

UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
DOKTORSKE STUDIJE KLINIČKE MEDICINE



Marina Kalić

**FIZIČKO-HEMIJSKA I REOLOŠKA KARAKTERIZACIJA MIKROKAPSULA
RIBLJEG ULJA INKORPORIRANIH U ČOKOLADNI MATRIKS**

Doktorska disertacija

Mentori:

Prof. dr Veljko Krstonošić

Dr Miroslav Hadnadev

Novi Sad, 2020.

ZAHVALNICA

Neizmernu zahvalnost dugujem svojim mentorima, prof. dr Veljku Krstonošiću i dr Miroslavu Hadnađevu, na poverenju koje su mi ukazali i na neverovatnoj energiji, trudu, razumevanju, dragocenim savetima i idejama kojima su me vodili kroz izradu ove doktorske disertacije.

Izrada ove doktorske disertacije ne bi bila moguća bez dr Tamare Dapčević Hadnađev, koja je uvek bila spremna da stavi na raspolaganje svoje znanje, ideje i savete i bila tu da me usmeri i vrati na pravi put.

Iskreno se zahvaljujem prof. dr Budimki Novaković i doc. dr Jeleni Jovičić Bati na svim korisnim savetima i sugestijama kojima je unapređena disertacija.

Posebno se zahvaljujem timu ljudi sa Instituta za prehrambene tehnologije Univerziteta u Orhusu, Danska, koji su mi omogućili izradu rada koji je označio početak ove doktorske disertacije.

Ogromnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima i bratu za svu moralnu podršku, ljubav i razumevanje tokom čitavog školovanja.

I na kraju, ogromno hvala svom suprugu za neograničenu podršku, ljubav, veru i razumevanje koje mi je pružio tokom čitave izrade ove disertacije. I Andriji - što sam tu gde jesam.

Marina

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Marina Kalić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Veljko Krstonošić, vanredni profesor Dr Miroslav Hadnađev, viši naučni saradnik
Naslov rada: NR	Fizičko-hemijska i reološka karakterizacija mikrokapsula ribljeg ulja inkorporiranih u čokoladni matriks
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / engl.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2020.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Fizički opis rada: FO	8 poglavlja / 137 stranica / 15 grafika / 17 slika / 21 tabela / 205 referenci
Naučna oblast: NO	Farmacija
Naučna disciplina: ND	Industrijska farmacija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	riblje ulje; omega-3 masne kiseline; proteini; dodaci ishrani; čokolada; reologija; funkcionalna hrana Ne MeSH: sušenje raspršivanjem
UDK	615.014.6:665.213
Čuva se: ČU	U biblioteci Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Omega-3 masne kiseline su uslovne za zdravlje ljudi i imaju značajne fiziološke uloge. Dijetetski proizvodi na bazi omega-3 masnih kiselina predstavljaju značajan izvor omega-3 masnih kiselina. Riblje ulje je dobar izvor polinezasićenih masnih kiselina (PUFA). Dnevni unos omega-3 polinezasićenih masnih kiselina je u većini delova sveta ispod preporučenog, uglavnom usled nedovoljne zastupljenosti ribe u ishrani. Zbog toga se danas riblje ulje nalazi u obliku različitih dijetetskih proizvoda i ponuda ovih preparata na tržištu je veoma široka. Problem sa unosom ribljeg ulja kao dodatka ishrani je njegov intenzivan i neprijatan ukus i miris, što može da dovede do neadekvatne suplementacije.</p> <p>Sušenje raspršivanjem (engl. <i>spray drying</i>) predstavlja tehniku koja omogućava trenutno sušenje rastvora, suspenzija ili emulzija. U pitanju je metoda koja ima široku primenu u farmaceutskoj industriji, a između ostalog se primenjuje i u cilju maskiranja neprijatnog ukusa lekova. Kao omotač mikrokapsula dobijenih sušenjem raspršivanjem je moguće</p>

koristiti proteine, ali je neophodno dobro ispitati i poznavati njihove fizičko-hemijske osobine i funkcionalnost.

Inkorporiranjem mikrokapsula ribljeg ulja u čokoladu bi se dobila funkcionalna ili obogaćena hrana, što predstavlja i finalnu formulaciju u ovom radu. Obogaćivanjem čokolade sa visokim sadržajem kakao delova mikrokapsulama ribljeg ulja kreirao bi se višestruko funkcionalan proizvod. Odabir čokolade kao matriksa za obogaćivanje uslovljen je činjenicom da je ona široko konzumiran proizvod.

Ciljevi ovog rada bili su da se ispita uticaj metode sušenja raspršivanjem na stabilnost preformulacije ribljeg ulja, da se utvrde karakteristike mikrokapsula dobijenih sušenjem raspršivanjem (prinos i efikasnost mikrokapsulacije, oksidativnu stabilnost ulja, morfološke osobine i veličinu mikrokapsula), zatim da se utvrdi uticaj veličine čestica na kristalizaciju u masnoj fazi suspenzije koja se koristi za izradu konditorskih proizvoda i da se utvrde fizičko-hemijske karakteristike (teksturu, boju, reološke osobine) čokolade koja sadrži inkorporirane mikrokapsule ribljeg ulja u odnosu na čokoladu bez dodatka mikrokapsula.

Metode su obuhvatale karakterizaciju proteina dobijenih iz soje, graška, krompira, pirinča i surutke, njihovih rastvora, kao i emulzija ribljeg ulja u vodenim rastvorima tih proteina, određivanje prinosa i efikasnosti mikrokapsulacije i karakterizaciju dobijenih mikrokapsula. Prilikom ispitivanja uticaja veličine čestica na kristalizaciju u masnoj fazi suspenzije koja se koristi za izradu konditorskih proizvoda i fizičko-hemijskih osobina čokolade koja sadrži inkorporirane mikrokapsule ribljeg ulja primenjivane su metode za određivanje teksture, reoloških karakteristika, sadržaja

	<p>čvrstih masti i boje dobijenih formulacija.</p> <p>Dobijeni rezultati su pokazali da se proteini ponašaju kao dobri emulgatori i da sušenje raspršivanjem predstavlja efikasan način za dobijanje mikrokapsula ribljeg ulja sa proteinima kao omotačima mikrokapsula. Kristalizacija masne faze u suspenziji koja predstavlja model čokolade zavisi od veličine čvrstih čestica. Kada je u pitanju proizvodnja čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja kod kojih su kao omotači korišćeni proteini soje, surutke i krompira, dodatak tih mikrokapsula ne utiče na karakteristike čokolade u meri dovoljnoj da bi se narušio proizvodni proces izrade. Sve navedeno upućuje na zaključak da bi proizvodnja čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja, tehnološki bila moguća.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP</p>	<p>30.05.2019.</p>
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>predsednik: dr Budimka Novaković, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Jelena Jovičić Bata, docent, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Tamara Dapčević Hadnađev, viši naučni saradnik, Naučni institut za prehrambene tehnologije, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Veljko Krstonošić, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Miroslav Hadnađev, viši naučni saradnik, Naučni institut za prehrambene tehnologije, Univerzitet u Novom Sadu</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF MEDICINE**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Marina Kalić
Mentor: MN	Veljko Krstonošić, PhD, Associate Professor Miroslav Hadnađev, PhD, Senior Research Associate
Title: TI	Physico-chemical and rheological characterization of fish oil microcapsules incorporated in a chocolate matrix
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	engl. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2020
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Physical description: PD	8 chapters / 137 pages / 15 graphs / 17 images / 21 tables / 205 references
Scientific field SF	Pharmacy
Scientific discipline SD	Industrial pharmacy
Subject, Key words SKW	Fish Oils; Fatty Acids, Omega-3; Proteins; Dietary Supplements; Chocolate; Rheology; Functional Food Non MeSH: Spray Drying
UC	615.014.6:665.213
Holding data: HD	Library of Faculty of Medicine, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad, Republic of Serbia
Note: N	
Abstract: AB	<p>Omega-3 fatty acids are essential for human health and have significant physiological roles. Dietary products based on omega-3 fatty acids are a significant source of omega-3 fatty acids. Fish oil is a good source of polyunsaturated fatty acids (PUFA). The daily intake of omega-3 polyunsaturated fatty acids is below the recommended level in most parts of the world, mainly due to the lack of fish in the diet. This is why fish oil is now found as various dietary products which are widely present in the world's market. The problem with fish oil intake as a dietary supplement is its intense and unpleasant taste and odor, which can lead to inadequate supplementation.</p> <p>Spray drying is a technique that allows instantaneous drying of solutions, suspensions or emulsions. It is a widely used method in the pharmaceutical industry and is used, among other things, to mask the unpleasant taste of medicines. It is possible to use proteins as a coating of spray-dried microcapsules, but it is necessary to test and know their physicochemical properties and functionality. Incorporating fish oil microcapsules into</p>

chocolate would make functional or enriched foods, which is considered as a final formulation in this work. Enriching the high cocoa content chocolate with fish oil microcapsules would create a multi-functional product. The choice of chocolate as a base is conditioned by the fact that it is a widely consumed product.

The aim of this study was to investigate the effect of spray drying method on the stability of fish oil pre-formulation, to determine the characteristics of microcapsules obtained by spray drying (yield and efficiency of microencapsulation, oxidative stability of oil, morphological properties and size of microcapsules), to determine the effect of particle size crystallization in the oil phase of the suspension used for confectionery products and to determine the physicochemical characteristics (texture, color, rheological properties) of chocolate containing fish oil microcapsules in comparison with chocolate without the addition of microcapsules.

Methods included characterization of proteins obtained from soybeans, peas, potatoes, rice and whey, their solutions, as well as fish oil emulsions in aqueous solutions of these proteins, determination of the yield and efficiency of microencapsulation, and characterization of the microcapsules obtained.

In the examination of the effect of particle size on crystallization in the oil phase of the suspension used for the manufacture of confectionery and physicochemical properties of chocolate containing fish oil microcapsules, methods were used to determine the texture, rheological characteristics, solid fat content and color of the formulations obtained.

The results show that proteins act as good emulsifiers and that spray drying is an effective way to obtain fish oil microcapsules with

	<p>proteins as microcapsule shells. The crystallization of the oil phase in the suspension representing the chocolate model depends on the size of the solid particles. In the case of production of chocolate with incorporated fish oil microcapsules using soybean, whey and potato proteins as coating material, the addition of these microcapsules does not affect the chocolate characteristics to a degree sufficient to impair the manufacturing process. All of the above points to the conclusion that the production of chocolate with incorporated fish oil microcapsules would be technologically possible.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>30.05.2019</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president: Budimka Novaković, PhD, Full Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad member: Jelena Jovičić Bata, PhD, Assistant Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad member: Tamara Dapčević Hadnađev, PhD, Senior Research Associate, Institute of Food Technology, University of Novi Sad member: Veljko Krstonošić, PhD, Associate Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad member: Miroslav Hadnađev, PhD, Senior Research Associate, Institute of Food Technology, University of Novi Sad</p>

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DEO	5
2.1. Omega-3 masne kiseline	5
2.2. Karakteristike ribljeg ulja.....	10
2.3. Mikrokapsulacija	11
2.3.1. Mikrokapsule	13
2.3.2. Sušenje raspršivanjem (engl. <i>spray drying</i>).....	15
2.4. Proteini	19
2.4.1. Struktura proteina	19
2.4.2. Proteini u vodenim rastvorima	21
2.4.3. Emulgujuće sposobnosti proteina.....	23
2.5. Čokolada	26
2.5.1. Sastav čokolade	26
2.5.2. Zdravstveni aspekti konzumiranja čokolade.....	28
2.6. Funkcionalna hrana	31
3. CILJEVI I RADNE HIPOTEZE.....	33
3.1. Ciljevi istraživanja	33
3.2. Radne hipoteze istraživanja.....	33
4. MATERIJAL I METODE	34
4.1. Materijal	34
4.2. Metode rada	36
4.2.1. Karakterizacija proteina.....	36
4.2.2. Priprema rastvora proteina.....	37
4.2.3. Određivanje površinskog napona rastvora proteina	37
4.2.4. Određivanje viskoziteta rastvora proteina	38
4.2.5. Priprema emulzija	38
4.2.6. Određivanje veličine čestica emulzija	39
4.2.7. Određivanje stabilnosti emulzija	40

4.2.8. Reološke karakteristike emulzija	41
4.2.9. Izrada mikrokapsula	41
4.2.10. Ispitivanje morfoloških osobina i veličine mikrokapsula	42
4.2.11. Određivanje prinosa i efikasnosti mikrokapsulacije	42
4.2.12. Određivanje oksidativne stabilnosti ulja inkorporiranog u mikrokapsule	43
4.2.13. Priprema modela čokolade.....	44
4.2.14. Analiza teksturnih karakteristika modela čokolade.....	47
4.2.15. Reološke karakteristike modela čokolade.....	47
4.2.16. Određivanje sadržaja čvrste masti u modelu čokolade.....	48
4.2.17. Analiza mikrostrukture modela čokolade	48
4.2.18. Inkorporiranje mikrokapsula ribljeg ulja u čokoladu	49
4.2.19. Određivanje reoloških karakteristika čokolade sa mikrokapsulama ribljeg ulja	49
4.2.20. Određivanje teksturnih karakteristika čokolade sa mikrokapsulama ribljeg ulja	51
4.2.21. Određivanje boje čokolade sa mikrokapsulama ribljeg ulja	51
4.2.22. Statistička obrada podataka.....	51
5. REZULTATI I DISKUSIJA.....	53
5.1. Određivanje karakteristika proteina i njihovih rastvora.....	53
5.1.1. Aminokiselinski sastav	53
5.1.2. Rastvorljivost proteina.....	56
5.1.3. Površinska hidrofobnost proteina.....	57
5.1.4. Određivanje površinskog napona rastvora proteina	58
5.1.5. Određivanje viskoziteta rastvora proteina	62
5.2. Određivanje karakteristika emulzija	66
5.2.1. Određivanje raspodele veličine čestica emulzija	66
5.2.2. Određivanje stabilnosti emulzija	75
5.2.3. Reološke osobine emulzija	80
5.3. Karakterizacija mikrokapsula.....	84
5.3.1. Morfološke osobine i veličina mikrokapsula.....	85
5.3.2. Prinos i efikasnost mikrokapsulacije	89
5.3.3. Oksidativna stabilnost ribljeg ulja inkorporiranog u mikrokapsule	91
5.4. Karakterizacija modela čokolade.....	93

5.4.1. Teksturne karakteristike modela čokolade	93
5.4.2. Reološke karakteristike modela čokolade	96
5.4.3. Sadržaj čvrstih masti u uzorcima modela čokolade	99
5.4.4. Mikrostruktura modela čokolade	101
5.5. Karakterizacija čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja	103
5.5.1. Reološke karakteristike čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja ...	103
5.5.2. Teksturne karakteristike čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja ..	108
5.5.3. Određivanje boje čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja.....	110
6. ZAKLJUČCI.....	113
7. LITERATURA	115
8. SKRAĆENICE I SIMBOLI	136

1. UVOD

Omega-3 masne kiseline su uslovne za zdravlje ljudi, pošto ne mogu sve da se sintetišu u organizmu, i imaju značajne fiziološke uloge (1,2). Prirodno se nalaze u masnim ribama hladnih mora: bakalar, losos, tuna i skuša, ali i u pojedinim vrstama jezgrastog voća, zatim u lanenom semenu i lanenom ulju. Dijetetski proizvodi na bazi omega-3 masnih kiselina mogu biti značajan izvor omega-3 masnih kiselina.

Riblje ulje predstavlja dobar izvor omega-3 polinezasićenih masnih kiselina (engl. *polyunsaturated fatty acids; ω -3 PUFA*), u koje spadaju eikozapentaenska kiselina (engl. *eicosapentaenoic acid; EPA*), dokozaheksaenska kiselina (engl. *docosahexaenoic acid; DHA*), i u manjoj količini dokozapentaenska (engl. *docosapentaenoic acid; DPA*) i alfa-linolenska (engl. *alpha-linolenic acid; ALA*) kiselina. DHA je najzastupljenija polinezasićena masna kiselina dugog lanca u sivoj masi mozga i u mrežnjači oka, a prirodno se nalazi i u majčinom mleku i neophodna je za fiziološki razvoj mozga i vida odojčadi (3,4).

Omega-3 masne kiseline koje ulaze u sastav ribljeg ulja mogu da imaju imunomodulatornu i antiinflamatornu aktivnost, utiču na agregaciju trombocita, mogu imati vazodilatatorni efekat i uticaj na vrednosti triglicerida u krvi. (5).

Panel Evropske agencije za bezbednost hrane (engl. *European Food Safety Authority; EFSA*) smatra da nema dovoljno naučnih dokaza da bi se uspostavile maksimalno dozvoljene količine omega-3 masnih kiselina u dnevnoj dozi dodatka ishrani, ali su, prema dostupnim naučnim podacima, doze za koje se smatra da ne dovode do rizika po zdravlje date na sledeći način: bezbednim se smatra suplementacija EPA i DHA u kombinaciji do 5 g dnevno, same EPA do 1,8 g dnevno, i same DHA do 1 g dnevno (6).

Dnevni unos omega-3 polinezasićenih masnih kiselina je u većini delova sveta ispod preporučenog, uglavnom usled nedovoljne zastupljenosti ribe u ishrani (5). Zbog toga se danas riblje ulje nalazi u obliku različitih dijetetskih proizvoda i ponuda ovih preparata na tržištu je

veoma široka. Problem sa unosom ribljeg ulja kao dodatka ishrani je njegov intenzivan i neprijatan ukus i miris, što može da dovede do loše komplijanse korisnika. Jedan od načina za maskiranje neprijatnog ukusa i mirisa ribljeg ulja jeste inkorporiranje istog u kapsule, ali ostaje nerešen problem kod dece i osoba koje imaju problem sa gutanjem kapsula. Maskiranje ukusa predstavlja jedan od najvećih izazova kada je u pitanju oralna primena farmaceutskih preparata, pa i dodataka ishrani (7).

Sušenje raspršivanjem (engl. *spray drying*) predstavlja tehniku koja omogućava trenutno sušenje rastvora, suspenzija ili emulzija (8). Navedena metoda se u velikoj meri koristi u farmaceutskoj industriji u cilju stabilizacije amorfnih lekova, proizvodnje mikrosfera, kapsulacije, izrade sistema za kontrolisano oslobađanje lekovite supstance, stabilizacije i inaktivacije mikroorganizama i konačno, što delom spada i u sve navedeno, primenjuje se u cilju maskiranja neprijatnog ukusa lekova (8,9).

Kad je u pitanju primena sušenja raspršivanjem u proizvodnji preparata sa različitim vrstama ulja, navedena tehnika se pokazala kao jednostavna, jeftina i praktična. Mikrokapsulacija ribljeg ulja se uglavnom koristi kako bi sprečila oksidaciju ulja, formiranjem barijere nepropusne za kiseonik (10). Postojanje barijere takođe doprinosi maskiranju neprijatnog ukusa ulja, dok funkcionalnost sistema značajno zavisi od materijala koji se koristi za mikrokapsulaciju. Uobičajena je upotreba modifikovanih ugljenih hidrata kao omotača mikrokapsula zbog lakog sušenja i sposobnosti za formiranje barijernog sloja. Tokom prethodnih godina, značajno je poraslo interesovanje za proteine kao omotača mikrokapsula, zahvaljujući njihovoj površinskoj aktivnosti, emulgujućim i gelirajućim svojstvima, kao i sposobnosti obrazovanja filma. Proteinski omotači su podložni enzimskoj degradaciji u digestivnom traktu, što može da se iskoristi u razvoju sistema sa kontrolisanim oslobađanjem (11,12). Značajno je napomenuti i činjenicu da su modifikovani ugljeni hidrati (hemijski modifikovana celuloza, skrobovi) aditivi i da njihova zamena proteinima omogućava kreiranje tzv. „*clean label*“ (bez aditiva) proizvoda koji su sve više poželjni među potrošačima.

Proteini imaju jedinstvene funkcionalne osobine koje im omogućavaju da budu rastvorljivi u vodi, ali im daju i sposobnost adsorpcije, modifikacije reoloških osobina proizvoda, sposobnosti geliranja, emulgovanja i stabilizacije nastalih emulzija (13). Zahvaljujući svojoj biorazgradivosti i niskoj toksičnosti, proteini predstavljaju jednu od komponenata izbora

prilikom formulacije farmaceutskih preparata. Upravo zbog toga je bitno dobro ispitati i poznavati njihove fizičko-hemijske osobine i funkcionalnost (14).

Sušenje raspršivanjem može da se primenjuje u kontroli veličine čestica aktivne supstance i da obezbedi homogenu raspodelu veličine čestica dobijenih na ovaj način (15). Raspodela veličine čestica je naročito bitna prilikom izrade konditorskih proizvoda (16). Od svih konditorskih proizvoda, najprodavaniji i najšire rasprostranjen jeste čokolada (17).

Čokolada predstavlja suspenziju čvrstih čestica (uglavnom kakao praha i šećera) u masnoj fazi (16,18). Strukturne karakteristike čokolade, kao i njena kristalizacija, igraju važne uloge u dobijanju proizvoda odgovarajućeg kvaliteta (16). Čvrste čestice predstavljaju nukleuse koji iniciraju početak kristalizacije masne faze (19). Proces kristalizacije se odvija u kontinualnoj fazi suspenzije tokom proizvodnje čokolade u toku hlađenja proizvoda. Ukoliko proizvodni proces nije adekvatan, doći će do nepravilne kristalizacije proizvoda, što uzrokuje nepravilnosti u finalnom proizvodu, odnosno promene u izgledu i u ukusu proizvoda (19). S obzirom na to da tekstura, izgled i ukus predstavljaju najvažnije faktore na osnovu kojih potrošači donose odluku da li će prihvatiti neki prehrambeni proizvod (20), a kristalizacija utiče na sve navedene faktore, veoma je važno da proizvod bude dobro formulisan.

Usled velikog broja čvrstih čestica u čokoladi, njihova veličina i raspodela veličina značajno utiču na proces kristalizacije (21). Čokolada mora imati određene teksturne i reološke karakteristike kako bi bila zadovoljavajućeg kvaliteta, te sve nove komponente koje se inkorporiraju u čokoladni matriks moraju imati odgovarajuću veličinu čestica.

Inkorporiranjem mikrokapsula ribljeg ulja u čokoladu bi se dobila funkcionalna hrana. Izraz „funkcionalna hrana“ je u upotrebi više od tri decenije, a ideja se prvi put javila u Japanu osamdesetih godina prošlog veka u vidu hrane za posebne zdravstvene namene (engl. *Food for Specified Health Use; FOSHU*) (22).

Čokolada sa visokim sadržajem kakao delova sadrži i veliku količinu polifenola poreklom iz kakao zrna. Polifenoli iz kakao zrna ispoljavaju različite zdravstvene koristi (antioksidativna aktivnost sa potencijalom za snižavanje krvnog pritiska, normalizaciju agregacije trombocita, snižavanje nivoa LDL holesterola u krvi) (23). Zbog toga se čokolada sa visokim sadržajem kakao delova smatra funkcionalnom hranom (24).

Prema Pravilniku o kakao i čokoladnim proizvodima namenjenim za ljudsku upotrebu (Sl. glasnik RS, br. 24/2019), čokolada je proizvod dobijen od prerađenog kakao zrna i šećera, koji sadrži najmanje 35% ukupne suve materije kakao delova (25). Veći sadržaj kakaa u čokoladi znači i veći sadržaj polifenola, dok se dodatkom mleka ili šećera snižava sadržaj kakaa, pa i polifenola u čokoladi (26,27).

Obogaćivanjem čokolade sa visokim sadržajem kakao delova mikrokapsulama ribljev ulja kreirao bi se višestruko funkcionalan proizvod. Odabir čokolade kao matriksa za obogaćivanje uslovljen je činjenicom da je ona široko konzumiran proizvod.

2. OPŠTI DEO

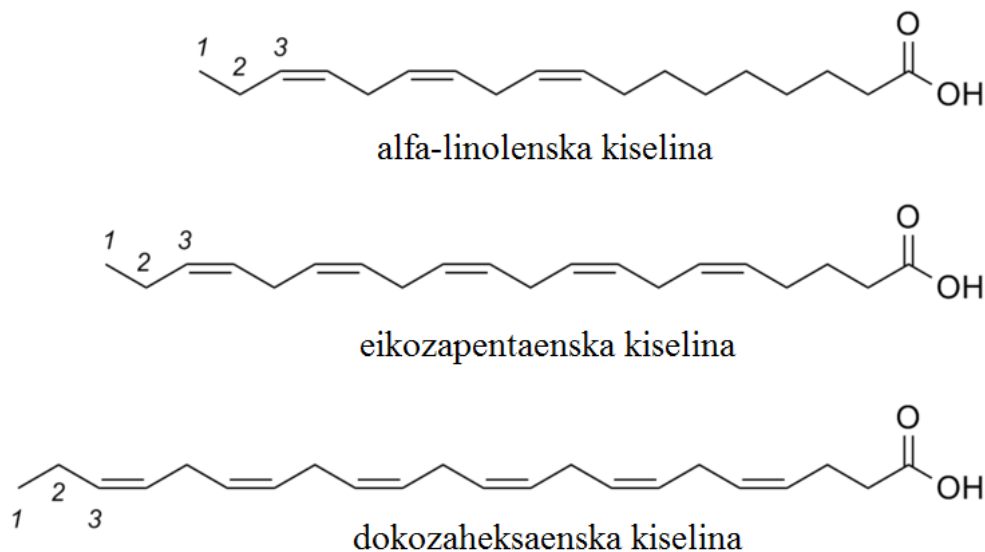
2.1. Omega-3 masne kiseline

Riblja ulja su lipidi koji se nalaze u ribama, posebno u vrstama koje žive u hladnijim vodama, kao i u nekim drugim morskim i okeanskim vrstama poput fitoplanktona (5). Pomenuta ulja su bogat izvor omega-3 polinezasićenih masnih kiselina, u koje spadaju eikozapentaenska kiselina, dokozaheksaenska kiselina, i u manjoj količini dokozaapentaenska i alfa-linolenska kiselina. Osim u ribljem ulju, omega-3 masne kiseline se nalaze i u orašastim plodovima, lanenom semenu, lanenom ulju i ulju uljane repice. Različite namirnice su izvor različitih omega-3 masnih kiselina (Tabela 1).

Prirodne polinezasićene masne kiseline su karboksilne kiseline sa ugljeničnim lancima različite dužine i većim brojem dvostrukih veza. Dele se u grupe ili familije, prema poziciji dvostruke veze najbliže terminalnoj metil grupi, i u skladu sa tim se označavaju “n-x” ili “ ω -x” sistemom. Najzastupljenije grupe su ω -3 i ω -6 masne kiseline, čije su roditeljske masne kiseline linolna (engl. *linoleic acid*; LA) i alfa-linolenska kiselina (28). Članovi ω -3 grupe su prikazani u Tabeli 1.

Tabela 1. ω -3 masne kiseline i njihovi nutritivni izvori (preuzeto i prilagođeno iz: Torović Lj. *Lipidi*. Novaković B, Torović L, ur. *Bromatologija: nutritivna vrednost i bezbednost hrane*. Novi Sad: Medicinski fakultet Novi Sad; 2014.)

Uobičajeni naziv	Skraćena oznaka	Nutritivni izvor
Alfa-linolenska	18:3n-3	Ulje lana, ulje uljane repice, sojino ulje
Stearidonska	18:4n-3	Riblje ulje, genetski modifikovano ulje soje, ulje semenki crne ribizle
Eikozapentaenska	20:5n-3	Riba, posebno masna (losos, haringa, sardine, skuša, bakalar)
Dokozaapentaenska	22:5n-3	Riba, posebno masna (losos, haringa, sardine, skuša, bakalar)
Dokozaheksaenska	22:6n-3	Riba, posebno masna (losos, haringa, sardine, skuša, bakalar)



Slika 1. Šematski prikaz struktura alfa-linolenske, eikozapentaenske i dokozaheksaenske kiseline

Iz familije ω -3 masnih kiselina, jedino je ALA zaista esencijalna masna kiselina koja se ne može sintetisati u ljudskom organizmu. Iz ALA, putem naizmeničnih reakcija desaturacije i elongacije u ljudskom organizmu, nastaju ostale ω -3 masne kiseline. Za navedene reakcije su potrebni enzimi, isti kao u reakcijama nastanka ω -6 masnih kiselina iz LA. Tipično viši unos LA hranom, kao i niži nivo ALA u tkivnim lipidima, dovode do značajno višeg stepena konverzije LA u ω -6 masne kiseline (28).

Efikasnost konverzije ALA u EPA i DHA je upitna, jer su istraživanja pokazala da povećan unos ALA hranom dovodi do rasta nivoa ALA u plazmi i tkivima, ali je taj rast znatno manji kad je u pitanju EPA, i gotovo zanemarljiv kod nivoa DHA. Najznačajniji rast nivoa DHA se postiže ishranom bogatom ribom, ili uzimanjem ribljeg ulja kao dodatka ishrani (28).

Značaj PUFA u ljudskom organizmu se ogleda u nastanku eikozanoida, bioaktivnih molekula čiji efekat zavisi od strukture PUFA iz koje su stvoreni. Iz EPA nastaju prostaglandini (vazodilatatorni efekat, inhibicija agregacije trombocita, antiinflamatorno delovanje), tromboksani (stimulacija agregacije trombocita i vazokonstriktorni efekat) i leukotrieni (signalni molekuli u imunom odgovoru), a iz DHA neuroprostani i 17S rezolvin (antiinflamatorno delovanje) (2).

ALA, DHA i EPA poreklom iz hrane i dodataka ishrani imaju antiinflamatorno delovanje (5,29,30). Istraživanja su pokazala da DHA i EPA imaju i potencijalno imunomodulatorno delovanje i da snižavaju nivoe triglicerida u krvi, a DHA povećava nivo HDL-holesterola u krvi (31). ALA i EPA deluju i kao inhibitori agregacije trombocita, a ALA ima i antiaterogeno i antiproliferativno delovanje (5,32). Više dosadašnjih istraživanja je potvrdilo i pozitivan uticaj DHA na razvoj i funkciju mozga i retine kod odojčadi (3,4,33).

Zahvaljujući velikom broju potencijalnih uloga ω -3 masnih kiselina u ljudskom organizmu i dovoljnom broju relevantnih studija, EFSA je prepoznala i autorizovala određene zdravstvene izjave, koje su od 2018. godine unete i u Pravilnik o prehrambenim i zdravstvenim izjavama koje se mogu navoditi na deklaraciji hrane (Sl. glasnik RS, 51/2018 i 103/2018) (34,35). Odobrene zdravstvene izjave za EPA, DHA i ALA, uz uslove njihovog korišćenja, date su u Tabeli 2.

Tabela 2. *Odobrene zdravstvene izjave vezane za EPA, DHA i ALA.*

Hranljivi sastojak	Zdravstvena izjava	Uslovi korišćenja zdravstvene izjave
	DHA doprinosi održavanju normalne funkcije mozga.	Obe izjave mogu da se koriste samo za hranu koja sadrži najmanje 40 mg DHA na 100 g i 100 kcal.
	DHA doprinosi održavanju normalnog vida.	Potrošača treba informisati da se koristan efekat postiže dnevnim unosom od 250 mg DHA.
DHA	DHA doprinosi održavanju normalnog nivoa triglicerida u krvi.	Izjava može da se koristi samo za hranu koja obezbeđuje dnevni unos od 2 g DHA i koja sadrži DHA u kombinaciji sa EPA. Potrošača treba informisati da se koristan efekat postiže dnevnim unosom 2 g DHA. Kod dodataka ishrani i/ili obogaćene hrane, potrošač se mora informisati da ne prelazi dnevni unos 5 g EPA i DHA u kombinaciji.

<p>Unos DHA tokom trudnoće i dojenja doprinosi normalnom razvoju mozga fetusa i odojčadi.</p> <p>Unos DHA tokom trudnoće i dojenja doprinosi normalnom razvoju oka kod fetusa i dojene odojčadi.</p>	<p>Informacija za trudnice i dojilje: Koristan efekat se postiže unosom 200 mg DHA dnevno uz preporučeni dnevni unos omega-3 masnih kiselina za odrasle, npr. 250 mg DHA i EPA. Izjava se može navesti samo na hrani koja obezbeđuje dnevni unos od najmanje 200 mg DHA.</p>	
<p>Uzimanje DHA doprinosi normalnom razvoju odojčadi do 12 meseci.</p>	<p>Koristan efekat se postiže uzimanjem 100 mg DHA dnevno. Kada se izjava ističe na prelaznoj formuli za odojčad, ta hrana treba da sadrži najmanje 0,3% DHA od ukupnih masnih kiselina.</p>	
<p>EPA/DHA doprinose normalnoj funkciji srca.</p>	<p>Izjava može da se koristi samo za hranu koja je izvor najmanje one količine EPA i DHA koja je navedena u nutritivnoj izjavi „Izvor omega-3 masnih kiselina“. Potrošača treba informisati da se koristan efekat postiže dnevnim unosom od 250 mg EPA i DHA.</p>	
<p>EPA/DHA</p>	<p>EPA/DHA doprinose održavanju normalnog krvnog pritiska.</p>	<p>Izjava može da se koristi samo za hranu koja obezbeđuje dnevni unos od 3 g EPA i DHA. Potrošača treba informisati da se koristan efekat postiže dnevnim unosom 3 g EPA i DHA. Kod dodatka ishrani i/ili obogaćene hrane, potrošač se mora informisati da ne prelazi dnevni unos 5 g EPA i DHA u kombinaciji.</p>
<p>EPA/DHA doprinose održavanju normalnog nivoa triglicerida u krvi.</p>	<p>Izjava može da se koristi samo za hranu koja obezbeđuje dnevni unos od 2 g EPA i DHA. Potrošača treba informisati da se koristan efekat postiže dnevnim unosom 2 g EPA i DHA. Kod dodatka ishrani i/ili obogaćene hrane, potrošač se mora informisati da ne prelazi dnevni</p>	

	unos 5 g EPA i DHA u kombinaciji.
ALA	ALA doprinosi održavanju normalnog nivoa holesterola u krvi. Izjava može da se koristi samo za hranu koja je izvor najmanje one količine ALA koja je navedena u nutritivnoj izjavi „Izvor omega-3 masnih kiselina“. Potrošača treba informisati da se koristan efekat postiže dnevnim unosom od 2 g ALA.

Prekomerni unos omega-3 masnih kiselina može imati neželjene efekte na zdravlje ljudi. Do sada zabeleženi neželjeni efekti su bili povezani sa visokim dnevnim dozama EPA i DHA i uključuju krvarenja, poremećeno funkcionisanje imunog sistema, povećana lipidna peroksidacija, i poremećen metabolizam lipida i glukoze (6). EFSA panel smatra da nema dovoljno naučnih dokaza da bi se uspostavile maksimalno dozvoljene količine omega-3 masnih kiselina u dnevnoj dozi dodatka ishrani, ali su, prema dostupnim naučnim podacima, doze za koje se smatra da ne dovode do rizika po zdravlje date na sledeći način: bezbednim se smatra suplementacija EPA i DHA u kombinaciji do 5 g dnevno, same EPA do 1,8 g dnevno, i same DHA do 1 g dnevno (6).

Odbor za lekove, hranu i ishranu Sjedinjenih Američkih Država (engl. *Food and Nutrition Board; FNB*) je doneo preporuku o adekvatnom unosu (engl. *Adequate Intake; AI*) omega-3 masnih kiselina, s obzirom na to da ne postoji dovoljno informacija za definisanje preporučenog dnevnog unosa. Dati podaci se odnose na različita životna doba, pol, i stanja (trudnoća, laktacija). Prema pomenutim podacima, adekvatni unos kod odojčadi iznosi 0,5 g dnevno, računato na ukupne omega-3 masne kiseline, dok je adekvatni unos kod odraslih muškaraca 1,6 g, a kod žena 1,1 g dnevno, računato na ALA (36).

Dnevni unos omega-3 polinezasićenih masnih kiselina je u većini delova sveta ispod preporučenog, uglavnom usled nedovoljne zastupljenosti ribe u ishrani (5). Zbog toga se danas riblje ulje nalazi u obliku različitih dijetetskih proizvoda i ponuda ovih preparata na tržištu je veoma široka. Problem sa unosom ribljeg ulja kao dodatka ishrani je njegov intenzivan i neprijatan ukus i miris, što može da dovede do loše komplijanse korisnika, o čemu će biti reči u nastavku.

2.2. Karakteristike ribljeg ulja

Riblje ulje sadrži omega-3 masne kiseline i izvor je liposolubilnih vitamina A i D. Značaj vitamina D se ogleda u njegovoj aktivnosti protiv rahitisa. Vitamin D₃ se sintetise u koži iz 7-dehidroholesterolu putem fotohemijske reakcije za koju su potrebni sunčevi UVB zraci. U određenim situacijama, sinteza vitamina D₃ u koži nije dovoljna da bi zadovoljila potrebe organizma, te u tim slučajevima vitamin D postaje esencijalni nutrijent.

Masne ribe i riblje ulje su redak i značajan nutritivni izvor vitamina D, te su dijetetski suplementi ribljeg ulja takođe značajan nutritivni izvor vitamina D (5).

Riblje ulje, kao i omega-3 masne kiseline izolovane iz njega imaju neprijatan miris („na ribu“), intenzivan ukus, i podložni su oksidaciji, što dovodi do smanjenja komplijanse kod korisnika ribljeg ulja kao dodatka ishrani, i do izazova u formulaciji takvih proizvoda, zbog otežane stabilizacije (3,37). Kao jedan od načina za stabilizaciju ribljeg ulja, koristi se mikrokapsulacija.

2.3. Mikrokapsulacija

Mikrokapsulacija je tehnika oblaganja određenih čestica (čvrstih čestica, tečnosti) polimernim materijalom u cilju odvajanja datih čestica od okolnog medijuma (38,39). Pomenuta tehnika se prvi put spominje u literaturi još 1931, kada su Bungenberg de John i Kaas opisali način dobijanja želatinskih mikrokapsula (40), a komercijalna proizvodnja mikrokapsula je započela sredinom prošlog veka (41).

Danas je mikrokapsulacija široko rasprostranjena, a najčešće se koristi za:

- zaštitu materije jezgra od okoline (zaštita od kiseonika, temperature, vlage, zračenja, sprečavanje fizičkih i hemijskih reakcija materije jezgra sa drugim komponentama),
- sprečavanje isparavanja materije jezgra,
- zaštitu okoline od eventualnog štetnog delovanja materije jezgra,
- prevođenje tečnih komponentata u čvrste čestice (praškove),
- kontrolu otpuštanja aktivnih supstanci iz mikrokapsula (kontrolisano oslobađanje lekovitih supstanci, odloženo oslobađanje, povećanje biološke raspoloživosti, transport aktivne komponente do mesta delovanja u organizmu),
- maskiranje neželjenih osobina materije jezgra (neprijatan miris, ukus, promena pH, katalitičko delovanje).

Širok spektar osobina mikrokapsula je omogućio primenu mikrokapsulacije u najrazličitijim industrijama. U prehrambenoj industriji mikrokapsule služe za zaštitu osetljivih materija, sprečavanje gubitka nutritivnih svojstava proizvoda, kao i za obogaćivanje hrane različitim nutrijentima: vitaminima, mineralima, antioksidansima (42,43).

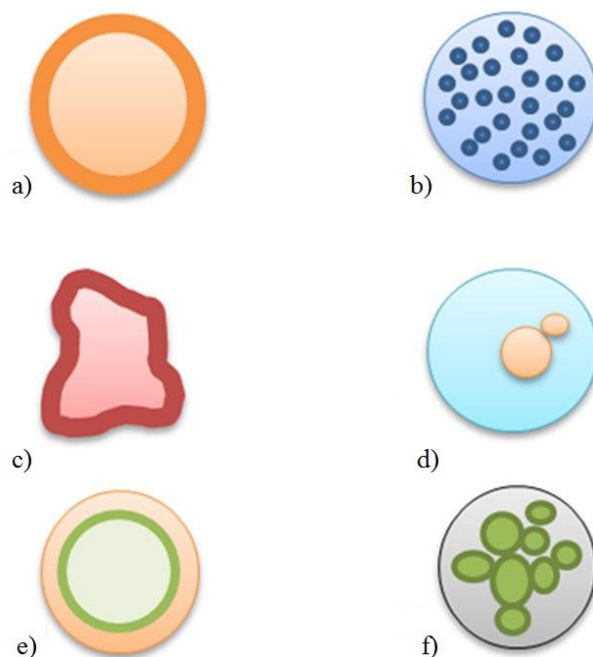
Primena mikrokapsula u farmaceutskoj industriji omogućava povećanje stabilnosti farmaceutski aktivnih komponenti (stabilnost na oksidaciju, sprečavanje isparavanja) i kontrolisano oslobađanje lekovitih supstanci (8,44). Mikrokapsule se koriste i u parenteralnim preparatima za ciljano oslobađanje lekovite supstance na mestu delovanja i za omogućavanje transporta lekovite supstance kroz krvotok (45–47). Kod aktivnih komponenti sa malom

terapijskom širinom, omogućeno je postizanje farmakološkog efekta pri niskim koncentracijama leka, primenom određenih metoda mikrokapsulacije sa omotačima specifičnih karakteristika (48).

Neprijatan ukus aktivnih supstanci može da bude uzrok odbijanja korišćenja lekova, posebno među decom. Maskiranje ukusa je postalo izuzetno značajno u razvoju i formulaciji lekovitih oblika i predstavlja jedan od osnovnih izazova u formulaciji oralnih lekovitih preparata (49,50).

2.3.1. Mikrokapsule

Mikrokapsule se sastoje od jezgra i omotača. Veličina mikrokapsula se kreće između 1 i 1000 μm . Manje od njih su nanokapsule ($<1 \mu\text{m}$), a veće su makrokapsule ($>1000 \mu\text{m}$). Jezgro mikrokapsule može biti čvrsto, tečno i gasovito. U zavisnosti od prirode jezgra i omotača, mikrokapsule mogu biti u obliku proste sfere, u vidu matriksa (sa mikrosferama), nepravilnog oblika, sa više jezgara, sa višeslojnim zidom, kao i grupisane mikrokapsule (51). Različiti tipovi mikrokapsula su prikazani na slici 2.



Slika 2. Različiti tipovi mikrokapsula: a) prosta sfera, b) matriks sa mikrosferama, c) mikrokapsula nepravilnog oblika, d) mikrokapsula sa više jezgara, e) mikrokapsula sa višeslojnim zidom i f) grupisane mikrokapsule

(preuzeto i prilagođeno iz: Bakry AM, Abbas S, Ali B, Majeed H, Abouelwafa MY, Mousa A, et al. *Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications*. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2016;15(1):143–82)

Polimerni omotači mikrokapsula mogu biti prirodnog, polusintetskog i sintetskog porekla, a izbor omotača zavisi od tipa mikrokapsule, njene namene i procesa mikrokapsulacije. Omotači moraju da ispune neke osnovne uslove (38):

- ne smeju reagovati sa materijom jezgra,
- moraju imati dobru sposobnost formiranja omotača,
- moraju biti fiziološki neškodljivi ukoliko se koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj ili kozmetičkoj industriji,
- nastali film mora biti stabilan, fleksibilan, odgovarajuće i jačine i propustljivosti,
- eventualni produkti biodegradacije omotača moraju biti neškodljivi.

