



**UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD
FARMACEUTSKO INŽENJERSTVO**



INKAPSULIRANI KAROTENOIDI IZ SPOREDNOG PROIZVODA PRERADE ŠARGAREPE U FUNKCIONALNOJ HRANI

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
Prof. dr Gordana Četković

Kandidat:
Vanja Šeregelj, mast. inž. tehnol.

Novi Sad, 2021

Zahvalnica

Sadržaj:

1. Uvod	1
2. Ciljevi istraživanja	4
3. Pregled literature	6
3.1. Funkcionalna hrana	7
3.1.1. Pojam i razvoj koncepta funkcionalne hrane	8
3.1.2. Proizvodnja i tržište funkcionalne hrane	10
3.1.3. Funkcionalne komponente	12
3.2. Sporedni proizvodi prehrambene industrije	16
3.2.1. Generisanje sporednih proizvoda prehrambene industrije	17
3.2.2. Mogućnosti iskorišćenja sporednih proizvoda prehrambene industrije	19
3.3. Šargarepa i sporedni proizvodi prerade šargarepe	21
3.3.1. Šargarepa – opis biljke, značaj i upotreba	22
3.3.2. Nutritivni i funkcionalni profil šargarepe	26
3.3.3. Sporedni proizvodi prerade šargarepe	28
3.4. Karotenoidi	34
3.4.1. Karotenoidi – osnovne odlike i klasifikacija	35
3.4.2. Bioraspoloživost karotenoida u humanom organizmu	37
3.4.3. Uloga karotenoida u zdravlju ljudi	40
3.4.3.1. Provitaminska aktivnost karotenoida	40
3.4.3.2. Antioksidativna aktivnost karotenoida	41
3.4.3.3. Uloga karotenoida u prevenciji i terapiji različitih oboljenja	44
3.5. Ekstrakcija karotenoida	46
3.6. Inkapsulacija karotenoida	49
3.6.1. Pojam i cilj inkapsulacije	50
3.6.2. Nosači za inkapsulaciju	52
3.6.3. Tehnike inkapsulacije	57

3.6.3.1. Sušenje u struji toplog vazduha	58
3.6.3.2. Liofilizacija	59
3.6.3.4. Elektrostatička ekstruzija	61
3.6.4. Inkapsulacija karotenoida izolovanih iz različitih biljnih izvora i njihovih sporednih proizvoda	62
3.7. Karotenoidi u funkcionalnoj hrani	64
3.7.1. Primena inkapsuliranih karotenoida u proizvodnji testenine	66
3.7.2. Primena inkapsuliranih karotenoida u proizvodnji jogurta	68
4. Materijal i metode	70
4.1. Materijali	72
4.1.1. Sirovine	72
4.1.2. Hemikalije i reagensi	73
4.2. Metode	73
4.2.1. Ekstrakcija sporednog proizvoda prerade šargarepe	73
4.2.2. Inkapsulacija ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe	74
4.2.2.1. Optimizacija inkapsulacije ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe <i>freeze</i> i <i>spray drying</i> tehnikama	74
4.2.2.2. Inkapsulacija ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe tehnikom elektrostatičke ekstruzije	76
4.2.3. Primena inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe u funkcionalnoj hrani	77
4.2.3.1. Primena inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe u proizvodnji testenine	77
4.2.3.2. Primena inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe u proizvodnji jogurta	79
4.2.4. <i>In vitro</i> simulirana gastrointestinalna digestija	80
4.2.5. Karakterizacija ekstrakta, inkapsulata i funkcionalnih proizvoda sa inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe	82
4.2.5.1. Sprektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih karotenoida	82
4.2.5.2. HPLC kvalitativna i kvantitativna analiza sadržaja karotenoida	83
4.2.5.3. HPLC kvalitativna i kvantitativna analiza sadržaja tokoferola	84
4.2.5.4. HPLC kvantitativna analiza furozina	85
4.2.5.5. Određivanje sadržaja masnih kiselina metodom gasne hromatografije (GC-FID)	86
4.2.5.6. Određivanje nutritivnih karakteristika	86

4.2.5.7. Određivanje antioksidativne aktivnosti β -karoten metodom	87
4.2.5.8. Određivanje redukcionne sposobnosti	88
4.2.5.9. Određivanje antihiperглиkemijske aktivnosti	89
4.2.5.10. Određivanje antiinflamatorne aktivnosti	89
4.2.5.11. Određivanje efikasnosti inkapsulacije karotenoida	90
4.2.5.12. Određivanje boje	91
4.2.5.13. Mikroskopska analiza inkapsulata	93
4.2.5.14. FTIR i Raman spektroskopska analiza ekstrakta i inkapsulata	93
4.2.5.15. Određivanje aktivnosti vode inkapsulata	94
4.2.5.16. Određivanje sadržaja vlage u inkapsulatima	94
4.2.5.17. Određivanje higroskopnosti inkapsulata	94
4.2.5.18. Određivanje prinosa inkapsulata	94
4.2.5.19. Određivanje rastvorljivosti inkapsulata	94
4.2.5.20. Određivanje raspodele veličine čestica inkapsulata	95
4.2.5.21. Određivanje nasipne i tapkane gustine	95
4.2.5.22. Određivanje kompresibilnosti inkapsulata	96
4.2.5.23. Određivanje oksidativne stabilnosti ekstrakta i inkapsulata	96
4.2.5.24. Određivanje optimalnog vremena kuvanja testenine	97
4.2.5.25. Određivanje procenta raskuvavanja testenine	97
4.2.5.26. Određivanje koeficijenta povećanja zapremine testenine	98
4.2.5.27. Određivanje količine apsorbirane vode tokom kuvanja testenine	98
4.2.5.28. Određivanje lepljivosti testenine	99
4.2.5.29. Mikrobiološka analiza	99
4.2.5.30. Senzorska analiza	99
4.2.5.31. Statistička analiza	100
5. Rezultati i diskusija	101
5.1. Ekstrakcija sporednog proizvoda prerade šargarepe	102
5.1.1. Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u suncokretovom ulju i ekstraktu sporednog proizvoda prerade šargarepe	103

5.1.2. Antioksidativna i farmakološka aktivnost suncokretovog ulja i ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe	107
5.1.3. Održivost karotenoida u ekstraktu sporednog proizvoda prerade šargarepe tokom skladištenja	113
5.1.4. Boja ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe	115
5.1.5. Mikrobiološki profil ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe	117
5.2. Optimizacija inkapsulacije karotenoida iz ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe <i>freeze</i> i <i>spray drying</i> tehnikama	118
5.2.1. Uticaj primenjenih nosača na ispitivane parametre – odzive	122
5.2.2. Provera modela	123
5.2.3. Odabir optimalne formulacije nosača za inkapsulaciju karotenoida iz ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe	126
5.3. Karakterizacija inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih <i>freeze</i> i <i>spray drying</i> tehnikama	128
5.3.1. Morfološke karakteristike inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe	128
5.3.2. FTIR i Raman spektroskopska analiza inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe	129
5.3.3. Fizičke karakteristike inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe	131
5.3.4. Oksidativna stabilnost inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe	138
5.3.5. Održivost karotenoida inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe	139
5.3.6. Boja inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe	141
5.3.7. Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe	144
5.3.8. Sadržaj furozina u inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe	146
5.3.9. Antioksidativna i farmakološka aktivnost inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe	147
5.4. Primena inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe u proizvodnji testenine	149
5.4.1. Sadržaj proteina i bioaktivnih jedinjenja u osnovnoj sirovini testenine - krupica durum pšenice (semolina)	151
5.4.2. Sadržaj furozina u krupici durum pšenice (semolina)	153
5.4.3. Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u nekuvanoj i kuvanoj testenini	154
5.4.4. Sadržaj furozina u nekuvanoj testenini	160
5.4.5. Antioksidativna i farmakološka aktivnost kuvane testenine	161

5.4.6. Mikrobiološki profil testenine	163
5.4.7. Boja nekuvane i kuvane testenine	164
5.4.8. Kvalitet kuvane testenine	166
5.4.9. Senzorska ocena testenine	170
5.4.10. Nutritivni profil testenine	171
5.5. Inkapsulacija karotenoida iz ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe tehnikom elektrostatičke ekstruzije	174
5.6. Karakterizacija inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenog tehnikom elektrostatičke ekstruzije	175
5.6.1. Analiza veličine hidrogel i liofiliziranih čestica inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe	175
5.6.2. Morfološke karakteristike inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe	178
5.6.3. FTIR i Raman spektroskopska analiza liofiliziranih čestica inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe	179
5.6.4. Efikasnost inkapsulacije karotenoida i njihova održivost tokom skladištenja	181
5.6.5. Antioksidativna i farmakološka aktivnost inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe	182
5.7. Primena inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe u proizvodnji jogurta	183
5.7.1. Ukupan sadržaj karotenoida, antioksidativna i farmakološka aktivnost jogurta	185
5.7.2. Boja jogurta	187
5.7.3. Mikrobiološki profil liofiliziranih čestica inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe i jogurta	188
5.7.4. Kinetička studija vijabilnosti mlečno-kiselinskih bakterija, pH vrednosti i karotenoida	189
5.7.5. Senzorska ocena jogurta	194
6. Zaključak	196
7. Literatura	206

1. Uvod

Naučna istraživanja u oblasti hrane daju brojne dokaze koji podržavaju stav da je ishrana glavna promenljiva determinanta hroničnih oboljenja. Iako koncept pozitivnog uticaja ishrane na zdravlje čoveka datira još iz petog veka pre nove ere, kada je Hipokrat rekao: "*Neka vam hrana bude lek, a lek vaša hrana*", zahtevi potrošača kada su u pitanju prehrambeni proizvodi značajno su se promenili tokom poslednje decenije. Prema izveštaju Svetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization*, u daljem tekstu WHO) 71% smrtnih slučajeva godišnje uzrokovano je bolestima novog doba, kao što su gojaznost, dijabetes, kancer, kardiovaskularna i respiratorna oboljenja. Procenjuje se da je 80% slučajeva navedenih oboljenja moguće izbeći promenom ishrane, što je dovelo i do povećanja zdravstvene svesti potrošača u pravcu interesovanja za hranom koja doprinosi zdravijem stilu života. Međutim, moderan način života nameće hranu koja se brzo i lako priprema i koja najčešće, osim zadovoljenja osnovnih nutritivnih i energetskih potreba, ne obezbeđuje unapređenje zdravlja i fizičke sposobnosti. Iz tih razloga, proizvodnja funkcionalne hrane ima izvanredan potencijal i predstavlja temelj razvoja savremene prehrambene industrije širom sveta.

Sa druge strane, širenje prehrambene industrije dovodi do stvaranja velike količine otpadnog materijala ili specifičnog sporednog proizvoda sa visokim sadržajem bioaktivnih jedinjenja. Generisanje ovakve vrste sporednog proizvoda predstavlja značajan ekološki problem i ekonomski deficit. Stoga, njihova valorizacija u ekonomski isplative proizvode podržana je u okviru koncepta "bioekonomija", a jedan od načina je proizvodnja funkcionalnih sastojaka namenjenih prehrambenoj industriji. U Srbiji, a i u svetu, prerađuje se značajna količina šargarepe, a zaostali sporedni proizvod odlikuje bogat sadržaj karotenoida.

Značaj karotenoida ogleda se u različitim biološkim funkcijama koje poseduju, od kojih su naistaknutija provitaminska i antioksidativna aktivnost. Za navedene aktivnosti odgovorna je hemijska struktura karotenoida, koju karakteriše poliizoprenski C40 ugljovodonični lanac sa nizom dvostrukih veza u centralnom delu molekula. Ovakav konjugovani sistem omogućava delokalizaciju elektrona duž čitavog polienskog lanca, što karotenoidima ne daje samo hemijsku reaktivnost, već i pigmentaciju. Poslednjih godina, posebna pažnja je usmerena i na potencijalni toksikološki rizik od upotrebe sintetskih boja, zbog čega se prehrambena industrija sve češće opredeljuje za primenu prirodnih karotenoida kao aditiva za hranu.

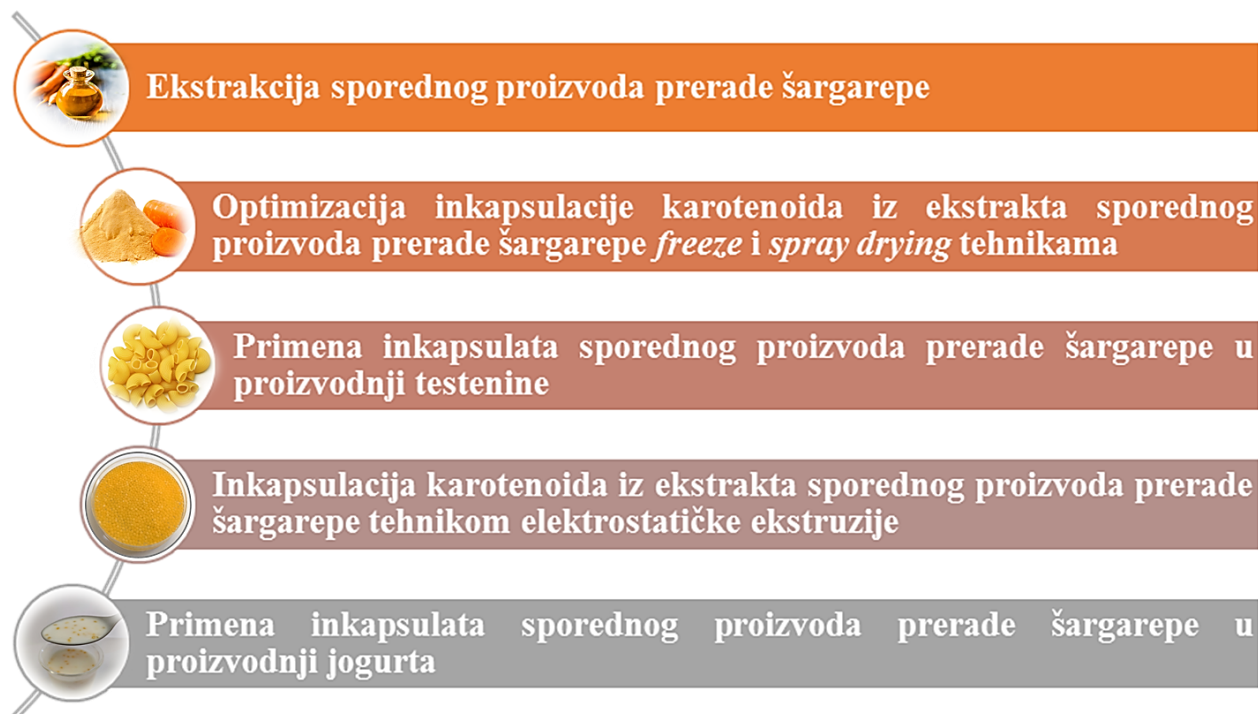
Pored navedenih osobina, polienska struktura je uzrok nestabilnosti karotenoida, što podrazumeva mogućnost njihove oksidacije, ciklizacije i izomerizacije. Faktori koji potpomažu

navedene reakcije jesu kiseonik, svetlost, toplota, vlaga, pH sredine, prisustvo enzima, te tokom procesa prerade, pakovanja i skladištenja karotenoidi mogu izgubiti svoja biološka svojstva i boju. Savremeni trend prehrambene industrije nameće očuvanje stabilnosti bioaktivnih jedinjenja kao kritičnu tačku za njihovu implementaciju u funkcionalnu hranu. Tehnologija koja predstavlja efikasan pristup zaštiti osetljivih jedinjenja, kojim se osigurava njihova stabilnost i održivost u hrani, jeste inkapsulacija. Među mnogobrojnim tehnikama inkapsulacije, sušenje u struji toplog vazduha, liofilizacija i elektrostatička ekstruzija su se izdvojile kao jednostavne, precizne i isplative metode za dobijanje inkapsulata odgovarajućih organoleptičkih i bioaktivnih karakteristika. Tehnikama inkapsulacije se takođe postiže i kontrolisano oslobađanje bioaktivnih jedinjenja, maskiranje neprijatnih mirisa ili ukusa, i sprečavanje dejstva gastrointestinalnog trakta. Osim toga, obogaćivanjem hrane inkapsuliranim jedinjenjima kao što su karotenoidi, može se obezbediti atraktivnija boja, aroma i tekstura prehrambenog proizvoda.

Pregledom dosadašnje dostupne literature ustanovljeno je da postoje navodi o inkapsulaciji karotenoida iz sporednih proizvoda prerade voća i povrća, ali nisu objavljeni podaci o mogućnostima inkapsulacije karotenoida iz uljanog ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe. Takođe, primena inkapsuliranih karotenoida u funkcionalnoj hrani nije dovoljno proučavana, naročito kada su u pitanju proizvodi poput testenine i jogurta. Osim pomenutog, veoma je mali broj naučnih radova koji su se bavili istraživanjem svih aspekata kvaliteta testenine i jogurta sa inkapsuliranim karotenoidima, koji pored nutritivnog i funkcionalnog profila uključuju i senzorsku ocenu ovako dobijenih proizvoda.

2. Ciljevi istraživanja

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je dobijanje funkcionalnih sastojaka, odnosno inkapsulata karotenoida iz sporednog proizvoda prerade šargarepe i njihova primena u funkcionalnoj hrani. Naročita pažnja poklonjena je modifikacijama proizvoda koji su u velikoj meri zastupljeni u ishrani stanovništva, a to su testenina i jogurt. Realizacija ovako postavljenog osnovnog cilja doktorske disertacije zahteva ispunjenje sledećih specifičnih ciljeva:



Očekuje se da će rezultati postavljenih ciljeva ove doktorske disertacije biti od velikog značaja za prehrambenu industriju sa aspekta dobijanja proizvoda poboljšanog nutritivnog, funkcionalnog i senzorskog kvaliteta. Inkapsulirani karotenoidi, kao funkcionalni dodaci, zbog svojih specifičnih organoleptičkih svojstava mogu biti od velikog značaja za proizvođače prehrambenih proizvoda, ali i same potrošače, koji nastoje da se upotreba veštačkih boja zameni prirodnim bojama sa bioaktivnim delovanjem. Stoga, dobijeni rezultati ukazaće na široku paletu mogućnosti primene inkapsuliranih karotenoida u funkcionalnoj hrani. U okviru ovog koncepta, prehrambena industrija bi mogla pronaći interes i u osnovnoj sirovini za izolovanje ovih jedinjenja, s obzirom da se radi o sporednom proizvodu njihove prerade.

3. Pregled literature



3.1. FUNKCIONALNA HRANA

3.1.1. Pojam i razvoj koncepta funkcionalne hrane

Pojam funkcionalne hrane prvi put je upotrebljen 1988. godine u Japanu i odnosio se na prehrambene proizvode obogaćene komponentama koje povoljno deluju na specifične funkcije organizma. Ministarstvo zdravlja Japana, 1991. godine uvelo, je pravilo za odobravanje specifične kategorije zdrave hrane pod nazivom Foods for Specified Health Use (FOSHU). Da bi proizvod dobio FOSHU status, neophodno je postojanje naučnih dokaza o zdravstvenom ili fiziološkom dejstvu finalnog proizvoda. Japan je danas jedina država koja zakonom kategoriše funkcionalnu hranu i reguliše upotrebu zdravstvenih izjava za ovu grupu proizvoda (Roberfroid, 2002).

Značaj proizvodnje funkcionalne hrane sagledan kroz porast cene zdravstvene zaštite, želje za unapređenjem kvaliteta života, razvoj novih tehnologija i ekonomski potencijal prehrambene industrije, vrlo brzo su prepoznale zemlje Evrope i SAD (Roberfroid, 2000b). U većini tih zemalja nema zakonskih regulativa ni univerzalne definicije funkcionalne hrane, zbog čega funkcionalna hrana predstavlja koncept, a ne specifičnu grupu prehrambenih proizvoda (Coppens i sar. 2006; Stanton i sar. 2005). Nekoliko organizacija je predložilo definicije za ovu kategoriju hrane. Prema definiciji američke Akademije nauka (Food and Nutrition Board) iz 1994. godine, u grupu funkcionalnih namirnica spadaju prehrambeni proizvodi sa potencijalno povoljnim delovanjem na zdravlje, uključujući i svaku izmenjenu namirnicu ili sastojak hrane koji mogu obezbediti zdravstveni efekat van okvira onog koji ima tradicionalna namirnica iste vrste (Hasler, 2002). Naredne godine je International Food Information Council Foundation (IFIC), jednostavnom definicijom predstavila funkcionalnu hranu kao hranu koja može obezbediti i zdravstvenu dobrobit.

U cilju dobijanja zvanične definicije funkcionalne hrane, Evropska komisija je preko akcije pod nazivom Functional Food Science in Europe (FUFOSE), koordinisane od strane International Life Science Institute (ILSI), 1999. godine usvojila koncenzus o konceptu funkcionalne hrane poznat kao "Scientific Concepts of Functional Foods". Prema ovom konceptu, funkcionalna hrana definiše se na sledeći način: "Hrana se može smatrati funkcionalnom ukoliko je na zadovoljavajući način pokazala povoljno dejstvo na jednu ili više ciljanih funkcija u organizmu osim zadovoljenja osnovnih nutritivnih potreba, na način koji je relevantan za unapređenje zdravlja i opšteg stanja organizma i/ili smanjuje rizik od oboljenja".

Takođe je istaknuto da količina i forma unetog funkcionalnog proizvoda mora biti kao i kod proizvoda u redovnoj ishrani. To znači da takav proizvod ne može biti u obliku tablete ili kapsule, već isključivo u obliku konvencionalnog prehrambenog proizvoda (Consensus Document, 1999; Roberfroid, 2000b). Nasuprot tome, od 2001. godine FOSHU proizvodi mogu da budu i u formi tablete ili kapsule (Ohama i sar. 2006).

S obzirom na to da većina zemalja funkcionalnu hranu posmatra kao koncept, a ne kao posebnu kategoriju hrane, zakonske regulative koje se odnose na ovakve proizvode su brojne i zavise prvenstveno od tipa prehrambenog proizvoda. U SAD, Federalna administracija za hranu i lekove (eng. *Food and drug administration*, u daljem tekstu FDA), funkcionalnu hranu reguliše kao konvencionalnu hranu ili kao dijetetske suplemente (Ellwood i sar. 2010). Da bi neka namirnica dobila status funkcionalne hrane, neophodno je da bude podržana zdravstvenom izjavom (eng. *Health claims ili disease-specific claims*) autorizovanom od strane FDA, kao i izjavom o odnosu strukture i funkcije (eng. *Structure and function claims*), koja mora biti istinita ali ne i odobrena od strane FDA (Miletić i sar. 2008). Evropska unija hranu definiše kao konvencionalnu hranu, modifikovanu hranu, hranu za specijalnu namenu i medicinsku hranu (Goldberg, 2012). Zbog toga proizvođači u Evropi mogu koristiti dve vrste izjava: nutritivne i/ili zdravstvene izjave. Nutritivne se odnose na nutritivni sastav namirnica i energetske vrednosti, dok se zdravstvene izjave odnose na hranu koja ima sposobnost da spreči, reguliše ili leči (Bragazzi i sar. 2017).

U Republici Srbiji takođe ne postoji posebna zakonska regulativa i nacionalni konsenzus za ovu grupu namirnica. Neke od njih mogu se svrstati u dijetetske proizvode prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda (Službeni glasnik RS br. 7/17). Pravilnikom o dijetetskim suplementima se bliže određuje kategorija namirnica sa zdravstvenom izjavom i prema njemu je zdravstvena izjava bilo koja izjava kojom se tvrdi da postoji neka veza između namirnice ili njenih sastojaka i zdravlja. Funkcionalna hrana, kao i hrana uopšte, mora biti pre svega bezbedna po svim osobinama definisanim u postojećem zakonodavstvu, a potom i ispuniti dopunski zahtev – funkcionalnost, tj. opravdanost određene zdravstvene izjave (Kwak i Jukes, 2001; Grunert, 2005). Stoga je bilo potrebno ustanoviti proceduru za razvoj ovakve hrane, koja podrazumeva identifikovanje određenih zdravstvenih aspekata u hrani; razumevanje mehanizama bioaktivnih komponenti prisutnih u hrani i načina njihovog delovanja na organizam; sprovođenje *in vitro* i *in vivo* kliničkih ispitivanja; i, konačno, definisanje zdravstvene izjave (Saarela, 2011).

Korišćenje zdravstvene izjave u Republici Srbiji moguće je jedino ako se ona bazira na dokazanim, opšte prihvaćenim naučnim činjenicama, na postojanju podataka koji opravdavaju upotrebu takve izjave i ukoliko je ista odobrena od Ministarstva nadležnog za poslove zdravlja (Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda, 2017).

3.1.2. Proizvodnja i tržište funkcionalne hrane

Nosioci funkcionalnosti prehrambenog proizvoda su funkcionalna jedinjenja koja se mogu naći u njegovom sastavu, i za koje je naučnim istraživanjima utvrđeno da, u količinama u kojima su prisutne u namirnici, doprinose postizanju optimalnog zdravstvenog stanja i snižavanju rizika od različitih oboljenja. Stoga, uvođenje koncepta funkcionalne hrane u praksu vezuje se za obogaćivanje proizvoda ili nekih njegovih komponenata funkcionalnim jedinjenjima, kao što su prehrambena vlakna, polifenoli, karotenoidi, masne kiseline, biljni steroli, prebiotici, probiotici, fitoestrogeni, proteini, vitamini i minerali (Kapsak, 2011). Noviji pravci razvoja funkcionalnih proizvoda podrazumevaju kombinovanje više postupaka uvođenja funkcionalnih sastojaka, uz istovremeno eliminisanje i/ili smanjivanje količine sastojaka sa štetnim dejstvom, čime se postižu višestruki blagotvorni efekti po zdravlje ljudi (Sloan, 2004). S tim u vezi, podela funkcionalnih proizvoda se može izvršiti sa aspekta njihovog delovanja i načina na koji je postignuta funkcionalnost (slika 1).

Razvoj funkcionalnih proizvoda podrazumeva tri pravca: (1) otkrivanje funkcionalnih svojstava tradicionalnih proizvoda, (2) pronalaženje adekvatnog matriksa za njihovo inkorporiranje i dizajniranje novih proizvoda, (3) određivanje bioraspoloživosti funkcionalne komponente i njene potencijalne promene tokom pripreme proizvoda (Kotilainen i sar. 2006; Siro i sar. 2008). Implementacija koncepta funkcionalne hrane u praksi je složen i skup postupak, kome prethode kliničke studije o ispravnosti i efikasnosti proizvoda u cilju dobijanja zdravstvenih izjava koje predstavljaju prateću dokumentaciju za ovu vrstu hrane. Konačan ishod ovog koncepta je postizanje prepoznatljivosti i prihvatljivosti od strane potrošača, te polje funkcionalne hrane predstavlja izazov za naučnu javnost, zakonodavnu praksu, prehrambenu i farmaceutsku industriju.

FUNKCIONALNI PROIZVODI



Slika 1. Podela funkcionalnih proizvoda (Siro i sar. 2008; Kotilainen i sar. 2006; Spence, 2006)

Što se tiče perspektive proizvodnje i razvoja novih funkcionalnih proizvoda, 21. vek se smatra vekom revolucije u ovoj oblasti. Tržište funkcionalne hrane je u stalnom porastu, a novi proizvodi nailaze na sve veću potražnju i prihvatljivost od strane potrošača (Hasler, 2002). Važno je napomenuti da uspeh te revolucije leži i u edukaciji. Razvoj informacionih tehnologija i brojni časopisi koji se bave ishranom omogućili su dostupnost velikom broju podataka i podizanje svesti o značaju hrane i njenom uticaju na zdravlje (Bornkessel i sar. 2014; Alexander i sar. 2015).

Tržište funkcionalne hrane je veoma raznovrsno i neravnomerno raspoređeno u različitim regionima sveta. Kako u većini zemalja ne postoji zakonska regulativa koja definiše funkcionalnu hranu, prilično je teško izvršiti procenu globalnog tržišta ovih proizvoda (Kotilainen i sar. 2006). Međutim, dostupni podaci ukazuju da su Severna Amerika, Evropa i

Japan tri najveća tržišta funkcionalne hrane, koji učestvuju sa preko 90% u ukupnoj prodaji funkcionalnih proizvoda (Siro i sar. 2008). Prve procene vrednosti globalnog tržišta funkcionalne hrane bile su između 33 i 61 milijarde US\$. Prema podacima statističke agencije Statista, tržište funkcionalne hrane u 2020. godini dostiglo je vrednost od 188,56 milijardi US\$, dok se za 2025. godinu predviđa procena od 275,77 milijardi US\$ (Statista, 2019). U Republici Srbiji nema zvaničnih informacija o vrednosti tržišta funkcionalnih proizvoda (Stojanović i Barjolle, 2012).

3.1.3. Funkcionalne komponente

Funkcionalne komponente su potencijalno korisni sastojci hrane, veoma raznolike strukture, sa dokazanim pozitivnim zdravstvenim efektima, koji su posledica njihove biološke i fiziološke aktivnosti. Rezultati brojnih epidemioloških, *in vivo* i *in vitro*, i kliničkih studija ukazali su na pozitivnu ulogu voća, povrća, žitarica i drugih jestivih biljaka u prevenciji i lečenju mnogih hroničnih oboljenja (Hasler, 2002; Liu, 2003). Steinmetz i Potter (1991) su u biljkama identifikovali više desetina klasa biološki aktivnih supstanci, danas poznatih kao "fitohemikalije". Po definiciji, fitohemikalije su sekundarni metaboliti biljaka ili bioaktivne nenutritivne komponente biljnog porekla, koje nisu esencijalne, ali se njihovim svakodnevnim unosom postižu zdravstveni benefiti (Liu, 2004). Najvažnija dejstva koja ispoljavaju fitohemikalije su: antioksidativna aktivnost, modulacija enzima koji učestvuju u detoksikaciji, sprečavanje agregacije trombocita, promene u metabolizmu holesterola, redukcija krvnog pritiska, kontrola koncentracije steroidnih hormona i endokrinog metabolizma, antibakterijsko i antivirusno dejstvo. Iako je najveći broj funkcionalnih komponenti biljnog porekla, potencijalnu ulogu u unapređenju zdravlja poseduje i nekoliko fiziološki aktivnih komponenti animalnog porekla. U tabeli 1 dat je pregled do sada poznatih funkcionalnih komponenata koje se primenjuju u proizvodnji funkcionalne hrane, njihovi najznačajniji izvori i potencijalni efekat na zdravlje ljudi.

