosno promena sadržaja odabranih bioaktivnih jedinjenja, određen je sadržaji askorbinske kiseline, ukupnih fenola i ukupnih tiosulfina, kao i aktivnost alinaze, u zavisnosti od uslova skladištenja sremuša. Dobijeni rezultati su prikazani u tabelama 8 i 9.

Sadržaj askorbinske kiseline (tabela 8) se menjao u velikom rasponu od 56,09 do 4,98 mg/100 g svežeg proizvoda u zavisnosti od temperature, načina i vremena skladištenja. Manji stepen redukcije askorbinske kiseline je zabeležen kod sremuša koji je bio uronjen u vodu. Askorbinska kiselina u ovako skladištenom sremušu je najbolje očuvala na temperaturi od 4 °C, pri čemu je došlo do redukcije njenog sadržaja za oko 2,8%, dok je ova redukcija bila značajno veća na višim temperaturama 20% na 11 °C i 65% na 18 °C, nakon 6 dana skladištenja. Redukcija askorbinske kiseline nakon 15 dana bila znatno veće i iznosila je 20,41% na 4°C i 47,62% na 11 °C. Serea i saradnici (2014) su zabeležili značajnu redukciju askorbinske kiseline tokom skladištenja zelene salate, u kojoj se nakon 15 dana skladištenja na temperaturi 0–6 °C sadržaj askorbinske kiseline kretao u intervalu od 6,47 do 2,93 mg/100 g svežeg proizvoda. Prema Lee i Kader (2000) prilikom skladištenja lisnatog povrća dolazi do redukcije askorbinske kiseline za oko 10% nakon 6 dana skladištenja, dok je gubitak od 20% zabeležen već nakon dva dana skladištenja na sobnoj temperature. Veća redukcija je zabeležena na višim temperaturama skladištenja. Zbog toga je određivanje adekvatne temperature tokom skladištenja najvažniji faktor za očuvanje sadržaja askorbinske kiseline, odnosno vitamina C, kod svežeg voća i povrća. Do većih gubitaka vitamina C brže dolazi na višim temperaturama i sa produženim trajanjem skladištenja. Lee i Kader (2000) su došli do zaključka da se gubitak vitamina C tokom skladištenja može smanjiti skladištenjem voća i povrća u atmosferi sa smanjenim udelom O₂ i/ili atmosferi koja sadrži do 10% CO₂. Međutim, Veltman i saradnici (2000) i Agar i saradnici (1997) su primetili povećanu redukciju askorbinske kiseline povećanjem CO₂ a smanjenjem O₂ unutar pakovanja. Slično rezultatu su dobijeni za sadržaj askorbinske kiseline u skladištenim listovima sremuša u modifikovanoj atmosferi. Kod listova sremuša pakovanim u modifikovanoj atmosferi došlo do veće redukcije askorbinske kiseline na 11 i 18 °C u odnosu na skladištenje svežnjeva zaronjenih u vodu. Zbog toga je bitno da se za svaki biljni proizvod ispita uticaj pakovanja u modifikovanoj atmosferi, kao i sadržaj gasova unutar pakovanja.

Poređenjem sadržaja askorbinske kiseline, u lisnatom povrću kao što je zelena salata (Serea et al., 2014) i spanać (Toledo et al., 2003), sremuš je i do deset puta bogatiji askorbinskom kiselinom nego zelena salata, dok je sadržaj askorbinske kiseline u spanaću (61.98 mg/100 g svežeg spanaća) približno isti kao i kod sremuša.

Sadržaj polifenolnih jedinjenja u biljkama može varirati u širokom opsegu i zavisi od mnogih faktora. Sadržaj fenola prvenstveno zavisi od stadijuma zrelosti biljke, a pored toga, na njihov sadržaj utiču i sorta, lokalitet, uslovi tokom rasta i uzgajanja, kao i uslovi čuvanja nakon branja (Lachowicz i sar., 2016). Tako se sadržaj ukupnih fenola prilikom skladištenja zelene salate tokom 15 dana menjao od 3,83 do 2,27 mg EGA/g svežeg proizvoda u zavisnosti od sorte i temperature skladištenja (Serea i sar., 2014).

Praćenjem promene sadržaja ukupnih fenola u svežem listu sremuša, tokom skladištenja ustanovljeno je da je došlo je do povećanja sadržaja ukupnih fenola na svim temperaturama u poređenju sa kontrolnim uzorkom od prvog dana. Povećanje ukupnih fenola je zapaženo i sa porastom temperature i dužine skladištenja u oba načina pakovanja u odnosu na početni uzorak (tabela 8).

Tabela 8 Sadržaj askorbinske kiseline i ukupnih fenola u svežem listu remuša u zavisnosti od trajanja i uslova skladištenja

	Svežnjevi			Modifikovana atmosfera		
Temperatura/dani	1	6	15	1	6	15
Askorbinska kiselina [AK mg/100 g svežeg uzorka]						
4 °C	57,7	56,09	45,92	57,7	52,05	46,78
11 °C		46,2	30,22		32,72	20,17
18 °C		20,28			4,98	
Ukupni fenoli [mg EGK/100 g svežeg uzora]						
4 °C	162,91	180,41	174,76	162,91	164,54	175,1
11 °C		186,13	210,51		176,52	207,19
18 °C		190,02			206,83	

EGK-ekvivalent galne kiseline, AK-ekvivalent askorbinske kiseline

Poređenjem sadržaja ukupnih fenola u početnom uzorku i uzorku skladištenom do poslednjeg dana zabeležen je porast od oko 20%, u zavisnosti od temperature skladištenja. Lachowicz i saradnici (2016a) su ispitivali sadržaj ukupnih fenola u listu sremuša ubranog u okolini Rzeszówa (Poljska), u zavisnosti od stadijuma njegove zrelosti (mart-jun). U istraživanju

Lachowicz i saradnici (2016) sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim uzorcima se kretao u intervalu od 38,1 do 47,7 mg EGK/100 g svežeg proizvoda, dok su Alexieva i saradnici (2014) detektovali ukupni sadržaj fenola od 40 mg EGK/100 g u svežeg lista sremuša sa područja Bugarske. Mihaylova i saradnici (2014) utvrdili su da je najveći sadržaj fenola u listovima sremuša sa područja Bugarske tokom njegovog perioda cvetanja (60,9 mg EGK/100 g svežeg proizvoda). Maksimalan sadržaj fenola u listu sremušu (128 mg EGK/100 g svežeg proizvoda) detektovali su Mahmutovic i saradnici (2014) za sremuš sakupljen u maju, na području Bosne i Hercegovine. Na osnovu dosadašnjih istraživanja za sadržaj ukupnih fenola je dobijen za sremuš korišćen u okviru ove doktorske disertacije. Dobijene vrednosti za ukupan sadržaj fenola slične vrednostima koje su dobili Mahmutović i saradnici (2014). List sremuša korišćen u istraživanjima Mahmutovica i saradnika (2014) i list sremuša ispitivan u okviru ove doktorske disertacije potiče sa istog područja, zapadnog Balkana, te se pretpostavlja da ovo područje pogoduje rastu sremuša bogatog bioaktivnim komponentama, odnosno fenolima. Povećanje sadržaja ukupnih fenola tokom skladištenja sremuša može biti objašnjeno i dodatnom sintezom fenola tokom skladištenja, jer sintezom fenola biljka pokušava za se zaštititi do oštećenja do kojih dolazi tokom skladištenja (Bernaert i sar., 2013).

Aktivnost alinaze je odgovorna za konverziju alina u alicin, koji je prepoznat kao značajno bioaktivno jedinjenje lista sremuša. Iz tog razloga, odabrano je da aktivnost alinaze u listu sremuša i promene aktivnosti ovog enzima budu analizirane kao pokazatelji kvaliteta lista sremuša (Simin, 2009). Prikazani rezultati ukazuju na veliku varijabilnost u aktivnosti alinaze tokom skladištenja pod različitim uslovima (tabela 9). Na aktivnost alinaze je značajno uticala temperatura skladištenja. Aktivnost enzima alinaze su u ispitivanim uzorcima kretala u interval od 23,81 do 43,03 mg pirogroždane kiseline/100 g svežeg proizvoda, pri čemu je njegova najviša aktivnost zabeležena nakon 15 dana skladištenja u modifikovanoj atmosferi na 11 °C. Generalno je veća aktivnost alinaze zapažena kod uzoraka sremuša skladištenim na temperaturi 11°C. Aktivnost enzima alinaze je uticala i na stvaranje tiosulfinata. Povećanje ukupnih tiosulfinata zabeleženo je i kod svežnjeva zaronjenih u vodu i u listovima pakovanim u modifikovanoj atmosferi, pri čemu se njihov sadržaj u ispitivanim uzorcima kretao od 4,04 do 13,37 mg alicina/100 g svežeg proizvoda. Horničkova i saradnici (2010) su ispitivali sadržaj *S*-alk(en)il-cistein sulfoksida, prekursora bioaktivnih sumpornih jedinjenja, u 58 različitih genotipova luka.

Sadržaj *S*-alk(en)il-cistein sulfoksida prvenstveno je zavisio od različitih genetskih faktora i uslova skladištenja posle berbe, dok su klimatski uslovi tokom rasta (npr. temperatura, navodnjavanje) u manjoj meri uticali na sadržaj sulfoksida. Ovi autori su došli do zaključka da se sadržaji svih *S*-alk(en)il-cistein sulfoksida značajno povećavaju nakon čuvanja na 5 °C. Kako su *S*-alk(en)il-cistein sulfoksidi prekursori tiosulfinata, rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji su u skladu sa rezultatima istraživanja Horničkove i saradnika (2010). Pretpostavlja se da je do povećanja sadržaja tiosulfinata tokom skladištenja sremuša došlo usled interakcije između povećanog sadržaja prekursora tiosulfinata i enzima alinaze.

Tabela 9 Sadržaj ukupnih tiosulfinata i aktivnost alinaze u sremuša u zavisnosti od trajanja i uslova skladištenja

	Svežnjevi			Modifikovana atmosfera		
Temperatura/dani	1	6	15	1	6	15
Aktivnost alinaze [mg PK/100 g svežeg uzorka]						
4 °C	23,81	24,47	36,88	23,81	30,15	39,25
11 °C		31,00	41,61		35,05	43,03
18 °C		33,43			27,69	
Ukupni tiosulfinati [mg AC/100g svežeg uzorka]						
4 °C	4,04	4,77	5,25	4,04	6,09	7,65
11 °C		5,85	8,43		12,19	13,37
18 °C		8,15			13,9	

PK-pirogroždana kiselina, AC-alicin

Sadržaj pojedinih sumpornih jedinjenja u listu svežeg sremuša nakon skladištenja, u svežnjevima uronjenim u vodu i u modifikovanoj atmosferi, analiziran je tečnom hromatografijom. Kako dominantno jedinjenje u analiziranim uzorcima je identifikovan alicin (AC), a identifikovani su i alil sulfid (AS), dialil disulfid (DADS) i metil-*m*-tiosulfonat (MMTS₂).

Iako vremenom sremuš gubi svoja senzorska svojstva i više ne ispunjava visoke zahteve kupaca, skladišteni listovi sremuša su i dalje bogati bioaktivnim jedinjenjima. Tako je primećeno da je sadržaj ukupnih fenola nakon 6 i nakon 15 dana skladištenja veći u odnosu na početni

uzorak. Produženjem vremena skladištenja svežeg lista sremuša dolazi i do povećanja sadržaja tiosulfinata. Iz tog razloga može se pretpostaviti da bi se sremuš koji više nije u skladu sa zahtevima potrošača u pogledu vizuelnih karakteristika i senzorskih svojstava mogao iskoristiti za izolovanje bioaktivnih komponenti, koje bi se dalje mogle inkorporiraju u nove funkcionalne proizvode. Takođe, u cilju povećanja sadržaja određenih bioaktivnih jedinjenja, posebno tiosulfinata, a za kasniju preradu u formu ekstrakata u okviru farmaceutske industrije, može se pretpostaviti da bi bilo poželjno pre ekstrakcije primeniti skladištenje lista sremuša i to u svežnjevima u trajanju od 15 dana na temperaturi od 11 °C, ili u modifikovanoj atmosferi u trajanju od 6 dana na temperaturi od 18 °C.

4.2. Sušenje lista sremuša

Sušenje je široko primenjivana metoda za dobijanje proizvoda od crnog i belog luka, međutim nema literaturnih podataka koji se tiču sušenja divljeg belog luka, sremuša, niti postoje podaci o uticaju različitih tehnika sušenja i procesnih parametara na stabilnost bioaktivnih komponenti u osušenom proizvodu. Konvektivno sušenje vrućim vazduhom je uobičajeni postupak koji se koristi za sušenje različitih sorti luka (Ratti i sar., 2007). Međutim, ovakav način sušenja često utiče na kvalitet dobijenog proizvoda u pogledu sadržaja bioaktivnih komponenti, jer je proizvod koji se suši često izložen visokim temperaturama duže vreme. Prema tome, može doći do delimične ili potpune inaktivacije enzima alinaze, koji je odgovoran za nastajanje tiosulfinata i alicina kao predstavnika ove grupe jedinjenja kod sremuša. Takođe, može doći i da razgradnje nastalih tiosulfinata na disulfide. Stoga je u okviru ove doktorske disertacije ispitan uticaj različitih tehnika sušenja (konvektivno i vakuumsko sušenje) i temperature sušenja (40, 50, 60, 70 °C) na sadržaj bioaktivnih komponenti u osušenom proizvodu. Uzorak osušen liofilizacijom je korišćen za poređenje sa ostale dve tehnike sušenja, jer se liofilizacija smatra visoko efikasnom metodom sušenja kada je u pitanju očuvanje sadržaja i stabilnosti bioaktivnih komponenti (James i sar., 2009; Ratti, 2001).

Prilikom sušenja lista sremuša, kao parametri ocene kvaliteta su ispitivani sadržaj vlage, promena boje (ΔE), sadržaj ukupnih fenola, sadržaj tiosulfinata, kao i aktivnost alinaze. Pored

temperature, analizirano je i vreme sušenja kao parametar koji treba uzeti u obzir prilikom odabira tehnike sušenja, u cilju optimizacije troškova procesa sušenja. Dobijeni rezultati ispitivanih parametara su prikazani u tabeli 10.

Tabela 10 Uticaj različitih tehnika sušenja na parametre kvaliteta osušenog lista sremuša

Tehnika sušenja	Temperatura (°C)	Sadržaj vlage (%)	ΔE	Ukupni fenoli (mg EGK/100 g SM)	Ukupni tiosufinatti (mg AC/100g SM)	Aktivnost alinaze (mg PK /100g)	Vreme sušenja (h)
konvektivno	40	9,03 ^a	6,95 ^{n.s.}	10,21 ^a	12,51 ^a	5,62 ^b	9,0 ^a
konvektivno	50	8,2a ^b	5,14 ^{n.s.}	8,71 ^{a,b}	8,75 ^b	4,70 ^{c,d}	4,5 ^b
konvektivno	60	7,53 ^{b,c}	6,31 ^{n.s.}	9,21 ^{a,b}	6,25 ^c	4,33 ^{d,e}	2,75 ^c
konvektivno	70	7,78 ^b	6,76 ^{n.s.}	7,89 ^b	5,97 ^c	4,98 ^c	1,75 ^d
vakuumsko	40	7,03 ^c	6,01 ^{n.s.}	9,81 ^{a,b}	9,01 ^b	3,82 ^{e,f}	6,0 ^e
vakuumsko	50	6,2 ^d	5,33 ^{n.s.}	9,57 ^{a,b}	8,45 ^b	3,78 ^{e,f}	3,75 ^f
vakuumsko	60	5,76 ^d	6,96 ^{n.s.}	8,91 ^{a,b}	9,04 ^b	3,66 ^f	2,25 ^g
vakuumsko	70	6,19 ^d	7,77 ^{n.s.}	9,17 ^{a,b}	8,48 ^b	3,96 ^{e,f}	1,25 ^h
liofilizacija		5,46 ^d	5,46 ^{n.s.}	10,92 ^a	12,96 ^a	7,71 ^a	48,0 ⁱ

Vrednosti obeležene istim slovom u koloni nisu značajno različite na 5% (Tukey's test). ΔE - promena ukupne boje, EGK - ekvivalent galne kiseline, AC- alicin, PK – pirogroždana kiselina, n.s - nema statističke značajne razlike

Na sadržaj vlage značajno su uticali način sušenja i primenjena temperatura, dok su na promenu boje uticale temperatura sušenja i interakcija temperature sušenja i tehnike sušenja. Sadržaj vlage u ispitanim uzorcima osušenog sremuša se kretao od 5,46 do 9,03%, što je u skladu sa zahtevima sadržaja vlage sličnih proizvoda, kao što su lekovito bilje i začini (Pravilnik o kvalitetu začina, ekstrakata začina i mešavina začina, 2014 i 2015). Uzorci sušeni vakuumskom tehnikom na 50, 60 i 70 °C i liofilizacijom nisu pokazali statistički značajno odstupanje u pogledu sadržaja vlage. Najveći sadržaj vlage je zabeležen prilikom konvektivnog sušenja na 40 °C, kao posledica niske temperature sušenja.

Razlika u boji osušenog lista sremuša je merena u odnosu na boju svežeg lista nakon branja (slika 31). Francis i Clydesdale (1975) su na osnovu vrednosti ukupne promene boje (ΔE) definisali da li je promena boje vidljiva golim okom. Ako je vrednost ΔE manja od 1, razlika u boji nije uočljiva golim okom. Ako se vrednost ΔE kreće u intervalu od 1 do 3, razlika u boji nije očigledna golim okom. Ako je vrednost ΔE veća od 3, razlika u boji je očigledna golim okom.

(Belović, 2016). Iako je razlika između svežeg i osušenog lista sremuša bila vidljiva ($\Delta E=5,33-7,77$), primenom jednofaktorske analize varijanse (ANOVA), razlike u boji uzoraka dobijenih primenom različitih tehnika sušenja nisu međusobno značajne (tabela 10). Dakle, u smislu degradacije boje tokom sušenja, očuvanje boje proizvoda bilo je zadovoljavajuće i karakteristično za dobijeni proizvod.



Slika 31 Listovi sremuša osušeni konvektivnom i vakuum tehnikom

Na osnovu rezultata prikazanih u okviru ove doktorske disertacije može se konstatovati tokom sušenja dolazi do redukcije sadržaja ukupnih fenola u poređenju sa svežim uzorkom (tabele 6 i 8). Primenom dvofaktorske analize varijanse (ANOVA) analiziran je uticaj primenjene tehnike sušenja (konvektivno i vakuumsko) i temperature sušenja (40, 50, 60 i 70 °C) na sadržaj ukupnih fenola u osušanim uzorcima sremuša. Analizom je utvrđeno da je u procesu sušenja značajan samo uticaj temperature ($p<0,05$), dok tehnika sušenja i interakcija između temperature i tehnike sušenja nisu imali značajan uticaj (tabela 10). Iako je najveći sadržaj ukupnih fenola dobijen u uzorku sušenom liofilizacijom (tabela 10), međusobno statistički

značajno različiti rezultati su dobijeni samo u slučaju sušenja liofilizacijom (10,92 mg EGK/100 g suvog uzorka) i konvektivnim sušenjem na 70 °C (7,89 mg EGK/100 g suvog uzorka), dok kod ostalih uzoraka sadržaj ukupnih fenola nije bio statistički značajnog odstupanja (tabela 10). Porastom temperature sušenja došlo je do smanjenja sadržaja ukupnih fenola primenom obe tehnike sušenja. Uticaj povećane temperature je dao slične rezultate u istraživanju Calín-Sánchez i saradnika (2014) prilikom sušenja belog luka. Zhou i saradnici (2017) su ispitali uticaj temperature na sušenja belog luka, gde su kao tehniku sušenja primenili infracrveno sušenje. U ovom istraživanju u osušanim uzorcima belog luka detektovano je značajno manje ukupnih fenola u poređenju sa svežim uzorkom, a smanjenje je bilo izraženije primenom viših temperatura. Generalno, porast temperature sušenja prati smanjenje sadržaja fenola zbog njihovog termolabilnog karaktera (Erbay i Icier, 2009). Analiza uticaja tehnike sušenja i uticaja procesnih parametara na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja rađena je na različitom biljnom materijalu. Tako su Hossain i saradnici (2010) analizirali sušenje šest različitih biljaka porodice *Lamiaceae* i poredili različite načine sušenja, odnosno njihov uticaj na sadržaj ukupnih fenola. Njihovo istraživanje je ukazalo na to da se najveći stepen očuvanja sadržaja fenolnih jedinjenja ostvaruje konvektivnim sušenjem, vakuumskim sušenjem i liofilizacijom, respektivno. Primenom različitih tehnika sušenja kao što je sušenje mikrotalasima, konvektivno sušenje, sušenje na suncu i liofilizacija, u istraživanju Chan i saradnika (2009), najbolje rezultate prilikom sušenja različitih sorti lista čaja i najmanji stepen redukcije bioaktivnih komponenti (ukupni fenoli, vitamin C, antioksidativna aktivnost) je dobijen u postupku liofilizacije, dok je sušenjem na suncu drastično smanjen sadržaj bioaktivnih komponenti. Iako se liofilizacija pokazala kao najbolji postupak za očuvanje bioaktivnih jedinjenja u listu čaja, stepen redukcije se razlikovao i u zavisnosti od same sorte čaja. Na osnovu ovakvih rezultata, može se zaključiti da, osim načina i temperature sušenja, na sadržaj ukupnih bioaktivnih jedinjenja u osušenom uzorku utiče i vrsta biljnog materijala koji se suši.

Na aktivnost alinaze su značajno uticali temperatura i tehnika sušenja, kao i interakcija ova dva parametra ($p < 0,05$). Iz rezultata prikazanih u tabeli 10 vidi se da su razlike između pojedinih uzoraka u pogledu temperature bile statistički značajne. Poređenjem dobijenih rezultata se zapaža da je aktivnost alinaze u uzorcima sušenim liofilizacijom najveća (7,71 mg

PK/100 g suvog uzorka), što je u skladu sa sadržajem nastalih tiosulfina (tabela 8). Veće aktivnosti alinaze su zabeležene u uzorcima sušenim konvektivnim sušenjem u poređenju sa vakuumskim sušenjem. Ali, razlike u aktivnosti alinaze u uzorcima sušenim primenom vakuumskog sušenja nisu bile statistički značajne u poređenju sa konvektivnom tehnikom (tabela 10). Kod konvektivno sušenja, najmanja aktivnost alinaze je detektovana kod uzorka sušenog na 60 °C. Nekoliko naučnih istraživanja bavila su se analizom procesa i parametara sušenja na aktivnost alinaze (Poojary i sar., 2017). Optimalna temperatura aktivnosti čistog enzima alinaze je 35–40 °C (Wang i sar., 2011). Prilikom sušenja belog luka, Li i saradnici, (2007) su utvrdili da je aktivnost alinaze značajno redukovana tokom procesa sušenja, ali da ona i dalje ima sposobnost da konvertuje alin u alicin. Pezzutti i Crapiste (1997) su pratili nastajanje arome u belom luku na osnovu određivanja sadržaja pirogroždane kiseline, kako bi odredili uticaj temperature sušenja na inhibiciju alinaze. U radu Lagunas i Castaigne, (2008) sušenje u temperaturnom opsegu od 45 do 75 °C dovelo je do zanemarljivog gubitka pirogroždane kiseline. Primenom hromatografske *headspace* analize isparljivih sumpornih jedinjenja u svežem belom luku, očuvana su i detektovana ista isparljiva sumporna jedinjenja i u osušenom belom luku konvektivnom tehnikom, u struji toplog vazduha (Lagunas i Castaigne, 2008). U ovom istraživanju ukazano je i na to da se cikličnim (naizmeničnim) sušenjem na temperaturama 40–60 °C bolje očuvala aktivnost alinaze i potencijal formiranja sumpornih jedinjenja (91%), nego primenom konstantne temperature sušenja u istom temperaturnom opsegu (Lagunas i Castaigne, 2008). Prema rezultatima Lagunas i Castaigne (2008), razlaganje prekursora sumpornih jedinjenja počinje na temperaturama sušenja većim od 100 °C. Do sličnih zapažanja su došli i Ben Haj Said i saradnici (2015), prilikom konvektivnog sušenja *Allium roseum* na 40, 50 i 60 °C. Visoke temperature (60 °C) prilikom konvektivnog sušenja nisu uticale na potencijal nastanka isparljivih sumpornih jedinjenja u *Allium roseum*.

Sadržaj ukupnih tiosulfina izražen na alicin u uzorcima sušenim konvektivnom tehnikom se kretao u intervalu od 5,97 do 12,51 mg/100 g suvog uzorka, dok je kod vakuumskog sušenja ovaj interval bio manji 8,45-9,04 mg/100 g suvog uzorka. Najveći sadržaj ukupnih tiosulfina je dobijen konvektivnim sušenjem na 40 °C, a povećanjem temperature je došlo do značajne redukcije. Na osnovu dobijenih rezultata se može pretpostaviti da je prilikom konvektivnog sušenja došlo do razgradnje nastalih tiosulfina i da je razgradnja veća ukoliko su

primenjene veće temperature sušenja. Vakuumskim sušenjem nisu detektovane statistički značajne razlike u pogledu sadržaja ukupnih tiosulfinata. Rahman i saradnici, (2009) su sproveli sličan eksperiment u kome su ispitivali uticaj temperature konvektivnog (50, 60, 80, 90 i 105 °C) i vakuumskog (50, 60 i 90 °C) sušenja na kinetiku i sadržaj alicina, tj. tiosulfinata u dobijenom osušenom belom luku. U njihovom istraživanju uzorci osušeni konvektivnom tehnikom na 50 °C i vakuumski na 50 i 60 °C su sadržali najviše alicina. Konvektivno sušenje toplim vazduhom na 60 °C je prouzrokovalo veći gubitak alicina nego na 50 °C. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim u okviru ove doktorske disertacije. Međutim, u radu (Abano i sar. 2011) prilikom konvektivnog sušenja belog luka na temperaturama 45, 50 i 55 °C došlo je do povećanja sadržaja alicina u odnosu na početni uzorak. Povećanje sadržaja alicina sa povećanjem temperature sušenja Abano i saradnici (2011) su objasnili razlaganjem i preraspodelom alil-S-cistein sulfoksida u dialil tiosulfinate. Optimizacijom vakuumske tehnike sušenja crnog luka u temperaturnom opsegu 50–70°C, primenom metode odzivne površine, Jayeeta i saradnici (2011) su došli do preporučene temperature sušenja od 58,66 °C. Proverom preporučenih parametara vakuumskog sušenja dobijen je najveći sadržaj ukupnih tiosulfinata u osušenom crnom luku. Primenom alternativnih tehnika sušenja, kao što je sušenje infracrvenim zračenjem na temperaturi 50, 60 i 70 °C, postignuta je manja degradacija tiosulfinata dok je pri višoj temperaturi došlo je do redukcije tiosulfinata usled njihovog termolabilnog karaktera (Zhou i sar., 2017). Sharma i Prasad (2006) su optimizovali postupak sušenja mikrotalasima i ustanovili da se sušenjem na 70 °C dobija kvalitetan proizvod po pitanju sadržaja isparljivih sumpornih jedinjenja. Primenom sušenja smrzavanjem, odnosno liofilizacijom, Poojary i saradnici (2017) su zaključili da se termolabilna sumporna jedinjenja mogu očuvati u liofilizovanom crnom luku, ali neka jedinjenja su osetljiva i na primenu ove tehnike (Poojary i sar., 2017).

Sa aspekta ostvarenja maksimalnih efekata u pogledu očuvanja sadržaja bioaktivnih jedinjenja (ukupnih fenola i tiosulfinata) u procesu sušenja lista sremuša najbolji efekti su postignuti primenom konvektivne tehnike sušenja na niskoj temperaturi (40 °C). Međutim, sušenje na ovoj temperaturi zbog dugog trajanja sušenja (9 h) sa aspekta iskorišćenja kapaciteta i sa utroška energije ne predstavlja optimalno rešenje. Shodno tome, kao optimalno rešenje za sušenje lista sremuša sa aspekta minimiziranja ukupnog vremena sušenja i izbegavanja negativnih efekata na sadržaj termolabilnih komponenti može se preporučiti vakuumsko sušenje

uz primenu umerenih temperatura (50–60 °C). Odabir adekvatnog načina sušenja i temperature sušenja omogućuje minimiziranje ukupnog vremena sušenja i smanjenje degradacije termolabilnih komponenti tokom procesa sušenja, a na taj način se dobija stabilan proizvod visokog kvaliteta, u pogledu bioaktivnih jedinjenja, koji se može koristiti tokom cele godine.

4.3. Konvencionalna ekstrakcija

Za proizvodnju tečnog ekstrakta odgovarajućih karakteristika i za postizanje visoke efikasnosti ekstrakcije jedan od ključnih faktora jeste odabir odgovarajućeg rastvarača. Rastvarač koji se primenjuje za pripremu i proizvodnju ekstrakata lekovitog bilja treba odabrati na osnovu njegove selektivnosti prema jedinjenjima od interesa koja se žele ekstrahovati, zdravstvene bezbednosti, cene i njegove dostupnosti. Danas se u proizvodnju ekstrakta prednost daje rastvaračima koji su zdravstveno bezbedni, pre svega vodi i etanolu, zbog čega su upravo oni i korišćeni u okviru ove disertacije za pripremu ekstrakta lista sremuša. Za pripremu ekstrakta korišćen je suvi list sremuša.

Rezultati ukupnog prinosa ekstrakcije, kao i sadržaja ukupnih fenola i ukupnih flavonoida, u ekstraktima dobijenim konvencionalnom tehnikom ekstrakcije prikazani su u tabeli 9. Najveći prinos ekstrakcije ostvaren je primenom vode kao rastvarača, što je u skladu sa činjenicom da voda kao rastvarač ima malu selektivnost i ekstrahuje širok spektar različitih jedinjenja, dok je najmanji prinos ekstrakcije dobijen primenom 90% etanola kao rastvarača. Najveći sadržaj ukupnih fenola je detektovan u tečnom ekstraktu koji je dobijen ekstrakcijom sa 70% etanolom, dok primena 30% i 50% etanola nije dovela do međusobno velikih razlika u sadržaju ukupnih fenola, ali su dobijeni rezultati ipak bili statistički značajni (tabela 11). Najveći sadržaj flavonoida detektovan je u ekstraktima koji su dobijeni primenom 90% etanola, dok je prinos ovih bioaktivnih jedinjenja primenom ostalih rastvarača bio oko dva puta manji. Polarnost rastvarača ima glavnu ulogu u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja. Prilikom izolovanja polifenolnih jedinjenja nepoznatog profila potrebno je uraditi niz ekstrakcija rastvaračima različite polarnosti, kako bi se došlo do preciznih podataka o kvalitativnom sastavu jedinjenja ovog tipa. Promenom polarnosti rastvarača koji se primenjuje u procesu ekstrakcije menja se

efikasnost ekstrakcije, te se rastvaračima visoke polarnosti ekstrahuju fenolna jedinjenja najpolarnijeg karaktera (derivati hidroksibenzoeve i hidroksicimetine kiseline), dok se rastvaračima umerene ili male polarnosti ekstrahuju manje polarna fenolna jedinjenja (aglikoni i polimetoksilovani flavonoidi) (Harnly i sar., 2007). Dodatkom vode organskim rastvaračima kao što su metanol, etanol i aceton stvara se polarniji medijum zbog čega dolazi do bolje ekstrakcije polarnijih fenolnih jedinjenja (Kallel i sar., 2014). Na osnovu dobijenih rezultata i na osnovu prethodno navedenih naučnih činjenica može se zaključiti da u sremušu dominiraju fenolna jedinjenja različite polarnosti, a najzastupljenija su ona čija polarnost odgovara 70% etanolu, odnosno jedinjenja srednje polarnog karaktera. Na osnovu najvećeg sadržaja flavonoida koji je detektovan u ekstraktu koji je dobijen primenom 90% etanola kao ekstragensa može se zaključiti da su po polarnosti izolovani flavonoidi slični polarnosti 90% etanola.

Tabela 11 Uticaj rastvarača primenjenog u konvencionalnoj ekstrakciji na prinos ekstrakcije, sadržaj ukupnih fenola i sadržaj ukupnih flavonoida

Rastvarač	Prinos ekstrakcije (%)	Ukupni fenoli (g EGK/100 g SD)	Ukupni flavonoidi (g KE/100 g SD)
H₂O	36,32	1,20 ^a	0,22 ^a
30% EtOH	28,73	1,23 ^b	0,17 ^b
50% EtOH	29,63	1,25 ^c	0,21 ^c
70% EtOH	23,79	1,29 ^d	0,32 ^d
90% EtOH	16,03	0,73 ^e	0,42 ^e

Vrednosti obeležene istim slovom u koloni nisu značajno različite na 5% (Tukey's test).

EGK – ekvivalent galne kiseline, KE – ekvivalent katehina, SD – suva droga

Gîtin i saradnici (2012) su takođe koristili list sremuša kao biljnu sirovinu za ekstrakovanje fenola i flavonoida. Onisu dobili znatno veći sadržaj ukupnih fenola (27,88 g EGK/100 g suve droge) primenom 70% etanola kao rastvarača u postupku maceracije, u trajanju od 12 dana. Osim što su koristili sirovinu sa drugog područja (Rumunija), značajno veće razlike u poređenju sa rezultatima dobijenim u okviru ove disertacije se mogu objasniti i značajno dužim vremenom ekstrakcije (12 puta).

4.4. Ultrazvučna ekstrakcija

Za dobijanje ekstrakta sa visokim sadržajem bioaktivnih jedinjenja bitno je ispitati uticaj parametara ekstrakcije koji utiču na željene karakteristike ekstrakta. Dominantni faktor, koji utiče na ekstrakciju, bez obzira na primenjenu tehniku ekstrakcije je svakako rastvarač. U ultrazvučnoj ekstrakciji druga dva značajna parametra koja utiču na ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja su temperatura i vreme ekstrakcije. Osim što direktno utiču na troškove procesa, temperatura i vreme ekstrakcije mogu pozitivno, ali i negativno (usled degradacije termolabilnih jedinjenja) uticati na kvalitet dobijenog ekstrakta, naročito u kombinaciji visoke temperature i dužeg vremena ekstrakcije (Wang i Weller, 2006). Četvrti dominantan parametar koji može da se varira u procesu ultrazvučne ekstrakcije i da pri tome utiče na kvalitet dobijenih ekstrakta jeste ultrazvuk, odnosno snaga ultrazvuka. Pored snage ultrazvuka koja se primenjuje prilikom ekstrakcije, frekvencija i distribucija ultrazvučnih talasa takođe bitno utiču na proces ultrazvučne ekstrakcije (Chemat i sar., 2017; González-Centeno i sar., 2014). Učinak ultrazvuka je korisniji pri nižim frekvencijama (18–40 kHz), dok je praktično zanemarljiv u rasponu od 400–800 kHz (Mitra, 2003). Proces ultrazvučne ekstrakcije je neophodno optimizovati, pre svega zbog činjenice da usled delovanja ultrazvuka dolazi do drastičnih promena u samom medijumu, te su moguće disocijacije molekula i nastanak slobodnih radikala na račun razgradnje ciljanih bioaktivnih komponenti (Tiwari, 2015). Zbog toga je, a u cilju dobijanja ekstrakta lista sremuš sa visokim sadržajem bioaktivnih jedinjenja u ovoj doktorskoj disertaciji analiziran uticaj četiri procesna parametra (koncentracija ekstragenta, temperatura, vreme i snaga ultrazvuka). Karakteristike dobijenih ekstrakta koje su analizirane tokom procesa ultrazvučne ekstrakcije su: ukupan prinos ekstrakcije, sadržaj ukupnih fenola, sadržaj ukupnih flavonoida i antioksidativna aktivnost izražena kao IC_{50} vrednost.