Najčešće upotrebljavani omotači za mikrokapsulaciju su (38,52):

- proteini (kazein, želatin, albumin, gluten),
- ugljeni hidrati (alginati, agar, arapska guma, škrob i njegovi derivati, dekstrani, derivati celuloze (metil-, etil-, nitro-, natrijum-karboksimetilceluloza)),
- voskovi i lipidi (stearinska kiselina, mono- i digliceridi stearinske i palmitinske kiseline, cetilalkohol miristil alkohol, pčelinji vosak, parafin, šelak),
- sintetski polimeri (polivinilalkohol, polivinilpirolidon, poliakrilna kiselina, polimlečna kiselina, poliestri, poliakrilamid, polistiren, najlon, polikarbonati, silikoni, itd).

U farmaceutskoj i prehrambenoj industriji se kao omotači mikrokapsula često koriste ugljeni hidrati kao što su škrobovi, maltodekstrini i kukuruzni sirup zbog lakog sušenja i sposobnosti za formiranje matriksa. Ugljeni hidrati imaju relativno loše međupovršinske osobine, što znači da se pre upotrebe moraju hemijski modifikovati kako bi im se poboljšala površinska aktivnost (53). Tokom prethodnih godina, značajno je poraslo interesovanje za proteine kao omotače za mikrokapsule, zahvaljujući njihovoj površinskoj aktivnosti, emulgujućim i gelirajućim svojstvima, kao i sposobnosti za stvaranje filma. Proteinski omotači su podložni enzimskoj degradaciji u digestivnom traktu, što može da se iskoristi u razvoju sistema sa kontrolisanim oslobađanjem (11,12). Modifikovani ugljeni hidrati (hemijski modifikovana

celuloza, skrobovi i sl.) aditivi i njihova zamena proteinima omogućava kreiranje tzv. „*clean label*“ (bez aditiva) proizvoda koji su sve više poželjni među potrošačima.

Postupci dobijanja mikrokapsula se mogu podeliti u tri osnovne grupe, ali podela nije striktna. Različiti autori predlažu različite klasifikacije, a postoje i postupci koji se ne mogu svrstati ni u jednu od navedenih grupa (38,54,55):

- fizički postupci: sušenje raspršivanjem (engl. *spray drying* i *spray cooling*), očvršćavanje disperzije, raspršivanje u fluidizovanom sloju, prevlačenje u centrifugama;
- hemijski postupci: međufazna polimerizacija, kapljična metoda;
- fizičko-hemijski postupci: prosta ili kompleksna koacervacija, otparavanje rastvarača, očvršćavanje emulzija, formiranje liposoma.

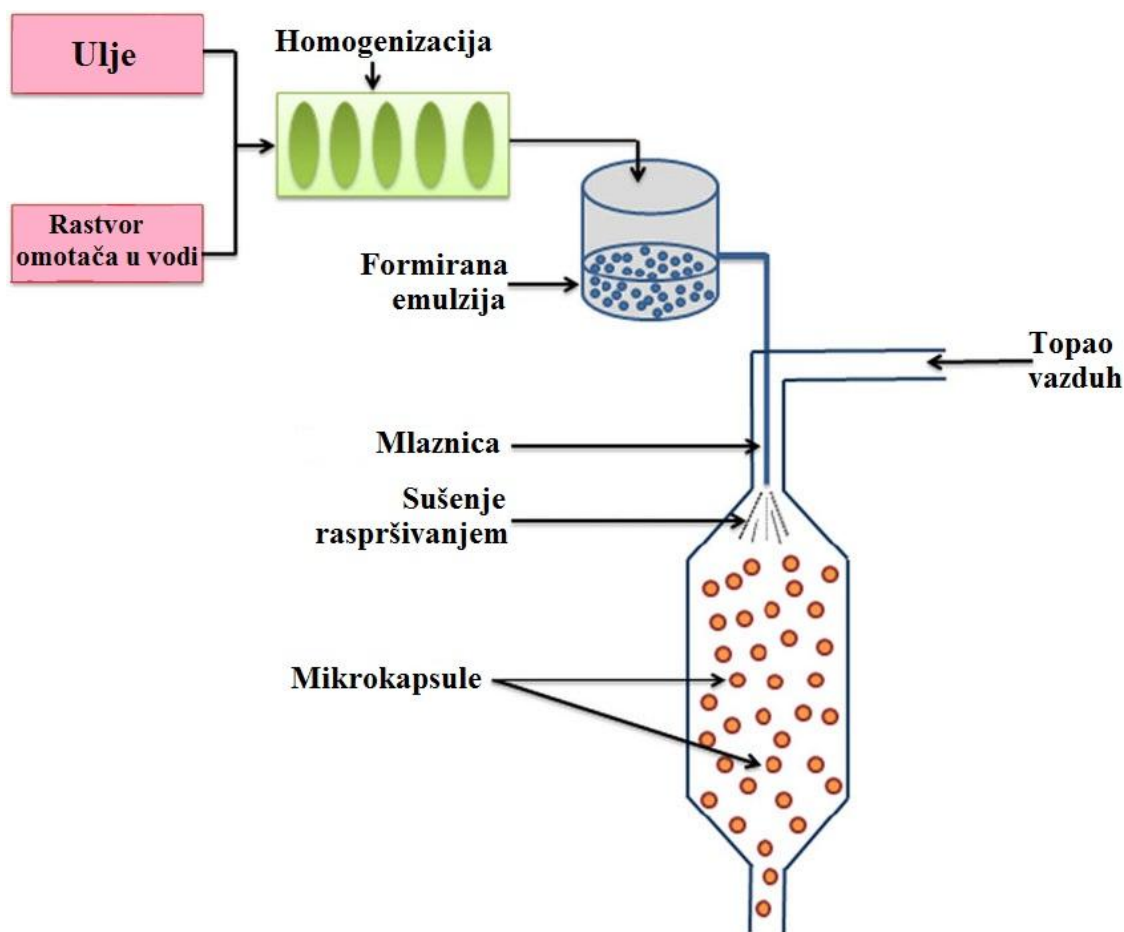
2.3.2. Sušenje raspršivanjem (engl. *spray drying*)

Sušenje raspršivanjem je postupak u kom se tečnost podvrgava struji toplog vazduha u cilju brzog isparavanja rastvarača i dobijanja praha. Inicijalna tečnost kojom se puni uređaj za sušenje u struji toplog vazduha, *spray dryer*, i koja se suši može biti rastvor, suspenzija ili emulzija. U zavisnosti od tipa tečnosti, kao i od uslova procesa, finalni proizvod su čvrste čestice (prah) koje mogu biti različite veličine: od vrlo sitnih i finih (10-50 μm), pa do krupnih (2-3 mm) (56).

Uklanjanje vode postupkom sušenja raspršivanjem je postalo jedan od najčešćih načina za obezbeđivanje mikrobiološke stabilnosti proizvoda, eliminisanje potencijalnih hemijskih reakcija u proizvodu, smanjenje troškova transporta i skladištenja, i dobijanje proizvoda željenih karakteristika (npr, prašak koji se pre upotrebe rastvori). S obzirom na to da izlaganje visokim temperaturama traje kratko, ovaj postupak je pogodan i za preradu i izradu osetljivih farmaceutskih preparata, kao što su proteinski lekovi i termolabilne komponente kao što su neke prehrambene arome (48).

Sušenje raspršivanjem je najčešće primenjivani postupak za mikrokapsulaciju ulja (51,57–59). Princip postupka se zasniva na sušenju emulzija ulje u vodi i ima nekoliko koraka,

prikazanih na slici 3 (51): prvo se pripremaju rastvor omotača (filmogena materija, polimer, rastvoran u vodi) i ulje, koji se zatim mešaju u cilju dobijanja homogene emulzije koja će omogućiti adsorpciju omotača na površinu kapljica ulja. Zatim se pripremljena emulzija pomoću pumpe (mlaznica) uvodi u *spray dryer* gde se izlaže struji toplog vazduha. Na povišenoj temperaturi, koja mora biti nešto viša od temperature otparavanja rastvarača (vode), dolazi prvo do raspršivanja emulzije a zatim i do dehidracije pojedinačnih raspršenih čestica. Tako osušene čestice (sada mikrokapsule) ulaze u ciklon toplog vazduha i skupljaju se u kolektorskoj posudi u vidu praha.



Slika 3. Proces mikrokapsulacije ulja u *spray dryer*-u.

(preuzeto i prilagođeno iz: Bakry AM, Abbas S, Ali B, Majeed H, Abouelwafa MY, Mousa A, et al. Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2016;15(1):143–82)

Uređaji za mikrokapsulaciju se razlikuju u zavisnosti od njihove namene i kapaciteta. Na slici 4 je prikazan *spray dryer* korišćen u ovom radu.



Slika 4. Laboratorijski spray dryer.

U cilju postizanja što efikasnije mikrokapsulacije, potrebno je podesiti odgovarajuće parametre u uređaju. Osnovni faktori koji utiču na optimizaciju procesa su temperatura emulzije, ulazna temperatura vazduha i kapacitet aspiracije (60). Temperatura emulzije utiče na viskozitet i

proticanje same emulzije, a time i na veličinu čestica: što je temperatura emulzije viša, to bi trebalo da je viskozitet niži i veličina čestica emulzije manja. Pošto nizak viskozitet omogućava brže proticanje emulzije kroz uređaj, pokretljivost čestica je prevelika i može otežati proces mikrokapsulacije. Niža temperatura i viši viskozitet emulzije smanjuju pokretljivost i povećavaju efikasnost mikrokapsulacije, ali ukoliko je emulzija previše viskozna, raspršivanje je znatno otežano.

Ulazna temperatura vazduha mora biti malo viša od temperature isparavanja rastvarača - što je temperatura viša, omotač će se brže formirati. Temperatura ne sme biti previsoka, kako ne bi došlo do isparavanja inkapsulirane materije, što se dodatno podešava regulisanjem kapaciteta aspiracije. Na opisani način može da se smanji vreme koje uzorak provede pod uslovima visoke temperature, tako da se dobiju adekvatne mikrokapsule, a da se izbegne mogućnost oštećenja jezgra mikrokapsule.

Način pripreme emulzije ima veliki značaj u dobijanju adekvatnih mikrokapsula: formirana emulzija mora biti stabilna duži vremenski period pre podvrgavanja sušenju raspršivanjem, viskozitet emulzije mora biti dovoljno nizak kako ne bi došlo do uklapanja mehurića vazduha, i čestice ulja moraju biti dovoljno male (61,62).

Efikasnost mikrokapsulacije može u nekim slučajevima biti povećana i povećanjem koncentracije omotača (polimera) u rastvoru (63). Vrsta omotača se bira u zavisnosti od vrste ulja, kao i od željenih karakteristika finalnog proizvoda, i ona takođe igra veliku ulogu u efikasnosti procesa dobijanja mikrokapsula. Odabrana polimerna materija treba da ima dobru rastvorljivost u vodi, jer se gotovo sva sušenja raspršivanjem obavljaju iz vodenih rastvora (64). Treba da ima i dobra emulgujuća svojstva, dobru sposobnost formiranja filma, kao i nizak viskozitet pri višim koncentracijama.

Mikrokapsule dobijene sušenjem raspršivanjem se podvrgavaju određenim ispitivanjima u zavisnosti od svoje namene. Univerzalna ispitivanja koja se primenjuju za najveći broj mikrokapsula obuhvataju efikasnost mikrokapsulacije i veličinu i morfologiju dobijenih mikrokapsula, što se najčešće ispituje primenom elektronskog mikroskopa (65).

2.4. Proteini

2.4.1. Struktura proteina

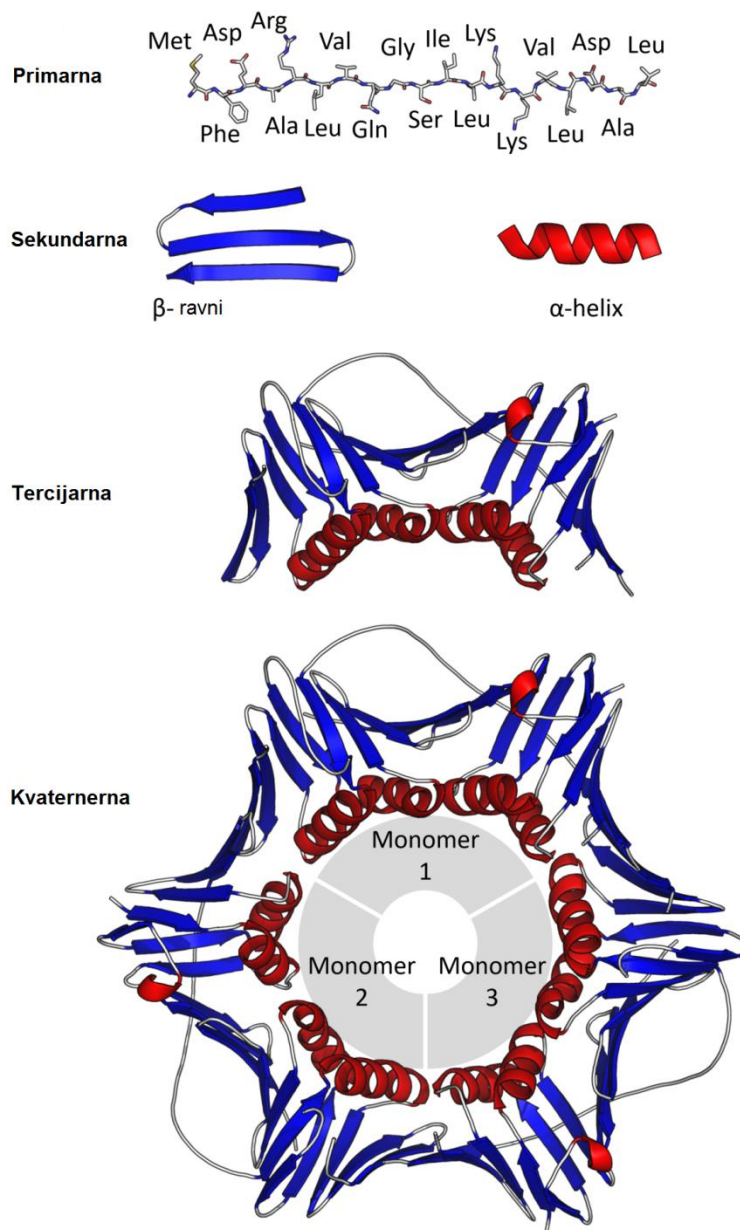
Proteini su makromolekuli koji se sastoje od amino-kiselina (66). Reč „protein“ opisuje organsko jedinjenje koje se sastoji primarno od amino-kiselina povezanih peptidnim vezama, a koje sadrže ugljenik, vodonik, kiseonik, azot i obično sumpor. Široko rasprostranjeni u biljnom i životinjskom svetu, proteini su osnovni sastojci protoplazme svih ćelija i esencijalni su za održavanje života (67).

Proteini u ljudskom organizmu imaju gradivne, funkcionalne i energetske uloge, pri čemu se najveća količina proteina koristi upravo kao gradivni materijal (66). Funkcionalne uloge proteina su u odbrani organizma (humoralni i celularni imunitet), transportu (transferin, lipoproteini), mišićnim kontrakcijama (aktin i miozin), izgradnji hormona (insulin, glukagon), održavanju acido-bazne ravnoteže (hemoglobin) i održavanju onkotskog pritiska (albumini).

Osnovni izvori proteina su životinjskog i biljnog porekla. U zavisnosti od izvora, sastav proteina se razlikuje (68). Redosled amino-kiselina u lancu predstavlja primarnu strukturu proteina. Razlike u proteinima potiču iz razlika u njihovoj primarnoj strukturi (69).

Često su proteinski lanci izuzetno dugački (više stotina ili hiljada monomera) i pre formiranja tercijarne trodimenzionalne strukture savijaju se u međufornacije - najčešće α -heliks ili β -ravan. Pomenute formacije su zapravo lokalne konformacije proteina, nastale zahvaljujući formiranju dodatnih veza (vodoničnih i disulfidnih) između prostorno bliskih molekula amino-kiselina i predstavljaju sekundarnu strukturu proteina.

Trodimenzijski oblik proteina predstavlja njegovu finalnu, tercijarnu strukturu, nastalu povezivanjem bočnih lanaca amino-kiselina kovalentnim vezama. Na osnovu tercijarne strukture proteina, izvedena je podela na fibrilarne (ispruženi, dugi polipeptidni lanci) i globularne proteine (uvijeni i gusto spakovani). Kvaternerna struktura proteina označava način povezivanja između više proteinskih jedinica. Na slici 5 su šematski prikazani različiti nivoi strukture proteina.



Slika 5. Šematski prikaz četiri nivoa strukture proteina. (preuzeto i prilagođeno sa <https://www.rcsb.org/structure>)

2.4.2. Proteini u vodenim rastvorima

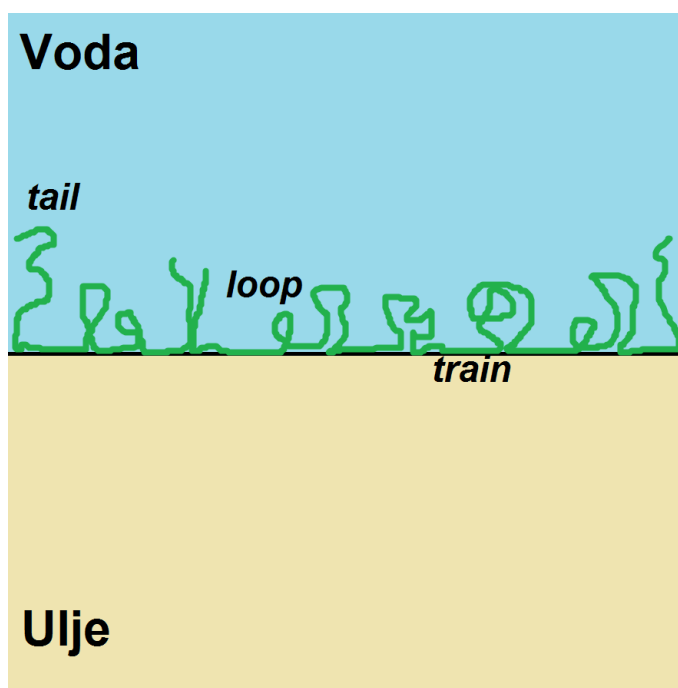
Kako je već naglašeno, proteini u svojoj strukturi imaju različite amino-kiseline, koje sadrže različite aktivne grupe, polarne i nepolarne. Polarne grupe mogu biti jonske i nejonske i pod određenim uslovima mogu da disosuju i obrazuju veliki broj elementarnih naelektrisanja. Molekuli proteina se pri tome ponašaju kao polielektroliti, i to amfoterni polielektroliti, jer se na istom molekulu nalaze i kisele i bazne grupe, nastale disocijacijom karboksilnih, odnosno amino grupa. Vodeni rastvori proteina obično imaju pH vrednosti koje su manje od 7, što ih čini slabim kiselinama (70). pH vrednost pri kojoj je broj pozitivno i negativno naelektrisanih grupa jednak, odnosno pri kome je ukupno naelektrisanje molekula jednako nuli, naziva se izoelektrična tačka. S obzirom na to da su rastvori naelektrisanih makromolekula viskozniji od nenaelektrisanih, proteini u izoelektričnoj tački pokazuju najniži viskozitet.

Rastvorljivost proteina u vodi zavisi prvenstveno od interakcije molekula vode sa molekulima proteina, odnosno u kojoj meri interakcija voda-protein preovladava nad interakcijom protein-protein (71,72). Faktori koji utiču na rastvorljivost proteina u vodi su (71):

- unutrašnji - molekulska masa proteina, sastav amino-kiselina i njihove površinske karakteristike i
- spoljašnji - pH vrednost, temperatura i prisustvo jonskih jedinjenja.

Rastvorljivost se smatra jednom od najvažnijih funkcionalnih osobina proteina jer može da utiče na teksturu, boju, emulgovanje, penjenje i senzorne karakteristike proizvoda sa proteinima. Za potrebe želiranja, emulgovanja ili penjenja, potrebno je da protein ima dobru rastvorljivost. Takvi proteini su izuzetno značajni sa aspekta tehnologije jer ulaze u sastav velikog broja proizvoda, prvenstveno farmaceutskih i prehrambenih. Proteini, zahvaljujući svojoj strukturi, poseduju i značajnu površinsku aktivnost, odnosno tendenciju ka adsorpciji na granicu faza (tečno – tečno, tečno – gas, tečno – čvrsto), te tako imaju značajnu ulogu u formiranju i stabilizaciji različitih disperznih sistema. Površinska aktivnost proteina i njihova sposobnost formiranja i stabilizacije disperznih sistema potiče od njihove strukture, tj. od prisustva hidrofilnih i hidrofobnih amino-kiselina.

Jedan od faktora kojim se procenjuje površinska aktivnost proteina jeste površinski napon, odnosno u kojoj meri proteini adsorbovani na granici faza snižavaju površinski napon između dve faze (73). Koliko će površinski napon biti snižen, zavisi na prvom mestu od vrste proteina (72). Proteini rastvorljivi u vodi se u velikoj meri nakupljaju na površini vodene faze (74). Prilikom adsorpcije dolazi do delimične denaturacije proteinskog molekula, koji se odvija i stvara *tail-loop-train* strukture koje mu omogućavaju bolje prijanjanje na granici faza, pa sposobnost adsorpcije zavisi od fleksibilnosti proteinskog molekula (75–78). *Train* su hidrofobni delovi proteina kojim se on vezuje na granicu faza, dok su *loop* i *tail* hidrofilni delovi okrenuti ka vodenoj fazi. Odnos ovih segmenata u lancu proteina određuje osobine adsorpcionog sloja, a time i stabilnost disperznih sistema (slika 6).



Slika 6. Šematski prikaz *train-loop-tail* modela proteina adsorbovanog na granici faza.

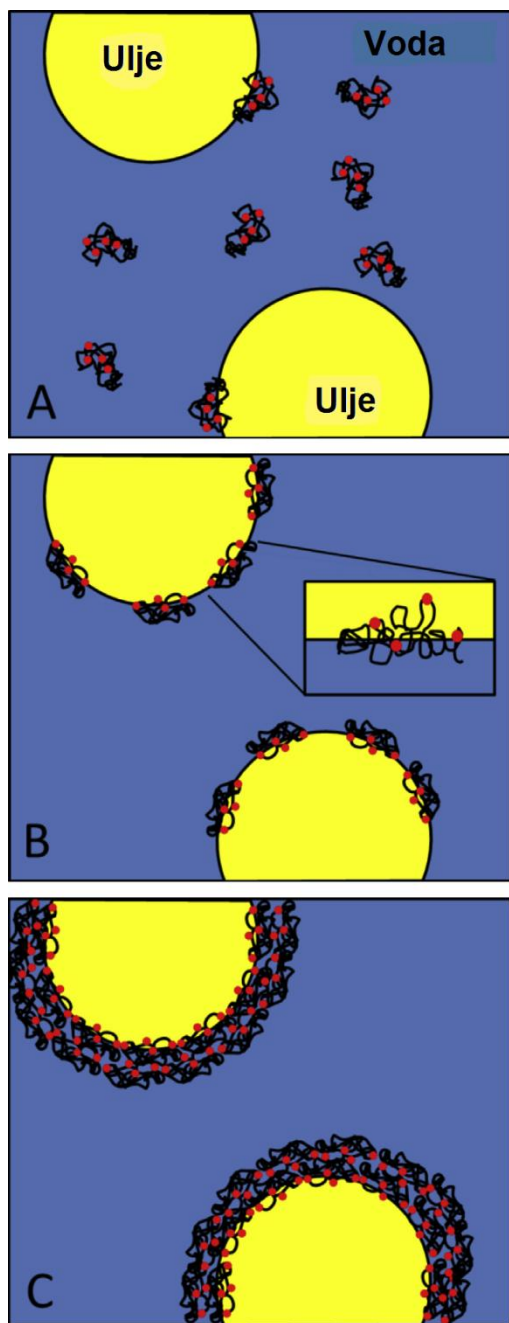
Da bi površinski aktivan molekul ujedno bio i dobar surfaktant, mora biti u stanju da snizi površinski ili međupovršinski napon između faza. Surfaktanti sa nižom molekularnom masom su efikasniji u tom pogledu u odnosu na teže molekule poput proteina, ali emulzije stabilizovane

proteinima su često stabilne duže u odnosu na emulzije stabilizovane niskomolekularnim surfaktantima (79). Pomenuta stabilnost zavisi od osobina međupovršinskog sloja kao što su pokrivenost površine, debljina sloja i površinsko naelektrisanje, što je funkcija karakteristika vodenog ratvora proteina kao što su pH, stepen jonizacije i eventualno prisustvo drugih komponenti (80).

2.4.3. Emulgujuće sposobnosti proteina

Emulzije se definišu kao disperzije dve ili više tečnosti koje se međusobno ne mešaju, a u kojima je jedna od tečnosti dispergovana u drugoj u vidu kapljica veličine od 0,1 do 100 μm . Najčešće emulzije u prehrambenoj industriji su tipa ulje u vodi, U/V (mleko, pavlaka, majonez), ili voda u ulju, V/U (margarin, puter). Kod specifičnih sistema za transport nutrijenata ili ciljanu isporuku lekovitih supstanci u organizmu (engl. *drug delivery*), emulzije mogu biti i komplikovanije - sistemi V/U/V ili U/V/U (81). Emulzije se formiraju uvođenjem mehaničke sile smicanja u mešavinu tečnosti - primenom homogenizatora, homogenizatora pod pritiskom ili putem specijalno dizajniranih prskalica, a sve u cilju dispergovanja kapljica jedne tečnosti u drugoj (82).

Nastanak emulzija ili njihova stabilizacija se takođe može postići uvođenjem emulgatora u mešavinu. Emulgator je površinski aktivna supstanca koja ima i hidrofobni i hidrofilni deo, adsorbuje se na površinu između ulja i vode i na taj način snižava površinski napon i omogućava mešanje dve tečnosti (79). Kada se proteinski molekuli nađu u mešavini ulja i vode, oni migriraju na površinu između faza i orijentišu se tako da hidrofilni delovi budu okrenuti ka vodenoj, a hidrofobni delovi ka uljanoj fazi. Proteini postavljeni na opisan način usporavaju flokulaciju i koalescenciju uljanih kapljica i produžavaju stabilnost emulzije (83). Zbog velike molekulske mase i voluminoznosti, može u izvesnoj meri doći do razmotavanja ili denaturisanja proteina. Sporo difunduju i sporije se postavljaju na granicu između faza u poređenju sa nekim manjim molekulima, ali jednom kad se proteini pozicioniraju, mogu da razviju snažan viskoelastični film koji je otporan na mehanički stres i omogućava elektrostatičku i sternu stabilizaciju emulzije (71,81). Slika 7 prikazuje migraciju proteina na površinu između faza, njihovu orijentaciju i stvaranje viskoelastičnog filma.



Slika 7. Šematski prikaz migracije globularnih proteina na površinu između ulja i vode (A), praćene orijentacijom (B) i formiranjem elastičnog filma (C). Crveni delovi u molekulima proteina predstavljaju njihove hidrofobne delove.

Preuzeto i prilagođeno iz: Lam RSH, Nickerson MT, Food proteins: a review on their emulsifying properties using a structure–function approach. Food Chem. 2013;141(2):975–84.

Fizičko-hemijske osobine proteina igraju značajnu ulogu u određivanju njihove sposobnosti emulgovanja. Na primer, veći nivo hidrofobnosti proteinskog molekula omogućava bolju adsorpciju na površinu kapljica ulja i samim tim bolje emulgovanje. Veće površinsko naelektrisanje povećava hidrofilnost proteinskog molekula i njegovu rastvorljivost u vodi, što je

važno kada je potrebno da protein brzo difunduje kroz vodenu fazu i brzo stigne do površine ulja (84,85).

Kada se viskoelastični film formira oko ulja, kapljice ulja obavijene proteinskim molekulima preuzimaju pozitivno ili negativno naelektrisanje, u zavisnosti od toga da li je pH emulzije ispod (preuzeće pozitivno naelektrisanje) ili iznad izoelektrične tačke proteina (preuzeće negativno naelektrisanje). Što je pH dalje od izoelektrične tačke, elektrostatičko odbijanje između kapljica ulja će biti jače i emulzija će biti stabilnija. Ukoliko je pH vrednost emulzije bliska izoelektričnoj tački, doći će do flokulacije i agregacije kapljica ulja, što posledično dovodi do koalescencije i odvajanja faza (86).

U zavisnosti od veličine, strukture i mogućnosti proteinskih molekula da obrazuju različite konformacije, njihovi pojedini delovi mogu učestvovati u sternoj stabilizaciji i na taj način fizički sprečiti ponovno povezivanje kapljica ulja. Prisustvo proteina u kontinualnoj fazi emulzije takođe povećava njen viskozitet i smanjuje pokretljivost i difuziju uljanih kapljica unutar emulzije, što je dodatni vid stabilizacije (81).

Danas postoji niz komponenata koje poseduju izrazitu površinsku aktivnost i formiraju stabilne filmove na granici faza i stabilizuju disperzne sisteme. Kada je u pitanju njihova primena u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, postoje određena ograničenja koja se uglavnom odnose na njihovo delovanje na ljudski organizam.

Trenutni trendovi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji vode ka tome da se umesto niskomolekularnih emulgatora i sintetskih polimernih stabilizatora koriste prirodni polimeri koji poseduju izrazitu biokompatibilnost. Dobar izbor mogu da predstavljaju prirodni polimeri, biopolimeri, gde spadaju proteini i ugljeni hidrati (87), ali modifikovani ugljeni hidrati (hemijski modifikovana celuloza, skrobovi) su aditivi, pa njihova zamena proteinima omogućava kreiranje tzv. „*clean label*“ (bez aditiva) proizvoda. Osim toga, proteini su digestibilni i biorazgradivi, što ih čini primamljivim kandidatima i širokim poljem na kom se trenutno obavljaju ispitivanja.

2.5. Čokolada

Tokom proteklih decenija, čokolada je postala jedan od najtraženijih prehrambenih proizvoda na svetu. Čokolada se prvenstveno upotrebljavala kao hrana i piće, a danas se koristi i kao funkcionalna hrana i dijetetski proizvod (17).

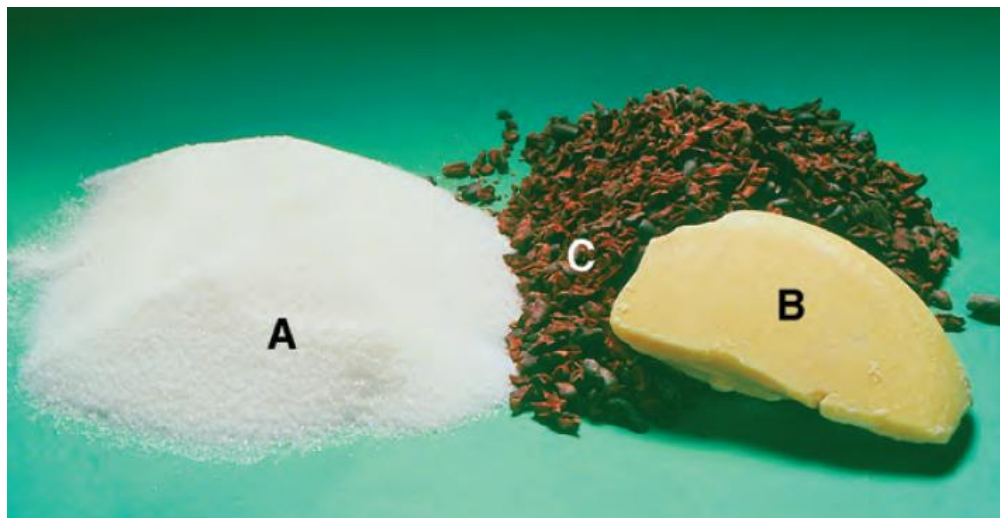
Čokolada se dobija iz kakao zrna sa drveta, kakaovca, *Theobroma cacao*, *Malvaceae*. Reč *Theobroma* je grčkog porekla i znači „hrana bogova“ (18). Kakaovac vodi poreklo iz Južne Amerike, a istorijski podaci govore o tome da je korišćen još pre 4000 godina. Prvi zapisi o plantažama kakaovca potiču oko 600. godine p.n.e. i gajile su ga Maje na poluostrvu Jukatan. Kasnije su ga uzgajali i Asteci i Inke, a u Evropu su zrna kakaa stigla posredstvom španskih osvajača u 16. veku (19).

2.5.1. Sastav čokolade

Čokolada je suspenzija čvrstih čestica, uglavnom šećera i kaka u masnoj fazi, kakao maslacu (16,88). Kakao maslac obavija čvrste čestice i pomaže njihovo uzajamno povezivanje, formirajući tako prostornu rešetku koja masu drži na okupu. U masi postoji i tečni deo masne faze, koji se nalazi unutar prostorne rešetke, vezuje se sa čvrstom frakcijom masti i time definiše reološke karakteristike sistema.

Prema Pravilniku o kakao i čokoladnim proizvodima namenjenim za ljudsku upotrebu (Sl. glasnik RS 24/2019), čokolada je proizvod dobijen od prerađenog kakao zrna i šećera, koji sadrži najmanje 35% ukupne suve materije kakao delova (25).

Osnovni delovi koji su neophodni za proizvodnju čokolade su obrađena kakao zrna, kakao maslac i šećer (slika 8) (17). U zavisnosti od vrste čokolade, odnos tri navedena sastojka varira, a dodaju se još i emulgatori (lecitini, PGPR - poliglicerol poliricinoleat), mleko, različiti dodaci poput orašastih plodova, voća, aroma.



Slika 8. Osnovni sastojci za proizvodnju čokolade, u sirovom stanju. A - šećer, B - kakao maslac, i C - obrađena kakao zrna.

(Preuzeto iz: Beckett, ST. Industrial chocolate manufacture and use. Oxford, UK: Blackwell, 1999.)

Kakao maslac je najskuplji sastojak čokolade. Ukupni sadržaj masti u kakao zrnu iznosi 48-49%, a zrelo zrno može da sadrži i do 700 mg kakao maslaca. Sastav kakao maslaca čine u najvećoj meri simetrični trigliceridi (preko 75%) (89):

- 2-oleodistearin (SOS),
- 2-oleopalmitostearin (POS) i
- 2-oleodipalmitat (POP).

Kakao maslac je polimorfna i monotropna mast, što znači da mast kristališe u više kristalnih oblika, od kojih je samo jedan stabilan, a ostali brže ili sporije prelaze u ovaj oblik. Polimorfni oblici kod kakao maslaca se obeležavaju rimskim brojevima od I (najnestabilniji oblik) do VI (najstabilniji oblik) (88).

Greške u proizvodnom procesu čokolade mogu dovesti do nekontrolisanog prelaska polimorfni oblika jedan u drugi, što dovodi do nepravilne kristalizacije, a to može da dovede do nepravilnosti u krajnjem proizvodu kao što su promena boje, sjaja, sivljenje čokolade (19), zatim

promene u strukturi (menja se lomljivost, osećaj žvakljivosti), pa čak i ukus (20,90–92). S obzirom na to da tekstura, izgled i ukus predstavljaju najvažnije osobine na osnovu kojih potrošači odlučuju da li će prihvatiti prehrambeni proizvod (20), veoma je važno da proizvod bude ispravno formulisan.

2.5.2. Zdravstveni aspekti konzumiranja čokolade

Hrana je izvor energije za ljudski organizam. Čokolada ima visoku energetska vrednost i sadrži tri grupe makronutrijenata - ugljene hidrate, proteine i masti, kao i neke vitamine i minerale (19).

Svakako da nutritivna vrednost i sastav čokolade zavise od načina proizvodnje čokolade, vrste upotrebljenog kakao zrna i količine kakao delova. U tabeli 3 su date prosečne nutritivne informacije za čokoladu koja sadrži 75-80% kakao delova (93,94). Navedeni su samo minerali čija količina prevazilazi 15% preporučenog dnevnog unosa. Osim navedenih, čokolada sadrži i druge vitamine i minerale u manjim količinama (kalcijum, selen, vitamin A, vitamin K, tiamin, riboflavin, niacin, vitamin B12, pantotensku kiselinu).

Čokolada sadrži polifenole, naročito flavanole (pogotovo katehine i proantocijane) (23,95). Polifenoli u zrnju kakaa ispoljavaju antioksidativno delovanje (95–97), zbog čega je korisno da čokolada koja se konzumira sadrži što veću količinu kakao delova (98).

Tabela 3. Nutritivne informacije za čokoladu koja sadrži 75-80% kakao delova.

Nutritivne informacije	Na 100 g	Referentni unos*
Energetska vrednost	599 kcal / 2508 kJ	30%
Ugljeni hidrati	45,8 g	18%
- od toga šećeri	24 g	27%
Proteini	7,8 g	15,6%
Masti	42,7 g	61%
- od toga zasićene masne kiseline	24,5 g	122,5%
Vlakna	10,9 g	
So	20 mg	< 1%
	Na 100 g	%NRV**
Kalijum	715 mg	36%
Fosfor	308 mg	44%
Magnezijum	228 mg	61%
Gvožđe	11,9 mg	85%
Cink	3,3 mg	33%
Bakar	1,8 mg	180%
Mangan	1,9 mg	95%

*Referentni unos za prosečnu odraslu osobu (8400 kJ / 2000 kcal)

NRV** = Nutritivna referentna vrednost (99)

Istraživanja su pokazala da flavanoli pozitivno deluju i na smanjenje otpora prilikom protoka kroz krvne sudove, kao i na regulisanje nivoa insulina u krvi (100). Smatra se da se smanjenje otpora postiže stimulacijom proizvodnje azot-monoksida (NO), kao i povećanjem njegove bioraspoloživosti, čime se poboljšava funkcija endotela krvnih sudova (98,101). Ispitivanjem polifenola izolovanih iz čokolade, dokazan je i njihov uticaj na inhibiciju agregacije trombocita (96,102).

Polifenoli izolovani iz čokolade i kakaa imaju pozitivan efekat na snižavanje nivoa LDL holesterola, i povećanje nivoa HDL holesterola, bez uticaja na prostaglandine (103–105).

Svi navedeni efekti polifenola doprinose i smanjenju ukupnog rizika od kardiovaskularnih oboljenja. Studije pokazuju da određene komponente kakaa mogu da imaju antihipertenzivni efekat, snize rizik od infarkta miokarda, šloga, i da smanje ukupni morbiditet i mortalitet povezan sa kardiovaskularnim oboljenjima (93,96,106,107).

Konsumiranje čokolade svakako nosi i određene rizike, od kojih je osnovni gojaznost. Iako preterana konzumacija čokolade može dovesti do gojaznosti, istraživanja pokazuju da gojazna deca i odrasli zapravo konzumiraju veće količine druge hrane u odnosu na čokoladu i imaju značajan manjak fizičke aktivnosti (19).

Ostala eventualna neželjena dejstva koja se odnose na konzumiranje čokolade su migrene usled sadržaja tiramina, histamina i feniletilamina (108). Vrlo mali broj ljudi je alergičan na proteine koji su sastavni deo kaka (19).

2.6. Funkcionalna hrana

Uloga hrane je obezbeđivanje potrebnih nutrijenata ljudskom organizmu. Tokom poslednjih godina, porastao je značaj uloge hrane povezane sa poboljšanjem zdravstvenog stanja ili prevencijom oboljenja. Hrana koja ima ovu ulogu se naziva funkcionalna hrana i pruža zdravstvenu korist koja prevazilazi tradicionalnu ulogu obezbeđivanja nutrijenata (22).

Izraz „funkcionalna hrana“ je u upotrebi više od tri decenije, a ideja o tome se prvi put javila u Japanu osamdesetih godina prošlog veka u vidu hrane za posebne zdravstvene namene (22). S obzirom na to da i danas funkcionalna hrana nije jasno definisana, različite organizacije iz različitih delova sveta imaju svoje radne definicije. Takođe, ne postoji ni jasno razgraničenje između konvencionalne i funkcionalne hrane. S jedne strane, postoji stav da je sva hrana funkcionalna, jer obezbeđuje potrebne materije za funkcionisanje organizma. S druge strane, postoji i shvatanje prema kom je funkcionalna hrana samo ona hrana koja je obogaćena ili poboljšana tako da obezbeđuje dodatne zdravstvene efekte (109).

Evropska komisija je dala radnu definiciju funkcionalne hrane kao rezultat projekta *European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe (FUFOSÉ)* u konsenzusnom dokumentu *Scientific Concepts of Functional Foods in Europe* koja glasi (110):

Hrana može da se smatra funkcionalnom ukoliko je dokazano da ima pozitivan učinak na jednu ili više ciljnih funkcija u telu, ne računajući uobičajene nutritivne efekte te hrane, a na način koji omogućava poboljšavanje zdravstvenog stanja i/ili smanjenje rizika od bolesti. Funkcionalna hrana mora ostati hrana po svojim svojstvima i ove pozitivne efekte mora ispoljavati u količinama u kojima se normalno konzumira. Funkcionalna hrana nisu tablete ili kapsule, nego je deo redovne ishrane.

Funkcionalna hrana može da bude uobičajena hrana, hrana u koju je dodata neka komponenta, ili hrana iz koje je neka komponenta odstranjena primenom tehnoloških ili biotehnoloških postupaka, kao i hrana u kojoj su osobine jedne ili više komponenata izmenjene. Funkcionalna hrana takođe može da bude hrana u kojoj je sastav sastojaka izmenjen kombinacijom bilo kojih od navedenih metoda. Funkcionalna hrana može da bude funkcionalna

za celu populaciju ili samo za određene populacione grupe, definisane uzrastom ili genetskom konstitucijom.

Kako bi se ostvarile moguće zdravstvene koristi unosom funkcionalne hrane, ona se najčešće primenjuje u oblasti rasta i razvoja (u ishrani trudnica, dojilja, odojčadi, dece i adolescenata), očuvanja zdravlja (održavanja telesne mase, mentalnih i fizičkih performansi, očuvanja fiziološke funkcije kardiovaskularnog i gastrointestinalnog sistema), i smanjenja rizika od hroničnih bolesti koje su posledica nepravilne ishrane (109).

Čokolada sa visokim sadržajem kakao delova se, zbog sadržaja polifenola poreklom iz kakao zrna, smatra funkcionalnom hranom (23,24).