Tabela 1. Funkcionalne komponente (IFIC, 2009)

Komponenta	Izvor	Potencijani zdravstveni efekat
Karotenoidi		
β-karoten	šargarepa, bundeva, slatki krompir, dinja	neutrališe slobodne radikale; podstiče ćelijsku antioksidativnu zaštitu; provitamin vitamina A
Lutein, zeaksantin	kelj, spanać, kukuruz, limun, jaja	doprinoso zdravlju očiju i očuvanju vida
Likopen	paradajz, lubenica, grejfrut	doprinoso očuvanju zdravlja prostate
Polifenolna jedinjenja		
Flavonoidi		
Antocijanini	bobičasto voće, višnje, crno grožđe	podstiču ćelijsku antioksidativnu zaštitu, doprinose očuvanju funkcije mozga
Flavanoli - katehini, epikatehini, epigaokatehin, procijanidini	čaj, kakao, čokolada, jabuke, grožđe	doprinoso očuvanju zdravlja srca
Flavanoni – hesperetin, naringenin	citrusno voće	neutrališe slobodne radikale; podstiče ćelijsku antioksidativnu zaštitu;
Flavonoli – kvercetin, kempferol, miricetin	crni luk, jabuke, čaj, brokoli	neutrališe slobodne radikale; podstiče ćelijsku antioksidativnu zaštitu;
Proantocijanidini	brusnica, kakao, jabuke, jagode, grožđe, vino, kikiriki, cimet	doprinoso očuvanju zdravlja urinarnog trakta i srca
Fenolne kiseline		
Kafena kiselina, ferulna kiselina	jabuke, kruške, citrusno voće, pojedino povrće, kafa	podstiču ćelijsku antioksidativnu zaštitu; doprinose očuvanju zdravlja očiju i srca
Izotiocijanati		
Sulforafan	kelj, brokoli, prokelj, kupus, ren	podstiče ćelijsku antioksidativnu zaštitu; unapređuje detoksikaciju organizma
Sulfidi/Tioli		
Dialil sulfid, alil metil trisulfid	beli luk, crni luk, praziluk	unapređuju detoksikaciju organizma; doprinose očuvanju zdravlja srca i imunog sistema
Ditiolioni	lisnato povrće	unapređuju detoksikaciju organizma; doprinose očuvanju imunog sistema

Fitoestrogeni		
Izoflavoni – daidzein, genistein	zrno soje, proizvodi od soje	doprinoso očuvanju zdravlja kostiju, mozga, i imunog sistema
Lignani	lan, raž, pojedino povrće	doprinoso očuvanju zdravlja srca i imunog sistema
Biljni stanoli/sterol		
Slobodni stanoli/steroli	kukuruz, soja, pšenica, obogaćena hrana i piće	mogu smanjiti rizik od kardiovaskularnih oboljenja
Stanol/estri stanola	obogaćeni namazi	mogu smanjiti rizik od kardiovaskularnih oboljenja
Polioli		
Šećerni alkoholi – ksilitol, sorbitol, manitol, laktitol	Pojedine žvakaće gume, drugi prilozi hrani	mogu smanjiti rizik od zubnog karijesa
Prebiotici		
Inulin, frukto-oligosaharidi, polidekstroza	integralne žitarice, crni luk, pojedino voće, beli lik, med, praziluk	doprinoso poboljšanju gastro-intestinalog zdravlja i apsorpciju kalcijuma
Probiotici		
Kvasac, <i>Lactobacillus</i>, <i>Bifidobacteria</i>, ostali specifični sojevi korisnih bakterija	određeni jogurti i drugi mlečni proizvodi sa kulturama, nemlečni prilozi hrani	doprinoso poboljšanju gastro-intestinalog zdravlja i imuniteta; dejstvo u zavisnosti od soja
Prehrambena vlakna		
Nerastvorljiva vlakna	pšenične mekinje, kukuruzne mekinje, kora voća	doprinoso očuvanju zdravlja digestivnog trakta; mogu smanjiti rizik od nekih vrsta kancera
β-glukan	ovsene mekinje i prekrupa, ovseno brašno, ječam, raž	mogu smanjiti rizik od kardiovaskularnih oboljenja
Rastvorljiva vlakna	grašak, pasulj, jabuke, citrusno voće	mogu smanjiti rizik od kardiovaskularnih oboljenja i od nekih vrsta kancera
Vitamini		
A	iznutrice, mleko, jaja, šargarepa, slatki krompir, spanać	doprinosi očuvanju vida, imunog sistema i zdravlja kostiju; može doprineti integritetu ćelije
B1 (Tiamin)	sočivo, grašak, smeđi pirinač	doprinosi očuvanju vida, imunog sistema i zdravlja kostiju; doprinosi integritetu ćelije
B2 (Riboflavin)	krto meso, jaja, zeleno lisnato povrće	doprinosi očuvanju mentalnih funkcija; pomaže regulaciju metabolizma

B3 (Niacin)	mlečni proizvodi, svinjsko meso, koštunjavo voće, jaja	podstiče rast ćelija; pomaže regulaciju metabolizma
B5 (Pantotenska kiselina)	iznutrice, jastog, zrno soje, sočivo	pomaže regulaciju metabolizma i sintezu hormona
B6 (Piridoksin)	pasulj, koštunjavo voće, leguminioze, riba, meso, integralne žitarice	doprinosi očuvanju zdravlja imunog sistema; pomaže regulaciju metabolizma
B9 (Folat)	pasulj, leguminioze, citrusno voće, zeleno lisnato povrće	može smanjiti rizik kod žena od rađanja deteta sa oštećenjem mozga ili kičmene moždine
B12 (Kobalamin)	jaja, svinjsko meso, mleko	doprinosi očuvanju mentalnih funkcija; pomaže regulaciju metabolizma i stvaranje krvnih zrnaca
Biotin	jetra, losos, mlečni proizvodi, jaja, ostrige	pomaže regulaciju metabolizma i hormonalnog sistema
C	guava, biber, kivi, citrusno voće, jagode	neutrališe slobodne radikale; doprinosi očuvanju imunog sistema i zdravlja kostiju
D	riba, obogaćena hrana i piće	pomaže regulaciju kalcijuma i fosfora; doprinosi zdravlju kostiju i imunog sistema; pomaže rast ćelija
E	seme suncokreta, badem, lešnik	neutrališe slobodne radikale; doprinosi očuvanju zdravlja srca i imunog sistema
Minerali		
Kalcijum	sardine, spanać, jogurt, niskomasni mlečni proizvodi, obogaćena hrana i piće	doprinosi očuvanju zdravlja kostiju; može smanjiti rizik od osteoporoze
Magnezijum	spanać, semenke bundeve, integralni hleb i žitarice	doprinosi očuvanju normalne muskulature i nervnih funkcija, zdravlju imunog sistema i kostiju
Kalijum	krompir, niskomasni mlečni proizvodi, integralni hleb i žitarice, citrusni sokovi, pasulj, banana	doprinosi očuvanju zdravlja srca; može smanjiti rizik od visokog pritiska i infarkta
Selen	riba, crveno meso, zrnevlje, beli luk, jetra, jaja	neutrališe slobodne radikale; može doprineti funkcionisanju imunog Sistema



3.2. SPOREDNI PROIZVODI PREHRAMBENE INDUSTRIJE

3.2.1. Generisanje sporednih proizvoda prehrambene industrije

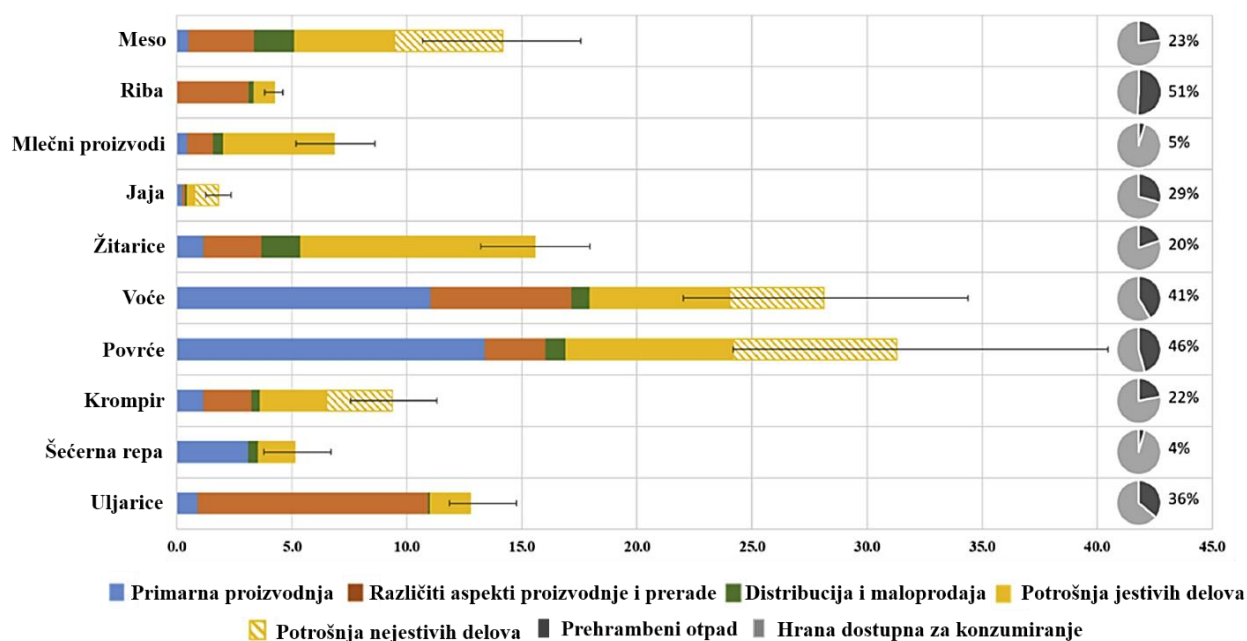
Prehrambena industrija je jedna od vodećih privrednih grana, sa dugom tradicijom i velikim značajem za celokupnu privredu kako Srbije, tako i velikog broja zemalja širom sveta. Međutim, razvoj prehrambene industrije dovodi do stvaranja velike količine otpadnog materijala ili specifičnog sporednog proizvoda, čije iskorišćenje predstavlja imperativ sa socijalnog, ekološkog i ekonomskog aspekta (Lin i sar. 2009). Prema definiciji Direktive Evropskog parlamenta, prehrambeni otpad predstavlja biorazgradivi materijal (biootpad) koji podleže anaerobnoj i aerobnoj fermentaciji (Directive 2008/98/EC, 2008). Odlaganje ovakve vrste biootpada predstavlja značajan ekološki problem, s obzirom na to da su zbog visokog sadržaja vode i aktivnih enzima podložni mikrobiološkoj razgradnji i autooksidaciji, uz nekontrolisanu potrošnju kiseonika i emisiju gasova sa efektom staklene bašte (Ndubuisi Ezejiogor i sar. 2014). Sa druge strane, ovaj problem karakteriše i ekonomski deficit, gde se pored hrane i poljoprivrednih inputa tokom proizvodnje hrane gube i resursi poput energije i vode (Galanakis, 2015).

Prema podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu (eng. *Food and Agriculture Organisation*, u daljem tekstu FAO) duž lanca snabdevanja prehrambenim proizvodima u svetu zaostaje odnosno ne iskoristi se trećina proizvedene hrane, što iznosi oko 1,3 milijarde tona na godišnjem nivou. U okviru Evropske unije, prema izveštaju Evropske komisije (2017), isti problem doseže vrednost od 90 miliona tona na godišnjem nivou, od čega 39% potiče iz prehrambene industrije (European Commission, 2017). Iako prema zakonskim propisima Evropske unije ove materije imaju status otpada, u prehrambenoj industriji se koristi termin "sporedni proizvod". Sporedni proizvodi prehrambene industrije, koji nastaju u različitim tehnološkim fazama, mogu biti biljnog ili životinjskog porekla i čine ih sporedni proizvodi prerade: (1) voća i povrća – trop, pulpa, kora, peteljke, pokožica, semenje, koštice; (2) krtolastog povrća – ljuska krompira, odbačeni krompir, sok i trop krompira, krompirova džibra; (3) uljarica i leguminoza – ljuske, delovi zrna, sačme i pogače (suncokretova, sojina sačma); (4) žitarica – ljuske, klice, mekinje, stočno brašno, kukuruzni gluten; (5) šećerne repe – listovi, rezanci šećerne repe, pulpa šećerne trske, melasa; (6) sporedni proizvodi u industriji vina – komina grožđa, vinski talog, semenke i peteljke vinove loze, (7) sporedni proizvodi u industriji piva (sladne klice, pivski treber, pivski kvasac; (8) sporedni proizvodi mesnoprerađivačke industrije – koža, krv, dlaka,

rogovi, kosti, kopita, iznutrice, masnoća; (9) ribe i morskih plodova – kosti, glave, ikra, iznutrice, oklop, krljušt, (10) mleka – surutka, (11) jaja – ljuska (Maslovarić, 2017).

Porast broja stanovnika u svetu iziskuje intenziviranje poljoprivredne proizvodnje i industrijske prerade hrane, što dalje rezultira porastom volumena prehrambenog otpada. Prema procenama FAO (2011) do 2050. godine broj stanovnika u svetu će dostići 9,1 milijardi, usled čega će biti neophodno da se i proizvodnja poljoprivredno-prehrambenih proizvoda poveća za 60% u odnosu na prosek iz perioda prethodnih deset godina, što ukazuje na značaj ovog problema (FAO, 2011).

Lanac snabdevanja prehrambenim proizvodima započinje primarnom poljoprivrednom fazom, potom uključuje različite aspekte proizvodnje, prerade, distribucije, maloprodaje, i završava se potrošnjom domaćinstva. Količina izgubljene hrane duž lanca snabdevanja prehrambenim proizvodima kod nekih proizvoda dostiže i do 46%, a procena gubitaka hrane različitog porekla u različitim fazama proizvodnje i upotrebe je prikazana na slici 2 (Caldeira i sar. 2019).



Slika 2. Gubici pojedinih vrsta hrane u ukupnom lancu snabdevanja prehrambenim proizvodima; Procenat prehrambenog otpada u odnosu na hranu dostupnu za konzumiranje (Caldeira i sar. 2019)

Zabrinjavajući podatak je i da su ukupni gubici nerazvijenih zemalja i zemalja u razvoju gotovo izjednačeni sa gubicima razvijenih zemalja, što je posledica klimatskih uslova, neadekvatne opreme, nezadovoljavajućih sanitarnih uslova, logistike i infrastrukture, kao i nivoa edukacije i nepostojanja svesti o mogućnostima iskorišćenja (FAO, 2011). Zapaženo je da u razvijenim zemljama preko 40% gubitka nastaje u finalnoj fazi, tj. u toku prodaje i potrošnje. Sa druge strane, u nerazvijenim zemljama i zemljama u razvoju, najviše hrane se izgubi u početnim i srednjim fazama lanca snabdevanja hranom, u tzv. *post-harvest* fazi i prilikom prerade (Gustavsson i sar. 2011).

Prevenaciji ovog ekološko- i socio-ekonomskog problema trebalo bi se pristupiti na različite načine. Na primer, kod razvijenih zemalja je neophodno podizanje svesti o uticaju bačene hrane na sve aspekte društva i time promeniti navike potrošača. Rešavanje problema u nerazvijenim zemljama se zasniva na investiranju u proizvodnu tehniku, infrastrukturu, kapacitete za skladištenje i preradu, kao i u edukaciji svih aktera u lancu snabdevanja hranom. Poslednjih decenija, na rešavanju globalnog problema bacanja hrane rade stručnjaci različitih profila, gde iskorišćenje otpada prehrambene industrije uz primenu savremenih tehnoloških procesa i rezultata naučnih istraživanja, predstavlja jedan od važnijih pristupa.

3.2.2. Mogućnosti iskorišćenja sporednih proizvoda prehrambene industrije

Pristup Evropske unije u upravljanju biootpadom temelji se na "hijerarhiji otpada", koja postavlja prioritete u politici upravljanja otpadom, kao i prioritete u upravljanju otpadom na operativnom nivou (Directive 2008/98/EC on waste). Na samom vrhu ove hijerarhije jeste minimizacija ili prevencija stvaranja otpada, zatim ponovna upotreba, reciklaža, iskorišćenje u ishrani ljudi i životinja, kompostiranje, dobijanje energije iz otpada, i deponovanje. Odlaganje otpada na deponijama predstavlja najmanje prihvatljivo rešenje, ne samo sa ekološkog aspekta u pogledu ugrožavanja životne sredine, već i sa ekonomskog aspekta i troškova koje ovaj način uklanjanja otpada iziskuje (Frewer i Gremmen, 2007).

Poslednjih godina zapaža se sve veći broj naučne literature i studija koji se odnose na sporedne proizvode prehrambene industrije, ispitivanje novih metoda i načina njihovog iskorišćenja. Sporedni proizvodi prehrambene industrije predstavljaju značajan izvor nutritivnih i bioaktivnih jedinjenja, kao što su proteini, polisaharidi, vitamini, minerali, dijetetska vlakna,

polifenoli, karotenoidi, aromatična jedinjenja, itd. (Frewer i Gremmen, 2007). Stoga, valorizacija ovih sporednih proizvoda kao izvora jedinjenja visoke vrednosti, sve više dobija na značaju, što ujedno predstavlja i potencijalno rešenje za očuvanje životne sredine i prirodnih resursa.

Sporedni proizvodi industrijske prerade voća i povrća, kao što su komina grožđa, pulpa citrusa, trop jabuke, kora i pulpa šargarepe, trop paradajza, trop cvekle, predstavljaju bogat izvor dijetetskih vlakana i polifenolnih jedinjenja i zaostaju upravo u onom delu biljnog materijala koji se, nakon prerade, tretira kao otpad (O'Shea i sar. 2012). Dokazana funkcionalna svojstva i bogatstvo bioaktivnim jedinjenjima, glavne su odlike sporednih proizvoda industrijske prerade voća i povrća, što ukazuje na višestruku dobrobit njihove valorizacije. Mnogi proizvodi nastali tim putem predstavljaju i bogat izvor prirodnih pigmenata, karotenoida. Ovi pigmenti se mogu koristiti kao zamena sintetskim prehranbenim bojama, doprinoseći razvoju prirodnih i kvalitetnih proizvoda, sa pozitivnim efektom na zdravlje. Mogućnost iskorišćenja sporednih proizvoda prerade voća i povrća je naročito značajna zbog niske cene sirovina, ali i potencijalne proizvodnje novih funkcionalnih proizvoda, koji su, kako je već navedeno, trend savremene prehrambene industrije.

Kako se industrijski pristup često ne poklapa sa naučnim, prehrambena industrija se ne upušta u problematiku korišćenja i prerade sporednih proizvoda bez razvijenih metodologija i ujednačenosti kvaliteta sirovina (Kalušević, 2017). Manipulacija sporednim proizvodima prehrambene industrije je komplikovana sa više aspekata, od mikrobiološkog, zbog neadekvatne biološke stabilnosti i rizika od kontaminacije, do praktičnog, gde visok sadržaj vode ima značajan uticaj na troškove transporta. Takođe, sporedni proizvodi od hrane sa visokim sadržajem masti i ulja podležu oksidaciji, što dalje uzrokuje njihovo kvarenje (Russ i Meyer-Pittroff, 2004). Tema ove doktorske disertacije i istraživanja u okviru iste, između ostalog su usmerena na prevazilaženje navedenih komplikacija u cilju približavanja naučnog i industrijskog pristupa ka valorizaciji sporednih proizvoda prehrambene industrije. U skladu sa tim, prvi korak je stabilizacija ovih proizvoda, smanjenje mogućnosti njihove razgradnje i kvarenja, smanjenje troškova transporta, stabilnost tokom dugog perioda skladištenja, i na kraju jednostavno doziranje prilikom uključivanja u formulaciju novih prehranbenih proizvoda.



3.3. ŠARGAREPA I SPOREDNI PROIZVODI PRERADE ŠARGAREPE

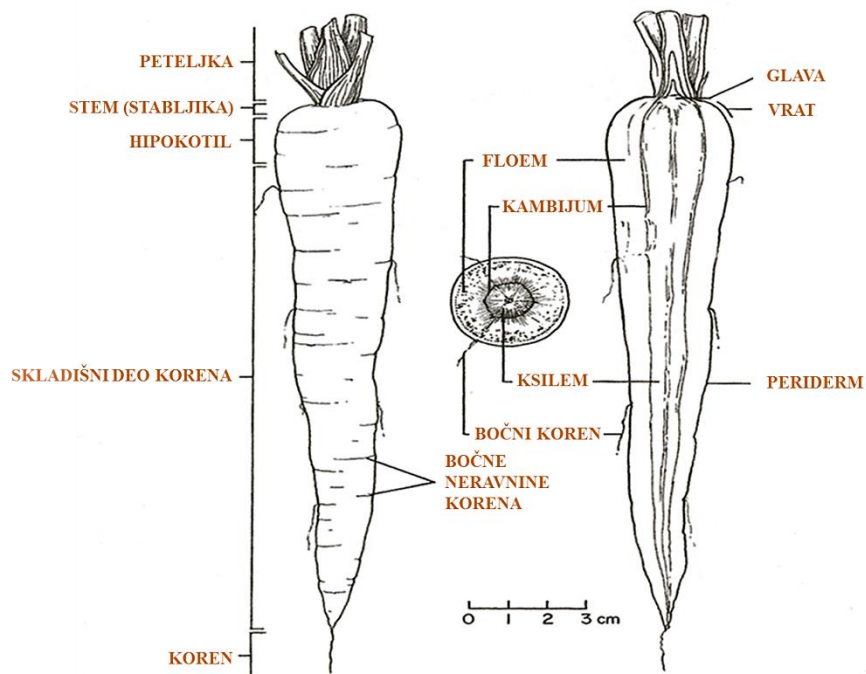
3.3.1. Šargarepa – opis biljke, značaj i upotreba

Šargarepa (*Daucus carota*) je dvogodišnja povrtarska biljka iz porodice *Apiaceae*. Pored kupusa, paradajza, luka, zelene salate, paprike, graška, boranije i krastavca, šargarepa je svrstana u red vodećih povrtarskih useva, sa godišnjom proizvodnjom preko 37 miliona tona. Prvobitno se koristila u medicinske svrhe, nakon čega se njena upotreba proširila i postala sastavni deo ljudske ishrane. Prema literaturnim podacima, šargarepa potiče sa područja Avganistana. U periodu od 10. do 12. veka gajenje šargarepe proširilo se na mediteranski region, a zatim u 14. i 15. veku preko Evrope i Kine, i do Japana. Koren prvih kultivisanih šargarepa je bio žute i ljubičaste boje. Tokom 17. veka prvi put se pojavila narandžasta šargarepa, koja je zahvaljujući visokom sadržaju provitamina A postala dominantna u svetu (Arscott i Tanumihardjo, 2010). U Srbiju je dospela iz Mađarske, pa otuda i nosi naziv šargarepa (*mađarski šargarepa – žuta repa*).



Slika 3. Različite sorte šargarepe (*Daucus carota*)

Šargarepa se gaji zbog zadebljalog korena koji, u zavisnosti od sorte i uslova gajenja, može biti različitog oblika, veličine i boje (slika 3). Na osnovu porekla, razlikuje se istočno ili azijsko (var. *atrorubens*) i zapadno (var. *sativus*) gajena šargarpa (Kammerer i sar. 2004b). Šargarepa koja rano cveta i ima ljubičasto-crveni ili žuti koren karakteristična je za Aziju, dok je šargarepa poreklom sa zapada belog, žutog, crvenog ili narandžastog korena i ima manju sklonost ka cvetanju. Narandžasta šargarepa ima visok sadržaj α - i β -karotena, a ujedno je i najvažniji izvor provitamina A. Žuta boja šargarepe potiče od luteina koji ima ključnu ulogu u prevenciji makularne degeneracije. Crvena boja šargarepe potiče od visokog sadržaja likopena, dok ljubičasta boja potiče od visokog sadržaja antocijana. Kultivari bele boje imaju mali sadržaj pigmentata. Koren šargarepe može biti koničan, sferičan ili cilindričan, što je prvenstveno određeno genotipom i klimatskim uslovima tokom rasta korena (Rosenfeld i sar. 1998a) (slika 4). Prema Petzoldtu (2008) temperatura tla između 15,5 °C i 21,1 °C omogućava razvoj kvalitetnog korenja, sudeći po obliku i dužini. Joubert i sar. (1994) su izvestili da temperatura ispod 15 °C podstiču tanke, duge, konusne šiljaste korene. Sa druge strane, temperatura iznad 25 °C menja oblik korena, te su vrhovi korena šargarepe više loptasti a manje cilindrični (Rosenfeld i sar. 1998a).

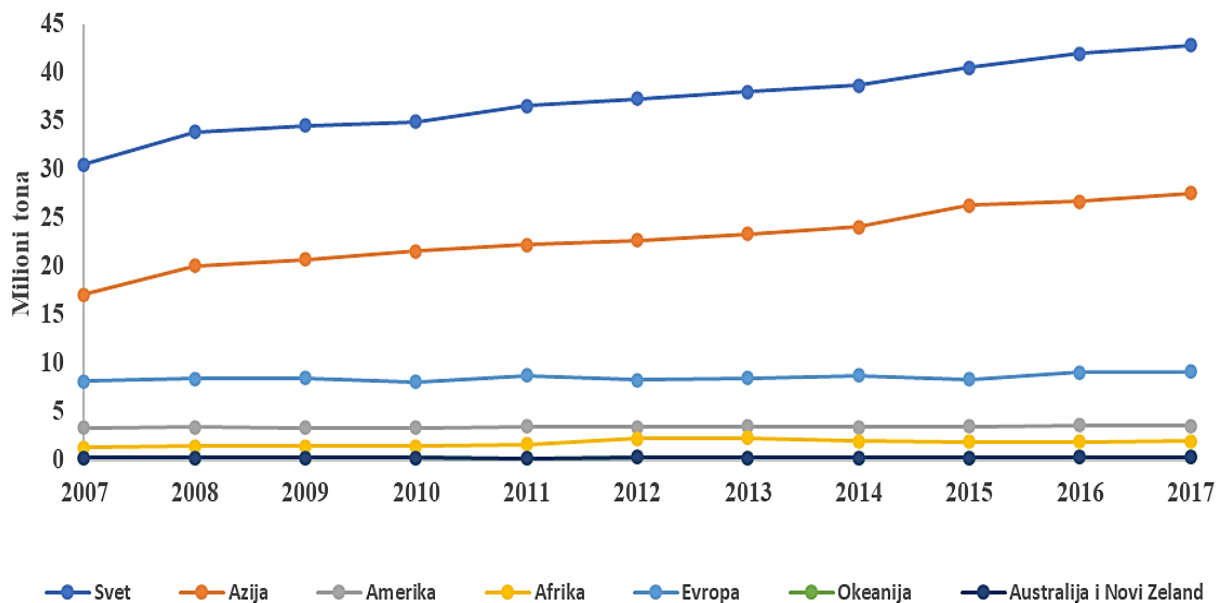


Slika 4. Šematski prikaz poprečnog preseka šargarepe

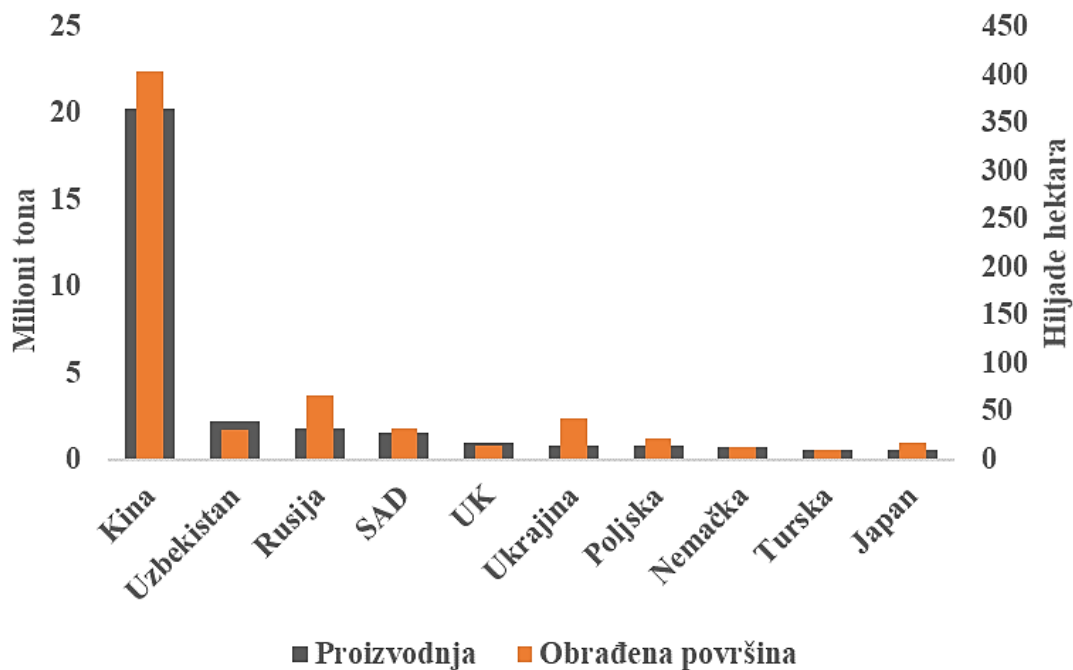
Nakon nicanja šargarepe može se uočiti razlika između korena i hipokotila. Hipokotil je na prvi pogled deblji, i ne nosi bočne korene. Listovi i koren se obrazuju istovremeno. U početku vegetacije brže rastu listovi (do pojave 3-4 lista), a zatim koren. Koren je prvobitno vretenast, a potom dolazi do zadebljanja i postizanja oblika tipičnog za sortu. Na zadebljalom korenu se razlikuje glava koja nosi lisnu rozetu, vrat korena - srednji deo bez listova i korenovih dlačica, i pravi koren obrastao korenovim dlačicama. Na korenu se razlikuju spoljašnje plutno tkivo, šupljikavo, lako propustljivo za vodu, zatim najkvalitetniji deo korena - floem, sloj aktivnih ćelija kambijuma, i unutrašnji deo korena - ksilem. Druge godine, iz glave korena raste razgranato, cvetno stablo, visine od 50-180 cm. Broj grana je vrlo različit, i javljaju se kao primarne, sekundarne i tercijalne. Na vrhovima grana formiraju se cvasti, složeni štitovi, sa mnoštvom prostih štitova koji imaju od 10-60 dvopolnih cvetova bele boje.

Šargarepa se jede kao sirovo povrće, ali je i sastavni deo mnogih kuvanih jela. Takođe, šargarepa je značajna sirovina u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Koren i list se koriste i kao stočna hrana, naročito plemenitih rasa konja, ovaca, koza i kunića. Shodno tome, zbog raznolike potrošnje i prepoznavanja šargarepe kao važnog izvora jedinjenja za unapređenje zdravlja, svetska proizvodnja u poslednjih 10 godina neprestano raste. Prema FAO, šargarepa i repa se uzgajaju na oko 1,15 miliona hektara širom sveta, proizvodeći oko 43 miliona tona za ljudsku upotrebu. Povećanje svetske proizvodnje šargarepe i repe od 2007. do 2017. godine iznosi 28,75%, kao što je prikazano na slici 5. Trenutno je Azija kontinent sa najvećom proizvodnjom, sa 27,57 miliona tona, dajući doprinos od 64,37% svetskoj proizvodnji šargarepe i repe. Slede je Evropa (21,49%), Severna i Južna Amerika (8,47%) i Afrika (4,80%). Najnižu proizvodnju imaju Okeanija, Australija i Novi Zeland što čini približno 1,77% svetske proizvodnje (FAOSTAT, 2017).

U 2017. Godini, Kina je rangirana kao zemlja sa najvećom proizvodnjom šargarepe i repe, sa obradivom površinom od 403 hiljade hektara i proizvodnjom od 20,27 miliona tona. Ovi prinosi čine približno 47,33% svetske godišnje proizvodnje, nakon čega sledi Uzbekistan (5,25%), Rusija (4,22%) i ostale zemlje predstavljene na slici 6. Generalno, prvih deset rangiranih zemalja čini 70,9% ukupne svetske proizvodnje šargarepe i repe, sa rastućim trendom produktivnosti svake sezone.



Slika 5. Svetska proizvodnja šargarepe i repe po godinama (FAOSTAT, 2017)



Slika 6. Najznačajniji proizvođači šargarepe i repe u 2017. godini (FAOSTAT, 2017)

3.3.2. Nutritivni i funkcionalni profil šargarepe

Tokom rasta i razvoja šargarepe, na kvalitet se može uticati od setve pa do berbe, i to opštim činiocima, kao što su izbor sorte i klimatski uslovi (svetlost, temperatura, padavine), ili činiocima u sistemu proizvodnje (organska ili konvencionalna proizvodnja), đubrenje i zaštita useva (Seljasen i sar., 2013). Kvalitet korena šargarepe zavisi i od uslova čuvanja, te hemijski sastav može varirati i unutar iste sorte. Nutritivne i funkcionalne komponente, kako međusobnim odnosom, tako i količinom, formiraju organoleptička, hranljiva i biološka svojstva proizvoda.

Nutritivne karakteristike šargarepe ogledaju se u visokom sadržaju vode (do 86,5%), ugljenih hidrata (do 10,5%), vlakana (do 2,8%), masti (do 0,2%) i proteina (do 0,9%). Energetska vrednost šargarepe je 41 kcal, odnosno 173 kJ. Šargarepa nije jedna od visokokaloričnih namirnica, ali predstavlja deo ishrane koja ljudski organizam snabdeva mineralima, vitaminima i drugim fitohemikalijama značajnim za očuvanje zdravlja ljudi (Arscott i Tanumihardjo, 2010). Najveći deo mineranih materija čini kalijum (240 mg/100 g). Prema Odboru za hranu i nutricionizam Instituta za medicinu SAD, preporučen dnevni unos (eng. *Recommended Dietary Allowance*, u daljem tekstu RDA) za kalijum iznosi 2000 mg/dan, što ukazuje na značaj zastupljenosti šargarepe u svakodnevnoj ishrani. Značaj kalijuma se ogleda u održavanju baznosti krvi, a takođe se smatra da pozitivno deluje na radnu sposobnost organizma, otpornost prema infekcijama, na pravilan rad srca i nervnog sistema (Gopalan i sar. 1991). Pored kalijuma, šargarepa je dobar izvor natrijuma (40 mg/100 g), kalcijuma (34 mg/100 g), fosfora (25 mg/100 g), magnezijuma (9 mg/100 g), gvožđa (0,4 mg/100 g) i cinka (0,2 mg/100 g). Od vitamina sadrži značajne količine vitamina C (4 mg/100 g), niacina (0,2 mg/100 g), tiamina (0,04 mg/100 g) i riboflavina (0,02 mg/100 g) (Holland i sar. 1991).