4.4.1. Provera modela

Rezultati ispitivanih promenljivih, prinos ekstrakcije, sadržaj ukupnih fenola, sadržaj ukupnih flavonoida i antioksidativna aktivnost (izražena kao IC_{50}) u ekstraktima dobijenim pri različitim uslovima ultrazvučne ekstrakcije prikazani su u tabeli 12. Dobijeni rezultati su fitovani kvadratnim modelom drugog reda (jednačina 7), a koeficijenti regresije koji odgovaraju ispitivanim promenljivim su dobijeni korišćenjem metode najmanjih kvadrata. Za proveru slaganja modela sa eksperimentalnim podacima korišćena je analiza varijanse (ANOVA) i deskriptivna statistika (koeficijent determinacija i koeficijent varijacije), a rezultati su prikazani u tabeli 11.

Primenom polinomne jednačine drugog reda (jednačina 7) matematički model koji opisuje ispitivani sistem i uticaj statistički značajnih ispitivanim ekstrakcionih parametara se može prikazati sledećim jednačinama:

$$EY = 36,66 + 1,44X_1 - 2,05X_1X_4 - 1,64X_2^2 - 1,07X_4^2 \quad (9)$$

$$TF = 1,26 + 0,03X_3 + 0,05X_1X_2 + 0,14X_1X_3 - 0,10X_1X_4 + 0,52X_1^2 \quad (10)$$

$$TFI = 0,13 + 0,13X_2 - 0,01X_3 + 0,10X_2^2 \quad (11)$$

$$IC_{50} = 0,91 - 0,08X_1 + 0,05X_2 + 0,15X_1X_4 \quad (12)$$

Tabela 52 Centralni kompozitni dizajn sa kodiranim i stvarnim vrednostima

Redni broj	Nezavisne promenljive				Odziv			
	Temperatura (°C)	Koncentracija etanola (%)	Vreme ekstrakcije (min)	Snaga ultrazvuka (W/l)	Prinos ekstrakcije (%)	Sadržaj ukupnih fenola (g EGK/100 g SD)	Sadržaj ukupnih flavonoida (g KE/100 g SD)	IC ₅₀ (mg/ml)
1	0 (60)	0 (50)	0 (60)	0 (28,8)	37,67	1,27	0,11	0,86
2	0 (60)	0 (50)	1 (80)	-1(19,2)	33,93	1,25	0,10	0,98
3	1 (80)	0 (50)	1 (80)	0 (28,8)	41,42	1,44	0,13	0,76
4	-1 (40)	0 (50)	1 (80)	0 (28,8)	34,95	1,14	0,12	1,03
5	0 (60)	1 (70)	0 (60)	-1(19,2)	34,73	1,27	0,35	0,86
6	1 (80)	-1 (30)	0 (60)	0 (28,8)	35,13	1,16	0,09	0,82
7	0 (60)	0 (50)	0 (60)	0 (28,8)	35,62	1,28	0,13	0,91
8	0 (60)	-1 (30)	0 (60)	1 (38,4)	33,34	1,15	0,09	0,88
9	0 (60)	0 (50)	0 (60)	0 (28,8)	36,5	1,25	0,13	0,83
10	1 (80)	1 (70)	0 (60)	0 (28,8)	35,74	1,33	0,36	0,87
11	0 (60)	-1 (30)	-1 (40)	0 (28,8)	34,27	1,24	0,09	0,71
12	1 (80)	0 (50)	0 (60)	1 (38,4)	33,71	1,09	0,14	1,16
13	0 (60)	0 (50)	0 (60)	0 (28,8)	36,88	1,28	0,12	0,91
14	-1 (40)	-1 (30)	0 (60)	0 (28,8)	36,18	1,22	0,09	10,35
15	0 (60)	-1 (30)	1 (80)	0 (28,8)	36,77	1,24	0,09	0,82
16	0 (60)	1 (70)	0 (60)	1 (38,4)	34,33	1,21	0,34	0,99
17	0 (60)	0 (50)	-1 (40)	1 (38,4)	34,64	1,30	0,13	0,92
18	-1 (40)	0 (50)	0 (60)	-1(19,2)	34,15	1,07	0,13	1,25
19	0 (60)	-1 (30)	0 (60)	-1(19,2)	34,88	1,19	0,09	0,83
20	1 (80)	0 (50)	0 (60)	-1(19,2)	39,5	1,32	0,15	0,73
21	0 (60)	0 (50)	1 (80)	1 (38,4)	36,64	1,19	0,11	0,81
22	1 (80)	0 (50)	-1 (40)	0 (28,8)	38,85	0,92	0,14	0,77
23	0 (60)	1 (70)	-1 (40)	0 (28,8)	34,23	1,28	0,40	10,77
24	0 (60)	1 (70)	1 (80)	0 (28,8)	34,65	1,29	0,37	1,02
25	0 (60)	0 (50)	-1 (40)	-1(19,2)	34,41	1,21	0,12	0,95
26	-1 (40)	0 (50)	0 (60)	1 (38,4)	36,56	1,27	0,10	0,89
27	-1 (40)	1 (70)	0 (60)	0 (28,8)	32,00	1,16	0,39	0,99
28	-1 (40)	0 (50)	-1 (40)	0 (28,8)	33,19	1,21	0,13	10,13
29	0 (60)	0 (50)	0 (60)	0 (28,8)	36,63	1,21	0,13	0,82

EGK – ekvivalent galne kiseline, KE – ekvivalent katehina, IC₅₀ – inhibitorna koncentracija, SD – suva droga

Koeficijent korelacije je varirao od 0,68 do 0,99 za različite promenljive. Iako je u slučaju ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti koeficijent korelacije bio nizak (0,71), i predstavljao umereno dobru aproksimaciju za korišćenje polinomne jednačine drugog reda, korišćenjem analize varijansi je potvrđeno dobro slaganje modela sa realnim vrednostima sa značajnim p -vrednostima za model ($p < 0,1$), kao i neznačajnim p -vrednostima za neslaganjem sa modelom ($p > 0,05$).

4.4.1. Uticaj procesnih parametara ultrazvučne ekstrakcije

Na osnovu podataka iz tabele 13 uočava se da je značajan uticaj na prinos ekstrakcije imao linearni član temperature ($p < 0,01$). Istovremeno delovanje temperature i snage ultrazvuka, kao i kvadratni član koncentracije etanola su imali značajan, ali negativan uticaj na prinos ekstrakcije. Umereno delovanje na prinos ekstrakcije je imao i kvadratni član rastvarača, dok je uticaj ostalih članova zanemarljiv. Najniži prinos (32,0%) ekstrakcije je postignut na temperaturi od 40 °C, u ekstrakciji pri kojoj je kao rastvarač primenjen 70% etanolu trajanju od ukupno 60 min ekstrakcije, pri primenjenom ultrazvuku jačine od 28,8 W/L. Najveći prinos ekstrakcije (41,4%) je postignut na najvišoj temperaturi i pri najdužem trajanju vremena ekstrakcije uz primenjen 50% etanol kao rastvarača i jačine ultrazvuka od 28,8 W/L. Kako bi se bolje procenio međusoban uticaj dva parametra potrebno je analizirati grafik odzivne površine analiziranog modela, pri čemu je analizirana površina dobijena variranjem dva parametra a konstantnom trećem parametru (Zhang i sar., 2011). Ovakav način prikazivanja rezultata je u skladu sa regresionom analizom, a omogućava bolju vizualizaciju uticaj procesnih parametara na posmatrane i dobijene odzive.

Tabela 13 Analiza varijanse (ANOVA) fitovanja rezultata polinomnim modelom drugog reda

Član	Koefficient regresije			
	Prinos ekstrakcije	Ukupni fenoli	Ukupni flavonoidi	DPPH test
Odsečak				
β_0	36,6612	1,2643	0,1301	0,91
Linearni				
β_1	1,4423*	0,0145	0,0042	-0,0840*
β_2	-0,4076	0,0284	0,1398*	0,0568**
β_3	0,7304	0,0314***	-0,0074***	-0,0025
β_4	-0,1976	-0,0074	-0,0023	0,01
Zavisni				
$\beta_{1,2}$	11,955	0,0569***	-0,0092	0,0208
$\beta_{1,3}$	0,2019	0,1476*	-0,0001	-0,0057
$\beta_{1,4}$	-2,0503**	-0,1072*	0,0057	0,1547*
$\beta_{2,3}$	-0,5194	0,0025	-0,0068	-0,0483
$\beta_{2,4}$	0,2851	-0,0067	-0,0007	0,0215
$\beta_{3,4}$	0,6211	-0,0356	-0,0019	-0,0377
Kvadratni				
$\beta_{1,1}$	0,2511	-0,0528**	0,0044	0,0448
$\beta_{2,2}$	-1,6418**	-0,0024	0,1031*	0,0144
$\beta_{3,3}$	-0,1791	0,0055	0	0,0072
$\beta_{4,4}$	-1,0705***	0,0278	0,0004	0,0388
R^2 ^a	0,7398	0,788	0,9911	0,6864
CV ^b	4,0895	5,0200	8,2188	8,5588
p modela	0,0300	0,098	< 0,0001	0,0056
p lack of fit	0,0659	0,0570	0,0566	0,0677

* $p < 0,01$ ** $0,01 \leq p < 0,05$ *** $0,05 \leq p < 0,1$ ^a Koefficient determinacije^b koefficient varijacije [%]^c verovatnoća F-testa ispitivanog modela^d verovatnoća F-testa neslaganja (*lack of fit*)IC₅₀ – inhibitorna koncentracija

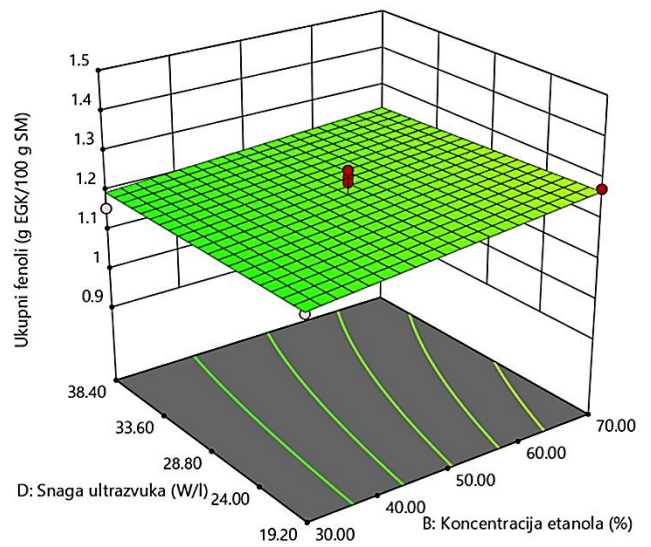
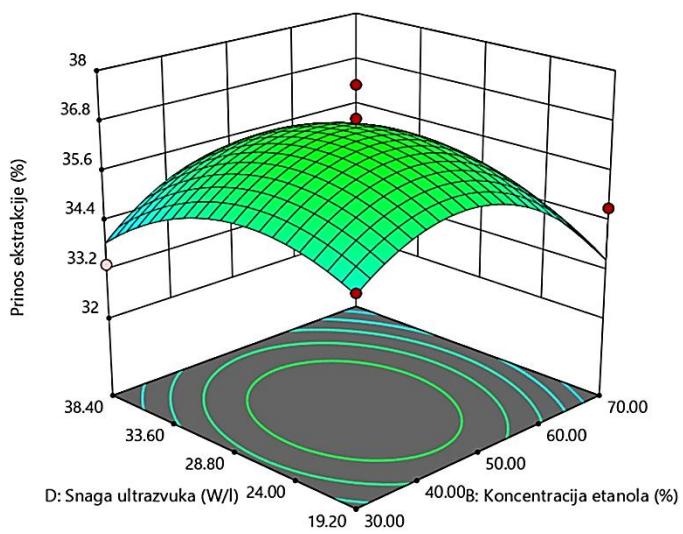
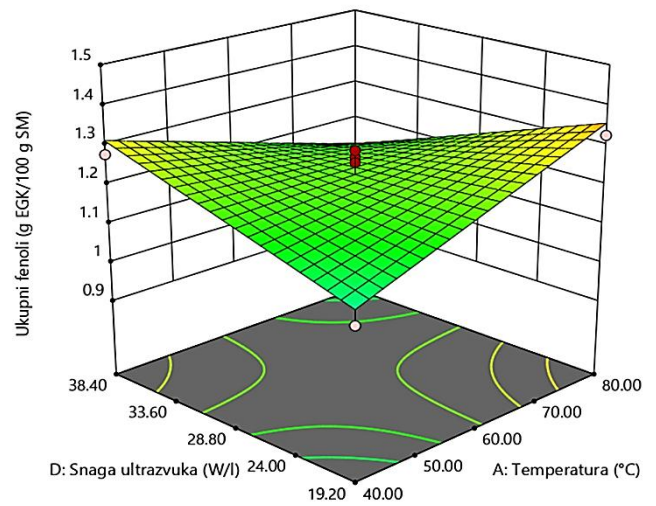
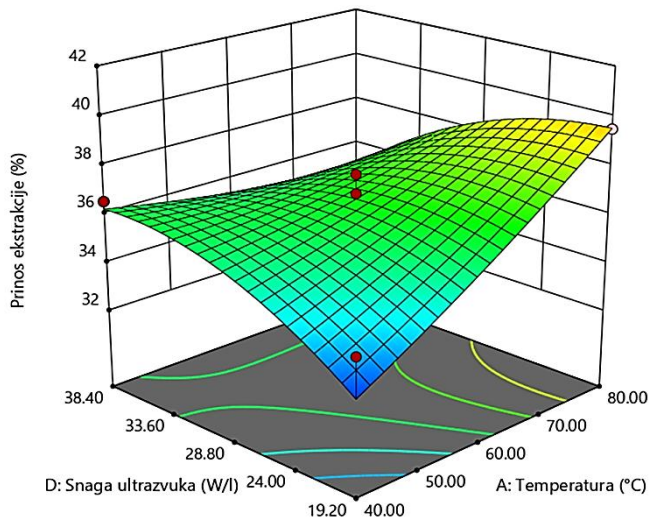
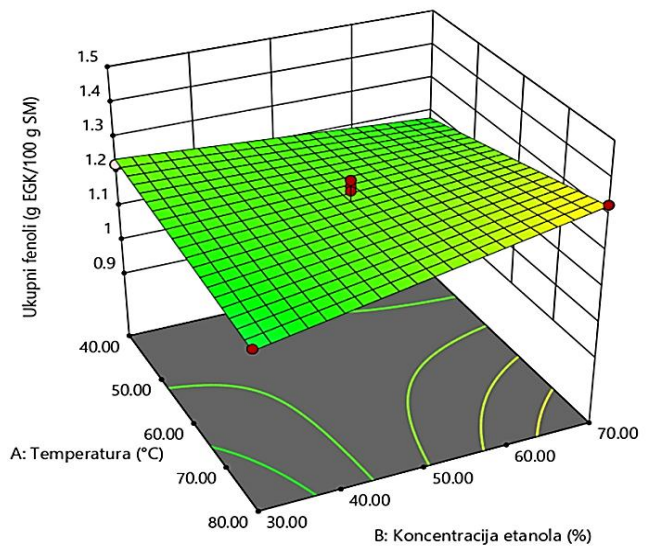
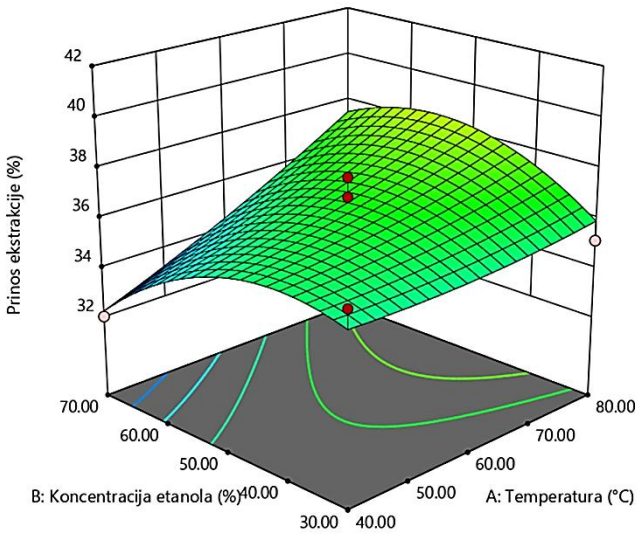
Pozitivni uticaj temperature i negativan uticaj kvadratnog člana koncentracije etanola i snage ultrazvuka na ukupan prinos ekstrakcije je prikazan na slici 36. Analiziranjem uticaja koncentracije primećuje se da se najbolji prinos ekstrakcije postiže primenom približno 50% koncentracije etanola. Ovaj podatak ukazuje na to da su u analiziranom suvom listu sremuša prisutne komponente sa umereno polarnim karakterom, odnosno onom koji odgovara polarnosti 50% etanola. Interakcija temperature i snage ultrazvuka ima negativno delovanje na prinos ekstrakcije što bi značilo da povećanjem snage ultrazvuka i povećanjem temperature tokom ultrazvučne ekstrakcije dolazi do intenzivnije degradacije biokativnih komponenti što rezultuje smanjenim ukupnim prinosom ekstrakcije. Ovo je u skladu i sa tvrdnjom Teh i Birch (2014), prema kojoj primenom manje jačine ultrazvuka u kombinaciji sa visokom temperaturom može doći do smanjenja degradacije bioaktivnih jedinjenja

Sadržaj ukupnih fenola ekstrakcije je varirao od 0,92 do 1,44 g EGK/100 g suvog lista sremuša. Najniži prinos ukupnih fenola je dobijen primenom 50% etanola kao rastvarača pri najvišoj temperaturi ekstrakcije (80 °C) i najkraćem vremenu ekstrakcije (40 min), dok je snaga ultrazvuka iznosila 28,8 W/l. Povećanjem temperature, povećava se brzina difuzije i rastvorljivost bioaktivnih komponenti, međutim za bolji prinos ukupnih fenola, značajno je i vreme ekstrakcije. Korišćenjem istog rastvarača (50% etanola) na istoj temperaturi ekstrakcije (80 °C) i snagi ultrazvuka (28,8 W/l) postignut je najveći sadržaj ukupnih fenola, ali je trajanje ekstrakcije bilo mnogo duže (80 min). Najveći sadržaj ukupnih fenola je dobijen pri istim uslovima pri kojima je ostvaren i najveći prinos ekstrakcije.

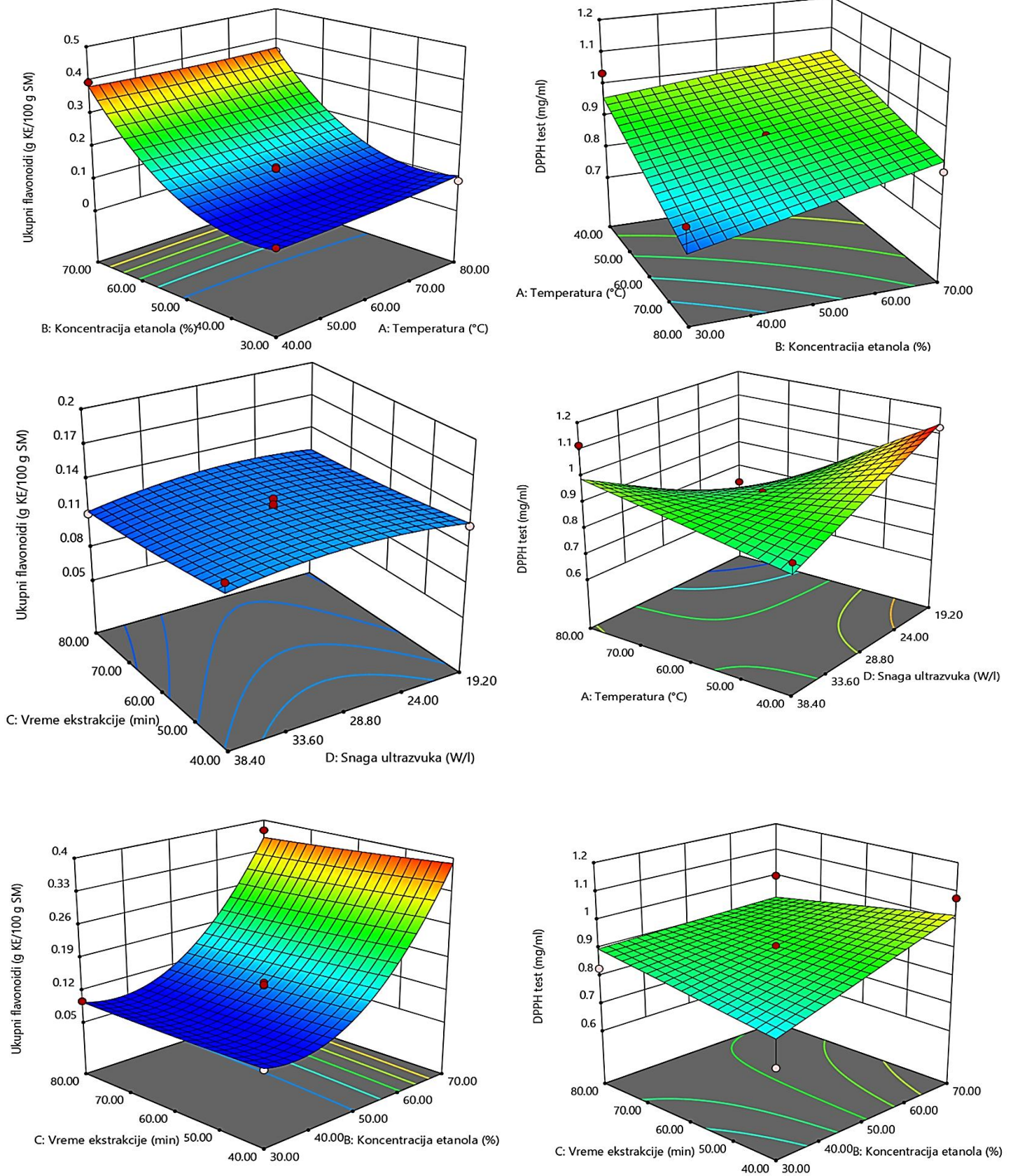
Matematičkom analizom procesnih parametara i dobijenih odziva, u ovom slučaju sadržaja ukupnih fenola, utvrđeno je da linearni član vremena trajanja ekstrakcije pokazuje umereno pozitivan uticaj ($0,01 < p < 0,05$) na sadržaj ukupnih fenola, što znači da će u ispitivanom domenu, duže vreme ekstrakcije umereno uticati na povećanje sadržaja ukupnih fenola. Isti efekat ispoljava i interakcija vremena ekstrakcije i koncentracije etanola kao primenjenog rastvarača. Interakcija između temperature i vremena trajanja ekstrakcije, kao i temperature i jačine ultrazvuka, je ostvarila značajan uticaj na sadržaj ukupnih fenola ($p < 0,01$) (slika 32). Interakcija temperature i vremena ekstrakcije je pozitivno uticala na sadržaj ukupnih fenola, odnosno povećanjem ovih parametara, ili jednog od njih, povećava se sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu. Uticaj interakcije ova dva procesna parametra se može objasniti višestrukim efektom temperature na proces prenosa mase, kao što je degradacija ćelija biljnog materijala, poboljšana penetracija rastvarača tokom vremena i poboljšana difuzija aktivnih komponenti (Sališová i sar., 1997). To je u skladu sa istraživanjima vezanim

za ultrazvučnu ekstrakciju polifenola iz sporednog proizvoda aronije u sličnom eksperimentalnom domenu (Ramić i sar., 2015). Međutim, interakcija između temperature i jačine ultrazvuka ispoljava značajan negativni uticaj na sadržaj ukupnih fenola, odnosno povećanje oba parametra dolazi do smanjenja sadržaja ukupnih fenola, dok smanjenje jednog a povećanje drugog parametra utiče na povećanje sadržaja ukupnih fenola. Iz slike 32 može se zaključiti da se interakcijom temperature i snage ultrazvuka na srednjim vrednostima postiže najveći prinos. Negativan uticaj kvadratnog člana temperature značajno utiče na sadržaj ukupnih fenola. Ovaj negativni uticaj kvadratnog člana temperature se objašnjava nedovoljnom efikasnošću ekstrakcije ukupnih fenola na nižim temperaturama i degradacijom izolovanih fenola usled primene visoke temperature.

Različiti autori su koristili različite metode ekstrakcije i različite rastvarače za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz sremuša (Đurđević i sar., 2004; Gîtin i sar., 2012; Oszmiański i sar., 2013). Đurđević i saradnici (2004) su tako za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz sremuša koristili vreli 80% metanol (vreme ekstrakcije 4 h) a nakon toga vreli etil acetat (vreme ekstrakcije 4 h). Sadržaj ukupnih fenola u sirovini izrazili su kao ekvivalent ferulne kiseline i on je iznosio 3,24 mg/g suve droge. Gîtin i saradnici (2012) su za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz svežeg lista kao ekstragens primenili 70% etanol u trajanju od 12 dana na sobnoj temperaturi. Za poređenje efikasnosti ekstrakcionih tehnika Gîtin i saradnici (2012) su primenili isti rastvarač ali u ultrazvučnoj ekstrakciji na sobnoj temperaturi tokom 2 sata, primenom frekvencije od 35 kHz. Primenom ultrazvučne ekstrakcije tokom 2 sata, ostvareno je oko 30% od prinosa ukupnih fenola dobijenih nakon 12 dana maceracije (27.88 mg EGK/100 g suve droge). Poređenjem rezultata klasične i ultrazvučne ekstrakcije istim ekstragensom, dobijenih u okviru ove doktorske disertacije, može se zaključiti da se znatno bolji rezultati za ukupni prinos, ukupne fenole i ukupne flavonoide dobijaju primenom ultrazvučne ekstrakcije u odnosu na maceraciju ukupnog trajanja od 24 h. Ovi podaci ukazuje na činjenicu da se primenom ultrazvuka može značajno skratiti vreme ekstrakcije. Međutim, u ultrazvučnoj ekstrakciji ostali parametri mogu takođe značajno doprineti povećanju sadržaju ukupnih fenola, pre svega vreme ekstrakcije, temperature ekstrakcije i snaga ultrazvuka. Variranjem procesnih parametara i izborom ekstrakcione tehnike značajno se utiče na maksimizaciju prinosa željenih komponenti. Osim primenjene tehnike, ekstragensa i procesnih parametara na sadržaj bioaktivnih komponenti u ekstraktima sremuša utiče i poreklo biljne sirovine, odnosno lokalitet branja/sakupljanja.



Slika 32 Uticaj precisnih parametara ultrazvučne ekstrakcije na prinos ekstrakcije i sadržaj ukupnih fenola



Slika 33 Uticaj procesnih parametara ultrazvučne ekstrakcije na sadržaj ukupnih flavonoida i antioksidativnu aktivnost, DPPH test

Sadržaj ukupnih flavonoida u zavisnosti od parametara ekstrakcije u ultrazvučnoj ekstrakciji se kretao u rasponu od 0,09 do 0,40 g KE/100 g suvog lista sremuša. Primenom ultrazvučne ekstrakcije, pri određenim procesnim parametrima, dobijen je i značajno veći sadržaj ukupnih flavonoida u poređenju sa konvencionalnom ekstrakcijom/maceracijom, u opsegu primenjenih ekstragensa od 30 do 70% etanola. Ipak, pri određenim procesnim parametrima, sadržaj ukupnih flavonoida bio je i značajno manji u odnosu na sadržaj ostvaren primenom konvencionalne ekstrakcije. Iz tabele 11 se vidi da je na sadržaj ukupnih flavonoida značajan uticaj imao rastvarač i njegov linearni i kvadratni član. Najmanji sadržaj ukupnih flavonoida je dobijen primenom 30% etanola kao rastvarača, dok se sadržaj povećavao sa povećanjem sadržaja etanola u primenjenom ekstragensu u ispitivanom eksperimentalnom domenu. Ghafoor i saradnici (2009) su ustanovili da polarnost rastvarača značajno utiče na izolovanje kako fenola tako i flavonoida. Povećanjem udela etanola u smeši voda/etanol menja se polarnost rastvarača koja pogoduje izolovanju flavonoida iz lista sremuša. Manja polarnost rastvarača je uticala na veći sadržaj flavonoida, a na osnovu najvećeg sadržaja flavonoida u 70% etanolu može se zaključiti da su po polarnosti izekstrahovani flavonoidi slični polarnosti 70% etanola.

Vreme ekstrakcije je imalo umereno značajan ($p < 0,1$) negativan uticaj na ekstrakciju ukupnih flavonoida tokom ultrazvučne ekstrakcije u ispitivanom domenu. Iako ostali parametri nisu ispoljili značajan uticaj na sadržaj ukupnih flavonoida, iz slike 33 se može zaključiti da primenom kraćeg vremena i primenom umerene snage ultrazvuka može ostvariti sličan sadržaj ukupnih flavonoida kao i pri dužem vremenu ekstrakcije i/ili većoj snazi ultrazvuka. Primenom manje jačine ultrazvuka i kraćeg vremena ekstrakcije mogu se smanjiti troškovi ekstrakcije, a da to značajno ne utiče na prinos ukupnih flavonoida.

Najviša antioksidativna aktivnost analiziranih ekstrakta (0,71 mg/mL) je dobijena primenom 30% etanola, na temperaturi od 60 °C i primenom ultrazvuka od 28,8 W/l u trajanju od 40 minuta. Iz rezultata prikazanih u tabeli 13 i jednačina 9-12, najznačajniji parametri su bili temperatura, koncentracija etanola kao rastvarača i interakcija između primenjene temperature ekstrakcije i jačine ultrazvuka. Veća snaga ultrazvuka može doprineti oštećenju ćelijskog zida biljnog materijala i na taj način poboljšati ekstrakciju, ali isto tako može da doprinese i degradaciji osetljivih komponenti, kao što je slučaj i sa temperaturom (Ghafoor i sar., 2009).

Na osnovu ovog zaključka i slike 33 za postizanje veće antioksidativne aktivnosti ekstrakta sremuša treba izbegavati istovremenu primenu najviše temperature i najveće jačine

ultrazvuka iz domena ovog eksperimenta. Analiziranjem slike 37 i značajnog uticaja temperature (tabela 13) na antioksidativnu aktivnost, može se zaključiti da se najbolja antioksidativna aktivnost ekstrakta lista sremuša postiže primenom veće temperature na manjoj jačini ultrazvuka. Pirsonovim testom dobijena je umerena pozitivna korelacija između antioksidativne aktivnosti i ukupnih fenola ($R^2=0,75$) i antioksidativne aktivnosti i ukupnih flavonoida ($R^2=0,80$). Iz ove korelacije možemo videti da antioksidativnoj aktivnosti najviše doprinose ukupni flavonoidi od izolovanih komponenti prisutnih u ekstraktu. Međutim, kako su Kinalski i saradnici (2014) su antioksidativnu potencijal sremuša pripisali i sumpornim jedinjenjima, zbog umerene korelacije sa fenolima i flavonoidima, može se pretpostaviti da su o potencijalno izolovana sumporna jedinjenja uticala na antioksidativni potencijal dobijenih ekstrakta.

4.4.2. Optimizacija procesnih parametara ultrazvučne ekstrakcije

Na osnovu eksperimentalnih rezultata i statističke analize, izvršene su numeričke optimizacije kako bi se utvrdio optimalan nivo nezavisnih procesnih parametara za dobijanje ekstrakta lista sremuša željenog kvaliteta i karakteristika. Određivanje optimalnih uslova i predviđenih vrednosti zasnovano je na poželjnoj funkciji, $D=0,878$. Na osnovu izvršene optimizacije, dobijeni su uslovi na kojima treba da se izvodi ultrazvučna ekstrakcija lista sremuša u cilju ekstrakta optimalnog kvaliteta u pogledu sadržaja bioaktivnih komponenti. Ovi uslovi su: 80 °C temperatura, 70% etanol, 79,8 min vreme ekstrakcije i snaga ultrazvuka od 20,06 W/L.

Teorijski pretpostavljeni rezultati su eksperimentalno potvrđeni sa odstupanjem $\pm 5\%$. Predviđene i eksperimentalne vrednosti zavisnih promenljivih su prikazane u tabeli 14.

Tabela 14 Predviđene i eksperimentalne vrednosti dobijene na optimalnim uslovima ultrazvučne ekstrakcije

Ispitivana promenljiva	Predviđena vrednost ^a	Eksperimentalna vrednost ^b
Ukupni fenoli (g EGK/100 g SD)	1,60±0,23	1,61±0,36
Ukupni flavonoidi (g KE/100 g SD)	0,35±0,05	0,41±0,04
Antioksidativna aktivnost (IC₅₀, mg/ml)	0,71±0,27	0,73±0,013
Prinos ekstrakcije (%)	38,07±5,39	36,70±4,17

^a predviđena vrednost odziva ± 5% interval poverenja

^b srednja vrednost ± standardno odstupanje (n=3)

EGK – ekvivalent galne kiseline

KE – ekvivalent katehina

IC – inhibitorna koncentracija

SD – suva droga

Iako je primenom maceracije najviši sadržaj ukupnih fenola (1,29 g EGK/100 suvog lista sremuša) ostvaren primenom 70% etanola, a najviši sadržaj ukupnih flavonoida (0,42 g KE/100 suvog lista sremuša) ostvaren primenom 90% etanol za u ultrazvučnoj ekstrakciji je najbolji rezultati postignut primenom 50% etanola. Ultrazvučnom ekstrakcijom pri optimalnim uslovima dobijeni su značajno bolji rezultati ukupnog prinosa ekstrakcije, sadržaja ukupnih fenola i sadržaja ukupnih flavonoida u poređenju sa konvencionalnom ekstrakcijom, maceracijom, kada se kao rastvarač koristi 70% etanol. U prilog ultrazvučnoj ekstrakciji ide i značajna redukcija trajanja procesa (18 puta kraće vreme trajanja ultrazvučne ekstrakcije u poređenju sa konvencionalnom tehnikom).