Prema Pravilniku o kakao i čokoladnim proizvodima namenjenim za ljudsku upotrebu (Sl. glasnik RS 24/2019), čokolada je proizvod dobijen od prerađenog kakao zrna i šećera, koji sadrži najmanje 35% ukupne suve materije kakao delova (25). Veći sadržaj kaka u čokoladi znači i veći sadržaj polifenola, dok se dodatkom mleka ili šećera snižava sadržaj kaka, pa i polifenola u čokoladi (26,27).

Inkorporiranjem mikrokapsula ribljeg ulja u čokoladu bi se takođe dobila funkcionalna hrana. Finalnu formulaciju u planiranom istraživanju predstavljaju mikrokapsule ribljeg ulja inkorporirane u čokoladu sa najmanje 60% kakao delova.

3. CILJEVI I RADNE HIPOTEZE

3.1. Ciljevi istraživanja

1. Ispitati uticaj metode sušenja raspršivanjem na stabilnost preformulacije ribljeg ulja.
2. Utvrditi karakteristike mikrokapsula dobijenih sušenjem raspršivanjem (prinos i efikasnost mikrokapsulacije, oksidativnu stabilnost ulja, morfološke osobine i veličinu mikrokapsula).
3. Utvrditi uticaj veličine čestica na kristalizaciju u masnoj fazi suspenzije koja se koristi za izradu konditorskih proizvoda.
4. Utvrditi fizičko-hemijske karakteristike (teksturu, boju, reološke osobine) čokolade koja sadrži inkorporirane mikrokapsule ribljeg ulja u odnosu na čokoladu bez dodatka mikrokapsula.

3.2. Radne hipoteze istraživanja

1. Mikrokapsulacija ribljeg ulja primenom sušenja raspršivanjem daje stabilne preformulacije ribljeg ulja, adekvatnih veličina čestica.
2. Korišćenjem metode sušenja raspršivanjem dobijaju se optimalne osobine formulacije ribljeg ulja (prinos i efikasnost mikrokapsulacije, oksidativna stabilnost ulja, morfološke osobine i veličina mikrokapsula).
3. Veličina čestica utiče na proces kristalizacije u masnoj fazi suspenzije koja se koristi za izradu konditorskih proizvoda.
4. Čokolada sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja se po svojim fizičko-hemijskim karakteristikama ne razlikuje u odnosu na čokoladu bez inkorporiranih mikrokapsula.

4. MATERIJAL I METODE

Eksperimentalni rad je izveden u laboratorijama Katedre za farmaciju, Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, Univerziteta u Novom Sadu, Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, Univerziteta u Novom Sadu, Univerzitetskog centra za elektronsku mikroskopiju - Novi Sad, Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu i Instituta za prehrambene tehnologije, Univerziteta u Orhusu, Kraljevina Danska.

4.1. Materijal

U oglecima je korišćeno riblje ulje iz kapsula, proizvođača Pharmatech AS, Kraljevina Norveška, sa visokim sadržajem omega-3 masnih kiselina, dobijeno od kompanije Norway House d.o.o. Sastav jedne kapsule dat je u tabeli 4.

Tabela 4. Deklarisana količina aktivnih sastojaka u jednoj kapsuli proizvoda Norveške Omega-3 kapsule, odnosno 500 mg ribljeg ulja.

Aktivni sastojak	U 1 kapsuli (500 mg ribljeg ulja)
Omega-3 masne kiseline	325 mg
- od toga EPA	165 mg
- od toga DHA	110 mg
Vitamin E (DL- α -tokoferol)	5 mg α -tokoferol ekvivalenta
Vitamin A (retinil palmitat)	125 μ g
Vitamin D (holekalciferol)	10 μ g

Korišćeni proteini su protein soje, graška, surutke, krompira i pirinča. Njihove karakteristike su objedinjene u tabeli 5. Količina vlage u uzorcima je određena metodom propisanom u Pravilniku o metodama uzimanja uzoraka i vršenja hemijskih i fizičkih analiza

belančevinastih proizvoda za prehrambenu industriju (Sl. glasnik SFRJ, br. 41/1985). Količina proteina u uzorcima je određena metodom po Kjeldahlu, opisanom u istom Pravilniku (111).

Tabela 5. Karakteristike uzoraka proteina korišćenih u ogledima.

Izvor	Uzorak	Vlaga (%)	Proteini (%)	pH vrednost 1% rastvora
Soja	Izolat sojinog proteina	5,06	82,77	7,17
Grašak	Izolat proteina graška	7,13	76,17	7,10
Surutka	Koncentrat proteina surutke	5,21	74,82	6,92
Krompir	Izolat proteina krompira	5,79	83,11	6,60
Pirinač	Protein pirinča	6,03	80,99	6,50

Šećer, kakao i palmino ulje korišćeni za izradu suspenzija su dobijeni od kompanije AAK (Aarhus Karlshamn, Orhus, Kraljevina Danska). Kakao prah sa redukovanim sadržajem kakao maslaca je bio poreklom od proizvođača Barry Callebaut Cocoa AG sa sadržajem kakao maslaca od 10-12%. Sastav upotrebljenog ulja je detaljno opisan u Gregersen i sar. 2017 (91).

Upotrebljena čokolada je dobijena od kompanije Eugen Chocolate (Gložan, Republika Srbija). Čokolada je bila poreklom od proizvođača KONDIMA Engelhardt GmbH & Co KG, Nemačka, tip čokolade „Donau“ couverture 60/40/38, i sadržala je najmanje 60% kakao delova, 40% šećera i 38% masti.

Sve hemikalije korišćene u radu (NaOH, HCl, n-heksan, cikloheksan, izopropanol, hloroform, metanol, amonijum tiocijanat, gvožđe(II)-hlorid, vodonik peroksid, koncentrovana sumporna kiselina, natrijum tiosulfat, metilcrveno, bromkrezolzeleno, etanol, borna kiselina, fenolftalein) bile su p.a. čistoće. Svi rastvori pripremani su korišćenjem demineralizovane ili destilovane vode.

4.2. Metode rada

4.2.1. Karakterizacija proteina

Karakterizacija proteina je obuhvatala analizu aminokiselinskog sastava korišćenih proteina, analizu površinske hidrofobnosti i analizu rastvorljivosti proteina.

4.2.1.1. Analiza sastava amino-kiselina

Aminokiselinski sastav uzoraka je određen modifikovanom ISO 13903:2005 metodom. Uzorci su hidrolizovani uz pomoć 6,0 mol/L HCl u trajanju od 24 h na 110 °C u zatvorenoj posudi. Nakon hidrolize, amino-kiseline su razdvojene korišćenjem AminoPac PA10 (2 x 250 mm, Thermo Scientific™ Dionex™) analitičke kolone i njene odgovarajuće AminoPac PA10 (2 x 50 mm, Thermo Scientific™ Dionex™) pretkolone. Aminokiselinski profil proteina je određen sistemom jonske hromatografije (Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-5000) uz korišćenje elektrohemijskog detektora (Thermo Scientific, Nemačka). Amino-kiselina triptofan nije određivana.

4.2.1.2. Određivanje rastvorljivosti proteina

Pripremane su 1% (m/v) suspenzije proteina kojima je pH vrednost podešavana u rasponu od 2,0 – 10,0 koristeći 1,0 mol/L HCl i 1,0 mol/L NaOH. Suspenzije su potom mešane na sobnoj temperaturi (23 °C) u trajanju od 1 h, uz održavanje pH vrednosti. Nakon toga, suspenzije su centrifugirane na 7000 x g u vremenskom periodu od 30 minuta. Dobijeni supernatant je filtriran i nakon odgovarajućeg razblaženja određen je sadržaj proteina metodom po Lowry-ju (112). Kako bi se odredio ukupan sadržaj proteina, uzorci proteina su rastvarani u 0,1 M rastvoru NaOH. Rastvorljivost proteina je izražena kao odnos sadržaja proteina u supernatantu i ukupnog sadržaja proteina.

4.2.1.3. Određivanje površinske hidrofobnosti

Površinska hidrofobnost proteina je određivana koristeći fluorescentnu probu 1-anilino-8-naftalensulfonat (ANS). Sveže pripremljen ANS (u koncentraciji od 8 mM u destilovanoj vodi) je dodat u 4 mL rastvora svakog od ispitivanih proteina. Rastvori proteina su pripremljeni u seriji koncentracija od 0,0015% do 0,015% (w/v). Intenzitet fluorescencije je određivan spektrofotometrom (Agilent Cary Eclipse, Nemačka) na 23 °C. Talasne dužine ekscitacije i emisije su bile 390 i 484 nm, redom. Kao vrednosti indeksa površinske hidrofobnosti (H_0) su uzete vrednosti nagiba linearne krive intenziteta fluorescencije naspram koncentracije proteina.

4.2.2. Priprema rastvora proteina

Rastvori/suspencije proteina su pripremani na dve pH vrednosti - na nativnom pH proteina (oko pH 7,0; dato u tabeli 5) i na pH 9,0.

Rastvori/suspencije su pripremani odmeravanjem količine uzorka proteina koja sadrži 2,5 g proteina u odmerni sud, koji je potom dopunjavao destilovanom vodom do 250 mL, tako da finalna koncentracija rastvora/suspencije proteina bude 1% za svaki protein. Nakon toga je merena pH vrednost rastvora/suspencije svakog proteina koristeći prenosni pH-metar Hanna Instruments HI 99161. Dobijene pH vrednosti rastvora/suspencije proteina su prikazane u tabeli 5. Dobijeni rastvori/suspencije su zatim razblaživani tako da se za svaki protein dobije serija rastvora/suspencija raspona koncentracija od 0,001% do 1%.

Prilikom izrade rastvora/suspencija na pH 9,0, pH vrednost svakog rastvora je podešena koristeći rastvore NaOH i HCl koncentracija 0,1 mol/L.

4.2.3. Određivanje površinskog napona rastvora proteina

Površinski napon je meren na digitalnom tenziometru marke KRÜSS EasyDyneS K20/20023411, Hamburg, Nemačka, koristeći metod prstena po du Noüy. Dobijene vrednosti

površinskog napona su korigovane u skladu sa Harkins & Jordan metodom, integrisanom u uređaju (113). Merenja su rađena na temperaturi 25 °C, a zapremina rastvora proteina za merenje je iznosila 25 mL. Prilikom svakog merenja, prsten je prvo uronjen u rastvor proteina i ostavljen 10 minuta kako bi se površina uravnotežila. Svako merenje je ponavljano tri puta, pri čemu je za analizu uzeta srednja vrednost sva tri merenja. Površinski napon vode korišćene za pripremanje rastvora je bio 71,4 mN/m.

4.2.4. Određivanje viskoziteta rastvora proteina

Za određivanje viskoziteta rastvora proteina korišćen je kapilarni Ubbelohde viskozimetar marke SCHOTT i vremena isticanja vode od 286,49 s na 25 °C. Vreme isticanja, t (s), na temperaturi $25 \pm 0,1$ °C, određeno je kao srednja vrednost tri ponavljanja. Rezultati su izraženi kao relativni viskozitet, tj. odnos vremena isticanja rastvora i rastvarača.

4.2.5. Priprema emulzija

Pripremane su emulzije tipa ulje u vodi (U/V). Prethodno su napravljene rastvori/suspenzije proteina tako da sadrže 1%, 4% i 7% suve materije proteina u kontinualnoj (vodenoj) fazi koji su ostavljeni preko noći kako bi se što bolje suspendovali/rastvorili. Rastvori/suspenzije su pripremani na dve pH vrednosti - na prirodnom pH proteina i na pH 9,0, na način prethodno opisan pod tačkom 4.2.1.

Emulzije su zatim pripremane dodavanjem ribljeg ulja u rastvore proteina u količinama od 5%, 15% i 30% ulja. Homogenizacija emulzija je obavljena pomoću uređaja za dispergovanje T 25 digital ULTRA-TURRAX® (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Nemačka) na 10000 rpm tokom 10 minuta u ultrazvučnom kupatilu. Emulzijama je dodat i natrijum-azid u koncentraciji od 0,02% kao konzervans (114). Vrste i sadržaj proteina, količine ulja i pH vrednosti pripremljenih emulzija su prikazane u tabeli 6.

Tabela 6. Vrste i sadržaj proteina, količine ulja i pH vrednosti pripremljenih emulzija

Vrsta proteina	Sadržaj proteina u kontinualnoj fazi emulzije	Sadržaj ribljeg ulja u emulziji	pH vrednost emulzije
Izolat sojinog proteina	1%	15%	7,17
	4%	5%, 15% i 30%	7,17 i 9,0
	7%	15%	7,17
Izolat proteina graška	1%	15%	7,10
	4%	5%, 15% i 30%	7,10 i 9,0
	7%	15%	7,10
Koncentrat proteina surutke	1%	15%	6,92
	4%	5%, 15% i 30%	6,92 i 9,0
	7%	15%	6,92
Izolat proteina krompira	1%	15%	6,60
	4%	5%, 15% i 30%	6,60 i 9,0
	7%	15%	6,60
Protein pirinča*	4%	5%, 15% i 30%	6,50 i 9,0
	7%	15%	6,50

*Izrada emulzije sa 1% proteina pirinča u kontinualnoj fazi nije bila moguća, što je naknadno prikazano u poglavlju 5.2.1.

4.2.6. Određivanje veličine čestica emulzija

Raspodela veličina čestica emulzija je određivana metodom rasipanja svetla. Emulzije su nakon pripreme ostavljene 24 časa u frižideru kako bi se eliminisala mogućnost uklapanja mehurića vazduha. Pre svakog merenja, emulzije su izvađene iz frižidera i ostavljene na magnetnoj mešalici najmanje sat vremena ili do temperiranja na sobnu temperaturu.

Merenja su obavljena na uređaju Mastersizer (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Ujedinjeno Kraljevstvo). Svako merenje je ponovljeno tri puta, a kao rezultat je uzeta srednja vrednost sva tri merenja. Rezultati su analizirani u Malvern programu, a dobijena

raspodela veličine čestica (engl. *particle size distribution; PSD*) je opisana korišćenjem nekoliko parametara (115,116):

- $d_{3,2}$ - površinski srednji prečnik (engl. *surface weighted mean* ili *surface area mean diameter*),
- $d_{4,3}$ - zapreminski srednji prečnik (engl. *volume weighted mean*) ili srednji prečnik masenog momenta (engl. *mass moment mean diameter*),
- prečnici čestica - $d(0.5)$, $d(0.1)$ i $d(0.9)$, koji predstavljaju srednje masene prečnike zapreminske raspodele; izražavaju se u mikrometrima i ukazuju za vrednost $d(0.5)$ da je 50% uzorka manje od te vrednosti, za $d(0.1)$ da je 10% uzorka manje od te vrednosti, dok vrednost $d(0.9)$ označava da je 90% uzorka manje, a 10% veće od te vrednosti
- Span (raspon) - predstavlja širinu raspodele čestica; za čestice sa užom distribucijom, manja je i vrednost raspona. Vrednost span se računa pomoću izraza:

$$\text{Span} = \frac{d(0.9) - d(0.1)}{d(0.5)} \quad (1)$$

4.2.7. Određivanje stabilnosti emulzija

Nakon pripreme, emulzije su odmah prenete u menzure od 10 mL, zatvorene i ostavljene na sobnoj temperaturi tokom 7 dana. Tokom navedenog perioda je praćeno izdvajanje slojeva u emulzijama, odnosno pojava isplivavanja (kriming; engl. *creaming*). *Creaming* predstavlja jedan od najčešćih vidova nestabilnosti emulzija tipa U/V (48). Izražava se pomoću *creaming* indeksa, CI(%), koji se izračunava kao odnos visine donjeg sloja emulzije, tj. seruma (H_s) i ukupne visine emulzije u menzuri (H_e) (84):

$$\text{CI}(\%) = \frac{H_s}{H_e} \cdot 100 \quad (2)$$

4.2.8. Reološke karakteristike emulzija

Reološka ispitivanja su izvođena na HAAKE MARS reometru (Thermo Scientific, Karlsruhe, Nemačka) koji je povezan sa termostatom radi održavanja temperature. Sva merenja su rađena pomoću cilindra DG41 Ti na temperaturi $25 \pm 0,1$ °C. Krive proticanja određene su merenjem histerezisnih petlji u opsegu brzine smicanja od 0 do 100 s^{-1} . Pri tome je brzina smicanja povećavana od $0,005$ do 100 s^{-1} , zatim je održavana na maksimalnoj brzini od 100 s^{-1} , nakon čega je ponovo smanjena na 0 s^{-1} . Eksperimentalni podaci su fitovani stepenim zakonom:

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad (3)$$

gde K predstavlja merilo konzistencije sistema, a n indeks nenjutnovskog ponašanja.

4.2.9. Izrada mikrokapsula

Prvi korak u izradi mikrokapsula bila je priprema emulzija ulja u vodi (U/V). Najpre su napravljene 4% rastvori/suspenzije proteina računato na sadržaj suve materije i sadržaj proteina. Nakon toga je dodavano 1,134 g smeše ulja i emulgatora – sojinog lecitina (1 g ribljeg ulja + 0,134 g sojinog lecitina) u prethodno napravljene rastvore/suspenzije proteina i emulzije su pripremane uz pomoć uređaja za dispergovanje T 25 digital ULTRA-TURRAX® (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Nemačka) na 10000 rpm tokom 10 minuta u ultrazvučnom kupatilu. Krajnja masa emulzija bila je 100 g.

Za dobijanje mikrokapsula je primenjen *spray drying* postupak mikrokapsulacije, odnosno raspršivanje emulzije u struji toplog vazduha uz pomoć uređaja Nano Spray Dryer B-90 (BÜCHI Labortechnik AG, Švajcarska). Optimalni uslovi sušenja su utvrđeni na osnovu prethodnih ispitivanja. Tokom sušenja su praćeni i po potrebi regulisani parametri poput protoka vazduha (110 L/min), pritiska (43 mbar) i protoka emulzije (jačina pumpe – 1). Ulazna temperatura emulzije iznosila je 110 °C a izlazna 45 °C.

4.2.10. Ispitivanje morfoloških osobina i veličine mikrokapsula

Morfologija mikrokapsula i njihova veličina ispitivane su pomoću elektronskog mikroskopa (engl. *Scanning electron microscope; SEM*) JSM-6460LV (JEOL Ltd., Japan).

Uzorci mikrokapsula u formi praška su postavljeni na nosač, a zatim prevučeni slojem zlata u procesu koji se naziva „spaterovanje“ (bombardovanje uzorka česticama zlata u vidu plazme) koristeći aparat za pripremu uzorka Sputter Coater SC 005 (Bal-Tec GmbH, Schalksmühle, Nemačka), pri jačini od 30 mA, tokom 90 sekundi, na razdaljini od 5 cm.

Tako pripremljeni uzorci su snimani pod različitim uvećanjima, prilikom čega je određena i veličina mikrokapsula.

4.2.11. Određivanje prinosa i efikasnosti mikrokapsulacije

Prinos mikrokapsulacije određen je kao odnos mase mikrokapsula sakupljenih na kraju procesa sušenja raspršivanjem u odnosu na masu omotača i jezgra mikrokapsula (proteina i ribljeg ulja).

Kako bi se odredila efikasnost mikrokapsulacije, odnosno količina inkapsuliranog ulja, korišćena je metoda opisana u Tonon, Grosso i Hubinger, 2011, uz izvesne korekcije (44).

Masa uzorka mikrokapsula od 1 g je stavljena u epruvetu i mešana na vorteksu sa 10 mL petroletra tokom 2 minuta na sobnoj temperaturi. Dobijeni rastvor je profiltriran kroz kvantitativni filter papir (CHMLAB, grade F2042), a prah koji je zaostao na filter hartiji je ispran još tri puta sa po 10 mL petroletra (114,117), svaki put profiltriran i filtrati su sakupljeni i spojeni.

Filtrat je potom prenet u čistu flašu za uparavanje kojoj je prethodno izmerena masa, i uzorak je uparen do suva na 60 °C (do konstantne mase). Masa ulja je dobijena iz razlike flaše sa uljem i čiste flaše (114).

Efikasnost mikrokapsulacije je određena iz odnosa ukupne mase ulja korišćene za mikrokapsulaciju (engl. *total oil*; *TO*) i površinskog ulja (engl. *surface oil*; *SO*), čija je masa dobijena iz prethodno objašnjenog postupka:

$$\text{Efikasnost mikrokapsulacije} = \frac{TO - SO}{TO} \cdot 100 \quad (4)$$

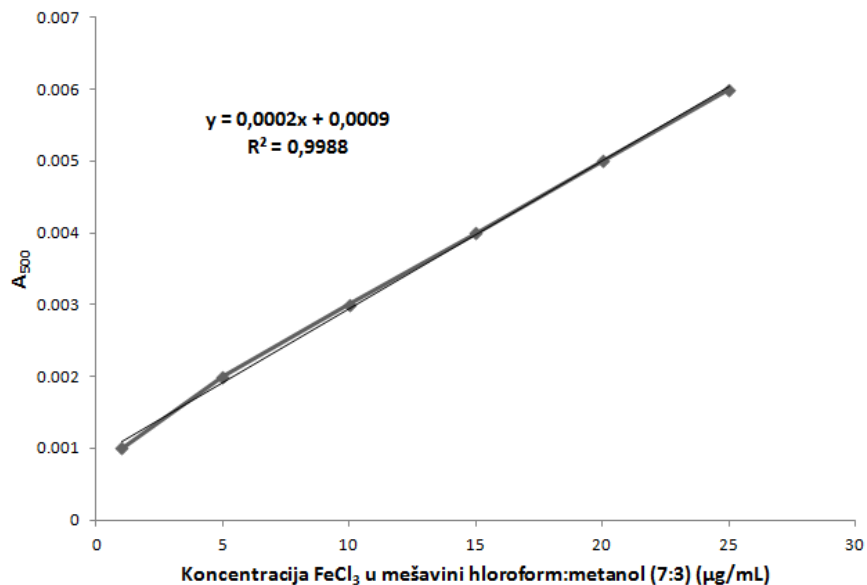
4.2.12. Određivanje oksidativne stabilnosti ulja inkorporiranog u mikrokapsule

Oksidativna stabilnost ulja je dobijena određivanjem peroksidne vrednosti ulja, na način opisan u Tonon, Grosso i Hubinger, 2011, uz izvesne modifikacije (44).

Kako bi se ekstrahovalo ulje iz mikrokapsula (118), 0,5 g uzorka mikrokapsula je suspendovano u epruveti u 5 mL destilovane vode i mućkano na vorteksu do potpunog dispergovanja (oko 2 minuta). Zatim je 900 μL rastvora pomešano u epruveti sa 4,5 mL mešavine cikloheksan:izopropanol (2:1). Razdvajanje faza je postignuto centrifugiranjem tokom 4 minuta na 1000 g i gornji sloj je uzet za analizu.

Određivanje peroksidne vrednosti ulja je obavljeno spektrofotometrijski (118,119). Zapremina uzorka od 600 μL je pomešana sa 2,8 mL mešavine hloroform:metanol (7:3). Za razvijanje boje je dodato 30 μL rastvora amonijum tiocijanat/gvožđe(II)-hlorid (119), uzorak je kratko izmešan na vorteksu, ostavljen 20 minuta u mraku da izreaguje i merena je apsorbance na 500 nm.

Za izradu kalibracione krive korišćen je rastvor gvožđe(III)-hlorida u mešavini hloroform:metanol (7:3), razblaživan tako da postoji linearna zavisnost apsorbance od koncentracije gvožđe(III)-hlorida. Dobijena kalibraciona kriva je prikazana na grafiku 1.



Grafik 1. Kalibracioni dijagram FeCl_3 u mešavini hloroform:metanol (7:3)

Peroksidna vrednost ulja (izražena u miliekvivalentima peroksida po kilogramu uzorka) je računata po sledećoj formuli (120):

$$\text{Peroksidna vrednost ulja} = \frac{(A_u - A_{sp}) \cdot m}{55,84 \cdot m_0 \cdot 2} \quad (5)$$

gde je A_u - apsorbanca uzorka, A_{sp} - apsorbanca slepe probe, m - nagib prave (u ovom slučaju, m iznosi 0,0002), m_0 - masa uzorka u gramima, a 55,84 je atomska masa gvožđa. Deljenjem sa 2 se postiže izražavanje rezultata u miliekvivalentima peroksida umesto u miliekvivalentima kiseonika.

4.2.13. Priprema modela čokolade

Čokolada predstavlja suspenziju čvrstih čestica (uglavnom šećera i kaka) u masnoj fazi (16,18). Osnovna vrsta masne faze koja se koristi za proizvodnju čokolade i čokoladnih proizvoda je kakao maslac, ali danas se u proizvodnji čokolade i čokoladnih proizvoda, kao i u

proizvodima sličnim čokoladi koriste različite zamene (zbog cene, tehnološkog procesa proizvodnje, itd), a jedna od najčešćih je biljno ulje (18). Zbog navedenog je pre ispitivanja na čokoladi prvo pripremljen model sistem čokolade koji se sastojao od kakao praha i šećera suspendovanih u biljnom ulju, kako bi se ispitaio uticaj različitih veličina čvrstih čestica na kristalizaciju masti i ulja.

4.2.13.1. Određivanje veličine čestica kakao praha i šećera

Uzorci su pripremljeni tako što je beli šećer samleven do veličine čestica od 20 do 45 μm . Šećer i kakao prah su prosejani kroz sita sa različitim veličinama otvora do postizanja zadovoljavajućih $d(0.1)$ i $d(0.9)$ vrednosti dobijenih merenjem veličine čestica. Veličina čestica je izmerena metodom rasipanja svetla na uređaju Mastersizer (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo). Svako merenje je ponovljeno tri puta, a kao rezultat je uzeta srednja vrednost sva tri merenja. Veličine čestica su prikazane u tabeli 7.

Tabela 7. Raspodela veličine čestica šećera i kakao praha sa referentnim $d(0.1)$, $d(0.5)$ i $d(0.9)$ vrednostima dobijenim metodom rasipanja svetla.

Vrsta čestica	Raspodela veličine čestica	$d_{(v)}$ u μm		
		$d(0.1)$	$d(0.5)$	$d(0.9)$
Šećer	20-25 μm	20,026 \pm 1,01	22,299 \pm 0,78	25,075 \pm 0,93
	26-38 μm	26,006 \pm 1,30	32,400 \pm 1,09	38,085 \pm 1,29
	39-45 μm	38,968 \pm 1,56	41,215 \pm 1,64	44,959 \pm 1,55
Kakao prah	25-38 μm	25,449 \pm 1,14	32,847 \pm 1,31	38,073 \pm 1,98
	39-45 μm	39,056 \pm 1,17	40,586 \pm 2,02	45,015 \pm 1,97
	46-106 μm	46,005 \pm 1,27	62,431 \pm 2,18	105,998 \pm 3,17

4.2.13.2. Priprema mešavine čvrstih čestica u ulju

Pripremljeno je 10 modela čokolade mešanjem šećera i kakao praha sa uljem. Svaka mešavina je dobijena mešanjem 35% (w/w) čvrstih čestica sa palminim uljem, do konačne mase uzoraka od 500 g. Uzorci su sadržali samo šećer, samo kakao prah ili mešavinu šećera i kakao praha u istim količinama. Sastav uzoraka je prikazan u tabeli 8.

Tabela 8. Sastav pripremljenih uzoraka koji su činili model čokolade.

Naziv uzorka	Disperzna, tečna faza	Vrsta i veličina čvrstih čestica
ULJE	Palmino ulje	/
Š1	Palmino ulje	šećer 20-25 μm
Š2	Palmino ulje	šećer 26-38 μm
Š3	Palmino ulje	šećer 39-45 μm
K1	Palmino ulje	kakao prah 25-38 μm
K2	Palmino ulje	kakao prah 39-45 μm
K3	Palmino ulje	kakao prah 46-106 μm
ŠK1	Palmino ulje	šećer 20-25 μm i kakao prah 25-38 μm
ŠK2	Palmino ulje	šećer 26-38 μm i kakao prah 39-45 μm
ŠK3	Palmino ulje	šećer 39-45 μm i kakao prah 46-106 μm

Prilikom pripreme uzoraka, ulje je prvo temperirano na vodenom kupatilu na 80 °C, a zatim sušeno na niskom pritisku tokom sat vremena u cilju eliminisanja eventualno zaostale vode. Nakon toga su u ulje dodati šećer i/ili kakao prah u prethodno opisanim količinama i takve mešavine su ostavljene na mešalici na temperaturi od 65 °C u zatvorenim sudovima tokom noći u cilju dobijanja homogenih uzoraka.

4.2.14. Analiza teksturnih karakteristika modela čokolade

Za teksturnu analizu, tečni uzorci su sipani u plastične čašice i hlađeni na vodenom kupatilu od 65 °C do 20 °C brzinom od 0,5 °C/min, a zatim čuvani na 20 °C tokom 7 dana. Uzorcima je merena čvrstoća nakon 24 časa i nakon 7 dana određivanjem maksimalne sile penetracije. Za ovo merenje korišćen je teksturometar TMS-PRO (Food Technology Corporation) uz sledeće radne uslove:

- dubina uzorka: 15 mm
- dubina penetracije: 4 mm
- pribor: igla PN2
- brzina penetracije: 30 mm/min

Merena je maksimalna jačina sile potrebne za penetraciju. Analizirano je po 6 uzoraka za svaku mešavinu, uz 5 različitih mesta penetracije na uzorcima.

4.2.15. Reološke karakteristike modela čokolade

Reološka merenja izvedena su na rotacionom viskozimetru AR G2 Rheometer (TA Instrument, New Castle, DE 19720, Sjedinjene Američke Države; SAD) koristeći pribor za želatinizaciju skroba (engl. *starch pasting cell*; *SPC*). Merenje deformacije je obavljeno pri konstantnoj frekvenciji od 1 Hz i naponu smicanja od 0,3% tokom hlađenja uzoraka sa 65 °C na 20 °C brzinom od 0,5 °C/min. Vrednost napona smicanja je uzeta kao sredina prethodno određenog linearnog viskoelastičnog regiona (LVR). LVR je određen na 65 °C pri frekvenciji od 1 Hz. Merenje svakog uzorka je ponavljano tri puta. Temperaturna vrednost pri kojoj vrednost modula G' značajno raste je uzeta kao početna tačka kristalizacije uzoraka.

4.2.16. Određivanje sadržaja čvrste masti u modelu čokolade

Sadržaj čvrstih masti (engl. *solid fat content; SFC*) je određen primenom pulsne nuklearne magnetne rezonance (pNMR) na aparatu Bruker Minispec SFC analyzer (SAD) koristeći direktnu metodu određivanja. Uzorci u tečnom stanju su prebačeni u epruvete, hlađeni u vodenom kupatilu sa 65 °C na 20 °C brzinom od 0,5 °C/min i ostavljeni na 20 °C tokom 7 dana pre analize. Svaki uzorak je analiziran tri puta, a rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tih merenja.

4.2.17. Analiza mikrostrukture modela čokolade

Za analizu mikrostrukture mreže kristala formirane u uzorcima nakon hlađena korišćena je konfokalna mikroskopija primenom aparata marke Nikon C2 (Nikon Instrument Inc, Tokyo, Japan). Uzorci su bojani koristeći Nile red (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i rodamin (Avanti Polar Lipids Inc, AL, SAD) za bojenje tečne frakcije ulja i kakao praha, redom. Boja Nile red je prethodno rastvorena u acetonu do koncentracije od 0,005 mg/mL, a rodamin je rastvoren u hloroformu do koncentracije 0,01 mg/mL.

Rastvori boja su naneti na predmetna stakla i ostavljeni dok rastvarači nisu isparili, nakon čega su dodati prethodno pripremljeni uzorci u tečnom stanju. Predmetna stakla sa uzorcima su zapečaćena u staklenim kutijicama i ohlađena u vodenom kupatilu sa 65 °C na 20 °C brzinom od 0,5 °C/min i ostavljena na 20 °C tokom 24 časa pre analize.

Za ekscitaciju i indukovanje fluorescencije su korišćeni argonski laser na 488 nm i HeNe laser na 561 nm. Brzina snimanja je iznosila 400 Hz pri rezoluciji od 8 bita (121,122).

4.2.18. Inkorporiranje mikrokapsula ribljeg ulja u čokoladu

Uzorci čokolade sa mikrokapsulama ribljeg ulja su pripremljeni tako što je čokolada prvo temperirana u zatvorenim staklenim posudama u termostatu na 50 °C. U tako otopljenu čokoladu su dodate mikrokapsule. Otopljeni uzorci su zatim preneti u kalupe dimenzija 7,5 cm x 2,5 cm x 0,6 cm i nakon toga temperirani. Ohlađeni uzorci su potom pakovani u aluminijsku foliju, a krajnja masa pojedinačnog uzorka je iznosila 15 g.

Količina inkorporiranih mikrokapsula je bila ona koja odgovara sadržaju od 40 mg EPA+DHA, odnosno 80 mg EPA+DHA, za svaki od korišćenih proteina kao omotača. Ove količine mikrokapsula su određene tako da gotov uzorak može da nosi odgovarajuće nutritivne izjave (35):

„Izvor omega-3 masnih kiselina“ - Izjava se može navoditi samo ako proizvod sadrži najmanje 0,3 g alfa-linolenske kiseline na 100 g i na 100 kcal ili najmanje 40 mg zbirne količine eikozapentaenske i dokozaheksaenske kiseline na 100 g i na 100 kcal.

„Bogata omega-3 masnim kiselinama“ - Izjava se može navoditi samo ako proizvod sadrži najmanje 0,6 g alfa-linolenske kiseline na 100 g i na 100 kcal ili najmanje 80 mg zbirne količine eikozapentaenske i dokozaheksaenske kiseline na 100 g i na 100 kcal.

Kontrolni uzorak je pripremljen na isti način, bez dodatka mikrokapsula.

4.2.19. Određivanje reoloških karakteristika čokolade sa mikrokapsulama ribljeg ulja

Reološka merenja su izvođena na reometru HAAKE MARS (Thermo Scientific, Karlsruhe, Nemačka) na 40 °C, primenom mernog pribora cilindar Z20 DIN (prečnik rotirajućeg senzora $d = 20$ mm, a unutrašnjeg prečnika posude $D = 21,7$ mm, rastojanje između rotirajućeg senzora i nerotirajuće posude 4,2 mm)

Ispitivanje tiksotropnosti sistema rađeno je pomoću histerezisnog postupka (praćenje zavisnosti τ – napona smicanja od $\dot{\gamma}$ – brzine smicanja). Prema IOCCC metodi (123), brzina smicanja je prvo povećavana od 2 do 50 s⁻¹ u trajanju od 180 s, zatim je maksimalna brzina

smicanja od 50 s^{-1} održavana 60 s i nakon toga je smanjivana od 50 do 2 s^{-1} takođe u trajanju od 180 s. Krive proticanja su fitovane prema Kasonovom modelu (engl. *Casson's model*) (124):

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_{CA}} + \sqrt{\eta_{CA}\dot{\gamma}} \quad (6)$$

gde je τ - napon smicanja, τ_{CA} - Kasonov prinosni napon, η_{CA} - Kasonov plastični viskozitet i $\dot{\gamma}$ - brzina smicanja.

Kasonov model je uobičajeni model za fitovanje krivih kod merenja koja se izvode na čokoladi i pomoću njega je moguće definisati dve jasne vrednosti:

- Kasonov prinosni napon (engl. *yield stress*) - početna sila koja je potrebna da bi uzorak uopšte počeo da teče, i
- Kasonov plastični viskozitet - mera viskoziteta sistema koji se posmatra. Zavisi od zapremine i oblika prisutnih čvrstih čestica, distribucije veličine čvrstih čestica, u kojoj meri su prekrivene masnom fazom, i od viskoziteta kontinualne faze (125).

Sledeće reološko ispitivanje koje je rađeno je merenje viskoziteta u tri koraka (engl. *three step viscosity measurements*), čime se simuliraju različite brzine smicanja kojima je uzorak podvrgnut u procesu proizvodnje. Ovo merenje daje informacije o prividnom viskozitetu sistema. Izvođeno je na $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$, na tri brzine:

- $25,0 \text{ s}^{-1}$ u trajanju od 60 s,
- $7,0 \text{ s}^{-1}$ u trajanju od 60 s, i
- $0,54 \text{ s}^{-1}$ u trajanju od 60 s.

Krive oporavka viskoziteta sistema su određivane na $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$, izlaganjem uzorka brzini od 1 s^{-1} u trajanju od 120 s, zatim brzini od 300 s^{-1} u trajanju od 60 s, i na kraju brzini od 1 s^{-1} u trajanju od 180 s. Vrednosti oporavka sistema su računane kao odnos srednjih vrednosti

prividnog viskoziteta η_a dobijenog tokom prvih 120 sekundi poslednjeg dela merenja i prividnog viskoziteta η_a dobijenog tokom prvog dela merenja.

4.2.20. Određivanje teksturnih karakteristika čokolade sa mikrokapsulama ribljeg ulja

Teksturne karakteristike određivane su na teksturometru TA.XTplus Texture Analyser (Stable Micro Systems, UK). Čvrstoća ispitivanih uzoraka je određivana primenom pribora za ispitivanje lomljivosti, odnosno čvrstoće (engl. *three-point bend rig* (HDP/3 PB)), a korišćenjem merne ćelije od 5 kg, Gornji deo pokretnog konusnog pribora je prethodno kalibrisan na visinu od 55 mm iznad osnove statičnog dela pribora za određivanje čvrstoće. Brzina kretanja gornjeg dela mernog pribora je bila 3 mm/s. Teksturna merenja su rađena na temperaturi od 20 °C, u šest ponavljanja.

U analizi rezultata su korišćene dobijene srednje vrednosti za čvrstoću (maksimalna upotrebljena sila prilikom lomljenja) i lomljivost (maksimalna pređena razdaljina do trenutka pucanja).

4.2.21. Određivanje boje čokolade sa mikrokapsulama ribljeg ulja

Merenja boje određivana su u šest ponavljanja korišćenjem kolorimetra Minolta Chroma Meter CR-400 (Sensing Inc., Japan) (8 mm Ø kontaktna površina). Instrument je kalibrisan korišćenjem belog standarda, a merenja su izvedena pri standardnom D65 iluminantu. Dobijeni rezultati su prikazi u CIE L^* , a^* i b^* sistemu.

4.2.22. Statistička obrada podataka

Rezultati svih dobijenih parametara za svaku vrstu ispitivanja su obrađeni testiranjem razlike između dobijenih vrednosti primenom jednofaktorske analize varijanse (ANOVA). Da bi

se utvrdilo postojanje statističke značajnosti, primenjen je post-hoc Taki test (engl. *Tukey HSD*) na nivou statističke značajnosti od 95% (0,05).

Za obradu podataka su korišćeni programi OriginPro 8 i SigmaPlot 13 (Systat Software Inc).

Svi dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Određivanje karakteristika proteina i njihovih rastvora

Prva faza ispitivanja je obuhvatala ispitivanje osobina upotrebljenih proteina i njihovih rastvora. Proteini su korišćeni kao omotači mikrokapsula.

5.1.1. Aminokiselinski sastav

Amino-kiseline se međusobno strukturno razlikuju zahvaljujući svojim bočnim lancima, koji im daju osobine poput različitih naelektrisanja i polarnosti. Tako je iz sastava amino-kiselina moguće proceniti i relativnu hidrofobnost proteina (126). Hidrofobnost proteina utiče na njihovu rastvorljivost u vodi. Hidrofobne amino-kiseline se uglavnom „pakuju“ u unutrašnjost proteina, dok su polarne okrenute ka spoljašnjosti. Prilikom kontakta proteina sa različitim rastvaračima, ili pozicioniranjem proteina na granici između dve faze, može doći do njegovog razmotavanja, odnosno izmene pozicije hidrofobnih i hidrofilnih amino-kiselina, što dovodi do izmena u njegovoj površinskoj hidrofobnosti. Aminokiselinski sastav svih korišćenih proteina dat je u tabeli 9.

Računanjem odnosa hidrofobnih i hidrofilnih amino-kiselina u proteinima korišćenim u ovom radu, utvrđeno je da najveću hidrofobnost ima izolat proteina krompira, zatim slede protein pirinča, izolat proteina graška, koncentrat proteina surutke, i na kraju izolat sojinog proteina, kao najmanje hidrofoban, odnosno najpolarniji (tabela 9).

Tabela 9. Aminokiselinski sastav svih korišćenih proteina.