Osim navedenih nutritivnih svojstava, šargarepa poseduje i funkcionalna svojstva, zahvaljujući prisustvu jedinjenja sa antioksidativnim delovanjem. Naučna istraživanja potvrđuju da su mnoga biološka i farmakološka svojstva šargarepe vezana za antioksidativno delovanje polifenola (Balasundram i sar. 2006). Šargarepu karakteriše prisustvo fenolnih kiselina, među kojima dominira hlorogenska kiselina i čini do 80% ukupnih polifenola, dok se u manjim koncentracijama nalaze kafena, ferulna i *p*-hidroksi benzoeva kiselina (Soltoft i sar. 2010; Sun i sar. 2009). Ishrana bogata hlorogenskom kiselinom igra značajnu ulogu u sprečavanju različitih bolesti povezanih sa oksidativnim stresom. Hlorogenska kiselina pokazuje inhibitorno dejstvo u

procesu karcinogeneze, posebno u slučaju kancera jetre i debelog creva (Cho i sar. 2010), deluje u prevenciji oksidativnog stresa *in vivo* (Tanaka i sar. 1993; Shahidi i Chandrasekara, 2010), kao i u slučaju kardiovaskularnih oboljenja, snižavajući nivo ukupnog holesterola (Lin i sar. 2020). Iako kora, odnosno periderm, čini samo 11% ukupne težine šargarepe, najveći sadržaj polifenolnih jedinjenja se nalazi upravo u ovom delu biljke (54,1% ukupnih polifenola), nakon čega slede floem (39,5%) i ksilem (6,4%). Međutim, sadržaj polifenola znatno varira u zavisnosti od sorte šargarepe. Prema Alasalvar i sar. (2005), ljubičasta sorta šargarepe ima 2,9 puta veći sadržaj polifenola (102 mg/100g) u odnosu na narandžastu (34,8 mg/100g).

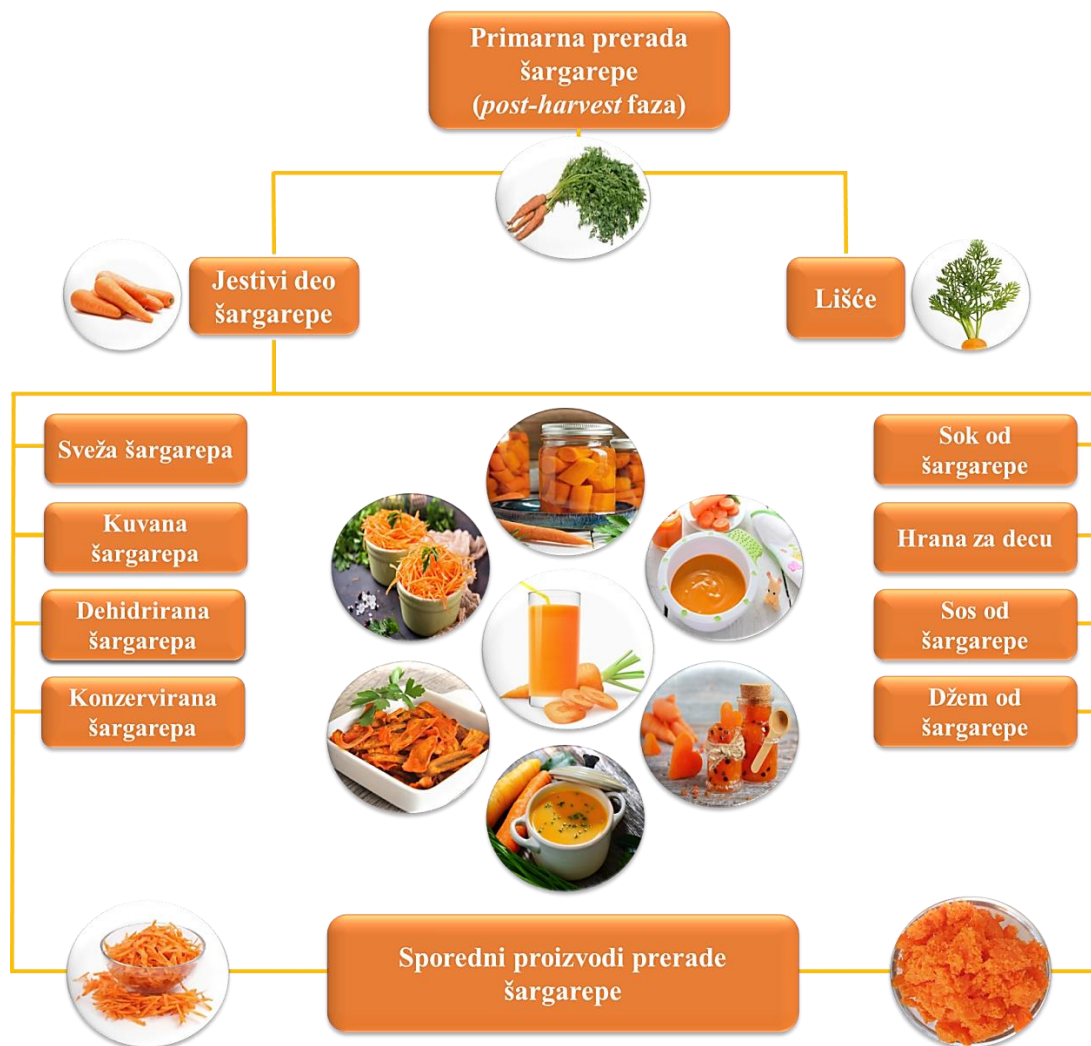
Biljke iz familje *Apiaceae* karakteriše prisustvo alifatičnih poliacetilena, a u biljnim vrstama koje su zastupljene u ishrani su prisutni većinom C17 poliacetileni tipa falkarinola. U svežoj šargarepi identifikovano je 12 poliacetilena, od kojih su najdominantniji falkarinol (16-84 mg/kg), falkarindiol (8-40 mg/kg) i falkarindiol-3-acetat (8-27 mg/kg) (Czepa i Hofmann, 2004). Poliacetileni su nestabilni i do njihovog razlaganja dolazi na povišenoj temperaturi, prilikom izlaganja UV svetlosti i promenama pH sredine. Primenom NIR-FT-Raman spektroskopije uočeno je da su u svežem korenu šargarepe falkarinol, falkarindiol i falkarindiol-3-acetat većinom lokalizovani u parenhimu i floemu. Smatra se da je za nepoželjnu gorčinu šargarepe odgovoran falkarindiol, čija je koncentracija najviša u floemu (Baranska i sar. 2005). Prilikom obrade šargarepe, poput ljuštenja ili kuvanja, dolazi do značajnog sniženja sadržaja poliacetilena (Tiwari i sar. 2013). Alifatični poliacetileni tipa falkarinola pokazuju niz bioloških aktivnosti, od kojih su najznačajnija antikancerogena i antiinflamatorna svojstva. Takođe, falkarinol i falkarindiol pokazuju antifungalnu i antimikrobnu aktivnost (Christensen i Brandt, 2006).

Koren šargarepe predstavlja jedan od najvažnijih izvora β -karotena, i obezbeđuje oko 17% potreba ukupnih β -karotena u ishrani ljudi (Alasalvar i sar. 2001). Takođe, β -karoten čini 75% ukupnih karotenoida u šargarepi, a prisutni su i α -karoten (23%), lutein (1,9%), kao i β -kriptoksantin, likopen i zeaksantin u tragovima (Soltoft i sar. 2011). Šargarepu poreklom iz Evrope karakteriše bogatiji sadržaj karotenoida u poređenju sa sortama koje potiču iz Azije, dok neke savremenije sorte sadrže i do 20% više karotenoida (Baranski i sar. 2012). Prema Koch i Goldman (2005) najveći sadržaj karotenoida se nalazi u floemu korena šargarepe. Prosečan sadržaj karotenoida u korenu šargarepe iznosi od 16-38 mg/100 g sveže mase (Mustafa i sar. 2012). Studije čiji je fokus na šargarepi, odnosno karotenoidima koji su zastupljeni u korenu, u

prvi plan ističu antioksidativni potencijal i povoljan efekat na zdravlje (Ahmad i sar. 2019; da Silva Dias, 2014).

3.3.3. Sporedni proizvodi prerade šargarepe

Primarna prerada šargarepe započinje čišćenjem i odvajanjem lišća od jestivog dela korena. Nakon toga vrši se pranje, kako bi se sa korena odstranile mehanička, hemijska i biološka nečistoća, a potom inspekcija plodova sa ciljem uklanjanja stranih primesa i plodova neodgovarajućeg kvaliteta (loše opranih, oštećenih, trulih). Opšte je poznato, a i naučno dokazano, da lišće šargarepe, koje se prilikom primarne prerade šargarepe tretira kao otpad, predstavlja bogat izvor vitamina i minerala (Pereira i sar. 2003; Goneim i sar. 2011). Stoga, prema načelima hijerarhije upravljanja otpadom, lišće šargarepe se svrstava u red sporednih proizvoda čija se valorizacija u pogledu izolovanja bioaktivnih jedinjenja smatra veoma značajnom. Šargarepa se može koristiti kao sveža u vidu salate, ili kuvana kao varivo i kao sastavni deo mnogih jela. Od velikog značaja je i upotreba prerađenih oblika šargarepe, konzervirana (kisela), dehidrirana (seckana kao začim), ili kroz proizvode kao što su sokovi i drugi napici, sosevi, džem, itd. (slika 7). U toku pripreme navedenih proizvoda od šargarepe zaostaje značajna količina biootpada (kora, pulpa, trop), koja može da čini i do 50% mase sveže prerađene sirovine (Bao i Chang, 1994). Budući da šargarepa obiluje karotenoidima i predstavlja jedan od najvažnijih izvora β -karotena, valorizacija nastalih sporednih proizvoda prilikom njene prerade, u pravcu dobijanja novih funkcionalnih sastojaka i proizvoda sa dodatom vrednošću, bila je osnovna ideja ove doktorske disertacije.



Slika 7. Proizvodi i sporedni proizvodi prerade šargarepe

Jedan od načina prerade šargarepe je proizvodnja soka, kako zbog prijatnog ukusa i atraktivne boje, tako i zbog bogatog sadržaja jedinjenja sa antioksidativnim delovanjem (Walde i sar. 1992). Prema Pravilniku o voćnim sokovima i određenim srodnim proizvodima namenjenim za ljudsku upotrebu (Službeni glasnik RS br. 103/18), voćni sok se definiše kao proizvod koji nije fermentisao, ali može da fermentiše, a koji se dobija od jestivih delova jedne ili više vrsta voća pomešanih zajedno, koje je zdravo, zrelo, sveže ili ohlađeno, odnosno zamrznuto. Boja, aroma i ukus voćnog soka treba da bude karakterističan za vrstu voća od koga je voćni sok proizveden. Sok može biti kašast, mutan ili bistar. Koncentrovan sok može kasnije biti rekonstituisan vodom koja je pogodna za održavanje osnovnog sastava i faktora kvaliteta soka. Od šargarepe se proizvode dve vrste soka, mutni i kašasti. Konvencionalna proizvodnja soka od

šargarepe podrazumeva mehaničko presovanje sirovine, pri čemu dolazi do izdvajanja mutnog soka i sporednog proizvoda bogatog karotenoidima. Kako su karoteni nerastvorljivi u vodi, prilikom izdvajanja soka značajna količina zaostaje u ćelijama šargarepe, a prema Bohm i sar. (1999) ta količina doseže i do 80%. U novije vreme, problem niskog prinosa soka od šargarepe, kao i samih karotenoida, rešava se različitim enzimskim tretmanima (Reiter i sar. 2003), ali i pored toga, količina i hemijski sastav sporednih proizvoda koji zaostaju nisu zanemarljivi.

Proizvodnja sokova od voća i povrća predstavlja jednu od vodećih i perspektivnijih industrija u svetu. U ukupnoj proizvodnji prerađevina od voća i povrća u našoj zemlji najveći udeo (81,5%) imaju sokovi (Lukač Bulatović, 2010). U Srbiji se godišnje proizvodi oko 230 miliona litara soka, što nas svrstava u ozbiljne proizvođače u regionu. Imajuću u vidu podatke o sadržaju funkcionalnih jedinjenja, koja nakon ceđenja soka zaostaju, pojavio se značajan interes za njihovim iskorišćenjem od strane prehrambene industrije, naučnika, ali i samih potrošača.

Detaljnim pregledom literature ustanovljeno je da postoje brojni radovi koji se odnose na ispitivanje sadržaja ukupnih karotenoida u sporednim proizvodima prerade šargarepe. Singh i sar. (2006) navode da, u zavisnosti od uslova prerade, sadržaj karotenoida koji zaostaje može iznositi i do 2 g/kg suve materije. Prilikom prerade korenastog povrća najčešće se koristi predtretman blanširanjem. Blanširanje predstavlja toplotni tretman koji se izvodi toplom vodom ili vodenom parom, i ima znatan uticaj na aktivnost enzima. Prema Bao i Chang (1994), nakon prerade neblanširane šargarepe sadržaj α - i β -karotena koji zaostaje iznosi 17%, dok sporedni proizvodi prerade blanširane šargarepe sadrže od 31 do 35% zaostalih karotenoida. Blanširanje može imati negativan uticaj na hranljive materije kao što su vitamini i jedinjenja koji su relativno nestabilna prilikom izlaganja toplotnim tretmanima (Prochasha i sar. 2000), zbog čega se preporučuje snižavanje temperature pri izvođenju ovog tretmana (Song i sar. 2003). Generalno, različite tehnike pripreme proizvoda od šargarepe, kao i metode ekstrakcije karotenoida iz nastalih sporednih proizvoda, doprinose značajnoj varijabilnosti u prijavljenim rezultatima. Tabela 2 prikazuje neke od poznatih rezultata koji se odnose na sadržaj individualnih i ukupnih karotenoida sporednih proizvoda prerade šargarepe.

Tabela 2. Literaturni podaci o sadržaju ukupnih i individualnih karotenoida u sporednim proizvodima prerade šargarepe

Sporedni proizvod prerade šargarepe	Sadržaj ukupnih karotenoida	α -Karoten	β -Karoten	Lutein	β -kriptoksantin	Izvor podataka
Kora	205,6 $\mu\text{g/g}$	67,6 $\mu\text{g/g}$	127,8 $\mu\text{g/g}$	8,4 $\mu\text{g/g}$	-	de Andrade Lima i sar. (2019)
Kora	219-289,2 mg/100 g	-	110,9-132,7 mg/100 g	-	-	Hiranvarach at i sar. (2014)
Trop	11,90-15,97 mg/g	-	-	-	-	Yu i sar. (2018)
Trop	78,66-120,14 mg/100 g	33,57-42,97 mg/100 g	43,50-74,91 mg/100 g	0,15-0,54 mg/100 g	1,06-1,72 mg/100 g	Borowska i sar. (2017)
Trop	28,51 mg/100 g	-	-	-	-	Jalgaonkar i sar. (2018)
Trop	5456 $\mu\text{g/100 g}$	-	607 $\mu\text{g/100 g}$	-	-	Nagarajaiah i Prakash, (2015)
Trop	5,84-10,84 mg/100 g	-	186,01-633,57 $\mu\text{g/100 g}$	-	-	Alam i sar. (2013)
Trop	65,74-92,64 mg/100 g	-	6,83-15,81 mg/100 g	-	-	Hernandez-Ortega i sar. (2013)
Trop	-	2,2-4,2 mg/100 g	8,1-19,3 mg/100 g	-	-	Mustafa i sar. (2012)
Pulpa	4 mg/100 g	-	3,92 mg/100 g	-	-	Shyamala i Jamuna, (2010)

Sadržaj proteina i masti u suvoj materiji sporednog proizvoda prerade šargarepe nije značajan. Prema Kumari i Grewal (2007) sadržaj proteina iznosi 0,7%, a sadržaj masti 1,3%. Rezultati istraživanja Nagarajaiah i Prakash (2015) pokazali su veći sadržaj proteina, i iznosio je 6,5%. Prema podacima koje navode Sharoba i sar. (2013), udeo proteina u suvoj materiji sporednog proizvoda prerade šargarepe iznosi 10,06%, dok je udeo masti 1,75%. U pogledu mikroelemenata, sporedni proizvod prerade šargarepe, u suvoj materiji, sadrži najviše gvožđa (30,5 mg/g), cinka (29,4 mg/g), kalijuma (18,6 mg/g), mangana (10,8 mg/g), bakra (4,0 mg/g),

natrijuma (3,2 mg/g), kalcijuma (3,0 mg/g), fosfora (1,8 mg/g) i magnezijuma (1,1 mg/g) (Tanska i sar. 2007).

Pored karotenoida, sporedni proizvodi prerade šargarepe predstavljaju i bogat izvor dijetetskih vlakana. Dijetetska vlakna su prepoznata kao važan sastojak pravilne ishrane, a definišu se kao sastojci biljnih ćelija koji ne podležu digestiji od strane digestivnih enzima ljudskog organizma. Prema rastvorljivosti u vodi, dijetetska vlakna se uobičajeno klasifikuju u dve kategorije: nerastvorljiva i rastvorljiva dijetetska vlakna (Esposito i sar. 2005). Rastvorljiva dijetetska vlakna imaju sposobnost formiranja viskoznih gelova, lako prolaze kroz tanko crevo, fermentišu u debelom crevu, i sastoje se od pektina, guma, fruktana i biljnih sluzi. Sa druge strane, nerastvorljiva dijetetska vlakna čine celuloza, hemiceluloza i lignin. U istraživanju Sharoba i sar. (2013) sadržaj ukupnih dijetetskih vlakana, na bazi suve materije, iznosio je 69,85%, sa većim udelom nerastvorljivih vlakana (45,12%) u odnosu na ona koja se rastvaraju u vodi (24,3%). Prema podacima Nawirska i Kwasniewska (2005), dijetetska vlakna sporednog proizvoda prerade šargarepe (na bazi suve materije) čine pektin (3,88%), hemiceluloza (12,3%), celuloza (51,6%) i lignin (32,1%).

Sadržaj vlage u sporednom proizvodu šargarepe, koji zaostaje nakon proizvodnje soka, kreće se u opsegu od 85-90% (Aglawe i Bobade, 2018). Sporedni proizvodi koji sadrže količinu vlage u datom opsegu brzo podležu kvarenju, a skladištenje i manipulacija materijalom ovakvih razmera su otežani. Da bi se stvorili uslovi za mogućnost valorizacije ovakvog sporednog proizvoda, pre svega je potrebno izvršiti njegovo konzervisanje, tj. prevođenje u oblik u kojem se može čuvati i koristiti u dužem vremenskom periodu. Sušenje predstavlja jedan od najzastupljenijih načina konzervisanja hrane, pri čemu se, u većoj ili manjoj meri, uklanja voda iz materijala, smanjuje aktivnost preostale vode i enzima, sprečava razvoj mikroorganizama, kao i hemijski procesi koji dovode do kvarenja hrane. Osim toga, sušenjem se postiže i smanjenje mase i zapremine hrane, čime se smanjuju troškovi pakovanja i transporta, i olakšavaju tehnološke operacije poput mlevenja i mešanja u daljim procesima prerade (Maslovarić, 2017). Neke od najčešće primenjivanih metoda su konvektivno sušenje, mikrotalasno sušenje, sušenje infracrvenim zracima i liofilizacija (Wu i sar. 2017; Ly i Zhang, 2017; Upadhyay i sar. 2008).

U istraživanjima koja su se odnosila na upotrebu osušenog sporednog proizvoda prerade šargarepe, sadržaj vlage je bio od 2,5 do 11% (Sharoba i sar. 2013; Jagaonkar i sar. 2017; Kumari i Grewal, 2007; Aglawe i Bobade, 2018, Nagarajaiiah i Prakash, 2015). Ovi sporedni

proizvodi mogu biti supstrat za izolovanje bioaktivnih jedinjenja koja se dalje mogu koristiti kao funkcionalni aditivi u hrani.

Osušeni sporedni proizvodi prerade šargarepe se mogu i direktno dodavati u prehrambene proizvode i na taj način doprineti poboljšanju njihovog nutritivnog, funkcionalnog ili senzorskog kvaliteta. U nekoliko istraživanja ispitani su efekti upotrebe sporednih proizvoda prerade šargarepe kao izvora funkcionalnih jedinjenja u pripremi pekarskih proizvoda (Kumar i Kumar, 2011; Hernandez-Ortega i sar. 2013; Sharma i sar. 2017; Aglawe i Bobade, 2018). Rezultati istraživanja koje su sprovedi Hernandez-Ortega i sar. (2013) pokazali su da se u pripremi keksa pšenično brašno može supstituisati sa 30% osušenog i samlevenog sporednog proizvoda prerade šargarepe, pri čemu se dobija proizvod sa povećanim sadržajem dijetetskih vlakana, karotenoida i polifenola, poboljšane antioksidativne aktivnosti i senzorskog kvaliteta. Gayas i sar. (2012) ispitivali su mogućnost pripreme biskvita sa sadržajem osušenog sporednog proizvoda prerade šargarepe u nivou od 5%, i zaključili unapređenje nutritivnog, funkcionalnog i tehnološkog kvaliteta proizvoda. Sporedni proizvod prerade šargarepe je uspešno inkorporiran i u druge prehrambene proizvode, poput ekstrudiranih snek proizvoda (Kumar i sar. 2010a; Kumar i sar. 2010b), hleba (Kumar i Kumar, 2012), kobasica (Yadav i sar. 2018), sladoleda (Hassan i Brakat, 2018), džema (Ullah i sar. 2018) itd.



3.4. KAROTENOIDI

3.4.1. Karotenoidi – osnovne odlike i klasifikacija

Karotenoidi su prirodni pigmenti žute, narandžaste ili crvene boje, odgovorni za boju voća, povrća, cveća, kao i za boju nekih insekata, ptica i riba. Samo biljke, bakterije, gljive i alge mogu sintetisati karotenoide, dok ih ljudi i životinje u svoj organizam unose hranom (Stahl i Sies, 2003). Danas je poznato da je u prirodi prisutno oko 800 karotenoida, a ishranom, konzumiranjem voća i povrća, u humani organizam se unosi oko 40 karotenoida (Omayma i Abdel Nasser, 2013). Zbog velike zastupljenosti, strukturne raznolikosti, različitih funkcija i delovanja, karotenoidi su u fokusu brojnih naučnih istraživanja dugi niz godina.

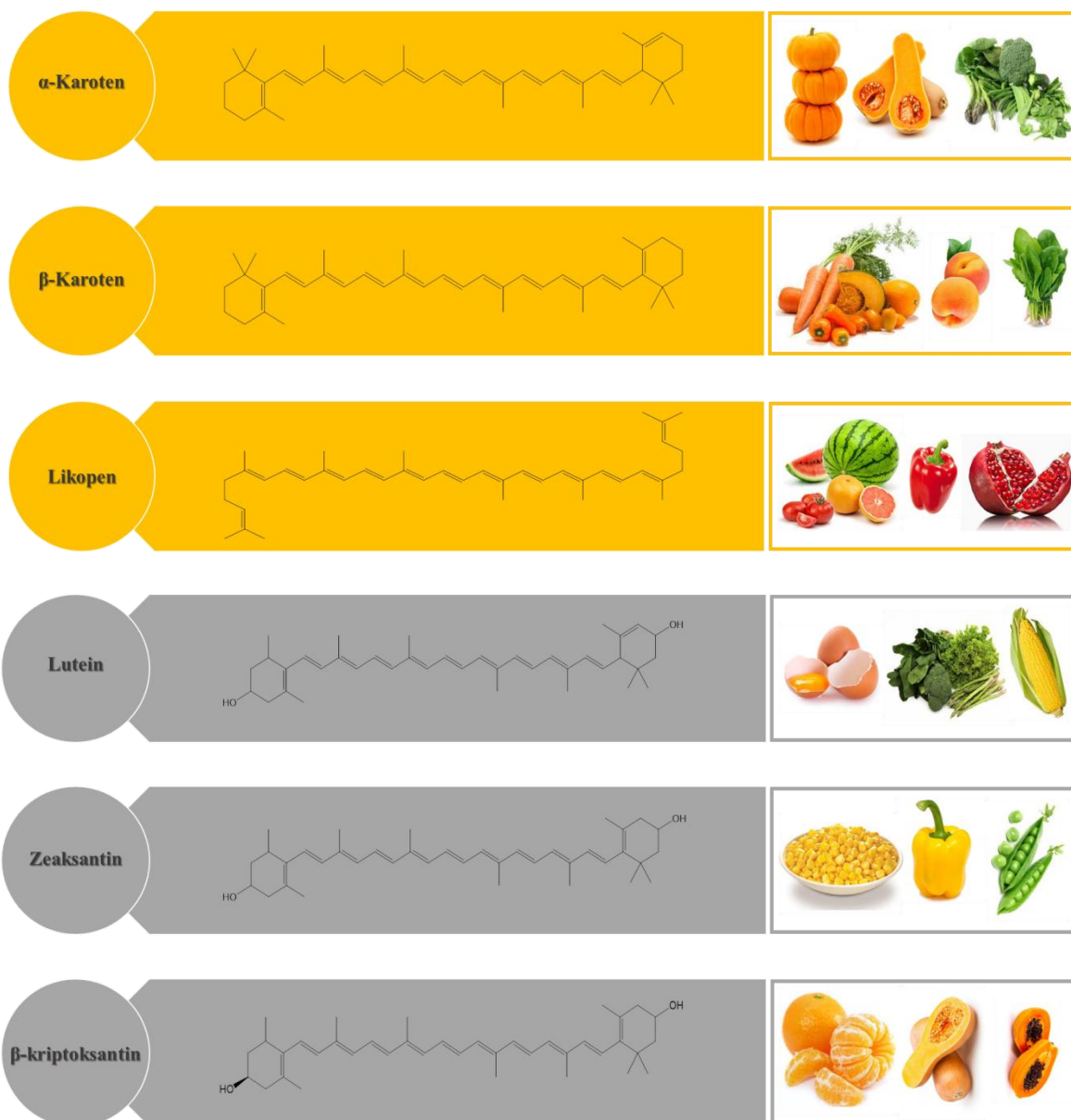
Najvažnija uloga karotenoida u prirodi je da učestvuju u procesima fotosinteze. Karotenoidi biljaka nalaze se u hloroplastima gde su vezani za proteine, odnosno nalaze se u obliku hromoproteina. Smatra se da karotenoidi u fotosintezi imaju zaštitnu ulogu, odnosno štite hlorofil od fotodestrukcije kratkim svetlosnim talasima (ispod 400 nm). Takođe, smatra se da karotenoidi u fotosintezi imaju i pomoćnu ulogu u prenošenju kiseonika ili transformaciji i prenošenju energije u fotohemijskim reakcijama (Lajšić i Grujić-Injac, 1998). Zaštitna uloga karotenoida ogleda se i u signalizaciji i adaptaciji biljaka na promene u okruženju, poput privlačenja oprašivača i disperznih agenasa, ili odbijanja biljojeda. Karotenoidi imaju ključnu ulogu u definisanju parametara za procenjivanje kvaliteta voća i povrća. Ova jedinjenja su zastupljena i u nekim nefotosintetskim bakterijama i kvascima, gde mogu da ispolje zaštitnu funkciju protiv nastanka oštećenja, kao posledice uticaja kiseonika i svetlosti.

Karotenoide karakteriše trodimenzionani oblik, koji je važan za određivanje njihovih funkcija. Osnovna molekulska struktura većine karotenoida sastoji se od poliizoprenskog C40 ugljovodoničnog lanca, sa nizom konjugovanih dvostrukih veza, koje čine centralni deo molekula. Ovakav konjugovani sistem omogućava efikasnu delokalizaciju elektrona duž čitavog polienskog lanca, što karotenoidima ne daje samo specifičan molekularni oblik, već i pigmentaciju, sposobnost apsorpcije svetlosti i hemijsku reaktivnost. Krajevi molekula karotenoida mogu biti otvoreni (aciklični) i ciklizovani (aliciklični i aromatični) (Dutta i sar. 2005).

Pored nabrojanih osobina, polienska struktura je i uzrok nestabilnosti karotenoida, pod kojim se podrazumeva mogućnost njihove oksidacije, ciklizacije i izomerizacije. Teoretski, svaka dvostruka veza u polienskom lancu može biti u dva geometrijska oblika (*cis/trans*).

Izomerizacijom može da nastane veliki broj izomera, ali se u prirodi ne sreću svi. U prirodi prevladavaju karotenoidi u stabilnijem *trans*-obliku, dok se *cis*-izomeri pojavljuju u malom broju (Rodriguez-Amaya, 2001). Toplota, svetlost i kiseline su faktori koji potpomažu izomerizaciju iz uobičajene *trans*-konfiguracije u *cis*-konfiguraciju, što dovodi do promene boje i biološke aktivnosti karotenoida. Oksidacija, koja je i najčešći uzrok raspadanja karotenoida, ubrzava se dejstvom svetlosti, toplote, metala, enzima i peroksida, a inhibira se antioksidatima, kao što su tokoferoli i askorbinska kiseina. Prilikom pripreme i čuvanja hrane prisutni su svi navedeni faktori koji podstiču izomerizaciju i oksidaciju karotenoida, odnosno njihovu degradaciju i gubitak aktivnosti. Degradacija karotenoida je povezana i sa razvojem nepoželjne promene arome u hrani, kao na primer kod sušene šargarepe i pahuljica od slatkog krompira (Falconer i sar. 1964).

Karotenoidi su dobili ime prema kristalima (β -karoten) koje je Wachenroder 1831. godine izolovao iz šargarepe i nazvao ih "karoten". Nekoliko godina kasnije, tačnije 1837. godine, švedski hemičar Berzelius izolovao je iz jesenjeg lišća polarnije pigmente žute boje i nazvao ih ksantofilima. Prema tome, karotenoidi se mogu klasifikovati u dve grupe: karotene - koji su čisti ugljovodonici rastvorljivi u nepolarnim rastvaračima, i ksantofili – oksidacioni proizvodi karotenoida koji sadrže kiseonik u ugljovodoničnom lancu, rastvorljivi u polarnim rastvaračima. Karotenoidi su izuzetno hidrofobne supstance, koje se vrlo teško ili uopšte ne rastvaraju u vodi. Stoga, karotenoidi se nalaze u hidrofobnim područjima u ćelijama, kao što su unutrašnji delovi membrane, dok im povezanost sa proteinima omogućuje pristup vodenoj sredini (Britton, 1995). Šargarepa je povrće koje se smatra jednim od najvažnijih izvora karotenoida, i karakteriše je prisustvo tri karotena (α -karoten, β -karoten, likopen) i tri ksantofila (lutein, zeaksantin i β -kriptoksantin). Prema Padovani i Amaya-Farfán (2006), ova jedinjenja su identifikovana u humanoj plazmi i tkivima, zbog čega su svrstana među najvažnije karotenoide sa aspekta ishrane ljudi. Na slici 8 predstavljene su hemijske strukture navedenih karotenoida, kao i različite vrste voća i povrća u kojim obiluju, dok će njihova uloga u zdravlju i primena u prehrambenoj industriji biti predstavljene u narednim poglavljima.



Slika 8. Hemijske strukture i najvažniji izvori karotenoida

3.4.2. Bioraspoloživost karotenoida u humanom organizmu

Proučavanjem biološke aktivnosti komponenti koje se unose ishranom, a samim tim i karotenoida, ustanovljeno je da su njihova bioiskoristivost i bioraspoloživost u organizmu važni parametri za doprinos u prevenciji i terapiji različitih patoloških stanja. Sa prehrabene tačke gledišta, bioiskoristivost se odnosi na udeo hranljivih sastojaka ili bioaktivnih jedinjenja

dostupnih za upotrebu u fiziološkim funkcijama. Kada su u pitanju definicije bioiskoristivosti i bioraspoloživosti, nailazi se na mnoge nejasnoće, zbog čega se ovi izrazi često koriste kao sinonim. Bioraspoloživost je koncept koji se može definisati kao količina ili frakcija koja se oslobađa iz matriksa hrane u gastrointestinalni trakt, te postaje dostupna za apsorpciju. U ovo su uključene gastrointestinalne transformacije hrane u materijal spreman za asimilaciju i apsorpciju u ćelije crevnog epitela, i na kraju za presistemski metabolizam. Dakle, bioaktivnost uključuje sve procese vezane za put kojim se bioaktivno jedinjenje transportuje do željenog tkiva, način na koji ostvaruje interakciju sa biomolekulima, metabolizam i biotransformaciju koju potom prolazi, te na kraju fiziološki odgovor koji uzrokuje. Bioaktivna komponenta može biti podvrgnuta raznim modifikacijama tokom gastrične i intestinalne digestije, kao i tokom prvog prolaska kroz jetru, što je od velikog značaja kod određivanja njene potencijalne zdravstvene koristi. Iz tih razloga, *in vitro* studije simulacije gastrointestinalne digestije danas predstavljaju ključan faktor u razvoju funkcionalne hrane (Fernandez-Garcia i sar. 2009).

Apsorpcija karotenoida u humanom organizmu je vrlo promenljiva i uslovljena brojnim faktorima kao što su: hemijska struktura, udeo karotenoida koji se unosi tokom obroka, matriks hrane koji predstavlja izvor karotenoida, udeo dijetetskih vlakana u datom matriksu, udeo lipida koji se unosi zajedno sa karotenoidima, međusobna interakcija između različitih karotenoida i karotenoida sa drugim nutritivnim sastojcima, udeo belančevina, udeo ksantofila i hlorofila, veličina čestica hrane, kao i genetski činioci.