4.5. Ekstrakcija subkritičnom vodom

U analizi ekstrakcije suvog lista sremuša subkritičnom vodom ispitan je uticaj procesnih parametara (temperatura, vreme ekstrakcije i dodatka HCl) pre svega na prinos bioaktivnih jedinjenja. Uticaj procesnih parametara je ispitan u cilju dobijanja ekstrakta sa visokim sadržajem ukupnih fenola i ukupnih flavonoida, kao i visokim antioksidativnim potencijalom. U ekstrakciji subkritičnom vodom, povećanjem temperature dolazi do fizičko-hemijskih promena primenjenog rastvarača odnosno vode, pri čemu dolazi do smanjenja njene gustine i dielektrične konstante, a do povećanja konstante jonizacije. Međutim, zbog primene visokih temperatura tokom ekstrakcije subkritičnom vodom može doći do razgradnje termolabilnih komponenti, koje se nalaze u sirovini koja se ekstrahuje, kao i do formiranja novih hemijskih jedinjenja od jedinjenja već prisutnih u matriksu. Često dolazi do neenzimskog tamnjenja i stvaranja proizvoda Maillardove reakcije, karamelizacije i oksidacije fenolnih jedinjenja usled primene visoke temperature (Herrero i sar., 2012). Shodno tome, od velikog je interesa da se proces ekstrakcije odabranog matriksa subkritičnom vodom analizira sa aspekta efikasnosti ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja, tako i aspekta formiranja nepoželjnih toksičnih komponenti, poput 5-hidroksimetil furfurala (5-HMF) i furfurala (F). Do negativnog uticaja temperature često dolazi usled produžavanja vremena ekstrakcije, te je vreme bitan parametar u ovoj ekstrakcionoj tehnici i značajno utiče na efikasnost ekstrakcije, odnosno kvalitet dobijenog proizvoda. Da bi se ostvario što veći prinos ciljanih jedinjenja i poboljšala soljubilizacija i transfer mase, u procesu ekstrakcije subkritičnom vodom mogu se koristiti aditivi, kao što su organske i neorganske kiseline (Heng i sar., 2013; Plaza i Turner, 2015), zbog čega je, pored vremena i temperature, upravo dodatak kiseline posmatran kao treći procesni parametar, koji značajno može da utiče na tok i prinos ekstrakcije subkritičnom vodom.

4.5.1. Provera modela

Rezultati uticaja procesnih parametara ekstrakcije subkritičnom vodom na ispitivane zavisne promenljive (sadržaj bioaktivnih jedinjenja i antioksidativni potencijal) u ekstraktima lista sremuša dobijenim pri različitim uslovima ekstrakcije prikazani su u tabeli 15.

Dobijeni rezultati su fitovani po modelu kvadratne jednačine drugog reda (jednačina 3), a koeficijenti korelacije koji odgovaraju ispitivanim promenljivim su dobijeni korišćenjem metode najmanjih kvadrata. Za proveru slaganja modela sa eksperimentalnim podacima korišćena je statistička analiza varijanse (ANOVA) i deskriptivna statistika za dodatne informacije o modelu. Statistička analiza pokazala je da je predloženi model odgovarajući i u skladu sa Fisherovim testom ($p \leq 0,05$) za poklapanje se modelom i neznačajnim p -vrednostima za neslaganje sa modelom ($p > 0,05$) (tabela 16). Primenom kvadratne jednačine drugog reda (jednačina 1), predložene jednačine pružaju dobro poklapanje eksperimentalnih vrednosti sa visokim koeficijentom korelacije ($R^2 = 0,92$ do $0,99$). Dobijeni matematički modeli koji opisuju ispitivani sistem se mogu prikazati sledećim jednačinama:

$$EY = 50,1033 - 6,1412X_1 + 5,9725X_3 - 5,52979X_1^2 - 5,0454X_3^2 \quad (13)$$

$$TP = 3,6079 + 0,9061X_1 + 0,4971X_3 - 1,0237X_1^2 - 0,6032X_3^2 \quad (14)$$

$$TF = 0,5812 + 0,2190X_1 - 0,0649X_3 - 0,1330X_1^2 - 0,1516X_3^2 \quad (15)$$

$$DPPH (IC_{50}) = 0,0549 - 0,1802X_1 - 0,0306X_3 + 0,0339X_1X_3 + 0,1758X_1^2 \quad (16)$$

$$ABTS = 9,8388 + 4,4439X_1 - 3,7924X_1^2 \quad (17)$$

Tabela 15 Box-Behnken eksperimentalni dizajn subkritične ekstrakcije sa kodiranim i stvarnim vrednostima

Redni broj	Nezavisna promenljiva			Odziv				
	Temperatura (°C)	Vreme ekstrakcije (min)	Dodatak HCl (%)	Prinos ekstrakcije (%)	Sadržaj ukupnih fenola (g EGK/100 g SD)	Sadržaj ukupnih flavonoida (g KE/100 g SD)	Antioksidativna aktivnost	
							DPPH test (mg/ml)	ABTS test (mM TEX/100 g SD)
1	0 (160)	-1 (10)	1 (1,5)	53,26	3,92	0,56	0,05	1031,46
2	1(120)	0 (20)	-1 (0)	38,44	0,97	0,11	0,47	391,16
3	0 (160)	-1 (10)	0 (0,75)	49,36	1,35	0,17	0,45	245,76
4	0 (160)	0 (20)	0 (0,75)	48,64	3,68	0,58	0,05	936,54
5	0 (160)	0 (20)	0 (0,75)	52,56	3,69	0,61	0,05	1058,26
6	1 (200)	-1 (10)	0 (0,75)	41,16	4,00	0,71	0,04	1364,48
7	1 (200)	1 (30)	0 (0,75)	37,00	3,33	0,66	0,07	1048,62
8	0 (160)	0 (20)	0 (0,75)	49,11	3,46	0,55	0,06	1016,74
9	1 (200)	0 (20)	-1 (0)	26,2	2,48	0,48	0,07	943,67
10	1 (200)	0 (20)	1 (1,5)	41,88	2,85	0,50	0,05	910,76
11	0 (160)	1 (30)	-1 (0)	40,62	2,43	0,36	0,07	925,30
12	0 (160)	-1 (10)	-1 (0)	42,16	2,00	0,23	0,10	908,87
13	-1 (120)	0 (20)	1 (1,5)	52,52	1,63	0,10	0,31	201,66
14	0 (160)	1 (30)	1 (1,5)	47,54	3,45	0,54	0,04	1180,12
15	-1 (120)	1 (30)	0 (0,75)	55,05	1,45	0,22	0,43	196,07

EGK – ekvivalent galne kiseline, KE – ekvivalent katehina , IC – inhibitorna koncentracija, TEX – ekvivalent troloksa, SD – suva droga

4.5.2. Uticaj procesnih parametara subkritične ekstrakcije

Na osnovu vrednosti prikazanih u tabeli 15, sadržaj ukupnih fenola u zavisnosti od parametara ekstrakcije varirao je od 0,97 to 4,00 g EGK/100 g suvog lista sremuša, dok se sadržaj ukupnih flavonoida kretao u intervalu od 0,10 do 0,71 g KE/100 g suvog lista sremuša. Najveći sadržaj ukupnih fenola je dobijen na najvišoj temperaturi (200 °C), sa dodatkom 0,75% HCl u trajanju ekstrakcije od 10 minuta. Primena ovih parametara rezultirala je dobijanjem i najvišeg sadržaja flavonoida, kao i najveće antioksidativne aktivnosti. Najniži sadržaj ukupnih fenola je dobijen na najnižoj temperaturi, bez dodatka HCl u trajanju od 20 minuta, dok je najniži sadržaj ukupnih flavonoida dobijen na najnižoj temperaturi u vremenu od 20 min uz dodatak 1,5% HCl. Rastvorljivost fenola u određenom

rastvaraču u velikoj meri zavisi od hemijske strukture fenola i polarnosti rastvarača. Ahmadian-Kouchaksaraie i saradnici (2016) i Xu i saradnici (2015) su došli do zaključka da visoke temperature tokom ekstrakcije mogu dovesti do degradacije fenola.

Međutim, kod ekstrakcije sremuša vodom u subkritičnom stanju, povećanjem temperature došlo je do povećanja sadržaja ukupnih fenola i flavonoida, što je uticalo i na bolju antioksidativnu aktivnost dobijenih ekstrakta. Iako je temperatura imala negativan uticaj na ukupni prinos ekstrakcije, upravo najveći sadržaj ukupnih fenola (4,00 g EGK/100 g suvog lista sremuša) i ukupnih flavonoida (0,71 g KE/100 g suvog lista sremuša), kao i najveća antioksidativna aktivnost, merena antiradikalnom aktivnošću na DPPH radikale, a izražena kao IC_{50} (0,04 mg/ml), kao i ABTS testom (13,81mM TEX/100 g suvog lista sremuša), dobijeni su na najvišoj temperaturi. Ove vrednosti su značajno više od vrednosti dobijenih korišćenjem ultrazvučne ekstrakcije, što ukazuje na činjenicu da je subkritična ekstrakcija efikasnija metoda za ekstrakciju ukupnih fenola i ukupnih flavonoida iz suvog lista sremuša. Pirsonovim testom dobijena je umerena pozitivna korelacija između antioksidativne aktivnosti (ABTS i DPPH test) i ukupnih fenola ($R^2= 0,78$ i $R^2= 0,75$), odnosno između antioksidativne aktivnosti (ABTS i DPPH test) i ukupnih flavonoida ($R^2= 0,77$ i $R^2= 0,70$, respektivno). Iz ove korelacije možemo videti da antioksidativnoj aktivnosti najviše doprinose ukupni fenoli i flavonoidi, kao i da je bolja korelacija postignuta sa rezultatima ABTS testa. Prema Serpenu i saradnicima (2007) ABTS test je osetljiviji na fenolna jedinjenja nego na proizvode Maillardove reakcije (HMF), te su upravo zbog toga u ovom istraživanju primenjena oba testa (DPPH i ABTS).

Analiziranjem podataka prikazanih u tabeli 16, vidi se da je temperatura bila dominantni parametar pri ekstrakciji suvog lista sremuša subkritičnom vodom. Linearni i kvadratni član temperature su pokazali značajan uticaj na ispitivane zavisne promenljive. Temperatura je značajno uticala na sadržaje ukupnih fenola i flavonoida i antioksidativnu aktivnost. Sa slike 34 se može uočiti da se značajan porast sadržaja ukupnih fenola i flavonoida postiže u intervalu 160–200 °C, što se može objasniti poboljšanom difuzijom i rastvorljivošću ukupnih fenola i antioksidativnih komponenti i smanjenjem viskoziteta i napona rastvarača.

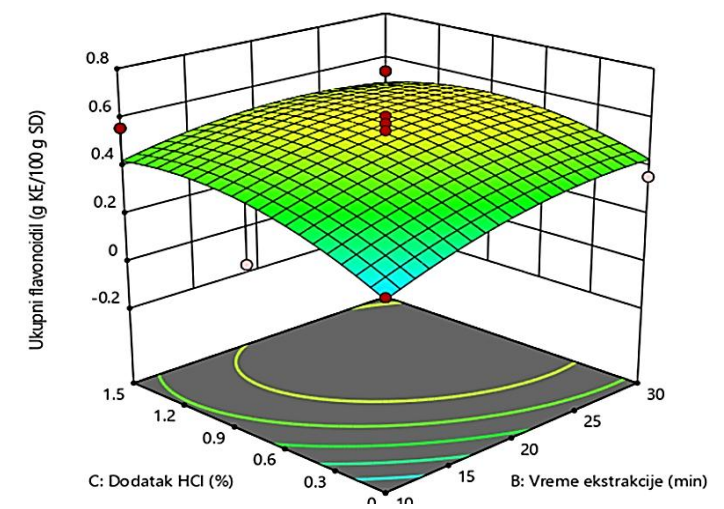
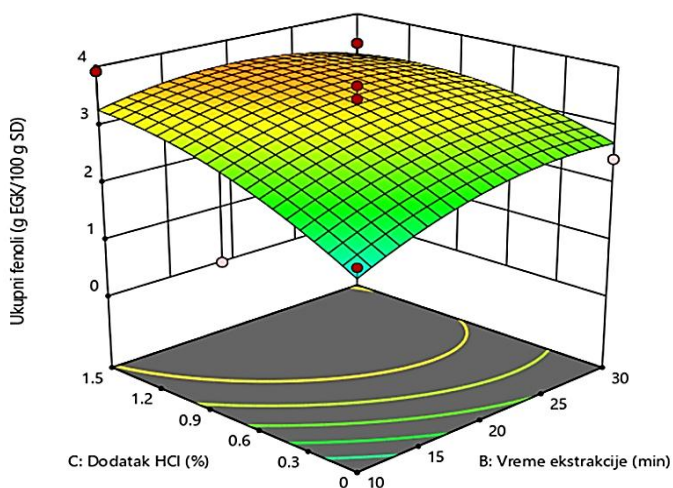
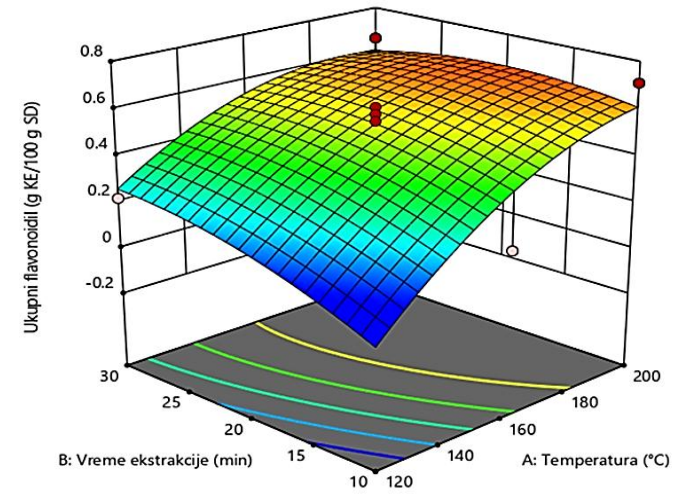
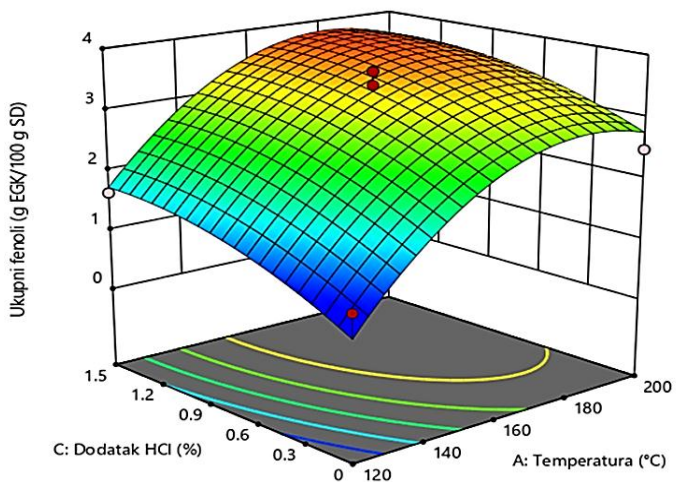
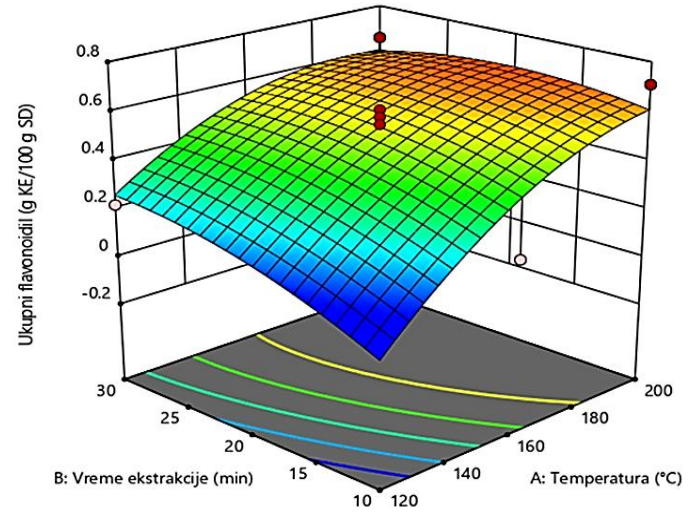
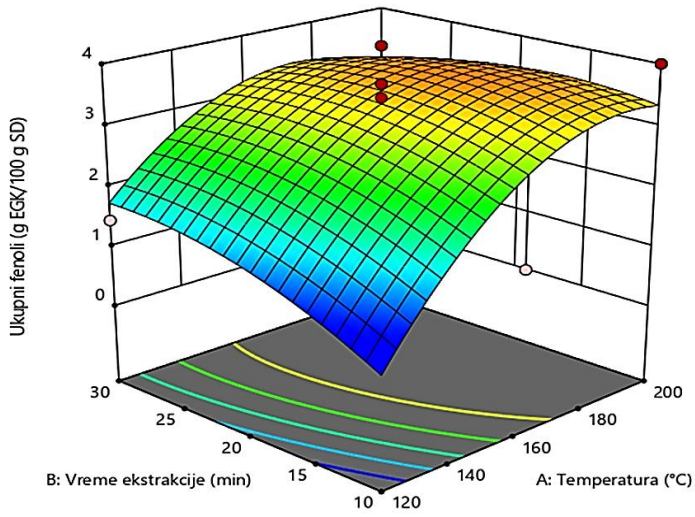
Tabela 16 Analiza varijanse (ANOVA) fitovanja rezultata polinomnim modelom drugog reda

Član	Koefficient regresije				
	Prinos ekstrakcije	Sadržaj ukupnih fenola	Sadržaj ukupnih flavonoida	DPPH test	ABTS test
Odsečak					
β_0	50,1033	3,608	0,5812	0,0549	9,8388
Linearni					
β_1	-6,1412*	0,9062*	0,2190*	-0,1803*	4,4439*
β_2	-0,7162	-0,0772	0,0135	-0,004	-0,2755
β_3	5,9725*	0,4971**	-0,0649***	- 0,0307**	0,2131
Zavisni					
$\beta_{1,2}$	-2,4625	-0,1942	-0,0236	0,0129	-0,7317
$\beta_{1,3}$	0,4	-0,0719	0,0051	0,0339**	0,4305
$\beta_{2,3}$	-1,045	-0,2257	-0,0375	0,0047	0,3635
Kvadratni					
$\beta_{1,1}$	-5,2979**	-1,0237*	-0,1330**	0,1759*	- 3,7924**
$\beta_{2,2}$	0,8371	-0,053	-0,0082	0,0162	0,6021
$\beta_{3,3}$	-5,0454**	-0,6033**	-0,1516**	-0,0039	-0,5186
R^2 ^a	0,9560	0,9367	0,9356	0,9918	0,9231
CV ^c	6,08	15,97	20,79	16,37	24,29
p_{modela} ^d	0,0068	0,0160	0,0167	0,0001	0,0251
$p_{lack\ of\ fit}$ ^d	0,3434	0,0521	0,0617	0,0510	0,0752

* $p < 0,01$ ** $0,01 \leq p < 0,05$ *** $0,05 \leq p < 0,1$ ^a koeficijent determinacije^b koeficijent varijacije^c verovatnoća F-testa

ispitivanog modela

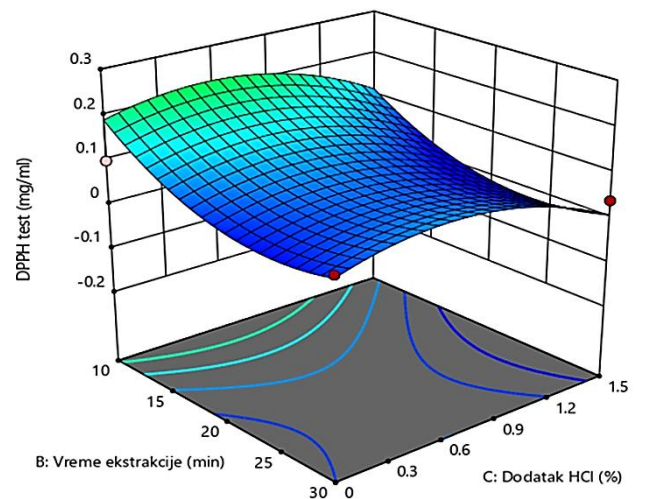
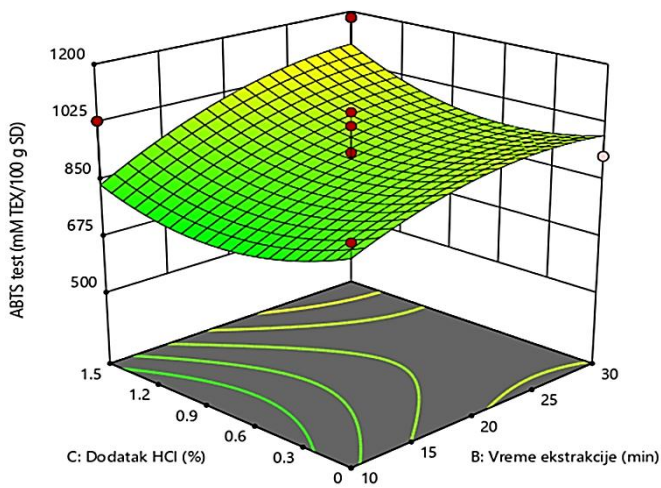
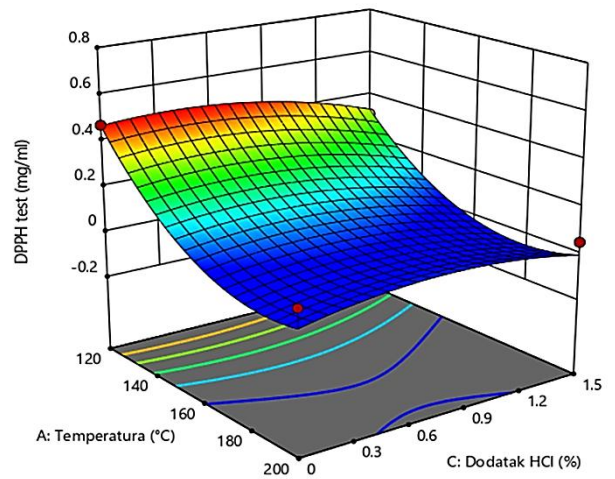
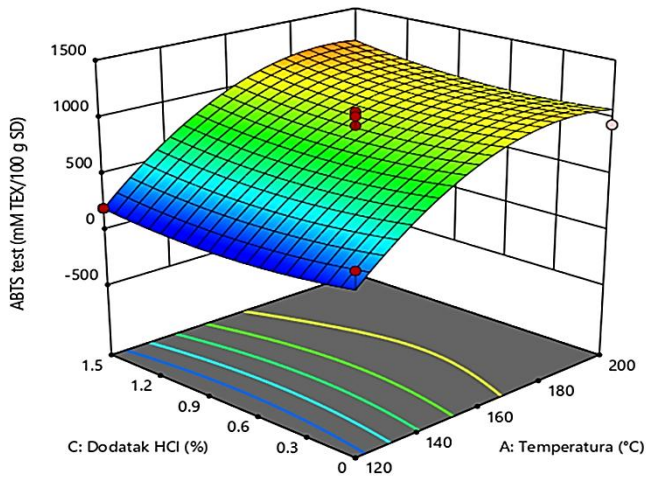
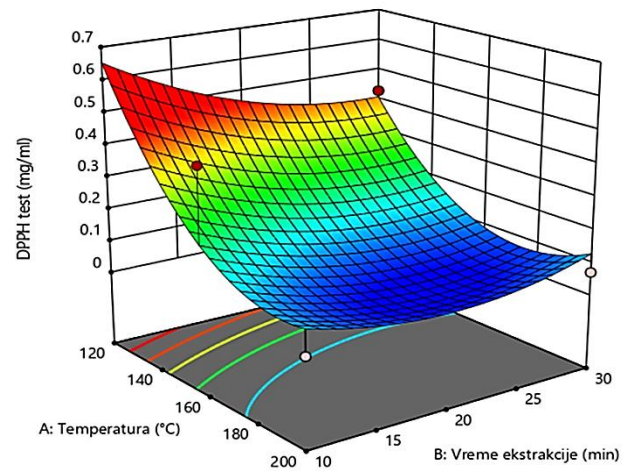
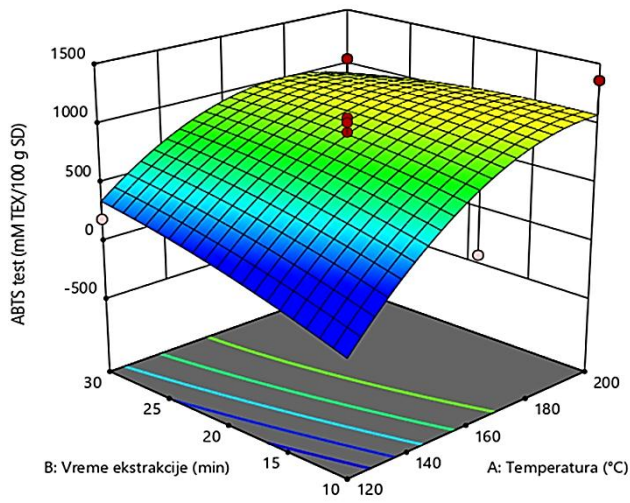
^d verovatnoća F-testanepoklapanja (*lack of fit*)



Slika 34 Uticaj procesnih parametara subkritične ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola i flavonoida

Oslobađanje fenolnih jedinjenja iz biljnih ćelija u velikoj meri zavisi od ćelijskog zida biljke, njegovih fizičko-hemijskih osobina i strukture, kao i hemijske strukture fenola koji se nalaze u biljci. Osim toga, fenolna jedinjenja u biljci su često vezana u komplekse sa nekim drugim jedinjenjima, kao što su ugljeni hidrati i/ili proteini (Yang i sar., 2013). Zbog toga je za dobijanje većeg sadržaja fenola važno na adekvatan, efikasan i ekološki prihvatljiv način hidrolizovati i degradirati ćelijski zid, čime se olakšava izolovanje fenola. Gizir i saradnici (2008) su ispitivali uticaj dodatka organskih i mineralnih kiselina na prinos antocijana tokom subkritične ekstrakcije, pri čemu je dodatkom kiselina došlo do značajnog poboljšanja efikasnosti ekstrakcije ovih bioaktivnih jedinjenja. U ispitivanoj ekstrakciji lista sremuša a na osnovu p -vrednosti ($p > 0,01$) može se zaključiti da je dodatak kiseline imao značajan pozitivan uticaj na prinos ekstrakcije i sadržaj ukupnih fenola, dok je ovaj uticaj bio manje izražen kada su u pitanju flavonoidi. Hidroliza je najverovatnije rezultirala oslobađanjem fenola iz fenolnih glikozida, što se odrazilo na porast sadržaja ukupnih fenola. Dobijeni rezultati ukazuju takođe da korišćenjem manjih i većih količina HCl od 0,75% sadržaja ukupnih fenola i flavonoida opada. Ovaj fenomen je više izražen u slučaju flavonoida. Povećanje koncentracije HCl može dovesti do hidrolize acetilovanih flavonoida, što je praćeno nižim vrednosti flavonoida (Nicoué i sar., 2007). Da bi se izbegla ovakva degradacija, ili bar svela na minimum, preporučuje se upotreba niže koncentracije HCl. Dodatak kiseline je takođe značajno uticao na antioksidativnu aktivnost merenu kao antiradikalska aktivnost na DPPH radikale, ali nije uticao na antioksidativnu aktivnost merenu ABTS testom. Ovo povećanje antioksidativne aktivnosti dodatkom kiseline je u korelaciji sa porastom sadržaja ukupnih fenola i flavonoida pri istim uslovima. Interakcija između temperature i dodatka kiseline, imala je uticaj samo na antiradikalnu aktivnost na DPPH radikale, dok je u ostalim slučajevima bila zanemarljiva (slika 35).

Vreme ekstrakcije nije imalo značajan uticaj ni na jednu zavisnu promenljivu. Stoga smanjenje vremena trajanja ekstrakcije neće značajno uticati na prinos ispitivanih bioaktivnih komponenti, ali će svakako uticati na smanjenje energetske i operativne troškova procesa. Takođe, smanjenjem vremena trajanja ekstrakcije može se povećati broj šaržnih ekstrakcija, što značajno može doprineti ukupnoj efikasnosti proizvodnje ovog tipa biljnog ekstrakta



Slika 35 Uticaj procesnih parametara subkritične ekstrakcije na antioksidativnu aktivnost merenu prinenom DPPH i ABTS testa

4.5.3. Indikatori Maillardove reakcije

Nekoliko radova ukazuju na to da tokom ekstrakcije subkritičnom vodom dolazi do akumuliranja neželjenih jedinjenja koja nastaju kao rezultat reakcije neenzimskog tamnjenja, (Wijngaard i Brunton, 2009). Neka od ovih jedinjenja, kao što su furfurali se formiraju tokom napredne faze Maillardove reakcije. Ova jedinjenja se često analiziraju da bi se procenio intenzitet primenjenih procesnih parametara ekstrakcije subkritičnom vodom, najčešće uticaj temperature (Narita i Inouye, 2012; Zhu i sar., 2009). Formiranje 5-hidroksimetil furfurala i furfurala i njihovo prisustvo u ekstraktima je nepoželjno zbog toga što je zabeleženo da ovaj jedinjenja u određenoj koncentraciji mogu da ispolje citotoksične, mutagene, kancerogene i genotoksične efekte (Capuano i Fogliano, 2011; Teixidó i sar., 2006). Da bi se stekao uvid u stvaranje furfurala tokom ekstrakcije subkritičnom vodom, određeni su sadržaji 5-hidroksimetil furfurala i furfurala u svim ekstraktima lista sremuša koji su dobijeni primenom ove ekstrakcione tehnike. Rezultati ove analize prikazani su u tabeli 17.

Sadržaj 5-hidroksimetil furfurala je značajno varirao u zavisnosti od uslova ekstrakcije (od 10,63 do 1135,5 $\mu\text{g/ml}$). Prema dobijenim rezultatima, količina 5-hidroksimetil furfurala u uzorcima značajno se razlikovala na 120 °C i 160 °C. Nakon dostizanja maksimalne temperature došlo je do značajnog smanjenja 5-hidroksimetil furfurala u ekstraktima dobijenim na temperaturi od 200 °C. Duže vreme ekstrakcije i dodatak HCl favorizuju stvaranje 5-hidroksimetil furfurala. Međutim, na temperaturi od 200 °C zabeleženo je suprotno. Niži sadržaj 5-hidroksimetil furfurala na temperaturi većoj od 210–220 ° zabeležili su Narita i Inouye (2012) i Wang i saradnici (2010), a pojava se pripisuje njegovoj degradaciji, polimerizaciji i reakcijama sa drugim jedinjenjima. Herrero i saradnici (2012) su ispitivali uticaj stvaranja 5-hidroksimetil furfurala na antioksidativno delovanje ekstrakta lista maline dobijenog subkritičnom ekstrakcijom na različitim temperaturama. U njihovom istraživanju 5-hidroksimetil furfural nije uticao na povećanje antioksidativne aktivnosti ekstrakta. Isti zaključci se mogu izvesti i u ovom istraživanju, jer nije bilo korelacije između nastanka 5-hidroksimetil furfurala i furfurala i antioksidativne aktivnosti ekstrakta, a primenom modela polinomne jednačine drugog reda dobijeni rezultati nisu odgovarali predloženom modelu ($p > 0,05$).

Praćenje Maillardove reakcije podrazumeva, pored određivanja sadržaja 5-HMF i furfurala, i merenje indeksa tamnjenja. Iz rezultata prikazanih u tabeli 15 primećuje se da indeks tamnjenja značajno raste sa povećanjem temperature ekstrakcije (slika 36). Takođe, dobijeni rezultati sugerišu da svi parametri ekstrakcije (temperatura, dodatak HCl, vreme ekstrakcije) doprinose razvoju braon boje ekstrakta. Indeks tamnjenja se kretao u interval 35,66–153,58.

Tabela 17 Indikatori Millardove reakcije tokom subkritične ekstrakcije

Redni broj	Temperatura (°C)	Vreme ekstrakcije (min)	Dodatak HCl (%)	Indeks tamnjenja	5-hidroksimetil furfural (µg/ml)	Furfural (µg/ml)
1	160	10	1,5	136,27	515,65	920,85
2	120	20	0	35,66	12,25	5,56
3	120	10	0,75	45,71	16,63	28,62
4	160	20	0,75	133,12	1057,90	764,54
5	160	20	0,75	127,07	1045,80	795,47
6	200	10	0,75	130,36	70,07	135,94
7	200	30	0,75	153,82	568,69	668,50
8	160	20	0,75	128,34	1035,10	832,63
9	200	20	0	146,16	608,04	140,58
10	200	20	1,5	153,58	10,63	10,46
11	160	30	0	139,32	477,08	47,27
12	160	10	0	145,71	122,69	7,10
13	120	20	1,5	97,85	1116,73	94,38
14	160	30	1,5	141,89	397,65	700,41
15	120	30	0,75	85,10	1135,50	59,66



Slika 36 Promena boje ekstrakta u zavisnosti od procesnih parametara SVE

4.5.4. Optimizacija procesnih parametara

Numerička optimizacija ekstrakcije lista sreмуša subkritičnom vodom je izvršena na osnovu dobijenih eksperimentalnih rezultata i statističke analize u cilju određivanja procesnih parametara ekstrakcija na kojima bi se dobio ekstrakt sa najvećim sadržajem ukupnih fenola i flavonoida i najvećom antioksidativnom aktivnošću. Određivanje optimalnih uslova i predviđenih vrednosti zasnovano je na poželjnoj funkciji, $D = 0,93$. Na osnovu rezultata numeričke optimizacije, za dobijanje ekstrakta željenog/optimalnog kvaliteta, parametre ekstrakcije treba podesiti na sledeće vrednosti: temperatura 179 °C, vreme ekstrakcije 10 min i 1,09% dodatak hlorovodonične kiseline. Ovi teorijski pretpostavljeni rezultati su eksperimentalno potvrđeni sa odstupanjem $\pm 5\%$. Predviđene i eksperimentalne vrednosti zavisnih promenljivih su prikazane u tabeli 18. Na osnovu dobijenih vrednosti, može se zaključiti da nije bilo značajne razlike između procenjenih i posmatranih vrednosti, što ukazuje na dobar odnos između predviđenog modela i eksperimentalno dobijenih rezultata.

Tabela 18 Predviđene i eksperimentalne vrednosti dobijene na optimalnim parametrima SVE

Ispitivana promenljiva	Predviđena vrednost ^a	Eksperimentalna vrednost ^b
Ukupni fenoli (g EGK/100 g SD)	4,11±0,21	4,13±0,36
Ukupni flavonoidi (g KE/100 g SD)	0,66±0,03	0,66±0,04
Antioksidativna aktivnost (IC₅₀, mg/ml)	0,013±0,02	0,013±0,01
Antioksidativna aktivnost (mM TEX/100 g SM)	1223±61,15	1237±1,57
Prinos ekstrakcije (%)	50,85±2,54	51,89±0,68

^a predviđena vrednost odziva $\pm 5\%$ interval poverenja

^b srednja vrednost \pm standardno odstupanje (n=3)

EGK – ekvivalent galne kiseline

KE – ekvivalent katehina

TEX – ekvivalent troloksa

SD – suva droga

Rezultati dobijeni na optimalnim uslovima ekstrakcije subkritičnom vodom i rezultati konvencionalne ekstrakcije, gde je voda primenjena kao rastvarač, su se značajno razlikovali. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu dobijenom na optimalnim uslovima subkritične ekstrakcije je bio dva puta veći nego sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu koji je dobijen postupkom maceracije, dok je sadržaj ukupnih flavonoidi bio veći za oko 3 puta, u

odnosu na rezultate maceracije. Povećanje ukupnog sadržaja fenola i flavonoida primenom subkritične vode kao rastvarača može se objasniti promenom polarnosti vode u subkritičnoj oblasti. Smanjenjem polarnosti vodi, poboljšano je izolovanje umereno polarnih fenola i flavonoida koji su prisutni u listu sremuša. Baš iz tog razloga, ekstrakcija subkritičnom vodom se može preporučiti kao ekstrakcija izbora za izolovanje ovih bioaktivnih komponenti iz lista sremuša.