Amino-kiselina (%)	Izolat sojinog proteina	Izolat proteina graška	Koncentrat proteina surutke	Izolat proteina krompira	Protein pirinča	Zahtev za sadržaj amino-kiselina u proteinu za odrasle*
L-Lizin	5,39 ± 1,078	5,70 ± 1,140	6,65 ± 1,330	6,30 ± 1,260	2,94 ± 0,588	4,5
L-Alanin	3,45 ± 0,690	3,10 ± 0,620	3,47 ± 0,694	4,81 ± 0,962	4,27 ± 0,854	
L-Treonin	3,23 ± 0,646	2,76 ± 0,552	5,01 ± 1,002	5,66 ± 1,132	2,98 ± 0,596	2,3
L-Glicin	3,45 ± 0,690	2,98 ± 0,596	1,26 ± 0,252	3,42 ± 0,684	3,36 ± 0,672	
L-Valin	3,26 ± 0,652	3,52 ± 0,704	4,10 ± 0,820	3,86 ± 0,772	4,57 ± 0,914	3,9
L-Serin	4,68 ± 0,936	3,89 ± 0,778	3,61 ± 0,722	4,48 ± 0,896	4,02 ± 0,804	
L-Prolin	4,12 ± 0,824	2,96 ± 0,592	4,14 ± 0,828	3,37 ± 0,674	3,31 ± 0,662	
L-Izoleucin	3,20 ± 0,640	3,41 ± 0,682	4,56 ± 0,912	3,59 ± 0,718	3,28 ± 0,656	3,0
L-Leucin	6,37 ± 1,274	5,96 ± 1,192	7,38 ± 1,476	8,34 ± 1,668	6,51 ± 1,302	5,9
L-Metionin	1,93 ± 0,386	1,25 ± 0,250	2,36 ± 0,472	3,67 ± 0,734	3,31 ± 0,662	1,6
L-Histidin	2,06 ± 0,412	1,72 ± 0,344	1,16 ± 0,232	1,43 ± 0,286	1,69 ± 0,338	1,5
L-Fenilalanin	4,38 ± 0,876	4,10 ± 0,820	2,52 ± 0,504	4,78 ± 0,956	4,36 ± 0,872	
L-Glutamat	15,51 ± 3,100	11,81 ± 2,36	11,61 ± 2,320	8,93 ± 1,786	12,67 ± 2,53	
L-Aspartat	9,50 ± 1,900	8,47 ± 1,694	7,59 ± 1,518	9,39 ± 1,878	6,96 ± 1,392	
L-Cistin	1,31 ± 0,262	0,81 ± 0,162	2,17 ± 0,434	0,45 ± 0,090	1,64 ± 0,328	0,6
L-Tirozin	2,87 ± 0,574	2,62 ± 0,524	1,86 ± 0,372	5,05 ± 1,010	3,78 ± 0,756	
L-Arginin	5,66 ± 1,132	6,00 ± 1,200	2,50 ± 0,500	3,10 ± 0,620	5,32 ± 1,064	
Ukupne amino-kiseline sa sumporom (metionin i cistin)	3,24	2,06	4,53	4,12	4,95	2,2

Ukupne aromatične amino-kiseline (fenilalanin i tirozin)	7,25	6,72	4,38	9,83	8,14	3,0
Ukupne hidrofobne amino-kiseline	30,16	27,28	29,79	35,84	32,97	
Ukupne hidrofilne amino-kiseline	27,60	21,89	24,26	24,57	25,09	
Odnos hidrofobnih i hidrofilnih aminokiselina	1,09	1,25	1,23	1,46	1,31	
Ukupne esencijalne amino-kiseline**	34	31,85	37,77	43,13	35,06	27,1
Ukupne neesencijalne amino-kiseline	46,37	39,21	34,18	37,5	39,91	
E/T (%)***	42,3	44,82	52,49	53,49	46,76	

*Podaci iz Izveštaja WHO/FAO/UNU o zahtevima za proteine i amino-kiseline (127)

**Ukupne esencijalne amino-kiseline bez triptofana

***Odnos esencijalnih i ukupnih amino-kiselina

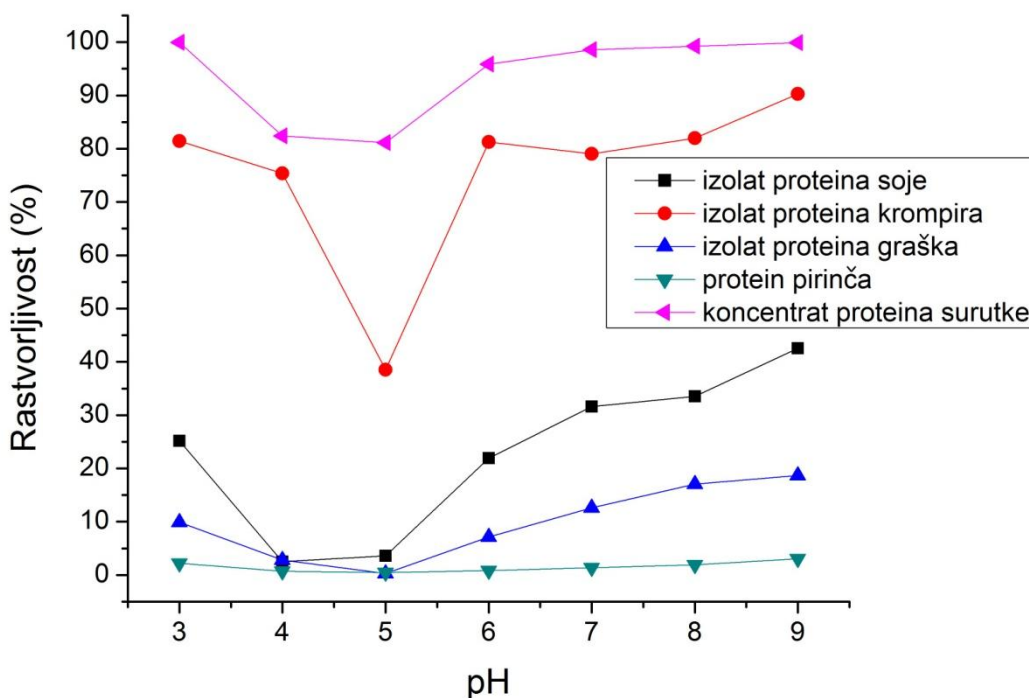
U tabeli 9 su predstavljene i preporučene količine aminokiselina u proteinu za odrasle, date od strane Svetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*; WHO), Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija (engl. *Food and Agriculture Organization*; FAO) i Univerziteta Ujedinjenih nacija (engl. *United Nations University*) (127). Tabela 9 ukazuje da je nutritivno najpotpuniji koncentrat proteina surutke, sa izuzetkom aminokiseline histidina, a u ukupnom sadržaju esencijalnih amino-kiselina, svi upotrebljeni proteini ispunjavaju FAO/WHO/UNU uslove.

Kod proteina pirinča lizin je značajan limitirajući faktor u ukupnoj nutritivnoj vrednosti proteina, dok je koncentrat proteina surutke najbogatiji izvor lizina.

5.1.2. Rastvorljivost proteina

Rastvorljivost proteina u vodenoj fazi je jedan od osnovnih uslova za dobre emulgujuće sposobnosti proteina (128). Rezultati rastvorljivosti proteina korišćenih u ovom istraživanju su prikazani na grafiku 2.

Izolati proteina surutke i krompira najbolje rastvorljivi u vodi (grafik 2.). Manju rastvorljivost pokazuju izolati proteina soja i graška, dok je protein pirinča najmanje rastvoran u vodi. Sa grafika 2. se očitava i zavisnost rastvorljivosti od pH vrednosti.



Grafik 2. Rastvorljivost proteina u zavisnosti od pH

Dobijeni „U“ oblik grafika je karakterističan za proteine, jer se njihova rastvorljivost snižava kako se pH vrednost rastvora približava izoelektričnoj tački. Nedostatak naelektrisanja na izoelektričnoj tački dovodi do smanjenja odbijanja između proteina, što uzrokuje pojačane protein-protein interakcije koje dovode do precipitacije proteina i smanjenja njihove

rastvorljivosti, a posleđično i drugih funkcionalnih karakteristika (129). Dalji porast pH vrednosti dovodi do porasta rastvorljivosti proteina. Najbolja rastvorljivost proteina u vodi je uočena na najvišoj određivanoj pH vrednosti, pH 9,0.

Rastvorljivost proteina na pH vrednostima iznad 9,0 nije analizirana, s obzirom na to da kod većine proteina pri pH vrednostima od 10,0 i iznad toga dolazi do denaturacije.

5.1.3. Površinska hidrofobnost proteina

Površinska hidrofobnost predstavlja bitnu osobinu proteina od koje zavise njihove funkcionalne karakteristike: formiranje pene i sposobnost emulgovanja (130). U pitanju je indeks broja hidrofobnih grupa koje se nalaze na površini proteina i dolaze u kontakt sa polarnom, vodenom sredinom (128). U tabeli 10. su prikazane izmerene vrednosti površinske hidrofobnosti korišćenih proteina.

Tabela 10. Vrednosti površinske hidrofobnosti proteina korišćenih u radu.

	Izolat sojinog proteina	Izolat proteina graška	Koncentrat proteina surutke	Izolat proteina krompira	Protein pirinča
Površinska hidrofobnost	28530 ± 194 ^a	33789 ± 284 ^b	33849 ± 116 ^b	39357 ± 221 ^c	10170 ± 98 ^d

^{abcd} Srednje vrednosti ± standardna devijacija za vrednosti površinske hidrofobnosti se međusobno ne razlikuju značajno ($p > 0,05$), ukoliko sadrže ista slova u eksponentu.

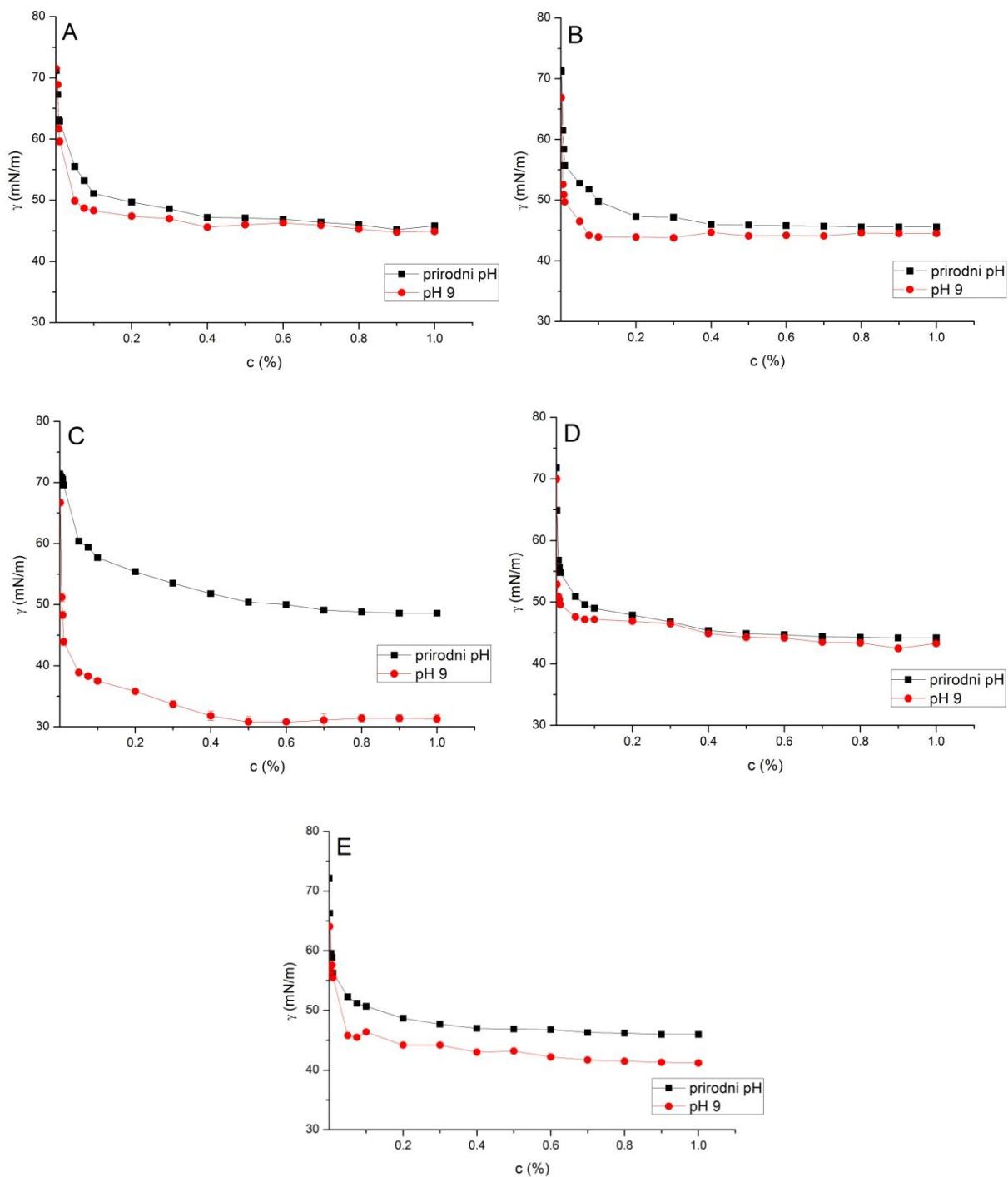
Tabela 10 pokazuje da najveću vrednost površinske hidrofobnosti ima izolat proteina krompira, a najmanju protein pirinča. Dobijene vrednosti za površinsku hidrofobnost se samo delimično poklapaju sa redosledom hidrofobnosti koji je dobijen iz aminokiselinskog sastava. Zbog prirode proteinskog molekula (makromolekuli sa više nivoa strukture), površinska hidrofobnost je važnija za funkcionalne karakteristike proteina od ukupne hidrofobnosti i utiče na fizičku stabilnost, rastvorljivost, tendenciju ka agregaciji i adsorpcione osobine (131).

Upoređivanjem površinske hidrofobnosti sa rastvorljivošću, utvrđeno je da izolati proteina krompira i surutke koji imaju najveću rastvorljivost, imaju i najveću površinsku hidrofobnost, kao i da protein pirinča koji ima najmanju rastvorljivost, ima ujedno i najmanju površinsku hidrofobnost. Opisani odnos rastvorljivosti i površinske hidrofobnosti se čini kontradiktornim, jer bi se očekivalo da protein koji ima visoku površinsku hidrofobnost ima nisku rastvorljivost, usled interakcija između hidrofobnih grupa na površini proteina i povećane tendencije za agregacijom molekula. Wagner i sar. (132) su pokazali da površinska hidrofobnost može da raste sa povećanjem rastvorljivosti. Osnovni razlog za opisani odnos rastvorljivosti i površinske hidrofobnosti jeste taj što rastvorljivost nije uslovljena isključivo stepenom izloženosti hidrofobnih grupa. Na navedeni odnos značajan uticaj ima i način pripreme uzoraka: da li je uzorak koncentrat ili izolat, izloženost uzoraka različitim vrednostima temperature, različitim rastvaračima, kao i različiti vremenski periodi tokom kojih su bili izloženi tim uslovima (132).

5.1.4. Određivanje površinskog napona rastvora proteina

Proteinski molekuli snižavaju površinski i međupovršinski napon zahvaljujući svojoj površinskoj aktivnosti. U pripremljenim emulzijama korišćeno je riblje ulje kao i rastvor proteina različitih koncentracija kao kontinualna faza. Rastvor proteina je pripreman na dve različite pH vrednosti: nativnoj pH vrednosti proteina i pH 9,0. Kako je za sposobnost emulgovanja i stabilizacije emulzije potrebno sniziti međupovršinski napon između faza (79), bilo je bitno odrediti u kojoj meri korišćeni proteini snižavaju površinski i međupovršinski napon.

Izmeren međupovršinski napon između vode i ribljeg ulja je bio $10,5 \pm 0,22$ mN/m. Navedena vrednost je bila vrlo niska, a nakon dodatka proteina, međupovršinski napon između rastvora proteina i ribljeg ulja nije bilo moguće izmeriti, jer je vrednost bila ispod donje granice osetljivost aparata. Zbog toga je meren uticaj koncentracije pet različitih proteina na površinski napon njihovih vodenih rastvora pripremljenih na dve različite pH vrednosti i rezultati su prikazani na grafiku 3.



Grafik 3. Vrednosti površinskog napona rastvora proteina u zavisnosti od njihove koncentracije, na dve različite pH vrednosti za A) izolat proteina soje, B) izolat proteina graška, C) protein pirinča, D) izolat protein krompira i E) koncentrat proteina surutke.

Sa grafika 3. se jasno vidi da svi upotrebljeni proteini u vodenom rastvoru snižavaju površinski napon na obe pH vrednosti. Porast koncentracije proteina dovodi do brzog pada površinskog napona. Pad površinskog napona u određenom trenutku dostiže plato i koncentracija pri kojoj se to dešava se označava sa c_p , što označava “kritičnu micelarnu koncentraciju” (engl. *critical micelle concentration; CMC*) (133).

CMC predstavlja koncentraciju surfaktanta pri kojoj se formiraju micide (134). Pre dostizanja CMC u rastvoru surfaktanta pada površinski napon. Sa dostizanjem CMC, površinski napon ostaje konstantan i svako dalje povećanje koncentracije surfaktanta ne utiče na dalje sniženje vrednosti površinskog napona.

Povećanje pH vrednosti je kod svih proteina dovelo do pada vrednosti površinskog napona i uticalo na c_p . Tabela 11. prikazuje vrednosti koncentracija pri kojima se dostiže plato (c_p) i najniže dostignute vrednosti površinskog napona (za rastvore koncentracije proteina od 1%).

Tabela 11. Koncentracije rastvora proteina pri kojima se dostiže plato vrednosti površinskog napona (c_p) i najniže dostignute vrednosti površinskog napona (za rastvore koncentracije proteina od 1%).

Izvor proteina	soja		grašak		pirinač		krompir		surutka	
	nativni pH	9,0	nativni pH	9,0	nativni pH	9,0	nativni pH	9,0	nativni pH	9,0
c_p (%)	0,1	0,05	0,1	0,05	0,4	0,3	0,1	0,01	0,1	0,05
γ_{min} (mN/m)	45,8±0,07	44,9±0,12	45,6±0,09	44,5±0,09	48,6±0,04	31,3±0,18	44,2±0,42	43,3±0,15	46,0±0,18	41,2±0,12

Prema rezultatima prikazanim u tabeli 11, može da se zaključi da vrednost koncentracije proteina pri kojoj se dostiže plato ne zavisi od vrste i karakteristika samog proteina, kad su u pitanju proteini soje, graška, krompira i surutke. Kod pomenutih proteina, plato se dostiže na

gotovo istim koncentracijama, kako na nativnom pH proteina, tako i na pH 9,0. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima o uticaju biljnih i proteina mleka na vrednosti međupovršinskog napona (73), s tim što se razlikuju vrednosti plato koncentracija (vrednosti koje su dobijene za površinski napon su oko 2,5% niže u odnosu na vrednosti dobijene za međupovršinski napon).

Koncentracije pri kojima se dostiže plato vrednosti površinskog napona su jedino za pirinač bile više u odnosu na ostale proteine, što može da se objasni vrlo slabom rastvorljivošću proteina pirinča koja je utvrđena tokom rada. Mogući uzrok slabe rastvorljivosti proteina pirinča je njegov specifičan sastav: 4 različite frakcije od koje svaka ima svoje karakteristike, albumin koji je rastvoran u vodi, globulin (rastvara se u rastvoru soli), glutelin (rastvoran u bazama) i prolamin (rastvoran u alkoholu) (135), dok se ostali proteini korišćeni u ovom radu uglavnom sastoje od globulina i albumina.

Najniže dostignute vrednosti površinskog napona za sve vodene rastvore proteina su na nativnom pH proteina bile u opsegu od $48,6 \pm 0,04$ mN/m (protein pirinča) do $44,2 \pm 0,42$ mN/m (protein krompira). Vrednosti površinskog napona su kod svih proteina neznatno opale prilikom povećanja pH rastvora na 9, osim kod proteina pirinča, čiji je pad vrednosti površinskog napona pri pH 9 bio najizraženiji. Najniže dostignute vrednosti površinskog napona na pH 9 su bile između $44,9 \pm 0,12$ mN/m (izolat proteina soje) i $41,2 \pm 0,12$ mN/m (koncentrat proteina surutke), a kod proteina pirinča $31,3 \pm 0,18$ mN/m. Povećanje pH vrednosti rastvora je uticalo na značajno povećanje rastvorljivosti proteina pirinča (porasla je rastvorljivost frakcije rastvorne u bazama), što je uzrokovalo i mnogo veći pad površinskog napona u rastvoru proteina pirinča u odnosu na ostale proteine.

Utvrđeni rezultati za najmanje dostignute vrednosti površinskog napona su slični rezultatima koje su dobili Prieto i sar. 2007, gde je za protein surutke pri pH 6,5 (na temperaturi od 25 °C) dobijena vrednost od 46,3 mN/m (136). U istraživanju Gustaw i sar. iz 2014. je za protein surutke na prirodnom pH (na temperaturi od 22 °C) dobijena vrednost približna 47 mN/m (137).

Rezultati dobijeni u ovom radu za najmanje dostignute vrednosti površinskog napona za sojin protein i protein krompira su saglasni sa istraživanjima Mozafarpour i sar, gde je za rastvor

sojinog proteina na pH 7 (na temperaturi od 20 °C) utvrđena vrednost $48,56 \pm 0,07$ mN/m (138), dok su Schmidt i sar. za najmanje vrednosti površinskog napona proteina krompira (pH 7,0, na temperaturi od $24,7 \pm 0,9$ °C) dobili 44 mN/m (139).

Površinsku aktivnost niskomolekularnih emulgatora moguće je predvideti na osnovu njihovih HLB brojeva (hidrofilno-lipofilna ravnoteža, engl. *hydrophilic-lipophylic balance*), ali kompleksnost strukture proteina otežava predviđanje (140). Svaki protein ima jedinstvene konformacione osobine striktno uslovljene sastavom i redosledom amino-kiselina, tako da čak i proteini koji imaju sličan ukupni sastav hidrofobnih i hidrofilnih rezidua, pokazuju potpuno različite strukturne karakteristike. Opisane razlike uzrokuju dalje razlike u fizičko-hemijskim osobinama i time značajno utiču na površinsku aktivnost proteinskih molekula. Prema rezultatima i dobijenim vrednostima za c_p i γ_{\min} , može se zaključiti da bez obzira na tip proteina, svi ispitivani proteini pokazuju sličnu površinsku aktivnost.

5.1.5. Određivanje viskoziteta rastvora proteina

Proteini kao makromolekuli povećavaju viskozitet vodenih rastvora, što posledično povećava njihov kapacitet za stabilizaciju emulzija. Merenje viskoziteta rastvora proteina može pružiti informacije vezane za karakteristike proteinskih molekula: određivanje unutrašnjeg viskoziteta proteinskih molekula u cilju detektovanja promena u konformaciji molekula (141–145). Proteini su po svojim karakteristikama polielektroliti, makromolekuli sa velikim brojem jonizujućih grupa, nakon čije disocijacije u vodenom rastvoru dolazi do značajnog porasta koncentracije jona različitog naelektrisanja. U tim slučajevima moguće je meriti redukovani ili unutrašnji viskozitet. Redukovani viskozitet predstavlja viskozitet u rastvoru polimera, odnosno porast specifičnog viskoziteta po jedinici koncentracije:

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (7)$$

Kada su vrednosti koncentracije toliko niske da teže nuli ($c \rightarrow 0$), definiše se granični broj viskoziteta ili unutrašnji viskozitet (134):

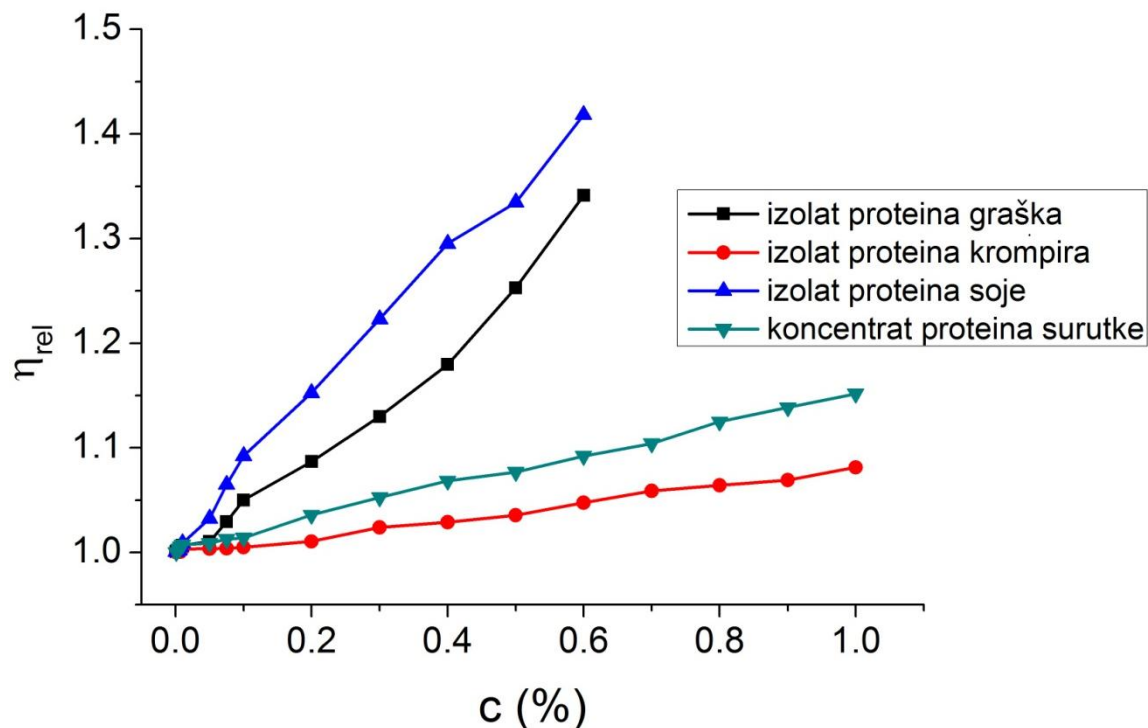
$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (8)$$

U merenjima izvršenim u radu, redukovani viskozitet je kod svih ispitivanih proteina opadao sa porastom koncentracije, što je i očekivano za polielektrolite (145). Navedeni trend nije u potpunosti pravilan i u suprotnosti je sa standardnim linearnim odnosom redukovano viskoziteta u odnosu na koncentraciju koji se dobija kada su u pitanju polimeri koji nisu polielektroliti, te je pouzdano određivanje unutrašnjeg viskoziteta proteina onemogućeno.

Zbog toga je u ovom radu određivana zavisnost relativnog viskoziteta od koncentracije polimera. Relativni viskozitet je predstavljen odnosom viskoziteta rastvora polimera i čistog rastvarača (u ovom slučaju, vode):

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} \quad (9)$$

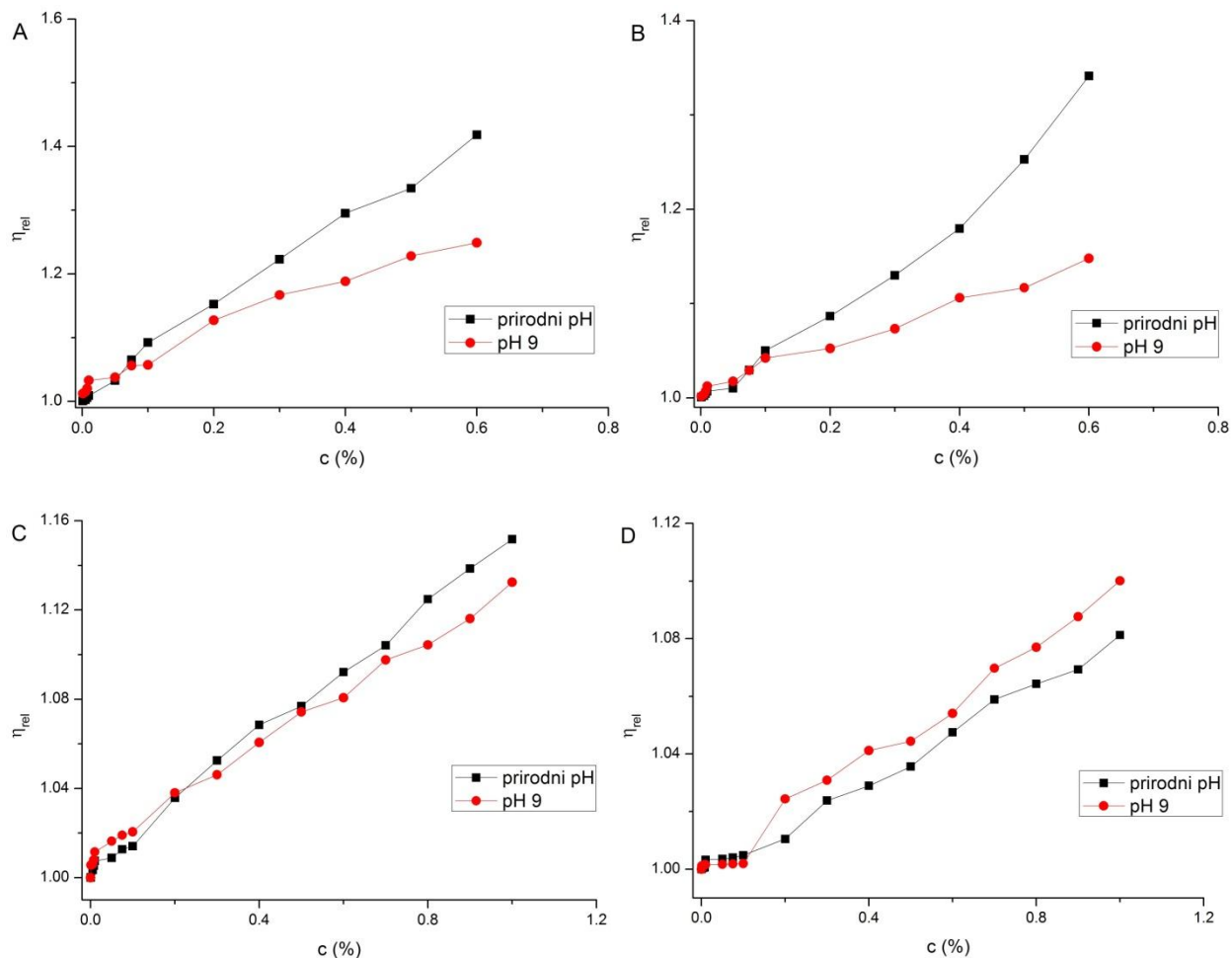
Vrednost relativnog viskoziteta je eksperimentalno određena kao t/t_0 , gde t i t_0 predstavljaju vremena proticanja rastvora proteina, odnosno vode (146). Za rastvor proteina pirinča nije bilo moguće odrediti relativni viskozitet koristeći kapilarni viskozimetar, usled njegove slabe rastvorljivosti. Dobijeni rezultati su predstavljeni na grafiku 4. Primenom kapilarnog viskozimetra nije bilo moguće odrediti vrednosti relativnog viskoziteta rastvora proteina soje i graška pri koncentracijama iznad 0,6%, usled previsoke viskoznosti navedenih rastvora.



Grafik 4. Vrednosti relativnog viskoziteta rastvora proteina soje, surutke, krompira i graška merenih na njihovim prirodnim pH vrednostima, u zavisnosti od koncentracije rastvora.

Ispitivani proteini na svojim prirodnim pH vrednostima utiču na viskozitet svojih vodenih rastvora (grafik 4). Viskozitet vodenih rastvora raste sa porastom koncentracije proteina. Najveće vrednosti viskoziteta se dostižu u rastvoru sojinog proteina, zatim proteina graška, dok su vrednosti viskoziteta vodenih rastvora proteina krompira i surutke manje od graška, pri čemu je rastvor proteina krompira imao najmanji viskozitet.

Povećanje pH vrednosti rastvora proteina na 9,0 je značajnije uticalo na promenu vrednosti viskoziteta samo na višim koncentracijama (grafik 5). Ovo se može objasniti boljom rastvorljivošću proteina na većim pH vrednostima, pri čemu su proteini iz sklopčane prešli u opruženu konformaciju, što je uticalo na orijentaciju tokom proticanja koja je uslovlila pružanje manjeg otpora proticanju a time i manje vrednosti viskoziteta.



Grafik 5. Vrednosti viskoziteta vodenih rastvora A) izolata proteina soje, B) izolata proteina graška, C) koncentrata proteina surutke i D) izolata proteina krompira na prirodnom pH proteina i na pH 9,0.

5.2. Određivanje karakteristika emulzija

Druga faza istraživanja je obuhvatala ispitivanje osobina emulzija ribljeg ulja u vodi, stabilizovanih proteinima. Sposobnost emulgovanja proteina je ispitivana menjanjem koncentracije proteina, menjanjem koncentracije ulja u emulziji i pH vrednosti kontinualne faze.

5.2.1. Određivanje raspodele veličine čestica emulzija

Veličina i raspodela veličine kapljica emulzija ribljeg ulja u vodi je ispitivana sa ciljem dobijanja informacija o emulgujućim sposobnostima proteina, kao jedan od preduslova naknadnog koraka mikrokapsulacije.

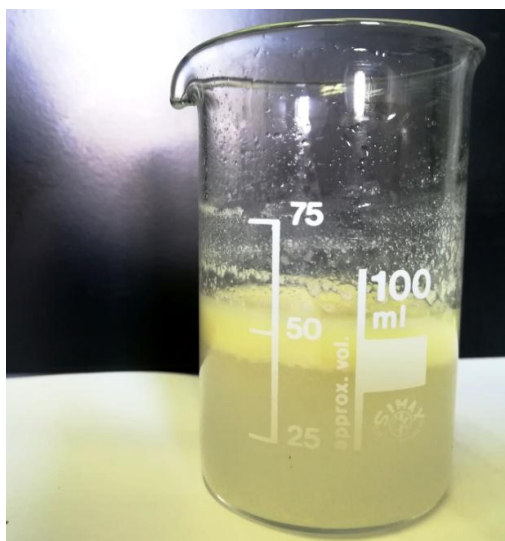
Uticaj koncentracije proteina na disperzne osobine emulzija je određivan pripremom emulzija sa tri različite koncentracije proteina (1%, 4% i 7%) na prirodnoj pH vrednosti proteina. Koncentracija ulja u emulzijama je bila 15%. U tabeli 12. su predstavljeni rezultati dobijeni merenjem raspodele veličine čestica u ovim emulzijama metodom difrakcije svetlosti.

Protein pirinča je pokazao veoma loše emulgujuće osobine u emulzijama sa ribljim uljem kao disperznom fazom (tabela 12). Emulzije stabilizovane proteinom pirinča su imale najveće vrednosti srednjih prečnika, od 6 do 20 puta veće u odnosu na ostale korišćene proteine. Emulzije koje su sadržale 1% proteina pirinča nije bilo moguće pripremiti za merenje na način kako su pripremane ostale emulzije jer se razdvajanje faza dogodilo odmah nakon pripreme emulzija (slika 9).

Tabela 12. Uticaj koncentracije proteina u emulziji na raspodelu veličine čestica na prirodnom pH emulzija, mereno metodom difrakcije svetlosti 24 časa nakon pripreme emulzija.

Izvor i procenat proteina u emulziji		$d_{3,2}$ (μm)	SPAN	$d(0.1)$	$d(0.5)$	$d(0.9)$
Surutka	1%	9,749±0,161 ^a	1,236±0,018 ^a	6,199±0,124 ^a	11,749±0,065 ^a	20,715±0,508 ^a
	4%	5,005±0,108 ^b	1,835±0,020 ^b	3,105±0,083 ^b	7,841±0,079 ^b	16,134±0,169 ^a _b
	7%	5,563±0,012 ^b	1,409±0,024 ^a	3,308±0,023 ^b	6,998±0,092 ^b	13,168±0,403 ^b
Soja	1%	5,917±0,090 ^a	1,329±0,002 ^a	3,516±0,058 ^a	6,709±0,101 ^a	12,432±0,089 ^a
	4%	3,263±0,035 ^b	1,717±0,002 ^b	1,697±0,014 ^b	4,259±0,091 ^b	11,082±0,305 ^a _b
	7%	3,255±0,061 ^b	1,980±0,006 ^c	1,769±0,007 ^b	3,880±0,020 ^b	9,449±0,415 ^b
Grašak	1%	15,984±0,016 ^a	1,205±0,010 ^a	9,853±0,065 ^a	18,029±0,160 ^a	31,583±0,521 ^a
	4%	11,395±0,140 ^b	3,205±0,061 ^b	5,307±0,124 ^b	27,918±0,022 ^b	78,268±0,18 ^b
	7%	8,202±0,055 ^c	3,170±0,016 ^b	3,851±0,012 ^b	10,714±0,045 ^c	37,812±0,013 ^c
Krompir	1%	7,974±0,014 ^a	1,865±0,074 ^{ab}	4,156±0,097 ^a	12,375±0,066 ^a	27,239±0,018 ^a
	4%	4,682±0,018 ^b	2,149±0,008 ^a	2,181±0,011 ^b	7,551±0,013 ^b	18,408±0,044 ^b
	7%	7,350±0,021 ^c	1,660±0,004 ^b	4,116±0,006 ^a	11,133±0,033 ^c	22,600±0,112 ^c
Pirinač	1%	/	/	/	/	/
	4%	61,599±0,018 ^a	1,744±0,014 ^a	34,828±0,252 ^a	103,403±0,01 ^a	215,126±0,88 ^a
	7%	57,965±0,020 ^b	1,437±0,025 ^b	38,387±0,331 ^b	93,049±0,165 ^b	172,097±0,07 ^b

^{a, b, c} Srednje vrednosti ± standardna devijacija za isti protein na njegovoj prirodnoj pH vrednosti, ako se nalaze u istoj koloni, se međusobno ne razlikuju značajno ($p > 0,05$), ukoliko sadrže ista slova u eksponentu.



Slika 9. Razdvajanje faza emulzije koja sadrži 1% proteina pirinča i 15% ribljeg ulja odmah nakon pripreme.

Emulgirajuće sposobnosti biopolimera zavise od njihovih funkcionalnih osobina (rastvorljivost, površinska aktivnost, bubrenje) koje su određene molekulskim karakteristikama polimera (86). Polimeri uglavnom prvo moraju da budu potpuno rastvoreni u vodi da bi delovali kao emulgatori (147). Zbog slabe rastvorljivosti u vodi, protein pirinča je loš emulgator na svom prirodnom pH. Protein pirinča moguće je modifikovati i koristiti u različitim prehranbenim i farmaceutskim proizvodima (135).

Veličina i raspodela veličine kapljica emulzija su glavni indikatori homogenosti emulzije i rezultat ravnoteže između dva suprotna procesa koji se dešavaju istovremeno tokom homogenizacije: smanjivanje veličina kapljica i njihova koalescencija (148,149). U svim emulzijama (osim u emulzijama stabilizovanim proteinom pirinča koji dalje nije uziman u obzir u analizi veličine čestica) najviše vrednosti srednjeg prečnika kapljica su primećene pri koncentraciji proteina od 1%. Porastom koncentracije proteina na 4%, vrednosti srednjih prečnika su opale, da bi ponovo blago porasle sa porastom koncentracije proteina na 7%, kod gotovo svih posmatranih sistema. Opisani rezultati su u skladu sa prethodnim ispitivanjima Amine i sar. (73), u kojima su emulzije stabilizovane proteinima krompira, graška i natrijum-kazeinatom. Kod pomenutih emulzija je plato za vrednosti srednjih prečnika kapljica emulzije dostignut pri koncentraciji od 5% za proteine krompira i graška i pri koncentraciji od 2,5% za natrijum kazeinat.

Uticaj koncentracije proteina na stabilnost emulzija se može objasniti postojanjem ekvilibrijuma na granici faza (81). Koncentracije proteina na površini između faza i u kontinualnoj fazi teže da budu u ravnotežnom odnosu. Promena u količini proteina može ili dodatno stabilizovati ili destabilizovati tu ravnotežu i poremetiti koncentraciju proteina na granici faza (86). Porast koncentracije proteina u kontinualnoj fazi uglavnom dovodi i do porasta koncentracije proteina na granici faza, ali prevelik porast koncentracije proteina može imati i negativan uticaj na međupovršinski napon na granici faza i destabilizovati emulzije (150,151).

Tabela 12 pokazuje da su najmanje vrednosti srednjih prečnika kod emulzija stabilizovanih izolatom sojinog proteina, što je u suprotnosti sa nalazima Amine i sar. (73) koji su utvrdili da su srednji prečnici emulzija stabilizovanih sojinim proteinima bili veći u odnosu na emulzije stabilizovane proteinima graška, krompira i Na-kazeinatom. Dobijene vrednosti površinskih srednjih prečnika ($d_{3,2}$) emulzija sa 4% proteina surutke i krompira su bile

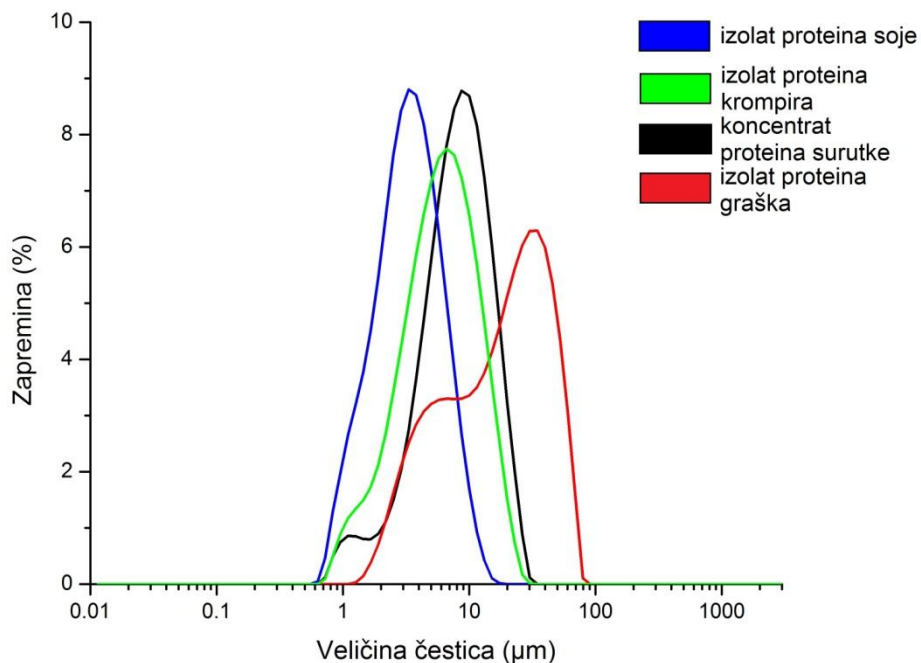
5,005±0,108 i 4,682±0,018 μm , redom, i bile su veće u odnosu na emulzije stabilizovane sa 4% sojinog proteina (3,233±0,035 μm), ali niže u odnosu na emulzije stabilizovane proteinom graška (11,395±0,140 μm). Mogući uzrok ovakvih rezultata može biti različit postupak izolacije ispitivanih proteina.

Posmatrajući span vrednosti dobijene merenjem raspodele veličine čestica, očekuje se da emulzije stabilizovane proteinima surutke i soje imaju kapljice koje su više uniformne u odnosu na emulzije stabilizovane istom koncentracijom proteina krompira, dok stabilizacija proteinom graška daje najširu distribuciju (tabela 12).

Povećanje koncentracije proteina sa 1% na 4% je uzrokovalo pomeranje pikova raspodele veličine čestica ka manjim veličinama čestica kod svih ispitivanih proteina. Dalje povećanje koncentracije proteina na 7% nije uzrokovalo značajnije smanjenje vrednosti pikova raspodele, te se zaključuje da povećanje koncentracije proteina sa 1% na 4% dovodi do formiranja manjih kapljica tokom homogenizacije emulzija.

Raspodela veličine čestica emulzija stabilizovanih sa 4% različitih proteina je prikazana na grafiku 6.

Poređenjem rezultata prikazanih u tabeli 12 i na grafiku 6, vidi se da serija pikova raspodele veličine kapljica emulzija, od najmanje do najveće veličine ide sledećim redom: izolat proteina soje, izolat proteina krompira, koncentrat proteina surutke i emulzije stabilizovane izolatom proteina graška. Navedeno ukazuje na to da je izolat proteina soje kao emulgator u stanju da formira manje kapljice u emulzijama u odnosu na ostala tri proteina, a da izolat proteina graška formira emulzije sa najvećim kapljicama.



Grafik 6. Raspodela veličine kapljica emulzija ribljeg ulja u vodi (sadržaj ulja 15%) stabilizovanih proteinima soje, krompira, surutke i graška u koncentraciji od 4% proteina.

Analizirajući uticaj koncentracije proteina na veličinu kapljica emulzija, odlučeno je da se u daljim ispitivanjima uticaja pH vrednosti i sadržaja disperzne faze na veličinu i raspodelu veličine čestica emulzija koriste emulzije sa koncentracijom proteina od 4% (tabela 13).

Tabela 13. Uticaj koncentracije ribljeg ulja u emulzijama i pH vrednosti emulzije na parametre raspodele veličine kapljica emulzija, mereno metodom difrakcije svetlosti 24 časa nakon pripreme emulzija.