Pojedini autori ukazali su na veću bioraspoloživost *cis*-izomera karotenoida u odnosu na *trans*-izomere, što može biti rezultat njihove veće rastvorljivosti u mešovitim micelama, lakše ugradnje u hilomikrone i manjoj sklonosti ka međusobnim interakcijama. Koncentracija *cis*-izomera u proizvodima od šargarepe povećava se njenom termičkom obradom, a stepen izomerizacije je u direktnoj vezi sa jačinom i trajanjem ovog tretmana. Tako karotenoidi iz šargarepe koja je prethodno podvrgnuta nekom termičkom tretmanu, se lakše apsorbuju od karotenoida iz sveže ceđenog soka (Levin i Mokaby, 1995; West i Castenmiller, 1998; Reboul, 2019).

Bioraspoloživost karotenoida u velikoj meri zavisi i od pratećih komponenti koje čine matriks hrane. Lipidi iz hrane igraju važnu ulogu u rastvaranju karotenoida, pri čemu olakšavaju njihovu apsorpciju u sluznicu tankog creva. Vrsta ulja (npr. maslinovo, suncokretovo) ne utiče na bioraspoloživost, ali može imati uticaj na antioksidativnu aktivnost karotenoida u plazmi (Lee i

sar. 2000). Sa druge strane, različiti tipovi dijetetskih vlakana mogu smanjiti bioraspoloživost karotenoida. Dijetetska vlakna smanjuju bioraspoloživost makronutrijenata, posebno lipida, i na taj način mogu uticati na apsorpciju karotenoida rastvorljivih u lipidima (Yonekura i Nagao, 2009). Interakcija između karotenoida odigrava se u različitim fazama procesa apsorpcije, a naročito je izražena pri visokim koncentracijama ovih jedinjenja. Iako ovi mehanizmi do sada nisu dovoljno ispitani, smatra se da karotenoidi antagonizuju apsorpciju jedni drugih. Na primer, Prince i sar. (1991) ukazali su na smanjenje udela likopena u plazmi nakon uzimanja visokih doza β -karotena.

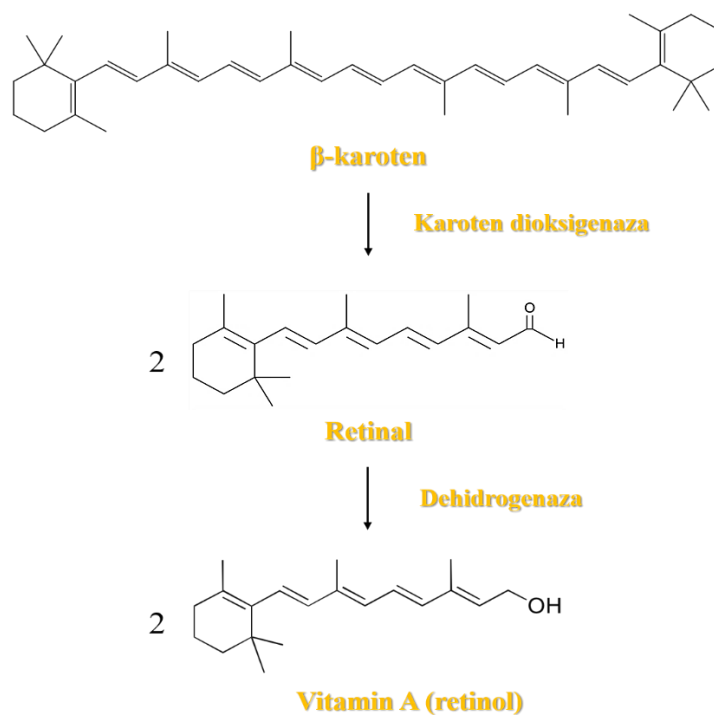
Apsorpcija karotenoida u ćelije crevnog epitela uslovljena je njihovim prethodnim rastvaranjem u želudačnoj tečnosti. Nakon oslobađanja karotenoida iz matriksa hrane neophodno je njihovo raspršivanje u želudačnoj tečnosti, što je često ograničeno zbog izrazite hidrofobnosti ovih molekula (Yonekura i Nagao, 2007). U tom slučaju, lipidi iz hrane olakšavaju raspršivanje karotenoida, tako što se prvo rastvaraju u lipidima prisutnim u hrani, a potom raspršuju u obliku emulzije u želudačnu tečnost. Razgradnja lipida iz hrane u emulziji vrši se uz pomoć lipolitičkih enzima i žuči, te se karotenoidi na kraju rastvaraju u mešovitoj miceli (Kotake-Nara i Nagao, 2011). Mešovita micela se sastoji od fosfolipida, holesterola, slobodnih masnih kiselina, monoacilglicerola i žučnih soli (Reboul, 2013). Smatra se da rastvoreni karotenoidi u mešovitoj miceli postaju dostupni za unos u ćelije crevnog epitela. Iz sluznice tankog creva do krvotoka karotenoidi se prenose hilomikronima. Transport karotenoida u plazmu se odvija isključivo preko lipoproteina, a lipofilni karotenoidi kao što su β -karoten i likopen smeštaju se unutar hidrofobnog jezgra lipoproteina. Ovi karotenoidi se u krvnoj plazmi pojavljuju najpre u frakcijama lipoproteina vrlo niske gustine (eng. *very low density lipoprotein*, u daljem tekstu VLDL) i hilomikron frakcijama, a kasnije u lipoproteine niske gustine (eng. *low density lipoprotein*, u daljem tekstu LDL) i frakcijama lipoproteina visoke gustine (eng. *high density lipoprotein*, u daljem tekstu HDL). Iz ovih razloga, karotenoidi su u organizmu skoncentrisani prvenstveno u onim tkivima koji imaju veliki broj LDL receptora, a to su jetra, bubrezi i testisi.

3.4.3. Uloga karotenoida u zdravlju ljudi

Karotenoidi učestvuju u mnogim biološki važnim funkcijama u humanom organizmu, od kojih su najznačajnije provitaminska i antioksidativna aktivnost (Kadian i Garg, 2012; Stahl i Sies, 2003). Rezultati velikog broja studija ukazali su i na direktnu vezu između ishrane bogate karotenoidima i smanjenja rizika od mnogih hroničnih oboljenja (Nicolle i sar. 2003; Zhang i Hamauzu, 2004; Sun i sar. 2009; Li i sar. 2014). Preventivni i terapijski efekti karotenoida mogu biti povezani sa više ćelijskih i molekularnih mehanizama, kao što su aktivnost uklanjanja slobodnih radikala, inhibicija abnormalne proliferacije ćelija, podsticanje interćelijske komunikacije, poboljšanje imunološkog odgovora, modulacija metabolizma kancerogenih supstanci, itd. (Padovani i Amaya-Farfán, 2006).

3.4.3.1. Provitaminska aktivnost karotenoida

Provitaminska aktivnost je nastanak vitamina A (retinola) iz karotenoida koji sadrži bar jedan β -jononski prsten. β -Karoten, α -karoten i β -kriptoksantin, koje telo konvertuje u vitamin A, nazivaju se još i "provitamin A" karotenoidi. Ovi karotenoidi se enzimskim putem, delovanjem karoten-dioksigenaze, prevode u intestinalnom traktu u retinal, i na kraju u retinol koji se skladišti u jetri. S obzirom da β -karoten sadrži dva β -jononska prstena, ovaj karotenoid poseduje 100% provitaminsku aktivnost, pri čemu nastaju dva molekula vitamina A (slika 9). Međutim, konverzija karotenoida u vitamin A spada u procese ograničenog karaktera, te se obično od ukupne količine samo jedna trećina unetih karotenoida prevede u vitamin A. Nedostatak β -jononskog prstena i povećanje količine *cis*-izomera dovodi do odsustva provitaminske aktivnosti. Vitamin A ima značajnu ulogu u organizmu, što je posledica njegovog vezivanja za specifične nuklearne receptore, te tako utiču na sintezu važnih proteina. Važan je i za kontrolu rasta i razvoja epitelnog tkiva, učestvuje u stvaranju pigmenta rodopsina koji se nalazi u retini oka, doprinosi boljoj funkciji oka i akomodaciji pri promeni jačine svetla. U skladu sa tim, nedostaci ovog vitamina mogu uzrokovati različite poremećaje, od oftamoloških pa do pojedinih dermatoloških oboljenja.



Slika 9. Konverzija β -karotena u vitamin A (retinol)

3.4.3.2. Antioksidativna aktivnost karotenoida

Antioksidanti su, po definiciji, molekuli sposobni da uspore ili čak neutrališu delovanje slobodnih radikala i drugih oksidanata, tako što sami bivaju oksidisani. Slobodni radikali su nestabilni, hemijski veoma reaktivni atomi ili molekuli sa jednim ili više nesparenih elektrona, i sa izraženom tendencijom da taj nedostatak nadomeste oduzimajući elektrone biološki važnim molekulima, menjajući na taj način njihovu strukturu i hemijske osobine. Povećana produkcija slobodnih radikala i/ili smanjena antioksidativna zaštita organizma dovodi do oštećenja tkiva i različitih oboljenja. Dakle, ukoliko postoji genetska predispozicija ili izlaganje spoljašnjim faktorima koji deluju stresno (dim cigarete, sunčeva svetlost, zagađenje, itd.) ravnoteža između slobodnih radikala i antioksidanata može biti narušena. Ovakvo stanje naziva se oksidativni stres, koji je uzrok ili prateći faktor u patologiji mnogih oboljenja (Halliwell i Gutteridge, 2006).

U odbrambenim reakcijama, karotenoidi su uključeni u deaktiviranje dve reaktivne vrste kiseonika (ROS), singletnog kiseonika ($^1\text{O}_2$) i peroksil radikala (ROO^\bullet) (Stahl i Sies, 2003). Antioksidativni potencijal karotenoida u biološkim sistemima zavisi od brojnih faktora, među

kojima su najistaknutiji: (1) struktura molekula i fizičke osobine karotenoida, (2) orijentacija i mesto delovanja karotenoida u ćeliji, (3) koncentracija karotenoida, (4) sinergističko delovanje karotenoida sa drugim antioksidantima, (5) parcijalni pritisak kiseonika (Britton, 1995; Young i Lowe, 2001).

Reaktivni oblici kiseonika koji nastaju u humanom organizmu uzrokuju oksidativna oštećenja biološki važnih molekula kao što su DNA, belančevine, ugljeni hidrati i lipidi. Smatra se da karotenoidi štite navedene biomolekule od oštećenja mehanizmom koji se zasniva na fizičkom "gašenju" $^1\text{O}_2$, pri čemu je neophodno da se ostvari bliska interakcija između ovih molekula. Fizičko "gašenje" $^1\text{O}_2$ uključuje direktnu razmenu energije između karotenoida i $^1\text{O}_2$. $^1\text{O}_2$ predstavlja pobuđeno, ekscitirano stanje molekula, čija se energija prenosi na molekul karotenoida, dajući kiseonik u osnovnom stanju i tripletni pobuđeni karotenoid. Dalje, pobuđeni molekul karotenoida se vraća u svoje osnovno stanje, rasipajući svoju energiju u interakciji sa okolnim rastvaračem. Efikasnost karotenoida u fizičkom "gašenju" ove reaktivne vrste je povezana sa brojem konjugovanih dvostrukih veza prisutnih u molekulu. Na antioksidativnu aktivnost utiču i strukturne karakteristike molekula (veličina i oblik molekula, priroda, položaj i broj supstituenata) i fizičke osobine (agregati, monomeri, *cis*- ili *trans*- konfiguracije). Značajnu sposobnost "gašenja" $^1\text{O}_2$ pokazuju α -karoten, β -karoten, zeaksantin i β -kriptoksantin, a najveću efikasnost fizičkog "gašenja" $^1\text{O}_2$ poseduje likopen (Stahl i Sies, 2003). Nasuprot fizičkom "gašenju", hemijske reakcije između $^1\text{O}_2$ i karotenoida su od manjeg značaja, pri čemu može doći do destrukcije molekula karotenoida (Young i Lowe, 2001).

Pod oksidativnim uslovima u organizmu nastaju različite radikalske vrste, pri čemu su karotenoidi pokazali najefikasniju aktivnost prema peroksil radikalima. Veživanjem ovih vrsta karotenoidi prekidaju slobodnoradikalnu reakciju lipidne oksidacije. Zahvaljujući lipofilnosti i sposobnosti karotenoida da vezuju peroksil radikale, smatra se da imaju važnu ulogu u zaštiti ćelijskih membrana i lipoproteina od oksidativnog oštećenja.

Većina rezultata vezanih za antioksidativni potencijal karotenoida prema različitim ROS, dobijena su kao rezultat *in vitro* ispitivanja. Međutim, *in vivo* uslovi, kao što su koncentracija karotenoida i heterogeni sastav većine tkiva, kompleksniji su od uslova karakterističnih za *in vitro* ispitivanja. U *in vivo* uslovima, karotenoidi su prisutni u značajno nižim koncentracijama i u obliku kompleksa sa lipoproteinom koji se nalazi u tkivima, zbog čega je veoma važno da u takvim uslovima karotenoidi budu inkorporirani u tkivo na tačno određenom mestu i u

odgovarajućoj koncentraciji u odnosu na oksidujući agens i molekul koji treba da štite (Seabra i Pedrosa, 2010).

Koncentracija karotenoida ima značajan uticaj na njihovo antioksidativno delovanje. Pri visokim koncentracijama karotenoida ili njihovih oksidacionih proizvoda, može doći do prooksidativnog delovanja ovih molekula. Istraživanje mogućih prooksidativnih svojstava karotenoida započelo je kao posledica sprovođenja studija koje su pokazale porast, a ne smanjenje pojave kancera pluća kod ljudi koji su koristili β -karoten kao dodatak ishrani (Palozza, 1998). Pored koncentracije, parcijalni pritisak kiseonika je takođe važna determinanta koja određuje antioksidativni/prooksidativni učinak karotenoida. Prema Burton i Ingold (1984) β -karoten pokazuje antioksidativno delovanje pri niskom parcijalnom pritisku, dok pri višim vrednostima parcijalnog pritiska, usled autooksidacije, dolazi do prooksidativnog delovanja. U humanom organizmu, parcijalni pritisak kiseonika u različitim tkivima se značajno razlikuje (npr. plućna alveola - 100 mm Hg, venska krv - 40 mm Hg, tkiva 5 - 15 mm Hg) te se u skladu sa tim i karotenoidi ponašaju drugačije u različitim delovima organizma. Stoga, karotenoidi ne moraju nužno ispoljavati prooksidativnu aktivnost, već samo mogu biti manje efikasni antioksidanti, npr. u plućima u odnosu na druga tkiva (Palozza i Krinsky, 1992).

Antioksidativna aktivnost karotenoida je važna i sa aspekta sinergističkog delovanja sa drugim antioksidantima. Truscott (1996) je predložio mehanizam interakcije vitamina C i vitamina E sa β -karotenom, pri čemu molekul karotenoida regeneriše vitamin E prenosom elektrona na tokoferol radikal katjon i nastaje karotenoid katjon radikal. U prisustvu vitamina C, karotenoid katjon radikal može biti preveden u neradikalni oblik. Takođe, redukcijom karotenoid katjon radikala vitamin E regeneriše karotenoid.

Istraživanjima koja su sprovedena na ulju crvene palme pokazano je da karotenoidi predstavljaju primarni supstrat lipidnim radikalima, pri čemu ih tokoferoli/tokotrienoli mogu regenerisati. Kao važan rezultat, predstavljeno je da sinergistički efekat zavisi od vrste antioksidanta i njihove koncentracije u datom sistemu. U homogenom rastvoru metil estra linoleinske kiseline i u oksidaciji metil estra linoleinske kiseline indukovane azo-inicijatorom, likopen je pokazao sinergističko delovanje sa vitaminom E, što se ne može reći i za β -karoten (Shi i sar. 2007). Takođe je zabeleženo i sinergističko delovanje između samih karotenoida.

3.4.3.3. Uloga karotenoida u prevenciji i terapiji različitih oboljenja

Antiproliferativna aktivnost karotenoida ispitana je u brojnim studijama na životinjama, pri čemu je utvrđeno njihovo protektivno delovanje u vidu smanjenja broja kancerogenih ćelija ili njihovog rasta. Van-Bremeen i Pajković (2008) su naveli da karotenoidi prisutni u šargarepi ispoljavaju antikancerogeno dejstvo kod različitih organa, od kože, grla, dojke, pluća, grlića materice, bešike i debelog creva. Zgheib i sar. (2014) istraživali su uticaj ekstrakta šargarepe na pokretljivost i invaziju karcinoma pluća, kože, dojke i glioblastoma. Kao rezultat, primećeno je izrazito smanjenje pokretljivosti i invazije četiri linije kancerogenih ćelija, kao i povećanje adhezije ovih ćelija, što je istaklo ekstrakt šargarepe kao potencijalnog agensa u terapiji navedenih oboljenja. Karotenoidi prisutni u šargarepi takođe su predloženi kao efikasna sredstva za lečenje leukemije. Zaini i sar. (2011) su ispitivali uticaj ekstrakta soka od šargarepe na ćelije mijeloidne i limfoidne leukemije, kao i na matične ćelije hematopoeze. *In vitro* analiza sprovedena je u toku 72h, nakon čega je primećeno da ekstrakt soka šargarepe poseduje sposobnost indukovanja apoptoze u ćelijskim linijama leukemije i inhibiciju napredovanja kroz ćelijski ciklus. Citotoksični efekat ekstrakta ulja šargarepe na akutne mijeloidne ćelije takođe je potvrđen u studiji Tawil i sar. (2015).

Ishrana bogata karotenoidima povezuje se i sa smanjenim rizikom od kardiovaskularnih bolesti, zbog povećane sposobnosti karotenoida da vezuju molekule kao što je holesterol, a samim tim i njegove biodostupnosti u organizmu. Različite studije navele su nekoliko mehanizama po kojima bioaktivna jedinjenja šargarepe doprinose kardioprotektivnim efektima, uključujući aktivaciju limfocita, inhibiciju proliferacije ćelija, antoksidativno delovanje, antiinflamatorno delovanje, snižavanje indeksa telesne mase, snižavanje krvnog pritiska i triglicerida, modulaciju enzimske aktivnosti itd. Nicolle i sar. (2003) proučavali su uticaj četvoronedeljne ishrane miševa liofiliziranom šargarepom na metabolizam lipida i oksidativni stres, gde je primećeno značajno smanjenje holesterola (-41%) i triglicerida (-49%). Takođe je povećana ukupna fekalna ekskrecija neutralnih sterola koji inhibiraju apsorpciju holesterola u digestivnom sistemu. Konzumiranje šargarepe doprinelo je i povećanju nivoa vitamina E u srcu kod miševa, što sugerise na veću zaštitu ovog tkiva. Različite sorte šargarepe pokazale su i antitrombotske aktivnosti u *in vivo* i *in vitro* studijama (Yamamoto i sar. 2008).

Pojedine biljne vrste tradicionalno se koriste u terapiji dijabetesa, što se može pripisati visokom sadržaju fenolnih jedinjenja, karotenoida i dijetetskih vlakana. Mehanizam se može objasniti smanjenjem intestinalne apsorpcije ugljenih hidrata, modulaciji enzima uključenih u metabolizam glukoze, poboljšanju funkcije β -ćelija i aktivnosti insulina, stimulacijom sekrecije insulina, kao i antioksidativnim i antiinflamatornim karakteristikama koje poseduju (Bahadoran i sar. 2013). Ispitivanja su pokazala značajnu vezu između "provitamin A" karotenoida i statusa dijabetesa (Montonen i sar. 2004).

Izloženost kože ultravioletnom (UV) zračenju dovodi do pojave opekotina, fotoosetljivosti, preranog starenja i povećanog rizika od karcinoma. Izloženost UV zračenju je povezana i sa nastankom ROS i slobodnih radikala. Smanjenje koncentracije karotenoida u koži nakon UV-zračenja rezultat je njihovog protektivnog delovanja u odbrani od reaktivnih kiseonikovih vrsta, pobuđenih usled delovanja navedenih zraka (Stahl i Sies, 2012).

Oko je organ koji je stalno izloženo radijaciji, atmosferskom kiseoniku, hemijskim materijama iz okruženja, ali i fizičkim oštećenjima. Stoga je oksidativni stres jedan od najznačajnijih mehanizama nastanka mnogih bolesti oka kao što su katarakta, glaukom, uveitis, retrolentalna fibroplazija, staračka degeneracija žute mrlje, kao i različite forme retinopatija. Za tkiva oka, najznačajniji hidrosolubilni antioksidanti su vitamin C i glutation, zahvaljujući njihovom redoks potencijalu, dok u najznačajnije liposolubilne antioksidante spadaju vitamin E, retinoidi i karotenoidi, uglavnom lutein i zeaksantin koji se akumuliraju u makuli i odgovorni su za njenu žutu boju. Različite studije pokazale su da osobe koje uzimaju β -karoten, vitamine C i E i zink preko hrane imaju manji rizik za nastanak bolesti oka u starijem dobu, u odnosu na osobe koje ne uzimaju vitaminsku suplementaciju (Čolak, 2012).

U naučnoj literaturi zastupljen je veliki broj radova koji ukazuju na činjenicu da povećani unos karotenoida putem ishrane ima preventivno dejstvo i na gastrointestinalna oboljenja (Agbaje i sar. 2017; Chandra i sar. 2015), bolesti jetre (Elvira-Torales i sar. 2019), bubrega (Browne i sar. 2019) itd. Važno je uočiti da rezultati dosadašnjih epidemioloških istraživanja o zdravstvenom značaju karotenoida ističu i mogućnost doprinosa ostalih sastojaka koji čine biljnu sirovinu putem sinergističkog delovanja. Ovi rezultati predstavljaju potporu preporukama o zastupljenosti voća i povrća u svakodnevnoj ishrani, ali i prehrambenoj i farmaceutskoj industriji pri iskorišćenju ovakvih sirovina bogatih bioaktivnim jedinjenjima koja doprinose prevenciji i terapiji mnogih oboljenja.



3.5. EKSTRAKCIJA KAROTENOIDA

Ekstrakcija predstavlja prvi korak u valorizaciji ciljnih bioaktivnih jedinjenja iz odabrane sirovine, u ovom slučaju karotenoida iz sporednog proizvoda prerade šargarepe. Postoji širok spektar tehnika koje se mogu koristiti u ove svrhe, od tradicionalnih do savremenih, i svaku od njih karakteriše niz prednosti i nedostataka. Osnovni zahtev koji bi ekstrakcija trebala da ispuni jeste maksimalan prinos ciljne grupe jedinjenja, uz što manje narušavanje njihove aktivnosti. S obzirom na hemijsku prirodu karotenoida, očuvanje njihove aktivnosti se smatra jednom od kritičnih tačaka kada se pristupa izboru ekstrakcione metode. Pored toga, na izbor ekstrakcione metode utiče kvalitet proizvoda koji se očekuje, kao i svrha njegove dalje primene. Brojni faktori utiču na efikasnost ekstrakcije, među kojima su najznačajniji rastvarač, metoda ekstrakcije, temperatura, dužina trajanja procesa ekstrakcije, stepen usitnjenosti biljnog materijala i pH ekstragenta (Stalikas, 2007).

Odabir rastvarača se vrši na osnovu hemijske prirode jedne ili grupe komponenata koje se ekstrahuju. Za potrebe valorizacije, odnosno ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja koriste se značajne količine rastvarača, od kojih je većina opasna po zdravlje ljudi i okolinu. Još 1991. godine, američki naučnik Pol Anastas naglasio je potrebu za smanjenjem štetnih rastvarača kroz specifičan program nazvan "zelena hemija" (eng. *Green chemistry*), a nekoliko godina kasnije utvrdio principe iste (Anastas i Warner, 1998). Zelena ekstrakcija je zamišljena kao koncept kojim se štite i životna sredina i zdravlje ljudi i samim tim podstiče kompetitivnost među industrijama za implementacijom ekološki i ekonomski prihvatljivih inovativnih metoda (Vladić, 2017). Danas je taj koncept uveliko izašao iz akademskih krugova, što se može zaključiti i po tome što je zakonodavstvo Evropske Unije na polju zaštite okoline za period 2010-2050. godine stavku o smanjenju korišćenja opasnih rastvarača stavilo među prioritete (Kalušević, 2016).

Tradicionalne metode ekstrakcije podrazumevaju ekstrakciju čvrsto-tečno, maceraciju, maceraciju uz kontinuirano mešanje, perkolaciju, digestiju, Soxhlet ekstrakciju. Navedene metode karakteriše dugo vreme ekstrakcije, mali prinos, nedovoljna selektivnost, potreba za naknadnim procesuiranjem i prečišćavanjem, degradacija termolabilnih komponenti, upotreba rastvarača koji su štetni za životnu sredinu, kao i mogućnost njihovog zaostajanja u finalnom proizvodu. Navedeni nedostaci, ali i sam koncept "zelene hemije", nametnuli su potrebu za razvojem i implementacijom novih tehnologija, kao što su ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija uz pomoć mikrotalasa, superkritična ekstrakcija (Khoddami i sar. 2013).

Jedna od obećavajućih alternativa tradicionalnim metodama ekstrakcije karotenoida je upotreba jestivih biljnih ulja kao "zelenih" rastvarača. Prednost biljnih ulja za ekstrakciju karotenoida ogleda se u postizanju visokog prinosa ovih jedinjenja s obzirom na njihovu lipofilnost, ali i zbog barijerne uloge ulja protiv kiseonika usled čega se usporava vreme oksidacije i razgradnja ekstrakta karotenoida. Takođe, u zavisnosti od hemijskog sastava ulja, profila masnih kiselina i tokoferola, njihova konzumacija može predstavljati dobrobit za zdravlje ljudi. Mnogi naučnici su do sada proučavali i optimizovali ovakav vid ekstrakcije karotenoida iz različitih izvora. Tako je Anderson (1975) razvio postupak za ekstrakciju karotenoida iz sporednog proizvoda prerade škampa uz primenu sojinog ulja kao ekstragensa. U iste svrhe, Sachindra i Mahendrakar (2005) su proučavali mogućnost primene različitih vrsta biljnih ulja (suncokretovo, orahovo, sojino, kokosovo ulje, ulje pirinčanih mekinja i slačice), pri čemu su optimizovali proces ekstrakcije uzimajući u obzir odnos sporednog proizvoda prerade škampa i ulja, temperaturu i vreme. Li i sar. (2013) su ispitivali mogućnost primene suncokretovog ulja za ekstrakciju karotenoida iz sveže šargarepe uz primenu ultrazvučne metode. Suncokretovo i sojino ulje su takođe ispitani kao potencijalni ekstragensi za valorizaciju karotenoida iz kore pomorandže (Goula i sar. 2017). Međutim, relativno visoka viskoznost biljnog ulja predstavlja ograničavajući faktor za njihovu efikasnu primenu u procesu ekstrakcije. Generalno, tokom postupka ekstrakcije, visoka viskoznost rastvarača obično je povezana sa pogoršanom migracijom rastvarača kroz matricu, što utiče na efikasnost ekstrakcije. Prema dostupnoj naučnoj literaturi, najveći zabeleženi prinosi karotenoida bili su sa suncokretovim uljem kao ekstragensom.

Uprkos velikom potencijalu primene ekstrakata bogatih karotenoidima u prehrambenoj, ali i u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, njihova upotreba nailazi na niz ograničenja koja proizilaze iz njihove relativne nestabilnosti u prisustvu kiseonika, svetlosti, toplote, vlage, enzima itd. Iz tih razloga, stabilizacija karotenoida je danas jedna od glavnih tema istraživanja. Pored toga, rešavanje problema slabe apsorpcije karotenoida nakon oralne primene i povećanje njihove bioraspoloživosti je takođe od velikog značaja za njihovu primenu u ovim industrijskim granama.

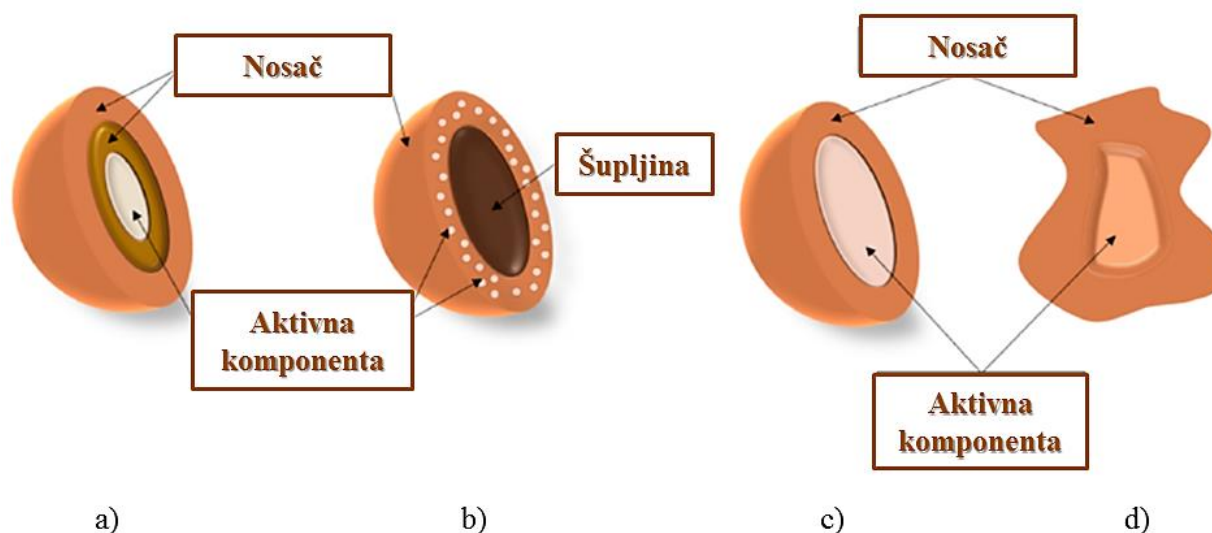


3.6. INKAPSULACIJA KAROTENOIDA

3.6.1. Pojam i cilj inkapsulacije

Savremeni trend prehrambene industrije nameće očuvanje stabilnosti bioaktivnih jedinjenja kao kritičnu tačku za njihovu implementaciju u različite proizvode, pa i funkcionalnu hranu. Kako je već naglašeno, mnoga bioaktivna jedinjenja su osetljiva na različite faktore poput kiseonika, svetlosti, temperature, vlage i pH vrednosti sredine, te tokom procesa prerade, pakovanja i skladištenja mogu izgubiti svoja biološka svojstva. Pored toga, nakon konzumiranja hrane, bioaktivne komponente su u organizmu podvrgnute brzom metabolizmu u gastrointestinalnom traktu i metabolizmu prvog prolaza, što dovodi do transformacije hemijske strukture i promene bioaktivnosti. Budući da su bioaktivna jedinjenja nosioci povoljnog dejstva funkcionalne hrane, zadatak koji se postavlja proizvođačima je da obezbede zaštitni mehanizam koji će očuvati biološka svojstva aktivnih komponenti do konzumiranja, i omogućiti njihovo delovanje na ciljanom mestu u organizmu. Tehnika koja ispunjava navedene zahteve i doprinosi očuvanju stabilnosti i kontrolisano otpuštanje aktivnih komponenti, jeste inkapsulacija (Nedović i sar. 2011; Nedović i sar. 2013).

Inkapsulacija se može definisati kao proces "hvatanja" ili "pakovanja" aktivne komponente unutar određenih materijala, tzv. nosača, ili formiranja fizičke barijere - zaštitnog omotača između okolne sredine i aktivne komponente u cilju njene zaštite (Nedović i sar. 2011; Nedović i sar. 2013). Finalni produkt inkapsulacije čini sistem aktivna komponenta/nosač, koji se naziva još i inkapsulat (Thies, 2005; Zuidam, i Shimoni, 2010). Međutim, inkapsulacija predstavlja daleko širi pojam, gde se u zavisnosti od odabira nosača i tehnike inkapsulacije mogu dobiti čestice različitog oblika i veličine. Veličina čestica se kreće između 1 i 1000 μm . Čestice prečnika manjeg od navedenog su nanokapsule ($<1 \mu\text{m}$), a veće su makrokapsule ($>1000 \mu\text{m}$) (Fang i sar. 2010; Lević i sar. 2014). Različiti oblici čestica inkapsulata podrazumevaju formiranje: (a) čestica sa višeslojnim zidom, (b) čestica sa više jezgara, (c) proste sfere i (d) čestica nepravilnog oblika (slika 10).