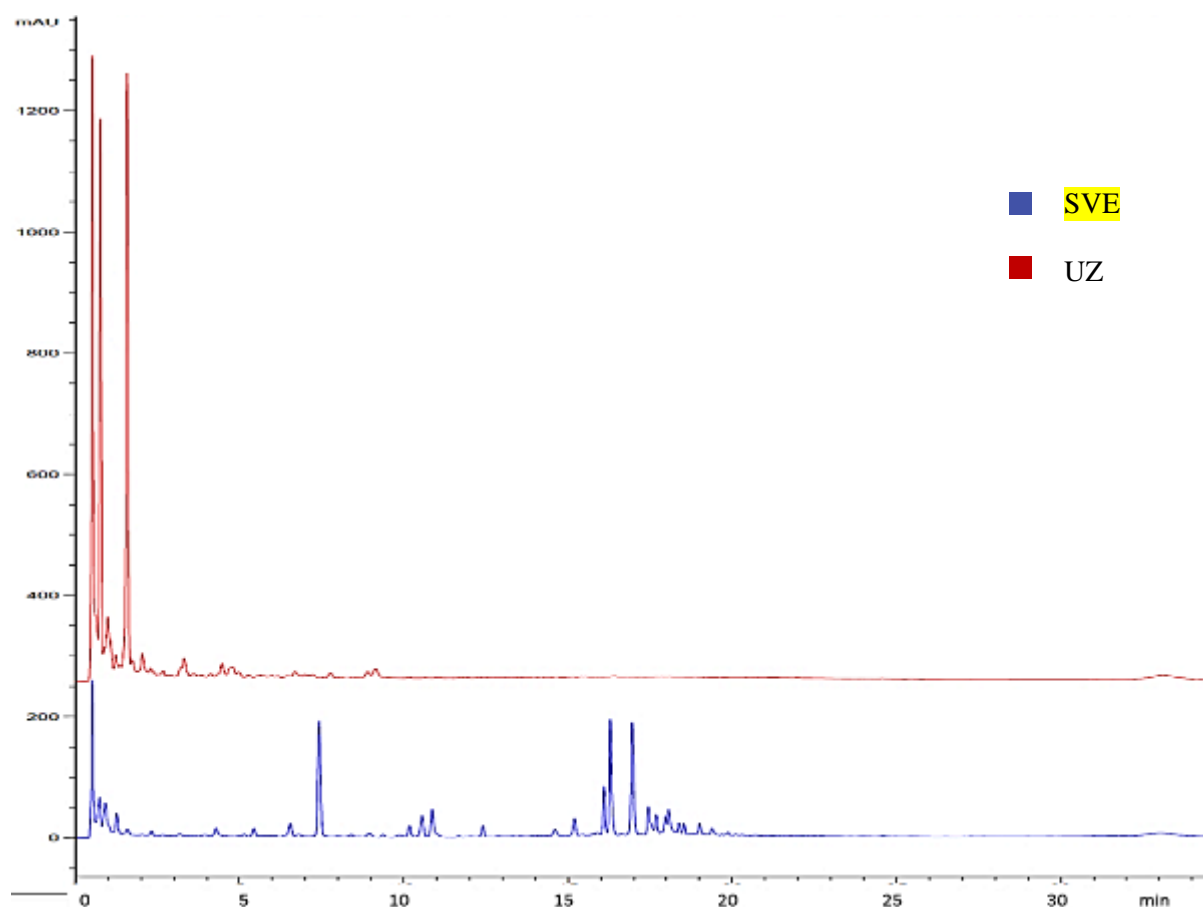
4.6. Poređenje hemijskog sastava odabranih ekstrakata

Biljni ekstrakti predstavljaju kombinaciju različitih vrsta bioaktivnih komponenti različite polarnosti, usled čega je postupak identifikacije o kvantifikacije ovih jedinjenja zahtevan i izazovan (Brusotti i sar., 2014; Sasidharan i sar., 2011). Sakakibara i saradnici (2003) su formirali bazu podataka koja sadrži retencionna vremena i DAD spektre 100 fenolnih jedinjenja razdvojenih primenom HPLC tehnike na reversnoj fazi. Jednostavni polifenoli i katehini se eluiraju na retencionim vremenima 5,8–34,3 min, odnosno 8,1–26,1 min; glikozidi flavona, flavonola, izoflavona i flavanona između 20,1–61,4 min, a njihove aglikonske forme između 26,7–91,6 min; za njima po retencionom vremenu slede antrahinoni i halkoni. Tip hromatografske kolone u gore navedenom radu (Sasidharan i sar., 2011) i kolone korišćene u okviru ove doktorske disertacije je isti, a razlike u retencionim vremenima su posledica različitih dimenzija kolone i u primenjenoj mobilnoj fazi.

Profil fenolnih jedinjenja analiziranih ekstrakata dobijenim na optimalnim uslovima ultrazvučne ekstrakcije i ekstrakcije subkritičnom vodom, primenom HPLC tehnike je prikazan u tabeli 20. Sa dobijenih hromatograma očitana su retencionna vremena pikova i maksimumi UV spektara odgovarajućih pikova, a kvalitativna analiza rezultata je izvršena na osnovu poređenja retencionih vremena pikova i UV spektara uzorka i dostupnih standarda fenolnih kiselina i flavonoida, kao i na osnovu dostupnih literaturnih podataka UV spektara. Na osnovu rezultata sprovedene analize, uočava se jasna razlika u hemijskom sastavu ekstrakta dobijenog različitim postupcima ekstrakcije.

Hromatogram ekstrakta dobijenog ultrazvučnom ekstrakcijom (UZ) karakterišu pikovi samo u prvom delu hromatograma (slika 37). Na osnovu retencionih vremena pikova i poređenjem dobijenog hromatograma sa hromatogramom prikazanim u istraživanju Mišan i saradnika (2011), u kome je korišćena ista metoda za analizu fenolnih jedinjenja kao i u

ispitivanjima obuhvaćenim ovom disertacijom, pretpostavlja se da su se ultrazvučnom ekstrakcijom izolovane većinom fenolne kiseline i to u značajno većoj meri u poređenju sa ekstraktom dobijenim ekstrakcijom subkritičnom vodom. Vlase i saradnici (2012) su u ekstraktu sremuša detektovali *p*-kumarinsku i ferulnu kiselinu korišćenjem 70% etanola kao rastvarača. Na osnovu UV spektra može se pretpostaviti da ekstrakt dobijen na optimalnim uslovima ultrazvučne ekstrakcije sadrži galnu kiselinu i derivate katehina.



Slika 37 Hromatografski profil fenolnih komponenti u zavisnosti od primenjene ekstrakcione tehnike i rastvarača

U poređenju sa ekstraktom dobijenim ultrazvučnom i ekstrakcijom subkritičnom vodom, subkritični ekstrakt je bogatiji fenolnim jedinjenjima (tabela 22). Na osnovu apsorpcionog spektra standarda i spektra jedinjenja u ekstraktu dobijenom subkritičnom ekstrakcijom potvrđeno je prisustvo katehina (pik 11 u tabeli 22). Na osnovu spektara dominantnih komponenti u ispitivanim ekstraktima može se pretpostaviti da se u ekstraktu dobijenom ekstrakcijom subkritičnom vodom nalaze jedinjenja tipa fenilpropanoida i flavonoida. Ovaj zaključak je u skladu sa saznanjem da apsorpcioni spektar flavonoida ima

dva maksimuma, jedan između 240–290 nm a drugi između 300–550 nm (Martins i sar., 2015). Prema istraživanju Santos-Buelga i saradnika apsorpcioni maksimum zavisi od broja hidroksilnih grupa u prstenu A i B, kao i od glikozilacije flavonoida i acil supstituenta koji prouzrokuju dodatni maksimum u UV spektru (Martins i sar., 2015). Oszmiański i saradnici (2013) su utvrdili da je sremuš bogat različitim derivatima kemferola, pretežno derivatima kemferol-hekzosil-acetil-deoksiheksoza-heksozid i kemferol-heksoza derivatima. U radu navedenih autora prikazani su rezultati LC-MS analiza, kao i karakteristični maksimumi spektara kemferol je karakteristično jedinjenje za *Allium* vrste, a različiti derivati kemferola su detektovani u ekstraktu belog luka dobijenog smešom rastvarača aceton/etanol/voda (70:15:15, v/v/v) tokom 24 h (Fратиanni i sar., 2015). Na osnovu literaturnih podataka različitih autora i spektara uzoraka dobijenih ekstrakcijom subkritičnom vodom i ultrazvučnom ekstrakcijom, pretpostavlja se da bi se pikovi 14-23 (tabela 18) na hromatogramu prikazanom na slici 41 mogli smatrati derivatima kemferola (Dziri i sar., 2012; Oszmiański i sar., 2013; Tsimogiannis i sar., 2007). Za ekstrakciju fenolnih jedinjenja Oszmiański i saradnici (2013) su kao rastvarač koristili zakišeljani metanol, dok je kod ekstrakta dobijenog ekstrakcijom subkritičnom vodom korišćena voda u subkritičnom stanju, koja na datim uslovima ekstrakcije ima sličnu dielektričnu konstantu kao metanol (Dai i Mumper, 2010), te se na osnovu toga može pretpostaviti da su jedinjenja u ekstraktu dobijenom na optimalnim uslovima ekstrakcije subkritičnom vodom derivati kemferola. Najzastupljenije komponente u ekstraktu dobijenom ekstrakcijom subkritičnom vodom su bile one kojima odgovaraju pikovi 14, 26 i 27 (1.85–88.19 µg kemferol ekvivalent/ml). UV spektar jedinjenja 14, 15, 16, 17, 21 i 23 pokazuju maksimum na 348 nm, dok je UV spektar jedinjenja br. 30–35 sa maksimumom apsorpcije na 318 nm.

Poređenjem hromatograma analiziranih ekstrakta dobijenih na optimalnim uslovima ekstrakcije subkritičnom vodom i ultrazvučne ekstrakcije može se zaključiti da odabrana tehnika i rastvarač značajno utiču na profil izolovanih polifenolnih jedinjenja. U procesu ekstrakcije može, u određenoj meri, doći do prevođenja pojedinih aglikona i njihovih glikozida u drugi, sličan aglikon (kao, na primer, redukcija kvercetina u kemferol) (Božin, 2009). Određivanje količine i vrsta polifenola u ekstraktima jedan je od najvećih izazova zbog broja prirodnih fenola koji pripadaju različitim klasama i nalaze se u biljkama u obliku različitih glikozida.

Iako ekstrakt dobijen pod optimalnim uslovima ekstrakcije subkritičnom vodom odlikuje veći sadržaj ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i bolju antioksidativnu aktivnost,

sadržaj sumpornih jedinjenja u optimalnom ekstraktu dobijenom ultrazvučnom ekstrakcijom je bio znatno viši (tabela 22). Iako voda u subkritičnom stanju ima osobine slične metanolu, nije došlo do izolovanja značajnih sumpornih jedinjenja kao što je alicin. Nizak sadržaj sumpornih jedinjenja u ekstraktu dobijenom subkritičnom ekstrakcijom je, najverovatnije, posledica termolabilnosti tih jedinjenja, obzirom na visoku temperaturu primenjenu u procesu ekstrakcije. Iz rezultata prikazanih u tabeli 21 se uočava da je sadržaj analiziranih sumpornih jedinjenja značajno veći u ekstraktu dobijenom ultrazvučnom ekstrakcijom korišćenjem etanola kao rastvarača, dok je u ekstraktu dobijenom subkritičnom ekstrakcijom detektovana manja količina alil sulfida, dialil disulfida i *S*-metilestar metantiosulfonske kiseline. U ekstraktu dobijenom pod optimalnim uslovima ultrazvučne ekstrakcije detektovano je prisustvo alicina, dialil disulfide i dialil trisulfida, koji nastaju razgradnjom alicina. Korišćenjem 70% etanola Vlase i saradnici (2012) su detektovali 1,965 mg AC/100 g svežeg lista sremuša primenom perkolacije kao ekstrakcione metode. U poređenju sa ekstrakcijama na povišenoj temperaturi, pri ultrazvučnoj ekstrakciji se očuvaju organska jedinjenja odgovorna za karakteristične mirise i ukus sveže seckanih belog luka (Poojary i sar., 2017). Primenom ultrazvučne ekstrakcije, korišćenjem vode kao rastvarača, Arzanlou i Bohlooli (2010) su ekstrahovali 0,48 mg alicina/ml ekstrakta iz mladog belog luka.

Tabela 22 Retenciona vremena i maksimumi dominantnih komponenti na 280 nm u ekstraktima dobijenim na optimalnim tačkama subkritične i ultrazvučne ekstrakcije

Uzorak		Subkritični vodeni ekstrakt		70% etanolni ekstrakt	
Pik	Retenciono vreme (min)	λ (nm)	Površina pika	λ (nm)	Površina pika
1	0,052	236, 272	885,40	236, 284	3845,9
2	0,74	230, 260	430,70		
3	0,76	n.d		264	3378,3
4	0,91	234, 256, 274	360,20	n.d	
5	0,98	n.d		234, 274	781,2
6	1,26	296	117,30	n.d	
7	1,58	n.d		284	4668,4
8	1,59	232, 270, 362	53,04	n.d	
9	2,32	234, 298	44,83	n.d	
10	3,31	n.d		232, 282	2148,9
11	4,28	234, 280	94,44	n.d	
12	4,47	n.d		232, 288	572,3
13	5,44	234, 316	86,34	n.d	
14	6,55	240, 266, 348	153,09	n.d	
15	7,42	232, 264, 348	1152,4	n.d	
16	8,96	232, 266, 348	56,02	n.d	
17	9,88	232, 266, 348	34,97	n.d	
18	10,17	232, 266, 346	113,68	n.d	
19	10,56	232, 266, 346	238,38	n.d	
20	10,87	232, 266, 346	277,22	n.d	
21	12,41	232, 266, 348	103,39	n.d	
22	14,61	230, 266, 312, 354sh	118,75	n.d	
23	15,20	232, 266, 348	215,19	n.d	
24	16,10	232, 266, 316	388,86	n.d	
25	16,29	234, 266, 316	1017,40	n.d	
26	16,95	234, 266, 316	1145,91	n.d	
27	17,45	232, 266, 316	267,07	n.d	
28	17,68	234, 266, 316	221,23	n.d	
29	17,96	230, 266, 316, 348sh	211,02	n.d	
30	18,01	230, 266, 318	304,52	n.d	
31	18,38	230, 266, 318	122,54	n.d	
32	18,50	230, 266, 318	127,98	n.d	
33	19,01	230, 266, 318	126,93	n.d	
34	19,38	230, 266, 318, 345sh	126,93	n.d	
35	19,85	230, 266, 318	60,24	n.d	

n.d – nije detektovano

Tabela 23 Sadržaj sumpornih jedinjenja u ekstraktima dobijenim ultrazvučnom ekstrakcijom i subkritičnom vodenom ekstrakcijom određen HPLC tehnikom

uzorak	Koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)				
	AS	DADS	DATS	AC	MMTS ₂
UZ	120,1	327,8	1236,3	153,2	450,6
SVE	44,1	27,3	n.d.	n.d.	302,6

n.d, nije detektovano

AS – alijsulfid, DADS – dialiisulfid, DATS – dialiltruslfid, AC – alicin, MMTS₂ – S-metilestar metanetiosulfonske kiseline

Na osnovu hromatografskih analiza ekstrakata dobijenih na optimalnim uslovima ultrazvučne ekstrakcije i ekstrakcije subkritičnom vodom, zaključuje se da je ekstrakt dobijen na optimalnim uslovima ekstrakcije subkritičnom vodom bogatiji polifenolnim jedinjenjima, dok je ekstrakt dobijen na optimalnim uslovima ultrazvučne ekstrakcije bogatiji sumpornim jedinjenjima. U skladu sa ovim činjenicama, odgovarajuću tehniku ekstrakcije treba izabrati na osnovu ciljanih jedinjenja.

4.7. Superkritična ekstrakcija ugljen-dioksidom

Superkritična ekstrakcija ugljen-dioksidom (SC-CO₂) je primenjena kako bi se iz suvog lista sremuša izolovala nepolarna i slabo polarna sumporna jedinjenja. U eksperimentu sprovedenom u okviru ove doktorske disertacije ispitan je uticaj pritiska i temperature superkritičnog ugljen-dioksida na prinos ekstrakcije i sastav dobijenih ekstrakata. Reverchon i De Marco (2006) su preporučili da temperature za ekstrakciju termolabilnih jedinjenja, u koja spadaju i sumporna jedinjenja, ovom tehnikom treba da budu u opsegu 35 i 60 °C, blizu kritične tačke, a što je moguće niže, kako bi se izbegla njihova degradacija. Povećanjem pritiska moć rastvaranja ugljen-dioksida raste, ali selektivnost opada, tako da se variranjem pritiska i temperature utiče na osobine superkritičnog ugljen-dioksida, a time i na kvalitet dobijenog ekstrakta. U skladu sa tim, u analizi ekstrakcije lista sremuša superkritičnim ugljen-dioksidom ispitan je uticaj temperature (40, 50 i 60 °C) i pritiska ekstrakcije (od 150 do 400 bara, sa korakom od 50 bara između eksperimenata) na ukupni prinos ekstrakcije i sastav dobijenih ekstrakata.

U tabeli 19 su prikazani kumulativni prinosi ekstrakcije, u zavisnosti od uslova ekstrakcije, dobijeni nakon 5 h pri konstantnom protoku ugljen-dioksida. Često se moć

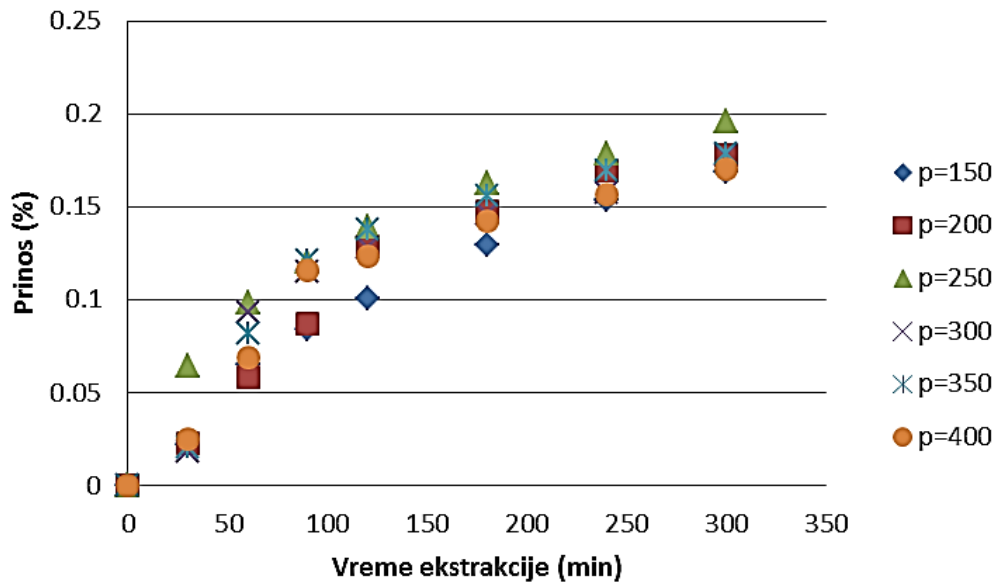
rastvaranja superkritičnog ugljen-dioksida izražava kao gustina ugljen-dioksida i zavisi od temperature i pritiska. U ovom eksperimentu, gustina superkritičnog ugljen-dioksida varira od 603,9 do 965,1 kg/m³. Iz tabele 19 može se uočiti da se povećanjem pritiska povećava prinos, usled povećanja solvatacione moći, odnosno gustine ugljen-dioksida. Najveći prinos ekstrakcije (3,43%) je postignut na najvišoj temperaturi i najvišem pritisku, gde je gustina superkritičnog ugljen-dioksida iznosila 890,30 kg/m³. Najniži prinos ekstrakcije je zabeležen na najblažim uslovima ekstrakcije (150 bar i 40 °C) i dosta nižoj gustini superkritičnog ugljen-dioksida.

Tabela 19 Prinos SF-CO₂ u zavisnosti od parametara ekstrakcije

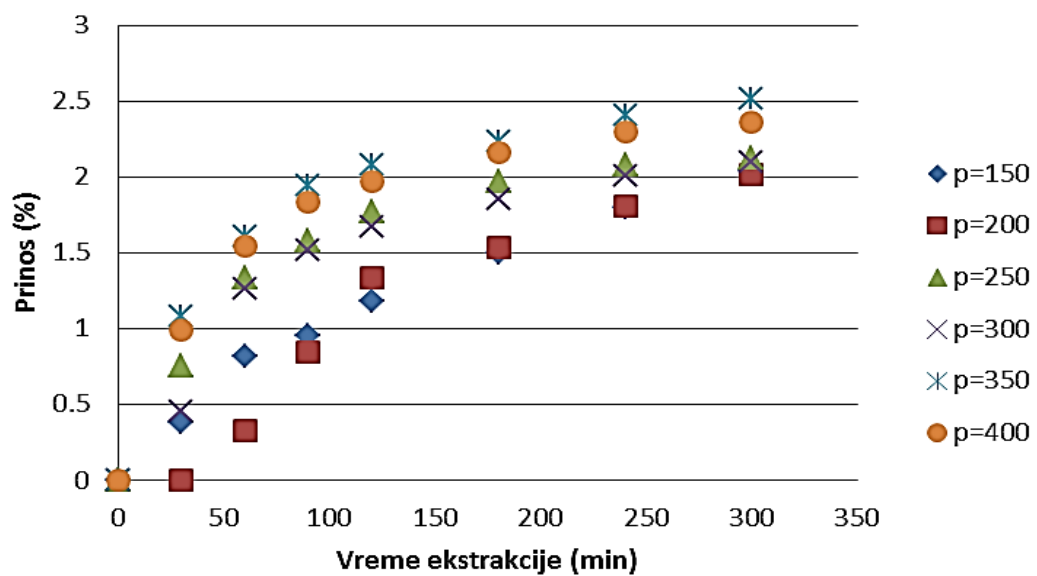
Pritisak (bar)	Temperatura (°C)	Gustina SC-CO ₂ (kg/m ³)	Prinos ekstrakcije (%)
150	40	780,30	1,69
	50	699,80	2,04
	60	603,90	2,08
200	40	839,90	1,78
	50	784,40	2,12
	60	723,80	2,32
250	40	879,60	1,96
	50	834,40	2,12
	60	786,80	2,62
300	40	910,00	1,78
	50	870,60	2,10
	60	830,00	2,61
350	40	934,90	1,79
	50	899,40	2,52
	60	863,20	3,34
400	40	956,10	1,70
	50	923,40	2,36
	60	890,30	3,43

Iz rezultata prikazanih na slikama 38–41 mogu se uočiti dva perioda ekstrakcije. Period brze ekstrakcije, tokom koga se ekstrahuju komponente iz razorenog ćelijskog materijala lako rastvorljive u superkritičnom ugljen-dioksidu, u ovom slučaju u intervalu do oko 120 min. Tokom perioda spore ekstrakcije ekstrahuju se komponente sa višom tačkom ključanja i veće molekulske mase, kao što su masna ulja, voskovi, pigmenti i dr (Sahena i

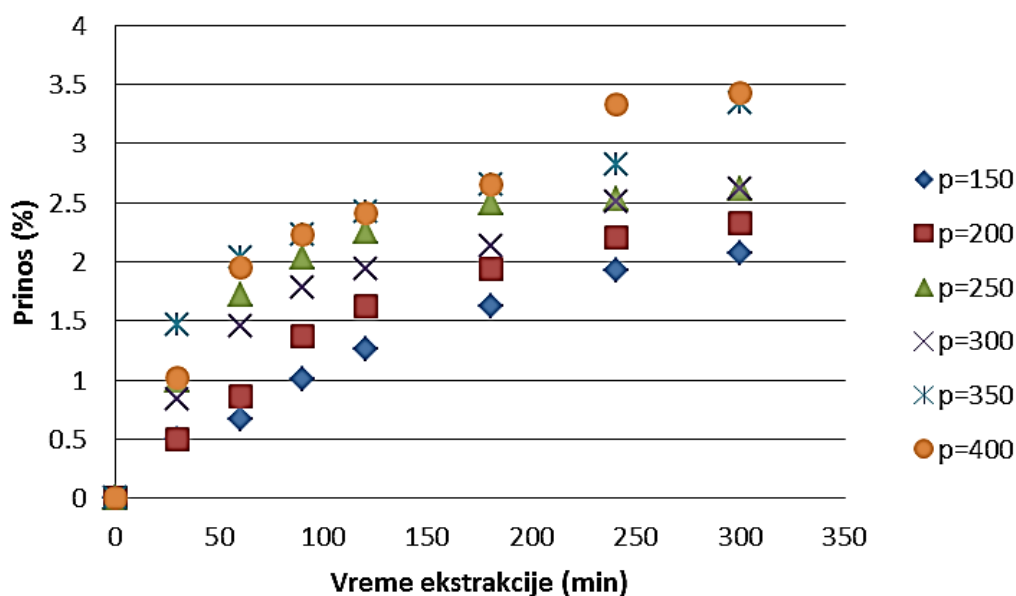
sar., 2009). Sahena i saradnici (2009) su primetili da prinos masti, odnosno masnih kiselina raste pri povećanju pritiska ekstrakcije, kao i produženom vremenu ekstrakcije.



Slika 38 Uticaj pritiska na kinetiku SC-CO₂ na temperaturi od 40 °C



Slika 39 Uticaj pritiska na kinetiku SC-CO₂ na temperaturi od 50 °C

Slika 40 Uticaj pritiska na kinetiku SC-CO₂ na temperaturi od 60 °C

4.7.1. Analiza sumpornih jedinjenja u ekstraktima dobijenim SF-CO₂

Obzirom da su sumporna jedinjenja, prema većini autora (Gîtin i sar., 2014; Godevac i sar., 2008; Sobolewska i sar., 2013), najvažniji sastojci predstavnika roda *Allium*, u okviru preliminarnog ispitivanja hemijskog sastava ekstrakata lista srećuša dobijenih superkritičnom ekstrakcijom izvršena je analiza primarnih isparljivih sumpornih jedinjenja primenom GC-MS tehnike.

U tabeli 20 prikazana su dominantna jedinjenja i njihove površine u zavisnosti od uslova superkritične ekstrakcije, detektovana primenom GC-MS tehnike, dok je karakterističan hromatogram analiziranih ekstrakata prikazan na slici 41. U zavisnosti od fizičkih i hemijskih osobina ciljanih jedinjenja prisutnih u uzorku potrebno je primeniti analitičku tehniku koja se karakteriše visokom selektivnošću i osetljivošću. Iako gasna hromatografija zadovoljava navedene uslove, prilikom primene visokih temperatura može doći do degradacije ili modifikacije određenih jedinjenja prisutnih u uzorku koji se analizira. Kako je alicin jedno od dominantnih jedinjenja lukova, pri zagrevanju koje je neophodno primeniti u GC-MS analizi, može doći do njegove razgradnje i formiranja novih isparljivih

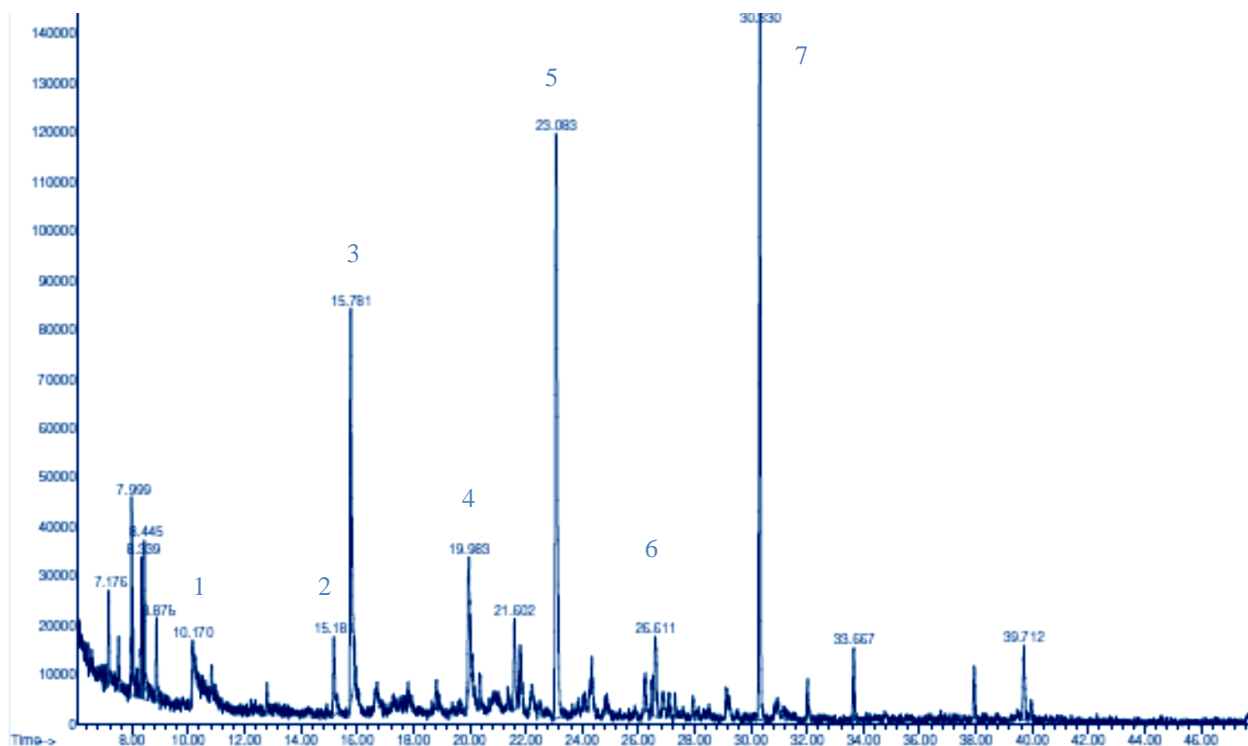
jedinjenja, kao što su sumpor dioksid, dimetil trisulfid (DMTS), dialil mono-, di- i trisulfid i alilmetil di- i trisulfid (Poojary i sar., 2017). U analiziranim ekstraktima sreмуša upravo je ovo uočeno, te su kao dominantna sumporna jedinjenja detektovani disulfidi, trisulfidi i tetrasulfidi, dok je kao dominantna komponenta u ekstraktima preovladao metilalil trisulfid. Prisustvo pojedinih komponenti u ekstraktima se menjalo u zavisnosti od temperature i pritiska ekstrakcije. Tako je na primer metilalil trisulfid bio najzastupljeniji u ekstraktu dobijenom na 50 °C i 350 bar, dimetil trisulfid, na temperaturi od 60°C i 200 bar a sadržaj dimetil disulfide je bio najveći na ekstrakcionim uslovima od 50°C i 200 bar. Dobijeni rezultati u skladu su sa rezultatima objavljenim u nekoliko naučnih radova koji su se bavili ispitivanjem sastava bioaktivnih jedinjenja u sreмуšu. Tako su, Bagiu i saradnici (2012) u vodeno-metanolnom ekstraktu sreмуša detektovali dimetil disulfid, dimetil trisulfid i dimetil tiosulfonat kao najzastupljenija isparljiva jedinjenja nastale od *S*-metil cistein sulfoksida. Analizom etarskog ulja sreмуša Gođevac i saradnici (2008) su primenom GC-MS utvrdili da su u etarskom ulju ove biljne sirovine najzastupljenije frakcije disulfidi (57%), trisulfidi (37%) i tetrasulfidi (4,7%), dok su Błażewicz-Woźniak i Michowska (2011) detektovali kao dominantne komponente metil-2-2-propenil disulfid i dimetil trisulfid. Primenom GC-MS u etarskom ulju belog luka dobijenom superkritičnom ekstrakcijom kao dominantna jedinjenja su detektovana metil 5-metilfurol sulfid (18,30 %), metil 3,4-dimetil-2-tienil disulfid (11,75 %) i 1-propenil propil disulfid (9,72 %) (Ye i Lai, 2012).

Za dalju analizu ekstrakata HPLC tehnikom izabrano je pet ekstrakata, dobijenih superkritičnom ekstrakcijom. Ovi ekstrakti su odabrani na osnovu visokog prinosa ekstrakcije i sadržaja sumpornih jedinjenja, koji je prethodno određen GC-MS tehnikom. Analiza primenom HPLC tehnike urađena je kako bi se što preciznije definisao sastav ekstrakata i na osnovu toga jasno odredili procesni parametri koji su potrebni za proizvodnju ekstrakta sreмуša sa najvećim sadržajem sumpornih bioaktivnih jedinjenja. U tom smislu za dalju hemijsku analizu odabrani su superkritični ekstrakti sreмуša dobijeni na temperaturi od 50 °C a radni pritisak za dobijanje ekstrakata je iznosio 200, 250, 300, 350 i 400 bar. Analizom dobijenih podataka (tabela 21) može se uočiti da je sadržaj alicina (AC) najveći u ekstraktu koji je dobijen na temperaturi od 50°C i na pritisku od 400 bar, zatim sledi ekstrakt dobijen na pritisku od 200 bara, pa ekstrakt dobijen na pritisku od 250 bara i na istoj procesnoj temperature od 50 °C. U ostalim ispitivanim ekstraktima sadržaj alicina je bio znatno manji.

Tabela 20 Sumporna jedinjenja detektovana GC-MS tehnikom u ekstraktima dobijenim superkritičnom ekstrakcijom

Detektovano jedinjenje (površina pika)										
Pritisak (bar)		Temperatura (°C)	Sulfoksid, dimetil, DMSO	Trisulfid, dimetil	Disulfid, dimetil, S-oksidi, dimetildisulfid	Metanetiosulfonska kiselina, S-metil ester	Trisulfid, metilalil	Tetrasulfid, dimetil	Trisulfid, dialil	
		RT (min)		10,10	15,18	15,81	19,99	23,08	26,60	30,35
	150	40	0,43	0,35	1,97	0,96	29,50	0,53	27,20	
		50	0,83	15,24	55,51	42,18	109,63	15,42	77,69	
		60	15,57	11,71	60,28	50,23	9,30	1,81	64,85	
	200	40	n.d	18,26	89,67	29,64	151,92	21,50	125,34	
		50	0,71	34,71	117,18	57,08	150,41	19,83	87,90	
		60	24,36	40,00	33,26	69,26	8,61	13,70	43,67	
	250	40	0,48	20,81	38,63	15,71	139,41	16,06	73,81	
		50	10,73	1,41	3,66	32,16	79,54	13,82	37,59	
60		14,73	20,04	53,07	64,19	11,79	18,59	57,68		
300	40	0,44	0,25	29,18	19,96	45,16	0,70	36,19		
	50	n.d	31,15	98,41	62,10	165,06	n.d	63,43		
	60	0,83	1,48	93,83	5,25	110,08	1,05	42,78		
350	40	0,26	n.d	48,23	2,53	74,53	n.d	28,69		
	50	n.d	30,81	71,14	38,81	219,70	n.d	72,82		
	60	0,94	26,04	30,46	38,43	90,33	10,22	29,85		
400	40	n.d	n.d	34,36	24,06	66,47	n.d	30,81		
	50	n.d	29,39	84,79	75,65	16,67	n.d	52,75		
	60	12,24	13,29	52,94	35,83	75,87	18,06	26,14		

n.d- nije detektovano

Slika 41 Gasni hromatogram SF-CO₂ ekstrakta

1–Sulfoksid, dimetil, DMSO, 2–Trisulfid, dimetil, 3–Disulfid, dimetil, S-oksid imethildisulfid, 4–Metanetiosulfonska kiselina, S-metil estar, 5–Trisulfid, metil alil, 6–Tetrasulfid, dimetil, 7–Trisulfid, dialil

Obzirom da se u značajne komponente koje doprinose bioaktivnosti sremuša ubrajaju i dialil disulfid (DADS), dialil trisulfid (DATS), alil sulfid (AS) i S-metil estar metanetiosulfonske kiseline (MMTS₂), ispitan je i njihov sadržaj u dobijenim ekstraktima (tabela 19). Najveći sadržaj DATS, MMTS₂ i AS je registrovan u ekstraktima dobijenim na pritisku od 200 bara i temperaturi od 50 °C. Na osnovu podataka iz tabele 19, zaključuje se da su ekstrakcioni parametri, temperatura od 50 °C i pritisak od 200 bar, najpogodniji za dobijanje ekstrakta sa visokim sadržajem sumpornih bioaktivnih komponenti.