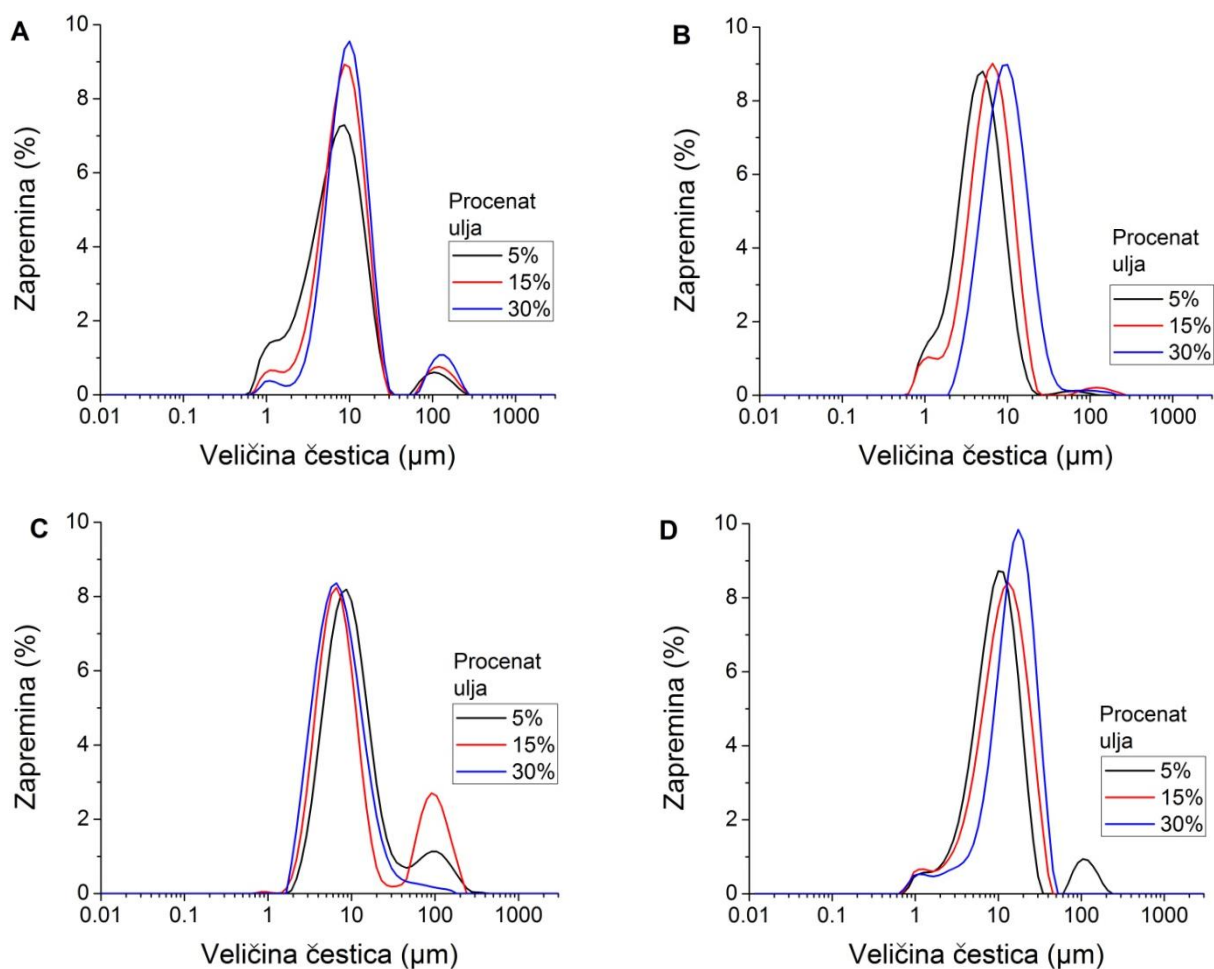
Vrsta proteina i procenat ulja u emulziji	pH emulzije	d _{3,2} (μm)	Span	d(0.1)	d(0.5)	d(0.9)
Surutka	5% nativni pH	3,93±0,10 ^{a0}	2,07±0,02 ^{a0}	1,76±0,01 ^{a1}	6,20±0,20 ^{a0}	14,21±0,19 ^{a1}
	pH 9,0	3,50±0,08 ^{x0}	2,06±0,04 ^{x0}	1,59±0,01 ^{x1}	5,12±0,15 ^{x0}	12,17±0,32 ^{x1}
	15% nativni pH	5,00±0,11 ^{ab0}	1,83±0,02 ^{a1}	3,10±0,08 ^{b0}	7,84±0,07 ^{b0}	16,13±0,11 ^{ab0}
	pH 9,0	5,20±0,11 ^{y0}	1,67±0,01 ^{xy1}	2,84±0,01 ^{y0}	7,55±0,01 ^{y0}	15,50±0,55 ^{y0}
	30% nativni pH	6,44±0,02 ^{b0}	1,45±0,01 ^{b1}	3,93±0,02 ^{b1}	8,41±0,04 ^{b0}	17,49±0,01 ^{b1}
	pH 9,0	6,19±0,17 ^{y0}	1,25±0,01 ^{y1}	3,32±0,06 ^{y1}	8,26±0,09 ^{y0}	16,23±0,07 ^{y1}
Soja	5% nativni pH	2,01±0,06 ^{a1}	3,25±0,02 ^{a1}	0,82±0,01 ^{a0}	3,15±0,03 ^{a1}	11,00±0,13 ^{a0}
	pH 9,0	3,05±0,08 ^{x1}	2,61±0,03 ^{x1}	0,80±0,04 ^{x0}	2,83±0,01 ^{x1}	10,68±0,47 ^{x0}
	15% nativni pH	3,26±0,03 ^{b1}	1,71±0,01 ^{b1}	1,69±0,01 ^{b1}	4,25±0,09 ^{b0}	11,08±0,30 ^{a0}
	pH 9,0	2,96±0,05 ^{x1}	3,07±0,02 ^{y1}	1,29±0,04 ^{y1}	3,88±0,01 ^{y0}	10,81±0,50 ^{x0}
	30% nativni pH	4,14±0,08 ^{b0}	1,67±0,04 ^{b1}	2,27±0,02 ^{c0}	5,69±0,05 ^{c0}	11,79±0,09 ^{a1}
	pH 9,0	4,06±0,02 ^{y0}	2,13±0,01 ^{z1}	2,22±0,01 ^{z0}	5,78±0,04 ^{z0}	10,36±0,20 ^{x1}
Grašak	5% nativni pH	13,97±0,11 ^{a1}	2,61±0,09 ^{a0}	4,94±0,06 ^{ab1}	17,26±0,12 ^{a1}	60,28±0,14 ^{a1}
	pH 9,0	6,28±0,08 ^{x1}	2,46±0,01 ^{x0}	2,65±0,02 ^{x1}	10,88±0,24 ^{x1}	29,47±0,12 ^{x1}
	15% nativni pH	11,39±0,14 ^{ab1}	3,20±0,06 ^{ab0}	5,30±0,14 ^{a1}	27,91±0,02 ^{b1}	78,26±0,18 ^{b1}
	pH 9,0	8,97±0,11 ^{y1}	3,30±0,03 ^{y0}	2,87±0,07 ^{x1}	10,07±0,01 ^{x1}	29,57±0,78 ^{x1}
	30% nativni pH	8,72±0,30 ^{b1}	4,42±0,11 ^{b1}	4,53±0,04 ^{b1}	9,99±0,215 ^{c1}	48,78±0,60 ^{c1}
	pH 9,0	6,43±0,01 ^{x1}	1,59±0,01 ^{z1}	3,65±0,06 ^{y1}	7,38±0,01 ^{y1}	15,38±0,01 ^{y1}
Krompir	5% nativni pH	2,57±0,10 ^{a0}	2,70±0,04 ^{a1}	1,11±0,05 ^{a0}	3,63±0,04 ^{a1}	10,95±0,19 ^{a1}
	pH 9,0	2,29±0,01 ^{x0}	1,99±0,02 ^{x1}	1,13±0,04 ^{x0}	2,91±0,01 ^{x1}	6,93±0,07 ^{x1}
	15% nativni pH	4,68±0,01 ^{b1}	2,14±0,01 ^{ab1}	2,11±0,01 ^{b1}	7,55±0,01 ^{b1}	18,40±0,04 ^{b1}
	pH 9,0	3,99±0,04 ^{y1}	1,90±0,01 ^{x1}	1,97±0,07 ^{x1}	5,56±0,07 ^{y1}	12,58±0,01 ^{y1}
	30% nativni pH	8,56±0,03 ^{c1}	1,58±0,01 ^{b0}	5,07±0,03 ^{c1}	14,42±0,03 ^{c1}	27,95±0,03 ^{c1}
	pH 9,0	6,31±0,01 ^{z1}	1,54±0,01 ^{y0}	3,56±0,13 ^{y1}	8,92±0,09 ^{z1}	17,36±0,22 ^{z1}

^{a, b, c} Srednje vrednosti ± standardna devijacija za isti protein na njegovoj prirodnoj pH vrednosti, ako se nalaze u istoj koloni, se međusobno ne razlikuju značajno ($p > 0,05$), ukoliko sadrže ista slova u eksponentu.

^{x, y, z} Srednje vrednosti ± standardna devijacija za isti protein na pH 9,0, ako se nalaze u istoj koloni, se međusobno ne razlikuju značajno ($p > 0,05$), ukoliko sadrže ista slova u eksponentu.

^{1, 0} Srednje vrednosti ± standardna devijacija za isti protein i pri istoj koncentraciji ulja na različitim pH vrednostima, ako se nalaze u istoj koloni, se međusobno ne razlikuju značajno ($p > 0,05$) ako u eksponentu sadrže 0, a značajno se razlikuju ($p < 0,05$) ukoliko u eksponentu sadrže 1.

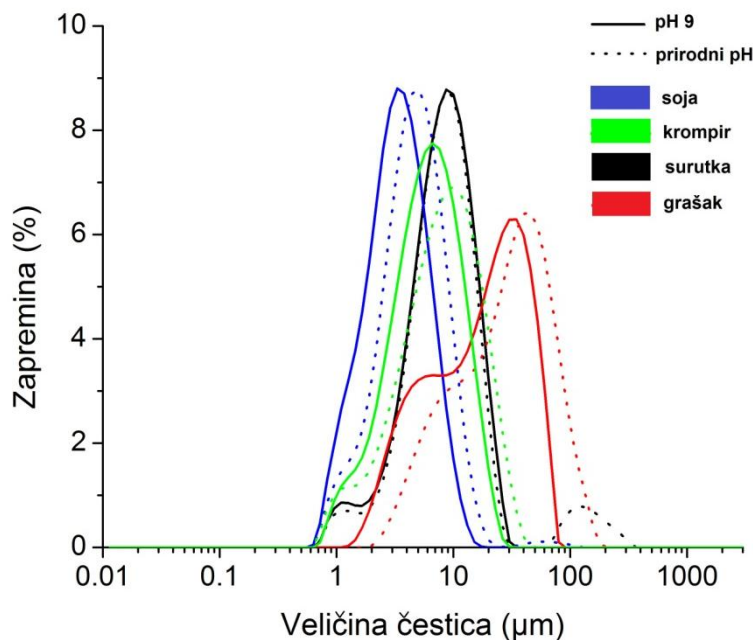
Ispitivan je uticaj tri različite koncentracije ribljeg ulja (5, 15 i 30%) na karakteristike emulzija. U tabeli 13 prikazan je porast vrednosti srednjih prečnika kapljica emulzija sa porastom koncentracije ribljeg ulja na obe pH vrednosti. Porast koncentracije ribljeg ulja je doveo do pomeranja pikova distribucije veličine kapljica emulzija ka većim vrednostima, što znači da povećanje koncentracije ribljeg ulja dovodi do formiranja većih kapljica (grafik 7). Opisani trend nije primećen jedino kod emulzija stabilizovanih izolatima proteina graška, gde su vrednosti srednjih prečnika kapljica emulzija bliske, ali su emulzije sa 30% ribljeg ulja ipak imale najmanje, dok su emulzije sa 5% ulja imale najveće kapljice.



Grafik 7. Uticaj različitih koncentracija ulja na veličinu kapljica emulzija stabilizovanih A) koncentratom proteina surutke, i izolatima proteina B) soje, C) graška, i D) krompira.

Hebishy i saradnici (152) su ispitivali uticaj različitih metoda homogenizacije na karakteristike emulzija tipa U/V stabilizovanih proteinom surutke. Pripremljene emulzije su imale različite koncentracije ulja - 10%, 30% i 50%. Rezultati dobijeni za emulzije pripremljene homogenizacijom pod visokim pritiskom su pokazali istu zavisnost koja je dobijena i u ovom radu: vrednosti srednjeg prečnika kapljica emulzija su rasle sa porastom koncentracije ulja, što se može objasniti na nekoliko načina. Prvi je povezan za porastom viskoziteta usled porasta koncentracije ulja, čime se otežava usitnjavanje kapljica emulzija. Drugo objašnjenje jeste da više koncentracije ulja i gušće pakovanje kapljica emulzija dovode do učestalijeg približavanje kapljica emulzija što uzrokuje porast koalescencije i rezultat je porast vrednosti srednjeg prečnika kapljica. Treće objašnjenje može biti da količina emulgatora koja je konstantna nije dovoljna za stabilizaciju povećane količine ulja, tj. veće specifične površine disperzne faze (152–154).

Uticaj pH vrednosti na veličinu i raspodelu veličine kapljica emulzija prikazan je u tabeli 13. Ispitivan je uticaj dve pH vrednosti: prirodnog pH proteina i pH 9,0. Prema dobijenim rezultatima, može se zaključiti da porast pH vrednosti sistema na 9,0 za sve ispitivane proteine dovodi do smanjenja srednjih vrednosti prečnika i formiranja manjih kapljica u emulzijama. Na grafiku 8 je prikazana raspodela veličine kapljica emulzija u zavisnosti od pH.



Grafik 8. Raspodela veličine kapljica emulzija ribljeg ulja u vodi (sadržaj ulja 15%) stabilizovanih koncentratom proteina surutke i izolatima proteina soje, krompira i graška u koncentraciji od 4% proteina na prirodnom pH proteina i na pH 9.

Prilikom homogenizacije emulzija i adsorpcije proteina dolazi do denaturacije proteinskih molekula u cilju smanjenja eventualnih nepoželjnih interakcija. Porast pH vrednosti uzrokuje da molekuli proteina postanu više negativno naelektrisani što dovodi do elektrostatičkog odbijanja kapljica stabilizovanih molekulima proteina. Odbijanje između aminokiselinskih grupa u istom molekulu stimuliše odmotavanje polipeptidnog lanca na granici faza i u kontinualnoj fazi. Istovremeno, pomenuto elektrostatičko odbijanje može dovesti do povećane adsorpcije proteina na granici faza, što poboljšava stabilnost emulzija (73), što je u skladu i sa prethodno predstavljenim rezultatima površinskog napona, gde se vidi porast površinske aktivnosti proteina sa porastom pH. Isti trend bi se očekivao i za vrednosti međupovršinskog napona, što svakako ima pozitivan uticaj na veličinu čestica i stabilnost emulzija.

Principi stabilizacije emulzija se baziraju na teorijama elektrostatičke i sterne stabilizacije. Kada su u pitanju emulzije stabilizovane proteinima, odnos i doprinosi ova dva mehanizma zavise od specifične strukture proteina i od pH vrednosti sistema. Razlika u molekulskoj strukturi proteina utiče na njihove površinske karakteristike. Rezultati dosadašnjih studija su pokazali da su osobine koje neki protein mora da ima da bi bio dobar surfaktant - brza adsorpcija na površine između faza, brzo odmotavanje lanca kako bi se što bolje adsorbovao i sposobnost formiranja kohezivnog filma na površini između faza putem intermolekularnih interakcija (140). Emulzije stabilizovane proteinima su stabilnije od emulzija stabilizovanih niskomolekularnim surfaktantima, uprkos činjenici da proteini nisu naročito efikasni kada je u pitanju snižavanje površinskog napona. Razlog tome je što sloj adsorbovanih proteina oko kapljica ulja obezbeđuje sternu stabilizaciju koja sprečava flokulaciju i koalescenciju kapljica ulja. Ovaj mehanizam ne postoji kod niskomolekularnih surfaktanata i upravo je on ključni faktor kada je u pitanju efikasna stabilizacija emulzije proteinima (155). Sloj koji se formira oko kapljica ulja je uglavnom vrlo tanak i omogućava da dodatni mehanizam stabilizacije bude i elektrostatičko odbijanje usled naelektrisanja proteinskih molekula, što čini emulzije stabilizovane proteinima osetljive na promene pH vrednosti, količinu jona i naelektrisanja u emulzijama (156).

5.2.2. Određivanje stabilnosti emulzija

Emulzije su disperzni sistemi sa širokom raspodelom veličine čestica (kapljica) disperzne faze (0,1-100 μm). Emulzioni sistemi su sami po sebi nestabilni, pa im se zbog toga dodaju emulgatori (157). U zavisnosti od vrste emulzije i vrste primenjenog emulgatora, kod U/V emulzija se pre ili kasnije javljaju određeni vidovi nestabilnosti, od kojih su najčešći isplivavanje kapi, odnosno „kriming“ (engl. *creaming*), sedimentacija i koalescencija, pri čemu su prva dva reverzibilna, dok je koalescencija ireverzibilan proces.

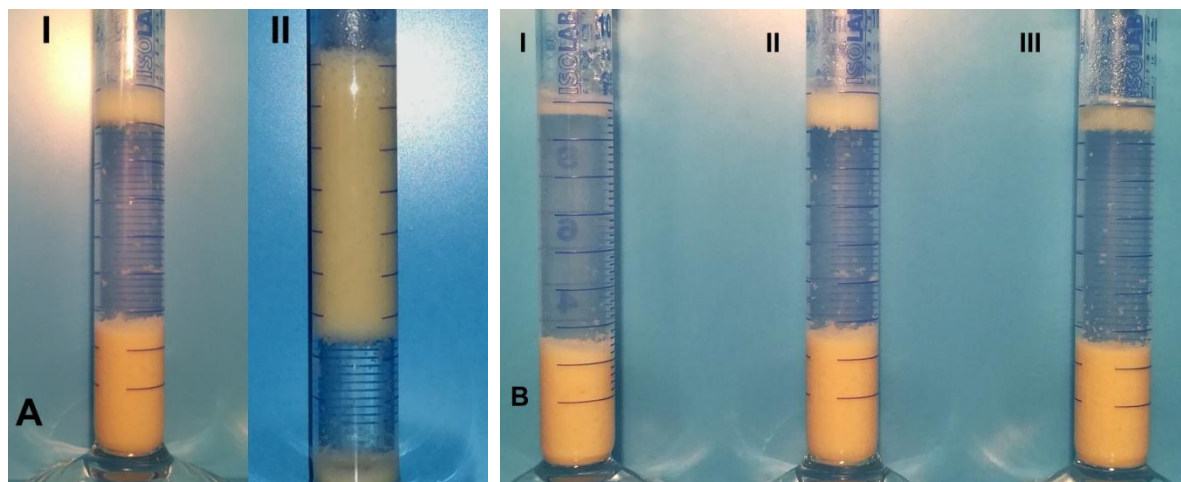
Kod emulzija tipa U/V, uljana faza je uglavnom manje gustine od vode, pa se zahvaljujući razlici u gustini i pod dejstvom gravitacije, kao vid nestabilnosti najčešće javlja *creaming*. Jedan od najčešće primenjivanih načina za određivanje stabilnosti U/V emulzija jeste upravo određivanje *creaming* indeksa (158).

Stabilnost emulzija na *creaming* je praćena tokom 7 dana na sobnoj temperaturi. Prema Stoksovom zakonu, brzina *creaming*-a zavisi od veličine čestica i viskoziteta kontinualne faze. Velike kapljice se brže kreću u odnosu na manje i veće su šanse da dođe do razdvajanja tokom *creaming*-a. Smanjenje broja većih kapljica u emulzijama usporava ili odlaže pojavu *creaming*-a. Istovremeno, povećanje viskoziteta vodene faze povećava stabilnost emulzije zbog sporijeg kretanja kapljica ulja.

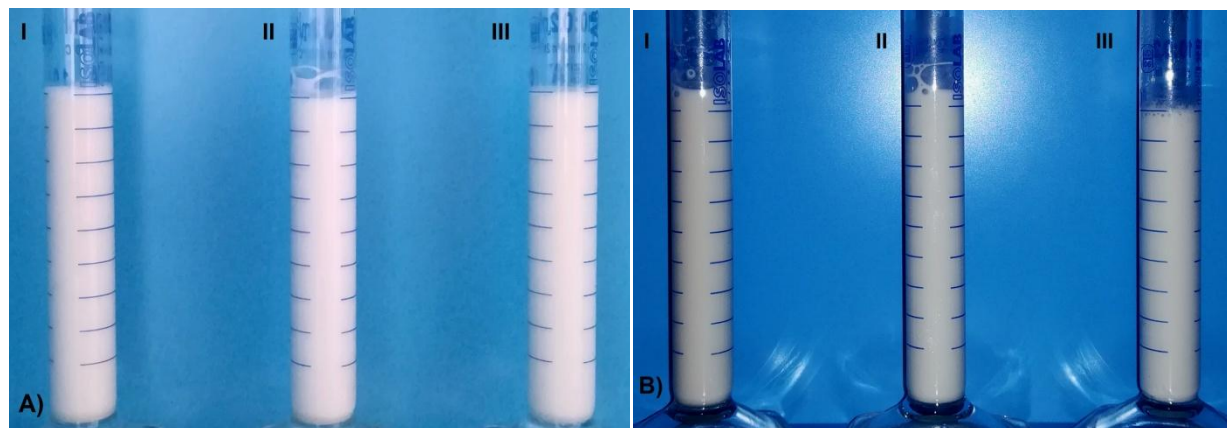
U radu je praćen uticaj vrste i koncentracije proteina, sadržaja ulja, i pH vrednosti na stabilnost emulzija.

Kod emulzija stabilizovanih proteinom pirinča je došlo do potpunog razdvajanja faza već nakon 2 sata kod svih emulzija pripremanih na prirodnom pH proteina (pri čemu, kako je ranije prikazano, nije ni došlo do emulgovanja kod uzoraka sa koncentracijom proteina od 1%), te tako ove emulzije nisu dalje uzimane u obzir prilikom praćenja stabilnosti (slika 10).

Dobijeni rezultati *creaming* indeksa su pokazali da su emulzije stabilizovane izolatom sojinog proteina bile najstabilniji sistemi - tokom 7 dana kod emulzija sa sadržajem proteina od 4% nije došlo do pojave *creaming*-a bez obzira na sadržaj ulja u emulziji i na pH vrednost (slika 11).



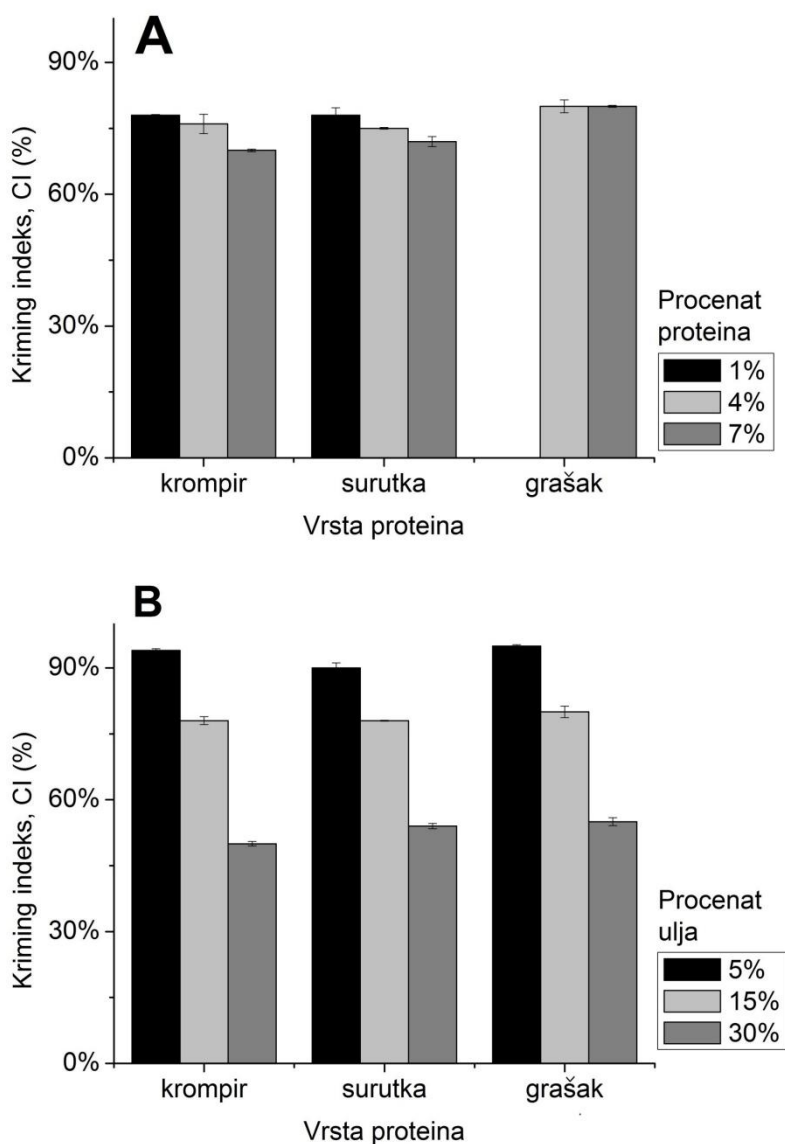
Slika 10. Emulzije stabilizovane proteinom pirinča, pripremane na prirodnom pH proteina, nakon 2h praćenja: A) sadržaj ribljeg ulja u emulziji 15%, koncentracija proteina I) 4% i II) 7%. B) koncentracija proteina u emulziji 4%, sadržaj ulja I) 5%, II) 15% i III) 30%.



Slika 11. Stabilnost emulzija stabilizovanih sa 4% izolata proteina soje i sa sadržajem ribljeg ulja od I) 5%, II) 15% i III) 30%, pripremljenih na (A) prirodnom pH proteina i na (B) pH 9 tokom 7 dana čuvanja na sobnoj temperaturi

Emulzije su ostale stabilne bez obzira na procenat proteina. Odsustvo *creaming*-a i stabilnost emulzija se u ovom slučaju može objasniti najmanjom veličinom kapljica emulzije (tabela 12) i sposobnošću sojinog proteina da poveća viskozitet vodene faze u većoj meri u odnosu na ostale ispitivane proteine (grafik 4).

Kod emulzija stabilizovanih koncentratom proteina surutke i izolatom proteina krompira je vrednost *creaming* indeksa opala sa porastom koncentracije proteina (grafik 9A). Tokom prva 24 časa je došlo do formiranja dva sloja emulzije. Gornji sloj je bio bogat kapljicama ulja, dok je donji bio manje zamućen. Granica između slojeva nije bila najjasnije vidljiva, što znači da su manje kapljice ostale dispergovane, dok su veće kapljice migrirale u gornji sloj.



Grafik 9. Vrednosti *creaming* indeksa emulzija, CI, nakon 24 h praćenja, A) stabilizovanih različitim koncentracijama proteina, sa 15% ribljevog ulja, i B) različitim koncentracijama ribljevog ulja, stabilizovanih sa 4% proteina

Vrednost *creaming* indeksa emulzija stabilizovanih koncentratom proteina surutke je nakon tih prvih 24 časa ostala statistički nepromenjena do kraja perioda praćenja, bez obzira na procenat ulja, pH vrednost i procenat proteina u emulziji. Kod emulzija stabilizovanih izolatom proteina krompira, nakon prvih 24 časa nije došlo do promene samo kod emulzija sa procentom proteina 7%. Kod emulzija sa sadržajem proteina od 1% i 4%, *creaming* indeks je poslednjeg dana praćenja bio izraženiji nego nakon 24 časa.

Emulzije stabilizovane proteinom graška u koncentraciji od 1% su pokazale slabu stabilnost na *creaming*. Kod pomenute koncentracije je došlo do potpunog razdvajanja faza tokom perioda praćenja. Druge dve koncentracije proteina graška su formirale emulzije koje su bile stabilne tokom 7 dana. Objašnjenje leži u smanjenju veličine kapljica sa porastom koncentracije proteina od 1 na 4% (tabela 12) i porastu viskoziteta kontinualne faze (grafik 5).

Uticaj koncentracije disperzne faze je prikazan na grafiku 9B, iz kog se vidi da dolazi do porasta stabilnosti emulzija sa povećanjem koncentracije ulja. Vrednosti *creaming* indeksa su opale sa porastom koncentracije ulja kod svih ispitivanih emulzija, osim kod emulzija stabilizovanih sojinim proteinom. Veća koncentracija ulja dovodi do gušćeg pakovanja, što smanjuje mobilnost kapljica unutar emulzije i povećava njenu stabilnost (159).

Povećanje pH vrednosti sistema sa prirodne pH vrednosti proteina na pH 9,0 je dovelo do značajnog porasta u stabilnosti emulzija stabilizovanih izolatom proteina graška i proteinom pirinča, najverovatnije usled porasta rastvorljivosti proteina i, posledično, površinske aktivnosti, a što je dovelo do formiranja manjih kapljica emulzija. Kod izolata proteina graška, porast pH vrednosti na 9,0 dovodi do porasta viskoziteta vodenog rastvora proteina, što dodatno doprinosi stabilnosti emulzije.

Kod ostalih ispitivanih proteina nije bilo promena u *creaming* indeksima sa promenom pH vrednosti. Razlog za to je, kao što je prethodno pokazano, što promena u pH vrednosti rastvora proteina utiče na viskozitet rastvora proteina soje, krompira i surutke samo kod visokih koncentracija (slika 11B). S druge strane, smanjenje veličine kapljica emulzija sa porastom pH vrednosti kod ova tri proteina nije bilo dovoljno da uzrokuje značajnije promene u vrednostima *creaming* indeksa.

Rezultati dobijeni određivanjem veličina kapljica emulzija, kao i stabilnosti emulzija na *creaming* se mogu objasniti i prethodnom karakterizacijom rastvora proteina. Prethodna istraživanja (81) govore u prilog tome da rastvorljivost proteina igra značajnu ulogu u njihovim emulgirajućim sposobnostima - veća rastvorljivost proteina dovodi do povećanja pokretljivosti makromolekula i njihovog nakupljanja na granici između faza. To znači da bolja sposobnost emulgovanja proteina može biti direktno povezana sa boljom rastvorljivošću i, posledično, bržim adsorbovanjem na granici između faza (160). Ovo ide u prilog rezultatima dobijenim u ovom radu, gde koncentrat proteina surutke i izolat proteina krompira imaju najviši stepen rastvorljivosti (grafik 2) i formiraju stabilne emulzije.

Međutim, navedeno se ne slaže sa činjenicom da izolat proteina soje ima značajno manju rastvorljivost od koncentrata proteina surutke i izolata proteina krompira, a daje najstabilnije emulzije. Ova pojava može da se objasni time da izolat proteina soje daje najviskoznije rastvore (grafik 4), pri čemu je ipak dovoljno rastvoran u vodi da može da se obezbedi migracija ovog proteina na granicu faza, za razliku od izolata proteina graška koji uprkos tome što daje viskozne rastvore ima izuzetno nisku rastvorljivost, što je ograničavajući faktor za njegove sposobnosti emulgovanja.

Kada se uporedi količina hidrofobnih amino-kiselina u proteinima, kao i amino-kiselina koje sadrže sumpor, vidi se da proteini soje, surutke i krompira sadrže najveću količinu ovih amino-kiselina (tabela 9). Izlaganje hidrofobnih grupa kao i sulfhidrilnih grupa prilikom razmotavanja proteina na granici između faza može da dovede do stvaranja disulfidnih veza i do stabilizacije nastalih emulzija (160).

5.2.3. Reološke osobine emulzija

Reološke osobine emulzija predstavljaju koristan način za prikaz strukturne organizacije unutar samih emulzija, kao i interakcija između njihovih komponenti (86). U tabelama 14 i 15 su prikazane vrednosti koeficijenta K i n . Koeficijent K predstavlja meru konzistencije sistema i indikator je viskoznosti sistema, a n je stepen nenjutnovskog ponašanja emulzija, odnosno stepen odstupanja pseudoplastičnog sistema od idealnog njutnovskog ponašanja. Vrednosti n se kreću od 0 do 1, pri čemu $n=1$ predstavlja njutnovsko proticanje. Vrednost n mahom zavisi od strukture kapljica u U/V emulzijama, kao i njihovog međusobnog privlačenja i agregacije prilikom primene sile na sistem (161).

Tabela 14. Vrednosti indeksa konzistencije K i stepena nenjutnovskog ponašanja n u zavisnosti od procenta proteina u emulzijama sa sadržajem ribljeg ulja 15%.

Vrsta proteina	Procenat proteina u emulziji sa 15% ribljeg ulja		
		K (mPa·s ⁿ)	n
Koncentrat proteina surutke	1%	1,754±0,0764 ^a	0,9969±0,0086 ^a
	4%	3,661±0,4228 ^b	0,9404±0,0233 ^{ab}
	7%	4,973±0,0608 ^c	0,9332±0,0024 ^b
Izolat proteina soje	1%	8,553±0,1089 ^a	0,9213±0,0165 ^a
	4%	16,525±0,2333 ^a	0,9175±0,0044 ^a
	7%	163,805±7,8751 ^b	0,7302±0,0675 ^b
Izolat proteina graška	1%	3,247±1,3251 ^a	0,9734±0,0228 ^a
	4%	11,345±0,1909 ^b	0,9306±0,0008 ^a
	7%	57,87±0,8344 ^c	0,8582±0,0049 ^b
Izolat proteina krompira	1%	2,3825±0,1732 ^a	0,9598±0,0145 ^a
	4%	3,6685±0,6102 ^a	0,9476±0,0093 ^a
	7%	6,885±0,5402 ^b	0,9188±0,0174 ^a

^{a, b, c} Srednje vrednosti ± standardna devijacija za isti protein na njegovoj prirodnoj pH vrednosti, ako se nalaze u istoj koloni, se međusobno ne razlikuju značajno ($p>0,05$), ukoliko sadrže ista slova u eksponentu.

Tabela 15. Vrednosti indeksa konzistencije K i stepena nenjutnovskog ponašanja n u zavisnosti od procenta ribljeg ulja u emulzijama stabilizovanim sa 4% proteina, mereno na prirodnom pH proteina i na pH 9.

Vrsta proteina	Procentat ribljeg ulja u emulziji	pH vrednost emulzije	K (mPa·s ⁿ)	n
Koncentrat proteina surutke	5%	prirodni pH proteina	2,62±0,2121 ^{a0}	0,9527±0,016 ^{a1}
		pH 9,0	4,22±0,636 ^{x0}	0,8426±0,007 ^{x1}
	15%	prirodni pH proteina	3,52±0,619 ^{a0}	0,9507±0,038 ^{a0}
		pH 9,0	4,82±0,382 ^{x0}	0,8938±0,019 ^{xy0}
	30%	prirodni pH proteina	6,41±0,253 ^{b0}	0,9766±0,007 ^{a0}
		pH 9,0	7,18±0,325 ^{y0}	0,9581±0,033 ^{y0}
Izolot proteina soje	5%	prirodni pH proteina	14,57±0,990 ^{a1}	0,8908±0,011 ^{a0}
		pH 9,0	19,25±0,099 ^{x1}	0,8829±0,001 ^{x0}
	15%	prirodni pH proteina	16,525±0,233 ^{a1}	0,9175±0,004 ^{a1}
		pH 9,0	29,18±1,697 ^{y1}	0,8768±0,008 ^{x1}
	30%	prirodni pH proteina	29,825±2,949 ^{b1}	1,002±0,013 ^{b1}
		pH 9,0	40,63±1,237 ^{z1}	0,9454±0,001 ^{y1}
Izolot proteina graška	5%	prirodni pH proteina	9,125±0,035 ^{a1}	0,9006±0,002 ^{a1}
		pH 9,0	9,93±0,085 ^{x1}	0,9337±0,001 ^{x1}
	15%	prirodni pH proteina	11,345±0,191 ^{b1}	0,9306±0,001 ^{b1}
		pH 9,0	20,335±2,171 ^{y1}	0,9051±0,007 ^{x1}
	30%	prirodni pH proteina	31,145±0,431 ^{c1}	0,9428±0,003 ^{c0}
		pH 9,0	41,405±2,086 ^{z1}	0,9057±0,017 ^{x0}
Izolot proteina krompira	5%	prirodni pH proteina	3,311±0,241 ^{a0}	0,8672±0,006 ^{a0}
		pH 9,0	2,393±0,617 ^{x0}	0,9699±0,058 ^{x0}
	15%	prirodni pH proteina	3,668±0,610 ^{a0}	0,9164±0,014 ^{b0}
		pH 9,0	2,999±0,284 ^{x0}	0,9660±0,013 ^{x0}
	30%	prirodni pH proteina	6,171±0,525 ^{b0}	0,9847±0,013 ^{c0}
		pH 9,0	6,663±1,037 ^{y0}	0,9567±0,016 ^{x0}

^{a, b, c} Srednje vrednosti ± standardna devijacija za isti protein na njegovoj prirodnoj pH vrednosti, ako se nalaze u istoj koloni, se međusobno ne razlikuju značajno ($p > 0,05$), ukoliko sadrže ista slova u eksponentu.

^{x, y, z} Srednje vrednosti ± standardna devijacija za isti protein na pH 9, ako se nalaze u istoj koloni, se međusobno ne razlikuju značajno ($p > 0,05$), ukoliko sadrže ista slova u eksponentu.

^{1, 0} Srednje vrednosti ± standardna devijacija za isti protein i pri istoj koncentraciji ulja na različitim pH vrednostima se međusobno ne razlikuju značajno ($p > 0,05$) ako u eksponentu sadrže 0, a značajno se razlikuju ($p < 0,05$) ukoliko u eksponentu sadrže 1.

Prema vrednostima indeksa n , sve ispitivane emulzije pokazuju pseudoplastično proticanje, osim emulzija stabilizovanih sa 1% koncentrata proteina surutke i 1% izolata proteina

graška. Pseudoplastično proticanje se manifestuje kroz smanjenje prividnog viskoziteta sistema kao posledica povećanja brzine smicanja. Opisano ponašanje je najčešće kod emulzija koje se koriste u prehrambenoj industriji. Rezultati koje su dobili Flourey i sar. govore da emulzije stabilizovane proteinom surutke, sa sadržajem disperzne faze manjom od 20%, pokazuju njutnovsko proticanje, bez obzira na primenjen pritisak homogenizacije (162). Vrednosti n indeksa koje su dobijene u ovom radu za emulzije sa sadržajem disperzne faze 15%, stabilizovane sa 1% proteina su bile u rasponu od 0,999 (protein surutke) do 0,921 (protein soje).

Vrednosti indeksa n kod svih ispitivanih proteina opadaju sa porastom koncentracije proteina (od 1% do 7%). Krive proticanja vodenih rastvora svih proteina pokazuju izraženo pseudoplastično ponašanje. Vrednosti indeksa n za emulzije stabilizovane proteinima surutke, soje, graška i krompira na prirodnom pH su bile $0,9808 \pm 0,0214$, $0,8213 \pm 0,0291$, $0,7136 \pm 0,0201$ i $0,5401 \pm 0,0191$, redom. Očigledno je da postoji dominantan uticaj proteina na proticanje emulzija, što je ujedno i razlog odstupanja emulzija od njutnovskog načina proticanja.

Porast koncentracije disperzne faze emulzija je doveo do porasta vrednosti indeksa n kod svih ispitivanih proteina, što znači da je ponašanje emulzija sa višim koncentracijama ulja bliže njutnovskom ponašanju, u odnosu na emulzije sa nižim sadržajem ulja. Prilikom procesa homogenizacije u vodenim rastvorima proteina dolazi do narušavanja strukture proteina, što može da uzrokuje i poremećaj u njihovim emulgujućim i stabilizujućim sposobnostima (162). Sa porastom koncentracije ulja u emulziji dolazi i do porasta novih površina na koje se proteini adsorbuju. Što je više tih novih površina, to se više proteina adsorbuje na njih, manje ih ostaje u vodenom rastvoru i time njihov uticaj na način proticanja emulzija postaje slabiji.

Porast pH vrednosti povećava stepen nenjutnovskog ponašanja emulzija (tabela 15), što je takođe povezano sa uticajem proteina prisutnih u vodenoj fazi emulzije. Dobijene vrednosti za n indekse vodenih rastvora proteina su veće na pH 9,0 nego na prirodnom pH proteina.

Vrednosti koeficijenta K su uglavnom male, što je srazmerno sa prividnim viskozitetom emulzija. Prema Hebshy i sar, sve emulzije sa viskozitetom nižim od 6 mPas pokazuju njutnovsko ponašanje (163). Jasno je da glavni uticaj na proticanje i prividni viskozitet emulzija ima tip proteina koji je korišćen za njihovu stabilizaciju. Emulzije pokazuju pseudoplastično

proticanje usled uticaja proteina. Najviskoznije emulzije su bile one stabilizovane izolatom proteina soje (kao što je ranije pokazano, vodeni rastvor sojinog proteina je ujedno imao i najveći viskozitet). Pomenute emulzije su imale i najveće vrednosti koeficijenta K u poređenju sa ostalima. Iz tabela 14 i 15 se vidi da vrednosti koeficijenta K rastu sa porastom koncentracije proteina, sadržaja ulja i pH vrednosti emulzija.