Slika 10. Različiti tipovi čestice inkapsulata: a) čestica sa višeslojnim zidom, b) čestica sa više jezgara, c) proste sfere i d) čestica nepravilnog oblika (Correa-Filho i sar. 2019)

Primenom inkapsulacije mogu se postići brojne prednosti (Salević i sar. 2018; Fang i sar. 2010; Zuidam i Shimoni, 2010; Nedović i sar. 2011; Nedović i sar. 2013):

- stabilizacija aktivne komponente i očuvanje funkcionalnosti tokom procesa prerade, skladištenja i konzumiranja;
- smanjenje stope degradacije aktivne komponente uzrokovane dejstvom različitih nepovoljnih spoljašnjih faktora (kiseonik, pH, svetlost, vlaga, toplota) tokom procesa proizvodnje, pakovanja, čuvanja, ili reakcijom sa drugim komponentama proizvoda;
- postizanje kontrolisanog otpuštanja aktivne komponente na ciljanom mestu i u pravo vreme;
- maskiranje neželjenog ukusa;
- praktičnije rukovanje aktivnom komponentom (npr. prevođenje tečnih biljnih ekstrakata u čvrste čestice);
- postizanje adekvatne koncentracije i uniformne raspodele aktivne komponente;
- stvaranje vizuelnih i teksturnih efekata.

Zahvaljujući nizu navedenih prednosti inkapsulacije, ova tehnika je našla široku primenu u različitim oblastima nauke i industrije. Primena inkapsulacije u prehrambenoj industriji najčešće podrazumeva zaštitu osetljivih materija od drugih komponenata prisutnih u proizvodu, sprečavanje gubitka nutritivnih svojstava proizvoda ili čak dodatak nutritivnih materija nakon završenog procesa proizvodnje (Petrović, 2010). U inkapsuliranom obliku mogu se koristiti i brojni aditivi, kao što su arome, konzervansi, boje, zaslađivači, enzimi, vitamini i antioksidanti. U oblasti fermentacija, inkapsulacija se koristi za inkapsulaciju ćelija kvasca u procesima proizvodnje piva, bioetanolu i prirodnih aroma (Lević, 2014). Poseban segment ove tehnologije jeste inkapsulacija ćelija probiotika, gde je cilj dodatna stabilizacija i održavanje visokog broja aktivnih ćelija (Manojlović i sar. 2010). Takođe, kontrolisano otpuštanje inkapsulirane materije obezbeđuje stabilnost prehrambenih proizvoda i duže zadržavanje njegovih senzornih i nutritivnih svojstava. Pored prehrambene industrije, inkapsulacija je našla široku primenu i u drugim oblastima, kao što su medicina, biotehnologija, poljoprivreda, hemijska industrija, tekstilna industrija, farmaceutska i kozmetička industrija (Wandrey i sar. 2010).

3.6.2. Nosači za inkapsulaciju

Materijali koji se mogu primeniti kao nosači bioaktivnih jedinjenja u procesima inkapsulacije su brojni i njihova primena zavisi od vrste jedinjenja koja se inkapsuliraju, kao i od proizvoda i procesa u kome će se dobijeni inkapsulat koristiti. Nosači bioaktivnih jedinjenja namenjenih za primenu u prehrambenoj industriji moraju da zadovolje stroge kriterijume bezbednosti i da budu deo GRAS liste (eng. *Generally Recognized as Safe*). Svojstva materijala kao što su dobra kompatibilnost sa aktivnom komponentom, dobro formiranje filma, biorazgradivost, cena i dostupnost su takođe važni kada se pristupa izboru nosača aktivne komponente (Lević, 2014; Wandrey i sar. 2010; Zuidam i Shimoni, 2010).

Izbor odgovarajućeg materijala nosača aktivne komponente definiše fizičko-hemijske karakteristike inkapsulata, i u tu svrhu se mogu koristiti polimeri prirodnog, polusintetskog i sintetskog porekla. Najčešće korišćeni materijali za inkapsulaciju bioaktivnih jedinjenja u prehrambenoj industriji su skrob, celuloza i njihovi derivati, pektini, gume, karagenan i alginati. Česta je i upotreba polisaharida mikrobnog i animalnog porekla, kao što su dekstran, hitozan,

ksantan i gelan (Kalušević, 2017). Ovi prirodni polimeri ispunjavaju prethodno navedene zahteve za materijale nosača aktivnih komponenti, sa izuzetkom u pogledu loših međupovršinskih svojstava. Međutim, ovaj nedostatak se može prevazići hemijskim modifikacijama u cilju poboljšanja površinske aktivnosti, ili se mogu kombinovati dva ili više materijala. Ovakav pristup omogućava da se postignu željeni rezultati kombinovanjem poželjnih svojstava različitih materijala (Lević, 2014). Tokom prethodnih godina, značajno je poraslo interesovanje za proteine kao nosače aktivnih komponenti, zahvaljujući njihovoj površinskoj aktivnosti, emulgirajućim i gelirajućim svojstvima, kao i sposobnosti za stvaranje filma. Proteinski nosači su podložni enzimskoj degradaciji u digestivnom traktu, što može da se iskoristi u razvoju sistema sa kontrolisanim oslobađanjem (Kalić, 2020). Neki od najčešće primenjivanih proteina za potrebe inkapsulacije su gluten, kazein, proteini surutke i želatin (Wandrey i sar. 2010). Lipidni materijali se takođe koriste u procesima inkapsulacije, a najrasprostranjeniji su masne kiseline i alkoholi, voskovi, gliceridi i fosfolipidi (Zuidam i Shimoni, 2010). Od sintetičkih materijala, koji su se istakli dobrim svojstvima kada je u pitanju formiranje filmova, najznačajniji su polivinil piroolidon (PVP) i polivinil alkohol (PVA) (Wandrey i sar. 2010). S obzirom da su u ovoj disertaciji korišćeni samo neki od pomenutih nosača, u daljem tekstu biće predstavljene njihove detaljnije karakteristike.

Maltodekstrini su oligosaharidi proizvedeni kiselinskom ili enzimskom hidrolizom skroba i sastoje se od D-glukoernih jedinica povezanih α (1→4) glikozidnim vezama. Kao sirovine za proizvodnju maltodekstrina primarno se koriste kukuruzni i krompirov skrob, ali se mogu proizvesti i od pirinčanog skroba i skroba tapioke. Ovi proizvodi se razlikuju po dekstroznom ekvivalentu (DE) koji predstavlja meru stepena hidrolize skroba i obrnuto je proporcionalan njihovoj molekularnoj masi. Maltodekstrini različite DE vrednosti pokazuju različite fizičko-hemijske karakteristike, gde sa porastom DE vrednosti rastu higroskopnost, rastvorljivost, osmotske osobine, dok smanjivanjem DE vrednosti raste viskoznost, kohezivnost i sprečavanje nastanka krupnih kristala u procesima kristalizacije (Wang i Wang, 2000). Osobine maltodekstrina u velikoj meri zavise od načina i uslova hidrolize, kao i botaničkog porekla skroba, te se mogu uočiti slučajevi da maltodekstrini sa istom DE vrednošću poseduju različita svojstva.

Pored veoma rasprostranjene upotrebe u prehrambenoj industriji, maltodekstrini se svrstavaju među najčešće primenjivane nosače za inkapsulaciju bioaktivnih jedinjenja. Razlozi

ove široke upotrebe su niska higroskopnost i viskoznost, dobra rastvorljivost u vodi, neutralan ukus i miris, te niska cena i dostupnost širom sveta. Utvrđeno je da maltodekstrin ima sposobnost stvaranja filma i modifikovanja površinske lepljivosti, što ga klasifikuje u efikasne nosače za inkapsulaciju različitih jedinjenja. Neke od potencijalnih mana maltodekstrina su niska sposobnost stvaranja emuzija, formiranje kristalne strukture pri izlaganju gotovog proizvoda visokoj temperaturi i dalje narušavanje strukturnog integriteta zida čestica, što rezultira aglomeracijom ili formiranjem pogače. Dodatno, može doći do otpuštanja aktivne supstance i degradacije/oksidacije tokom skladištenja (Goula i Adamopoulos, 2008; Nadeem i sar. 2011; Caliskan i Dirim, 2016). Navedene nedostatke moguće je eliminisati/smanjiti kombinacijom maltodekstrina sa drugim nosačima.

U poslednjih nekoliko godina objavljena su brojna istraživanja na temu inkapsulacije karotenoida iz različitih izvora, gde je maltodekstrin potvrdio svoje dobre karakteristike nosača. Neki od primera su inkapsulacija ekstrakta čili paprika (Guadarrama-Lezama i sar. 2014), ulja čia semenki (Us-Medina i sar. 2018), tamarilo soka (Ramakishnan i sar. 2018), koncentrata paradajza (Souza i sar. 2018), biomase *Dunaliella salina* zelenih algi (Mohammad i Ghasemi, 2016), ekstrakta slatkog krompira (Grabowski i sar. 2008), ekstrakta šargarepe (Wagner i Warthesen, 1995), lubenice (Quek i sar. 2007) itd.

Inulin je prirodni heteropolisaharid i proizvod biljaka kao što su crni i beli luk, cikoriya, artičoka i banana. Za komercijalnu upotrebu proizvodi se iz korena cikoriye (*Cichorium intybus* L.) i jerusalimske artičoke (*Helianthus tuberosus* L.), koji prosečno sadrže 15-20% inulina. Pripada grupi dijetetskih vlakana poznatih kao fruktani. Osnovni polisaharidni niz inulina je polifruktozan, koji je nastao uspostavljanjem β (2 \rightarrow 1) glikozidnih veza, dok su na krajevima niza vezani ostaci D-glukoze (Stojanović i sar. 2012). Međusobno se razlikuju prema stepenu polimerizacije (SP), a inulin proizveden iz korena cikoriye obično ima SP između 3 i 60.

Prema FDA, inulin zadovoljava GRAS standard (Agnihotri i sar. 2004). Zahvaljujući pogodnim tehnološkim karakteristikama, u prehrambenoj industriji inulin se može koristiti kao zamena za šećer, mast i brašno. Neutralnog je do blago slatkog ukusa, a poseduje ~10% slatkoće saharoze. Zbog svoje selektivne stimulacije rasta crevnih bifidobakterija inulin ispoljava prebiotsko delovanje, te ima široku primenu u industriji funkcionalne hrane i dijetetskih proizvoda. Često se kategorizuje i kao probiotik, s obzirom da se smatra formom rastvorljivih dijetetskih vlakana. Značaj inulina se ogleda i u poboljšanju apsorpcije nutritivno važnih

minerala, naročito kalcijuma i magnezijuma (Šturm i sar. 2019). Takođe, inulin minimalno utiče na povećanje nivoa šećera u krvi, i za razliku od fruktoze ne povećava nivo triglicerida, što ga čini generalno prihvatljivim za dijabetičare (Barros Fernandes i sar. 2013).

Povećan je interes za upotrebom inulina kao nosača za inkapsulaciju bioaktivnih jedinjenja osetljivih na promene ili degradaciju duž gastrointestinalnog trakta, budući da se njegovo otpuštanje odvija samo u intestinalnom traktu, gde se i apsorbuje. Do danas je ispitana upotreba inulina kao nosača karotenoida iz ekstrakta tropa paradajza (Correa-Filho i sar. 2019), soka narandže (Saavedra-Leos i sar. 2014), ulja pistaća (Poyrazoglu i sar. 2017) itd.

Proteini surutke spadaju u nutritivno najvrednije proteine zahvaljujući sastavu koji karakteriše veliki udeo esencijalnih aminokiselina i visoka bioraspoloživost u organizmu. Naime, surutka predstavlja glavni sporedni proizvod industrije mleka koja nastaje u procesima proizvodnje sira i kazeina, pri čemu se svega 10-20% mleka iskoristi za njihovo dobijanje, a 80-90% mleka otpada na surutku.

Proteini surutke, kao i njihovi fragmenti, pokazuju raznovrsna bioaktivna (antimikrobna, antikancerogena, imunostimulativna, antihipertenzivna, antioksidativna, itd.) i dobra tehnološka svojstva u pogledu rastvorljivosti, sposobnosti emulgovanja i želiranja (Madureira i sar. 2007; Tavares i Malcata, 2013, Krunić, 2017). β -Laktoglobulin je najzastupljeniji protein surutke sa udelom od 50-60%. Aminokiseline sadržane u ovom proteinu imaju nekoliko važnih funkcija, koje se ogledaju u pozitivnom delovanju na razvoj mišića, visokom nivou cisteina koji podstiče sintezu važnog antioksidanta - glutationa, pozitivno utiče na rast probiotičkih kultura *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* u crevima te pokazuje prebiotička svojstva, i utiče na imunitet vezivanjem retinske kiseline čiji je pozitivan uticaj na proliferaciju limfocita i aktivnost T-ćelija dokazan *in vitro* (Krunić, 2017; Marshall, 2004). α -Laktalbumin je drugi po važnosti protein surutke sa ukupnim udelom od 20%. Po aminokiselinskom sastavu najsličniji je proteinima u humanom mleku. Deluje kao prebiotik stimulišući rast "dobrih" bakterija, podstiče stvaranje antigena, deluje stimulatивно na B-limfocite i T ćelije, poseduje antimikrobnu, antikancerogenu i antihipertenzivnu aktivnost. α -Laktalbumin pozitivno deluje i na stres usled velike koncentracije triptofana, aminokiseline koja učestvuje u sintezi serotonina, poznatog kao hormona sreće (Marcus i sar. 2005).

Zbog navedenih karakteristika, proteini surutke su našli primenu u funkcionalnoj hrani i u procesima inkapsulacije, kao nosači mnogih bioaktivnih jedinjenja, naročito karotenoida.

Pogodne karakteristike proteina surutke kao nosača karotenoida potvrđene su od strane mnogih autora, pri inkapsulaciji ekstrakta morske heljde (Mihalcea i sar. 2017), ulja iz kore gorke dinje (Chuyen i sar. 2019), ekstrakta sporednoog proizvoda prerade crvene paprika (Vulić i sar. 2019), ekstrakta šargarepe (Šeregelj i sar. 2016), ekstrakta kore pomorandže (El-Messery i sar. 2019), ekstrakta kore mandarine (Hu i sar. 2019), kurkume (Huggett i sar. 2018) itd.

Alginati su prirodni linearni polisaharidi rastvorni u vodi, i sastoje se od ostataka β -D-manuronske i α -L-guluronske kiseline vezanih (1 \rightarrow 4) glikozidnim vezama. Najzastupljeniji i komercijalno najznačajniji alginat se dobija iz smeđih morskih algi porodice *Phaeophyceae*, ali ga u značajnim količinama mogu sintetisati i neke bakterijske vrste iz roda *Pseudomonas* i *Azotobacter* u kontinualnim kulturama na glukozu i fruktozu kao izvorima ugljenika (Nedović, 1999; Donati i Paoletti, 2009). Molekulska masa alginata se kreće između 20 000 i 240 000, što kao i zastupljenost manuronske i guluronske kiseline u njihovoj građi, varira u zavisnosti od vrste algi iz kojih se dobijaju (Suri i sar. 2013). Ovo je naročito značajno sa aspekta njihove primene, s obzirom da alginati različite strukture formiraju hidrogelove različitih karakteristika (Tonessen i Karlsen, 2002). Svojstvo formiranja hidrogelova u prisustvu određenih katjona predstavlja najznačajniju odliku alginata, zbog čega se smatra jednim od najšire ispitivanih i korišćenih biomaterijala u različitim oblastima. Naime, alginati ispoljavaju specifičan afinitet prema katjonima, i to prema sledećem poretku: $Pb^{2+} > Cu^{2+} = Ba^{2+} > Sr^{2+} > Cd^{2+} > Ca^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+}$. U tom slučaju, alginati se koriste kao gelovi ili sfere u koje se ugrađuju aktivne komponente. Naročito je ispitana mogućnost primene Ca^{2+} jona za dobijanje ovakvih gelova s obzirom na njihovu netoksičnost i znatno pravilniji, sferičan oblik Ca-alginatnih mikročestica u odnosu na mikročestice izrađene primenom drugih gelirajućih jona. Alginatne čestice koje se dobijaju mogu biti u rasponu veličina od 100 μ m do 3 mm. Pripremom ovih čestica eliminiše se upotreba organskih rastvarača i visokih temperatura koje smanjuju aktivnost bioaktivnih jedinjenja. Difuzione karakteristike alginatnih čestica, veličina njihovih pora i raspodela pora gela bitne su kada se alginat koristi za inkapsulaciju aktivnih komponenti. Koncentracija Ca^{2+} jona u medijumu za geliranje je jedan od parametara koji ima veliki uticaj na poroznost i stabilnost Ca-alginatnih mikročestica (Morch i sar. 2006).

Alginska kiselina i Na-alginat imaju GRAS status, zbog čega je u Evropi dozvoljena njihova primena kao aditiva u hrani, i prepoznaju se pod brojem E 401 (Rowe i sar. 2009). Najviše se upotrebljava u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. U literaturi

skorijeg datuma su ispitane potencijalne primene alginata kao nosača karotenoida izolovanih iz grejpfruta (Aguirre Calvo i sar. 2017), Kaboča bundeve (Mulyadi i sar. 2017), spiruline (Dulinski i sar. 2020), šargarepe (Ariahu i sar. 2020) itd.

3.6.3. Tehnike inkapsulacije

Inkapsulacione tehnike koje su našle svoju primenu u prehrambenoj industriji su brojne, i variraju od jednostavnih postupaka, koji podrazumevaju mešanje aktivne komponente i nosača, pa do složenih postupaka polimerizacije. S obzirom na brojnost i raznovrsnost postupaka inkapsulacije, ne može se izdvojiti jedinstvena i opšte prihvaćena klasifikacija istih. Međutim, prema Thies (2005) procesi inkapsulacije se mogu podeliti na hemijske i mehaničke, ali postoje i postupci koji se ne mogu svrstati ni u jednu od navedenih grupa.

U hemijske procese inkapsulacije spadaju: (1) kompleksna koacervacija; (2) polimer/polimer inkompatibilnost; (3) polimerizacija na površini tečno-tečno i tečno-čvrsto sistema; (4) *in situ* polimerizacija; (5) formiranje čestica otparavanjem rastvarača i (6) ekstruzija sa potopljenom diznom. U navedenim procesima formiranje zaštitnog sloja omotača oko aktivne komponente se odvija u rastvoru, zbog čega je važno postići dobru stabilnost emulzije/disperzije (Lević, 2014).

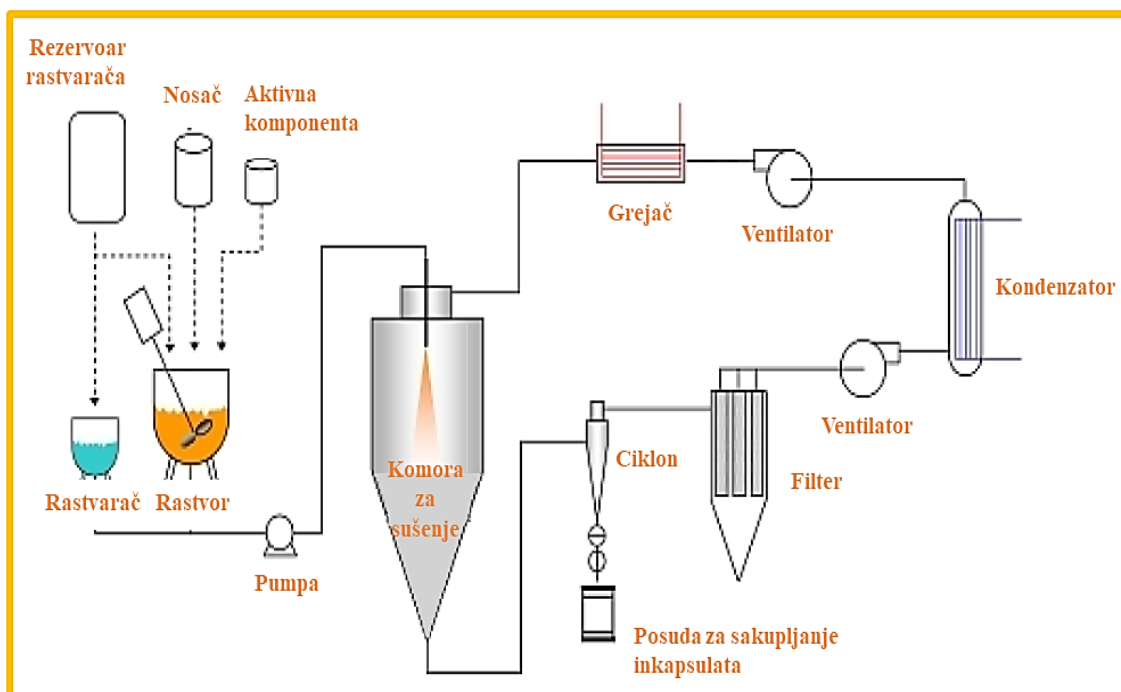
Mehanički postupci obuhvataju: (1) sušenje raspršivanjem; (2) inkapsulacija u fluidizovanom sloju; (3) centrifugalna ekstruzija; (4) ekstruzija pomoću rortirajućeg diska; (5) polimerizacija na tečnoj/gas ili čvrstoj/gas površini i (6) ekstruzija pod pritiskom. Navedene metode se baziraju na disperziji pripremljenog rastvora za inkapsulaciju mehaničkim procesima i naknadnim geliranjem dobijenih čestica (Lević, 2014; Thies, 2005).

Sušenje raspršivanjem, ili sušenje u struji toplog vazduha, jedna je od najstarijih i najčešće primenjivanih metoda inkapsulacije u prehrambenoj industriji, zahvaljujući nizu prednosti koje je odlikuju. Alternativa sprej sušenju, kada se inkapsuliraju jedinjenja koja brzo podležu degradaciji usled izlaganja visokim temperaturama, jeste liofilizacija. Liofilizacija se takođe koristi i kao naknadno, odnosno finalno sušenje prethodno inkapsuliranih bioaktivnih jedinjenja nekom drugom tehnikom. Poslednjih godina, elektrostatička ekstruzija se izdvojila kao jednostavna, precizna i isplativa metoda za dobijanje čestica odgovarajućih karakteristika za primenu u prehrambenoj industriji, ali i mnogim drugim granama industrije. U nastavku

poglavlja će biti dat detaljan prikaz ove tri tehnike, s obzirom da su upravo one korišćene u eksperimentalnom delu doktorske disertacije.

3.6.3.1. Sušenje u struji toplog vazduha

Sušenje u struji toplog vazduha ili *spray drying* tehnika zasniva se na emulgovanju ili dispergovanju materijala koji se želi inkapsulirati u rastvoru nosača, koji se potom raspršuje u komori za sušenje u struji toplog vazduha uz pomoć specijalne dizne pod pritiskom vazduha ili pomoću rotacionog atomizera (slika 11). U toku ovog procesa dolazi do naglog isparavanja rastvarača, najčešće vode, i dobijanja čvrstih čestica u vidu praha, koje u ovom slučaju predstavljaju inkapsulat. U zavisnosti od procesnih parametara, odnosno od karakteristika rastvora (viskozitet i površinski napon), temperature na ulazu (*Inlet*), temperature na izlazu (*Outlet*), brzine protoka napojne smeše i brzine raspršivanja, moguće je dobiti čestice sfernog oblika veličine od 10 do 100 μm (Nedović i sar. 2013; Zuidam i Shimoni, 2010).



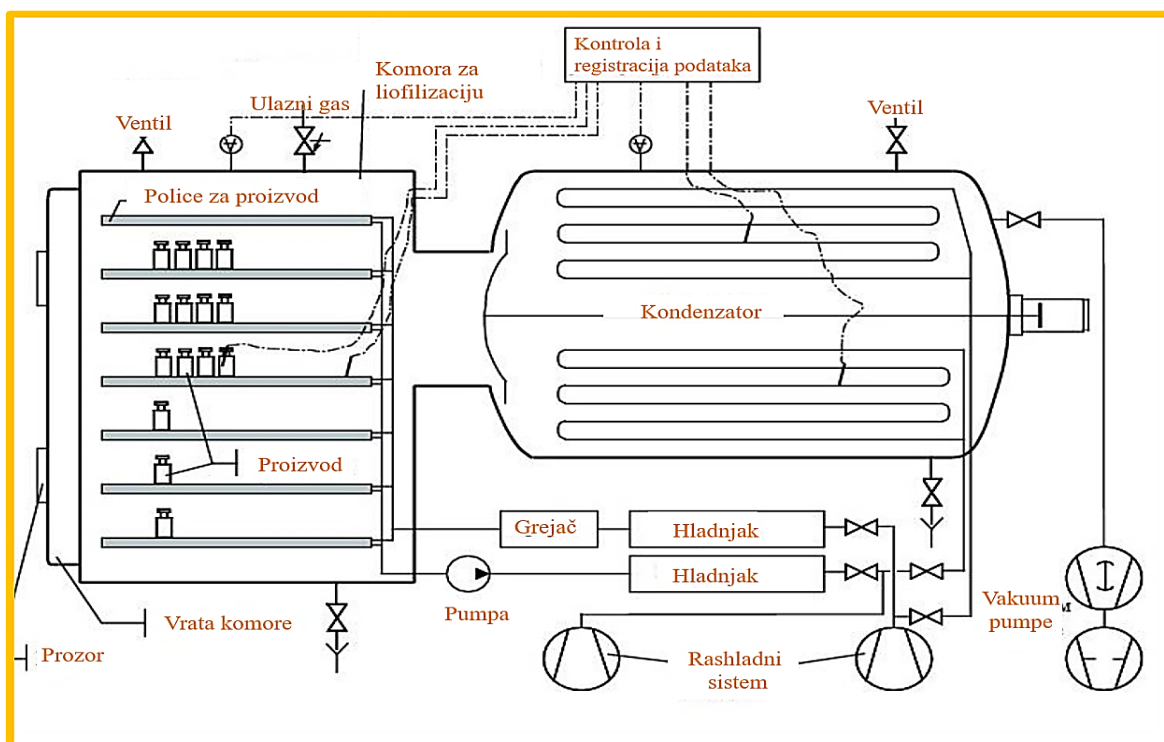
Slika 11. Šematski prikaz *spray drying* tehnike (Dobry i sar. 2009)

Prilikom inkapsulacije bioaktivnih jedinjenja *spray drying* tehnikom, kao nosači najčešće se koriste maltodesktrin, guma arabika, skrob, surutka u prahu, želatin, ali i različite mešavine ovih nosača. Vrsta nosača se bira u zavisnosti od aktivne komponente koja se inkapsulira i od željenih karakteristika finalnog proizvoda. Karakteristike odgovarajućeg nosača su dobra rastvorljivost u vodi, dobra emulgujuća svojstva, dobra sposobnost stvaranja filma, i nizak viskozitet pri povišenim temperaturama. U zavisnosti od interakcije aktivne komponente i nosača, pored svih navedenih procesnih parametara, može se postići efikasnost inkapsulacije i do 99% (Burges i Hickey, 2007; Park i Yeo, 2007).

Osnovne prednosti *spray drying* tehnike inkapsulacije, koje je čine jednom od najprimenjenijih i najpouzdanijih metoda u različitim oblastima, jesu jednostavnost, ekonomičnost, veliki kapacitet proizvodnje i mogućnost primene u komercijalne svrhe. Finalni proizvod koji se dobija odlikuje visok kvalitet i mikrobiološka stabilnost, kao i mogućnost standardizacije kvaliteta i osobina proizvoda u pogledu sadržaja aktivnih komponenti, sadržaja vlage, nasipne gustine, veličine čestica i drugih fizičko-hemijskih svojstava praha. Sa druge strane, nedostaci kada je u pitanju inkapsulacija *spray drying* tehnikom ogledaju se u ograničenom izboru nosača koji nisu izrazito viskozni, kao i aktivnih komponenti koje je moguće inkapsulirati. Ovo se naročito odnosi na komponente koje su osetljive na povišenu temperaturu. *Spray drying* tehnika je najčešće primenjivani postupak za inkapsulaciju ulja, etarskih ulja, bijnih ekstrakata, vitamina, aroma i drugih biološki aktivnih jedinjenja (Dias i sar. 2017).

3.6.3.2. Liofilizacija

Liofilizacija ili *freeze drying* tehnika se zasniva na uklanjanju rastvarača na niskim temperaturama (ispod tačke mržnjenja rastvarača) i pod vakuumom, pri čemu aktivna komponenta biva zarobljena i inkapsulirana unutar strukture nosača. Kod ove tehnike inkapsulacije, smeša aktivne komponente i rastvora nosača (najčešće vodenog) u prvoj fazi se podvrgava procesu zamrzavanja na temperaturi od $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, te se pod vakuumom i na odgovarajućoj temperaturi vrši direktno otparavanje rastvarača sublimacijom (slika 12).



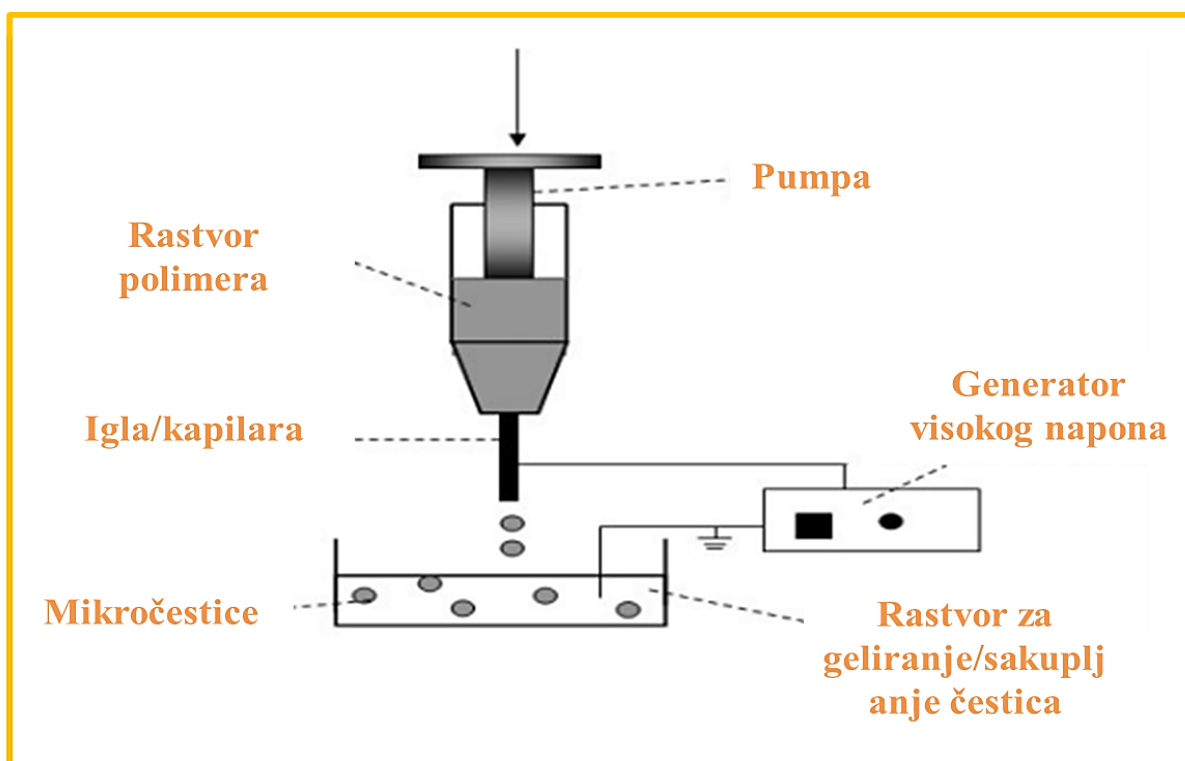
Slika 12. Šematski prikaz procesa liofilizacije (Kalušević, 2017)

U posljednjih nekoliko godina, liofilizacija je prepoznata kao značajna tehnika za inkapsulaciju termolabilnih prirodnih pigmenta poput antocijana, betalaina i karotenoida, ali i drugih bioaktivnih jedinjenja (Kalušević, 2017; Tumbas Šaponjac i sar. 2016; Šeregelj i sar. 2017; Chiu i sar. 2007; Rodriguez i sar. 2016). Posebno polje primene liofilizacije je inkapsulacija živih ćelija, odnosno bakterija, osjetljivih na različite faktore spoljašnje sredine.

Osnovne prednosti liofilizacije su dobijanje inkapsulata visokog kvaliteta i mikrobiološke stabilnosti, održavanje strukture, boje, arome, sa minimalnim gubicima aktivnih komponenti. S obzirom da se ovaj proces sušenja izvodi pod vakuumom, da zahteva primenu niskih temperatura i dugog vremenskog perioda, liofilizacija se smatra neekonomičnom tehnikom u poređenju sa *spray drying* metodom (Zuidam i Shimoni, 2010).

3.6.3.3. Elektrostatička ekstruzija

Elektrostatička ekstruzija je tehnika koja se se zasniva na primeni elektrostatičke sile koja deluje na površinu meniskusa rastvora polimera na vrhu igle/kapilare, usled čega dolazi do generisanja velikog broja kapljica, koje formiraju mikročestice u tzv. rastvoru za geliranje (CaCl_2) (Manojlović i sar. 2008; Kostić i sar. 2012). Na slici 13 prikazana je aparatura za izvođenje metode elektrostatičke ekstruzije.