Tabela 21 Sadržaj sumpornih jedinjenja u ekstraktima dobijenim ekstrakcijom SF- CO₂ određen HPLC tehnikom

Pritisak (bar)	Koncentracija (mg/g)				
	Alilsulfid (AS)	Dialilsulfid (DADS)	Dialiltruslfid (DATS)	Alicin (AC)	S-metilestar metanetiosulfonske kiseline (MMTS ₂)
200	72,1	37,9	717	388	180
250	42,1	27,3	25,8	315,9	67,4
300	72,1	10,6	17,8	193,5	85,1
350	26,1	31,1	17,4	210,5	n.d.
400	66,1	40,2	27,2	458,4	20,4

Različiti autori su istraživali uticaj procesnih parametara SC-CO₂ na ekstrakciju sumpornih jedinjenja iz belog ili crnog luka. U ranijim istraživanjima i optimizaciji ekstrakcionih parametara SC-CO₂ za izolovanje alicina iz belog luka Calvey i saradnici (1994) su preporučili temperaturu od 36 °C i pritisak veći od 240 bar, a slični uslovi su zabeleženi i u istraživanju Rybaka i saradnika (2004) (45 °C i 310 bar). Drugi autori su zaključili da pritisak i temperatura imaju pozitivan uticaj na prinos ekstrakcije aromatičnih komponenti, pri čemu se najveći prinos (~15 g aromatičnih jedinjenja/kg) dobija korišćenjem pritiska od 300 ili 450 bara na temperaturi od 65 °C (Sass-Kiss i sar., 1998). Optimizacijom procesnih parametara SC-CO₂ korišćenjem RSM, Ye i Lai (2012) su dobili najveći prinos etarskog ulja iz belog luka (4,69 g/kg SM) na pritisku od 206 bar i temperaturi 40,6 °C u trajanju od 260 min pri protoku CO₂ od 22 L/h. Del Valle i saradnici (2012) su za dobijanje ekstrakta belog luka bogatog alicinom predložili sledeće ekstrakcione uslove: 55 °C, 300 bar, 4 h i 55 kg/kg CO₂/uzorku kao optimalne .

Na osnovu dosadašnjih literaturnih podataka o uticaju procesnih parametara tokom SC-CO₂ ekstrakcije, može se zaključiti da je optimalna temperatura za dobijanje ekstrakta lista sremuša sa visokim sadržajem sumpornih jedinjenja 40-50 °C, dok je kao optimalan predložen pritisak u opsegu 240-300 bara. Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije, na osnovu kojih je kao optimalna temperatura preporučena 50 °C, a kao optimalni pritisak 200 bar, su u skladu sa dosadašnjim rezultatima. Optimalni uslovi svakako zavise od sirovine koja se ekstrahuje i variraju u zavisnosti od sorte luka.

4.8. Enkapsulacija pomoću *spray drying* tehnike

Tečni biljni ekstrakt, dobijen na optimalnim uslovima ekstrakcije subkritičnom vodom, primenom odgovarajuće tehnike enkapsulacije vrlo jednostavno se može prevesti u formu suvog ekstrakta koji karakteriše povećana stabilnost i visoka koncentracija bioaktivnih jedinjenja. Pored ove prednosti u odnosu na tečne biljne ekstrakte, suvi ekstrakti su jednostavniji za manipulaciju i doziranje, transport i skladištenje. Jedna od najjednostavnijih i najefikasnijih tehnika koja se može primeniti za dobijanje ovakve forme ekstrakata je *spray drying*. Međutim, kao i u slučaju ekstrakcija, ukoliko proces nije dobro postavljen, odnosno ukoliko procesni parametri nisu dobro odabrani, prilikom sušenja *spray drying* tehnikom može doći do pojave problema, kao što su lepljivost ekstrakta, nedovoljna efikasnost sušenja, proizvodnja ekstrakata neadekvatnog kvaliteta u pogledu fizičko-hemijskih karakteristika ili izostanak farmakološke aktivnosti suvih ekstrakata usled degradacije bioaktivnih komponenti. Stoga se pod efikasnim procesom podrazumeva proizvodnja suvog ekstrakta bez pojave lepljivosti i zaostajanja na zidovima komore *spray dryer* uređaja, uz minimalno smanjenje biološke aktivnosti (Bhandari i sar., 1997). Dobijeni proizvod treba da zadovolji željene fizičko-hemijske karakteristike, a sadržaj vlage suvih ekstrakata mora da bude nizak, kako bi proizvodi bili stabilni sa aspekta njihovih fizičko-hemijskih osobina i zadržali svoju bioaktivnost. Rastvorljivost suvih ekstrakata je takođe jedan od značajnih parametara, zbog poželjnog brzog rastvaranja za dalju primenu u prehrambenim ili farmaceutskim proizvodima (Bhandari i sar., 1997).

U okviru ovog dela disertacije prikazani su rezultati sušenja ekstrakta lista sremuša koji je dobijen na optimalnim uslovima ekstrakcije subkritičnom vodom. U eksperimentalnom radu ispitan je uticaj pre svega dodatka nosača i agensa za sušenje, maltodekstrina (MD DE 19,7), na efikasnost procesa i fizičko-hemijska svojstva dobijenih suvih ekstrakata. Maltodekstrin je uspešno primenjen u enkapsulaciji bioaktivnih jedinjenja iz različitih biljnih ekstrakata (Mahdavi i sar., 2016; Marques i sar., 2014; Medina-Torres i sar., 2016). Pored široke primene u prehrambenoj industriji, maltodekstrin je najčešće korišćen nosač u procesima mikroenkapsulacije zbog niske cene, neutralne arome i ukusa (umereno sladak), visoke rastvorljivosti i niskog viskoziteta. Analizirani suvi ekstrakti su dobijeni sušenjem na ulaznoj temperaturi sušenja 120 °C i 140 °C a izlazna temperature je bila podešena na 80 °C. Protok napojne smeše je u svim eksperimentima bio konstantan.

4.8.1. Fizičke osobine suvih ekstrakata

Kao rezultat sušenja tečnog ekstrakta dobijen je prah žuto-braon boje, čija je boja zavisila od dodate količine maltodekstrina. Promena boje izražena preko parametara L^* , a^* , b^* prikazana je u tabeli 24. Boja dobijenih suvih ekstrakata je statistički značajno zavisila od količine dodatog maltodekstrina, odnosno povećanjem sadržaja maltodekstrina u suvim ekstraktima najveća promena je zapažena za a^* i b^* parametre, dok je za L^* parametar ta promena bila manje izražena.

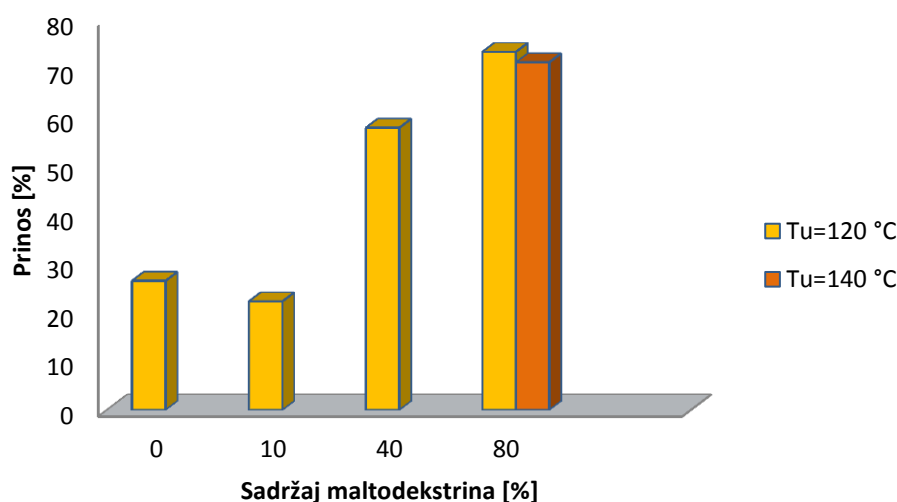
Tabela 24 Parametri boje dobijenih suvih ekstrakata u zavisnosti od uslova *spray drying* procesa

Sadržaj MD (%)	Ulazna temperatura sušenja (°C)	L^*	a^*	b^*
0	120	64,95 ^c	10,61 ^a	40,51 ^a
10	120	63,43 ^c	10,13 ^b	38,82 ^b
40	120	67,82 ^b	8,78 ^c	35,46 ^c
80	120	79,11 ^a	4,78 ^d	34,45 ^d
80	140	79,76 ^a	3,78 ^e	29,03 ^e

Vrednosti obeležene istim slovom u koloni nisu značajno različite na 5% (Tukey's test).

Kako bi proces dobijanja suvih ekstrakata *spray drying* tehnikom bio ekonomski isplativ, proces sušenja se smatra efikasnim ukoliko je prinos sušenja jednak ili veći od 50% (Vidović i sar., 2014). Na osnovu toga, proces dobijanja suvih ekstrakata sremuša *spray drying* tehnikom se smatra efikasnim u slučaju dodatka MD u koncentraciji od 40 ili 80% (slika 42). Efikasnost *spray drying* procesa je varirao u širokom rasponu od 26,45 do 73,36%. Uočeno je da efikasnost sušenja raste sa dodatkom maltodekstrina u postupku dobijanja suvih ekstrakata primenom *spray drying* tehnike. Veća ulazna temperatura (140 °C) sušenja pri istoj količini MD (80%) je dovela do smanjenja efikasnosti u odnosu na nižu ulaznu temperaturu sušenja (120 °C), ali ovo smanjenje nije bilo značajno (3%). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim u istraživanju Nadeem i saradnika (2013), koji su došli do zaključka da povećanjem ulazne temperature dolazi do smanjenja efikasnosti *spray drying* procesa. Dalje povećanje ulazne temperature u okviru ove disertacije nije ispitivano baš iz navedenog razloga. Takođe, dalje povećanje ulazne temperature moglo bi imati i negativan uticaj na bioaktivne komponente sadržane u ekstraktu.

Dodatak MD je značajno uticao na efikasnost *spray drying* procesa. Značajno bolja efikasnost procesa je postignuta dodatkom MD u koncentraciji 80% u odnosu na suvi ostatak, pri čemu se efikasnost procesa povećala za 2-3 puta u odnosu na ekstrakt dobijen u sušenju bez dodatka MD ili sa dodatkom MD u koncentraciji od 10%. Ovakav uticaj količine nosača na efikasnost sušenja je u skladu sa istraživanjima i drugih autora, koji navode da se povećanjem količine nosača povećava i sadržaj čvrste materije u napojnoj smeši, što rezultira većim prinosom suvog ekstrakta (Pavlič i sar., 2017; Vidović i sar., 2014).



Slika 42 Prinos suvih ekstrakta u zavisnosti od dodatka maltodekstrina

Efikasnost procesa sušenja *spray drying* tehnikom razmatra se i sa aspekta lepljenja suvog ekstrakta na zidovima komore za sušenja, povezanim cevima i ciklonu. Takođe, jedan od pokazatelja smanjenje efikasnosti je pojava naslaga, koje ne moraju biti lepljive, na istim delovima uređaja. U eksperimentu gde je ekstrakt sušen bez dodatka maltodekstrina i sa dodatkom od 10% uočeno je lepljenje dobijenog praha na ciklon i gubitak dobijenog praha. Ovaj fenomen prikazan je na slici 43. Prilikom dodavanja 40% maltodekstrina efikasnost procesa sušenja je bila znatno veća (57,81%) a lepljivost i formiranje naslaga na delovima uređaja nisu bili toliko izraženi. Dodatak 80% MD je dao najbolje rezultate u pogledu efikasnosti. Caliskan i Nur Dirim (2013) su se susreli sa sličnim problemom primenom *spray drying* tehnike u sušenju ekstrakta grozdastog ruja. Sušenje bez dodatka nosača je rezultiralo niskim prinosom i neefikasnim procesom dobijanja suvog ekstrakta. Dobijeni prah se lepio na ciklon i komoru za sušenje. Dodatak maltodekstrina značajno je poboljšao prinos i osobine dobijenog suvog ekstrakta (Caliskan i Nur Dirim, 2013).

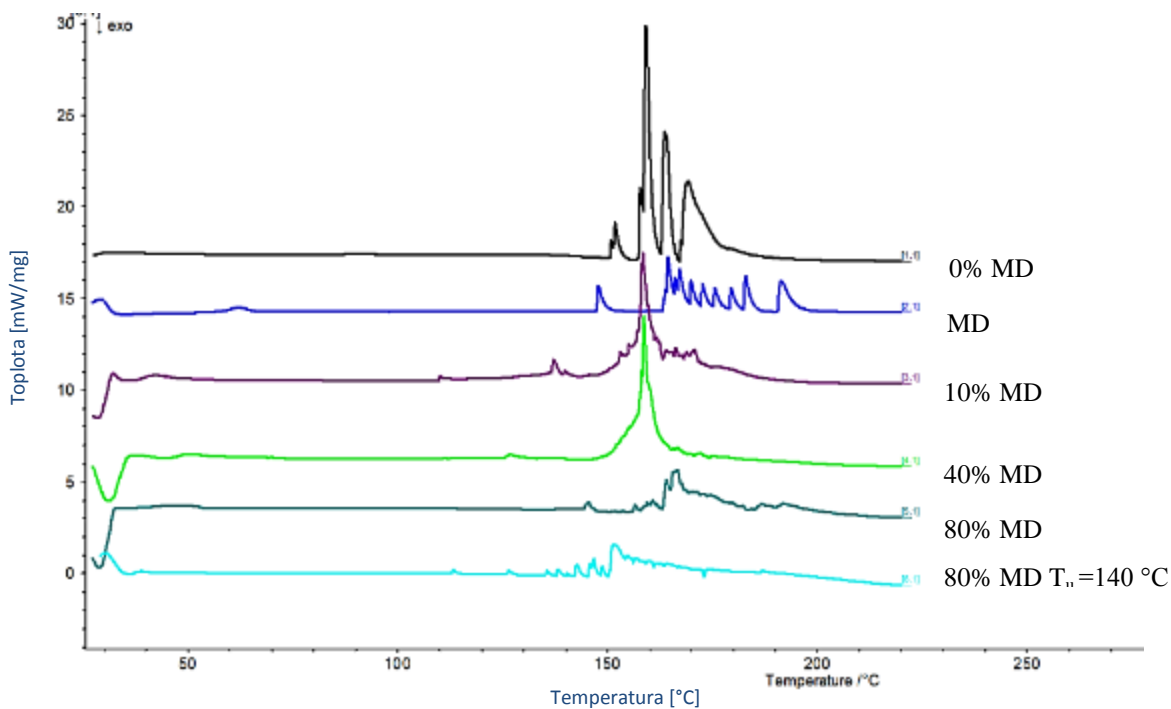
Lepljivost ekstrakta se najčešće povezuje sa sadržajem šećera (glukoza, fruktoza i saharoza) i organskih kiselina (limunska, malinska i vinska kiselina) u tečnom ekstraktu koji se suši. Ove komponente izazivaju lepljivost zbog niske temperature prelaska u staklasto stanje (koja je npr. za glukozu i fruktozu $T_g = 14,31 \text{ }^\circ\text{C}$). Celli i saradnici (2016) došli su do zaključka da niska T_g može biti uslovljena i sastavom aktivnih komponenti prisutnih u ekstraktu (fenoli, organske kiseline, monosaharidi). Zbog toga, da bi se smanjila lepljivost, mora se povećati temperatura prelaska u staklasto stanje, što se najčešće postiže dodatkom aditiva-nosača (Shrestha i sar., 2007). Temperatura prelaska u staklasto stanje čistog maltodekstrina i dobijenih suvih ekstrakata određena je diferencijalnim skenirajućim kalorimetrom (model 204F1 Phoenix, NETSCH, Nemačka). Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) je u ovoj disertaciji upotrebljena kako bi se utvrdile fizičke ili hemijske transformacije, kako pojedinačnih komponenata, tako i dobijenih suvi ekstrakata i potencijalne interakcije između komponenata ekstrakta i nosača. Temperatura prelaska u staklasto stanje čistog maltodekstrina (MD DE 19,7) korišćenog u okviru ove doktorske disertacije je iznosila $66,6 \text{ }^\circ\text{C}$, dok je T_g za dobijene suve ekstrakte prikazana u tabeli 25. Dodatkom veće količine maltodekstrina dolazi do povećanja T_g , što je i u korelaciji sa većom efikasnošću procesa sušenja i smanjenom pojavom lepljivosti u procesu sušenja.



Slika 43 Suvii ekstrakti dobijeni *spray drying* tehnikom sa dodatkom 10% (a) i 80% (b) maltodekstrina

Na termogramima prikazanim na slici 44 uočava se niz termalnih događaja, koji su zabeleženi u vidu pikova tokom zagrevanja uzoraka. Endotermni pikovi ukazuju na to da uzorak koji se analizira na određenoj temperaturi koristi energiju sistema, do čega najčešće dolazi usled gubitka vode ili usled topljenja uzorka. Razlike u poziciji i intenzitetu

maksimuma krivih ispitivanih uzoraka se verovatno javljaju kao posledica razlika u sadržaju vode, tj. vlage u uzorku i hemijskim vezama u strukturi materijala, što je verovatno posledica međusobne interakcije sa nosačem (Kalušević, 2017). Poređenjem DSC krivih ispitivanih uzoraka uočava se da povećanjem udela maltodekstrina dolazi do povećanja vrednosti Tg. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je do najveće promene došlo dodavanjem 10% maltodekstrina kao nosača, dok veći sadržaj maltodekstrina nije statistički značajno uticao na povećanje temperature prelaska u staklasto stanje.



Slika 44 DSC termogram suvog ekstrakta u zavisnosti od sadržaja maltodekstrina

Tabela 25 Sadržaj vlage i higroskopnost isuvih ekstrakata

Sadržaj MD (%)	Ulazna temperatura sušenja (°C)	Sadržaj vlage (%)	T _g (°C)	Higroskopnost (%)		
				Nakon 24 h	Nakon 2 dana	Nakon 7 dana
0	120	15,83 ^a	>20 ^a	9,26 ^b	12,90 ^b	21,43 ^a
10	120	13,07 ^b	42,3 ^b	8,85 ^{b,c}	12,32 ^b	18,67 ^b
40	120	11,13 ^c	51,6 ^c	8,55 ^c	11,08 ^c	17,79 ^b
80	120	7,65 ^d	52,5 ^c	8,53 ^c	10,48 ^c	17,69 ^b
80	140	5,02 ^e	52,4 ^c	13,46 ^a	17,26 ^a	21,18 ^a

Vrednosti obeležene istim slovom u koloni nisu značajno različite na 5% (Tukey's test). T_g – temperature prelaska u staklasto stanje

Sadržaj vlage u suvim ekstraktima je veoma bitna karakteristika koja utiče na fizičko-hemijsku i mikrobiološku stabilnost dobijenog proizvoda-suvog ekstrakta. Nizak sadržaj vlage u suvim ekstraktima sprečava aglomeracija čestica i omogućava očuvanje dobrih protočnih karakteristika suvih ekstrakata (da Silva i sar., 2013). U ispitivanim suvim ekstraktima, sadržaj vlage se kretao u rasponu od 5,02 do 15,83%. Dodatkom maltodekstrina, sadržaj vlage je značajno smanjen, a najmanji sadržaj vlage je određen u uzorku dobijenom dodatkom 80% maltodekstrina pri ulaznoj temperaturi sušenja od 140 °C. Razlike u sadržaju vlage su bile statistički značajne, čak i pri istom sadržaju maltodekstrina (80%), a različitoj ulaznoj temperaturi, na osnovu čega se može zaključiti da temperatura sušenja može biti značajan parametar koji utiče na sadržaj vlage u finalnom proizvodu. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Mishra i saradnika (2014), koji upućuju na to da su dodatak maltodekstrina i viša ulazna temperatura uticali na sadržaj vlage u finalnom proizvodu. Tengse i saradnici (2017) su došli do zaključka da viša ulazna temperatura može smanjiti relativnu vlažnost vazduha, koji se ubrizgava u komoru za sušenje i ubrzava prenos toplote između vazduha i napojne smeše, što rezultira nižim sadržajem vlage u dobijenom proizvodu. U skladu sa pravilnikom o kvalitetu čaja, biljnog čaja i njihovih proizvoda (Sl. glasnik RS, br. 4/2012) instant-čaj, odnosno biljni instant-čaj u čvrstom stanju, proizvod u čiju grupu se može uvrstiti suvi ekstrakt sremuša treba da zadovolji uslov u pogledu sadržaja vlage u proizvodima ovog tipa do 8%. Suvi ekstrakti koji zadovoljavaju uslove ovog pravilnika su ekstrakti dobijeni sušenjem na ulaznoj temperature od 120 i 140 °C sa dodatkom 80% maltodekstrina. Zbog visokog sadržaja vlage, upotreba ostalih ekstrakata bi mogla biti ograničena za dalju upotrebu u prehrambenoj ili farmaceutskoj industriji.

Prema istraživanjima koja su sproveli Vladić i saradnici (2016), očekuje se da dodatak maltodekstrina dovede do smanjenja higroskopnosti suvih ekstrakata. Međutim, analizom dobijenih rezultata prikazanih u tabeli 25, može se zaključiti da ove razlike nisu bile statistički značajne za uzorke proizvedene dodatkom 10, 40 i 80% maltodekstrina nakon prvog i sedmog dana od njihove proizvodnje. Higroskopnost biljnih ekstrakata može da se pripíše prisustvu komponenti sa hidrofilnim karakterom kao što su ugljeni hidrati, glikozidi, organske kiseline, fenoli, aminokiseline, proteini (Chang i sar., 2014). Pored dodatka nosača, temperatura sušenja ima takođe veliki uticaj na higroskopnost suvog ekstrakta i očekivano je da suvi ekstrakti dobijeni na većim temperaturama imaju veću higroskopnost, obzirom da se na višim temperaturama dobijaju poroznije čestice i na taj način je olakšana apsorpcija vode (de Souza i sar., 2015). Ova konstatacija je u skladu sa rezultatima dobijenim u okviru ove doktorske disertacije. Najveća higroskopnost je zabeležena u uzorku dobijenom dodatkom 80% MD i sušenjem na ulaznoj temperaturi od 140 °C. Higroskopnost ispitivanih suvih ekstrakata na 25°C i 90% relativnoj vlažnosti vazduha se povećala za 1,2–1,4 puta nakon dva dana u odnosu na higroskopnost izmerenu nakon 24 sata, a nakon sedam dana higroskopnost je povećana 1,5–2,3 puta u odnosu na higroskopnost izmerenu nakon 24 h. Zbog sposobnosti suvih ekstrakata sremuša da apsorbuju vlagu iz okoline, preporučuje se skladištenje pod kontrolisanim uslovima sa smanjenim prisustvom vlage.

Kako se dobijeni suvi ekstrakt često dalje primenjuje za proizvodnju farmaceutskih i prehrambenih proizvoda oni moraju da ima zadovoljavajuće karakteristike. Prema Hoge Kamp i Schubert (2003), dobijeni suvi ekstrakt treba da se brzo i potpuno kvasi, da ne pliva po površini rastvarača, nego da tone i da se dobro rastvara ili disperguje. Indeks rastvorljivosti u vodi predstavlja značajan parametar pri karakterizaciji dobijenih praškastih proizvoda, odnosno suvih ekstrakata, jer pokazuje sposobnost suvog ekstrakta da se rastvara u vodi. Veća vrednost indeksa rastvorljivosti u vodi znači bolje rastvaranje. Rezultati analiziranih suvih ekstrakata (tabela 26) su pokazali visoke vrednosti indeksa rastvorljivosti u vodi (77,13–85,05 %), što implicira da se dobijeni suvi ekstrakti lako rastvaraju u vodi. Dodatak veće količine maltodekstrina nije statistički značajno uticao na indeks rastvorljivosti u vodi, ali je uticao na brzinu rastvaranja. Suvi ekstrakti sa većim sadržajem maltodekstrina su se brže rastvarali u vodi. Za razliku od indeksa rastvorljivosti u vodi, indeks apsorpcije vode predstavlja sposobnost praškastih proizvoda, suvih ekstrakata da apsorbuje vodu i kod ovog indeksa su poželjne niže vrednosti (Hoge Kamp i Schubert, 2003). Analiziranjem rezultata prikazanih u tabeli 26, zapaženo je da se povećanjem količine maltodekstrina redukuje

kapacitet zadržavanja vode u suvim ekstraktima, pa se može zaključiti da dodatak maltodekstrina pozitivno deluje na ove osobine dobijenih ekstrakta.

Tabela 26 Vrednosti nasipne zapremine, indeksa rastvorljivosti u vodi, indeksa apsorpcije vode i brzine rastvaranja u suvim ekstraktima sremuša

Sadržaj MD (%)	Ulazna temperatura sušenja (°C)	Nasipna zapremina (mg/ml)	Indeks rastvorljivosti u vodi (%)	Indeks apsorpcije vode	Brzina rastvaranja (s)
0	120	250	77,13 ^a	7,61 ^a	137 ^a
10	120	250	82,04 ^b	7,13 ^b	114 ^b
40	120	230	83,81 ^b	5,78 ^c	105 ^c
80	120	620	85,05 ^b	1,78 ^d	68 ^d
80	140	570	80,30 ^b	0,78 ^e	62 ^e

Vrednosti obeležene istim slovom u koloni nisu značajno različite na 5% (Tukey's test).

Nasipna zapremina je bitna osobine praškastih proizvoda sa funkcionalnog i ekonomskog aspekta i značaja je za dalje procesuiranje praškastih proizvoda, skladištenje, pakovanje i distribuciju (Nadeem i sar., 2013). Obzirom da su praškaste forme izuzetno zastupljene u proizvodnji različitih farmaceutskih i prehrambenih proizvoda, poželjne su veće nasipne zapremine (Paini i sar., 2015). Nasipna masa dobijenih suvih ekstrakta sremuša se kretala od 230 do 620 mg/ml. Vrednost nasipne zapremine se značajno povećala sa povećanjem sadržaja maltodekstrina. Povećanje nasipne zapremine sa povećanjem koncentracije nosača je u skladu sa zapažanjima i drugih autora (Nadeem i sar., 2013). Osim količine nosača, na nasipnu zapreminu utiče i vrsta nosača, ulazna temperature unutar *spray dryer* komore, brzina raspršivanja i protok napojne smeše (Shrestha i sar., 2007).

4.8.2. Sadržaj bioaktivnih komponenti

Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim suvim ekstraktima se kretao od 23,00 do 28,21 mg EGK/g suvog ekstrakta. Najveći sadržaj ukupnih fenola je detektovan u ekstraktu bez nosača, 28,21 mg/g (tabela 25). Prilikom dodavanja maltodekstrina sadržaj ukupnih fenola se nije menjao u širokom rasponu, ali su dobijeni rezultati bili međusobno statistički značajno različiti. Najveći sadržaj flavonoida je detektovan u uzorku dobijenom sa dodatkom maltodekstrina od 10%, 6,33 mg KE/g suvog ekstrakta, dok se daljim povećanjem maltodekstrina ukupan sadržaj flavonoida smanjio. Razlike antioksidativne aktivnosti dobijenih suvih ekstrakata su bile male, bez obzira na dodatku količinu maltodekstrina. Povećanje sadržaja maltodekstrina uticalo je na smanjenje sadržaja bioaktivnih komponenti u poređenju sa suvim ekstraktom bez dodatka maltodekstrina (tabela 27). Međutim, što se tiče sadržaja ukupnih flavonoida i antioksidativne aktivnosti, dodatak maltodekstrina od 40% i 80% nije pokazao međusobno statistički značajne razlike. Razlog smanjenja sadržaja fenola i flavonoida u ekstraktima sa većim količinama maltodekstrina može biti „razblažujući“ efekat maltodekstrina, jer se sa dodatkom veće količine nosača smanjuje sadržaj fenola u napojnoj smeši (Vidović i sar., 2014). „Razblažujući“ efekat usled dodatka nosača je zabeležen i kod suvog ekstrakta planinskog čaja (*Sideritis stricta*) (Şahin Nadeem i sar., 2011). Međutim, iako dodatak maltodekstrina ima razblažujući efekat, maltodekstrin kao nosač ima i zaštitnu ulogu, smanjuje degradaciju fenolnih jedinjenja i antioksidativnog potencijala (Brown i sar., 2016).

Tabela 27 Sadržaj bioaktivnih komponenti u dobijenim suvim ekstraktima

Sadržaj MD (%)	Ulazna temperatura sušenja (°C)	Ukupni fenoli (mg EGK/g SE)	Ukupni flavonoidi (mg KE/g SE)	IC ₅₀ (mg/ml)
0	120	28,21 ^a	6,22 ^a	0,25 ^b
10	120	26,02 ^b	6,33 ^a	0,31 ^a
40	120	22,98 ^c	5,47 ^{a,b}	0,24 ^{b,c}
80	120	23,00 ^c	4,92 ^b	0,21 ^{b,c}
80	140	23,44 ^d	4,89 ^b	0,21 ^{b,c}

Vrednosti obeležene istim slovom u koloni nisu značajno različite na 5% (Tukey's test).

EGK – ekvivalent galne kiseline, KE – ekvivalent katehina, IC₅₀ – inhibitorna koncentracija, SE – suvi ekstrakt

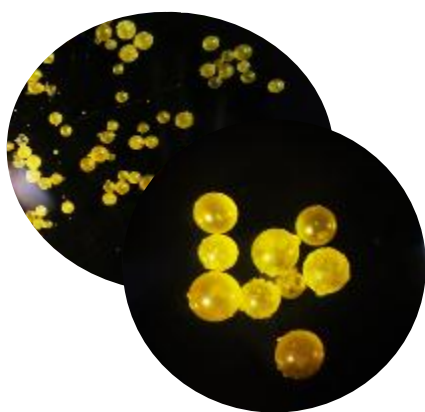
Za potrebe dobijanja stabilnije forme, odnosno suvog ekstrakta sremuša, uz primenu *spray drying* tehnike najbolji efekti u pogledu fizičkih karakteristika (sadržaj vlage, higroskopnost, nasipna zapremina brzina rastvaranja, indeks apsorpcije vode i indeks rastvorljivosti u vodi) i sadržaja ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i antioksidativne aktivnosti ostvareni su pri dodatku 80% maltodekstrina i sušenju na ulaznoj temperaturi od 120 ili 140 °C i izlaznoj temperaturi od 80 °C.

4.9. Enkapsulacija superkritičnog ekstrakta lista sremuša *spray congealing* tehnikom

U naučnoj i stručnoj literaturi postoje podaci o enkapsulaciji velikog broja biljnih ekstrakta, među kojima su ekstrakt pulpe paradajza (Chiu i sar., 2007), rabarbare (Hsu i sar., 2013), ruzmarina (Hsu i sar., 2013), konoplje (Passerini i sar., 2012) ili cimeta (Tulini i sar., 2016) u cilju poboljšanja njihove biorasploživosti i rastvorljivosti. Biljni ekstrakti su podložni degradaciji ili promenama ekstrahovanih bioaktivnih komponenti, pri čemu ove promene mogu biti uzrokovane različitim faktorima od kojih su uslovi skladištenja jedni od najčešćih (Fujisawa i sar., 2008; Wang i sar., 2015). Enkapsulacija se često primenjuje kao bi se održala stabilnost bioaktivnih komponenti sadržanih u ekstraktu ili poboljšale njegove karakteristike u pogledu mogućnosti doziranja i skladištenja, jednostavnosti manipulacije i inkorporacije u različite proizvode u prehrambenoj ili farmaceutskoj industriji. Obzirom da se mikročestice dobijene *spray congealing* tehnikom sastoje od matriksa koji se nalazi unutar nosača, mogu se koristiti za poboljšanje stabilnosti, prikrivanje neprijatnog ukusa i smanjenje gastrointestinalne iritacije (Albertini i sar., 2008a; Almeida i sar., 2012; Passerini i sar., 2003; Sachan i sar., 2006). *Spray congealing* ne zahteva upotrebu vodenih ili organskih rastvarača, što ovu metodu čini ekološki prihvatljivom i manje vremenski i energetski zahtevanom u poređenju sa drugim tehnikama (Alvim i sar., 2016; Martins i sar., 2012). Ova tehnika predstavlja tehniku izbora kada se želi poboljšati rastvorljivost i brzina rastvaranja aktivnih komponenti slabo rastvorljivih u vodi (Ilić i sar., 2009; Passerini i sar., 2012, 2002a). Vrsta nosača i metoda enkapsulacije igraju najvažniju ulogu kada želi da se dobije proizvod dobrih karakteristika. Gelucire[®] 50/13 je ekscipijens rastvorljiv u vodi, namenjen formulacijama na bazi lipida u cilju poboljšanja soljubilizacije i povećanja oralne biorasploživosti za jedinjenja slabo rastvorljiva u vodi. Njegova tačka topljenja se kreće od 49 do 56 °C i zbog

toga je pogodan za enkapsulaciju termolabilnih jedinjenja (Albertini i sar., 2008b; Passerini i sar., 2012; Potluri i sar., 2011). Gelucire® 50/13 je zbog svojih dobrih karakteristika već uspešno korišćen za enkapsulaciju biljnih ekstrakata (Passerini i sar., 2012), i stoga je izabran kao nosač za enkapsulaciju odabranog superkritičnog ekstrakta suvog lista sremuša. Ekstrakt dobijen superkritičnom ekstrakcijom, primenom pritiska od 200 bar i na temperaturi od 50 °C, je enkapsuliran primenom *spray congealing* tehnike u Gelucire® 50/13 u koncentracije 5%, (m/m) u cilju poboljšanja rastvorljivosti ovog tipa ekstrakta i očuvanja njegove bioaktivnost tokom skladištenja. Ova tehnika može se smatrati posebno pogodnom za ovaj tip ekstrakta s obzirom na sadržaj sumpornih jedinjenja koja su posebno osetljiva na visokim temperaturama.