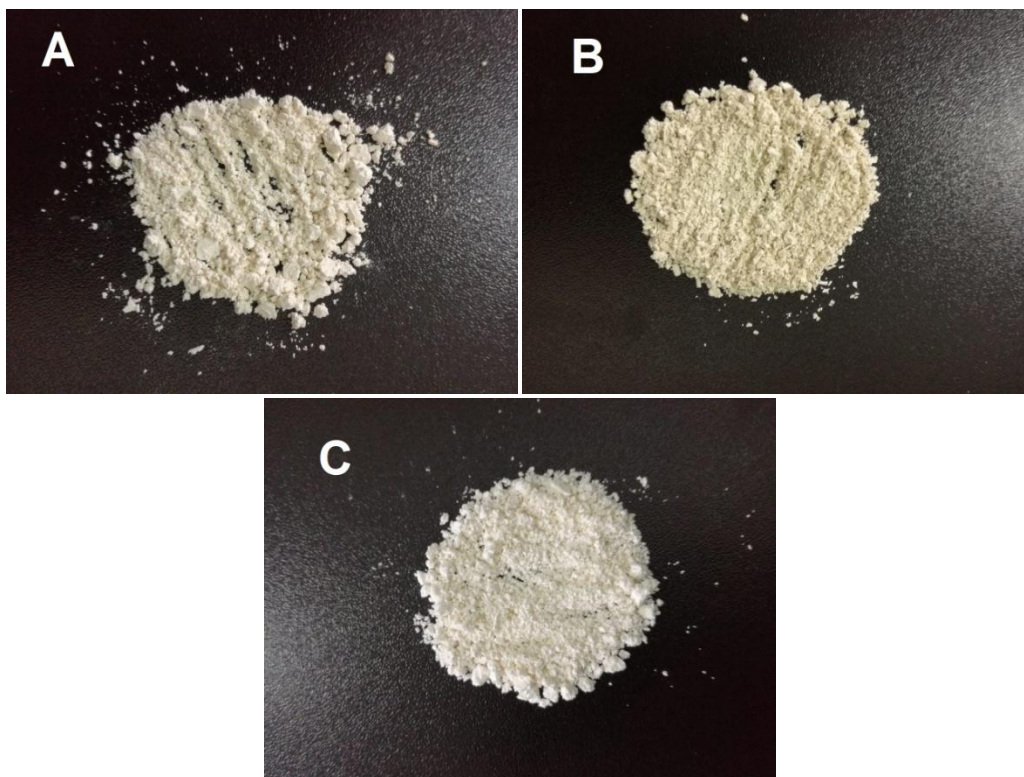
Emulzije stabilizovane izolatom proteina soje, kao i vodeni rastvori proteina soje su imali i najmanje vrednosti indeksa n u poređenju sa ostalim emulzijama, odnosno vodenim rastvorima drugih ispitivanih proteina.

Veliki je broj uzroka pseudoplastičnog ponašanja emulzija. Jedan od njih, koji bi ujedno mogao biti i objašnjenje za ponašanje ispitivanih sistema je da prostorna distribucija kapljica ulja može da se promeni pod dejstvom sile smicanja, one koje nisu sfernog oblika se mogu poravnati sa poljem proticanja i molekuli rastvarača koji su vezani za ove kapljice mogu biti odstranjeni, a same kapljice ulja deformisane ili narušene (86).

5.3. Karakterizacija mikrokapsula

Da bi se dobile mikrokapsule, upotrebljene su prethodno pripremljene emulzije. U skladu sa sprovedenim ispitivanjem emulzija je zaključeno da proteini koji su najpogodniji za dalji rad i izradu mikrokapsula jesu izolati proteina soje i krompira i koncentrat proteina surutke. Protein pirinča nije uključen u dalja ispitivanja zbog svojih slabih emulgirajućih sposobnosti. Sušenjem emulzija pripremljenim sa izolatom proteina graška, usled izraženih viskoznih svojstava, dolazilo je do zapušavanja mlaznica i neadekvatnog rada *spray dryer*-a. Kako su izolati proteina graška i soje pokazivali slične reološke osobine, odlučeno je da u dalja istraživanja budu uključeni po jedan predstavnik proteina leguminoza, krtole i surutke – proteina životinjskog porekla. Izolat proteina graška nije uključen u dalja ispitivanja.

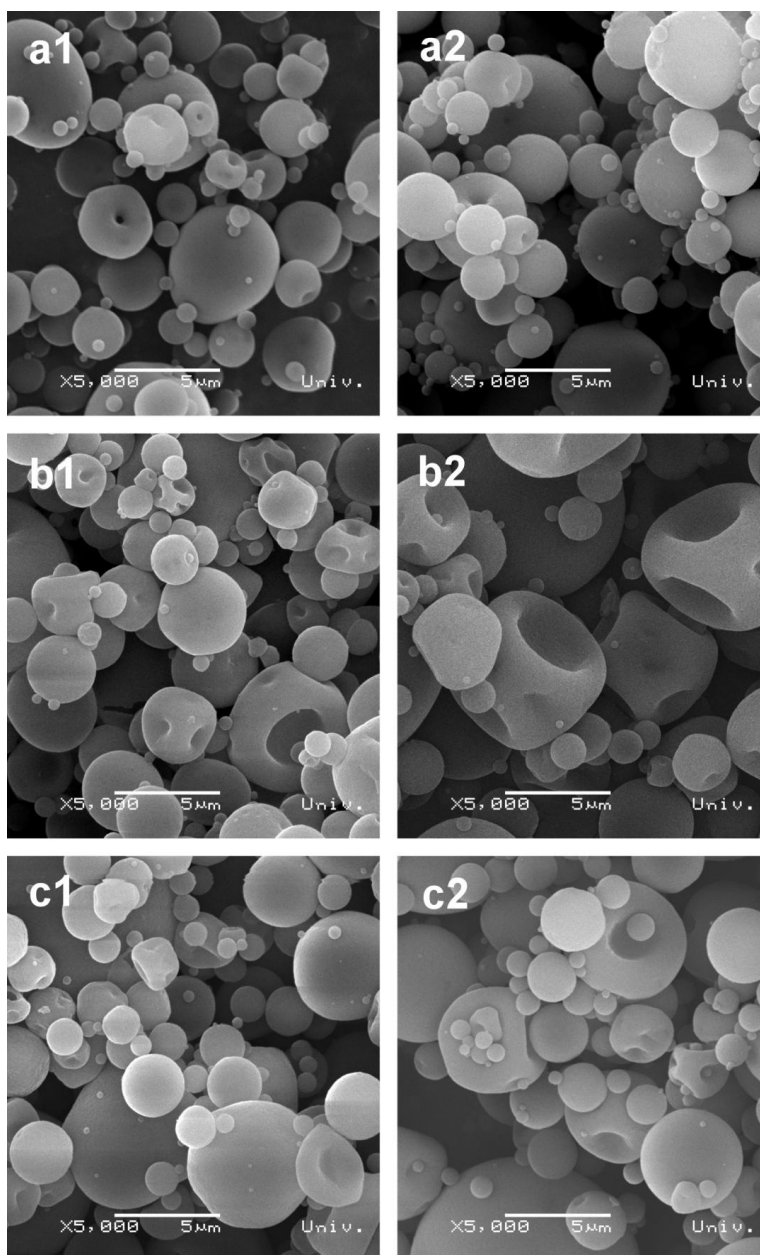
Sušenjem prethodno pripremljenih emulzija primenom *spray dryer*-a dobijene su mikrokapsule u vidu beličasto-žutog praha (slika 12).



Slika 12. Izgled mikrokapsula ribljeg ulja dobijenih sušenjem raspršivanjem, primenom proteina A) soje, B) krompira i C) surutke kao omotača mikrokapsula

5.3.1. Morfološke osobine i veličina mikrokapsula

Posmatranjem morfologije mikrokapsula pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM), uočava se njihov sferni oblik, sa naboranom površinom na pojedinim mestima (slika 13).



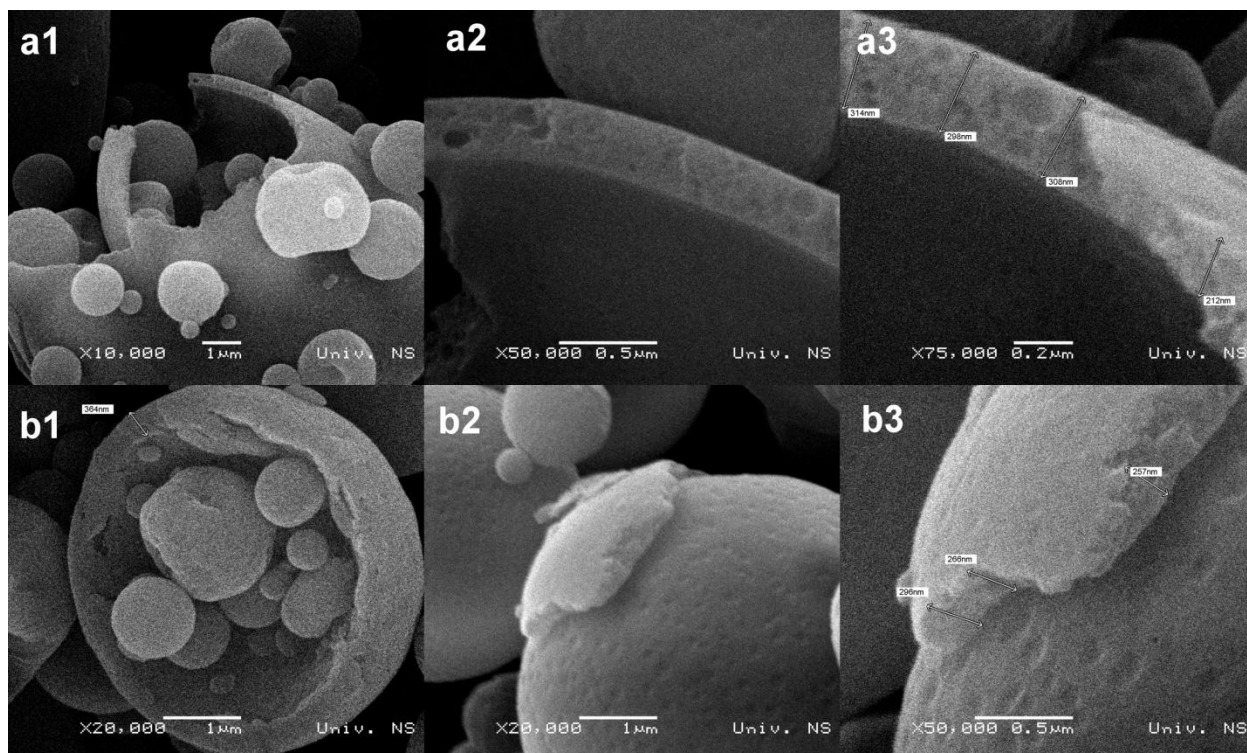
Slika 13. Izgled mikrokapsula ribljeg ulja, snimljen pomoću SEM pod uvećanjem od 5000 x, pripremljenih koristeći proteine krompira (a1 i a2), surutke (b1 i b2) i soje (c1 i c2) kao omotače mikrokapsula

Izgled površine mikrokapsula zavisi od vrste proteina koji je korišćen kao omotač. Sve kapsule su sfernog oblika, ali kod mikrokapsula kod kojih je korišćen izolat proteina krompira, površina je najhomogenija, dok se kod mikrokapsula kod kojih su korišćeni izolat proteina soje i koncentrat proteina surutke kao omotači uočava značajno veći broj neravnina, nabora i udubljenja. Prethodna istraživanja su pokazala da proteini kao omotači uopšteno daju homogenije površine mikrokapsula u odnosu na druge polimere i u odnosu na kombinacije proteina i drugih polimera (117). Manji broj pora kod mikrokapsula obezbeđuje njihovu veću stabilnost, jer pore olakšavaju prodor kiseonika u mikrokapsulu kao i izlazak ulja iz nje, te tako povećavaju mogućnost za oksidaciju ulja (63).

Građa zida mikrokapsula sa više nepravilnosti je najverovatnije uzrokovana nestabilnošću makromolekula i narušavanjem njegove strukture prilikom procesa sušenja, što ukazuje na to da je nastali omotač elastičniji i podložniji skupljanju (164). Ovaj proces se delimično može korigovati dodatkom plastifikatora (najčešće različitih vrsta ftalata) (165).

U uzorcima mikrokapsula pripremljenih korišćenjem izolata proteina soje i koncentrata proteina surutke je uočen i manji broj oštećenih mikrokapsula, čime je omogućen uvid u unutrašnju strukturu i debljinu zida mikrokapsula (slika 14).

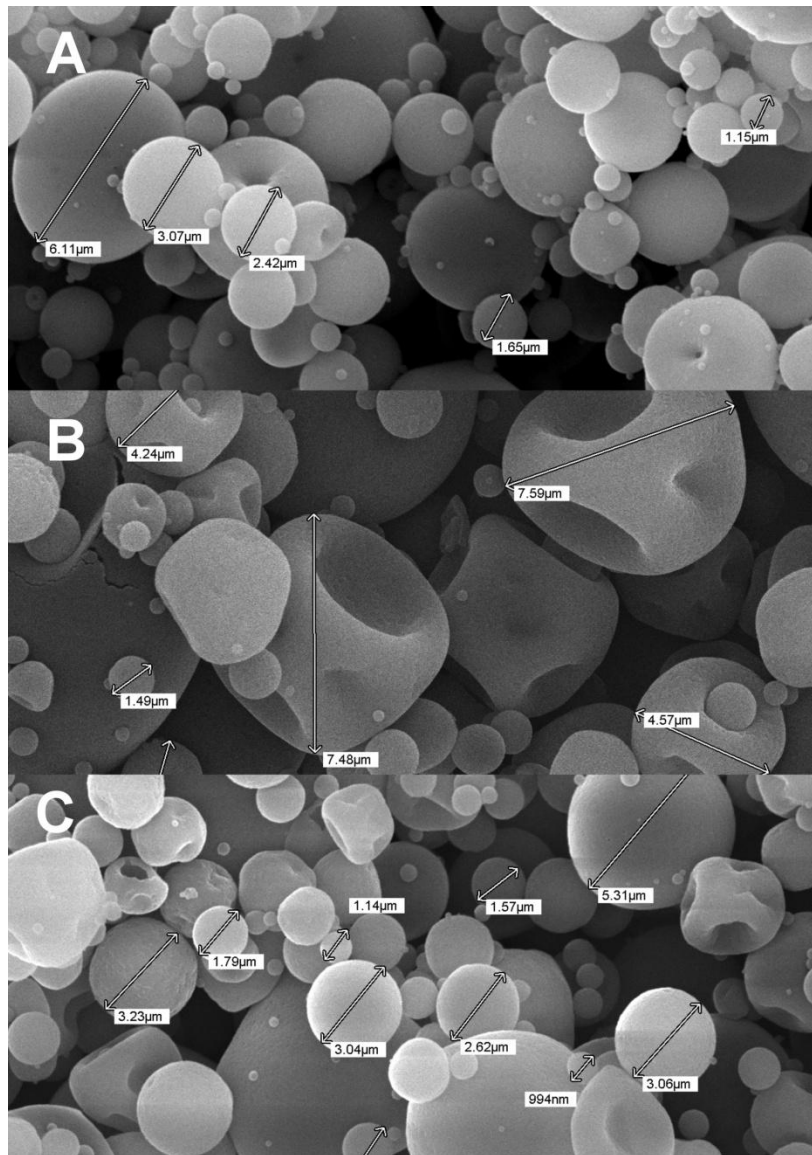
Debljina zida mikrokapsule dobijene upotrebom koncentrata proteina surutke kao omotača varira između 212 i 314 nm, dok debljina zida mikrokapsule sa izolatom proteina soje kao omotačem varira između 257 i 364 nm. Omotači koje formiraju navedeni proteini su uglavnom uniformne debljine, bez prevelikih odstupanja.



Slika 14. Izgled zida mikrokapsula ribljeg ulja, snimljen pomoću SEM pod različitim uvećanjima, kod kojih su kao omotači korišćeni proteini surutke (a1, a2 i a3) i soje (b1, b2 i b3).

Veličina mikrokapsule je važna za njenu homogenost i kompaktnost. Smatra se da veličina iznad $50\ \mu\text{m}$ povećava mogućnost za stvaranje nepravilnosti i pora na površini mikrokapsula (15). Veličine mikrokapsula u ovom radu su različite, snimljen je određen broj manjih od $1\ \mu\text{m}$ (između 100 i $700\ \text{nm}$), ali je većina mikrokapsula veličina od 1 do $8\ \mu\text{m}$ (slika 15). Dobijene vrednosti su saglasne sa rezultatima dobijenim prethodnim istraživanjima u kojima su veličine mikrokapsula dobijenih sušenjem raspršivanjem između 5 i $150\ \mu\text{m}$ (166). Rezultati koje su dobili Agibert i Lannes (167) za veličinu mikrokapsula se kreću od 1 do $20\ \mu\text{m}$, kao i rezultati dobijeni u studiji Rubilar i sar. (63), ali su u ove dve studije kao omotači korišćeni različiti polisaharidi.

Veličine mikrokapsula ribljeg ulja u kojima su korišćeni biljni proteini kao omotači su u prethodnim istraživanjima bile u rasponu od 1 do $5\ \mu\text{m}$ (12), što je u potpunosti u skladu sa dobijenim rezultatima.



Slika 15. Veličina mikrokapsula ribljeg ulja, snimljena pomoću SEM pod uvećanjem od 5000 x, pripremljenih koristeći proteine krompira (A), surutke (B) i soje (C) kao omotače mikrokapsula.

5.3.2. Prinos i efikasnost mikrokapsulacije

Važan pokazatelj kvaliteta izrađenih mikrokapsula jeste efikasnost mikrokapsulacije, odnosno procenat mikrokapsuliranog ulja u odnosu na početnu, ukupnu masu ulja korišćenu za mikrokapsulaciju (117). Uobičajeni način za određivanje efikasnosti mikrokapsulacije, koji je korišćen i u ovom radu, jeste ekstrakcija površinskog, slobodnog ulja, prisutnog na površini mikrokapsula, ispiranjem mikrokapsula organskim rastvaračem. Prisustvo slobodnog ulja u prahu može negativno da utiče na fizičke i hemijske karakteristike mikrokapsula, kao što su njihova protočnost, nasipna gustina i sposobnost dispergovanja, i dovodi do brže lipidne oksidacije. Proces ekstrakcije površinskog ulja organskim rastvaračem može da dovede do ekstrakcije i mikrokapsuliranog ulja, pogotovo onog koje se nalazi bliže površini mikrokapsule (168), pa dobijeni rezultat može biti veći u odnosu na stvarnu količinu slobodnog ulja.

U tabeli 16 su predstavljeni prinos i efikasnost mikrokapsulacije za analizirane uzorke.

Tabela 16. Količina slobodnog ribljeg ulja i efikasnost mikrokapsulacije uzoraka kod kojih su kao omotači korišćeni proteini soje, krompira i surutke

Protein korišćen kao omotač	Prinos mikrokapsulacije (%)	Količina slobodnog ulja (%)	Efikasnost mikrokapsulacije (%)
Izolat proteina soje	70±2,7 ^a	27±0,66 ^a	73±0,12 ^a
Izolat proteina krompira	72±3,1 ^a	39±0,38 ^b	61±0,48 ^b
Koncentrat proteina surutke	85±2,4 ^b	32±0,66 ^{ab}	68±0,62 ^{ab}

^{a, b, c} Srednje vrednosti ± standardna devijacija za vrednosti u istoj koloni, se međusobno ne razlikuju značajno ($p > 0,05$), ukoliko sadrže ista slova u eksponentu.

Najviši prinos prilikom procesa mikrokapsulacije je ostvaren kod proteina surutke. Razlog jeste najmanja vrednost viskoziteta emulzije stabilizovane proteinom surutke.

Procenat mikrokapsuliranog ribljeg ulja je najviši u mikrokapsulama kod kojih je korišćen izolat proteina soje kao omotač, zatim sledi koncentrat proteina surutke, dok je efikasnost mikrokapsulacije najniža kod izolata proteina krompira (tabela 16). Značajna razlika u procentu slobodnog, odnosno mikrokapsuliranog ribljeg ulja ($p < 0,05$), postoji samo između mikrokapsula kod kojih su korišćeni izolati proteina soje i krompira.

Jedan od razloga za razliku u efikasnosti mikrokapsulacije jeste veličina kapljica emulzije (44). Efikasnost mikrokapsulacije ulja opada sa porastom veličina kapljica emulzije (62,114,169), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom radu, s obzirom na to da je ranije pokazano da emulzije stabilizovane izolatom proteina soje imaju najmanju veličinu kapljica u odnosu na emulzije stabilizovane koncentratom proteina surutke i izolatom proteina krompira.

U pojedinim istraživanjima (170), veća količina slobodnog ulja na površini mikrokapsula proizvedenih od emulzija sa velikim kapljicama objašnjena je pucanjem tih kapljica tokom sušenja raspršivanjem. Dodatni razlog za neadekvatnu mikrokapsulaciju ili izlazak ulja iz kapsula mogu biti i aglomeracija mikrokapsula prilikom sušenja što im može narušiti integritet i morfologiju i dovesti do međusobne kompresije, a što za posledicu ima izlazak ulja iz mikrokapsula (171).

Istraživanje Bae i Lee utvrdilo je da se efikasnost mikrokapsulacije avokadovog ulja kreće između 45 i 66% (117), dok se u istraživanju Tonon i sar. (44) efikasnost mikrokapsulacije lanenog ulja kretala između 60 i 90%. Tan i sar. su ispitivali efikasnost mikrokapsulacije ribljeg ulja i dobijene vrednosti su se kretale u još širem rasponu, između 57 i 92% (172). U navedenim istraživanjima kao omotači su se koristili polisaharidi. U ispitivanju gde je kao omotač mikrokapsule ribljeg ulja korišćena kombinacija maltodekstrina i proteina surutke (114), efikasnost mikrokapsulacije se kretala oko 75%. Koristeći istu kombinaciju omotača za mikrokapsulaciju ulja mirte, Huynh i sar. su dobili vrednosti efikasnosti mikrokapsulacije između 60 i 80% (173), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju.

5.3.3. Oksidativna stabilnost ribljeg ulja inkorporiranog u mikrokapsule

Lipidna oksidacija dovodi do fizičkih i hemijskih promena u proizvodima koji sadrže ulje. U prehrambenim proizvodima, lipidna oksidacija može da dovede do promena u ukusu i teksturi hrane (118). Lipidna oksidacija predstavlja problem i u lekovitim preparatima, gde se javlja i rizik od subdoziranja, interakcije sa eventualnim drugim aktivnim i pomoćnim supstancama, poremećaj u brzini otpuštanja aktivnih komponenti i sveukupno nezadovoljavanje standarda kvaliteta koje lekovi treba da ispune (174).

Osnovni faktor neophodan za oksidaciju i formiranje primarnih proizvoda oksidacije iz nezasićenih masnih kiselina (hidroperoksida masnih kiselina) jeste kiseonik (175). Kada postoji čvrst matriks koji štiti proizvod od prodora kiseonika, lipidnu peroksidaciju je moguće kontrolisati. U slučajevima kada je barijera koja štiti ulje podložna reakcijama sa vodom, lako može da dođe do prodora vazduha ili vlage do ulja i do narušavanja protektivnih osobina barijere (176,177).

U ovom istraživanju je ispitivana oksidativna stabilnost ulja inkorporiranog u mikrokapsule sa različitim proteinskim omotačima, tokom dve nedelje. Uzorci su čuvani u zatvorenim polietilenskim kesicama za zipom na temperaturi od 8°C. Dobijeni rezultati za peroksidnu vrednost ulja su prikazani u tabeli 17.

Tabela 17. Oksidativna stabilnost ribljeg ulja inkorporiranog u mikrokapsule tokom dve nedelje praćenja

Peroksidna vrednost ribljeg ulja (meq peroksida/kg ulja)			
Protein korišćen kao omotač	Nakon 24 h	Nakon 7 dana	Nakon 14 dana
Izolat proteina soje	0,008826±0,00041 ^a	0,010042±0,00091 ^a	0,010272±0,00045 ^a
Izolat proteina krompira	0,009892±0,00010 ^a	0,010952±0,00001 ^a	0,012464±0,00091 ^a
Koncentrat proteina surutke	0,009026±0,00031 ^a	0,010064±0,00084 ^a	0,011074±0,00072 ^a

^a Srednje vrednosti ± standardna devijacija peroksidne vrednosti ulja, se međusobno ne razlikuju značajno (p>0,05), ukoliko sadrže ista slova u eksponentu.

Tabela 17 prikazuje da ne postoji statistički značajna razlika između peroksidnih vrednosti ribljeg ulja inkorporiranog u mikrokapsule sa različitim proteinima kao omotačima. Dobijene vrednosti, iako se statistički ne razlikuju, prate vrednosti dobijene merenjem efikasnosti mikrokapsulacije. Kod mikrokapsula kod kojih je korišćen izolat proteina soje kao omotač je ustanovljena najbolja efikasnost mikrokapsulacije i najmanja količina slobodnog ulja, kao i najniže peroksidne vrednosti ulja. Kada je kao omotač korišćen izolat proteina krompira kod kog je izmerena najlošija efikasnost mikrokapsulacije i najveća količina slobodnog ulja, dobijene su i najviše peroksidne vrednosti ulja, tokom svih 14 dana praćenja, što se može objasniti time što je ulje inkorporirano u mikrokapsule u većoj meri zaštićeno od oksidacije u odnosu na ulje koje zaostaje na površini mikrokapsula. Niža efikasnost mikrokapsulacije uzrokuje zaostajanje veće količine ulja na površini koje je podložnije lipidnoj oksidaciji u odnosu na ulje zaštićeno u mikrokapsuli (44).

Činjenica da nema statistički značajne razlike u peroksidnim vrednostima ulja inkorporiranog u mikrokapsule saglasna je sa prethodno opisanom morfologijom mikrokapsula. Bez obzira na broj neravnina i nepravilnosti na površini određenih mikrokapsula, mikrokapsule sa sva tri proteina koji su korišćeni kao omotači su uglavnom uniformnog oblika, bez prevelikih odstupanja, sličnih debljina zidova mikrokapsula i bez vidljivih značajnijih nepravilnosti i pora na površini koje bi mogle da dovedu do prodora vlage i kiseonika i lipidne oksidacije.

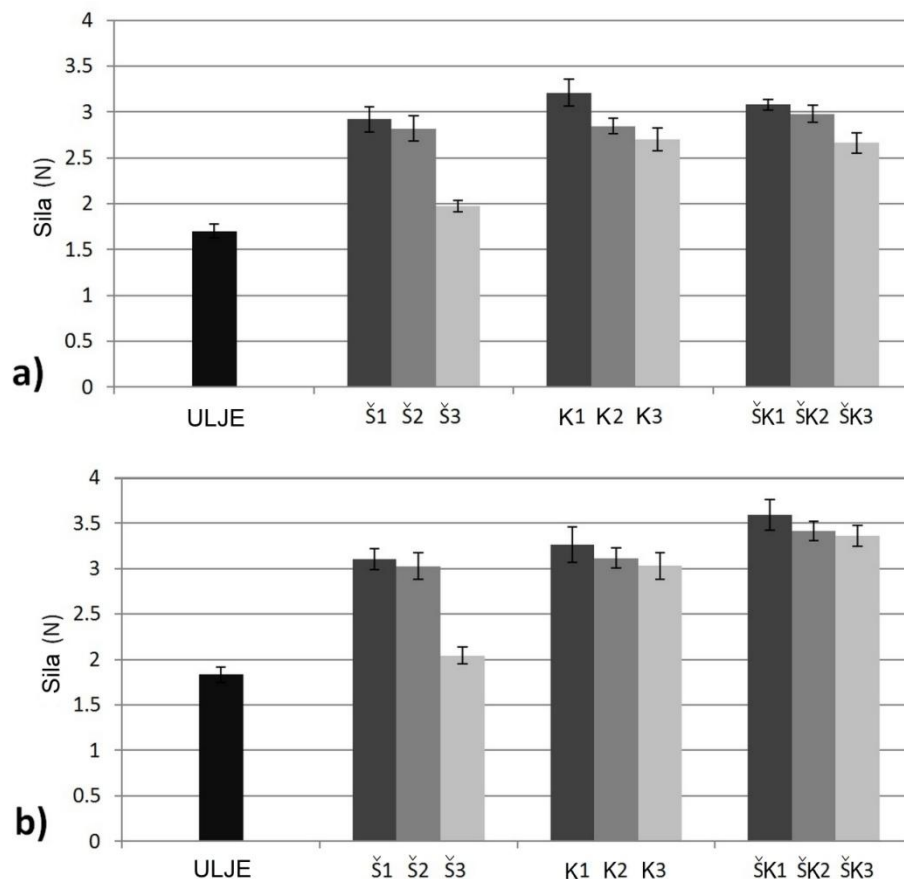
5.4. Karakterizacija modela čokolade

Korišćeni model čokolade je imao za cilj da se utvrdi uticaj veličine najzastupljenijih čvrstih čestica, šećera i kakao praha na kristalizaciju masne faze u čokoladi. Razlog upotrebe palminog ulja u izradi modela čokolade jeste što je to najčešće upotrebljavano biljno ulje u hrani, pa i u konditorskim proizvodima (178).

5.4.1. Teksturne karakteristike modela čokolade

Teksturne karakteristike, poput čvrstoće, imaju jednu od ključnih uloga u određivanju konzistencije konditorskih proizvoda (179,180). Čvrstoća i konzistencija zajedno predstavljaju parametre tvrdoće (181). Tvrdoća određuje teksturne osobine proizvoda i utiče na senzorne osobine proizvoda, lomljivost, krutost, koje su značajne za izbor proizvoda od strane potrošača. Prihvatljivost od strane potrošača je jedan od osnovnih ciljeva proizvodnje hrane željenih teksturnih karakteristika (182). Ispitivanja koja su se odnosila na procenu fizičkih osobina različitih konditorskih proizvoda su se u velikoj meri zasnivala upravo na različitim teksturnim analizama (19,20).

U ovom istraživanju su izrađene suspenzije upotrebom palminog ulja kao kontinualne faze u kojoj su suspendovane čvrste čestice. Količina čvrstih čestica je u svim uzorcima bila ista, ali su se razlikovali vrsta čvrstih čestica kao i njihove veličine. Grafik 10. prikazuje uticaj različitih veličina čestica na tvrdoću nakon jednog i nakon sedam dana praćenja.



Grafik 10. Uticaj prisustva različitih veličina čestica šećera (Š), kakao praha (K) i njihove mešavine (ŠK) na čvrstoću uzoraka nakon a) 24 časa i b) 7 dana praćenja. Standardna devijacija je predstavljena na svakom stubiću i njena vrednost je bila manja od 5% srednje vrednosti za svaki od uzoraka (oznake 1, 2 i 3 ukazuju na različite veličine čestica šećera i kakao praha, od najmanje do najveće).

Mali, ali statistički značajan porast u tvrdoći tokom 7 dana praćenja je zabeležen jedino kod uzoraka koji su sadržali mešavinu kakao praha i šećera (ŠK1, ŠK2 i ŠK3). Prema tome, može da se zaključi da je tekstura uzoraka bila relativno stabilna tokom perioda praćenja. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim ispitivanjima u kojima je tvrdoća palminog ulja porasla nakon 24 časa praćenja, kao i nakon 7 dana, ali samo u slučaju kada je primenjeno vrlo sporo hlađenje uzoraka, kao što je bilo i u ovom istraživanju (91).

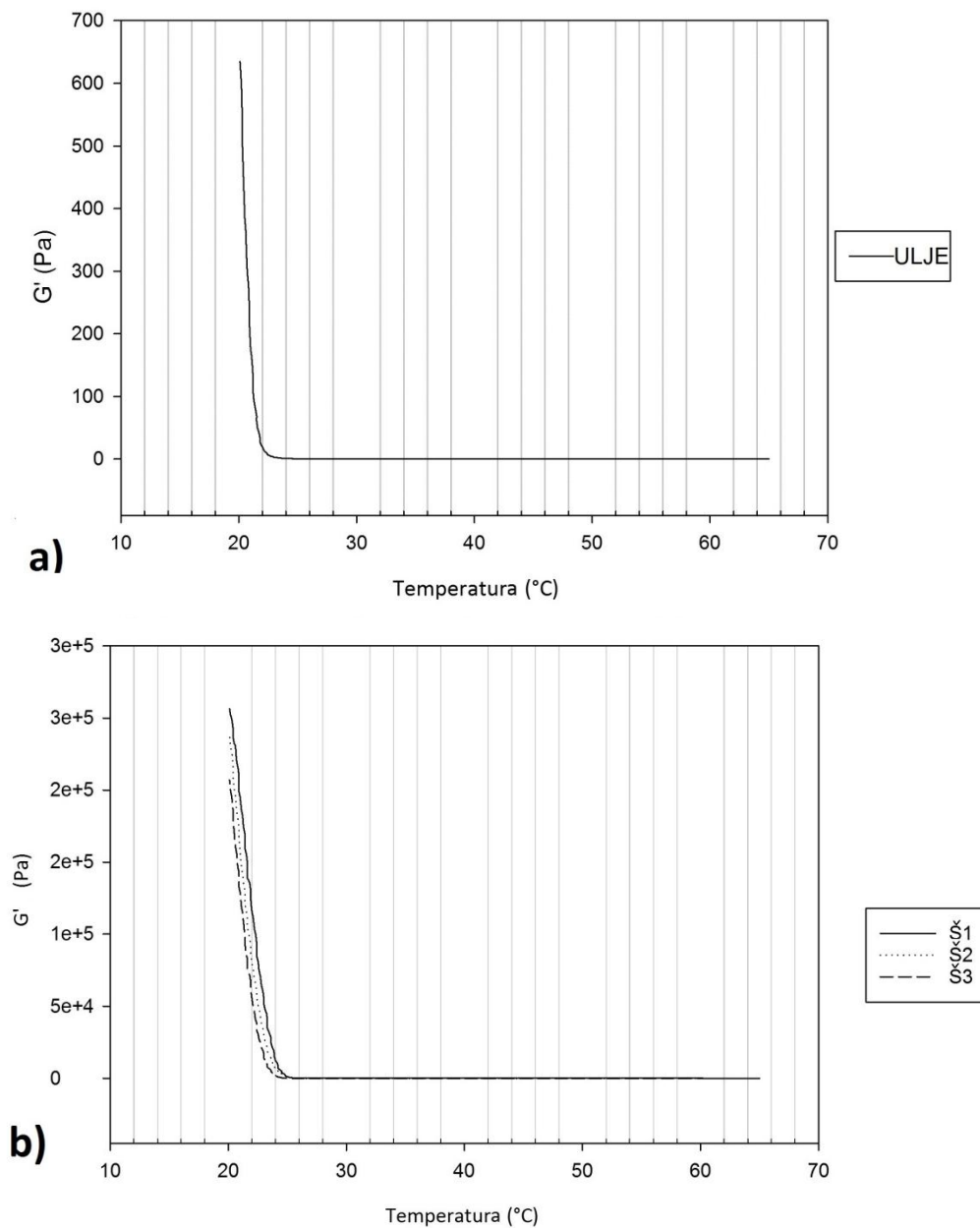
Kod mešavina koje su sadržale najmanje čestice (uzorci Š1, K1 i ŠK1) je izmeren najviši nivo tvrdoće u poređenju sa uzorcima koji su sadržali veće čestice (uzorci Š2, Š3, K2, K3 i ŠK2,

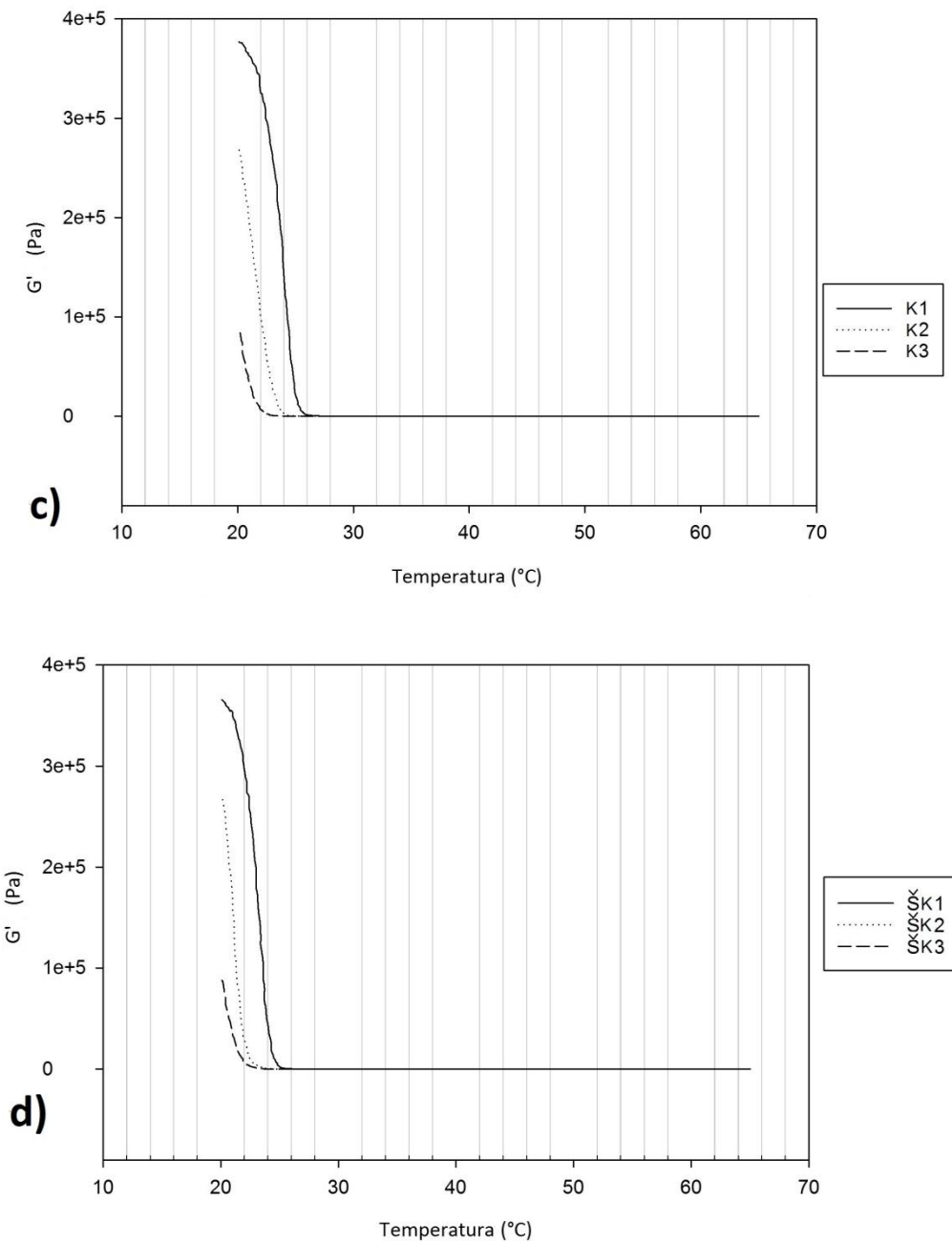
ŠK3, redom), nakon i 24 časa i 7 dana praćenja. Uzorci koji su sadržali kombinacije oba tipa čestica (ŠK uzorci) sa najmanjim veličinama čestica su pokazali značajan porast tvrdoće u poređenju sa uzorcima koji su sadržali samo šećer ili samo kakao prah, nakon 7 dana praćenja. Manje čestice dovode do veće tvrdoće kristalizovane masne faze, što je u saglasnosti sa rezultatima prethodnih studija gde se takođe vidi da su veličina čestica i tvrdoća uzoraka obrnuto srazmerni (179,183).

Veličina čestica se pokazala kao izuzetno važan faktor kad je u pitanju tvrdoća kristalnih struktura u konditorskim proizvodima, odnosno u svim proizvodima koji sadrže slične masti koje kristalizuju (184,185). U konditorskim proizvodima, čestice su uglavnom manje od 50 μm (19), te se povećanje otpora čvrstih čestica ka proticanju i posledično povećana tvrdoća objašnjavaju činjenicom da masna faza ispunjava prostor između čvrstih čestica dok je proizvod otopljen, odnosno u tečnom stanju. Navedeni efekat je najizraženiji u sistemima koji sadrže izrazito sitne čestice (19,179). Povezanost veličine čestica i tvrdoće uzoraka se može objasniti i jačinom međučestičnih veza (185) jer su one direktno odgovorne za mehaničke osobine i snagu materijala kom pripadaju. Afoakwa i sar. (179) su pokazali da smanjenje veličine čvrstih čestica značajno utiče na povećanje tvrdoće crne čokolade, što je uzrokovano porastom interakcija između čvrstih čestica. Isti autori su u narednom istraživanju (21) tvrdoću opisali u funkciji specifične površine i dobijene vrednosti objasnili međučestičnim interakcijama. Manje čestice imaju veću ukupnu specifičnu površinu, što dovodi do izraženijih međučestičnih interakcija. Specifična površina je proporcionalna slobodnoj površinskoj energiji, tako da veća specifična površina uzrokuje veću slobodnu površinsku energiju (186). U cilju smanjenja slobodne energije i stabilizacije sistema, čestice teže da se organizuju u flokule, što dovodi do povećanja tvrdoće materijala. Opisani vid međučestične interakcije se poklapa sa nalazima i objašnjava vrednosti tvrdoće modela dobijenih u ovom istraživanju.

5.4.2. Reološke karakteristike modela čokolade

Na grafiku 11 je predstavljeno ponašanje elastičnog modula (G') tokom hlađenja uzoraka sa 65 na 20 °C. Nagli porast vrednosti G' predstavlja početak kristalizacije uzoraka.





Grafik 11. Vrednosti elastičnog modula (G') tokom hlađenja sa 65 na 20 °C uzoraka **a)** palminog ulja, i sa dodatim **b)** šećerom, **c)** kakao prahom, i **d)** mešavinom šećera i kakao praha.

Grafik 11 prikazuje da se inicijalni porast vrednosti elastičnog modula javio na najvišoj temperaturi kod uzoraka sa najmanjim veličinama čestica (Š1, K1 i ŠK1), na nešto nižoj kod uzoraka sa srednjim veličinama čestica (Š2, K2 i ŠK2), dok se porast vrednosti elastičnog modula javio najkasnije, odnosno na najvišoj temperaturi, kod uzoraka sa najvećim česticama (Š3, K3 i ŠK3). Početne temperature kristalizacije svih uzoraka su prikazane u tabeli 18. Iz tabele se jasno vidi da uzorci koji sadrže čestice manjih veličina kristalizuju na višim temperaturama u poređenju sa uzorcima koji sadrže veće čestice. Fernandes i sar. (16) su ,pokazali da manje čestice dovode do brže kristalizacije, što je u skladu sa našim rezultatima.