Slika 13. Aparatura za izvođenje metode elektrostatičke ekstruzije (Kostić i sar. 2012)

Veličina i uniformnost dobijenih mikročestica zavise pre svega od fizičkih karakteristika rastvora polimera, prečnika igle, rastojanje između igle i rastvora za geliranje, protoka tečnosti i primenjenog napona (Nedović, 1999; Nedović i sar. 2001, Kostić i sar. 2012). Kada se govori o karakteristikama rastvora polimera, viskozitet predstavlja jedan od najvažnijih reoloških parametara koji utiču na formiranje čestica pri elektrostatičkoj ekstruziji, što je posebno izraženo na primeru ekstruzije Na-alginata i dobijanju Ca-alginatnih čestica (Lević, 2014). Sa povećanjem koncentracije alginata u rastvoru raste i viskozitet samih rastvora, što dovodi do otežavanja

procesa ekstruzije. Pri relativno malim koncentracijama alginata (do 2%) mogu se pri određenim protocima dobiti uniformne čestice sfernog oblika sa prečnicima manjim od 100 μm . Međutim, sa povećanjem koncentracije alginata, raste i viskozitet rastvora što dovodi do formiranja izduženih tj. čestica nepravilnog oblika (Nedovic i sar. 2006).

Jedna od prednosti ove tehnike jeste mogućnost inkapsulacije termolabilnih materija, jer ne zahteva primenu visokih temperatura i izvodi se pod blagim uslovima bez upotrebe organskih rastvarača koji bi mogli da inhibiraju aktivnost biološki aktivnih jedinjenja (Prusse i sar. 2008). U poslednje dve decenije, značajno mesto u inkapsulaciji zauzela je upravo ekstruziona tehnika usled relativno jednostavne proizvodnje mikročestica (Manojlović i sar. 2008; Kostić i sar. 2012). Široko se primenjuje u različitim oblastima farmacije, biotehnologije, biomedicine i prehrambene tehnologije, gde je naročito značajna u oblasti inkapsulacije aroma, biljnih ekstrakata itd.

3.6.4. Inkapsulacija karotenoida izolovanih iz različitih biljnih izvora i njihovih sporednih proizvoda prerade

Prema literaturnim podacima prikazanim u tabeli 3, može se zaključiti da je inkapsulacija karotenoida izolovanih iz različitih biljnih izvora, kao i njihovih sporednih proizvoda veoma aktuelna tema među istraživačima. Mogućnosti iskorišćenja sporednih proizvoda prerade prehrambene industrije predmet su istraživanja dugi niz godina, ali se tek u poslednjih par ulazu napori da se takve komponente inkapsuliraju radi dalje primene. U ove svrhe ispitana je mogućnost primene različitih nosača i tehnika inkapsulacije, koji su takođe predstavljeni u tabeli 3. Primeri i dokazi uspešne primene inkapsuliranih karotenoida u prehrambenim industriji su dodatak istih u sladoled (de Lima i sar., 2016), jogurt (Toniazzi i sar., 2014), hleb (Rutz i sar., 2016), testeninu (Durante i sar., 2019) itd. Takođe, ovakvi inkapsulati našli su primenu i u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, naročito kao sastojci topikalnih preparata (Casanova i Santos, 2015).

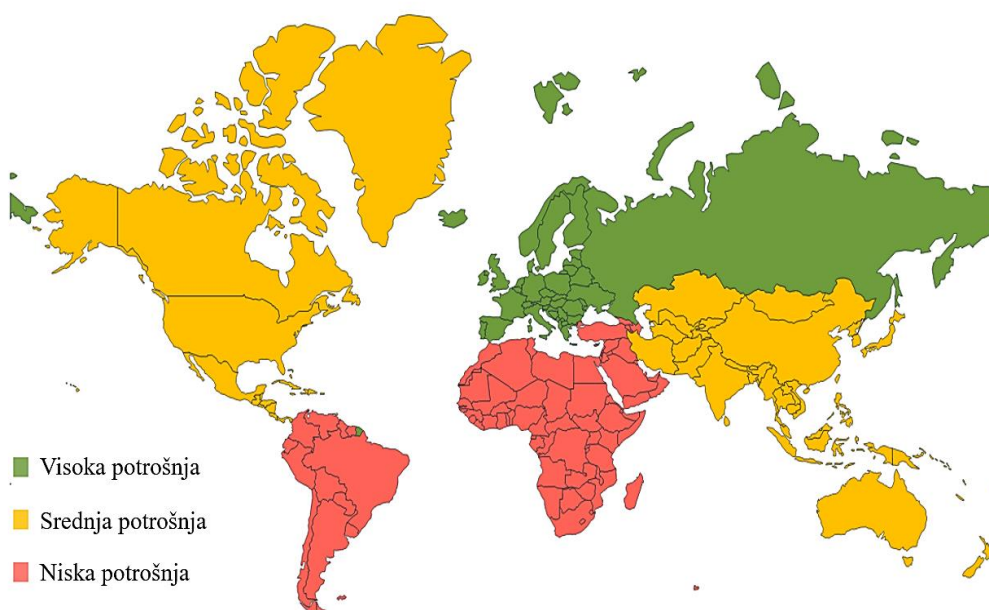
Tabela 3. Literaturni podaci o primerima inkapsulacije karotenoida iz različitih biljnih izvora i njihovih sporednih proizvoda

Izvor karotenoida	Nosač	Tehnika inkapsulacije	Izvor podataka
Kora palme breskve	Maltodekstrin Guma arabika Želatin Šećer u prahu Lecitin	Emulzifikacija Spray drying	Ordoñez-Santos i sar. (2018)
Sporedni proizvod prerade crvene paprike	Proteini surutke	Spray drying Freeze drying	Šeregelj i sar. (2019)
Trop paradajza	Želatin Poli(γ -glutaminska) kiselina Saharoza Želatin	Emulzifikacija Spray drying	Chiu i sar. (2007) Shu i sar. (2006); Ranveer i sar. (2015)
Ljuska paradajza	Zein	Elektrospining	Horuz i Belibagli (2018)
Kora gorke dinje	Guma arabika Proteini surutke	Spray drying	Chuyen i sar. (2019)
Gorka dinja	Maltodekstrin	Spray drying	Kha i sar. (2010); Angkananon i Anantawa (2015)
Slatki krompir	Maltodekstrin	Spray drying	Grabowski i sar. (2008)
Paprika	Guma arabika Proteini soje	Spray drying	Rascon i sar. (2011)
Grejpfrut	Alginat Šećeri i galaktomanani	Freeze drying	Aguirre Calvo i sar. (2017)
Smeđe alge	Maltodekstrin	Freeze drying	Indrawati i sar. (2015)
Čili	Guma arabika Maltodekstrin	Spray drying	Guadarrama-Lezama i sar. (2014)
Paradajz	β -ciklodekstrin	Freeze drying	Nunes i Mercadante (2007)
Lubenica	Maltodekstrin	Spray drying	Quek i sar. (2007)
Šargarepa	Maltodekstrin Proteini soje Proteini surutke	Freeze drying	Šeregelj i sar. (2017)
Kora melinja	Guma arabika Proteini surutke	Spray drying	Siregar i Margareta (2019)
Trop dinje	Želatin Proteini surutke	Emulzifikacija	de Oliveira Cavalcanti Medeiros i sar. (2019)



3.7. KAROTENOIDI U FUNKCIONALNOJ HRANI

Probuđena svest potrošača o dobrobiti koje mogu imati od hrane koju konzumiraju, doprinela je razvoju funkcionalne hrane sa širokim asortimanom raspoloživih bioaktivnih jedinjenja, kao i načina njihove aplikacije, sa ciljem da obezbede nutritivni i zdravstveni kvalitet proizvoda. Poslednjih godina, posebna pažnja usmerena je na potencijalni toksikološki rizik od upotrebe pojedinih sintetskih boja, što između ostalog predstavlja ključni pokretač rasta na tržištu karotenoida (Husain i sar., 2006). Tržište karotenoida u 2019. godini dostiglo je vrednost od 1,5 milijardi US\$, dok se za 2026. godinu predviđa procena od 2 milijarde US\$. Prema navedenoj statistici, Evropa je predstavljena kao najunosnija regija za tržište karotenoida (Slika 14).



Slika 14. Globalno tržište karotenoida iz 2019. godine

U toku razvoja funkcionalne hrane koja sadrži inkapsulirana bioaktivna jedinjenja, izbor samih sastojaka i procesa proizvodnje tradicionalno se zasnivao na empirijskom pristupu. Ubbink i Kruger (2006) su sugerisali da je alternativni koncept upotreba takozvanog "retro-dizajnerskog" pristupa, koji se oslanja na temeljno razumevanje potrebnih performansi sastojka u složenom okruženju hrane. Ovaj pristup obuhvata razumevanje efekta procesa prerade i fizičko-hemijskih promena koji utiču na stabilnost i oslobađanje inkapsuliranih sastojaka. Glavni pokazatelj da li je sistem za inkapsulaciju prilagođen svojoj primeni u finalnom prehrambenom proizvodu, jeste njegovo prihvatanje od strane potrošača i tržišta. Put od koncepta do prihvatanja

funkcionalnog proizvoda od strane potrošača sačinjen je od velikog broja faza, a samim tim i izazova, što zahteva doprinos naučnih istraživača, tehnologa i nutricionista (Jones i Jev, 2007).

Mogućnosti primene inkapsuliranih karotenoida u prehrambenim proizvodima su brojne, a u toku izrade ove doktorske disertacije naročita pažnja poklonjena je modifikacijama proizvoda koji su najzastupljeniji u ishrani stanovništva. Zastupljenost testenine u ishrani širom sveta se neprekidno povećava, prvenstveno zbog jednostavne i brze pripreme, lake svarljivosti, prijatnih senzorskih osobina, jednostavnog skladištenja, dugog roka trajanja i ekonomske prihvatljivosti. Međutim, testeničarke proizvode, kao i druge proizvode na bazi žita, karakteriše ograničen sadržaj proteina i drugih esencijalnih konstituenata hrane, zbog čega predstavljaju realnu osnovu za dodatak biološki aktivnih jedinjenja, koji će uticati na poboljšanje njihovih nutritivnih i funkcionalnih karakteristika. Sa druge strane, popularnost funkcionalne hrane najviše je izražena u domenu proizvodnje fermentisanih mlečnih proizvoda. Fermentisanom mleku mogu se dodati različite supstance u cilju poboljšanja konzistencije, biološke vrednosti, ukusa, mirisa, izgleda, i dr. Prema međunarodnoj klasifikaciji (FAO-WHO), navedeni dodaci pripadaju aditivima, te je zbog pomenutog stava potrošača u ovom radu ispitna mogućnost proizvodnje i senzorska prihvatljivost jogurta sa dodatkom inkapsuliranih karotenoida prirodnog porekla.

3.7.1. Primena inkapsuliranih karotenoida u proizvodnji testenine

Savremeni trend proizvodnje funkcionalne hrane nameće poboljšanje kvaliteta prehrambenih proizvoda, uključujući i testeninu, čija je važnost gotovo izjednačena sa važnošću hleba. Prema Pravilniku o kvalitetu žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzo smrznutih testa (Službeni glasnik RS br. 68/16 i 56/18) testenine se definišu kao proizvodi dobijeni mešanjem i oblikovanjem pšenične krupice ili namenskog brašna sa vodom - obična testenina, ili mešanjem i oblikovanjem osnovnih sirovina uz korišćenje nekih dodatnih sirovina - testenina sa dodacima.

Nutritivna vrednost testenine zavisi od sastojaka koji se koriste za njenu pripremu, ali se generalno smatra snabdevačem ugljenim hidratima. S tim u vezi, testenina je proizvod male prehrambene vrednosti, bogat skrobom, ali siromašan u pogledu proteina i drugih esencijalnih nutrijenata. Takođe, nutritivni kvalitet testenine se značajno menja tokom kuvanja, i u većini slučajeva oko 20% njenih početnih energetskih materija prelazi u vodu od kuvanja, zajedno sa

mineralnim materijama, aminokiselinama i vitaminima. Korišćenjem nutritivno vrednih sirovina u proizvodnji testenine može se dobiti proizvod poboljšanog nutritivnog kvaliteta i odgovarajućih senzorskih karakteristika (Pojić i sar. 2014).

Novi trendovi u proizvodnji testenine podrazumevaju dodavanje različitih komponenti u zames testa, sve u cilju unapređenja nutritivne vrednosti proizvoda, poboljšanja ukusa ili postizanja atraktivnijeg izgleda i boje testenine. Dodavanje ovih sastojaka može pozitivno uticati na teksturna svojstva kuvane testenine, ali isto tako mogu narušiti integritet skrobno-proteinske mreže i kvalitet testenine, te ovo polje tehnologije predstavlja pravi izazov za prehrambenu industriju.

Na osnovu dostupne literature može se zaključiti da je veliki broj istraživanja bio usmeren proizvodnji testenine obogaćene proteinima. U tu svrhu koristili su se proteini surutke, proteinski izolati i koncentрати pasulja, proteinski izolati kvasca i izolati soje, ali i brašna različitih žita, pseudožita ili mahunarki bogatih proteinima (Škrobot, 2016; Petitot i sar. 2010; Sudha i Leelavathi, 2011; Zhao i sar. 2005; Chillo i sar. 2008a; Wood, 2009; Chillo i sar. 2008b).

Velika pažnja je poklonjena i istraživanjima koja su imala za cilj da ostvare povećanje sadržaja prehrambenih vlakana, minerala ili vitamina u testenini, kao i obezbeđivanje ujednačene žute boje, svojstvene ovoj vrsti proizvoda, dodatkom pigmenata iz različitih biljnih izvora. Takođe, u istraživanjima novijih datuma mogu se pronaći i testenine obogaćene inkapsuliranim bioaktivnim jedinjenjima, što ukazuje da je prehrambenoj industriji finalni kvalitet funkcionalnog proizvoda, i obezbeđivanje niza prednosti uslovljene inkapsulacionim tehnikama, od izuzetne važnosti. Primer jedne takve studije predstavljena je od strane Durante i sar. (2019) koji su ispitivali dodatak ulja bundeve ili inkapsuliranog ulja bundeve sa α -ciklodekstrinom u formulaciju špageta, i dobili proizvode sa povećanim sadržajem fitosterola, skvalena, karotenoida, tokoferola i nezasićenih masnih kiselina. Inkorporiranjem inkapsuliranog ulja bundeve povećao se sadržaj prehrambenih vlakana u ovoj vrsti testenine, kao i stabilnost navedenih bioaktivnih jedinjenja tokom procesa proizvodnje. Negativna strana uključivanja bundevinog ulja u formulaciju testenine, odrazila se na teksturne karakteristike kao što su lepljivost i čvrstina, ali je ipak senzorna ocena bila zadovoljavajuća za oba uzorka špageta. Sa druge strane, Zen i sar. (2019) su ispitivali mogućnost proizvodnje zelene testenine, dodatkom inkapsulirane spiruline osnovnoj formulaciji proizvoda. Uprkos percepcije zelenih tačkica i neujednačene boje, potrošači su dali pozitivnu ocenu i prihvatljivost testenine obogaćene

mikroalgama. Inkapsulacija je i u ovom radu potvrdila pozitivan uticaj na zaštitu antioksidativnog kapaciteta mikroalgi, a sa tim i njihovu potencijalnu primenu kao aditiva u funkcionalnoj hrani. Na tehnološke parametre kvaliteta kuvane testenine nije uticalo obogaćivanje testenine inkapsuliranom spirulinom. Kao krajnji rezultat, Zen i sar. (2019) sugerisali su dodatne studije za procenu bioraspoloživosti inkapsuliranih bioaktivnih sastojaka spiruline nakon gutanja hrane.

3.7.2. Primena inkapsuliranih karotenoida u proizvodnji jogurta

Dobijanje širokog asortimana fermentisanih mlečnih proizvoda sa povećanim nutritivnim i funkcionalnim svojstvima, jedan je od glavnih pravaca istraživanja i u tehnologiji mleka i mlečnih proizvoda. Prema Pravilniku o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura (Sl. glasnik, br. 34/14) navodi se da se u fermentisane proizvode od mleka ubrajaju jogurt, kiselo mleko, fermentisani proizvodi od mleka sa probiotskim bakterijama, kefir i drugo. Jogurt je prema navedenom Pravilniku definisan kao proizvod dobijen fermentacijom mleka delovanjem simbiotske kulture *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, i predstavlja najzastupljeniji fermentisani mlečni proizvod na tržištu.

Jedan od najizraženijih trendova kada su u pitanju fermentisana mleka jeste nagla ekspanzija takozvanih "pogodnih" proizvoda koji mogu da predstavljaju ceo obrok, a odlikuju se lakoćom rukovanja pri čemu se štedi energija i vreme. Ovde spadaju brojne "drink" forme jogurta u plastičnim bočicama, proizvodi u automatima i "drive in" restoranima (Iličić, 2010). Tokom poslednje dve decenije došlo je do značajnog povećanja popularnosti jogurta usled dodatka probiotskih bakterija, koje dovode do poboljšanja nutritivnog i fiziološkog kvaliteta ovog prehrambenog proizvoda. Najnovije varijante jogurta pored probiotika sadrže i prebiotike (inulin, oligofruktoza i dr.) koji stimulišu rast i vijabilnost prisutnih startera. Takođe, razvijene su i "specijalne" vrste jogurta inkorporiranjem funkcionalnih dodataka iz različitog voća, povrća i žitarica, namenjene ciljanim grupama potrošača kao što su deca, sportisti, osobe starije dobi, ili proizvodi namenjeni ženskoj populaciji (Gregurek i Tonković, 2008; Obradović, 2008). Lansiranje novih vrsta proizvoda za specijalne namene obezbedilo je ogroman napredak u savremenom razvoju tehnologije fermentisanih mlečnih napitaka sa funkcionalnim karakteristikama, zbog čega je dalji razvoj tehnologije ove grupe proizvoda opravdan i sa

ekonomskog i sa zdravstvenog aspekta. Do danas, brojna istraživanja su dokumentovala prednosti razvoja ovakvih proizvoda, a neki od njih su funkcionalni jogurt od jagode obogaćen klijancima pšenice (Gahruie i sar. 2019), jogurt obogaćen sporednim proizvodom koji zaostaje nakon prženja kafe (Bertolino i sar. 2019), jogurt obogaćen ekstraktom sporednog proizvoda prerade paprike (Šeregelj i sar. 2019), jogurt obogaćen ekstraktom sporednog proizvoda prerade jagode (Ivanov i Dimitrova, 2019), jogurt obogaćen ekstraktom kore jabuke (Ahmad i sar. 2020), jogurt obogaćen ekstraktom kore crvene bodljikave kruške (Hernandez-Carranza i sar. 2019), jogurt obogaćen pektinom izolovanim iz kore citrusa (Arioui i sar. 2017), itd. U navedenim radovima se može uočiti trend iskorišćenja sporednih proizvoda prehrambene industrije kao izvora funkcionalnih sastojaka i njihove potencijalne primene u proizvodnji funkcionalnih proizvoda iz grupe fermentisanih mlečnih napitaka. Ovakav pristup proizvodnje jogurta, pored nesumnjivog unapređenja nutritivnog i zdravstvenog kvaliteta, obezbeđuje i značajan napredak sa tehnološkog aspekta, naročito u pogledu kvaliteta, trajnosti, stabinosti i senzorskih karakteristika.

Inkapsulacija, kao tehnologija od izuzetne važnosti za prehrambenu industriju, našla je svoju primenu i u proizvodnji jogurta tako što se koristi za zaštitu probiotskih bakterija i funkcionalnih jedinjenja kojim se vrši njihovo obogaćivanje (Borgogna i sar. 2010; Nedović i sar. 2016). U naučnoj literaturi dokumentovana su i istraživanja o potencijalnoj primeni inkapsuliranih karotenoida u proizvodnji jogurta, u cilju dobijanja proizvoda sa provitaminskim i antioksidativnim karakteristikama. U studiji Rutz i sar. (2016) sintetički β -karoten i palmino ulje inkapsulirani su smešom hitozana i karboksimetilceluloze kao nosača metodom koacervacije, kao i smešom hitozana i Na-tripolifosfata metodom jonskog geliranja. Dobijeni inkapsulati inkorporirani su u prehrambene sisteme kao što su jogurt i hleb, pri čemu se postigla bolja bioraspoloživost β -karotena u intestinalnom traktu. Toniazzi i sar. (2014) ispitali su mogućnost inkapsulacije β -karotena u liposome, stabilizovanih ksantanom i guar gumom. U ovom radu, lipozomi sa β -karotenom dobijeni su spray drying metodom, nakon čega je ispitana njihova potencijalna primena kao prehrambene boje u proizvodnji jogurta. Na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika dobijenog proizvoda, pre svega boje i teksture, potvrđena je prednost primene ovih lipozoma kao funkcionalnog dodatka za postizanje crvene boje jogurta, kao i brojnih zdravstvenih efekata.

4. Materijal i metode

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Laboratorijama za Organsku hemiju, Hemiju hrane i Hemiju prirodnih proizvoda Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Univerziteta u Novom Sadu. U okviru ovih laboratorija odrađena je ekstrakcija sporednog proizvoda prerade šargarepe, liofilizacija, spektrofotometrijske metode određivanja sadržaja ukupnih karotenoida, antioksidativne i farmakološke aktivnosti, kao i deo fizičko-hemijske karakterizacije inkapsulata. Mikrobiološke analize uzoraka realizovane su u Laboratoriji za Mikrobiologiju na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu, Univerziteta u Novom Sadu. Liofilizacija inkapsulata sprovedena je i na Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu. Sušenje u struji toplog vazduha, elektrostatička ekstruzija, mikroskopska i spektroskopska analiza realizovane su na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu, Univerziteta u Beogradu. Proizvodnja testenine sprovedena je u pilot postrojenju Instituta za istraživanja u poljoprivredi i agroekonomiji (CREA) u Sant Anđelu Lodiđijanu, Italija. HPLC analiza testenine urađena je na Departmanu za nauku o hrani, ishrani i zaštiti životne sredine (DEFENS) Univerziteta u Milanu, Italija. Proizvodnja jogurta sprovedena je u mlekari "Dana" sa sedištem u Vrbasu. Gasna hromatografija, instrumentalno merenje parametara boje, kvalitet kuvane testenine, nutritivni profil testenine i senzorska analiza dobijenih funkcionalnih proizvoda u okviru ove disertacije urađeni su u laboratorijama Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, Univerziteta u Novom Sadu.

4.1. Materijali

4.1.1. Sirovine

Sporedni proizvod prerade šargarepe dobijen je sa proizvodne linije sokova fabrike "Nectar", Bačka Palanka, Srbija (slika 15). Biljni materijal je liofiliziran (Alpha 2-4 LSC, Martin Christ, Osterode, Nemačka) i do upotrebe čuvan na -20 °C.



Slika 15. Sporedni proizvod prerade šargarepe, "Nectar", Bačka Palanka, Srbija

Suncokretovo ulje koje je korišćeno za ekstrakciju karotenoida iz biljnog materijala kupljeno je u lokalnom supermarketu, a proizvod je kompanije za proizvodnju jestivog ulja "Dijamant", Zrenjanin, Srbija.

Kao nosači za inkapsulaciju ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe korišćeni su maltodekstrin (Battery Nutrition Limited, London), proteini surutke (Olimp Laboratories, Debica, Poljska), inulin (Elephant Pharma, Beograd, Srbija) i natrijum alginat (Carl Roth, Karlsruhe, Nemačka).

Za proizvodnju testenine korišćena je krupica durum pšenice (*Triticum durum*) – semolina (Molino Pagani, Borghetto Lodigiano, Italija).

Sveže kravlje mleko koje je korišćeno za proizvodnju jogurta dobijeno je sa farme u okviru preduzeća "Sava Kovačević", Vrbas, Srbija. Proces fermentacije je izveden korišćenjem komercijalne kulture Thermophilic Yo-Flex® (Christian Hansen, Hoersholm, Danska).

4.1.2. Hemikalije i reagensi

Najveći broj specifičnih hemikalija i reagenasa korišćenih u eksperimentima nabavljen je od proizvođača Sigma-Aldrich Chemicals (Steinheim, Nemačka) i to: standardi i reagensi za kvantifikaciju i kvalifikaciju ukupnog sadržaja karotenoida i tokoferola, enzimi za *in vitro* simuliranu gastrointestinalnu digestiju (amilaza, pepsin, pankreatin), 50% bor(III)-fluorid, linolna kiselina, kao i α -glukozidaza, 4-nitrofenil α -D-glukopiranozid i natrijum diklofenak koji su korišćeni za procenu antihiperglihemijske i antiinflamatorne aktivnosti. Gvožđe(III) hlorid je proizvod kompanije JT Baker (Deventer, Holandija). Mikrobiološke podloge nabavljene su od proizvođača Himedia, Mumbai, India. Svi drugi upotrebljeni reagensi i hemikalije u eksperimentalnom radu bili su analitičke čistoće, proizvedeni u Lach-Ner (Brno, Češka Republika). Destilovana voda je proizvedena korišćenjem sistema za prečišćavanje vode - destilatora DESA 0081 Water Still (POBEL, Madrid, Španija).

4.2. Metode

4.2.1. Ekstrakcija sporednog proizvoda prerade šargarpe

Liofilizirani sporedni proizvod prerade šargarepe ekstrahovan je suncokretovim uljem u odnosu 1:2 (m/V), mešanjem u blenderu u toku 30 min na 5000 o/min (B800E, Gorenje, Velenje, Slovenia). Nakon toga izvršeno je centrifugiranje u toku 10 min na 4000 o/min (Lace 24, Colo Lab Ekparts, Novo Mesto, Slovenija) a potom odvajanje supernatanta. Dobijeni uljani ekstrakt čuvan je na temperaturi od -20 °C do dalje upotrebe.

4.2.2. Inkapsulacija ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe

4.2.2.1. Optimizacija inkapsulacije ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe *freeze i spray drying* tehnikama

Za optimizaciju smeše nosača za inkapsulaciju ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe *freeze i spray drying* tehnikama korišćena je metoda odzivnih površina (eng. *Response Surface Methodology*, u daljem tekstu RSM). Usvojeni eksperimentani model bio je *Simplex Centroid Mixture Design* gde su nezavisno promenljive, odnosno udeli ispitivanih nosača karotenoida iz ekstrakta – maltodekstrina (MD), proteina surutke (PS) i inulina (IN) varirani na četiri nivoa sa jednom ponovljenom tačkom. Kompletan model sastojao se od osam eksperimenata, odnosno formulacija (tabela 4). Kao zavisno promenljive praćeni su ukupan sadržaj karotenoida (TCar), efikasnost inkapsulacije (EI) i antioksidativna aktivnost određena β -karoten metodom (AA_{BCB}). Za odabir optimalnih inkapsulata (za obe tehnike inkapsulacije; *freeze i spray drying*) koji će dalje biti ispitivani u radu, izvršena je optimizacija više odziva (engl. *multi-response*).

Tabela 4. *Simplex Centroid Mixture* eksperimentalni plan formulacija nosača za inkapsulaciju ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe *freeze i spray drying* tehnikama

Formulacija nosača	Nezavisno promenljive		
	A	B	C
1	0,5	0	0,5
2	0	1	0
3	0,33	0,33	0,33
4	0	0,5	0,5
5	1	0	0
6	0	1	0
7	0,5	0,5	0
8	0	0	1

A – maltodekstrin; B – proteini surutke; C – inulin

Formulacije nosača definisane eksperimentalnim dizajnom pripremljene su njihovim mešanjem sa vodom zagrejanom na 60 °C, do potpune hidratacije nosača i hlađenja rastvora do 25 °C. U slučaju *freeze drying* tehnike odnos nosača i vode bio je 1:2 (m/V), dok je u slučaju *spray drying* tehnike ovaj odnos iznosio 1:8 (m/V). Prilikom pripreme inkapsulata *spray drying* tehnikom neophodno je povećati zapreminu vode za rastvaranje nosača kako bi se ostvario zadovoljavajući protok kroz sistem za sušenje. Priprema emulzija za inkapsulaciju podrazumevala je mešanje pripremljenih rastvora formulacija nosača sa ekstraktom sporednog proizvoda prerade šargarepe i emulgatora Tween 80 u toku 5 min Ultraturrax-om na 11000 o/min (Ultra-Turrax® T25, Ika-Labortechnik, Staufen, Nemačka). Predviđeni odnos nosača i ekstrakta za inkapsulaciju je 5:3 (m/V), dok se emulgator dodaje u koncentraciji od 0,02%.

Za sušenje inkapsulata liofilizacijom, odnosno *freeze drying* tehnikom, korišćen je laboratorijski liofilizator model Alpha 2-4 LSC proizvođača Martin Christ (Osterode am Harc, Nemačka) (Slika 16a). Pripremljene emulzije za inkapsulaciju su zamrznute na -80 °C u uređaju za dubinsko zamrzavanje (Snijders Labs, Tilburg, Holandija). Momenat izjednačavanja temperature uzorka i grejanja je bio indikator da nema preostalog leda za sublimaciju, odnosno da je proces liofilizacije završen.

Za sušenje inkapsulata u struji toplog vazduha, odnosno *spray drying* tehnikom, korišćen je laboratorijski *spray dryer* Buchii mini B-290 (Flavil, Švajcarska) (slika 16b). Ulazna temperatura je bila 130 °C, a izlazna 65 ± 2 °C, protok vazduha iznosio je 600 L/h, a protok tečnosti 8 ml/min.



Slika 16. a) *Freeze dryer*, Alpha 2-4 LSC ; b) *Spray dryer*, Buchii mini B-290

4.2.2.2. Inkapsulacija ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe tehnikom elektrostatičke ekstruzije

Inkapsulacija ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe tehnikom elektrostatičke ekstruzije sprovedena je uz korišćenje 2% m/V rastvora natrijum alginata kao nosača, koji je pripremljen rastvaranjem polimera u destilovanoj vodi uz mešanje na magnetnoj mešalici na sobnoj temperaturi. Neposredno pre same inkapsulacije vršena je priprema smeše natrijum alginat/ekstrakt. Maseni udeo ekstrakta u rastvoru alginata bio je 25%. Emulzija natrijum alginata i ekstrakta homogenizovana je mešanjem pri 10000 o/min u toku 5 min (Ultra-Turrax® T25, Ika-Labortechnik, Staufen, Nemačka).

Ekstruzija smeše za inkapsulaciju vršena je kroz pozitivno naelektrisanu iglu sa otvorom od 0,7 mm od nerđajućeg čelika. Protok smeše (40 ml/h) za inkapsulaciju je kontrolisan špric pumpom (model 11, Harvard Appair, Cambridge, MA, SAD). Vodeni rastvor kalcijum hlorida (15 mg/ml) je korišćen za geliranje (dobijanje Ca-alginata) pri čemu je rastvor spojen sa (-) konekcijom na generator napona. Elektrostatički potencijal (3 kV) formiran je elektrostatičkim sistemom za inkapsulaciju (VAR V1 Nisco Encapsulation Unit, Ciri, Švajcarska) (slika 17). Rastojanje između vrha igle i površine rastvora za geliranje je bilo podešeno na 2,5 cm. Nakon inkapsulacije, dobijene čestice su ostavljene u rastvoru kalcijum hlorida 60 min, kako bi se proces geliranja završio. Čestice su potom ispirane destilovanom vodom, filtrirane i osušene tehnikom liofilizacije. Liofilizirane čestice čuvane su na -20 °C do dalje upotrebe.



Slika 17. Elektrostatički sistem za inkapsulaciju, VAR V1 Nisco Encapsulation Unit

4.2.3. Primena inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe u funkcionalnoj hrani

4.2.3.1. Primena inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe u proizvodnji testenine

Proizvodnja testenine sprovedena je u pilot postrojenju Instituta za istraživanja u poljoprivredi i agroekonomiji (Sant Anđelo Lodiđiano, Italija) na jednopužnom ekstruderu (Ital past Mac 30 Pasta Maker Extruder, Parma, Italija) (slika 18). Proizvedena je testenina od krupice durum pšenice – semoline, koja je u eksperimentima korišćena kao kontrolni uzorak, i testenina u kojima je semolina supstutuisana u nivou od 10 i 20% optimalnim inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenim *freeze drying* (FDI) i *spray drying* (SDI) tehnikama. Formulacije uzoraka testenine korišćenih za dalja ispitivanja prikazane su u tabeli 5.