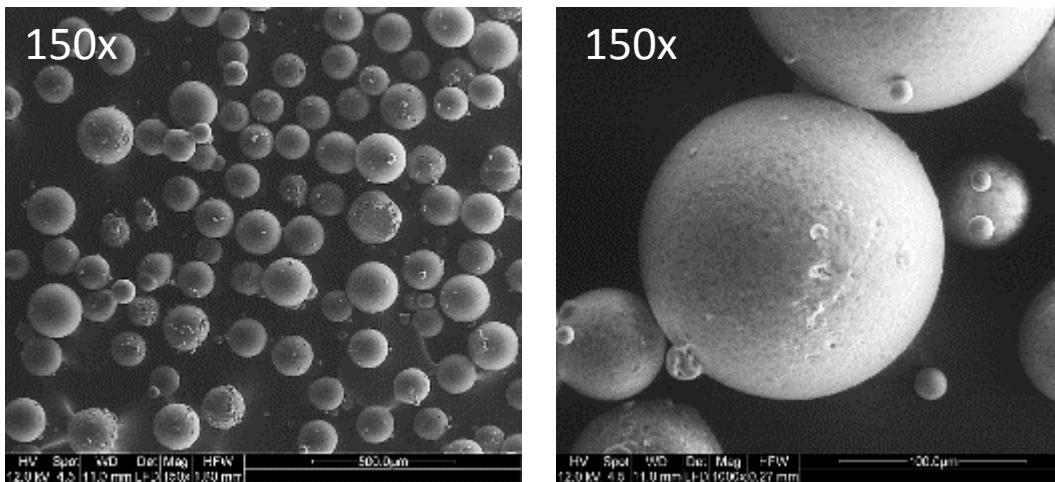
4.9.1. Karakterizacija čestica praha dobijenog *spray congealing* tehnikom



Slika 45 Slika čestica pod konfokalnim mikroskopom

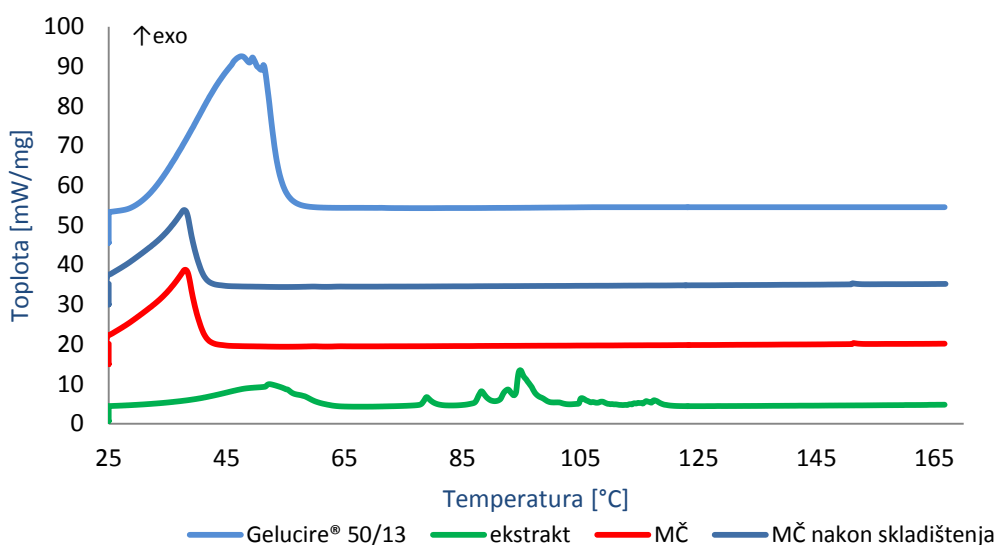
Primenom *spray congealing* tehnike dobijen je fin, žuto obojen prah (slika 45) sa visokim prinosom od 78%. Ovako visok prinos enkapsulacije je u skladu sa navodima drugih autora koji su koristili *spray congealing* tehniku (Di Sabatino i sar., 2012; Ilić i sar., 2010; Passerini i sar., 2012). Glavna odlika *spray congealing* tehnike je visok prinos, a prema Matos-Jr i saradnicima (2015) prinos najviše zavisi od procesnih parametara i dizajna procesne opreme, kao i od osobina nosača i enkapsuliranog materijala.

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) uzoraka omogućila je da se sagledaju veoma bitne karakteristike dobijenog enkapsuliranog ekstrakta, poput sferičnosti dobijenih čestica, izgleda površine, postojanja pora, pukotina, neravnina i slično. Na osnovu rezultata ove analize može se zaključiti da su analizirani uzorci (slika 46) pravilnog sfernog oblika, glatke površine bez vidljivih pora, odnosno šupljina, karakterističnog oblika i površine za izabrani nosač.



Slika 46 SEM mikrograf mikročestica

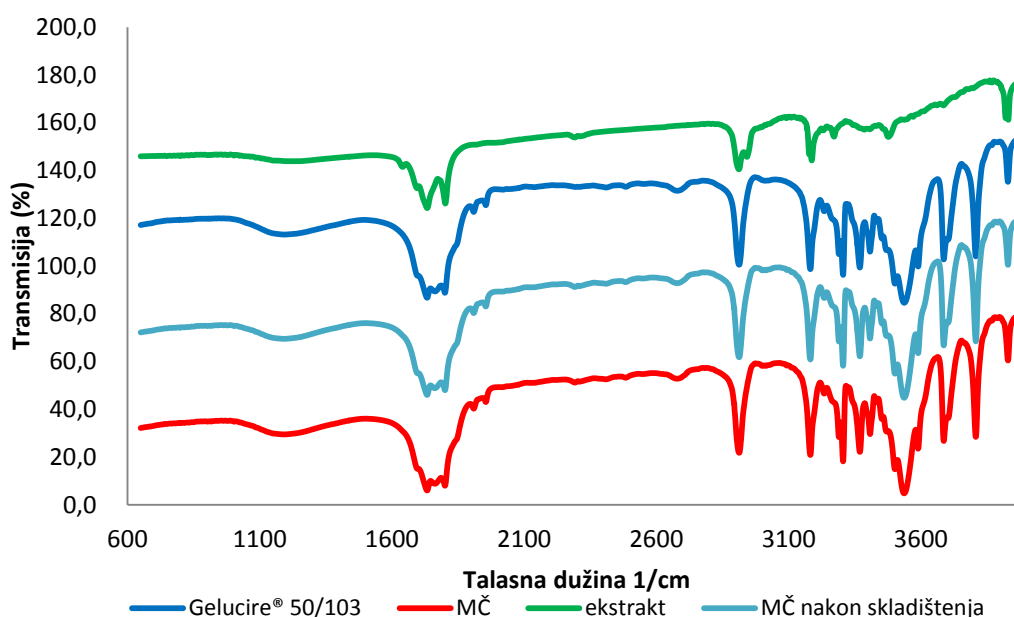
Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija je upotrebljena kako bi se utvrdila termička stabilnost, kako pojedinačnih komponenti, tako i potencijalne interakcije između komponenata tokom procesa enkapsulacije primenom *spray congealing* tehnike. Na DSC krivi superkritičnog ekstrakta uočava se nekoliko endotermnih pikova na oko 50 °C i u intervalu 80–120 °C. Uočeno je prisustvo endotermnog pika na oko 50 °C, što je verovatno povezano sa gubitkom isparljivih sastojaka ekstrakta. Dalje termalne promene, o čijoj pojavi svedoče endotermni pikovi u intervalu 80–120 °C mogu se povezati sa širokim spektrom sekundarnih metabolita prisutnih u ekstraktu. Analiziranjem dobijenih rezultata (slika 47) nisu zapažene dodatne tačke topljenje u analiziranom enkapsuliranom ekstraktu poređenju sa samim nosačem ili ekstraktom, verovatno zbog niskog sadržaja ekstrakta unutar čestica ili potpunog rastvaranja ekstrakta u otopljenom nosaču, što je i zapaženo prilikom pripreme uzorka. Nakon 3 meseca skladištenja ponovljena je DSC analiza, pri čemu je utvrđeno da nije došlo do promena tokom procesa skladištenja. Slično ponašanje su zabeležili Passerini i saradnici (2012) prilikom enkapsulacije ekstrakta konoplje kada je takođe korišćen Gelucire® 50/13 kao nosača, bez obzira što je u njihovom istraživanju sadržaj ekstrakta u česticama iznosio 15%.



Slika 47 DSC termogrami ispitivanih uzoraka ekstrakta, nosača i enkapsuliranog ekstrakta (MČ)

Osim termičke stabilnosti, čestice enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta su analizirane FTIR spektroskopijom) u cilju ispitivanja postojanja hemijskih veza između nosača i ekstrakata. Naime, FTIR se pokazala kao veoma pogodna analiza za karakterizaciju hemijskih jedinjenja ili funkcionalnih grupa u biljnim ekstraktima nepoznatog sastava (Sasidharan i sar., 2011). Ova analiza se često koristi kao nedestruktivna metoda, jer se uzorak ne podvrgava termalnoj promeni za razliku od DSC (Fernandes i sar., 2013). Stoga, da bi se utvrdilo da li je došlo do hemijskih promena u strukturi enkapsuliranog ekstrakta, dobijene čestice su analizirane FTIR spektroskopijom. Na slici 48 su dati rezultati FTIR spektroskopske analize enkapsuliranog ekstrakta, kao i nosača i ekstrakta pojedinačno. FTIR spektar nosača, Gelucire® 50/13, prikazanog na slici 48 karakteriše nekoliko valencionih opsega između 3850 cm^{-1} i 2954 cm^{-1} zbog istežanja slobodnih OH grupa iz COOH grupa, valencionna traka na 1960 cm^{-1} i valencionna C=O vibracija na 1739 cm^{-1} i manji maksimum na 1200 cm^{-1} usled istežanja -C-O grupe. Slične rezultate za Gelucire® 50/13 su dobili i Martins i saradnici (2013) i Passerini i saradnici (2002). Čist ekstrakt je pokazao nekoliko valencionih opsega između 3505 i 2949 cm^{-1} i između 1808 i 1767 cm^{-1} (slika 48). Ayala-Zavala i saradnici (2008) su analizirali FTIR spektar etarskog ulja belog luka, koji pokazuje karakteristične trake između 3100 i 2900 cm^{-1} , i u delu od 1700 do 1000 cm^{-1} , slično kao i ispitivani ekstrakt u ovom istraživanju. Na osnovu rezultata FTIR spektra koje su dobili Fernando i saradnici (2008), Ren i saradnici (2016) i Ilić i saradnici (2012) ispitivani

enkapsulirani superkritični ekstrakt sremuša u okviru ovog istraživanja se može okarakterisati valenciono asimetričnim vibracijama istezanja koje pripadaju =CH₂ (3118 cm⁻¹), valenciono simetrične vibracijama istezanja koje pripadaju CH (2969 cm⁻¹) i valencionim vibracije koje pripadaju O-H (3415 cm⁻¹). Poređenjem dobijenih spektara, ustanovljeno je da nema prisustva dodatnih hemijskih veza u vidu novih pikova između aktivnih komponenata, odnosno komponenti superkritičnog ekstrakata i nosača, što ukazuje da su je smeša zadržale postojeće veze, odnosno one predstavljaju višekomponentne smeše. Dobijene čestice su bile stabilne, bez hemijskih promena u periodu od tri meseca.



Slika 48 FT-IR spektara ispitanih uzoraka ekstrakta, nosača i enkapsuliranog ekstrakta (MČ)

Gelucire® 50/13 je izabran kao nosač za enkapsulaciju superkritičnog ekstrakta, jer je poznat i kao ekscipijens koji poboljšava rastvorljivost i/ili kinetiku rastvaranja slabo rastvorljivih jedinjenja u vodi, u ovom slučaju ekstrakta. Bioaktivna jedinjenja biljnog porekla su često slabo rastvorljiva u vodi, što za posledicu ima nisku bioraspoloživost u ljudskom organizmu po konzumiranju, odnosno smanjeno pozitivno delovanje. Gunasekaran i saradnici (2014) su utvrdili da se enkapsulacijom lekova biljnog porekla povećava njihova rastvorljivost, stabilnost i delovanje, kao i zaštićenost od fizičkih i hemijskih promena.

Najvažniji faktor koji utiče na oslobađanje enkapsuliranog matriksa su fizičke osobine i hemijski sastav matriksa i nosača. Generalno, enkapsulirani matriks se sporije oslobađa iz lipofilnih nosača (Wong i sar., 2015).

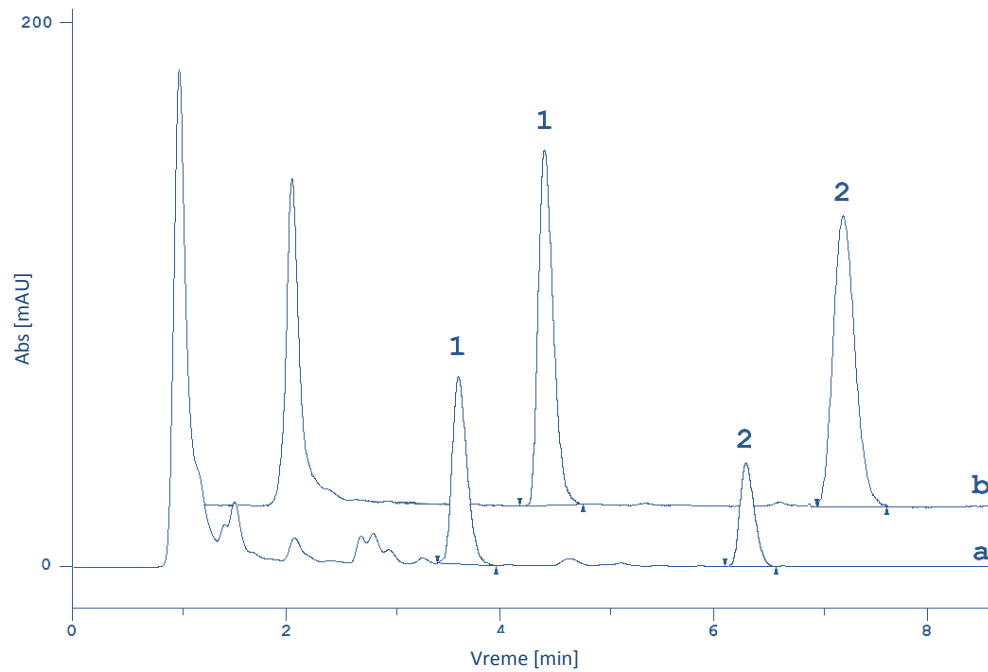
4.9.2. Sadržaj i stabilnost aktivnih komponenti unutar čestica dobijenih *spray congealing* tehnikom

Pozitivan uticaj na zdravlje čoveka koje ispoljava sremuš je povezan sa njegovim sadržajem sumpornih jedinjenja i alicinom kao predstavnikom. Osim antimikrobnog delovanja, alicin ispoljava bitnu ulogu u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja, a pokazuje i antioksidativno dejstvo (Ilić i sar., 2010). Druga komponenta sremuša koja doprinosi antimikrobnom delovanju je *S*-metilmetantiosulfonat. Zbog antimikrobnih osobina, alicin i *S*-metilmetantiosulfonat su odabrani kao komponente od značaja i ispitano je njihovo prisustvo u dobijenim česticama sa enkapsuliranim ekstraktom. Takođe, zbog nestabilnosti ovih jedinjenja, ispitan je uticaj enkapsulacije na očuvanje ovih aktivnih komponenti ekstrakta tokom skladištenja u trajanju od 3 meseca.

U enkapsuliranom superkritičnom ekstraktu sremuša dobijenom primenom *spray congealing* tehnike HPLC tehnikom detektovano je 80,0 ng AC/mg, dok je u česticama enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta skladištenim (u polietilenskim bočicama, na 4 °C) tokom tri meseca detektovano 77,3 ng/mg. Sadržaj *S*-metilestra metanskufonske kiseline je detektovan neposredno nakon proces proizvodnje čestica sa enkapsuliranim ekstraktom i nakon tri meseca skladištenja, pri čemu je taj sadržaj iznosio 52,5 ng/mg i 43,8 ng/mg, respektivno. Tokom tri meseca skladištenja došlo je do redukcije alicina unutar čestica za oko 3%, dok je redukcija za MMTS₂ iznosila 16,5% (slika 49). Del Valle i saradnici (2012) su pratili sadržaj alicina detektovanog u superkritičnom ekstraktu belog luka kako bi odredili njegovo vreme degradacije. Na osnovu rezultata u prikazanim u radu Del Valle i saradnika (2012) utvrđeno je da se sadržaj alicina smanjuje za 51% tokom 8 dana skladištenja na sobnoj temperaturi, za 33% u kiseloj sredini (pH=3) na sobnoj temperaturi i za 10% u kiseloj sredini (pH=3) na temperaturi od 6 °C. Lu i saradnici (2014) su uspeli da produže stabilnost alicina do 30 dana enkapsulacijom u nanoliposome, dok su Wang i saradnici (2012) koristili *spray drying* tehniku za enkapsulaciju alicina u smeši β-ciklodekstrina i skroba u cilju očuvanja njegove bioaktivnosti. Ovako enkapsulirane čestice su sadržale 20–40% viši sadržaj alicina u odnosu na nekapsulirani uzorak i bile su stabilne što se tiče temperature, pH, uticaja svetlosti i kiseonika (Wang i sar., 2012).

Enkapsulacija se pokazala kao pogodna tehnika u cilju poboljšanja stabilnosti i očuvanja bioaktivnosti ekstrakta bogatih sumpornim jedinjenjima. Analizom stabilnosti čestica enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta sremuša, utvrđeno je da nakon 3 meseca

skladištenja dobijenih čestica nije došlo do značajnih promena tokom procesa skladištenja u vidu termičkih ili hemijskih promena. Mali stepen redukcije aktivnih komponenti tokom skladištenja, naročito za alicin, čini Gelucire® 50/13 odgovarajući nosač za očuvanje bioaktivnog potencijala enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta sremuša.



Slika 49 HPLC-DAD hromatogrami sminjeni na 210 nm a) mikročestice sa 5% ekstrakta sremuša nakon 90 dana skladištenja; b) smeša standarda sa 200 ng/ml (1) S-metil metanetiosulfonata i (2) alicina

4.10. Antibakterijsko delovanje odabranih ekstrakata lista sremuša

4.10.1. Antibakterijsko delovanje subkritičnog vodenog ekstrakta

U tabeli 28 prikazani su rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti ekstrakta sremuša dobijenog na optimalnim uslovima ekstrakcije subkritičnom vodom na Gram pozitivne (*L. monocytogenes*, *E. faecalis*) i Gram negativne (*S. Enteritidis*, *E. coli*, *P. hauseri*) bakterijske sojeve, inicijalno prisutne u različitim nivoima kontaminacije.

U tabeli 28 su prikazani samo rezultati određenih koncentracija, koje su pokazale međusobne razlike (5, 10 i 30 mg/ml). Subkritični vodeni ekstrakt sremuša je pokazao naj snažnije antibakterijsko delovanje pri koncentraciji od 30 mg/ml, gde nakon 24 h inkubiranja na 37 °C nije detektovano prisustvo niti jednog od ispitivanih patogena, pa se ova koncentracija može smatrati minimalnom inhibitornom koncentracijom (*MIC*).

Ispitivani ekstrakt je pri svim testiranim koncentracijama najjaču antibakterijsku aktivnost ispoljio prema *L. monocytogenes*, s obzirom da je izvesno inhibitorno dejstvo prema ovom mikroorganizmu zabeleženo čak i pri najnižoj radnoj koncentraciji subkritičnog vodenog ekstrakta (5 mg/ml) (tabela 26), što nije bio slučaj u oglelima sa ostalim bakterijskim sojevima gde antimikrobna aktivnost nije detektovana. U eksperimentima sa subkritičnim vodenim ekstraktom koncentracije 10 mg/ml, pri nižim nivoima kontaminacije (10^2 – 10^4 CFU/ml) broj *L. monocytogenes* se nakon završetka inkubiranja nije statistički značajno razlikovao ($p > 0,05$) u odnosu na početni broj, pa se može zaključiti da se antibakterijska aktivnost ekstrakta ovde sastojala od produženja *lag* faze na 24 h. Nasuprot tome, pod istim eksperimentalnim uslovima, povećanje inicijalnog broja *L. monocytogenes* (10^5 – 10^6 CFU/ml) je dovelo do njenog umnožavanja. Međutim, antibakterijska aktivnost je i dalje postojala i ogledala se u usporavanju rasta *L. monocytogenes*. U pozitivnim kontrolama rast *L. monocytogenes* je bio mnogo intenzivniji (8,64–8,71 CFU/ml na kraju inkubiranja). Uticaj nivoa kontaminacije na antibakterijski kapacitet ekstrakata dobijenog na optimalnim uslovima subkritične vodene ekstrakcije prema *L. monocytogenes* zabeležen je i pri najnižoj koncentraciji ekstrakta, gde je veći inicijalni broj ove bakterije, značio i njen veći broj na kraju ogleđa.

Iako je kod svih testiranih bakterijskih sojeva utvrđena jednaka vrednost *MIC* subkritičnog vodenog ekstrakta sremuša, ovaj ekstrakt je u manjim koncentracijama pokazao znatno slabiju antibakterijsku aktivnost prema *E. faecalis*, *S. Enteritidis*, *P. hauseri* i *E. coli*, nego što je to bio slučaj sa *L. monocytogenes*. Poređenjem broja ovih patogena u pozitivnim kontrolama, sa njihovim brojem zabeleženim u ogledima sa ekstraktom koncentracije 10 mg/ml, može se zaključiti da ekstrakt *A. ursinum* u ovoj koncentraciji ipak poseduje izvesno antibakterijsko dejstvo. Naime, broj testiranih patogena registrovan nakon 24 h u pozitivnim kontrolama je bio statistički značajno veći ($p < 0,05$) nego u bujonima sa dodatim ekstraktom, a antibakterijska aktivnost ekstrakta se ogledala u određenom usporavanju bakterijskog rasta.

Oba soja *E. coli* ispitivana u okviru ove doktorske disertacije su pokazala sličnu osetljivost na sve testirane koncentracije vodenog ekstrakta *A. ursinum*. Na osnovu nešto nižeg broja *E. coli* ATCC 8739 detektovanog u bujonima sa ekstraktom, ne može se izvesti zaključak o većoj osetljivosti ovog soja na antibakterijsko dejstvo u poređenju sa *E. coli* ATCC 10536, jer je broj *E. coli* ATCC 8739 bio manji od broja *E. coli* ATCC 10536 i u pozitivnim kontrolama.

U naučnoj literature postoji nekoliko radova koji su se bavili ispitivanjem antimikrobnog delovanja sremuša i ekstrakta sremuša (Sapunjjeva i sar., 2012)) Sapunjjeva i saradnici (2012) su ispitivali antibakterijsko delovanje 70% etanolnog ekstrakta sremuša na Gram pozitivne i Gram negativne bakterije (*L. monocytogenes*, *S. aureus* i *S. enterica* subsp. *Enterica*), pri čemu je ekstrakt pokazao veću zonu inhibicije na Gram pozitivne bakterije. Synowiec i saradnici (2010) su ispitivali antibakterijsko delovanje vodenog i etanolnog ekstrakta sremuša u koncentracionim opsezima 0,16–83,7mg/ml za vodeni i 0,06–35,5 mg/ml za etanolni rastvor. Oni su ispitivali antibakterijsko delovanje na sledeće sojeve: *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *S. Enteritidis*, pri čemu je vodeni rastvor ispoljio antimikrobno delovanje samo na *B. subtilis* ATTC 6633 sa *MIC* 83,7 mg/ml. U poređenju sa podacima dostupnim u naučnoj literature može se zaključiti da je ekstrakt lista sremuša dobijen na optimalnim uslovima ekstrakcije subkritičnom vodom ispoljio znatno šire antibakterijsko delovanje, pri nižim koncentracijama *MIC* (30 mg/ml).

Tabela 28 Antibakterijsko delovanje subkritičnog vodenog ekstrakta

Ispitivani mikroorganizam	Nivo kontaminacije [CFU/ml]	Koncentracija primenjenog ekstrakta (mg/ml)			
		5	10	30	+ kontrola
		Broj bakterija (log cfu/ml) nakon 24 h inkubacije			
<i>L. monocytogenes</i>	10 ²	8,63 ^c	2,19 ^b	n.d. ^a	8,64 ^c
	10 ³	8,73 ^c	3,20 ^b	n.d. ^a	8,74 ^c
	10 ⁴	8,71 ^c	4,18 ^b	n.d. ^a	8,71 ^c
	10 ⁵	8,71 ^c	5,12 ^b	n.d. ^a	8,71 ^c
	10 ⁶	8,77 ^c	7,73 ^b	n.d. ^a	8,75 ^c
<i>S. Enteritidis</i>	10 ²	8,74 ^c	8,35 ^b	n.d. ^a	8,78 ^c
	10 ³	8,76 ^c	8,20 ^b	n.d. ^a	8,76 ^c
	10 ⁴	8,77 ^c	8,07 ^b	n.d. ^a	8,78
	10 ⁵	8,64 ^c	8,01 ^b	n.d. ^a	8,64 ^c
	10 ⁶	8,74 ^c	8,4 ^b	n.d. ^a	8,74 ^c
<i>E. coli 10536</i>	10 ²	8,91 ^c	8,39 ^b	n.d. ^a	8,91 ^c
	10 ³	8,90 ^c	8,36 ^b	n.d. ^a	8,90 ^c
	10 ⁴	8,91 ^c	8,40 ^b	n.d. ^a	8,91 ^c
	10 ⁵	8,74 ^c	8,01 ^b	n.d. ^a	8,90 ^d
	10 ⁶	8,64 ^c	8,40 ^b	n.d. ^a	8,88 ^d
<i>E. coli 8739</i>	10 ²	8,80 ^c	8,15 ^b	n.d. ^a	8,80 ^c
	10 ³	8,80 ^c	8,17 ^b	n.d. ^a	8,80 ^c
	10 ⁴	8,78 ^c	8,10 ^b	n.d. ^a	8,79 ^c
	10 ⁵	8,78 ^c	8,15 ^b	n.d. ^a	8,79 ^c
	10 ⁶	8,79 ^c	8,15 ^b	n.d. ^a	8,88 ^d
<i>P. hauseri</i>	10 ²	8,87 ^c	8,38 ^b	n.d. ^a	8,87 ^c
	10 ³	8,87 ^c	8,34 ^b	n.d. ^a	8,87 ^c
	10 ⁴	8,86 ^c	8,39 ^b	n.d. ^a	8,87 ^c
	10 ⁵	8,88 ^c	8,39 ^b	n.d. ^a	8,88 ^c
	10 ⁶	8,86 ^c	8,39 ^b	n.d. ^a	8,87 ^c
<i>E. faecalis</i>	10 ²	7,57 ^c	7,25 ^b	n.d. ^a	7,58 ^c
	10 ³	7,57 ^c	7,30 ^b	n.d. ^a	7,57 ^c
	10 ⁴	7,56 ^c	7,36 ^b	n.d. ^a	7,57 ^c
	10 ⁵	7,56 ^c	7,28 ^b	n.d. ^a	7,56 ^c
	10 ⁶	7,54 ^b	7,34 ^b	n.d. ^a	7,54 ^c

Vrednosti obeležene istim slovom u koloni nisu značajno različite na 5% (Tukey's test).

Antimikrobno delovanje roda *Allium* se najčešće pripisuje sumpornim jedinjenjima, ali su naučna istraživanja pokazala da i druga jedinjenja doprinose antimikrobnom delovanju (Sobolewska i sar., 2013). Poznato je antimikrobno delovanje fenolnih jedinjenja, posebno flavonoida (Daglia, 2011). Prisustvo različitih bioaktivnih jedinjenja u ekstraktima često podrazumeva njihovo sinergističko delovanje (Cushnie i Lamb, 2005; Pereira i sar., 2007; Rauha i sar., 2000). Na osnovu hromatografskih analiza vodenog ekstrakta sremuša (poglavlje 4.5), može se zaključiti da njegov antimikrobni potencijal potiče i od fenolnih jedinjenja, posebno flavonoida. Flavonoidi svoje antimikrobno delovanje ispoljavaju različitim delovanjem na ćelije mikroorganizama, kao što je formiranje kompleksa proteina stvaranjem vodoničnih ili hidrofobnih veza ili formiranjem kovalentnih veza, inaktivirajući na takav način mikrobnu adheziju, enzime i transport proteina (Kumar i Pandey, 2013).

4.10.2. Antibakterijsko delovanje superkritičnog ekstrakta i enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta

U tabeli 29 su prikazani rezultati antimikrobnog delovanja ekstrakta dobijenog SC-CO₂ ekstrakcijom na temperaturi od 50 °C i pritisku od 200 bara, kao i enkapsuliranog ekstrakta nakon pripreme mikročestica i nakon 3 meseca njihovog skladištenja (u polipropilenskim bočicama na 4 °C). Antibakterijski test je odabran kako bi se odredile promene bioaktivnog potencijala do kojih je moglo doći tokom skladištenja mikročestica enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta.

U okviru ove doktorske disertacije već je prikazan sadržaj sumpornih jedinjenja ispitivanih uzoraka (poglavlja 4.4. i 4.7), za koja se u literaturi tvrdi da imaju antimikrobno delovanje. Antimikrobna aktivnost alicina i *S*-metilestra metantiosulfonske kiseline je već potvrđena od strane drugih autora (Ankri i Mirelman, 1999; Kyung, 2012; Kyung i sar., 1997). Ankri i Mirelman (1999) su utvrdili da široki spektar antimikrobnog delovanja alicina potiče od njegove sposobnosti da inhibira različite enzimske sisteme sa tiolnim grupama. Ivanova i saradnici (2009) su ispitivali antimikrobnu aktivnost različitih ekstrakata svežih listova sremuša (acetonski, hloroformski, etil acetatni, n-butanolni i vodeni). Acetonski i hloroformski ekstrakti su pokazali inhibitorno delovanje na *S. aureus* (MIC 625 µg/ml), dok nijedan ekstrakt nije ispoljio inhibitorno delovanje na rast *E. coli*. Zhu i saradnici (2004) su utvrdili da antimikrobna aktivnost ispitivanih ekstrakta zavisi i od izbora rastvarača i da

najbolju antimikrobnu aktivnost pokazuju hloroformski ekstrakti. Kako se ova jedinjenja nalaze u ispitivanim uzorcima, može se pretpostaviti da oni utiču na antimikrobno delovanje ispitivanog ekstrakta i enkapsuliranog ekstrakta prikazanih u tabeli 29.

Rezultati antibakterijskog testa ispitivanog superkritičnog ekstrakta su pokazali potpunu inhibiciju na sve sojeve ispitivanih bakterija, dok su rezultati mikročestica enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta sremuša pokazali različitu antibakterijsku aktivnost na testirane bakterije (tabela 29). Najjače antibakterijsko delovanje je primećeno na *P. hauseri*, *E. coli* i *S. Enteritidis*, jer ovi bakterijski sojevi nisu detektovani u ispitivanim uzorcima. Enkapsulirani superkritični ekstrakt je ispoljio potpunu inhibiciju na *S. Typhimurium*, dok je enkapsulirani superkritični ekstrakt koji je bio skladišten 3 meseca pokazao manju inhibiciju na *S. Typhimurium* nego sveže enkapsuliranin ekstrakt. Međutim, iako je inkibicija na *S. Typhimurium* skladištenog enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta smanjena, broj kolonija je bio značajno niži ($p < 0,05$) u odnosu na pozitivnu kontrolu (tabela 29). Ispitivan enkapsulirani superkritični ekstrakt je redukovao rast *S. aureus* je u oba ispitana uzorka enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta nakon proizvodnje i nakon skladištenja u poređenju sa kontrolom (tabela 29).

Iako je ispitivani SC-CO₂ ekstrakt pokazao potpunu inhibiciju na ispitivane sojeve mikroorganizama, ispitivani uzorci enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta nisu pokazali antibakterijsku aktivnost na ispitivane sojeve *L. monocytogenes* i *E. faecalis* i dobijeni rezultati u testiranim uzorcima nisu bili značajno drugačiji ($p > 0,05$) u poređenju sa pozitivnom kontrolom. Kako se u enkapsuliranom uzorku nalazi samo 5% enkapsuliranog ekstrakta, može se zaključiti da ova koncentracija nije dovoljno za inhibiciju ovih sojeva. Veći broj kolonija *S. aureus* i *S. Typhimurium* određenih nakon 24 h u uzorku koji je bio skladišten ukazuje na to da se antibakterijska aktivnost na ove mikroorganizme delimično smanjila tokom 90 dana skladištenja. Međutim, ovi uzorci su i dalje zadržali antibakterijski potencijal.

Tabela 29 Broj kolonija testiranih bakterijskih sojeva inkubiranih na 25 °C nakon 24 sata

Mikroorganizam	A	B	SC-CO ₂ ekstrakt	S	S nakon skladištenja
<i>S. Typhimurium</i>	8,00 ^a	7,98 ^a	n.d. ^a	n.d. ^b	4,39 ^c
<i>P. hauseri</i>	7,02 ^b	7,00 ^b	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a
<i>L. monocytogenes</i>	5,75 ^{ns}	5,72 ^{ns}	n.d. ^a	5,90 ^{ns}	5,81 ^{ns}
<i>E. faecalis</i>	5,36 ^{ns}	5,38 ^{ns}	n.d. ^a	5,64 ^{ns}	5,79 ^{ns}
<i>S. aureus</i>	7,63 ^a	7,67 ^a	n.d. ^a	4,69 ^b	6,63 ^c
<i>E. coli</i>	8,10 ^b	8,05 ^b	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a
<i>S. Enteritidis</i>	7,93 ^b	7,96 ^b	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a

Rezultati su izraženi kao log cfu/ml. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost (n=3). Vrednosti sa različitim slovom u istoj koloni su statistički značajno različiti ($p < 0.05$).

A, pozitivna kontrola (bakterijska suspenzija sa istom koncentracijom praznih čestica, bez ekstrakta); B, negativna kontrola (čista bakterijska suspenzija, bez uzorka); S, ispitivani uzorak (čestice sa enkapsuliranim ekstraktom); n.d., nije detektovano; ns, nije značajno.

Na osnovu dobijenih rezultata, zaključuje se da je antibakterijska aktivnost ispitanih uzoraka bila je efikasnija prema Gram negativnim nego prema Gram pozitivnim bakterijama, verovatno zbog razlike u strukturi ćelijskog zida bakterija. Međutim Sapunjevoj i saradnici (2012) su ispitivali antibakterijsko delovanje etanolnog ekstrakta sremuša i ustanovili veću antimikrobnu aktivnost prema Gram pozitivnim bakterijama. Ove razlike mogu se objasniti izolovanjem različitih aktivnih jedinjenja korišćenjem različitih rastvarača i ekstrakcionih postupaka, čak i u okviru ove doktorske disertacije. Dok je ispitivani subkritični vodeni ekstrakt bogat fenolima i flavonoidima ispoljio najjače antimikrobno delovanje na *L. monocytogenes*, mikročestice sa enkapsuliranim superkritičnim ekstraktom nisu delovale na ovaj mikroorganizam u ispitivanim koncentracijama. Pored toga, antibakterijska aktivnost uzoraka zavisi i od ispitivanog bakterijskog soja. Nakon skladištenja, testirani enkapsulirani superkritični ekstrakt je pokazalo najslabiju antibakterijsku aktivnost prema *S. Typhimurium* od Gram negativnih bakterija. Pored toga, *S. aureus* je bio jedina Gram pozitivna bakterija na koju je ispitivani uzorak delovao antibakterijski. Mikročestice bez enkapsuliranog ekstrakta, koje su korišćene kao pozitivna kontrola, nisu pokazale antimikrobno delovanje na ispitivane sojeve, a ispitivani sojevi nisu bili detektovani u negativnim kontrolama.