Tabela 18. Početne temperature kristalizacije za uzorke modela čokolade

Uzorak	Početna temperatura kristalizacije (°C)
ULJE	22,76 ± 0,960 ^a
Š1	26,01 ± 0,006 ^b
Š2	25,17 ± 0,160 ^c
Š3	25,09 ± 0,115 ^c
K1	27,51 ± 1,250 ^d
K2	25,39 ± 0,265 ^c
K3	24,14 ± 0,965 ^e
ŠK1	27,51 ± 0,208 ^d
ŠK2	26,67 ± 1,096 ^b
ŠK3	25,31 ± 0,316 ^c

a, b, c, d, e Srednje vrednosti ± standardna devijacija početnih temperatura kristalizacije, se međusobno razlikuju značajno ($p < 0,05$), ukoliko sadrže različita slova u eksponentu

Čvrste čestice mogu da imaju ulogu centara kristalizacije, nukleusa, od kojih započinje kristalizacija. Uzorci koji sadrže čestice malih veličina (Š1, K1 i ŠK1) sadrže veći broj centara kristalizacije u istoj zapremini, što dovodi do kristalizacije materijala ranije, odnosno na višoj temperaturi u poređenju sa uzorcima koji sadrže veće čestice. Opisani efekat je bio izraženiji kod uzoraka koji sadrže samo kakao prah (grafik 11c) i koji sadrže mešavinu šećera i kakao praha (grafik 11d) u poređenju sa uzorcima koji sadrže samo šećer (grafik 11b). Dobijeni rezultati se ne mogu objasniti samo uticajem veličine čestica, pošto su čestice šećera u pripremi uzoraka bile

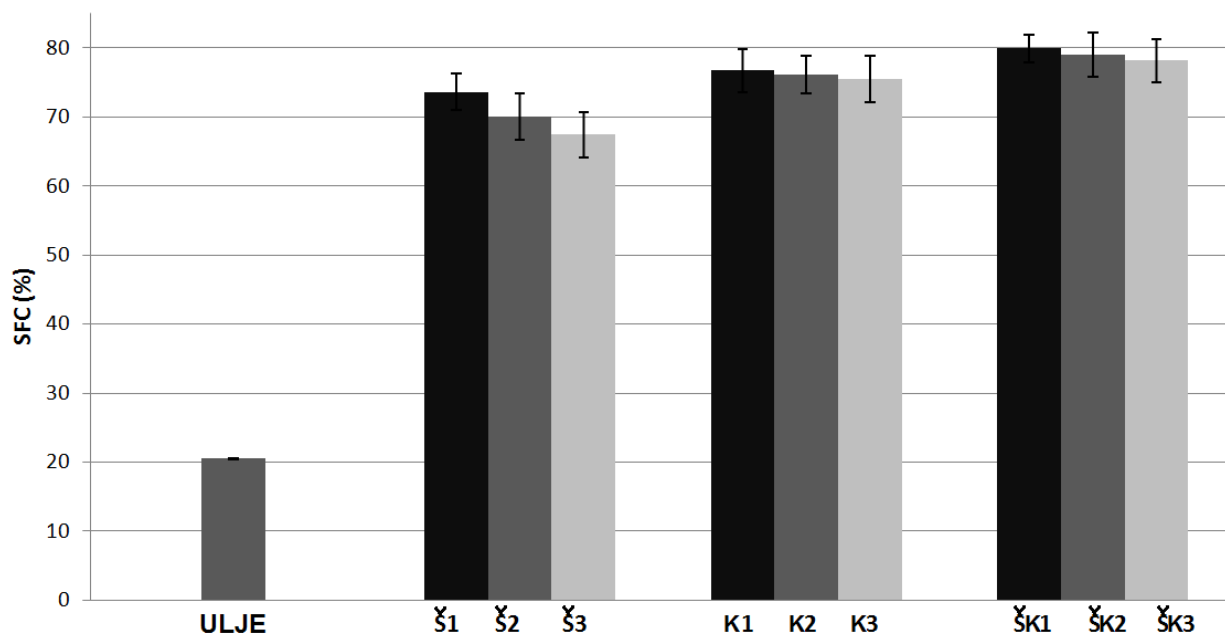
sitnije od čestica kakao praha (videti tabelu 7). Zaključuje se da su čestice kakao praha bolji promotori kristalizacije od šećera.

Iako su različite veličine čestica imale uticaj na početak kristalizacije, ipak nisu uticale na dalju kristalizaciju, odnosno, nagli porast vrednosti elastičnog modula, G' , je uočen kod svih uzoraka. Dobijeni rezultati ukazuju da manje čestice ubrzavaju proces kristalizacije i utiču na povećanje viskoziteta ispitivanih sistema.

5.4.3. Sadržaj čvrstih masti u uzorcima modela čokolade

Sadržaj čvrstih masti (SFC) predstavlja frakciju masti u uzorku koju je moguće odrediti primenom pulsne nuklearne magnetne rezonance (187). SFC u čokoladi zavisi od sastava masne faze i od kristalizacije masne faze (88). Merenje pomenutog parametra se obavlja jer sadržaj čvrstih masti predstavlja jedan od najvažnijih faktora koji utiču na funkcionalnost masti. Teksturine osobine čokolade, poput lomljivosti, čvrstoće, otpornosti na zagrevanje, ukusa, se mogu predvideti određivanjem SFC (188).

Na grafiku 12 su predstavljeni rezultati izmerenog sadržaja čvrstih masti u uzorcima nakon 7 dana praćenja.



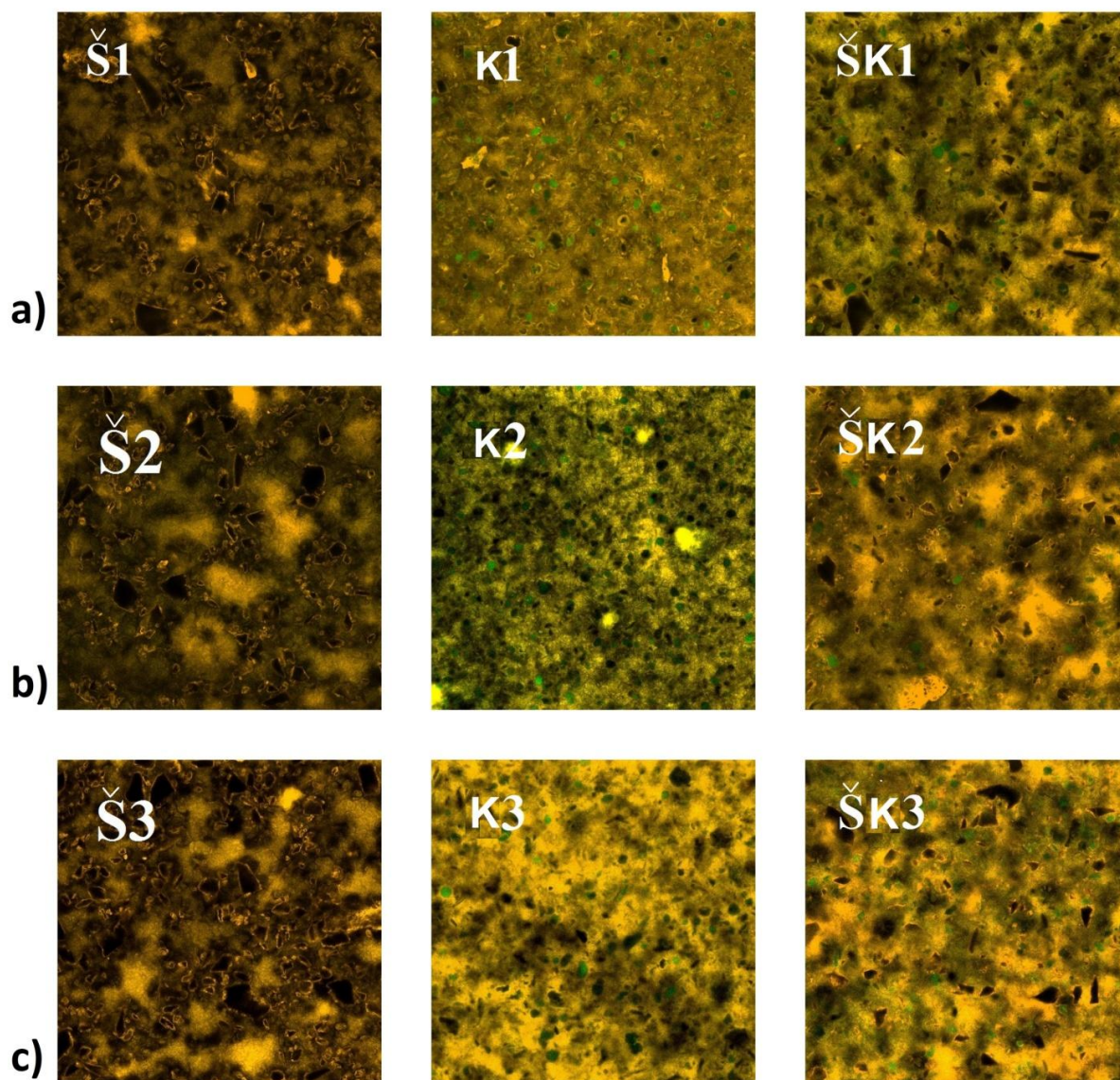
Grafik 12. Sadržaj čvrstih masti (SFC) u uzorcima modela čokolade nakon 7 dana praćenja.

Jedine značajne razlike u SFC su primećene kod uzoraka koji sadrže samo šećer (Š1, Š2 i Š3). Uzorci sa najmanjim česticama su imali ujedno i najviši sadržaj čvrstih masti. Kod ostalih uzoraka nije primećena statistički značajna razlika.

Tokom sporog hlađenja, kakvo je sprovedeno u ovom eksperimentu, molekuli masne faze se organizuju u lamele, što dovodi do građenja stabilne, koherentne kristalne mreže. Organizacija i raspored molekula masne faze zavisi, pre svega, od sastava masti ili ulja (189). Prisustvo bilo kakvih nečistoća može imati značajan uticaj na razvoj kristalizacije. U ovom istraživanju je ipak pokazano da dodatak čvrstih čestica nema značajan uticaj na sadržaj čvrstih masti. Povećanje vrednosti SFC u odnosu na kontrolni uzorak je posledica većeg sadržaja čvrstih čestica (šećera i kakao praha), što znači da pomenuti faktor ne može da objasni povećanje čvrstoće uzoraka nakon dodatka šećera i kakao praha (grafik 10). Zbog toga je za pronalaženje razloga za porast čvrstoće uzoraka urađena i analiza mikrostrukture ohlađenih uzoraka u kojoj se vidi kristalizovana masna faza.

5.4.4. Mikrostruktura modela čokolade

Mikrostruktura kristalne rešetke masne faze ima značajnog uticaja na fizičke osobine konditorskih proizvoda (190). Na slici 16 su prikazani svi uzorci snimljeni konfokalnom laserskom mikroskopijom. Tamna senka na slici predstavlja kristalnu rešetku masne faze (očvrslog ulja), dok je ulje u tečnom stanju žute boje. Zelene tačke predstavljaju kakao prah, a crni kristalni oblici su kristali šećera.



Slika 16. Slike uzoraka modela čokolade sa a) najmanjom, b) srednjom i c) najvećom veličinom čvrstih čestica dobijene primenom konfokalne laserske mikroskopije

Uljana kristalna rešetka je gušća i homogenija u uzorcima sa najmanjim česticama (Š1, K1 i ŠK1, slika 16a), a nešto je ređa kod uzoraka sa srednjom veličinom čestica (Š2, K2 i ŠK2, slika 16b), dok su kod uzoraka sa najvećim česticama (Š3, K3 i ŠK3, slika 16c) primetne najređa i najmanje prisutna kristalna rešetka i najveće površine nekristalizovanog, tečnog ulja. Mogući uzrok opisanih rezultata je uticaj veličine čestica na kinetiku kristalizacije masne faze: manje čestice dovode do brže kristalizacije zahvaljujući većem broju nukleusa koji promovišu kristalizaciju, što zatim dovodi do stvaranja homogenije i gušće pakovane kristalne rešetke. Studije na palminom ulju su dale slične rezultate. Gregersen i sar. su utvrdili da je brža kinetika kristalizacije izazvana promenom ritma hlađenja (191).

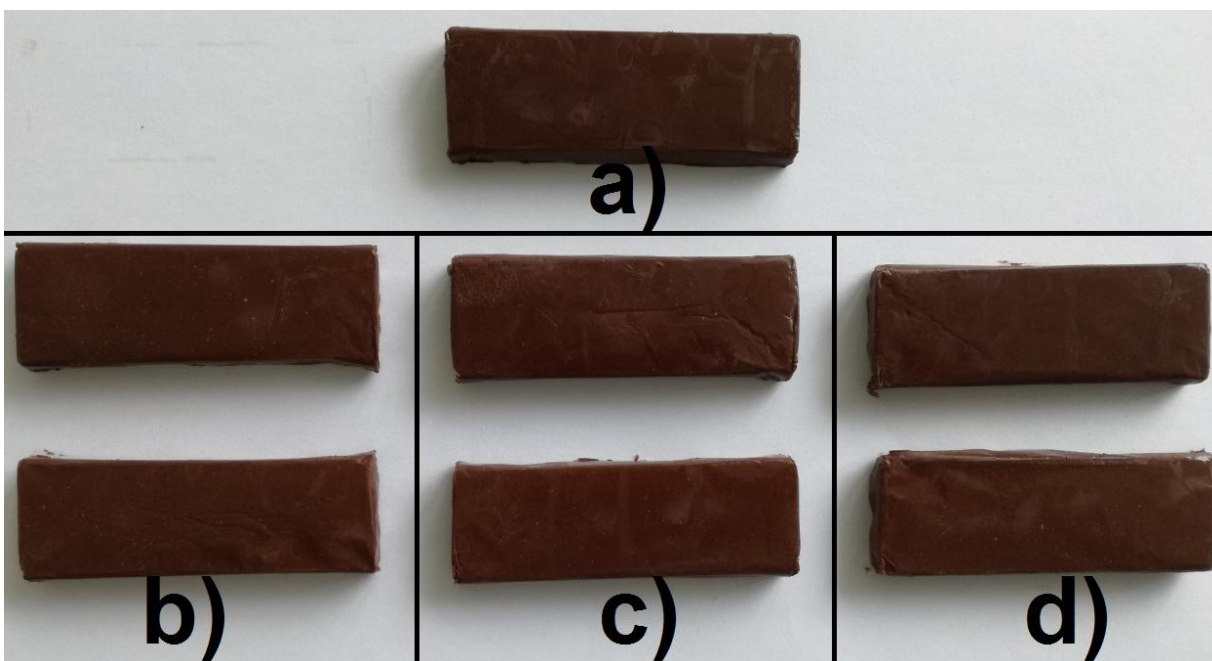
Ukoliko se posmatraju dva sistema sa jednakim sadržajem masne faze, ali sa različitim veličinama čvrstih čestica, u njima će doći do razlike u međučestičnim interakcijama. Osnovne sile koje stabilizuju ove sisteme su van der Waals-ove sile (192), ali one nisu jedine koje se javljaju (185). Te druge sile zavise od međučestičnih interakcija, a broj interakcija je direktno proporcionalan broju čestica. Što je kristalna rešetka gušća i homogenija, biće omogućen i veći broj interakcija unutar same rešetke. Pomenuta pojava može da objasni prethodno uočen porast čvrstoće u uzorcima sa najmanjim veličinama čestica, uprkos tome što nije zabeležena značajna razlika u sadržaju čvrstih masti u uzorcima.

Čestice kakao praha i kristalizovane čestice šećera se u sistemu orijentišu tako da ih okružuje uljana kristalna rešetka. Razlog ovome je ponašanje čvrstih čestica kao nukleusa od kojih kreće kristalizacija i stvaranje kristalne rešetke. Tečno ulje se na slici 16 može videti u oblastima gde nema kakao praha i kristala šećera, mada se kod uzoraka sa najvećim česticama (Š3, K3 i ŠK3, slika 16c) može videti po koja čvrsta čestica u oblastima nekristalizovanog, tečnog ulja.

Većinu kristala šećera (Š1, Š2, Š3, ŠK1, ŠK2 i ŠK3) okružuje tanak sloj tečnog ulja, dok se taj sloj ne vidi na snimcima uzoraka koji sadrže samo čestice kakao praha (K1, K2 i K3). Zaključuje se da čestice šećera nemaju interakcije sa uljanom kristalnom rešetkom u istoj meri u kojoj to imaju čestice kakao praha, što objašnjava zbog čega čestice kakao praha deluju kao bolji nukleusi u odnosu na šećer. Uprkos tome, veličina čestica šećera je i dalje imala značajan uticaj na mikrostrukturne karakteristike, kao i na finalnu čvrstoću uzoraka.

5.5. Karakterizacija čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja

Količine mikrokapsula ugrađene u čokoladu su odgovarale količinama ribljeg ulja od 40 i 80 mg/100 kcal čokolade. Na slici 17 su prikazani uzorci čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja u odnosu na kontrolni uzorak.



Slika 17. Pripremljeni uzorci čokolade: a) čista čokolada (kontrolni uzorak), i čokolada sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja kod kojih su kao omotač korišćeni proteini b) krompira, c) surutke i d) soje

5.5.1. Reološke karakteristike čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja

U farmaceutskoj i prehrambenoj industriji reološka merenja proizvoda u fazi ispitivanja, ali i u fazama proizvodnje proizvoda omogućavaju njegovu efikasnu kontrolu kvaliteta proizvoda i prilagođavanje uslova proizvodnje fizičkim i hemijskim karakteristikama datog

proizvoda (193). U tabeli 19. su predstavljeni reološki parametri uzoraka čokolade sa inkorporiranim mikro kapsulama ribljeg ulja u odnosu na čistu čokoladu. Krive proticanja su date na grafiku 13.

Tabela 19. Reološki parametri uzoraka čokolade sa inkorporiranim mikro kapsulama ribljeg ulja u odnosu na čistu čokoladu.

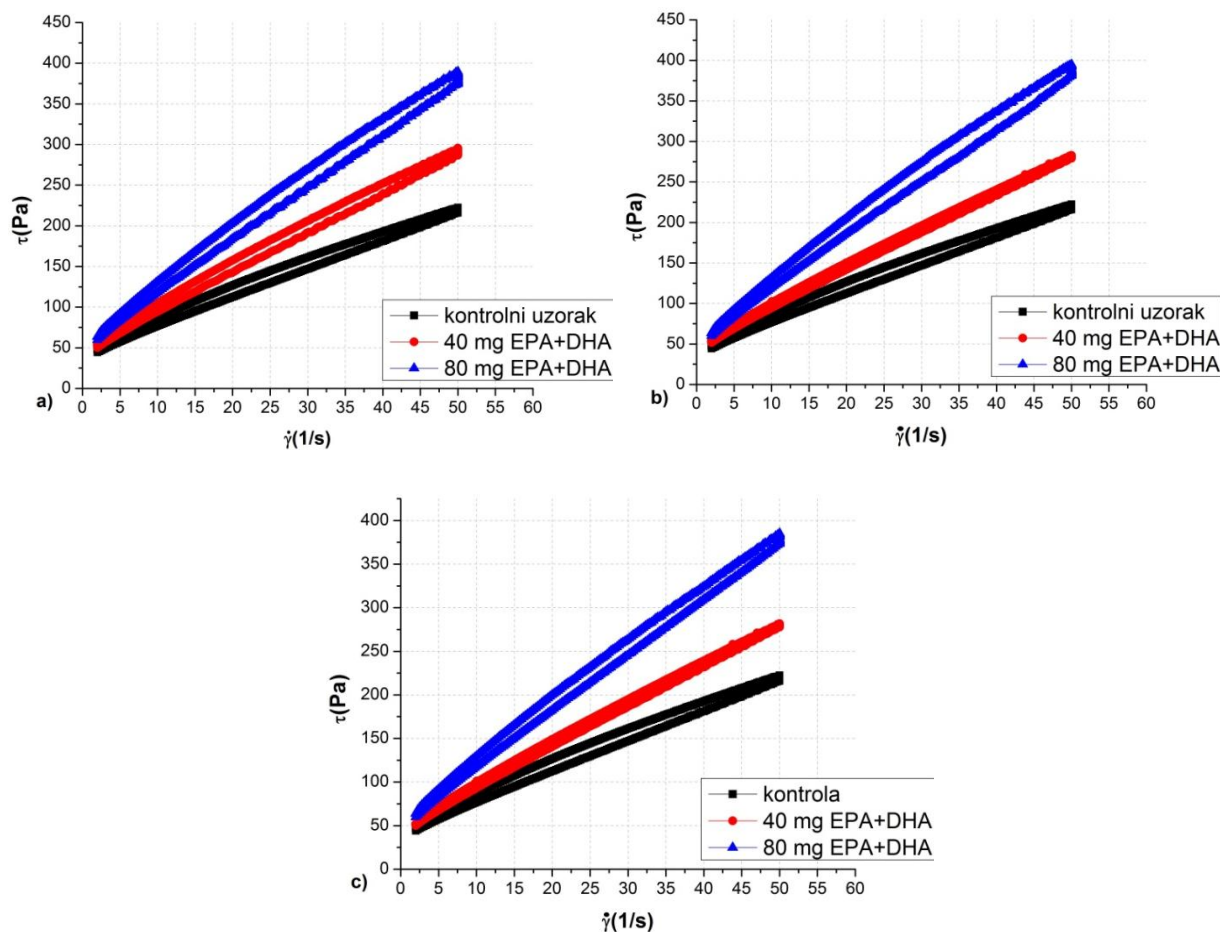
		Kasonov prinosni napon (Pa)	Kasonov plastični viskozitet (Pas)	Vrednosti oporavka sistema (Pas)
Kontrolni uzorak		4,688±0,194 ^{ab}	1,440±0,012 ^a	1,048±0,003 ^a
Sadržaj EPA+DHA 40 mg				
Protein korišćen kao omotač mikrokapsule	Krompir	4,716±0,037 ^{ab}	1,739±0,036 ^b	1,017±0,004 ^{bd}
	Surutka	4,614±0,030 ^a	1,738±0,020 ^b	1,036±0,008 ^{ac}
	Soja	4,651±0,067 ^a	1,736±0,015 ^b	1,027±0,006 ^{cde}
Sadržaj EPA+DHA 80 mg				
Protein korišćen kao omotač mikrokapsule	Krompir	4,838±0,054 ^b	2,124±0,024 ^c	1,013±0,010 ^b
	Surutka	4,837±0,093 ^b	2,089±0,023 ^c	1,035±0,004 ^c
	Soja	4,769±0,078 ^b	2,087±0,035 ^c	1,015±0,006 ^{be}

^{a, b, c, d, e} Srednje vrednosti ± standardna devijacija reoloških parametara uzoraka u istoj koloni se međusobno razlikuju značajno ($p < 0,05$), ukoliko sadrže različita slova u eksponentu

Iz tabele se vidi da su vrednosti Kasonovog plastičnog viskoziteta značajno veće kod svih uzoraka u odnosu na kontrolni uzorak, dok su vrednosti Kasonovog prinosnog napona veće u odnosu na kontrolu kod uzoraka kod kojih je dodato 80 mg EPA+DHA. Dobijeni rezultati za Kasonov plastični viskozitet su saglasni sa rezultatima dobijenim u sličnim ispitivanjima čokolade (167,194). Fernandes i sar. (16) su dobili vrednosti za Kasonov plastični viskozitet za čokoladu na 40 °C oko 1,10 Pas, slično rezultatima dobijenim u ovom istraživanju.

Razlog porasta viskoziteta i prinosnog napona nakon dodatka mikro kapsula može biti dodatak čvrstih čestica (mikrokapsula) u čokoladu, bez istovremenog povećanja količine masne faze. Kod uzoraka koji sadrže mikro kapsule dolazi do većeg broja međučestičnih interakcija,

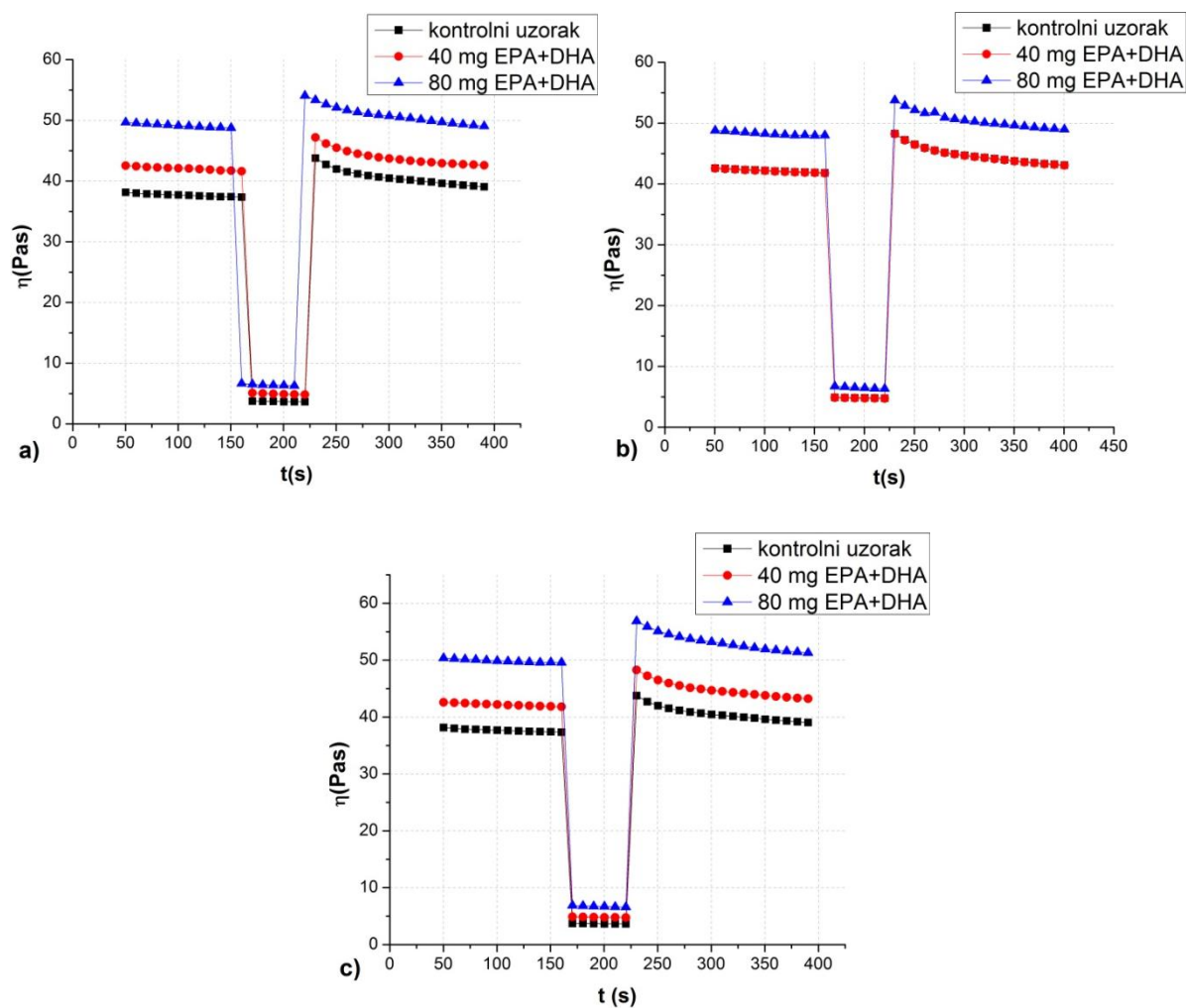
usled manje količine slobodne masne faze koja biva zarobljena u kristalnu mrežu između čestica, što ometa proticanje celog sistema i dovodi do porasta viskoziteta (167).



Grafik 13. Krive proticanja čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja kod kojih je kao omotač mikrokapsula korišćen protein a) krompira, b) soje i c) surutke.

Postoji i značajna razlika između uzoraka u koje su dodate mikrokapsule u količini koja odgovara 40 mg EPA+DHA po 100 kcal i uzoraka u koje su dodate mikrokapsule koje sadrže 80 mg EPA+DHA na 100 kcal. Porast prinosnog napona i plastičnog viskoziteta je uzrokovan većim brojem čvrstih čestica. Razlike koje se javljaju između uzoraka koji sadrže mikrokapsule sa različitim proteinima kao omotačima su previše male da bi im se pridavao značaj u smislu celokupnog ponašanja sistema.

Na grafiku 14. se vidi ponašanje sistema prilikom izvođenja testa oporavka.

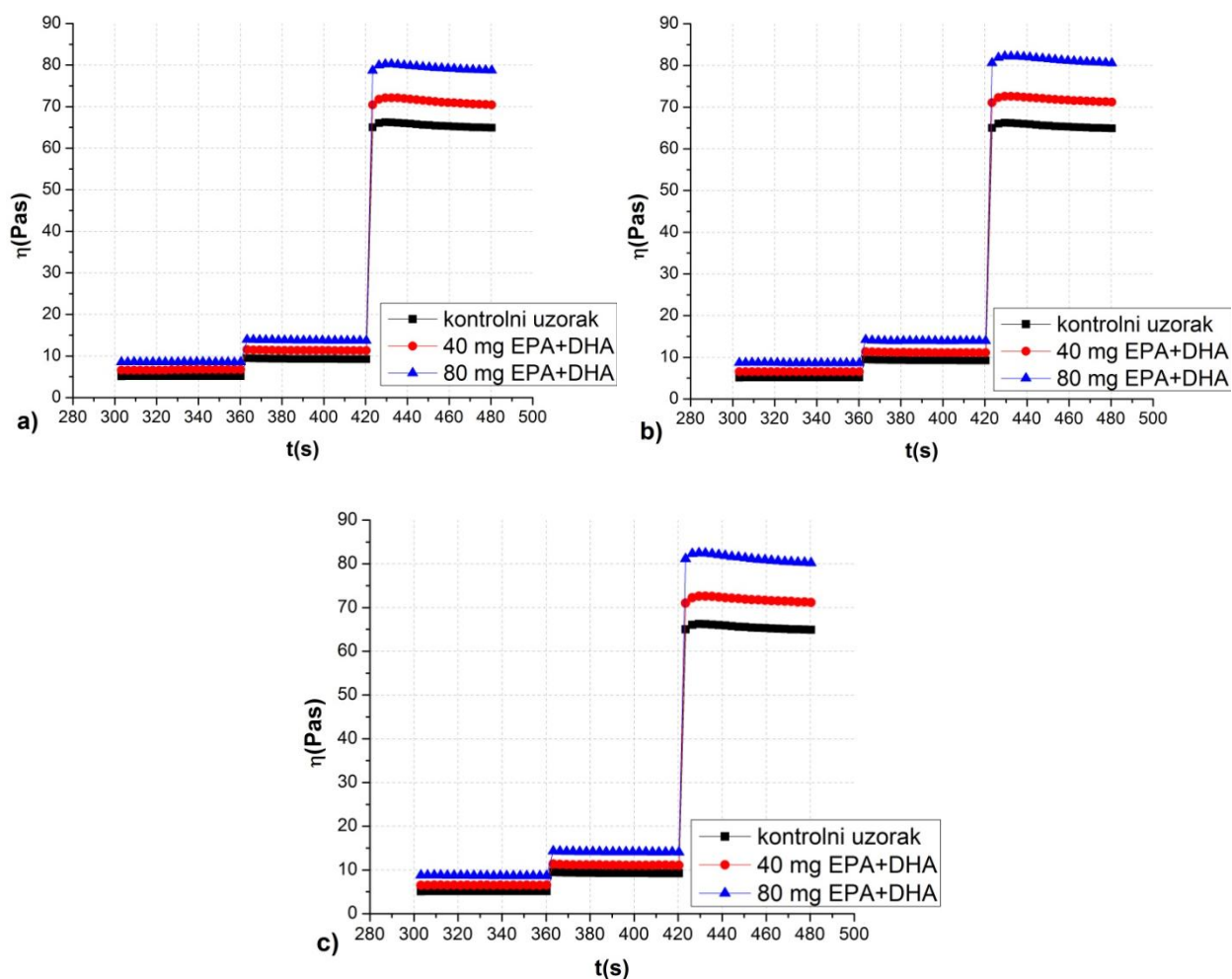


Grafik 14. Ponašanje sistema prilikom izvođenja testa oporavka na uzorcima čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja kod kojih je kao omotač mikrokapsula korišćen protein a) krompira, b) soje i c) surutke.

Kod svih uzoraka prisutan je oporavak strukture nakon izlaganja sistema stresu (grafik 14, tabela 19). Dodatak mikrokapsula smanjuje vrednosti oporavka sistema u odnosu na čistu čokoladu, ali u ovom slučaju nema uticaja u tehnološkim procesima proizvodnje čokolade.

Na grafiku 15 je prikazano ponašanje uzoraka prilikom izvođenja 3-step testa. Merenje prividnih viskozитета pri različitim brzinama smicanja predstavlja simulaciju ponašanja sistema u različitim tehnološkim procesima (195):

- merenje pri brzini od $25,0 \text{ s}^{-1}$ simulira velike brzine koje se primenjuju prilikom raspršivanja čokolade, što se najčešće koristi u prelivanju dezerta;
- merenje pri brzini od $7,0 \text{ s}^{-1}$ simulira proces temperiranja i mešanja čokoladne mase;
- merenje pri brzini od $0,54 \text{ s}^{-1}$ simulira vrlo sporo kretanje čokolade koje se odvija prilikom izlivanja čokolade u kalupe.



Grafik 15. Ponašanje sistema prilikom izvođenja “3-step” testa na uzorcima čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja kod kojih je kao omotač mikrokapsula korišćen protein a) krompira, b) soje i c) surutke.

Kod sva tri uzorka, ponašanje pri brzinama od 25 i 7,0 s⁻¹ gotovo je isto kao kod kontrolnog uzorka, odnosno čiste čokolade (grafik 15). Bez obzira na količinu dodatih mikrokapsula, svi uzorci bi mogli da prođu tehnološke procese mešanja, temperiranja i raspršivanja. Izlaganje uzoraka najmanjoj brzini povećava prividni viskozitet čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama u odnosu na kontrolu, što ukazuje da bi se ovaj tip uzoraka teže razlivao u kalupe.

5.5.2. Teksturne karakteristike čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja

Reološke osobine čokolade se ogledaju u njenoj teksturi. Od teksture čokolade će zavistiti proizvodnja, održivost na tržištu i prihvatljivost proizvoda od strane potrošača (88). Tekstura obuhvata mehanička i geometrijska svojstva hrane. U mehanička svojstva spadaju čvrstoća, lomljivost, kohezivnost, žvakljivost, viskoznost, elastičnost, dok se geometrijska svojstva odnose na veličinu i raspored, oblik i orijentaciju čestica. Pošto je razlika između navedenih karakteristika mala, i one zavise jedna od druge, čvrstoća se posmatra kao funkcija gustine, dok je lomljivost u funkciji geometrije proizvoda (196). Kod čokolade je potrebno da je vrednost lomljivosti što manja, što bi ukazivalo na krt prelom. Veća vrednost lomljivosti znači da je čokolada mekša i nema izražen krt prelom koji je karakteristika crne čokolade.

U tabeli 20 su prikazani rezultati čvrstoće i lomljivosti uzoraka. Čvrstoća je izražena kao maksimalna sila potrebna za lomljenje uzorka, dok je lomljivost izražena u razdaljini koju je potrebno preći da bi došlo do slamanja.

Tabela 20. Vrednosti čvrstoće i lomljivosti čiste čokolade i čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja, koristeći različite proteine kao omotače mikrokapsula

		Čvrstoća (N)	Lomljivost (mm)
Kontrolni uzorak		9,847±0,653 ^a	78,384±0,441 ^a
Sadržaj EPA+DHA 40 mg			
Protein korišćen kao omotač mikrokapsule	Krompir	14,519±0,020 ^b	79,711±0,269 ^b
	Surutka	12,848±0,743 ^{bc}	79,162±0,238 ^b
	Soja	13,782±1,156 ^{bc}	79,020±0,297 ^{ab}
Sadržaj EPA+DHA 80 mg			
Protein korišćen kao omotač mikrokapsule	Krompir	13,671±0,277 ^b	79,462±0,228 ^b
	Surutka	11,895±1,610 ^c	79,238±0,358 ^b
	Soja	13,019±0,229 ^{bc}	79,375±0,233 ^b

^{a, b, c} Srednje vrednosti ± standardna devijacija vrednosti čvrstoće i lomljivosti, u istoj koloni, se međusobno razlikuju značajno ($p < 0,05$), ukoliko sadrže različita slova u eksponentu

Inkorporiranje mikrokapsula u čokoladu dovelo je do povećanja čvrstoće, kao i do povećanja vrednosti za lomljivost, odnosno čokolada je imala manje izražen krt prelom (tabela 20). Vrednosti za čvrstoću se značajno razlikuju od kontrolnog uzorka, dok se kod vrednosti za lomljivost jedino čokolada sa inkorporiranim mikrokapsulama soje u količini od 40 mg EPA+DHA nije značajno razlikovala od kontrole. Prikazani rezultati su u skladu sa istraživanjima Agibert i Lannes gde je takođe zabeleženo povećanje čvrstoće uzoraka crne čokolade u koje su dodate mikrokapsule ulja kikirikija (167).

Kada je u pitanju uticaj tipa proteina koji je korišćen kao omotač mikrokapsula, statistički značajna razlika je zabeležena jedino kod uzoraka sa sadržajem od 40 mg EPA+DHA na 100 kcal proizvoda i to između proteina krompira i surutke, što je, iako statistički značajno, bez većeg značaja za teksturne osobine čokolade, jer se sve dobijene vrednosti za parametre teksture nalaze u okviru očekivanih vrednosti za crnu čokoladu (197).

5.5.3. Određivanje boje čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja

Boja proizvoda u značajnoj meri utiče na prihvatljivost prehrambenog ili dijetetskog proizvoda od strane potrošača. Rezultati ispitivanja boje čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja i kontrolnog uzorka (čista čokolada) prikazani su u tabeli 21. Boja je opisana parametrima L^* , a^* i b^* , gde je L^* parametar boje kojim se meri svetloća uzorka i njegove vrednosti se kreću od 0 (najtamnije, crno) do 100 (najsvetlije, belo). Parametri a^* i b^* predstavljaju razliku između zelene ($-a^*$) i crvene ($+a^*$), odnosno plave ($-b^*$) i žute ($+b^*$) nijanse (198,199). Indeks beline, (engl. *whiteness index*; *WI*) je prikazan u tabeli 21. Indeks beline se, prema autorima Lohman i Hartel, dobija računskim putem, objedinjavanjem parametara boje (124):

$$WI = 100 - [(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2]^{0,5} \quad (10)$$

Tabela 21. Parametri boje kontrolnog uzorka čokolade i čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja, gde su kao omotači mikrokapsula upotrebljeni proteini krompira, soje i surutke

Parametri boje		L^*	a^*	b^*	WI
Kontrolni uzorak		29,642±0,389 ^a	7,642±0,143 ^a	5,088±0,185 ^a	29,045±0,284 ^a
Sadržaj EPA+DHA 40 mg					
Protein korišćen kao omotač mikrokapsule	Krompir	31,078±0,335 ^b	8,098±0,124 ^b	5,172±0,181 ^a	30,411±0,114 ^b
	Surutka	31,982±0,519 ^c	8,068±0,098 ^b	4,81±0,158 ^a	31,336±0,205 ^c
	Soja	31,936±0,766 ^c	8,186±0,250 ^b	5,236±0,449 ^a	31,246±0,074 ^c
Sadržaj EPA+DHA 80 mg					
Protein korišćen kao omotač mikrokapsule	Krompir	33,566±0,529 ^d	8,738±0,234 ^c	6,046±0,470 ^b	32,721±0,544 ^d
	Surutka	33,724±0,540 ^d	9,004±0,078 ^d	6,252±0,205 ^b	32,823±0,072 ^d
	Soja	33,178±0,616 ^d	9,028±0,103 ^d	6,236±0,281 ^b	32,283±0,145 ^d

^{a, b, c, d} Srednje vrednosti ± standardna devijacija parametara boje, u istoj koloni, se međusobno razlikuju značajno ($p < 0,05$), ukoliko sadrže različita slova u eksponentu

Posmatrajući parametar svetloće, L^* , uočava se da dodatak mikrokapsula značajno utiče na povećanje njegovih vrednosti, odnosno da su uzorci sa dodatim mikrokapsulama svetliji u odnosu na čistu čokoladu za oba sadržaja EPA+DHA. Uticaj dodatka mikrokapsula u crnu čokoladu na povećanje vrednosti parametra L^* već je zabeležen u literaturi (167).

Sve vrednosti parametra a^* (udeo crvene komponente) se značajno razlikuju u odnosu na kontrolni uzorak. Kod parametra b^* razlika postoji jedino pri dodatku mikrokapsula koje sadrže 80 mg EPA+DHA na 100 kcal. Dodatak mikrokapsula sa manjom količinom EPA+DHA (40 mg) nije uticao na promenu vrednosti parametra b^* u odnosu na čistu čokoladu.

Kod svih uzoraka je primećen uticaj količine mikrokapsula na parametre boje. Dodatak mikrokapsula u količini koja sadrži 80 mg EPA+DHA na 100 kcal je kod svih vrsta proteina doveo do promene u parametrima u odnosu na dodatak mikrokapsula koje sadrže 40 mg EPA+DHA.

Vrsta proteina koji je korišćen kao omotač mikrokapsula uticala je jedino na parametar L^* kod mikrokapsula koje sadrže 40 mg EPA+DHA, i na vrednosti parametra a^* , pri dodatku mikrokapsula koje sadrže 80 mg EPA+DHA. U oba slučaja, razlika se uočava samo kod mikrokapsula kod kojih je kao omotač korišćen protein krompira.

Indeks beline se koristi u cilju procene procesa sivljenja čokolade, uzrokovanog migracijom masti iz čokolade na površinu. Viša vrednost ovog indeksa označava belju površinu čokolade i pojavu sivljenja čokolade (200,201). Prema dosadašnjim istraživanjima, vrednosti WI između 20 i 30 su optimalne za boju čokolade odmah nakon izrade (202), a sve dok vrednosti WI ne prelaze 35, smatra se da sivljenje čokolade nije značajno, odnosno da nema migracije masti na površinu u dovoljnoj meri da bi izazvala sivljenje i značajniju promenu boje (203,204).

Povećanje vrednosti WI pri dodatku mikrokapsula prikazano je u tabeli 21. Vrednosti WI rastu sa porastom količine dodatih mikrokapsula. Vrednosti WI su veće kada su dodate mikrokapsule u količini koja sadrži 80 mg EPA+DHA, u odnosu na mikrokapsule koje sadrže 40 mg EPA+DHA na 100 kcal, verovatno zbog fizičkih karakteristika samih mikrokapsula koje su beličaste boje. Povećanje vrednosti WI može da bude i posledica uticaja dodatka mikrokapsula na rekristalizaciju masti u čokoladi (201).

Vrednosti WI su nakon dodatka mikrokapsula veće za 1 do 3 podeoka u odnosu na kontrolni uzorak. Agibert i Lannes su utvrdili da je vrednost WI čokolade porasla nakon dodatka mikrokapsula kikirikijevog ulja (167), i to za 1 do 2 podeoka, u zavisnosti od vremena mešanja, u odnosu na crnu čokoladu. Erdem i sar. su takođe zabeležili povećanje vrednosti WI nakon dodatka maltodekstrina i vlakana limuna u crnu čokoladu (205). U navedenim istraživanjima, povećanje vrednosti WI nije dovelo do značajnog uticaja na boju i sveukupni izgled čokolade.

Najviša zabeležena vrednost WI u uzorcima u ovom istraživanju je iznosila $32,823 \pm 0,072$ kod čokolade u koju su dodate mikrokapsule sa sadržajem EPA+DHA od 80 mg i gde je kao omotač mikrokapsula korišćen protein surutke. S obzirom na to da nijedna zabeležena vrednost nije prelazila 35, povećanje indeksa beline nije značajno uticalo na promenu boje, niti na sveukupni izgled čokolade, što je bilo moguće potvrditi i vizuelnim pregledom gotovih uzoraka.