Slika 18. Proizvodnja testenine u pilot postrojenju Instituta za istraživanja u poljoprivredi i agroekonomiji (Sant Anđelo Lodiđiano, Italija)

Tabela 5. Formulacije testenine i oznake uzoraka

Sirovina (g/100 g)	Kontrola	10% FDI	20% FDI	10% SDI	20% SDI
Semolina	100	90	80	90	80
FDI	-	10	20	-	-
SDI	-	-	-	10	20
Voda	32	32	32	32	32

Homogenizacija semoline, odnosno semoline i inkapsulata i neophodne količine vode da bi se postigla vlažnost testa od 32%, sprovedena je u trajanju od 2,5 min i 50 o/min na sobnoj temperaturi, nakon čega je mešanje nastavljeno u ekstruzijskom rezervoaru pod vakuumom u toku 1 min i 30 o/min, a potom ekstrudiranje testa pod pritiskom od 80 atm. Na izlaznom otvoru puža ekstrudera montirana je bronzana matrica sa odgovarajućim otvorima i nožem koji je omogućio oblikovanje testa u odgovarajući oblik, karakterističan za kratko sečenu testeninu. Ekstrudirana vlažna testenina je rasprostirana na drvene ramove sa perforiranom podlogom ("lese") a potom podvrgnuta predsušenju (slika 19).

**Slika 19.** Sušenje testenine raspoređene po lesama

Cilj predsušenja je da se vlaga iz testenine intenzivno izdvoji i spreči slepljivanje testenine koja je po izlasku iz ekstrudera topla, vlažna i lepljiva. Nakon raspoređivanja testenine po lesama, lese se postavljaju na nosače i smeštaju u sušnicu sa režimom niske temperature sušenja (60 °C). Sušenje testenine izvršeno je u toku 17 h, pri konstantnoj vlažnosti od 75%. Nakon sušenja testenina je ohlađena na temperaturi od 25 °C u toku 6 h, a potom pakovana i čuvana do daljeg analiziranja. Pre analize uzorci testenine su samleveni u laboratorijskom mlinu.

4.2.3.2. Primena inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe u proizvodnji jogurta

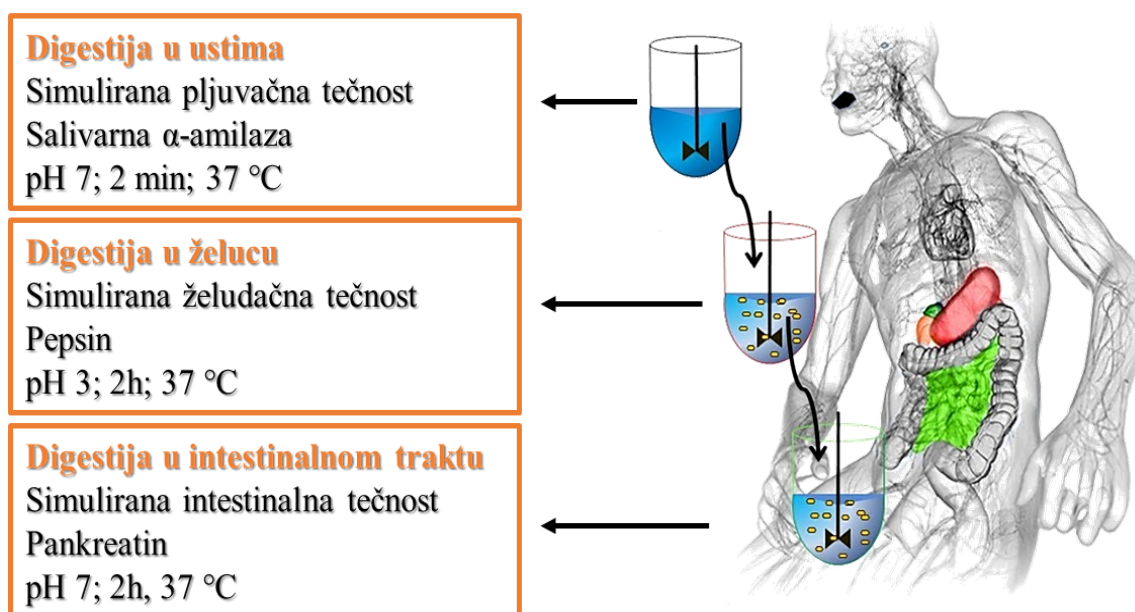
Proizvodnja jogurta od svežeg kravljeg mleka realizovana je u mlekari "Dana" sa sedištem u Vrbasu. Proces fermentacije je izveden korišćenjem komercijalne kulture Thermophilic Yo-Flex® (Christian Hansen, Hoersholm, Danska) prema preporuci proizvođača. Kada su parametri rada označili kraj procesa fermentacije, izvršen je postupak obogaćivanja i pakovanja jogurta. Obogaćivanje jogurta vršeno je dodatkom inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenim tehnikom elektrostatičke ekstruzije, pre procesa pakovanja, u koncentracijama od 2,5 i 5% (m/m) (slika 20). Obogaćeni uzorci jogurta, kao i kontrolni uzorak, upakovani su u čaše od 2,5 dcl (180 g) i označeni kao "kontrola", "2,5%" i "5%", a potom skladišteni na temperaturi od 4 °C i analizirani u toku propisanog perioda skladištenja od 28 dana.



Slika 20. Proizvodnja jogurta u mlekari "Dana" (Vrbas)

4.2.4. *In vitro* simulirana gastrointestinalna digestija

Simulirana gastrointestinalna digestija sprovedena je prema standardizovanoj metodi za statički model *in vitro* digestivnog sistema, poznat kao InfoGest, sa izvesnim modifikacijama (Mineskus i sar. 2014). Infogest statički model obuhvatao je tri faze digestije – digestija u ustima, želucu i intestinalnom traktu (slika 21).



Slika 20. Faze *in vitro* simulirane gastrointestinalne digestije

Simulirane tečnosti za sve tri faze digestije, odnosno pljuvačna, želudačna i intestinalna tečnost pripremljene su u koncentraciji od 1,25 \times upotrebom osnovnih rastvora elektrolita i vode prema datom protokolu u tabeli 6. Količine su izračunate za finalnu zapreminu od 500 ml za svaku simuliranu digestivnu tečnost. Pre upotrebe sve hemikalije i reagense je neophodno zagrijati na 37 °C. Podešavanje pH izvršeno je 1 M HCl i 1 M NaOH.

Tabela 6. Priprema osnovnih rastvora digestivnih tečnosti

Komponenta	Osnovna koncentracija	Simulirana pljuvačna tečnost pH 7	Simulirana želudačna tečnost pH 3	Simulirana intestinalna tečnost pH 7
KCl	37,3	15,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	68	3,7	0,9	0,8
NaHCO ₃	84	6,8	12,5	42,5
NaCl	117	-	11,8	9,6
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30,5	0,5	0,4	1,1
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0,06	0,5	-
Podešavanje pH				
1 M NaOH	-	-	-	-
1 M HCl	-	0,09	1,3	0,7

Digestija u ustima: Mastifikacija hrane, u ovom slučaju inkapsulata ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe, kuvane testenine (prethodno usitnjene u laboratorijskom mlinu) i jogurta, simulirana je mešanjem uzorka i simulirane pljuvačne tečnosti u odnosu 1:1 (m/V). Nakon što je postignuta konzistencija uzoraka nalik pasti, dodat je rastvor salivarne α -amilaze (pripremljena u simuliranoj pljuvačnoj tečnosti) da se postigne aktivnost od 75 U/ml u finalnoj smeši, potom kalcijum hlorid da se postigne koncentracija od 0,75 mM i potrebna količina vode za razblaživanje osnovnog rastvora simulirane pljuvačne tečnosti (1 \times koncentrat). Ovako pripremljeni uzorci su inkubirani na 37 °C u toku 2 min uz stalno mešanje.

Digestija u želucu: Bolus dobijen nakon simulirane digestije u ustima pomeša se sa simuliranom želudačnom tečnosti u odnosu 1:1 (V/V), a potom podesi pH na 3 dodavanjem prethodno definisane zapremine HCl. Dodaje se rastvor pepsina (pripremljen u simuliranoj želudačnoj tečnosti) tako da se postigne aktivnost od 2000 U/ml u finalnoj smeši, kalcijum hlorid da se postigne finalna koncentracija od 0,15 mM i potrebna količina vode za razblaživanje osnovnog rastvora simulirane želudačne tečnosti (1 \times koncentrat). Dobijene smeše su inkubirane na 37 °C u toku 2h uz stalno mešanje. Tokom inkubacije neophodno je pratiti pH i po potrebi podesiti na 3.

Digestija u intestinalnom traktu: Želudačni himus dobijen nakon simulirane digestije pomeša se sa simuliranom intestinalnom tečnosti u odnosu 1:1 (V/V) i podesi na 7 dodavanjem definisane zapremine NaOH. Potom se dodaje rastvor pankreatina (pripremljen u simuliranoj

intestinalnoj tečnosti) da se postigne aktivnost od 100 U/ml u finalnoj smeši, kalcijum hlorid da se postigne koncentracija od 0,6 mM i potrebna količina vode za razblaživanje osnovnog rastvora simulirane intestinalne tečnosti (1× koncentrat). Izvršena je inkubacija na 37 °C u toku 2h uz stalno mešanje. Tokom inkubacije neophodno je pratiti pH i po potrebi podesiti na 7.

Uzorci su nakon simulirane gastrointestinalne digestije zamrznuti na -80 °C u uređaju za dubinsko zamrzavanje a potom liofilizirani. Osušeni digestati čuvani su u tamnim posudama na temperaturi od -20 °C do dalje upotrebe. Digestirani uzorci analizirani su u pogledu antioksidativne, antihiperглиkemijske i antiinflamatorne aktivnosti.

4.2.5. Karakterizacija ekstrakta, inkapsulata i funkcionalnih proizvoda sa inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe

4.2.5.1. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih karotenoida

Sadržaj ukupnih karotenoida (Car) određen je spektrofotometrijski prema metodi Nagata i Yamashita (1992). U otvore mikrotitar ploča odmereno je 250 µl uzorka i ekstragensa (slepa proba) nakon čega su očitane apsorbance na talasnim dužinama od 663 nm, 645 nm, 505 nm i 453 nm. Ukupan sadržaj karotenoida (Car) određen je na osnovu sledeće jednačine:

$$\text{Car (mg/100 ml)} = 0,216A_{663} - 1,22A_{645} - 0,304A_{505} + 0,452A_{453}$$

gde su A_{663} , A_{645} , A_{505} i A_{453} apsorbance izmerene na 663 nm, 645 nm, 505 nm i 453 nm. Ukupan sadržaj karotenoida (Car) izražen je kao mg ekvivalenta β-karotena po 100 g uzorka (mg β-karotena/100 g).

Priprema uzoraka za analizu: Uzorci za analizu bili su ekstrakt, inkapsulati i jogurt obogaćen inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe.

Ekstrakcija karotenoida iz uljanog ekstrakta izvršena je uz primenu smeše metanol:dihlormetan (50:50 V/V) mešanjem na vorteksu u odnosu 1:5 (m/V) u toku 1 min.

Inkapsulati dobijeni *freeze i spray drying* tehnikama ekstrahovani su smešom metanol:dihlormetan (50:50 V/V) mešanjem u odnosu 1:7,5 (m/V) na vorteksu u toku 1 min, a

potom na ultrazvučnom kupatilu u toku 7 min. Nakon centrifugiranja na 12000 o/min u toku 10 min supernatanti su odvojeni, a postupak ponovljen još dva puta. Odvojeni supernatanti su spojeni, profiltrirani kroz špric filter 0,45 μm (Chromafil Xtra PTFE-45/13, Macherey-Nagel, Nemačka) i dalje analizirani.

Sadržaj karotenoida u inkapsulatu koji je dobijen tehnikom elektrostatičke ekstruzije određen je nakon rastvaranja liofiliziranih čestica inkapsulata u 2% m/V rastvoru natrijum-citrata. Homogenizacija inkapsulata i rastvora natrijum-citrata u odnosu 1:7 (m/V) izvršena je uz mešanje na vortexu do potpunog rastvaranja i dezintegracije čestica, nakon čega su karotenoidi ekstrahovani uz primenu heksana kao ekstragensa.

Sadržaj karotenoida u obogaćenim uzorcima jogurta određen je prema proceduri Šeregelj i sar. (2019). Uzorak jogurta ekstrahovan je smešom metanola i hloroforma (75:25 V/V) u odnosu (1:5 m/V) primenom ultrazvuka u toku 20 min, a potom je izvršeno centrifugiranje u trajanju od 10 min. Supernatant bogat karotenoidima je odvojen, a postupak ponovljen do potpunog iscrpljenja uzorka. Odvojeni supernatanti su spojeni i profiltrirani kroz špric filter 0,45 μm (Chromafil Xtra PTFE-45/13, Macherey-Nagel, Nemačka) pre analiziranja.

4.2.5.2. HPLC kvalitativna i kvantitativna analiza sadržaja karotenoida

Kvalitativna i kvantitativna analiza karotenoida u uzorcima izvršena je tačnom hromatografijom visoke rezolucije (engl. *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) prema metodi Hidalgo i sar. (2006) pod sledećim uslovima rada: kolona Grace-Vydac 201TP54C18, 250 \times 4,6 mm, 5 mm (Hesperia, Kalifornija, SAD); pretkolona Vydac 201TP54C18, 7,5 \times 4,6 mm, 5mm (Grace, Deerfield, Illinois, SAD); mobilna faza metanol:tetrahidrofuran (95:5, V/V) stabilizovan sa 0,1% BHT (butilhidroksitoluen); protok 1 ml/min; pumpa Waters 510 (Millipore, Milford, Masačusets, SAD). Karotenoidi su detektovani na 445 nm, koristeći Waters 996 fotodiodni detektor (eng. *Photodiode array detector*) (Millipore, Milford, Masačusets, SAD) kontrolisan softverom Millennium 32 Chromatography Manager (Waters Chromatography Division, Millipore, Milford). Korišćeni opseg talasnih dužina bio je 200-600 nm. Na osnovu dobijenih hromatograma i kalibracionih dijagrama standardnih rastvora karotenoida izračunate su koncentracije identifikovanih karotenoida

(mg/kg). U ovom slučaju, karoteni (α -karoten, β -karoten i *cis*- β -karoten) su kvantifikovani korišćenjem standardne krive β -karotena.

Priprema uzoraka za analizu: Uzorci za analizu bili su suncokretovo ulje, ekstrakt, FDI i SDI inkapsulati, semolina i uzorci nekuvane i kuvane testenine.

Ekstrakcija karotenoda iz suncokretovog ulja i uljanog ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe sprovedena je smešom rastvarača - metanol:dihlormetan (50:50 V/V), mešanjem u odnosu 1:5 (m/V) na vorteksu u toku 1 min.

Ekstrakcija karotenoida iz FDI i SDI inkapsulata, semoline i uzoraka kuvane i nekuvane testenine zasnivala se na prethodnoj saponifikaciji uzoraka, prema proceduri koju su opisali Kurilic i Juvik (1999) sa manjim modifikacijama. U odmerenu masa uzorka (0,5 g) dodato je 2,5 ml etanola sa 6% m/V pirogalola, 1 ml 95% m/V etanola, 1 ml 1% m/V NaCl i 1 ml 60% m/V KOH. Nakon propuštanja azota u toku 1 min, uzorci su homogenizovani na vorteksu u toku 1 min, te na ultrazvučnom kupatilu u toku 2 min, a potom inkubirani u vodenom kupatilu na 70 °C u toku 45 min, pri čemu je na svakih 10 min vršena homogenizacija uzoraka na vorteksu. Po završetku inkubiranja uzorci su ohlađeni i pomešani sa 7,5 ml 1% m/V NaCl i 15 ml smeše heksana i etilacetata (90:10 V/V). Nakon homogenizacije na vorteksu u toku 1 min i centrifugiranja uzoraka u roku 5 min, supernatanti se odvoje u balon a postupak ekstrakcije ponovi sa 15 ml smeše heksana i etilacetata (90:10 V/V). Spojeni supernatanti su upareni uz pomoć vakuum uparivača Büchi Rotavapor R-200 (Büchi Labortechnik, Flawil, Švajcarska), a suvi ostatak rastvoren u 2 ml ekstragensa, odnosno smeši metanola i dihlormetana (50:50 V/V).

Svi uzorci, neposredno pred HPLC analizu, su profiltrirani kroz špric filter 0,45 μ m (Chromafil Xtra PTFE-45/13, Macherey-Nagel, Nemačka).

4.2.5.3. HPLC kvalitativna i kvantitativna analiza sadržaja tokoferola

Kvalitativna i kvantitativna analiza tokoferola i tokotrienola u uzrocima izvršena je HPLC metodom opisanom od strane Hidalgo i Brandolini (2010) pod sledećim uslovima rada: kolona Alltima SI, 250 \times 4.6 mm, 5 mm (Alltech Associates Inc., Deerfield, Illinois, SAD); pretkolona Alltima SI, 7,5 \times 4,6 mm, 5mm (Alltech Associates Inc., Deerfield, Illinois, SAD); mobilna faza heksan:etilacetat:sirćetna kiselina (97,3:1,8:0,9 V/V/V); protok 1,6 ml/min; pumpa L-2130 Elite LaChrom (VWR, Hitachi, Japan); fluorescentni detektor (eng. *Fluorimetric*

detector) Jasco 821 FP Intelligent Spectrofluorometer (Japan) na talasnim dužinama ekscitacije - emisije od 290 i 330 nm; konekcija sa Hitachi D-7500 integratorom (Merck, Darmštat, Nemačka). Na osnovu dobijenih hromatograma i kalibracionih dijagrama standardnih rastvora tokoferola i tokotrienola, izračunate su koncentracije identifikovanih jedinjenja a rezultati su izraženi u mg/kg uzorka.

Priprema uzoraka za analizu: Uzorci za analizu bili su suncokretovo ulje, ekstrakt, FDI i SDI inkapsulati, semolina i uzorci nekuvane i kuvane testenine.

Svi uzorci su pripremljeni prema proceduri opisanoj u delu 4.2.5.2., a kao ekstragens za ekstrakciju tokoferola korišćena je smeša heksana i izopropanola (90:10 V/V). Dobijeni ekstrakti pre HPLC analize su profiltrirani kroz špric filter 0,45 µm (Chromafil Xtra PTFE-45/13, Macherey-Nagel, Nemačka).

4.2.5.4. HPLC kvantitativna analiza furozina

Sadržaj furozina u ispitivanim uzorcima je određen primenom HPLC metode po Resmini i Pellegrino (1990) sa hromatografskim uslovima opisanim kod Hidalgo i sar. (1995). Za analizu korišćen je tečni hromatograf Millipore Waters (Milford, Masačusets, SAD). Detekcija furozina izvršena je na C8 koloni (250 mm × 4,6 mm, Alltech, Bolonja, Italija). Kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača: A (0,4% sirćetna kiselina) i B (0,3% kalijum-hlorid u rastvaraču A). Brzina protoka je bila 1,2 ml/min. Primenjen je sledeći gradijent elucije: početno stanje do 2% za 13,5 minuta; od 2% do 50% u 7 minuta; 50% za 1 minut; od 50% do 2% u 1,5 minuta i 2% za 10 minuta. Detekcija je izvršena na talasnoj dužini od 280 nm, a injektovana zapremina uzorka je bila 20 µl.

Priprema uzoraka za analizu: Uzorci za analizu bili su FDI i SDI inkapsulati, semolina i nekuvana testenina.

U 0,4 g uzorka dodato je 8 ml 8 N HCl. Nakon propuštanja azota u toku 1 min, epruvete sa uzorcima su zatvorene i temperirane na 110 °C u toku 23h. Nakon toga, uzorci su profiltrirani kroz 0,45 µm PTFE špric filter (Chromafil Xtra PTFE-45/13, Macherey-Nagel, Nemačka). Zapremina filtrata od 0,5 ml je podvrgnuta ekstrakciji na čvrstoj fazi. Furozin je eluiran upotrebom 3 ml 3 N HCl.

4.2.5.5. Održavanje sadržaja masnih kiselina metodom gasne hromatografije (GC-FID)

Suncokretovo ulje i ekstrakt sporednog proizvoda šargarepe podvrgnuti su transesterifikaciji u prisustvu bor(III)-fluorida (BF_3) prema proceduri opisanoj od strane Karlović i Andrić (1996). Kao rastvarač upotrebljen je n-heptan, a za inertizaciju i oslobađanje metil estara masnih kiselina od ostataka rastvarača primenjivano je uparavanje u struji azota. Gasno-hromatografska analiza metil-estara masnih kiselina (FAMES) je izvršena na GC uređaju Agilent 7890A sa plameno jonizujućim detektorom (eng. *Flame ionization detector* - FID) i autoinjektujućim sistemom za tečnosti, na kapilarnoj koloni od mešane silike (Supelco SP-2560 Capillary GC Column 100 m x 0.25 mm, d = 0,20 μm). Kao gas nosač upotrebljen je helijum čistoće 99,9997 vol%, pri protoku od 1,26 ml/min. Uzorci su ubrizgavani u kolonu u takozvanom split režmu, čiji je odnos iznosio 30:1. Pikovi metil estara masnih kiselina identifikovani su poređenjem retencionih vremena iz uzoraka sa retencionim vremenima smeše standarda "Supelco 37 component FAME mix" (Supelco, Bellefonte, SAD) kao i sa internim podacima dobijenim u prethodnim ispitivanjima masnih kiselina na gasnom hromatografu sa masenim detektorom. Količina pojedinih masnih kiselina dobijena je poređenjem površine pikova uzorka sa površinama pikova standarda masnih kiselina poznate koncentracije uz primenu korekcionih faktora (MAFF, 1998). Sadržaj masnih kiselina izražen je kao maseni udeo pojedine masne kiseline.

4.2.5.6. Određivanje nutritivnih karakteristika

Sadržaj sirovih proteina, masti, ukupnih ugljenih hidrata, sirove celuloze, skroba, vlage i pepela određen je prema metodama propisanim u Pravilniku o metodima fizičkih i hemijskih analiza za kontrolu kvaliteta žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzo smrznutih testa (Službeni list SFRJ, br. 74/88). Sadržaj sirovih proteina određen je metodom po Kjeldahl-u (za inkapsulate i semolinu korišćen je faktor 5,7, dok je za testeninu korišćen faktor 6,25). Sadržaj masti u testenini je određen metodom po Weibull-Stoldt-u, sadržaj ukupnih ugljenih hidrata po

Lufle Schoorl-u, sadržaj sirove celuloze po Weender-u i sadržaj skroba po Ewers-u. Sadržaj vlage i pepela u uzorcima testenine određen je gravimetrijski.

4.2.5.7. Određivanje antioksidativne aktivnosti β -karoten metodom

Antioksidativna aktivnost (AA_{BCB}) uzoraka određena je na osnovu oksidativne degradacije β -karotena u emulziji β -karoten-linolna kiselina, spektrofotometrijskom metodom prema proceduri Al-Saikhan i sar. (1995) koja je prilagođena za mikrotitar ploču sa 96 otvora.

Priprema emulzije β -karotena i linolne kiseline podrazumevala je rastvaranje 1 mg β -karotena u 10 ml hloroforma. Alikvot od 3 ml rastvora β -karotena pomešan je sa 40 mg linolne kiseline i 400 mg Tween 40. Dobijena smeša je potom uparena na rotacionom vakuum uparivaču na 40 °C u cilju uklanjanja hloroforma, nakon čega je u porcijama dodato 100 ml 50% V/V vodonik-peroksida (H_2O_2) do postizanja homogene emulzije. Emulzija linolne kiseline za slepu probu pripremljena je na isti način, ali bez dodatka rastvora β -karotena. U otvor mikrotitar ploče dodato je 190 μ l emulzije β -karotena i linolne kiseline i 10 μ l ispitivanog ekstrakta. Kontrola je pripremljena sa 10 μ l ekstragensa i 190 μ l emulzije β -karotena i linolne kiseline. Inicijalne apsorbance su očitane odmah po završetku pripreme reakcionih smeša na 470 nm, nakon čega su su podvrgnute inkubaciji na 45°C u toku 180 minuta i očitavanju finalnih apsorbanci. Brzina degradacije β -karotena u uzorku je izračunata je upotrebom jednačine:

$$\text{Brzina degradacije } \beta\text{-karotena u uzorku} = \ln(a/b) \times 1/t$$

gde su: \ln - prirodni log, a - vrednost inicijalne apsorbance na 470 nm, b - vrednost finalne apsorbance na 470 nm, t - vreme (180 min).

% Inhibicije u odnosu na kontrolu, izračunat je upotrebom jednačine:

$$\% \text{ Inhibicije} = ((v_k - v_u)/v_k) \times 100$$

gde su: v_k - brzina degradacije β -karotena u kontrolnom uzorku i v_u - brzina degradacije β -karotena u ispitivanom uzorku.

Za izradu kalibracione krive je korišćen troloks, a rezultati su izraženi kao μmol troloks ekvivalenta (TE) po 100 g uzorka ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$).

Priprema uzoraka za analizu: Uzorci za analizu bili su suncokretovo ulje, ekstrakt, inkapsulati, kuvani uzorci testenine i uzorci jogurta.

Priprema uzoraka suncokretovog ulja, ekstrakta i inkapsulata dobijenog tehnikom elektrostatičke ekstruzije izvršeno je prema proceduri opisanoj u delu 4.2.5.1.

Ostali uzorci su bili podvrgnuti *in vitro* simuliranoj gastrointestinalnoj digestiji, i nakon liofilizacije ekstrahovani su smešom metanola i dihlormetana (50:50 V/V) mešanjem na vorteksu u odnosu 1:7,5 (m/V) u toku 1 min, a potom na ultrazvuku u toku 7 min. Nakon centrifugiranja na 12000 o/min u toku 10 min supernatanti su odvojeni, a postupak ponovljen još jednom. Odvojeni supernatanti su spojeni, profiltrirani kroz špric filter 0,45 μm (Chromafil Xtra PTFE-45/13, Macherey-Nagel, Nemačka) i analizirani.

4.2.5.8. Određivanje redukcione sposobnosti

Metodom po Oyaizu (1986), podešenoj za mikrotitar ploču sa 96 otvora, određena je redukciona sposobnost (RP), koja se zasniva na praćenju redukcione sposobnosti ispitivanog uzorka za transformaciju $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$.

Pomešano je 75 μl rastvora uzorka ili 75 μl ekstragensa (slepa proba), 75 μl natrijum-fosfatnog pufera pH 6,6 i 75 μl 1% m/V kalijum-fericijanida. Rastvori su temperirani u vodenom kupatilu 20 min na 50 °C. Prohlađeni su, a zatim je u rastvore dodato 75 μl 10% m/V trihlorsirćetne kiseline. Potom su rastvori centrifugirani na 3000 o/min u toku 10 min. Nakon centrifugiranja, u 50 μl pažljivo odvojenog supernatanta dodato je 50 μl destilovane vode i 10 μl 0,1% m/V ferihlorida. Apsorbance su izmerene odmah na talasnoj dužini od 700 nm. Za izradu kalibracione krive je korišćen troloks kao standardni antioksidant, a rezultati su izraženi kao μmol troloks ekvivalenta (TE) po 100 g uzorka ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$).

Priprema uzoraka za analizu: Uzorci za analizu bili su suncokretovo ulje, ekstrakt, inkapsulati, kuvani uzorci testenine i uzorci jogurta, a njihova priprema je opisana u delu 4.2.5.7.

4.2.5.9. Određivanje antihiperглиkemijske aktivnosti

Potencijal inhibicije α -glukozidaze (AHgA) je određen spektrofotometrijski prema metodi Tumbas Šaponjac i sar. (2014). Neophodni rastvori i reagensi za ovaj test su: 10 mM kalijum-fosfatni pufer pH 7, 2 mM rastvor supstrata (4-nitrofenil α -D-glukopiranozid) u puferu, uzorci rastvoreni u puferu i enzim (α -glukozidaza) rastvorena u puferu. Priprema enzima podrazumevala je rastvaranje 1,35 mg α -glukozidaze u 1 ml pufera, nakon čega je odmeren alikvot od 40 μ l u posudu od 10 ml i dopunjeno do crte.

Reakcione smeše su pripremljene u otvorima mikrotitar ploča na sledeći način: 100 μ l supstrata je pomešano sa 20 μ l uzorka i 100 μ l rastvora enzima. Apsorbanca 4-nitrofenola oslobođenog iz 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozida izmerena je na 405 nm, pre i nakon inkubacije od 10 min na 37 °C i upoređena sa kontrolnom apsorbancom, za izračunavanje potencijala inhibicije. AHgA (%) je izračunat na osnovu jednačine:

$$\text{AHgA (\%)} = (\Delta A_{\text{kontrola}} - \Delta A_{\text{uzorka}}) / \Delta A_{\text{kontrola}} \times 100$$

gde su $\Delta A_{\text{kontrola}}$ i ΔA_{uzorka} razlike apsorbanca reakcione smeše kontrole i sa uzorkom pre dejstva enzima i nakon 10 minuta inkubacije sa enzimom.

Slepa proba kontrole se sastojala od 100 μ l supstrata i 120 μ l pufera, kontrola od 100 μ l supstrata, 20 μ l pufera i 100 μ l enzima, slepa proba za uzorak od 100 μ l supstrata, 20 μ l uzorka i 100 μ l pufera.

Priprema uzoraka za analizu: Uzorci za analizu bili su suncokretovo ulje, ekstrakt, inkapsulati, kuvani uzorci testenine i uzorci jogurta, a njihova priprema je opisana u delu 4.2.5.7. Dobijeni ekstrakti prema opisanoj proceduri su upareni u struji azota, a potom rastvoreni u puferu u odnosu 1:10 m/V mešanjem na vorteksu u toku 1 min.

4.2.5.10. Određivanje antiinflamatorne aktivnosti

In vitro procena antiinflamatornih karakteristika uzoraka sprovedena je testom denaturacije proteina. Denaturacija proteina tkiva je jedan od dobro dokumentovanih uzroka

inflamatornih bolesti i artritisa. Proizvodnja auto antigena u pojedinim artritičnim bolestima može biti usled denaturacije proteina *in vivo*. Stoga, jedinjenja koja mogu sprečiti denaturaciju proteina mogu biti korisna za razvoj antiinflamatornih lekova (Dei i sar., 2011 i Chandra i sar., 2012).

Reakciona smeša (5 ml) se sastojala od 0,2 ml albumina jaja (od svežeg jajeta kokoške), 2,8 ml fosfatnog pufera pH 6,4 i 2 ml ekstrakta uzorka. Slični volumen (2 ml) destilovane vode služio je kao kontrola. Smeše su potom inkubirane na 37 ± 2 °C u Buchi inkubatoru (Grejno kupatilo B-491, Švajcarska) 15 min, a nakon toga zagrevane na 70 °C tokom 5 min. Posle hlađenja, njihova apsorpcija je merena na 660 nm na čitaču mikrotitar ploča Multiscan GO (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, SAD). Procenat inhibicije denaturacije proteina (AIA) je izračunat na osnovu sledeće formule:

$$\text{AIA (\%)} = (A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorka}}) / A_{\text{kontrola}} \times 100$$

gde su A_{kontrola} i A_{uzorka} apsorbanse reakcione smeše kontrole i uzorka. Natrijum diklofenak u koncentraciji od 20 mg/ml je korišćen kao referentni lek i tretiran isto u cilju određivanja apsorbancije i antiinflamatorne aktivnosti.

Priprema uzoraka za analizu: Uzorci za analizu bili su suncokretovo ulje, ekstrakt, inkapsulati, kuvani uzorci testenine i uzorci jogurta, a njihova priprema je opisana u delu 4.2.5.7.

4.2.5.11. Određivanje efikasnosti inkapsulacije karotenoida

Za inkapsulate dobijene *freeze* i *spray drying* tehnikama efikasnost inkapsulacije karotenoida određena je prema modifikovanoj metodi Barbosa i sar. (2005). Određivanje ukupnih karotenoida (TCar) izvršeno je homogenizacijom 0,25 g inkapsulata sa 5 ml 0,2 M fosfatnog pufera u toku 1 min na vortex-u u cilju razbijanja kapsula, praćeno iscrpnom ekstrakcijom karotenoida dihlormetanom na ultrazvučnom kupatilu u toku 5 min i centrifugiranjem na 4000 o/min u toku 10 min. Odvojeni supernatanti su spojeni, profiltrirani kroz špric filter 0,45 µm (Chromafil Xtra PTFE-45/13, Macherey-Nagel, Nemačka) i dalje analizirani. Određivanje površinskih karotenoida (SCar) izvršeno je homogenizacijom 0,1 g inkapsulata sa 1 ml dihlormetana na vortex-u u toku 20 s, praćeno centrifugiranjem na 4000

o/min u toku 5 min. Odvojeni supernatanti su profiltrirani kroz špric filter 0,45 µm (Chromafil Xtra PTFE-45/13, Macherey-Nagel, Nemačka) i dalje analizirani. Metodom opisanom u poglavlju 3.2.4.1. određen je sadržaj ukupnih karotenoida u celom inkapsulatu (TCar) i na površini inkapsulata (SCar), a rezultati su izraženi kao mg β-karotena/100 g inkapsulata. Efikasnost inkapsulacije EI izračunata je na osnovu jednačine:

$$EI (\%) = ((TCar-SCar)/TCar) \times 100$$

Za inkapsulat dobijen tehnikom elektrostatičke ekstruzije efikasnost inkapsulacije karotenoida izračunata je na osnovu jednačine:

$$EI (\%) = Car_{inkapsulat}/Car_{ekstrakt} \times 100$$

gde su $Car_{inkapsulat}$ - sadržaj karotenoida u inkapsulatu određen prema protokolu u poglavlju 4.2.5.1. a $Car_{ekstrakt}$ – inicijalna količina karotenoida.