4.11. Predlog tehnoloških procesa prerade lista sremuša

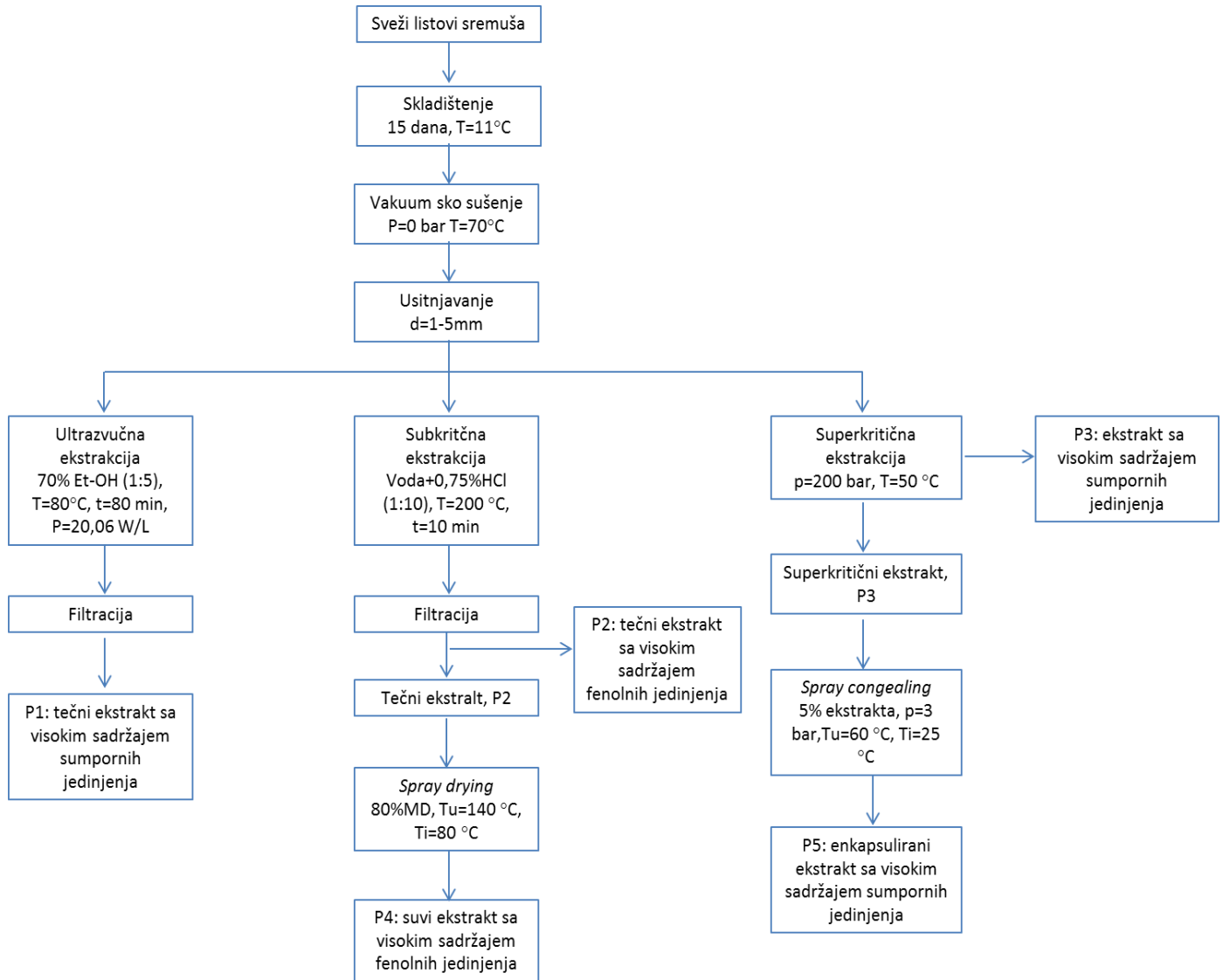
Na osnovu dobijenih rezultata i izvedenih zaključaka u okviru ove doktorske disertacije, mogu se preporučiti uslovi prerade sremuša u cilju povećanja njegove dostupnosti tokom cele godine, kao i mogućnosti izolovanja veće količine bioaktivnih komponenti.

Za konzumiranje sremuša u svežem stanju, predloženi su uslovi i dužina skladištenja od 15 dana na temperaturi od 4 °C. Za dalju primenu sremuša predlaže se duže skladištenje, na sobnoj temperaturi zbog akumulacije bioaktivnih komponenti. Da bi se list sremuš mogao koristiti tokom cele godine, primenjuje se adekvatan način sušenja, kao sa aspekta fizičko-hemijskih karakteristika osušenog proizvoda, tako i sa ekonomskog aspekta, vakkumsko sušenje predstavlja odgovarajući način sušenja za sremuš.

Za primenu u farmaceutskoj i prehrambenoj tehnologiji, lekovito i začinsko bilje se najviše primenju u formi ekstrakta, tečnih ili suvih. U okviru ove doktorske disertacije primenjeni su različite tehnike dobija ekstrakta a u zavisnosti od primenjenje ekstrakcione tehnike, dobija se različit sadržaj bioaktivnih komponenti u dobijenom ekstraktu. U skladu sa ovim činjenicama odgovarajuću tehniku ekstrakcije treba izabrati na osnovu ciljanih jedinjenja, te se u zavisnosti od primenjene ekstrakcije mogu dobiti 3 različita ekstrakta, proizvoda (P1, P2, P3).

Za dobijanje čvrstih formi ekstrakta se primenjuje odgovarajući način enkapsulacije i u zavisnosti od načina enkapsulacije mogu se dobiti enkapsulirani, suvi ekstrakti sremuša (P4, P5).

Na slici 50 prikazan je niz tehnoloških operacija koje treba primeniti u cilju dobijanja proizvoda bogatog bioaktivnim komponentama izolovanim iz lista sremuša.



Slika 50 Predlog tehnološke sheme dobijanja proizvoda od sremuša sa visokim sadržajem bioaktivnih komponenti (P-proizvod)

5. Zaključci

Na osnovu dobijenih rezultata i činjenica izloženih u disertaciji, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Kako bi se očuvale senzorske i nutritivne karakteristike svežeg lista sremuša, temperaturu skladištenja je potrebno podesiti na 4 °C, dok je na temperaturi od 11 i 18 °C čuvanje moguće ali za znatno kraće vreme. Da bi bio prihvatljiv za potrošače, listovi sremuša se mogu uspešno čuvati na temperaturi od 4 °C skladišteni u svežnjevima zaronjenim u vodu i pakovani u modifikovanoj atmosferi u trajanju od 15 dana.
- Iako vremenom list sremuš gubi senzorska svojstva i više nije prihvatljiv za potrošače, u pogledu vizuelnih karakteristika i mirisa, tokom skladištenja dolazi do akumulacije aktivnih jedinjenja kao što su fenoli i tiosulfinati te su listovi sremuša nakon skladištenja bogatiji ovim bioaktivnim jedinjenjima. Zbog visokog sadržaja tiosulfinata i fenola ovakvi listovi sremuša su pogodni za izolovanje bioaktivnih komponenti i njihovu dalju primenu u funkcionalnim proizvodima.
- Za primenu listova sremuša u farmaceutskoj industriji, da dobijanje različitih formi ekstrakta bogatih bioaktivnim jedinjenjima, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da bi pre ekstrakcije lista sremuša bilo poželjno prvo ga skladištiti i to u svžnjevima u trajanju od 15 dana na temperaturi od 11 °C, ili u modifikovanoj atmosferi u trajanju od 6 dana na temperaturi od 18 °C.
- Sa aspekta očuvanja sadržaja bioaktivnih jedinjenja (ukupnih fenola i tiosulfinata) u procesu sušenja lista sremuša najbolji efekti su postignuti primenom konvektivnog postupka sušenja na niskoj temperaturi (40 °C). Međutim, ovaj postupak zbog dugog trajanja sušenja (9 h), sa aspekta iskorišćenja kapaciteta i sa aspekta utroška energije, ne predstavlja optimalno rešenje. Shodno tome, kao optimalno rešenje za sušenje lista sremuša, sa aspekta minimiziranja ukupnog vremena sušenja i izbegavanje negativnih efekata na sadržaj termolabilnih komponenti, može se preporučiti vakuumsko sušenje uz primenu umerenih temperatura.
- U slučaju primene ultrazvučne ekstrakcije utvrđeno je da se optimalni efekti ekstrakcije postižu primenom 70% etanola kao ekstragensa na temperaturi od 80 °C i snazi

ultrazvuka od 20,06 W/l u trajanju od 80 min. Pri ovim uslovima ostvaruje se najveći prinos ekstrakcije (38,1%), i ekstrahuje se najveći sadržaj ukupnih fenola (1,60 g EGK/100 g SM), ukupnih flavonoida (0,35 g KE/100 g SM), a ekstrakti dobijeni na ovim uslovima pokazuju antioksidativna aktivnost IC_{50} od 0,71 mg/ml.

- Primenom ekstrakcije subkritičnom vodom ekstrakt najboljih karakteristika dobijen je pri temperaturi od 200 °C i vremenu ekstrakcije od 10 min, uz dodatak 1,09% HCl. Pri ovim uslovima ostvaren je prinos ekstrakcije 50,85%, ekstrahovano je 4,11 g EGK/100 SM ukupnih fenola, 0,66 g KE/100 g SM ukupnih flavonoida, a dobijeni ekstrakti imali su sledeću antioksidativnu aktivnost: IC_{50} = 0,013 mg/ml, dobijeno u DPPH testu i ABTS, 1223 mM TEKS / 100 g SM za ABTS test).
- Prilikom ekstrakcije subkritičnom vodom došlo je do nastanka indikatora Maillardove reakcije.
- Ultrazvučnom ekstrakcijom ekstrahuju se većinom fenolne kiseline. Rezultati hromatografskih ispitivanja upućuju na pretpostavku da se u ekstraktu dobijenom subkritičnom ekstrakcijom nalaze jedinjenja tipa fenilporpanoida i flavonoida, pretežno derivati kempferola. Ekstrakt dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom je bogatiji u pogledu sumpornih jedinjenja, alicina, alil sulfida, dialil sulfida i *S*-metilestar metantiosulfonske kiseline u odnosu na subkritični ekstrakt. Prema tome subkritična vodena ekstrakcija je pogodnija za izolovanje fenolnih jedinjenja, derivati kemferola, dok je ultrazvučna ekstrakcija 70% etanolom pogodna za izolovanje sumpornih jedinjenja. U skladu sa ovim činjenicama odgovarajuću tehniku ekstrakcije treba izabrati na osnovu ciljanih jedinjenja.
- U slučaju primene superkritične ekstrakcije ugljen-dioksidom, utvrđeno je da se sa povećanjem pritiska povećava prinos ekstrakcije, zbog povećanja solvatacione moći, odnosno gustine. Najveći prinos ekstrakcije (3,43%) je postignut na najvišoj ispitivanoj temperature (60 °C) i najvišem ispitivanom pritisku (400 bara).
- Analizom podataka o sadržaju pojedinih sumpornih jedinjenja u ekstraktu dobijenom primenom superkritične ekstrakcije ugljen-dioksidom utvrđeno je da se najveći sadržaj alicina, dobija na ekstrakcionom pritisku od 400 bara i 200 bar, dok se na pritisku od 200 bar dobija i najveći sadržaj dialil trisulfida, alil sulfida i *S*-metil estra metanetiosulfonske kiseline. Shodno tome, temperatura od 50 °C i pritisak od 200 bar su najpogodniji parametri superkritične ekstrakcije za dobijanje ekstrakta sa visokim sadržajem sumpornih bioaktivnih komponenti.

- Na osnovu hromatografskih analiza ekstrakata dobijenih na optimalnim uslovima ultrazvučne ekstrakcije i ekstrakcije subkritičnom vodom, zaključuje se da je ekstrakt dobijen na optimalnim uslovima ekstrakcije subkritičnom vodom bogatiji polifenolnim jedinjenjima, dok je ekstrakt dobijen na optimalnim uslovima ultrazvučne ekstrakcije bogatiji sumpornim jedinjenjima. U skladu sa ovim činjenicama, odgovarajuću tehniku ekstrakcije treba izabrati na osnovu ciljanih jedinjenja.
- Za potrebe dobijanja stabilnije forme, odnosno suvog ekstrakta sremuša, uz primenu *spray drying* tehnike najbolji efekti u pogledu fizičkih karakteristika (sadržaj vlage, higroskopnost, nasipna zapremina brzina rastvaranja, indeks apsorpcije vode i indeks rastvorljivosti u vodi) i sadržaja ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i antioksidativne aktivnosti ostvareni su pri dodatku 80% maltodekstrina i sušenju na ulaznoj temperaturi od 120 ili 140 °C i izlaznoj temperaturi od 80 °C. Zbog neefikasnosti procesa ili visokog sadržaja vlage ekstrakti dobijeni pri manjim udelima maltodekstrina (10 i 40%) imali bi ograničenja za dalju upotrebu u prehrambenoj ili farmaceutskoj industriji.
- Analizom stabilnosti enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta, utvrđeno je da nakon 3 meseca skladištenja enkapsuliranog ekstrakta nije došlo do značajnih promena tokom procesa skladištenja u vidu termičkih ili hemijskih promena. Tokom tri meseca skladištenja došlo je do redukcije alicina enkapsuliranog ekstrakta za samo 3%, dok je redukcija za *S*-metilestar metantiosulfonsku kiselinu iznosila 16,5%. Ovako mali stepen redukcije, naročito za alicin, čini Gelucire® 50/13 odgovarajućim nosačem za očuvanje bioaktivnog potencijala enkapsuliranog ekstrakta.
- Subkritični vodeni ekstrakt i superkritični ekstrakt sremuša dobijeni pri optimalnim uslovima utvrđenim u ovoj disertaciji imaju izraženo antibakterijsko delovanje. Subkritični vodeni ekstrakt sremuša je pokazao najsnažnije antibakterijsko delovanje pri koncentraciji od 30 mg/ml, gde nakon 24 h inkubiranja nije detektovano prisustvo niti jednog od ispitivanih Gram pozitivnih (*L. monocytogenes*, *E. faecalis*) i Gram negativnih patogenih (*S. Enteritidis*, *E. coli*, *P. hauseri*), pa se ova koncentracija može smatrati minimalnom inhibitornom koncentracijom (*MIC*). Subkritični vodeni ekstrakt je pri svim testiranim koncentracijama najjaču antibakterijsku aktivnost ispoljio prema *L. monocytogenes*.
- Rezultati antibakterijskog testa ekstrakta dobijenog superkritičnom CO₂ ekstrakcijom su pokazali potpunu inhibiciju na sve sojeve, *P. hauseri*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. Enteritidis*, dok su rezultati enkapsuliranog ekstrakta sremuša pokazali

različitu antibakterijsku aktivnost na testirane bakterije usled manje koncentracije ekstrakta u česticama enkapsulata.

- Ispitivanje antibakterijskih svojstava nakon 3 meseca skladištenja enkapsuliranog ekstrakta pokazali su da su dobijene čestice sa 5% ekstrakta i dalje zadržale antibakterijski potencijal, ali se antibakterijska aktivnost delimično smanjila u slučaju *S. aureus* i *S. Typhimurium*.
- Na osnovu hemijskog sastava može se zaključiti da antimikrobno delovanje ispitivanog superkritičnog ekstrakta i enkapsuliranog superkritičnog ekstrakta *spray congeling* tehnikom potiče od sadržaja sumpornih jedinjenja, pre svega alicina i *S*-metilestara metantiosulfonske kiseline dok kod vodeno ekstrakta na antimikrobno delovanje je uticalo i prisustvo fenolnih jedinjenja.

6. Literatura

Abano, E. E., Ma, H., & Qu, W. (2011). Effects of pretreatments on the drying characteristics and chemical composition of garlic slices in a convective hot air dryer. *J. Agric. Food. Tech*, 1(5), 50-58.

Abascal, K., Ganora, L., & Yarnell, E. (2005). The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: a review. *Phytotherapy Research*, 19(8), 655-660.

Agar, I. T., Streif, J., & Bangerth, F. (1997). Effect of high CO₂ and controlled atmosphere (CA) on the ascorbic and dehydroascorbic acid content of some berry fruits. *Postharvest Biology and Technology*, 11(1), 47-55.

Agüero, M. V., Barg, M. V., Yommi, A., Camelo, A., & Roura, S. I. (2008). Postharvest changes in water status and chlorophyll content of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and their relationship with overall visual quality. *Journal of food science*, 73(1).

Ahmadian-Kouchaksaraie, Z., Niazmand, R., & Najafi, M. N. (2016). Optimization of the subcritical water extraction of phenolic antioxidants from *Crocus sativus* petals of saffron industry residues: Box-Behnken design and principal component analysis. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 36, 234-244.

Albertini, B., Mezzena, M., Passerini, N., Rodriguez, L., & Scalia, S. (2009). Evaluation of spray congealing as technique for the preparation of highly loaded solid lipid microparticles containing the sunscreen agent, avobenzone. *Journal of pharmaceutical sciences*, 98(8), 2759-2769.

Albertini, B., Passerini, N., González-Rodríguez, M. L., Perissutti, B., & Rodriguez, L. (2004). Effect of Aerosil® on the properties of lipid controlled release microparticles. *Journal of Controlled Release*, 100(2), 233-246.

Albertini, B., Passerini, N., Pattarino, F., & Rodriguez, L. (2008). New spray congealing atomizer for the microencapsulation of highly concentrated solid and liquid substances. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(1), 348-357.

Albertini, B., Passerini, N., Di Sabatino, M., Vitali, B., Brigidi, P., & Rodriguez, L.

(2009). Polymer–lipid based mucoadhesive microspheres prepared by spray-congealing for the vaginal delivery of econazole nitrate. *European journal of pharmaceutical sciences*, 36(4-5), 591-601.

Alexieva, J., Mihaylova, D., & Popova, A. (2014). Antioxidant capacity and thin layer chromatography of ethanol extracts of *Allium ursinum* L. and *Allium bulgaricum* L. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, 18, 91-96.

Alghoul, Z. M., Ogden, P. B., & Dorsey, J. G. (2017). Characterization of the polarity of subcritical water. *Journal of Chromatography A*, 1486, 42-49.

Alibas, I. (2007). Energy consumption and colour characteristics of nettle leaves during microwave, vacuum and convective drying. *Biosystems Engineering*, 96(4), 495-502.

Almeida, H., Amaral, M. H., & Lobão, P. (2012). Comparative study of sustained-release lipid microparticles and solid dispersions containing ibuprofen. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(3), 529-536.

Alvim, I. D., Stein, M. A., Koury, I. P., Dantas, F. B. H., & Cruz, C. L. D. C. V. (2016). Comparison between the spray drying and spray chilling microparticles contain ascorbic acid in a baked product application. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 689-694.

Anklam, E., Berg, H., Mathiasson, L., Sharman, M., & Ulberth, F. (1998). Supercritical fluid extraction (SFE) in food analysis: a review. *Food Additives & Contaminants*, 15(6), 729-750.

Ankri, S., & Mirelman, D. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and infection*, 1(2), 125-129.

Anthon, G. E., & Barrett, D. M. (2003). Modified method for the determination of pyruvic acid with dinitrophenylhydrazine in the assessment of onion pungency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(12), 1210-1213.

Ariffin, A. A., Ghazali, H. M., & Kavousi, P. (2014). Validation of a HPLC method for determination of hydroxymethylfurfural in crude palm oil. *Food chemistry*, 154, 102-107.

Arzanlou, M., & Bohlooli, S. (2010). Introducing of green garlic plant as a new source of

allicin. *Food chemistry*, 120(1), 179-183.

Asl, A. H., & Khajenoori, M. (2013). Subcritical water extraction. In *Mass Transfer-Advances in sustainable energy and environment oriented numerical modeling*. InTech.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.

Ayala-Zavala, J. F., Soto-Valdez, H., González-León, A., Álvarez-Parrilla, E., Martín-Belloso, O., & González-Aguilar, G. A. (2008). Microencapsulation of cinnamon leaf (*Cinnamomum zeylanicum*) and garlic (*Allium sativum*) oils in β -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 60(3-4), 359-368.

Bagiu, R. V., Vlaicu, B., & Butnariu, M. (2012). Chemical composition and in vitro antifungal activity screening of the *Allium ursinum* L.(Liliaceae). *International journal of molecular sciences*, 13(2), 1426-1436.

Barreiro, J. A., Milano, M., & Sandoval, A. J. (1997). Kinetics of colour change of double concentrated tomato paste during thermal treatment. *Journal of Food Engineering*, 33(3-4), 359-371.

Barros, H. D., Grimaldi, R., & Cabral, F. A. (2017). Lycopene-rich avocado oil obtained by simultaneous supercritical extraction from avocado pulp and tomato pomace. *The Journal of Supercritical Fluids*, 120, 1-6.

Baş, D., & Boyacı, I. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of food engineering*, 78(3), 836-845.

Belović M. (2016). Iskorišćenje sporednog produkta paradajza kao sirovine za prehrambene proizvode sa dodatom vredonošću, doktorska disertacija, Unierzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Serbia, 136

Benkeblia, N., & Lanzotti, V. (2007). Allium thiosulfinates: chemistry, biological properties and their potential utilization in food preservation. *Food*, 1(2), 193-201.

Bernaert, N., De Clercq, H., Van Bockstaele, E., De Loose, M., & Van Droogenbroeck,

- B. (2013). Antioxidant changes during postharvest processing and storage of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*). *Postharvest biology and technology*, 86, 8-16.
- Bhandari, B. R., Datta, N., & Howes, T. (1997). Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. *Drying technology*, 15(2), 671-684.
- Błażewicz-Woźniak, M., Kęsik, T., & Michowska, A. E. (2011). Flowering of bear garlic (*Allium ursinum* L.) cultivated in the field at varied nitrogen nutrition and mulching. *Acta Sci Pol Hortorum Cultus*, 10(3), 133-144.
- Błażewicz-Woźniak, M., & Michowska, A. (2011). The growth, flowering and chemical composition of leaves of three ecotypes of *Allium ursinum* L. *Acta agrobotanica*, 64(4), 171.
- Block, E., Birringer, M., Jiang, W., Nakhodo, T., Thompson, H. J., Toscano, P. J., Uzar, H., Zhang, X. & Zhu, Z. (2001). Allium chemistry: synthesis, natural occurrence, biological activity, and chemistry of Se-alk(en)ylselenocysteines and their γ -glutamyl derivatives and oxidation products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(1), 458-470.
- Božin, B. (2009). Biohemijška i farmakološka ispitivanja vrsta roda *Allium* L. (sect. *Allium*), doktorska disertacija, University of Novi Sad, Faculty of natural science, Novi Sad, Serbia, 236
- Brusotti, G., Cesari, I., Dentamaro, A., Caccialanza, G., & Massolini, G. (2014). Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: the role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 87, 218-228.
- Calin-Sanchez, A., Figiel, A., Wojdyło, A., Szarycz, M., & Carbonell-Barrachina, A. A. (2014). Drying of garlic slices using convective pre-drying and vacuum-microwave finishing drying: kinetics, energy consumption, and quality studies. *Food and Bioprocess Technology*, 7(2), 398-408.
- Caliskan, G., & Dirim, S. N. (2013). The effects of the different drying conditions and the amounts of maltodextrin addition during spray drying of sumac extract. *Food and*

Bioproducts Processing, 91(4), 539-548.

Calvey, E. M., Matusik, J. E., White, K. D., DeOrazio, R., Sha, D., & Block, E. (1997). Allium Chemistry: Supercritical Fluid Extraction and LC–APCI–MS of Thiosulfinates and Related Compounds from Homogenates of Garlic, Onion, and Ramp. Identification in Garlic and Ramp and Synthesis of 1-Propanesulfinothioic Acid S-Allyl Ester. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(11), 4406-4413.

Calvey, E. M., Roach, J. A., & Block, E. (1994). Supercritical fluid chromatography of garlic (*Allium sativum*) extracts with mass spectrometric identification of allicin. *Journal of chromatographic science*, 32(3), 93-96..

Capuano, E., & Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 44(4), 793-810.

Carotenuto, A., Fattorusso, E., Lanzotti, V., Magno, S., De Feo, V., & Cicala, C. (1997). The flavonoids of *Allium neapolitanum*. *Phytochemistry*, 44(5), 949-957.

Carr, A. G., Mammucari, R., & Foster, N. R. (2011). A review of subcritical water as a solvent and its utilisation for the processing of hydrophobic organic compounds. *Chemical Engineering Journal*, 172(1), 1-17.

Cavero, S., Jaime, L., Martín-Álvarez, P. J., Senorans, F. J., Reglero, G., & Ibañez, E. (2005). In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *European food research and technology*, 221(3-4), 478-486.

Celli, G. B., Dibazar, R., Ghanem, A., & Brooks, M. S. L. (2016). Degradation kinetics of anthocyanins in freeze-dried microencapsulates from lowbush blueberries (*Vaccinium angustifolium* Aiton) and prediction of shelf-life. *Drying technology*, 34(10), 1175-1184.

CIE. (1976). International Commission on Illumination, Colorimetry: Official Recommendation of the International Commission on Illumination. Publication CIE No. (E-1.31) Bureau Central de la CIE, Paris, France.

Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., Wong, S. K., Lim, K. K., Tan, S. P., Lianto, F. S., & Yong, M. Y. (2009). Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves

and tea of ginger species. *Food chemistry*, 113(1), 166-172.

Chang, Y. X., Yang, J. J., Pan, R. L., Chang, Q., & Liao, Y. H. (2014). Anti-hygroscopic effect of leucine on spray-dried herbal extract powders. *Powder Technology*, 266, 388-395.

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.

Chemat, F., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(4), 813-835.

Chen, W., Wang, W. P., Zhang, H. S., & Huang, Q. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from *Boletus edulis* mycelia using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 614-619.

Chiu, Y. T., Chiu, C. P., Chien, J. T., Ho, G. H., Yang, J., & Chen, B. H. (2007). Encapsulation of lycopene extract from tomato pulp waste with gelatin and poly (γ -glutamic acid) as carrier. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(13), 5123-5130.

Condrat, D., Mosoarca, C., Zamfir, A., Crişan, F., Szabo, M., & Lupea, A. (2010). Qualitative and quantitative analysis of gallic acid in *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum*, *Acorus calamus* and *Solidago virga-aurea* by chip-electrospray ionization mass spectrometry and high performance liquid chromatography. *Open Chemistry*, 8(3), 530-535.

Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343-356.

Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., & Jokić, S. (2015). Green solvents for green technologies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(9), 1631-1639.

Da Silva, R. P., Rocha-Santos, T. A., & Duarte, A. C. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40-51.3

- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 174-181.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- De Souza, V. B., Thomazini, M., de Carvalho Balieiro, J. C., & Fávaro-Trindade, C. S. (2015). Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). *Food and Bioproducts Processing*, 93, 39-50.
- Del Valle, J. M. (2015). Extraction of natural compounds using supercritical CO₂: Going from the laboratory to the industrial application. *The Journal of Supercritical Fluids*, 96, 180-199.
- Del Valle, J. M., Glatzel, V., & Martínez, J. L. (2012). Supercritical CO₂ extraction of allicin from garlic flakes: Screening and kinetic studies. *Food research international*, 45(1), 216-224.
- Del Valle, J. M., Mena, C., & Budinich, M. (2008). Extraction of garlic with supercritical CO₂ and conventional organic solvents. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 25(3), 532-542.
- Devahastin, S., & Niamnuy, C. (2010). Invited review: modelling quality changes of fruits and vegetables during drying: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(9), 1755-1767.
- Dias, D. R., Botrel, D. A., Fernandes, R. V. D. B., & Borges, S. V. (2017). Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. *Current Opinion in Food Science*, 13, 31-37.
- Di Sabatino, M., Albertini, B., Kett, V. L., & Passerini, N. (2012). Spray congealed lipid microparticles with high protein loading: Preparation and solid state characterisation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(5), 346-356.
- Díaz-Maroto, M., Pérez-Coello, M., & Cabezudo, M. (2002). Effect of different drying methods on the volatile components of parsley (*Petroselinum crispum* L.). *European*

Food Research and Technology, 215(3), 227-230.

Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S., & Cabezudo, M. D. (2002). Effect of drying method on the volatiles in bay leaf (*Laurus nobilis* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(16), 4520-4524.

Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S., Gonzalez Vinas, M. A., & Cabezudo, M. D. (2003). Influence of drying on the flavor quality of spearmint (*Mentha spicata* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1265-1269.

Djurdjevic, L., Dinic, A., Pavlovic, P., Mitrovic, M., Karadzic, B., & Tesevic, V. (2004). Allelopathic potential of *Allium ursinum* L. *Biochemical systematics and ecology*, 32(6), 533-544.

Dobry, D. E., Settell, D. M., Baumann, J. M., Ray, R. J., Graham, L. J., & Beyerinck, R. A. (2009). A model-based methodology for spray-drying process development. *Journal of pharmaceutical innovation*, 4(3), 133-142.

Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., & Nedović, V. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, 7(4), 452-490.

Doymaz, İ., & Kocayigit, F. (2012). Effect of pre-treatments on drying, rehydration, and color characteristics of red pepper ('Charliston' variety). *Food Science and Biotechnology*, 21(4), 1013-1022.

Duarte, Í., Andrade, R., Pinto, J. F., & Temtem, M. (2016). Green production of cocrystals using a new solvent-free approach by spray congealing. *International journal of pharmaceuticals*, 506(1-2), 68-78.

Dziri, S., Hassen, I., Fatnassi, S., Mrabet, Y., Casabianca, H., Hanchi, B., & Hosni, K. (2012). Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Allium roseum* var. *odoratissimum*). *Journal of functional foods*, 4(2), 423-432.

El-Sebaili, A. A., & Shalaby, S. M. (2012). Solar drying of agricultural products: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(1), 37-43.

Erbay, Z., & Icier, F. (2009). Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 91(4), 533-541.

Espín, J. C., Soler-Rivas, C., & Wichers, H. J. (2000). Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 648-656.

Francis, F. J., & Clydesdale, F. M. (1975). *Food colorimetry: theory and applications*. AVI Publishing Co. Inc.

Fernandes, F. H., Santana, C. P., Santos, R. L., Correia, L. P., Conceição, M. M., Macêdo, R. O., & Medeiros, A. C. D. (2013). Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 113(2), 443-447.

Fernández-Ponce, M. T., Casas, L., Mantell, C., Rodríguez, M., & de la Ossa, E. M. (2012). Extraction of antioxidant compounds from different varieties of *Mangifera indica* leaves using green technologies. *The Journal of Supercritical Fluids*, 72, 168-175.

Ferrante, A., Incrocci, L., Maggini, R., Serra, G., & Tognoni, F. (2004). Colour changes of fresh-cut leafy vegetables during storage. *J. Food Agric. Environ*, 2(3&4), 40-44.

Ferreira, S. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandao, G. C., Da Silva, E.G.P., Portugal, L.A., Dos Reis, P.S., Souza, A.S., & Dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica chimica acta*, 597(2), 179-186.

Fратиanni, F., Ombra, M. N., Cozzolino, A., Riccardi, R., Spigno, P., Tremonte, P., P., Coppola, R. & Nazzaro, F. (2016). Phenolic constituents, antioxidant, antimicrobial and anti-proliferative activities of different endemic Italian varieties of garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Functional Foods*, 21, 240-248.

Fujisawa, H., Suma, K., Origuchi, K., Kumagai, H., Seki, T., & Ariga, T. (2008). Biological and chemical stability of garlic-derived allicin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(11), 4229-4235.

Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., & Jo, I. H. (2009). Optimization of ultrasound-

assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(11), 4988-4994.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107-1121.

Gițin, L., Dinică, R., Neagu, C., & Dumitrascu, L. (2014). Sulfur compounds identification and quantification from *Allium* spp. fresh leaves. *journal of food and drug analysis*, 22(4), 425-430.

Gitin, L., Dinica, R., & Parnavel, R. (2012). The influence of extraction method on the apparent content of bioactive compounds in Romanian *Allium* spp. leaves. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(1), 93.

Gizir, A. M., Turker, N., & Artuvan, E. (2008). Pressurized acidified water extraction of black carrot [*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.] anthocyanins. *European Food Research and Technology*, 226(3), 363-370.

Gladon, R. (2006). Posle ubirajuće tehnologije za voće i povrće u SAD. *Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi/PTEP*, 10(1-2), 1-5.

Gođevac, D., Vujisić, L., Mojović, M., Ignjatović, A., Spasojević, I., & Vajs, V. (2008). Evaluation of antioxidant capacity of *Allium ursinum* L. volatile oil and its effect on membrane fluidity. *Food chemistry*, 107(4), 1692-1700.

González-Centeno, M. R., Comas-Serra, F., Femenia, A., Rosselló, C., & Simal, S. (2015). Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): experimental kinetics and modeling. *Ultrasonics sonochemistry*, 22, 506-514.

Gorinstein, S., Jastrzebski, Z., Namiesnik, J., Leontowicz, H., Leontowicz, M., & Trakhtenberg, S. (2007). The atherosclerotic heart disease and protecting properties of garlic: contemporary data. *Molecular nutrition & food research*, 51(11), 1365-1381.

Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2010). A new technique for spray drying orange juice concentrate. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(2), 342-351.

- Gunasekaran, T., Haile, T., Nigusse, T., & Dhanaraju, M. D. (2014). Nanotechnology: an effective tool for enhancing bioavailability and bioactivity of phytomedicine. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4, S1-S7.
- Gupta, A., Naraniwal, M., & Kothari, V. (2012). Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International journal of applied and natural sciences*, 1(1), 8-26.
- Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food control*, 46, 412-429.
- Han, J., Lawson, L., Han, G., & Han, P. (1995). Spectrophotometric method for quantitative determination of allicin and total garlic thiosulfinates. *Analytical biochemistry*, 225(1), 157-160.
- Harborne, J. B. (1989). *Methods in plant biochemistry. Volume 1. Plant phenolics*. Academic Press Ltd..
- Harnly, J. M., Bhagwat, S., & Lin, L. Z. (2007). Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389(1), 47-61.
- Harvey, A. L. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug discovery today*, 13(19-20), 894-901.
- He, L., Zhang, X., Xu, H., Xu, C., Yuan, F., Knez, Ž., Novak, Z. & Gao, Y. (2012). Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC-ABTS+ assay. *Food and Bioproducts Processing*, 90(2), 215-223.
- Helou, C., Jacolot, P., Niquet-Léridon, C., Gadonna-Widehem, P., & Tessier, F. J. (2016). Maillard reaction products in bread: A novel semi-quantitative method for evaluating melanoidins in bread. *Food chemistry*, 190, 904-911.
- Heng, M. Y., Tan, S. N., Yong, J. W. H., & Ong, E. S. (2013). Emerging green technologies for the chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 50, 1-10.

Herrero, M., Castro-Puyana, M., Mendiola, J. A., & Ibañez, E. (2013). Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 43, 67-83.

Herrero, M., Castro-Puyana, M., Rocamora-Reverte, L., Ferragut, J. A., Cifuentes, A., & Ibañez, E. (2012). Formation and relevance of 5-hydroxymethylfurfural in bioactive subcritical water extracts from olive leaves. *Food research international*, 47(1), 31-37.

Herrero, M., & Ibañez, E. (2015). Green processes and sustainability: An overview on the extraction of high added-value products from seaweeds and microalgae. *The Journal of Supercritical Fluids*, 96, 211-216.

Herrero, M., Mendiola, J. A., Cifuentes, A., & Ibañez, E. (2010). Supercritical fluid extraction: recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2495-2511.

Hiyasat, B., Sabha, D., Grötzinger, K., Kempfert, J., Rauwald, J. W., Mohr, F. W., & Dhein, S. (2009). Antiplatelet activity of *Allium ursinum* and *Allium sativum*. *Pharmacology*, 83(4), 197-204.