6. ZAKLJUČCI

U ovom istraživanju ispitivan je uticaj primene proteina u procesu mikrokapsulacije ribljeg ulja na osobine emulzija i mikrokapsula, zatim uticaj veličine čestica na kristalizaciju masne faze suspenzije koja se koristi za izradu konditorskih proizvoda, inkorporiranje dobijenih mikrokapsula u čokoladu i tehnološka funkcionalnost dobijenog finalnog proizvoda.

Na osnovu dobijenih rezultata istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

Proteini se ponašaju kao dobri emulgatori. Njihova sposobnost emulgovanja zavisi od niza faktora, među kojima su ključni rastvorljivost i aminokiselinski sastav. Od proteina ispitivanih u ovom istraživanju, stabilne emulzije daju proteini soje, surutke, graška i krompira, dok protein pirinča nema dobra emulgujuća svojstva. Procenat proteina u emulziji je jedan od faktora koji utiče na stvaranje stabilne emulzije, ali povećanje procenta proteina iznad 4% nema značajnog efekta na stabilnost emulzije.

Sušenje raspršivanjem predstavlja efikasan način za dobijanje mikrokapsula ribljeg ulja sa proteinima kao omotačima mikrokapsula. Dobijene mikrokapsule sa proteinima krompira, soje i surutke kao omotačima mikrokapsula su uniformnih veličina (najveći broj dobijenih mikrokapsula se kretao u rasponu od 1 do 8 μm), sfernog oblika, stabilne strukture, sa tek ponekom primećenom napuklom mikrokapsulom. Efikasnost mikrokapsulacije je iznosila preko 60% za sve korišćene proteine (kod proteina soje 73%), što je jednako, ili iznad uobičajenog proseka.

Oksidativna stabilnost ulja inkorporiranog u mikrokapsule se menja tokom vremena, ali ne dovoljno da bi narušila kvalitet mikrokapsule. Može se zaključiti da se primenom sušenja raspršivanjem dobijaju stabilne mikrokapsule ribljeg ulja, adekvatnih veličina. Dobijene mikrokapsule ne narušavaju značajnije oksidativnu stabilnost inkorporiranog ulja tokom 14 dana praćenja. Relativno visok prinos proizvoda primenom sušenja raspršivanjem čini ovu metodu adekvatnom za izradu mikrokapsula ribljeg ulja sa proteinima soje, surutke i krompira kao omotačima mikrokapsula.

Kristalizacija masne faze u suspenziji koja predstavlja model čokolade zavisi od veličine čvrstih čestica. Manje čestice dovode do brže kristalizacije masne faze, kao i do stvaranja najgušće i najhomogenije kristalne rešetke. Čestice kakao praha su se pokazale kao bolji promotori kristalizacije ulja od kristala šećera.

Ispitivane karakteristike čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja kod kojih su kao omotači korišćeni proteini soje, surutke i krompira su pokazale da postoje statistički značajne razlike u teksturnim, reološkim osobinama i boji proizvoda u odnosu na čistu čokoladu. Navedene razlike su veoma male i ne predstavljaju značajnost kad je u pitanju tehnološki proces izrade čokolade. Pomenuto važi i za razlike koje se javljaju između uzoraka kod kojih su kao omotači mikrokapsula korišćeni različiti proteini. Moguće je zaključiti da se mikrokapsule ribljeg ulja sa proteinima soje, surutke i krompira ponašaju kao inertni punioci u čokoladi i ne menjaju njene fizičko-hemijske i reološke karakteristike u meri koja bi uticala na proizvodni proces čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama u odnosu na čistu čokoladu.

Proizvodnja funkcionalnog proizvoda, čokolade sa inkorporiranim mikrokapsulama ribljeg ulja, tehnološki je moguća i opravdana.

7. LITERATURA

1. Feng H, Andrade J, Yildiz G, Gaur S, Engeseth NE, Ding J. Microencapsulation of docosahexaenoic acid (DHA) with four wall materials including pea protein-modified starch complex. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2018;114:935–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.175>
2. Novakovic B. Lipidi. In: Novakovic B, Jusupovic F, editors. *Ishrana i zdravlje*. Novi Sad: Medicinski fakultet Novi Sad; 2014. p. 51–61.
3. Shahidi F, Ambigaipalan P. Beverages fortified with omega-3 fatty acids, dietary fiber, minerals, and vitamins. In: Shahidi F, Alasalvar C, editors. *Handbook of functional beverages and human health*. Routledge; 2016. p. 801–13.
4. Hoffman DR, Boettcher JA, Diersen-Schade DA. Toward optimizing vision and cognition in term infants by dietary docosahexaenoic and arachidonic acid supplementation: A review of randomized controlled trials. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* [Internet]. 2009;81(2–3):151–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2009.05.003>
5. Hendler SS, Rorvik D. *PDR for nutritional supplements*. 2nd ed. Montvale, NJ: Thomson Reuters; 2008.
6. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific opinion on the tolerable upper intake level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid. *EFSA J*. 2012;10(7):2815.
7. Sohi H, Sultana Y, Khar RK. Taste masking technologies in oral pharmaceuticals: Recent developments and approaches. *Drug Dev Ind Pharm*. 2004;30(5):429–48.
8. Palmieri G, Bonacucina G, Di Martino P, Martelli S. Spray-drying as a method for microparticulate controlled release systems preparation: advantages and limits. I. Water-soluble drugs. *Drug Dev Ind Pharm*. 2001;27(3):195–204.
9. Chávez BE, Ledebøer AM. Drying of probiotics: Optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Dry Technol*. 2007;25(7–8):1193–201.

10. Shu B, Yu W, Zhao Y, Liu X. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *J Food Eng.* 2006;76:664–9.
11. Krishnan S, Bhosale R, Singhal R. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum Arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydr Polym.* 2005;61:95–102.
12. Wang R, Tian Z, Chen L. A novel process for microencapsulation of fish oil with barley protein. *Food Res Int* [Internet]. 2011;44(9):2735–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.013>
13. Lin LH, Lai YC, Chen KM, Li CS. Preparation and Surface Activities of Modified Soy Protein-Dextrin Surfactants. *J Surfactants Deterg.* 2016;19(1):19–28.
14. Rondel C, Portet B, Alric I, Mouloungui Z, Blanco JF, Silvestre F. Green production of anionic surfactant obtained from pea protein. *J Surfactants Deterg.* 2011;14(4):535–44.
15. Cuvelier ME, Fuchs M, Turchiuli C, Bohin M, Peyrat-Maillard MN, Ordonnaud C, et al. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration. *J Food Eng.* 2005;75(1):27–35.
16. Fernandes VA, Müller AJ, Sandoval AJ. Thermal, structural and rheological characteristics of dark chocolate with different compositions. *J Food Eng* [Internet]. 2013;116(1):97–108. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.002>
17. Beckett ST. *Industrial chocolate manufacture and use.* Oxford, UK: Blackwell; 1999.
18. Shukla VKS. *Confectionery Lipids.* In: Hui YH, editor. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products.* Wiley; 2005.
19. Beckett ST. *The science of chocolate.* 2nd ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 2008.
20. Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M, Vieira J. Fat bloom development and structure-appearance relationships during storage of under-tempered dark chocolates. *J Food Eng* [Internet]. 2009;91(4):571–81. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.10.011>
21. Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M, Vieira J. Microstructure and mechanical properties related to particle size distribution and composition in dark chocolate. *Int J Food Sci Technol.* 2009;44(1):111–9.
 22. Stein AJ, Rodriguez-Cerezo E. Functional food in the European Union [Internet]. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 2008. Available from: <papers://212b1ffe-06e6-4071-a992-8a7f6bf41482/Paper/p24931>
 23. Wollgast J, Anklam E. Polyphenols in chocolate: Is there a contribution to human health? *Food Res Int.* 2000;33(6):449–59.
 24. Sirtori CR, Galli C, Anderson JW, Sirtori E, Arnoldi A. Functional foods for dyslipidaemia and cardiovascular risk prevention. *Nutr Res Rev.* 2009;22(2):244–61.
 25. Pravilnik o kakao i čokoladnim proizvodima namenjenim za ljudsku upotrebu (Službeni glasnik RS, br. 24/2019).
 26. Ackar D, Valek Lendić K, Valek M, Šubarić D, Miličević B, Babić J, et al. Cocoa polyphenols: Can we consider cocoa and chocolate as potential functional food? *J Chem.* 2013;2013.
 27. Rogovská V, Čukanová M. Chocolate as a functional food. In: *Era of Science Diplomacy: Implications for Economics, Business, Management and Related Disciplines (EDAMBA 2015)*. Bratislava; 2015. p. 0–15.
 28. Torovic L. Lipidi. In: Novakovic B, Torovic L, editors. *Bromatologija: nutritivna vrednost i bezbednost hrane*. Novi Sad: Medicinski fakultet Novi Sad; 2014. p. 33–41.
 29. Momen T, Saraeian S, Esmail N, Kelishadi R. Effect of fish oil on the level of interferon gamma on the breast milk of atopic mothers: A randomized clinical trial. *Iran J Neonatol.* 2019;10(1):6–14.
 30. Calder PC. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(suppl):1505S-1519S.

31. Harris WS. n-3 Fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr.* 1997;65(suppl):1645S-1654S.
32. Jordan HS, Harris WS, Balk EM, Chung M, Lichtenstein AH, Wang C, et al. n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not α -linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2018;84(1):5–17.
33. Lauritzen L, Hansen HS, Jørgensen MH, Michaelsen KF. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res.* 2001;40:1–94.
34. EFSA EU Register of nutrition and health claims made on foods [Internet]. Available from:
http://ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/claims/register/public/?event=register.home&CFID=254245&CFTOKEN=bb3e31c237d43155-9ACA8A95-C7F6-455F-D75E629248A0F481
35. Pravilnik o prehranbenim i zdravstvenim izjavama koje se navode na deklaraciji hrane (Službeni glasnik RS, br. 51/2018 i 103/2018).
36. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (macronutrients). Washington DC; 2005.
37. Davidov-Pardo G, Roccia P, Salgado D, Leon AE, Pedroza-Islas R. Utilization of different wall materials to microencapsulate fish oil - evaluation of its behavior in bread products. *Am J Food Technol.* 2008;3(6):384–93.
38. Sovilj V. Makromolekuli u procesima mikrokapsulacije, monografija. Novi Sad: Tehnološki fakultet, Novi Sad; 2000.
39. Luzzi LA. Microencapsulation, a review. *J Pharm Sci.* 1970;59(10):1367–76.
40. Bungenberg de Jong HD, Kaas AJ. Zur Kenntnis der Komplexkoarzewation, in V. Mitteilung: Relative verschiebung im elektrischen gleichstrom feinde von flüssigkeits-

- einschiebungen in komplex koazervat-tropfehen. *Biochem Z.* 1931;232:338–45.
41. Green BK. U. S. Patent: 2,712,507. U. S. Patent: 2,712,507, 1955.
 42. Re MI. Microencapsulation by spray drying. *Dry Technol.* 1998;16:1195–236.
 43. Drusch S, Serfert Y, Scampicchio M, Schmidt-Hansberg B, Schwarz K. Impact of physicochemical characteristics on the oxidative stability of fish oil microencapsulated by spray-drying. *J Agric Food Chem.* 2008;55:11044–51.
 44. Tonon R V., Grosso CRF, Hubinger MD. Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. *Food Res Int* [Internet]. 2011;44(1):282–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.018>
 45. Lu C-H, Willner I. Stimuli-responsive DNA-functionalized nano-/microcontainers for switchable and controlled release. *Angew Chemie-International Ed.* 2015;54(42):12212–35.
 46. Zhu Y, Shi J, Shen W, Dong X, Feng J, Ruan M, et al. Stimuli-responsive controlled drug release from a hollow mesoporous silica sphere/polyelectrolyte multilayer core-shell structure. *Angew Chemie-International Ed.* 2005;44(32):5083–7.
 47. Xiao W, Zeng X, Lin H, Han K, Jia HZ, Zhang XZ. Dual stimuli-responsive multi-drug delivery system for the individually controlled release of anti-cancer drugs. *Chem Commun.* 2015;51(8):1475–8.
 48. Petrović L. Dobijanje ekstrakta nevena (*Calendula officinalis* L.) ugljen dioksidom pod pritiskom i njegovo mikrokapsuliranje u sistemu polimer–površinski aktivna materija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet; 2010.
 49. Hejaz H, Karaman R, Khamis M. Computer-assisted design for paracetamol masking bitter taste prodrugs. *J Mol Model.* 2012;18(1):103–14.
 50. Hoang Thi TH, Morel S, Ayouni F, Flament MP. Development and evaluation of taste-masked drug for paediatric medicines - application to acetaminophen. *Int J Pharm*

- [Internet]. 2012;434(1–2):235–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.05.047>
51. Bakry AM, Abbas S, Ali B, Majeed H, Abouelwafa MY, Mousa A, et al. Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2016;15(1):143–82.
 52. Karsa DR, Stephenson RA. Encapsulation and controlled release. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 1993.
 53. Kanakdande D, Bhosale R, Singhal R. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum Arabic, maltodextrin and modified starch. *Carbohydr Polym*. 2007;67:536–41.
 54. Umer H, Nigam H, Tamboli AM, Nainar MS. Microencapsulation: Process, techniques and applications. *Int J Res Pharm Biomed Sci*. 2011;2:474–81.
 55. Dubey R, Shami TC, Bhasker Rao KU. Microencapsulation technology and applications. *Def Sci J*. 2009;59(1):82–95.
 56. Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res Int*. 2007;40(9):1107–21.
 57. Bao SS, Hu XC, Zhang K, Xu XK, Zhang HM, Huang H. Characterization of spray-dried microalgal oil encapsulated in cross-linked sodium caseinate matrix induced by microbial transglutaminase. *J Food Sci*. 2011;76(1).
 58. Polavarapu S, Oliver CM, Ajlouni S, Augustin MA. Physicochemical characterisation and oxidative stability of fish oil and fish oil-extra virgin olive oil microencapsulated by sugar beet pectin. *Food Chem* [Internet]. 2011;127(4):1694–705. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.044>
 59. Tatar F, Tunç MT, Dervisoglu M, Cekmecelioglu D, Kahyaoglu T. Evaluation of hemicellulose as a coating material with gum arabic for food microencapsulation. *Food Res Int* [Internet]. 2014;57:168–75. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.022>
60. Liu ZQ, Zhou JH, Zeng YL, Ouyang XL. The enhancement and encapsulation of *Agaricus bisporus* flavor. *J Food Eng.* 2004;65(3):391–6.
 61. Drusch S. Sugar beet pectin: A novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying. *Food Hydrocoll.* 2007;21(7):1223–8.
 62. Liu XD, Atarashi T, Furuta T, Yoshii H, Aishima S, Ohkawara M, et al. Microencapsulation of emulsified hydrophobic flavors by spray drying. *Dry Technol.* 2001;19(7):1361–74.
 63. Rubilar M, Morales E, Contreras K, Ceballos C, Acevedo F, Villarroel M, et al. Development of a soup powder enriched with microencapsulated linseed oil as a source of omega-3 fatty acids. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2012;114(4):423–33.
 64. Gouin S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci Technol.* 2004;15(7–8):330–47.
 65. Pérez-Alonso C, Báez-González JG, Beristain CI, Vernon-Carter EJ, Vizcarra-Mendoza MG. Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. *Carbohydr Polym.* 2003;53(2):197–203.
 66. Trajkovic Pavlovic L, Novakovic B, Jovicic Bata J. Proteini. In: Novakovic B, Jusupovic F, editors. *Ishrana i zdravlje*. Novi Sad: Medicinski fakultet Novi Sad; 2014. p. 43–50.
 67. Morris C, editor. *Academic Press dictionary of science and technology*. San Diego: Academic Press; 1992. 1742 p.
 68. Hoffman JR, Falvo MJ. Protein - Which is best? *J Sport Sci Med.* 2004;3(3):118–30.
 69. Li-Chan ECY, Lacroix IME. Properties of proteins in food systems: An introduction. In: Yada RY, editor. *Proteins in food processing [Internet]*. 2nd ed. Elsevier Ltd.; 2017. p. 1–25. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00002-4>
 70. Fraj J. Primena protein-polimer interakcije za formiranje mikrokapsula sa kontrolisanim

- otpuštanjem aktivne supstance. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet; 2016.
71. Haque MA, Timilsena Y, Adhikari B. Food protein, structure and function. Ref Modul Food Sci [Internet]. 2016;1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03057-2>
 72. Chen W, Liang G, Li X, He Z, Zen M, Gao D, et al. Impact of soy proteins, hydrolysates and monoglycerides at the oil/water interface in emulsions on interfacial properties and emulsion stability. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2019;
 73. Amine C, Dreher J, Helgason T, Tadros T. Investigation of emulsifying properties and emulsion stability of plant and milk proteins using interfacial tension and interfacial elasticity. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2014;39:180–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.001>
 74. Martin AH, Grolle K, Bos MA, Cohen Stuart MA, Van Vliet T. Network forming properties of various proteins adsorbed at the air/water interface in relation to foam stability. *J Colloid Interface Sci*. 2002;254(1):175–83.
 75. Graham DE, Phillips MC. Proteins at liquid interfaces. I. adsorption kinetics. *J Colloid Interface Sci*. 1978;70(3):403–14.
 76. Graham DE, Phillips MC. Proteins at liquid interfaces. IV. Dilatational properties. *J Colloid Interface Sci*. 1980;76(1):227–39.
 77. Graham DE, Phillips MC. Proteins at liquid interfaces. III. Molecular structures of adsorbed films. *J Colloid Interface Sci*. 1979;70(3):427–39.
 78. Graham DE, Phillips MC. Proteins at liquid interfaces. II. Adsorption isotherms. *J Colloid Interface Sci*. 1979;70(3):415–26.
 79. Bos MA, Van Vliet T. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Adv Colloid Interface Sci*. 2001;91(3):437–71.
 80. Qingyi X, Nakajima M, Liu Z, Shiina T. Soybean-based surfactants and their applications. In: Tzi-Bun N, editor. *Soybean - Applications and Technology* [Internet]. InTech; 2011. p.

- 1–23. Available from: <http://www.intechopen.com/books/soybean-applications-and-technology/soybean-based-surfactants-and-their-applications>
81. Lam RSH, Nickerson MT. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach. *Food Chem* [Internet]. 2013;141(2):975–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.038>
82. Schultz S, Wagner G, Urban K, Ulrich J. High-pressure homogenization as a process for emulsion formation. *Chem Eng Technol*. 2004;27(4):361–8.
83. Hasenhuettl GL, Hartel RW. *Food emulsifiers and their applications*. 2nd ed. New York: Springer-Verlag; 2008.
84. Karaca AC, Low N, Nickerson M. Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Res Int* [Internet]. 2011;44(9):2742–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.012>
85. Kim HJ, Decker EA, McClements DJ. Role of postadsorption conformation changes of β -lactoglobulin on its ability to stabilize oil droplets against flocculation during heating at neutral pH. *Langmuir*. 2002;18(20):7577–83.
86. McClements DJ. *Food emulsions: principles, practice, and techniques*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press; 2015.
87. Dickinson E. Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophys*. 2011;6(1):1–11.
88. Zarić D. Optimizacija parametara proizvodnje čokolade sa sojinim mlekom u kugličnom mlinu. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet; 2011.
89. Chaiseri S, Dimick PS. Cocoa butter - its composition and properties. *Manuf Confect*. 1987;67(9):115–21.
90. De Graef V, Vereecken J, Smith KW, Bhaggan K, Dewettinck K. Effect of TAG composition on the solid fat content profile, microstructure, and hardness of model fat

- blends with identical saturated fatty acid content. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2012;114(5):592–601.
91. Gregersen SB, Andersen MD, Hammershøj M, Wiking L. Impact of triacylglycerol composition on shear-induced textural changes in highly saturated fats. *Food Chem* [Internet]. 2017;215:438–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.008>
92. Zhang X, Li L, Xie H, Liang Z, Su J, Liu G, et al. Effect of temperature on the crystalline form and fat crystal network of two model palm oil-based shortenings during storage. *Food Bioprocess Technol.* 2014;7(3):887–900.
93. Steinberg FM, Bearden MM, Keen CL. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. *J Am Diet Assoc.* 2003;103(2):215–23.
94. Nutrition facts label for candies, chocolate, dark, 70-85% cacao solids [Internet]. [cited 2019 May 3]. Available from: <https://nutritiondata.self.com/facts/sweets/10638/2>
95. Crozier SJ, Preston AG, Hurst JW, Payne MJ, Mann J, Hainly L, et al. Cacao seeds are a “super fruit”: A comparative analysis of various fruit powders and products. *Chem Cent J* [Internet]. 2011;5(1):5. Available from: <http://ccj.springeropen.com/articles/10.1186/1752-153X-5-5>
96. Corti R, Flammer AJ, Hollenberg NK, Luscher TF. Cocoa and cardiovascular health. *Circulation.* 2009;119(10):1433–41.
97. Halvorsen BL, Carlsen MH, Phillips KM, Bøhn SK, Holte K, Jacobs DR, et al. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *Am J Clin Nutr.* 2006;84(1):95–135.
98. Fraga CG, Croft KD, Kennedy DO, Tomás-Barberán FA. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct.* 2019;10(2):514–28.
99. Pravilnik o deklarisanju, označavanju i reklamiranju hrane (Službeni glasnik RS, br. 19/2017 i 16/2018).

100. Hooper L, Kay C, Abdelhamid A, Kroon PA, Cohn JS, Rimm EB, et al. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Clin Nutr.* 2012;95(3):740–51.
101. Schewe T, Steffen Y, Sies H. How do dietary flavanols improve vascular function? A position paper. *Arch Biochem Biophys.* 2008;476(2):102–6.
102. Murphy KJ, Fassoulakis AK, Singh I, Francis MA, Pike MJ, Mann NJ, et al. Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa inhibit platelet function. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003;30(5–6):A10–A10.
103. Baba S, Natsume M, Yasuda A, Nakamura Y, Tamura T, Osakabe N, et al. Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *J Nutr.* 2007;137:1436–41.
104. Wan Y, Vinson JA, Etherton TD, Proch J, Lazarus SA, Kris-Etherton PM. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *Am J Clin Nutr.* 2001;74(5):596–602.
105. Davinelli S, Corbi G, Zarrelli A, Arisi M, Calzavara-Pinton P, Grassi D, et al. Short-term supplementation with flavanol-rich cocoa improves lipid profile, antioxidant status and positively influences the AA/EPA ratio in healthy subjects. *J Nutr Biochem [Internet].* 2018;61:33–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.07.011>
106. Buijsse B, Feskens EJM, Kok FJ, Kromhout D. Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Arch Intern Med.* 2006;166(4):411–7.
107. Cooper KA, Donovan JL, Waterhouse AI, Williamson G. Cocoa and health: A decade of research. *Br J Nutr.* 2008;99(1):1–11.
108. Moffat AM, Swash M, Scott DF. Effect of chocolate in migraine: a double-blind study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1974;37(4):445.
109. Jovicic Bata J, Grabez M, Novakovic B. Funkcionalna hrana. In: Novakovic B, Torovic L,

- editors. *Bromatologija: nutritivna vrednost i bezbednost hrane*. Novi Sad: Medicinski fakultet Novi Sad; 2014. p. 256–60.
110. European Commission. Scientific concepts of functional foods in Europe consensus document. *Br J Nutr*. 1999;81(4):S1–27.
 111. Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i vršenja hemijskih i fizičkih analiza belančevinastih proizvoda za prehrambenu industriju (Službeni list SFRJ, br. 41/1985).
 112. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Fair AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folinephenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265–75.
 113. Milanovic M, Krstonosic V, Dokic L, Hadnadjev M, Dapcevic Hadnadjev T. Insight into the interaction between carbopol® 940 and ionic/nonionic surfactant. *J Surfactants Deterg*. 2015;18(3):505–16.
 114. Jafari SM, Assadpoor E, Bhandari B, He Y. Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Res Int*. 2008;41(2):172–83.
 115. Stojanović Z, Marković S, Uskoković D. Merenje raspodele veličina čestica metodom difrakcije laserske svetlosti. *Novi Mater*. 2010;19(5):1–15.
 116. Baldino N, Gabriele D, Migliori M. The influence of formulation and cooling rate on the rheological properties of chocolate. *Eur Food Res Technol*. 2010;231(6):821–8.
 117. Bae EK, Lee SJ. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *J Microencapsul*. 2008;25(8):549–60.
 118. Partanen R, Raula J, Seppänen R, Buchert J, Kauppinen E, Forssell P. Effect of relative humidity on oxidation of flaxseed oil in spray dried whey protein emulsions. *J Agric Food Chem*. 2008;56(14):5717–22.
 119. Kellerby SS, McClements DJ, Decker EA. Role of proteins in oil-in-water emulsions on the stability of lipid hydroperoxides. *J Agric Food Chem*. 2006;54(20):7879–84.
 120. Shanta NC, Decker EA. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *J AOAC Int*. 1994;

121. Buldo P, Wiking L. The role of mixing temperature on microstructure and rheological properties of butter blends. *JAACS, J Am Oil Chem Soc.* 2012;89(5):787–95.
122. Buldo P, Andersen U, Wiking L. Microstructure and material properties of milk fat systems during temperature fluctuations. *Food Biophys.* 2013;8(4):262–72.
123. International Office of Cocoa Chocolate and Sugar Confectionery (IOCCC). Viscosity of cocoa and chocolate products. Analytical method 46 [Internet]. 2000. Available from: <http://caobisco.eu/>
124. Lohman M, Hartel R. Effect of milk fractions on fat bloom in dark chocolate. *J Am Oil Chem Soc.* 1994;71:267–76.
125. Servais C, Ranc H, Roberts ID. Determination of chocolate viscosity. *J Texture Stud.* 2003;34(5–6):467–97.
126. Sigma Aldrich. Amino Acids Reference Chart [Internet]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/learning-center/amino-acid-reference-chart.html>
127. Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint WHO/FAO/UNU expert consultation. Geneva, Switzerland; 2002.
128. Chen L, Chen J, Ren J, Zhao M. Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates. *J Agric Food Chem.* 2011;59(6):2600–9.
129. Malik MA, Saini CS. Improvement of functional properties of sunflower protein isolates near isoelectric point: Application of heat treatment. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2018;98(September):411–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.009>
130. Malik MA, Sharma HK, Saini CS. Effect of removal of phenolic compounds on structural and thermal properties of sunflower protein isolate. *J Food Sci Technol.* 2016;53(9):3455–64.
131. Wang R, Xu P, Chen Z, Zhou X, Wang T. Complexation of rice proteins and whey protein

- isolates by structural interactions to prepare soluble protein composites. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2019;101(October 2018):207–13. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.006>
132. Wagner JR, Sorgentini DA, Anon MC. Relation between solubility and surface hydrophobicity as an indicator of modifications during preparation processes of commercial and laboratory-prepared soy protein isolates. *J Agric Food Chem.* 2000;48(8):3159–65.
133. Adhikari B, Howes T, Shrestha A, Bhandari BR. Effect of surface tension and viscosity on the surface stickiness of carbohydrate and protein solutions. *J Food Eng.* 2007;79(4):1136–43.
134. McNaught AD, Wilkinson A, editors. IUPAC. Compendium of chemical terminology. 2nd ed. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications; 1997.
135. Amagliani L, O'Regan J, Kelly AL, O'Mahony JA. The composition, extraction, functionality and applications of rice proteins: A review. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2017;64:1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.008>
136. Prieto CA, Guadix A, González-Tello P, Guadix EM. A cyclic batch membrane reactor for the hydrolysis of whey protein. *J Food Eng.* 2007;78(1):257–65.
137. Gustaw W, Tomczyńska-Mleko M, Kamysz E, Sikorska E, Puchalski C, Mleko S, et al. Changes of secondary structure and surface tension of whey protein isolate dispersions upon pH and temperature. *Czech J Food Sci.* 2014;32(1):82–9.
138. Mozafarpour R, Koocheki A, Milani E, Varidi M. Extruded soy protein as a novel emulsifier: Structure, interfacial activity and emulsifying property. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2019;93(February):361–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.036>
139. Schmidt JM, Damgaard H, Greve-Poulsen M, Larsen LB, Hammershøj M. Foam and emulsion properties of potato protein isolate and purified fractions. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2018;74:367–78. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.07.032>
140. Damodaran S. Protein stabilization of emulsions and foams. *J Food Sci.* 2005;70(3).
 141. Eissa AS. Effect of SDS on whey protein polymers. Molecular investigation via dilute solution viscometry and dynamic light scattering. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2019;87(July 2018):97–100. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.046>
 142. Eissa AS. Newtonian viscosity behavior of dilute solutions of polymerized whey proteins. Would viscosity measurements reveal more detailed molecular properties? *Food Hydrocoll* [Internet]. 2013;30(1):200–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.018>
 143. Vardhanabhuti B, Foegeding EA. Rheological properties and characterization of polymerized whey protein isolates. *J Agric Food Chem.* 1999;47(9):3649–55.
 144. Purwanti N, Smiddy M, Jan van der Goot A, de Vries R, Alting A, Boom R. Modulation of rheological properties by heat-induced aggregation of whey protein solution. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2011;25(6):1482–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.027>
 145. Daubert CR, Hudson HM, Foegeding EA, Prabhasankar P. Rheological characterization and electrokinetic phenomena of charged whey protein dispersions of defined sizes. *LWT - Food Sci Technol.* 2006;39(3):206–15.
 146. Krstonošić V, Milanović M, Dokić L. Application of different techniques in the determination of xanthan gum-SDS and xanthan gum-Tween 80 interaction. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2019;87(July 2018):108–18. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.040>
 147. Damodaran S. Amino acids, peptides and proteins. In: Fennema OR, editor. *Food Chemistry*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; 1996. p. 321–430.
 148. Jafari SM, He Y, Bhandari B. Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. *J Food Eng.* 2007;82(4):478–88.

149. Walstra P. Principles of emulsion formation. *Chem Eng Sci.* 1993;48(2):333–49.
150. Conde JM, Rodríguez Patino JM. The effect of enzymatic treatment of a sunflower protein isolate on the rate of adsorption at the air-water interface. *J Food Eng.* 2007;78(3):1001–9.
151. Romero A, Beaumal V, David-Briand E, Cordobés F, Guerrero A, Anton M. Interfacial and oil/water emulsions characterization of potato protein isolates. *J Agric Food Chem.* 2011;59(17):9466–74.
152. Hebishy E, Zamora A, Buffa M, Blasco-Moreno A, Trujillo A-J. Characterization of whey protein oil-in-water emulsions with different oil concentrations stabilized by ultra-high pressure homogenization. *Processes.* 2017;5(4):6.
153. Sun C, Gunasekaran S. Effects of protein concentration and oil-phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum. *Food Hydrocoll.* 2009;23(1):165–74.
154. Seekkuarachchi IN, Tanaka K, Kumazawa H. Formation and characterization of submicrometer oil-in-water (O/W) emulsions, using high-energy emulsification. *Ind Eng Chem Res.* 2006;45(1):372–90.
155. Dickinson E. Flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2010;81(1):130–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.06.033>
156. McClements DJ. Protein-stabilized emulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2004;9(5):305–13.
157. Myers D. Emulsions. In: Myers D, editor. *Surfactant science and technology*. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons Ltd.; 2006. p. 280–321.
158. Capek I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 2004;107(2–3):125–55.
159. Dapcevic Hadnadjev T, Dokic L, Krstonosic V, Hadnadjev M. Influence of oil phase concentration on droplet size distribution and stability of oil-in-water emulsions. *Eur J*

- Lipid Sci Technol. 2013;115(3):313–21.
160. Dapčević-Hadnađev T, Dizdar M, Pojić M, Krstonošić V, Zychowski LM, Hadnađev M. Emulsifying properties of hemp proteins: Effect of isolation technique. *Food Hydrocoll.* 2019;89(December 2018):912–20.
 161. Khan NM, Mu TH, Zhang M, Arogundade LA. The effects of pH and high hydrostatic pressure on the physicochemical properties of a sweet potato protein emulsion. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2014;35:209–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.05.011>
 162. Flourey J, Desrumaux A, Lardières J. Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2000;1(2):127–34.
 163. Hebishy E, Buffa M, Guamis B, Blasco-Moreno A, Trujillo AJ. Physical and oxidative stability of whey protein oil-in-water emulsions produced by conventional and ultra high-pressure homogenization: Effects of pressure and protein concentration on emulsion characteristics. *Innov Food Sci Emerg Technol* [Internet]. 2015;32:79–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.013>
 164. Loksuwan J. Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocoll.* 2007;21(5–6):928–35.
 165. Zhang ZY, Ping QN, Xiao B. Microencapsulation and characterization of tramadol-resin complexes. *J Control Release.* 2000;66(2–3):107–13.
 166. Santos AB, Fávaro-Trindade CS, Grosso CRF. Preparation and characterization of paprika oleoresin microcapsules obtained by spray drying. *Food Sci Technol.* 2005;25:322–6.
 167. Agibert SAC, Lannes SC d. S. Dark chocolate with a high oleic peanut oil microcapsule content. *J Sci Food Agric.* 2018;98(15):5591–7.
 168. Vega C, Roos YH. Spray-dried dairy and dairy-like emulsions—compositional considerations. *J Dairy Sci.* 2006;89:383–401.

169. Soottitantawat A, Bigeard F, Yoshii H, Furuta T, Ohkawara M, Linko P. Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated D-limonene by spray drying. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2005;6(1):107–14.
170. Jafari SM, Assadpoor E, He Y, Bhandari B. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Dry Technol.* 2008;26(7):816–35.
171. Drusch S, Serfert Y, Heuvel A, Schwarz K. Physicochemical characterization and oxidative stability of fish oil encapsulated in an amorphous matrix containing trehalose. *Food Res Int.* 2006;39:807–15.
172. Tan LH, Chan LW, Heng PWS. Effect of oil loading on microspheres produced by spray drying. *J Microencapsul.* 2005;22(3):253–9.
173. Huynh TV, Caffin N, Dykes G, Bhandari B. Optimization of the microencapsulation of lemon myrtle oil using response surface methodology. *Dry Technol.* 2008;26(3):357–68.
174. Khanum R, Thevanayagam H. Lipid peroxidation: Its effects on the formulation and use of pharmaceutical emulsions. *Asian J Pharm Sci.* 2017;12(5):401–11.
175. McClements DJ, Decker EA. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *J Food Sci.* 2000;65:1270–82.
176. Partanen R, Hakala P, Sjoval O, Kallio H, Forssell P. Effect of relative humidity on the oxidative stability of microencapsulated sea buckthorn seed oil. *J Food Sci.* 2005;70:E37–43.
177. Soottitantawat A, Yoshii H, Furuta T, Ohgawara M, Forssell P, Partanen R, et al. Effect of water activity on the release characteristics and oxidative stability of D-limonene encapsulated by spray drying. *J Agric Food Chem.* 2004;52:1269–76.
178. Global production volume palm oil, 2012–2018 [Internet]. Hamburg: Statista. 2018. Available from: <https://www.statista.com/statistics/613471/palm-oil-production-volume-worldwide/>

179. Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M, Vieira J. Effects of tempering and fat crystallisation behaviour on microstructure, mechanical properties and appearance in dark chocolate systems. *J Food Eng.* 2008;89(2):128–36.
180. Hadnadjev M, Dokić L, Dapcevic Hadnadjev T, Pajin B, Krstonošić V. The impact of maltodextrin-based fat mimetics on rheological and textural characteristics of edible vegetable fat. *J Texture Stud.* 42:404–11.
181. Lukic M, Jaksic I, Krstonosic V, Cekic N, Savic S. A combined approach in characterization of an effective w/o hand cream: The influence of emollient on textural, sensorial and in vivo skin performance. *Int J Cosmet Sci.* 2012;34(2):140–9.
182. Zhao Q, Zhao M, Yang B, Cui C. Effect of xanthan gum on the physical properties and textural characteristics of whipped cream. *Food Chem [Internet].* 2009;116(3):624–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.079>
183. Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M, Vieira J. Particle size distribution and compositional effects on textural properties and appearance of dark chocolates. *J Food Eng.* 2008;87(2):181–90.
184. Marangoni AG, Narine SS. Identifying key structural indicators of mechanical strength in networks of fat crystals. *Food Res Int.* 2002;35(10):957–69.
185. Campos R, Narine SS, Marangoni AG. Effect of cooling rate on the structure and mechanical properties of milk fat and lard. *Food Res Int.* 2002;35(10):971–81.
186. Owens D, Wendt R. Estimation of the surface free energy of polymers. *J Appl Polym Sci.* 1969;13:1741–7.
187. Marangoni AG, Acevedo N, Maleky F, Co E, Peyronel F, Mazzanti G, et al. Structure and functionality of edible fats. *Soft Matter.* 2012;8(5):1275–300.
188. van den Enden JC, Rossell JB, Vermaas LF, Waddington D. Determination of the solid fat content of hard confectionery butters. *J Am Oil Chem Soc.* 1982;59(10):433–9.
189. Metin S, Hartel RW. Crystallization of fats and oils. In: Shahidi F, editor. *Bailey's*

- Industrial Oil and Fat Products. 6th ed. John Wiley & Sons Ltd.; 2005. p. 45–76.
190. Tang D, Marangoni AG. Microstructure and fractal analysis of fat crystal networks. *J Am Oil Chem Soc.* 2006;5:377–88.
191. Gregersen SB, Miller RL, Andersen MD, Hammershøj M, Wiking L. Inhomogeneous consistency of crystallized fat. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2015;117(11):1782–91.
192. DeMan JM. Relationship among chemical, physical, and textural properties of fats. In: Widlak N, editor. *Physical properties of fats, oils and emulsions.* Champaign, IL, USA: AOCS Press; 1999. p. 79–95.
193. Goncalves EV, Lannes SC da S. Chocolate rheology. *Ciência e Tecnol Aliment.* 2010;30(4):845–51.
194. Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M. Effects of particle size distribution and composition on rheological properties of dark chocolate. *Eur Food Res Technol.* 2008;226(6):1259–68.
195. Palsgaard. The importance of expanded rheology information and emulsifier functionality in chocolate production [Internet]. Available from: <https://www.palsgaard.com/en/knowledge-innovation/confectionery/technical-articles/the-importance-of-expanded-rheology-information>
196. Mayfield S, Van De Walle D, Delbaere C, Shinn SE, Proctor A, Dewettinck K, et al. CLA-rich chocolate bar and chocolate paste production and characterization. *J Am Oil Chem Soc.* 2015;92(11–12):1633–42.
197. Afoakwa EO. *Chocolate science and technology.* 2nd ed. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd.; 2016.
198. Gouveia L, Batista AP, Miranda A, Empis J, Raymundo A. *Chlorella vulgaris* biomass used as colouring source in traditional butter cookies. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2007;8:433–6.
199. Hadnadjev M. Funkcionalne karakteristike smeša maltodekstrina i namenske masti kao komponenti niskoenergetskih masnih punjenja za konditorske proizvode. Univerzitet u

- Novom Sadu, Tehnološki fakultet; 2012.
200. Luccas V, Bonomi ÉC, Kieckbusch TG. Comparative characterization between milk chocolates formulated with anhydrous milk fat and with milk fat stearin. *Brazilian J Food Technol.* 2014;17(2):130–8.
 201. Silva MP, Tulini FL, Urbano Marinho JF, Mazzocato MC, Pereira Martinis EC, Luccas V, et al. Semisweet chocolate as a vehicle for the probiotics *Lactobacillus acidophilus* LA3 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1: Evaluation of chocolate stability and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Sci Technol.* 2017;75:640–7.
 202. Son Y, Choi S, Yoo K, Lee K, Lee S, Hwang I, et al. Anti-blooming effect of maltitol and tagatose as sugar substitutes for chocolate making. *LWT - Food Sci Technol.* 2018;88:87–94.
 203. Pastor C, Santamaría J, Chiralt A, Aguilera J. Gloss and colour of dark chocolate during storage. *Food Sci Technol Int.* 2007;13(1):27–34.
 204. Kumara B, Jinap S, Man Y, Yusoff M. Note: Comparison of colour techniques to measure chocolate fat bloom. *Food Sci Technol Int.* 2003;9(4):295–9.
 205. Erdem O, Gültekin-Özgüven M, Berktas I, Ersan S, Tuna H, Karadag A, et al. Development of a novel symbiotic dark chocolate enriched with *Bacillus indicus* HU36, maltodextrin and lemon fiber: optimization by response surface methodology. *LWT - Food Sci Technol.* 2014;56:187–93.

8. SKRAĆENICE I SIMBOLI

AI	adekvatan unos (engl. <i>Adequate Intake</i>)
ALA	alfa-linolenska kiselina
ANS	1-anilino-8-naftalensulfonat
CMC	kritična micelarna koncentracija (engl. <i>critical micelle concentration</i>)
DHA	dokozaheksaenska kiselina
DPA	dokozapentaenska kiselina
EFSA	Evropska agencija za bezbednost hrane (engl. <i>European Food Safety Authority</i>)
EPA	eikozapentaenska kiselina
FAO	Agencija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija (engl. <i>Food and Agriculture Organization</i>)
FNB	Odbor za hranu i ishranu Sjedinjenih Američkih Država (engl. <i>Food and Nutrition Board</i>)
FOSHU	hrana za posebne zdravstvene namene (engl. <i>Food for Specified Health Use</i>)
HCl	hlorovodonična kiselina
HDL	lipoproteini velike gustine (engl. <i>High Density Lipoprotein</i>)
LA	linolna kiselina
LDL	lipoproteini male gustine (engl. <i>Low Density Lipoprotein</i>)
LVR	linearni viskoelastični region
NaOH	natrijum hidroksid
NO	azot monoksid
PGPR	poliglicerol poliricinoleat
pNMR	pulsna nuklearna magnetna rezonanca
POP	2-oleodipalmitat
POS	2-oleopalmitostearin
PSD	raspodela veličina čestica (engl. <i>particle size distribution</i>)
PUFA	polinezasićene masne kiseline (engl. <i>polyunsaturated fatty acids</i>)
rpm	obrtaja u minutu (engl. <i>rounds per minute</i>)

SAD	Sjedinjene Američke Države
SEM	skenirajući elektronski mikroskop (engl. <i>Scanning electron microscope</i>)
SFC	sadržaj čvrstih masti (engl. <i>solid fat content</i>)
SO	površinsko ulje (engl. <i>surface oil</i>)
SOS	2-oleodistearin
TO	ukupno ulje (engl. <i>total oil</i>)
UNU	Univerzitet Ujedinjenih nacija (engl. <i>United Nations University</i>)
UVB	ultraljubičasti B zraci
U/V	ulje u vodi
U/V/U	ulje/voda/ulje
V/U	voda u ulju
V/U/V	voda/ulje/voda
WI	indeks beline (engl. <i>whiteness index</i>)
WHO	Svetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i>)
γ	površinski napon