Hodge, G., Hodge, S., & Han, P. (2002). *Allium sativum* (garlic) suppresses leukocyte inflammatory cytokine production in vitro: potential therapeutic use in the treatment of inflammatory bowel disease. *Cytometry Part A*, 48(4), 209-215.

Hogekamp, S., & Schubert, H. (2003). Rehydration of food powders. *Food Science and Technology International*, 9(3), 223-235.

Horníčková, J., Kubec, R., Cejpek, K., Velíšek, J., Ovesná, J., & Stavěliková, H. (2010). Profiles of S-alk(en)ylcysteine sulfoxides in various garlic genotypes. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(4), 298-308.

Hossain, M. B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A. B., & Brunton, N. P. (2010). Effect of drying method on the antioxidant capacity of six *Lamiaceae* herbs. *Food Chemistry*, 123(1), 85-91.

Hsu, C. M., Yu, S. C., Tsai, F. J., & Tsai, Y. (2013). Enhancement of rhubarb extract solubility and bioactivity by 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Carbohydrate*

polymers, 98(2), 1422-1429.

<https://www.slideshare.net/AmritanshuNihal/drying-by-nihal-70178107>

<http://www.ramsdale.org/ramsons.htm>

Huang, L. L., Zhang, M., Wang, L. P., Mujumdar, A. S., & Sun, D. F. (2012). Influence of combination drying methods on composition, texture, aroma and microstructure of apple slices. *LWT-Food Science and Technology*, 47(1), 183-188.

Ilić, I., Dreu, R., Burjak, M., Homar, M., Kerč, J., & Srčić, S. (2009). Microparticle size control and glimepiride microencapsulation using spray congealing technology. *International journal of pharmaceutics*, 381(2), 176-183.

Ilić, D. P., Nikolić, V. D., Nikolić, L. B., Stanković, M. Z., Stanojević, L. P., & Cakić, M. D. (2011). Allicin and related compounds: Biosynthesis, synthesis and pharmacological activity. *Facta universitatis-series: Physics, Chemistry and Technology*, 9(1), 9-20.

Ilić, D., Ristić, I. S., Nikolić, L., Stanković, M., Nikolić, G., Stanojević, L., & Nikolić, V. (2012). Characterization and release kinetics of allylthiosulfinate and its transformants from poly (D, L-lactide) microspheres. *Journal of Polymers and the Environment*, 20(1), 80-87.

Ilić, D. P., Nikolić, V. D., Nikolić, L. B., Stanković, M. Z., & Stanojević, L. P. (2010). Thermal degradation, antioxidant and antimicrobial activity of the synthesized allicin and allicin incorporated in gel. *Hemijska industrija*, 64(2), 85.

Ilić, D. P., Nikolić, V. D., Nikolić, L. B., Stanković, M. Z., Stanojević, L. P., & Cakić, M. D. (2011). Allicin and related compounds: Biosynthesis, synthesis and pharmacological activity. *Facta universitatis-series: Physics, Chemistry and Technology*, 9(1), 9-20.

Imahori, Y., Suzuki, Y., Kawagishi, M., Ishimaru, M., Ueda, Y., & Chachin, K. (2007). Physiological responses and quality attributes of Chinese chive leaves exposed to CO₂-enriched atmospheres. *Postharvest biology and technology*, 46(2), 160-166.

Ivanova, A., Mikhova, B., Najdenski, H., Tsvetkova, I., & Kostova, I. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of wild garlic *Allium ursinum* of Bulgarian

origin. *Natural product communications*, 4(8), 1059-1062.

Jacxsens, L., Devlieghere, F., & Debevere, J. (2002). Predictive modelling for packaging design: equilibrium modified atmosphere packages of fresh-cut vegetables subjected to a simulated distribution chain. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2-3), 331-341.

James, C., Seignemartin, V., & James, S. J. (2009). The freezing and supercooling of garlic (*Allium sativum* L.). *International Journal of Refrigeration*, 32(2), 253-260.

Jayeeta, M., Shrivastava, S. L., & Rao, P. S. (2011). Process optimisation of vacuum drying of onion slices. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(6), 586-594.

Joana Gil-Chávez, G., Villa, J. A., Fernando Ayala-Zavala, J., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E. M., & González-Aguilar, G. A. (2013). Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 5-23.

Julkunen-Tiitto, R., & Sorsa, S. (2001). Testing the effects of drying methods on willow flavonoids, tannins, and salicylates. *Journal of Chemical Ecology*, 27(4), 779-789.

Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Smyth, T. J., & O'Donnell, C. P. (2015). Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive components from brown seaweed *Ascophyllum nodosum* using response surface methodology. *Ultrasonics sonochemistry*, 23, 308-316.

Kalayarasan, S., Prabhu, P. N., Sriram, N., Manikandan, R., Arumugam, M., & Sudhandiran, G. (2009). Diallyl sulfide enhances antioxidants and inhibits inflammation through the activation of Nrf2 against gentamicin-induced nephrotoxicity in Wistar rats. *European journal of pharmacology*, 606(1-3), 162-171.

Kallel, F., Driss, D., Chaari, F., Belghith, L., Bouaziz, F., Ghorbel, R., & Chaabouni, S. E. (2014). Garlic (*Allium sativum* L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties. *Industrial Crops and Products*, 62, 34-41.

Kanekanian, A. (2013). Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals (2012), edited by N. Garti and DJ McClements, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK. ISBN 978-1-8456-9801-0. Price, £ 165.00. *International Journal of Dairy Technology*, 66(3), 458-459.

Kang, H. M., & Saltveit, M. E. (2002). Antioxidant capacity of lettuce leaf tissue increases after wounding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(26), 7536-7541.

Kalušević, A. (2017). Mikroinkapsulacija bioaktivnih jedinjenja iz sporednih proizvoda prehrambene industrije, doktorska disertacija, University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade, Serbia, 227

Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328-2375.

Khuwijitjaru, P., Pokpong, A., Klinchongkon, K., & Adachi, S. (2014). Production of oligosaccharides from coconut meal by subcritical water treatment. *International journal of food science & technology*, 49(8), 1946-1952.

Kimbaris, A. C., Siaty, N. G., Daferera, D. J., Tarantilis, P. A., Pappas, C. S., & Polissiou, M. G. (2006). Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrasonics sonochemistry*, 13(1), 54-60.

Kinalski, T., & Noreña, C. P. Z. (2014). Effect of blanching treatments on antioxidant activity and thiosulfinate degradation of garlic (*Allium sativum* L.). *Food and Bioprocess Technology*, 7(7), 2152-2157.

Knez, Ž., Markočič, E., Leitgeb, M., Primožič, M., Hrnčič, M. K., & Škerget, M. (2014). Industrial applications of supercritical fluids: A review. *Energy*, 77, 235-243.

Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Hafiz, A. M. M., Hafeza, A. B., & Rao, S. R. M. (2009). Study on retention of bioactive components of *Morinda citrifolia* L. using spray-drying. *Journal of Applied Sciences*, 9(17), 3092-3097.

Kubec, R., Svobodova, M., & Velíšek, J. (2000). Distribution of S-alk(en)ylcysteine

- sulfoxides in some *Allium* species. Identification of a new flavor precursor: S-ethylcysteine sulfoxide (ethiin). *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(2), 428-433.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Kyung, K. H. (2012). Antimicrobial properties of allium species. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 142-147.
- Kyung, K.H., Han, D.C., Fleming, H.P. (1997). Antibacterial Activity of Heated Cabbage Juice, S-Methyl-L-Cysteine Sulfoxide and Methyl Methanethiosulfonate. *Journal of food science*, 62(2), 406-409.
- Lachowicz, S., Kolniak-Ostek, J., Oszmiański, J., & Wiśniewski, R. (2017). Influence of Maturity on the Content of Phenolic Compounds of *Allium ursinum* L. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1).
- Lagunas, L. L. M., & Castaigne, F. (2008). Effect of temperature cycling on allinase activity in garlic. *Food chemistry*, 111(1), 56-60.
- Lai, K. C., Kuo, C. L., Ho, H. C., Yang, J. S., Ma, C. Y., Lu, H. F., Huang, H. Y., Chueh, F. S., Yu, C. C., & Chung, J. G. (2012). Diallyl sulfide, diallyl disulfide and diallyl trisulfide affect drug resistant gene expression in colo 205 human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Phytomedicine*, 19(7), 625-630.
- Lang, Q., & Wai, C. M. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta*, 53(4), 771-782.
- Lanzotti, V. (2006). The analysis of onion and garlic. *Journal of chromatography A*, 1112(1-2), 3-22.
- Larkeche, O., Zermane, A., Meniai, A. H., Crampon, C., & Badens, E. (2015). Supercritical extraction of essential oil from *Juniperus communis* L. needles: Application of response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 99, 8-14.
- Lee, S. K., & Kader, A. A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin

C content of horticultural crops. *Postharvest biology and technology*, 20(3), 207-220.

Li, Y., Xu, S. Y., & Sun, D. W. (2007). Preparation of garlic powder with high allicin content by using combined microwave–vacuum and vacuum drying as well as microencapsulation. *Journal of Food Engineering*, 83(1), 76-83.

Løkke, M. M., Seefeldt, H. F., Skov, T., & Edelenbos, M. (2013). Color and textural quality of packaged wild rocket measured by multispectral imaging. *Postharvest Biology and Technology*, 75, 86-95.

Lu, J., Feng, X., Han, Y., & Xue, C. (2014). Optimization of subcritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Laminaria japonica Aresch* by response surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(1), 139-145.

Lu, Q., Lu, P. M., Piao, J. H., Xu, X. L., Chen, J., Zhu, L., & Jiang, J. G. (2014). Preparation and physicochemical characteristics of an allicin nanoliposome and its release behavior. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 686-695.

Łuczaj, Ł., & Pieroni, A. (2016). Nutritional Ethnobotany in Europe: from emergency foods to healthy folk cuisines and contemporary foraging trends. In *Mediterranean wild edible plants* (pp. 33-56). Springer, New York, NY.

Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Assadpoor, E., & Dehnad, D. (2016). Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *International journal of biological macromolecules*, 85, 379-385.

Mahmutovic, O., Tahirovic, I., Copra, A., Memic, M., Ibragic, S., & Karic, L. (2014). Correlation of Total Secondary Sulfur Compounds, Total Phenols and Antioxidant Capacity in the Ramsons and Garlic.

Marques, G. R., Borges, S. V., de Mendonça, K. S., de Barros Fernandes, R. V., & Menezes, E. G. T. (2014). Application of maltodextrin in green corn extract powder production. *Powder Technology*, 263, 89-95.

Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. (2015). Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, 170, 378-385.

- Martins, R. M., Siqueira, S., & Freitas, L. A. P. (2012). Spray congealing of pharmaceuticals: Study on production of solid dispersions using Box-Behnken design. *Drying technology*, 30(9), 935-945.
- Martins, R. M., Siqueira, S., Machado, M. O., & Freitas, L. A. P. (2013). The effect of homogenization method on the properties of carbamazepine microparticles prepared by spray congealing. *Journal of microencapsulation*, 30(7), 692-700.
- Matos-Jr, F. E., Di Sabatino, M., Passerini, N., Favaro-Trindade, C. S., & Albertini, B. (2015). Development and characterization of solid lipid microparticles loaded with ascorbic acid and produced by spray congealing. *Food Research International*, 67, 52-59.
- Mazaheri, H., Lee, K. T., Bhatia, S., & Mohamed, A. R. (2010). Subcritical water liquefaction of oil palm fruit press fiber for the production of bio-oil: effect of catalysts. *Bioresource technology*, 101(2), 745-751.
- Medina-Torres, L., García-Cruz, E. E., Calderas, F., Laredo, R. G., Sánchez-Olivares, G., Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzmán, N.E. & Rodríguez-Ramírez, J. (2013). Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*). *LWT-Food Science and Technology*, 50(2), 642-650.
- Medina-Torres, L., Santiago-Adame, R., Calderas, F., Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., ... & Manero, O. (2016). Microencapsulation by spray drying of laurel infusions (*Litsea glaucescens*) with maltodextrin. *Industrial Crops and Products*, 90, 1-8.
- Mihaylova, D., & Popova, A. (2012). Antimicrobial and antioxidant activity of extracts of *Allium ursinum* L. *J. BioSci. Biotech*, 143-145.
- Mihaylova, D. S., Lante, A., Tinello, F., & Krastanov, A. I. (2014). Study on the antioxidant and antimicrobial activities of *Allium ursinum* L. pressurised-liquid extract. *Natural product research*, 28(22), 2000-2005.
- Mišan, A., Mimica-Dukić, N., Sakač, M., Mandić, A., Sedej, I., Šimurina, O., & Tumbas, V. (2011). Antioxidant activity of medicinal plant extracts in cookies. *Journal of food science*, 76(9).

- Mišan, A., Mimica-Dukić, N., Mandić, A., Sakač, M., Milovanović, I., & Sedej, I. (2011). Development of a rapid resolution HPLC method for the separation and determination of 17 phenolic compounds in crude plant extracts. *Open Chemistry*, 9(1), 133-142.
- Mishra, P., Mishra, S., & Mahanta, C. L. (2014). Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Embllica officinalis*) juice powder. *Food and Bioproducts Processing*, 92(3), 252-258.
- Mitra, S. (2003). Sample preparation techniques in analytical chemistry. John Wiley & Sons. New Jersey, USA
- Montgomery, D.C. (2005). Design and Analysis of Experiments, 6th ed. Wiley John & Sons, New York, NY.
- Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica chimica acta*, 703(1), 8-18.
- Nadeem, H. Ş., Torun, M., & Özdemir, F. (2011). Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. *LWT-Food Science and Technology*, 44(7), 1626-1635.
- Narita, Y., & Inouye, K. (2012). High antioxidant activity of coffee silverskin extracts obtained by the treatment of coffee silverskin with subcritical water. *Food chemistry*, 135(3), 943-949.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815.
- Nicoue, E. E., Savard, S., & Belkacemi, K. (2007). Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction and identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5626-5635.
- Nielsen, T., Bergström, B., & Borch, E. (2008). The origin of off-odours in packaged rucola (*Eruca sativa*). *Food chemistry*, 110(1), 96-105.

- Oliveira, M., Abadias, M., Usall, J., Torres, R., Teixidó, N., & Viñas, I. (2015). Application of modified atmosphere packaging as a safety approach to fresh-cut fruits and vegetables—A review. *Trends in Food Science & Technology*, *46*(1), 13-26.
- Oliveira, S. M., Ramos, I. N., Brandão, T. R., & Silva, C. L. (2015). Effect of Air-Drying Temperature on the Quality and Bioactive Characteristics of Dried Galega Kale (*Brassica oleracea* L. var. *Acephala*). *Journal of food processing and preservation*, *39*(6), 2485-2496.
- Oriani, V. B., Alvim, I. D., Consoli, L., Molina, G., Pastore, G. M., & Hubinger, M. D. (2016). Solid lipid microparticles produced by spray chilling technique to deliver ginger oleoresin: Structure and compound retention. *Food Research International*, *80*, 41-49.
- Oszmiański, J., Kolniak-Ostek, J., & Wojdyło, A. (2012). Characterization and content of flavonol derivatives of *Allium ursinum* L. plant. *Journal of agricultural and food chemistry*, *61*(1), 176-184.
- Paini, M., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Lagazzo, A., Botter, R., & Perego, P. (2015). Microencapsulation of phenolic compounds from olive pomace using spray drying: a study of operative parameters. *LWT-Food Science and Technology*, *62*(1), 177-186.
- Pârvu, M., Pârvu, A.E., Vlase, L., Ro, O., Pârvu, O. (2011). Antifungal properties of *Allium ursinum* L. ethanol extract. *Journal of Medicinal Plants Research*, *5*(10), 2041-2046.
- Passerini, N., Albertini, B., Di Sabatino, M., Corace, G., Luppi, B., Canistro, D., Vivarelli, F., Cirillo, S., Soleti, A., Merizzi, G. & Paolini, M. (2016). Development of microparticles for oral administration of the non-conventional radical scavenger IAC and testing in an inflammatory rat model. *International journal of pharmaceutics*, *512*(1), 126-136.
- Passerini, N., Perissutti, B., Albertini, B., Franceschinis, E., Lenaz, D., Hasa, D., Locatelli, I. & Voinovich, D. (2012). A new approach to enhance oral bioavailability of *Silybum Marianum* dry extract: association of mechanochemical activation and spray congealing. *Phytomedicine*, *19*(2), 160-168.

Passerini, N., Perissutti, B., Albertini, B., Voinovich, D., Moneghini, M., & Rodriguez, L. (2003). Controlled release of verapamil hydrochloride from waxy microparticles prepared by spray congealing. *Journal of controlled release*, 88(2), 263-275.

Passerini, N., Perissutti, B., Moneghini, M., Voinovich, D., Albertini, B., Cavallari, C., & Rodriguez, L. (2002). Characterization of carbamazepine–Gelucire 50/13 microparticles prepared by a spray-congealing process using ultrasounds. *Journal of pharmaceutical sciences*, 91(3), 699-707.

Pavkov, I. (2012). Kombinovana tehnologija sušenja voćnog tkiva, doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Serbia, 221.

Pavlić, B. (2017). Valorizacija sporednog proizvoda žalfije (*Sage officinalis* L.) u cilju dobijanja bioaktivnih jedinjenja savremenim tehnikama ekstrakcije, doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Serbia, 173.

Pavlić, B., Teslić, N., Vidaković, A., Vidović, S., Velićanski, A., Versari, A., Radosavljević, R. & Zeković, Z. (2017). Sage processing from by-product to high quality powder: I. Bioactive potential. *Industrial Crops and Products*, 107, 81-89.

Pavlić, B., Vidović, S., Vladić, J., Radosavljević, R., Cindrić, M., & Zeković, Z. (2016). Subcritical water extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by-products—Process optimization by response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 116, 36-45.

Pavlić, B., Vidović, S., Vladić, J., Radosavljević, R., & Zeković, Z. (2015). Isolation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil by green extractions versus traditional techniques. *The Journal of Supercritical Fluids*, 99, 23-28.

Pereira, A. P., Ferreira, I. C., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A. & Pereira, J. A. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12(5), 1153-1162.

Pezzutti, A., & Crapiste, G. H. (1997). Sorptional equilibrium and drying characteristics of garlic. *Journal of food Engineering*, 31(1), 113-123.

Phoungchandang, S., & Sertwasana, A. (2010). Spray-drying of ginger juice and

physicochemical properties of ginger powders. *Science Asia*, 36, 40-45.

Plaza, M., & Turner, C. (2015). Pressurized hot water extraction of bioactives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 39-54.

Poojary, M. M., Putnik, P., Kovačević, D. B., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Dias, D. A., & Potluri, R. H. K., Bandari, S., Jukanti, R., & Veerareddy, P. R. (2011). Solubility enhancement and physicochemical characterization of carvedilol solid dispersion with Gelucire 50/13. *Archives of pharmacal research*, 34(1), 51-57.

Pourmortazavi, S. M., & Hajimirsadeghi, S. S. (2007). Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of chromatography A*, 1163(1-2), 2-24.

Pravilnik o kvalitetu začina, ekstrakata začina i mešavina začina ("Sl. glasnik RS", br. 72/14 i 23/2015)9.

Radusin, T. (2015). Priprema i karakterizacija nanokompozita polimlečne kiseline i silicijum (IV) oksida namenjenog za pakovanje hrane, doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Serbia, 130.

Rahman, M. S., Al-Shamsi, Q. H., Bengtsson, G. B., Sablani, S. S., & Al-Alawi, A. (2009). Drying kinetics and allicin potential in garlic slices during different methods of drying. *Drying Technology*, 27(3), 467-477.

Ramić, M., Vidović, S., Zeković, Z., Vladić, J., Cvejic, A., & Pavlić, B. (2015). Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory. *Ultrasonics sonochemistry*, 23, 360-368.

Ratti, C. (2001). Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of food engineering*, 49(4), 311-319.

Ratti, C., Araya-Farias, M., Mendez-Lagunas, L., & Makhoulouf, J. (2007). Drying of garlic (*Allium sativum*) and its effect on allicin retention. *Drying technology*, 25(2), 349-356.

Rauha, J. P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H. & Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts

containing flavonoids and other phenolic compounds. *International journal of food microbiology*, 56(1), 3-12.

Ravber, M., Knez, Ž., & Škerget, M. (2015). Simultaneous extraction of oil-and water-soluble phase from sunflower seeds with subcritical water. *Food chemistry*, 166, 316-323.

Ray, S., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2016). An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience*, 13, 76-83.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

Reed, R. W., & Reed, G. B. (1948). "Drop plate" method of counting viable bacteria. *Canadian Journal of Research*, 26(6), 317-326.

Ren, H., Zhang, R., Wang, Q., Pan, H., & Wang, Y. (2016). Garlic root biomass as novel biosorbents for malachite green removal: Parameter optimization, process kinetics and toxicity test. *Chemical Research in Chinese Universities*, 32(4), 647-654.

Reuter, H. D. (1995). *Allium sativum* and *allium ursinum*: Part 2 pharmacology and medicinal application. *Phytomedicine*, 2(1), 73-91.

Reverchon, E., & De Marco, I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38(2), 146-166.

Ribeiro, M. D. M., Arellano, D. B., & Grosso, C. R. F. (2012). The effect of adding oleic acid in the production of stearic acid lipid microparticles with a hydrophilic core by a spray-cooling process. *Food Research International*, 47(1), 38-44.

Rietz, B., Isensee, H., Strobach, H., Makdessi, S., & Jacob, R. (1993). Cardioprotective actions of wild garlic (*Allium ursinum*) in ischemia and reperfusion. *Molecular and cellular biochemistry*, 119(1-2), 143-150.

Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., & Saenz, C. (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by

spray drying. *International journal of food science & technology*, 45(7), 1386-1394.

Rocha, R. P., & Melo, E. C. (2011). Influence of drying process on the quality of medicinal plants: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(33), 7076-7084.

Romdhane, M., & Gourdon, C. (2002). Investigation in solid–liquid extraction: influence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal*, 87(1), 11-19.

Roselló-Soto, E., Parniakov, O., Deng, Q., Patras, A., Koubaa, M., Grimi, N., Boussetta, N., Tiwari, B.K., Vorobiev, E., Lebovka, N. & Barba, F. J. (2016). Application of non-conventional extraction methods: toward a sustainable and green production of valuable compounds from mushrooms. *Food Engineering Reviews*, 8(2), 214-234.

Rybak, M. E., Calvey, E. M., & Harnly, J. M. (2004). Quantitative determination of allicin in garlic: supercritical fluid extraction and standard addition of alliin. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 52(4), 682-687.

Sabha, D., Hiyasat, B., Grötzinger, K., Hennig, L., Schlegel, F., Mohr, F. W., Rauwald, H.W. & Dhein, S. (2012). *Allium ursinum* L.: bioassay-guided isolation and identification of a galactolipid and a phytosterol exerting antiaggregatory effects. *Pharmacology*, 89(5-6), 260-269.

Sachan, N. K., Singh, B., & Rao, K. R. (2006). Controlled drug delivery through microencapsulation. *Malaysian J Pharm Sci*, 4(1), 65-81.

Sahena, F., Zaidul, I. S. M., Jinap, S., Karim, A. A., Abbas, K. A., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2009). Application of supercritical CO₂ in lipid extraction—A review. *Journal of Food Engineering*, 95(2), 240-253.

Şahin-Nadeem, H., Dinçer, C., Torun, M., Topuz, A., & Özdemir, F. (2013). Influence of inlet air temperature and carrier material on the production of instant soluble sage (*Salvia fruticosa* Miller) by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*, 52(1), 31-38.

Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., & Kanazawa, K. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 571-581.

- Said, L. B. H., Najjaa, H., Farhat, A., Neffati, M., & Bellagha, S. (2015). Thin layer convective air drying of wild edible plant (*Allium roseum*) leaves: experimental kinetics, modeling and quality. *Journal of food science and technology*, 52(6), 3739-3749.
- Salehan, N. A. M., Sulaiman, A. Z., & Ajit, A. (2016). Effect of temperature and sonication on the extraction of galic acid from *Labisia pumila* (Kacip fatimah). *ARPJN Journal of Engineering and Applied Sciences*, 11(4), 2193-2198.
- Sališová, M., Toma, Š., & Mason, T. J. (1997). Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*. *Ultrasonics sonochemistry*, 4(2), 131-134.
- Samaram, S., Mirhosseini, H., Tan, C. P., & Ghazali, H. M. (2014). Ultrasound-assisted extraction and solvent extraction of papaya seed oil: Crystallization and thermal behavior, saturation degree, color and oxidative stability. *Industrial Crops and Products*, 52, 702-708.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*, 8(3), 121-137.
- Sandhya. (2010). Modified atmosphere packaging of fresh produce: current status and future needs. *LWT-Food Science and Technology*, 43(3), 381-392.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Latha, L. Y. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1).
- Sass-Kiss, A., Simandi, B., Gao, Y., Boross, F., & Vamos-Falusi, Z. (1998). Study on the pilot-scale extraction of onion oleoresin using supercritical CO₂. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(3), 320-326.
- Schmitt, B., Schulz, H., Storsberg, J., & Keusgen, M. (2005). Chemical characterization of *Allium ursinum* L. depending on harvesting time. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(18), 7288-7294.
- Schwimmer, S., & Weston, W. J. (1961). Onion flavor and odor, enzymatic development

of pyruvic acid in onion as a measure of pungency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 9(4), 301-304.

Sengupta, A., Ghosh, S., & Bhattacharjee, S. (2004). *Allium* vegetables in cancer prevention: an overview. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 5(3), 237-245.

Serea, C., Barna, O., Manley, M., & Kidd, M. (2014). Effect of storage temperature on the ascorbic acid content, total phenolic content and antioxidant activity in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *The Journal of animal and plant sciences*, 24(4), 1173-7.

Serpen, A., Capuano, E., Fogliano, V., & Gökmen, V. (2007). A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7676-7681.

Sharma, G. P., & Prasad, S. (2006). Optimization of process parameters for microwave drying of garlic cloves. *Journal of Food Engineering*, 75(4), 441-446.

Shin, Y., Ryu, J. A., Liu, R. H., Nock, J. F., & Watkins, C. B. (2008). Harvest maturity, storage temperature and relative humidity affect fruit quality, antioxidant contents and activity, and inhibition of cell proliferation of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 49(2), 201-209.

Shirsath, S. R., Sonawane, S. H., & Gogate, P. R. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 53, 10-23.

Shpigelman, A. (2017). Stability and extraction of bioactive sulfur compounds from *Allium* genus processed by traditional and innovative technologies. *Journal of Food Composition and Analysis*, 61, 28-39.

Shrestha, A. K., Ua-Arak, T., Adhikari, B. P., Howes, T., & Bhandari, B. R. (2007). Glass transition behavior of spray dried orange juice powder measured by differential scanning calorimetry (DSC) and thermal mechanical compression test (TMCT). *International Journal of Food Properties*, 10(3), 661-673.

Silva, E. M., Da Silva, J. S., Pena, R. S., & Rogez, H. (2011). A combined approach to optimize the drying process of flavonoid-rich leaves (*Inga edulis*) using experimental

design and mathematical modelling. *Food and Bioproducts Processing*, 89(1), 39-46.

Simin, N. (2015). Sekundarni biomolekuli u vrstama *Allium* sect. *Codonoprasum* rchb. – biološke aktivnosti, fitokemijski i hemotaksonomski aspekti, doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, Serbia, 333.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

Sobolewska, D., Janeczko, Z., Kisiel, W., Podolak, I., Galanty, A. & Trojanowska, D., (2006). Steroidal glycosides from the underground parts of *Allium ursinum* L. and their cytostatic and antimicrobial activity. *Acta Pol Pharm Drug Res*, 63(3), 219-223.

Sobolewska, D., Podolak, I., & Makowska-Wąs, J. (2015). *Allium ursinum*: botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry reviews*, 14(1), 81-97.

Sosnik, A., & Seremeta, K. P. (2015). Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in colloid and interface science*, 223, 40-54.

Štajner, D., & Varga, I. S. (2003). An evaluation of the antioxidant abilities of *Allium* species. *Acta biologica szegediensis*, 47(1-4), 103-106.

Štajner, D., Popović, B. M., Čanadanović-Brunet, J., & Štajner, M. (2008). Antioxidant and scavenger activities of *Allium ursinum*. *Fitoterapia*, 79(4), 303-305.

Šumić, Z. (2014). Optimizacija sušenja voća u vakuumu, doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Serbia, 126

Synowiec-Piłat, M. (2010). Wybrane społeczne wyznaczniki jakości życia 50-letnich Polek w kontekście ich sytuacji zdrowotnej. *Przegląd Menopauzalny*, 14(6), 385-389.

Teh, S. S., & Birch, E. J. (2014). Effect of ultrasonic treatment on the polyphenol content and antioxidant capacity of extract from defatted hemp, flax and canola seed cakes. *Ultrasonics sonochemistry*, 21(1), 346-353.

Teixidó, E., Santos, F., Puignou, L., & Galceran, M. T. (2006). Analysis of 5-

hydroxymethylfurfural in foods by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 1135(1), 85-90.

Tengse, D. D., Priya, B., & Kumar, P. A. R. (2017). Optimization for encapsulation of green tea (*Camellia sinensis* L.) extract by spray drying technology. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(1), 85-92.

Teo, C. C., Tan, S. N., Yong, J. W. H., Hew, C. S., & Ong, E. S. (2010). Pressurized hot water extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2484-2494.

Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100-109.

Toledo, M. E. A., Ueda, Y., Imahori, Y., & Ayaki, M. (2003). L-ascorbic acid metabolism in spinach (*Spinacia oleracea* L.) during postharvest storage in light and dark. *Postharvest biology and technology*, 28(1), 47-57.

Tomšik, A., Pavlić, B., Vladić, J., Cindrić, M., Jovanov, P., Sakač, M., Mandić, A. & Vidović, S. (2017). Subcritical water extraction of wild garlic (*Allium ursinum* L.) and process optimization by response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 128, 79-88.

Tomšik, A., Pavlić, B., Vladić, J., Ramić, M., Brindza, J., & Vidović, S. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). *Ultrasonics sonochemistry*, 29, 502-511.

Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G., & Oreopoulou, V. (2007). Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*, 12(3), 593-606.

Trajković, J., Baras, J., Mirić, M. i Šiler, S., (1983). Analiza životnih namirnica. Tehnološkometaluški fakultet, Univeriteta u Beogradu. Beograd

Tulini, F. L., Souza, V. B., Echalar-Barrientos, M. A., Thomazini, M., Pallone, E. M., & Favaro-Trindade, C. S. (2016). Development of solid lipid microparticles loaded with a proanthocyanidin-rich cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum*): Potential for increasing antioxidant content in functional foods for diabetic population. *Food Research*

International, 85, 10-18.

Veltman, R. H., Kho, R. M., Van Schaik, A. C. R., Sanders, M. G., & Oosterhaven, J. (2000). Ascorbic acid and tissue browning in pears (*Pyrus communis* L. cvs Rocha and Conference) under controlled atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 19(2), 129-137.

Vidović, S. S., Vladić, J. Z., Vaštag, Ž. G., Zeković, Z. P., & Popović, L. M. (2014). Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in *Satureja montana* dry powder extract obtained by spray drying technique. *Powder Technology*, 258, 209-215.

Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics sonochemistry*, 8(3), 303-313.

Vlase, L., Parvu, M., Parvu, E. A., & Toiu, A. (2013). Phytochemical analysis of *Allium fistulosum* L. and *A. Ursinum* L. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)*, 8(1).

Wang, D., Feng, Y., Liu, J., Yan, J., Wang, M., Sasaki, J. I., & Lu, C. (2010). Black garlic (*Allium sativum*) extracts enhance the immune system. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 4(1), 37-40.

Wang, H., Li, X., Liu, X., Shen, D., Qiu, Y., Zhang, X., & Song, J. (2015). Influence of pH, concentration and light on stability of allicin in garlic (*Allium sativum* L.) aqueous extract as measured by UPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(9), 1838-1844.

Wang, J., Cao, Y., Sun, B., Wang, C., & Mo, Y. (2011). Effect of ultrasound on the activity of alliinase from fresh garlic. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(2), 534-540.

Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.

Wang, S., & Langrish, T. (2009). A review of process simulations and the use of additives in spray drying. *Food Research International*, 42(1), 13-25.

Wang, Y. F., Shao, J. J., Wang, Z. L., & Lu, Z. X. (2012). Study of allicin microcapsules

in β -cyclodextrin and porous starch mixture. *Food research international*, 49(2), 641-647.

Wijngaard, H., & Brunton, N. (2009). The optimization of extraction of antioxidants from apple pomace by pressurized liquids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(22), 10625-10631.

Wong, P. C. H., Heng, P. W. S., & Chan, L. W. (2015). Spray congealing as a microencapsulation technique to develop modified-release ibuprofen solid lipid microparticles: the effect of matrix type, polymeric additives and drug–matrix miscibility. *Journal of microencapsulation*, 32(8), 725-736.

Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., ... & Li, H. B. (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 96.

Xu, H., Wang, W., Liu, X., Yuan, F., & Gao, Y. (2015). Antioxidative phenolics obtained from spent coffee grounds (*Coffea arabica* L.) by subcritical water extraction. *Industrial Crops and Products*, 76, 946-954.

Yang, Y. C., Yang, Z. W., Zhang, Z. H., Li, J., Zu, Y. G., & Fu, Y. J. (2013). Effect of acid hydrolysis in the microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Geranium sibiricum* Linne with the guidance of antibacterial activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(14), 819-830.

Ye, C. L., & Lai, Y. F. (2012). Supercritical CO₂ extraction optimization of onion oil using response surface methodology. *Chemical Engineering & Technology*, 35(4), 646-652.

Yoo, K. S., Lee, E. J., & Patil, B. S. (2012). Changes in Flavor Precursors, Pungency, and Sugar Content in Short-Day Onion Bulbs during 5-Month Storage at Various Temperatures or in Controlled Atmosphere. *Journal of food science*, 77(2).

Zakaria, S. M., & Kamal, S. M. M. (2016). Subcritical water extraction of bioactive compounds from plants and algae: applications in pharmaceutical and food ingredients. *Food Engineering Reviews*, 8(1), 23-34.

- Zeković, Z., Vidović, S., Vladić, J., Radosavljević, R., Cvejin, A., Elgndi, M. A., & Pavlić, B. (2014). Optimization of subcritical water extraction of antioxidants from *Coriandrum sativum* seeds by response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 95, 560-566.
- Zhang, G., He, L., & Hu, M. (2011). Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities in vitro. *Innovative food science & emerging technologies*, 12(1), 18-25.
- Zhou, L., Guo, X., Bi, J., Yi, J., Chen, Q., Wu, X., & Zhou, M. (2017). Drying of garlic slices (*Allium sativum* L.) and its effect on thiosulfinates, total phenolic compounds and antioxidant activity during infrared drying. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1).
- Zhu, D., Ji, B., Eum, H. L., & Zude, M. (2009). Evaluation of the non-enzymatic browning in thermally processed apple juice by front-face fluorescence spectroscopy. *Food chemistry*, 113(1), 272-279.
- Zhu, X., Zhang, H., & Lo, R. (2004). Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(24), 7272-7278.
- Zuidam, N.J., Nedović, V. (2010). Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing, in: Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Springer, pp. 3–30.
- Zuidam, N. J., & Shimoni, E. (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (pp. 3-29). Springer, New York, NY.