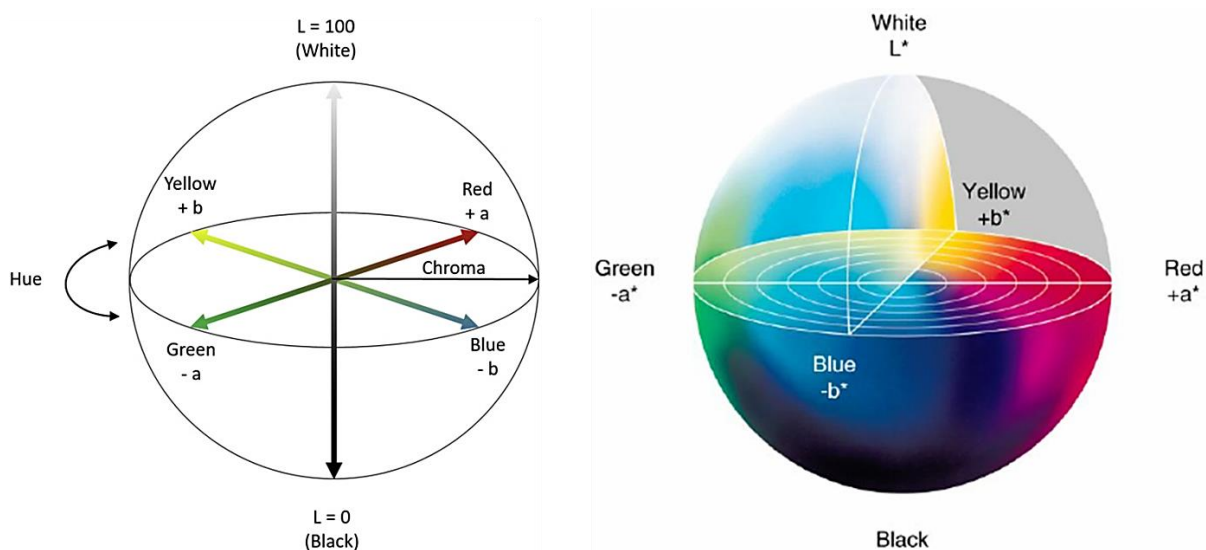
4.2.5.12. Određivanje boje

Boja ekstrakta, inkapsulata, ispitivanih uzoraka testenine i jogurta određena je upotrebom kolorimetra Minolta Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) (slika 22). Za merenja je korišćeno D-65 osvetljenje i standardni ugao posmatranja od 2°. Pre merenja izvršena je kalibracija standardom bele boje. Boja ekstrakta i jogurta izmerena je u stakenoj kivetu sa dužinom puta svetlosti od 10 mm (CM-A98) montiranoj na nosač za merenje boje tečnih uzoraka (CR-A505). Boja inkapsulata izmerena je korišćenjem nastavka za granulirane materijale (CR-A50), dok je boja testenine određena uz primenu odgovarajućeg nastavka CR-A33b sa staklenom zaštitom prilagođenog za merenje ovakve vrste uzoraka.



Slika 21. Instrumentalno merenje boje: a) merni instrument Minolta Chroma Meter CR-400; b) nastavak za merenje boje tečnih uzoraka (CR-A505, CM-A98); c) nastavak za merenje granuliranih materijala (CR-A50); d) nastavak sa staklenom zaštitom (CR-A33b)

Rezultati su izraženi prema CIE Lab sistemu boja (slika 23), gde su koordinate definisane na sledeći način: L^* je koordinata svetloće boje (gde 0 označava crno, a 100 belo), a^* je udeo crvene/zelene boje (gde $a^* > 0$ označava crvenu i $a^* < 0$ označava zelenu boju), i b^* je udeo žute/plave boje (gde $b^* > 0$ označava žutu i $b^* < 0$ označava plavu boju). Parametar C^* se definiše kao *chroma* ili zasićenost boje, dok se parametar H ili h° definiše kao *hue angle* ili nijansa, i meri ugaonu rotaciju.



Slika 22. Prikaz CIE Lab sistema boja

Imajući u vidu moguće promene boje tokom skladištenja ili finalne pripreme proizvoda, u okviru ove disertacije određeni su parametri boje ekstrakta i inkapsulata nakon perioda skladištenja od 180 dana u svetlim i tamnim uslovima (25 °C), parametri boje kuvane i nekuvane testenine, kao i parametri boje jogurta nakon perioda skladištenja od 28 dana (4 °C). Varijacije u boji (ΔE) nastale usled skladištenja ili pripreme proizvoda, određene su prema formuli Jaros i Rohm (2001):

$$\Delta E^* = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$$

4.2.5.13. Mikroskopska analiza inkapsulata

Morfologija uzoraka inkapsulata ispitivana je skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) uz prethodno nanošenje zlata. Ispitivanja su vršena na Jeol JSM-6390LV uređaju (Tokio, Japan), a nanošenje zlata pomoću Baltec SCD 005. Određivanje dimenzija, prečnika i sferičnosti hidrogel i liofiliziranih čestica inkapsulata dobijenih tehnikom elektrostatičke ekstruzije, sprovedeno je binokularnim mikroskopom Nikon SMZ18 (Japan) opremljenim kamerom (Nikon DS-Fi1c) i softverom za merenje (Nikon NIS-Elements D4.30).

4.2.5.14. FTIR i Raman spektroskopska analiza ekstrakta i inkapsulata

Analiza spektara ekstrakta i inkapsulata vršena je na infracrvenom spektrometru sa Furijevom transformacijom (FTIR) IRAffiniti-1 (Shimadzu, Japan). Spektri su snimljeni u spektralnom opsegu 4000-500 cm^{-1} , sa rezolucijom od 4 cm^{-1} . Čvrsti uzorci su kompresovani u pelete sa kalijum-bromidom, dok je uljani ekstrakt sporednog proizvoda prerade šargarepe analiziran na površini prazne pelete kalijum-bromida.

Raman spektri ekstrakta i inkapsulata snimljeni su XploRA Raman spektrometrom (Horiba Jobin Yvon) pod sledećim uslovima: laser na 785 nm (snaga smanjena na 25%); rešetka od 1800 gr/mm; objektiv mikroskopa za velike radne udaljenosti (uvećanje $\times 50$). Spektri su izgladeni (Savitzky-Golay filter sa 10 tačaka i polinomskom funkcijom drugog reda) i korigovani osnovnom linijom pomoću softvera Spectragryph.

4.2.5.15. Određivanje aktivnosti vode inkapsulata

Aktivnost vode ili a_w vrednost je izračunata pomoću a_w – metra LabSwiftawmeter Novasina (Švajcarska) na 25 °C.

4.2.5.16. Određivanje sadržaja vlage u inkapsulatima

Sadržaj vlage u inkapsulatima je određen gravimetrijskim postupkom, na osnovu gubitka sušenjem (105 °C, 3 h), koji propisuje Ph. Jug. IV.

4.2.5.17. Određivanje higroskopnosti inkapsulata

Higroskopnost je određena prema metodi opisanoj u studiji od strane autora Cai i Corke (2000), sa izvesnim modifikacijama. Uzorak inkapsulata (približno 1 g) se prenese u Petrijevu šolju i postavi u eksikator u kome su prethodno postignuti uslovi: temperatura 23 °C i relativna vlažnost 70% (što se obezbeđuje pomoću rastvora natrijum-hlorida). Higroskopnost je izražena kao gram apsorbovane vode po 100 g inkapsulata nakon sedam dana.

4.2.5.18. Određivanje prinosa inkapsulata

Prinos inkapsulata se izražava kao procenat mase finalnog praha dobijenog u procesu sušenja u odnosu na masu čvrste materije prethodno utvrđene u napojnoj smeši.

4.2.5.19. Određivanje rastvorljivosti inkapsulata

Rastvorljivost inkapsulata je izračunata nakon što je masa uzorka rastvorena u destilovanoj vodi u odnosu 1:100 (m/V) uz konstantno mešanje 30 minuta od 150 o/min, nakon čega je svaki uzorak centrifugiran brzinom 4000 o/min (EBA 21, Hettich Zentrifugen, Tutlingen, Nemačka) u toku 5 minuta. Supernatant je sušen u sušnici na 105 °C do konstantne mase.

Dobijena i početna masa uzorka su poslužile za izračunavanje rastvorljivosti inkapsulata koja je izražena procentualno.

4.2.5.20. Određivanje raspodele veličine čestica inkapsulata

Raspodela veličina čestica inkapsulata određena je metodom difrakcije laserske svetlosti. Laserska difraktometrija se bazira na činjenici da je prostorni raspored difraktovane svetlosti funkcija veličine čestica uzorka koji se analizira. Generalno, laserska difraktometrija meri intenzitete i rastojanja difrakcionih prstenova (prostorne uglove i pravac upadne svetlosti). Merenja su ostvarena pomoću uređaja Mastersizer 2000, Malvern Instruments (Velika Britanija). Uređaj čine optički instrument, jedinica za dispergovanje uzorka Hydro 2000G i računar sa odgovarajućim programskim paketom. Uzorak čestica prolazi kroz fokusirani snop svetlosti i rasejava svetlost pod karakterističnim prostornim uglovima. Mastersizer 2000 koristi dva izvora svetlosti, HeNe laser je izvor crvene svetlosti talasne dužine 633 nm, i smešten je u osu instrumenta. Drugi izvor svetlosti, koji nije u osi, je LED koji emituje plavu svetlost talasne dužine 455 nm. Opseg veličina čestica koje se mogu izmeriti instrumentom je od 0,02 do 2000 μm .

4.2.5.21. Određivanje nasipne i tapkane gustine

Određivanje nasipne i tapkane gustine izvršeno je prema proceduri koju propisuje Evropska farmakopeja (European Pharmacopeia 8.0).

Nasipna gustina je određena nakon što je masa uzorka (10 g) podeljena sa očitanom zapreminom koju je uzorak zauzeo u menzuri od 100 ml. Vrednost nasipne gustine je izražena kao masa inkapsulata po ml (g/ml).

Tapkana gustina je izračunata nakon manuelnog tapkanja istih uzoraka i to 10, 250 i 500 puta. Vrednost tapkane gustine je određena iz odnosa mase uzoraka i zapremine nakon 500 tapkanja, ukoliko razlika između V_{250} i V_{500} nije bila veća od 2 ml. Vrednost tapkane gustine je izražena kao masa inkapsulata po ml (g/ml).

4.2.5.22. Određivanje kompresibilnosti inkapsulata

Kompresibilnost inkapsulata je izražena na dva načina i to preko indeksa kompresibilnosti i Hausnerovog odnosa. Jednačine za izračunavanje su sledeće:

$$\text{Indeks kompresibilnosti (\%)} = (\text{nasipna gustina} - \text{tapkana gustina}) / \text{nasipna gustina} \times 100$$

$$\text{Hausnerov odnos} = \text{nasipna gustina} / \text{tapkana gustina}$$

Klasifikacija protočnosti i kohezivnosti inkapsulata na osnovu Indeksa kompresibilnosti i Hausnerovog odnosa izvršena je prema podacima iz tabele 7 (Jinapong i sar. 2008).

Tabela 7. Klasifikacija protočnosti i kohezivnosti inkapsulata

Indeks kompresibilnosti (%)	Protočnost
< 15	Veoma dobra
15 - 20	Dobra
20 - 35	Zadovoljavajuća
35 - 45	Loša
> 45	Veoma loša
Hausnerov odnos	Kohezivnost
< 1,2	Niska
1,2 - 1,4	Srednja
> 1,4	Visoka

4.2.5.23. Određivanje oksidativne stabilnosti ekstrakta i inkapsulata

Oksidativna stabilnost ekstrakta i inkapsulata je ispitana određivanjem indukcionog perioda na aparatu Metrohm Rancimat 670 standardnom metodom (SRPS EN ISO 6886:2017). Metoda se bazira na ubrzanom kvarenju ulja pri povišenim temperaturama i prodivavanju vazduha kroz uzorak, pri čemu se određuje otpornost ulja prema oksidaciji. Indukcioni period, izražen u satima (h), se određuje konduktometrijski, automatskim registrovanjem provodljivosti u funkciji vremena, usled izdvajanja nižemolekularnih isparljivih kiselina, produkata oksidacije

ulja pri definisanim uslovima. Temperatura zagrevanja je iznosila 100, odnosno 110 °C, a protok vazduha 18-20 l/h.

4.2.5.24. Određivanje optimalnog vremena kuvanja testenine

Testenine su kuvane u skladu sa uputstvom koje je propisano u Pravilniku o metodama fizičkih i hemijskih analiza za kontrolu kvaliteta žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzo smrznutih testa (Službeni list SFRJ, br. 74/88). Odmereno je 100 g testenine u stavljeno u 1 l ključale vode u koju je dodato 5 g kuhinjske soli. U momentu stavljanja testenine u vodu započeto je merenje vremena kuvanja. Testenina se kuvala na temperaturi na kojoj je voda umereno ključala u posudi sa poklopcem kako bi se sprečio gubitak vode isparavanjem, uz povremeno mešanje i praćenje nestanka farinoznog brašnenog sloja. Nivo farinoznog sloja je proveravan pritikanjem komada testenine između dve plastične ploče, a u trenutku kada je utvrđen nestanak ovog sloja očitano je vreme kuvanja testenine koje predstavlja optimalno vreme kuvanja.

4.2.5.25. Određivanje procenta raskuvavanja testenine

Kuvane testenine su ocedene od vode od kuvanja i isprane sa 500 ml mlake vode i ostavljene da se ocede. Voda od kuvanja i ispiranja su sakupljene (voda od ceđenja) i izmerena je njihova zapremina (C, ml). Alikvot od 100 ml je odmeren u staklenu laboratorijsku čašu poznate mase i ostavljen da ispari do suva, a potom je ostatak osušen na 130 °C u trajanju od 90 min. Suvi ostatak (So) je preračunat na sadržaj suve materije u uzorku testenine. Procenat raskuvavanja izračunat je prema sledećoj formuli (Službeni list SFRJ, br. 52/95):

$$\text{Procenat raskuvavanja (\%)} = [C (So-K)]/(100-V)$$

gde je: C – zapremina vode od ceđenja (ml); So – masa suvog ostatka od 100 ml vode od ceđenja (g); K – korekcija za kuhinjsku so (g), $K=(4,7 \cdot 100)/C$, na bazi 61% vode u soli); V – vlaga testenine.

Prema procentu raskuvavanja, kvalitet kuvane testenine ocenjuje se sledećim opisnim ocenama (Kaluderski i Filipović, 1990): do 6 - testenina ima vrlo dobre osobine kuvanja, 6 do 8 - testenina ima dobre osobine kuvanja, 8 do 10 - testenina ima zadovoljavajuće osobine kuvanja, 10 do 12 - testenina ima slabe osobine kuvanja, preko 12 - testenina ima nezadovoljavajuće osobine kuvanja.

4.2.5.26. Određivanje koeficijenta povećanja zapremine testenine

Koeficijent povećanja zapremine testenine izračunat je po sledećoj formuli (Službeni list SFRJ, br. 52/95):

$$\text{Koeficijent povećanja zapremine} = A/B$$

gde je: A - zapremina nekuvane testenine (ml) određena merenjem promene zapremine vode u menzuri nakon dodavanja 100 g nekuvane testenine; B - zapremina kuvane testenine (ml) određena merenjem promene zapremine vode u menzuri nakon dodavanja 100 g kuvane testenine.

4.2.5.27. Određivanje količine apsorbovane vode tokom kuvanja testenine

Količina vode apsorbovane tokom kuvanja određena je po sledećoj formuli (Službeni list SFRJ, br. 52/95):

$$\text{Apsorpcija vode (\%)} = [(M_k - M_n)/M_n] \times 100$$

gde je: M_k - masa kuvane testenine (g) određena merenjem mase testenine nakon kuvanja i ceđenja tokom 1 minute; M_n - masa nekuvane testenine (g) odnosno masa testenine odmerena za kuvanje (100 g).

4.2.5.28. Određivanje lepljivosti testenine

Za potrebe određivanja lepljivosti testenine primenjen je test kompresije, sa mernom ćelijom od 30 kg, uz primenu mernog pribora (HDP/PFS). Lepljivost kuvane testenine određena je 10 minuta nakon njihovog ceđenja koje je usledilo posle kuvanja i ispiranja testenine. Određivanje lepljivosti kuvane testenine sprovedeno je prilagođavanjem postojećeg protokola iz softverskog paketa (Exponent Stable Micro Systems, version 6.0):

Parametri testa: merenje sile kompresijom; brzina sonde pre testa - 2,5 mm/s; brzina sonde tokom testa - 1,5 mm/s; brzina sonde nakon testa - 10,0 mm/s; sila kompresije - 1000 g; vreme kompresije - 3 s; sila okidanja - 20 g.

4.2.5.29. Mikrobiološke analize

Mikrobiološki profil ekstrakta, inkapsulata, testenine i jogurta određen je prema ISO standardizovanim metodama. Sa ciljem otkrivanja patogena i drugih mikroorganizama koji se prenose hranom, ispitano je prisustvo *Salmonella* spp. (SRPS EN ISO 6579-1:2017) i *Listeria monocytogenes* (SRPS EN ISO 11290-1:2017), *Staphylococcus aureus* (SRPS EN ISO 6888-1:2008), *Enterobacteriaceae* (SRPS EN ISO 21528-2:2017). U uzorcima je određen broj aerobnih mezofilnih bakterija (SRPS ISO 4833-1:2013) i kvasaca i plesni (SRPS ISO 21527-2:2009). Broj bakterija mlečne kiseline (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaris*) određen je prema ISO 7889:2003. Broj streptokoka (*Streptococcus thermophilus*) određen je na M17 agaru pri aerobnim uslovima na 30 °C tokom 72 h. Broj aerobnih spirogenih bakterija nakon termičkog tretmana uzorka (5min, 100 °C) određen je na PCA agaru na 30 °C tokom 72 h.

4.2.5.30. Senzorska analiza

Ukupna dopadljivost proizvoda i dopadljivost pojedinačnih senzorskih svojstava, odnosno boja nekuvane testenine, ukus, aroma i tekstura kuvane testenine, kao i, boja, tekstura, ukus i aroma jogurta, ocenjeni su od strane panela polutreniranih ocenjivača (4 muškarca, 11 žena, starosti od 23 do 45 godina) uz primenu hedonske skale sa 9 kategorija, pri čemu je 1 = izuzetno mi se ne dopada, 5 = niti mi se dopada, niti mi se ne dopada, 9 = izuzetno mi se dopada.

Smatra se da proizvod ima prihvatljiva senzorska svojstva za potrošače, ukoliko je srednja ocena ukupne prihvatljivosti veća od 5 (niti mi se dopada, niti mi se ne dopada).

4.2.5.31. Statistička analiza

Svi eksperimenti su izvedeni u dovoljnom broju ponavljanja (tri i više), a rezultati su izraženi kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Utvrđivanje statističke značajnosti razlika između aritmetičkih sredina sprovedeno je primenom analize varijanse (ANOVA) i Tukey HSD (Honest Significant Difference) testa višestrukih poređenja sa pragom značajnosti 0,05. Svi podaci su obrađeni statistički pomoću softverskog paketa STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD).

Optimizacija formulacije nosača ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe sprovedena je primenom *Simplex Centroid* dizajna smeše kao eksperimentalnog plana, a optimalan odnos nosača – maltodekstrina, inulina i proteina surutke utvrđena je "*multi-response*" optimizacijom u softverskom paketu DESIGN-EXPERT 10.0 (Stat-Ease, Minneapolis, Inc., USA).

Kinetika održivosti mlečno-kiselinskih bakterija proučavana je pomoću četvoroparametarskog sigmoidnog matematičkog modela (eng. Four Parameter Logistic Regression function) koji predstavlja pogodan model za biološke uzorke (Romano i sar., 2007) i može se zapisati kao jednačina:

$$y = d + \frac{a-d}{1 + \left(\frac{t}{c}\right)^b}$$

gde je: $y(t)$ - broj održivih ćelija ili vrednost pH tokom procesa; a - dobijena minimalna vrednost (blizu $t = 0$); d - maksimalna vrednost koja se mogla dobiti ($t = \infty$); c - tačka pregiba (tačka na krivoj u obliku slova S između a i d) i b - Hill-ov nagib krive (nagib krive u tački c).

Analiza glavnih komponenti (eng. principal component analysis – PCA) sprovedena je na pojedinim podacima u cilju vizuelizacije korelativnih odnosa između odabranih promenljivih i ispitivanih uzoraka, primenom softvera StatSoft Statistica i softvera XLSTAT (Addinsoft, 2013. NY, SAD).

5. Rezultati i diskusija

5.1. Ekstrakcija sporednog proizvoda prerade šargarepe

Sporedni proizvod prerade šargarepe predstavlja bogat izvor karotenoida, i prva faza njegove valorizacije podrazumevala je ekstrakciju ovih jedinjenja. Kako kvalitet finalnog proizvoda, u ovom slučaju funkcionalne hrane, zavisi od kvaliteta ekstrakta, koji se koristi za obogaćivanje, u ovoj fazi eksperimentalnog dela cilj je bio postići visoku koncentraciju karotenoida primenom rastvarača koji je u skladu sa principima "zelene" hemije. Ekstrakcija lipofilnih jedinjenja, kao što su karotenoidi, predstavlja veliki izazov sa aspekta "zelene" hemije, s obzirom na mali broj nepolarnih rastvarača okarakterisanih kao GRAS. Tradicionalne metode ekstrakcije ovih jedinjenja podrazumevaju primenu organskih rastvarača poput heksana, petrol etra ili tetrahidrofurana (Saini i Keum, 2018). Međutim, ni jedan od navedenih rastvarača nije deo GRAS liste. Alternativa tradicionalnim metodama ekstrakcije jeste upotreba biljnih ulja za ekstrakciju karotenoida, čije usvajanje i primenu u ove svrhe prati ekološka i ekonomska dimenzija održivog razvoja.

Mogućnost primene biljnih ulja za ekstrakciju karotenoida ispitana je od strane grupe istraživača (Purohit i Gogate, 2015; Goula i sar. 2017; Baria i sar. 2019; da Silva i sar. 2020), koji su u tu svrhu koristili kokosovo, suncokretovo, sojino i laneno ulje. Kada je u pitanju upotreba biljnih ulja u ove svrhe, ograničavajući faktor predstavlja njihova relativno visoka viskoznost koja je uzrok otežane migracije rastvarača kroz materijal koji se ekstrahuje, i posledično smanjenje efikasnosti ekstrakcije. U navedenim studijama, najveći prinosi ostvareni su primenom suncokretovog ulja. Suncokret predstavlja jednu od najznačajnijih uljarica u našoj zemlji, i njegovo ulje se široko koristi u svakodnevnoj pripremi hrane usled dobrih fizičko-hemijskih i nutritivnih karakteristika.

Sporedni proizvod prerade šargarepe podložan je nekontrolisanoj fermentaciji i kvarenju usled visokog sadržaja vlage i fermentabilnih šećera (glukoze, fruktoze i saharoze). Iz tih razloga, procesom liofilizacije izvršeno je njegovo sušenje (konzervisanje) u ciju čuvanja i upotrebe u dužem vremenskom periodu. Nakon sušenja, sporedni proizvod prerade šargarepe ekstrahovan je klasičnom metodom suncokretovim uljem kao ekstragensom (slika 24).

Dobijeni ekstrakt okarakterisan je u pogledu sadržaja bioaktivnih jedinjenja, biološke aktivnosti, održivosti tokom perioda skladištenja, parametara boje i mikrobiološke ispravnosti.



Slika 23. Ekstrakcija sporednog proizvoda prerade šargarepe

5.1.1. Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u suncokretovom ulju i ekstraktu sporednog proizvoda prerade šargarepe

Sadržaji najvažnijih bioaktivnih jedinjenja u suncokretovom ulju i ekstraktu sporednog proizvoda prerade šargarepe predstavljeni su u tabeli 8. Sadržaj karotenoida, tokoferola i tokotrienola, određeni su HPLC metodom, dok je sadržaj masnih kiselina određen metodom gasne hromatografije.

Prisustvo karotenoida u suncokretovom ulju nije detektovano. Dobijeni rezultat je u skladu sa prethodno objavljenim literaturnim podacima, u kojima je navedeno odsustvo karotenoida u suncokretovom, grožđanom i susamovom ulju (Rafalowski i sar. 2008). Prisustvo karotenoida u biljnim uljima je od velikog značaja, ne samo zbog provitaminske uloge i prevencije brojnih hroničnih obojenja, već i zbog njihovih prirodnih antioksidativnih svojstava. Iz tih razloga, suncokretovo ulje se smatra medijumom čije je obogaćivanje karotenoidima poželjno.

Tabela 8. Sadržaj karotenoida (mg/kg), tokoferola (mg/kg) i masnih kiselina (%) u suncokretovom ulju i ekstraktu sporednog proizvoda prerade šargarepe

Sadržaj	Suncokretovo ulje	Ekstrakt
Karotenoidi (mg/kg)		
α -karoten	nd ^a	13,97 ± 1,49 ^b
β -karoten	nd ^a	40,10 ± 4,27 ^b
<i>cis</i> - β -karoten	nd ^a	6,56 ± 0,70 ^b
Ukupan sadržaj karotenoida	nd^a	60,63^b
Tokoferoli (mg/kg)		
α -tokoferol	559,40 ± 6,69 ^a	488,80 ± 4,19 ^b
β -tokoferol	22,80 ± 1,54 ^a	21,10 ± 0,63 ^a
γ -tokoferol	4,90 ± 0,12 ^a	4,80 ± 0,01 ^a
Ukupan sadržaj tokoferola	587,10^b	514,70^a
Masne kiseline (%)		
C 16:0 (Palmitinska)	5,84 ± 0,13 ^a	5,95 ± 0,12 ^a
C 16:1 (Palmitoleinska)	0,07 ± 0,01 ^a	0,08 ± 0,01 ^a
C 18:0 (Stearinska)	3,47 ± 0,06 ^a	3,21 ± 0,04 ^a
C 18:1n9c (Oleinska)	35,84 ± 0,24 ^a	36,42 ± 0,11 ^a
C 18:2n6c (Linolna)	54,78 ± 0,33 ^a	54,33 ± 0,26 ^a
Mononezasićene masne kiseline	35,91^a	36,5^a
Nezasićene masne kiseline	54,78^a	54,33^a
Zasićene masne kiseline	9,31^a	9,16^a

nd – nije detektovano

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju;

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 3$).

Sadržaj ukupnih karotenoida u uljanom ekstraktu sporednog proizvoda prerade šargarepe iznosio je 60,63 mg/kg. Dominantan karotenoid detektovan u ekstraktu je β -karoten (40,10 mg/kg), zatim α -karoten (13,97 mg/kg) i *cis*- β -karoten (6,56 mg/kg). U literaturi postoje pojedine studije koje su ispitivale efekat primene ultrazvučnih talasa na efikasnost ekstrakcije karotenoida

iz šargarepe uz primenu suncokretovog ulja kao ekstragensa. Ovim postupkom, za ostvarivanje najvećeg prinosa β -karotena (99,94 mg/100g) da Silva i sar. (2020) predložili su sledeće procesne varijable: temperatura - 60°C; vreme - 60 minuta; odnos ulja i šargarepe - 30 ml/g. Sa druge strane, Li i sar. (2013) su za ostvarivanje najvećeg prinosa β -karotena (334,75 mg/l) predložili nižu temperaturu i kraće vreme procesa (temperatura - 40 °C; vreme - 20 minuta; odnos šargarepe i ulja - 2:10; jačina ultrazvuka - 22,5 W/cm²). Radi procene efikasnosti ekstrakcije karotenoida iz šargarepe suncokretovim uljem, isti autori su ispitivali prinos β -karotena nakon ekstrakcije šargarepe organskim rastvaračem. Uz primenu heksana kao organskog rastvarača, nešto manji prinos β -karotena (321,35 mg/l) ostvaren je za vreme ekstrakcije od 60 minuta, i time potvrđen potencijal primene suncokretovog ulja kao "zelenog" ekstragensa u prehrambenoj industriji.

U toku preliminarnih ispitivanja, u poređenju sa klasičnom metodom, primena ultrazvučne ekstrakcije u ovom slučaju nije pokazala značajne razlike u prinosu karotenoida iz sporednog proizvoda prerade šargarepe (rezultati nisu prikazani). Takođe, ukoliko se upoređi sadržaj β -karotena u prethodno navedenim studijama sa sadržajem koji je ostvaren u toku ovog istraživanja, zapažaju se značajne, ali očekivane razlike, s obzirom da je valorizovana sirovina sporedni proizvod prehrambene industrije.

Tokoferoli i tokotrienoli su komponente od posebnog značaja, koje se kao antioksidanti prirodno javljaju u svim jestivim uljima. U zavisnosti od položaja metil grupe na hromanolnom prstenu, tokoferoli i tokotrienoli se klasifikuju u pojedinačna jedinjenja označena grčkim prefiksima α , β , γ , δ . Od svih tokoferola, α -tokoferol ima aktivnost vitamina E, te se upravo njegova količina uzima u obzir pri određivanju količine ovog vitamina. Prisustvo ovih antioksidanata u biljnim uljima je od vitalnog značaja i u pogledu stabilnosti polinezasićenih masnih kiselina prema oksidativnom kvarenju, a samim tim i prema održivosti ulja (*in vitro*). Antioksidativna aktivnost tokoferola zasniva se na elektron-donorskim osobinama hromanolnog prstena, gde pri otpuštanju H atoma dolazi do njegovog vezivanja za peroksil radikal (ROO[•]) molekula nezasićene masne kiseline, a potom nastanka hidroperoksida (ROOH) i tokoferil radikala (TO[•]). Nastali tokoferil radikal reaguje sa drugim peroksil radikalom ili tokoferil radikalom formirajući stabilnije proizvode. U ovom slučaju, tokotrienoli poseduju jači antioksidativni efekat na oksidaciju lipida od tokoferola. Prema Shaidi i Zhong (2005), antioksidativna aktivnost tokoferola može se predstaviti sledećim poretком: $\delta > \gamma > \beta > \alpha$.

Svojstva tokoferola u pogledu zaštite nezasićenih masnih kiselina od oksidacije podjednako su značajna i u biološkim sistemima (*in vivo*) (Brigelius-Flohé i Traber, 1999). Prema Ryan i sar. (2007) tokoferoli deluju kao "skevendžeri" (hvatači) lipidnih peroksil radikala, te se njihova zastupljenost u hrani dovodi u direktnu vezu sa smanjenim mortalitetom od kardiovaskularnih i kancerogenih oboljenja (Tucker i Townsend, 2005).

Ukupan sadržaj tokoferola u ispitivanom suncokretovom ulju iznosi 587,1 mg/kg. Najzastupljeniji izomer bio je α -tokoferol, koji predstavlja 95,28% vrednosti ukupnih tokoferola. Pored α -tokoferola, prisutne su i male količine β -tokoferola (3,88%) i γ -tokoferola (0,84%). Tokotrienoli nisu detektovani u suncokretovom ulju. Značajno viši sadržaj α -tokoferola u komercijanom suncokretovom ulju prijavljen je od strane da Silva i sar. (2020) i iznosio je 149,76 mg/100 g, dok su su Zaunschirm i sar. (2018) zabeležili sadržaj α - i γ -tokoferola u suncokretovom ulju sa vrednostima od 788,0 i 35,7 mg/kg. Ayerdi Gotor i sar. (2015) su prijavili ukupan sadržaj tokoferola u suncokretovom ulju između 303,8 i 1187,9 mg/kg za različite komercijalne sorte uzgajane širom Francuske. Rezultati njihove studije bili su jasan pokazatelj da sadržaj tokoferola zavisi od genotipa i klimatskih uslov gajenja suncokreta, kao i to da je sadržaj tokoferola u velikoj korelaciji sa brojem sunčanih dana.

Sadržaj ukupnih tokoferola u uljanom ekstraktu sporednog proizvoda prerade šargarepe iznosi 514,7 mg/kg. U odnosu na suncokretovo ulje, nisu zabeležene značajne razlike u sadržajima β - i γ -tokoferola, dok je sadržaj α -tokoferola smanjen za 12,62%. Smanjenje sadržaja α -tokoferola nakon obogaćivanja suncokretovog ulja β -karotenom iz šargarepe takođe je prijavljeno od strane da Silva i sar. (2020). Pretpostavlja se da je zagrevanje tokom procesa ekstrakcije uticalo na prinos α -tokoferola usled njegove male oksidativne stabilnosti, dok su β - i γ -tokoferol otporniji na oksidaciju i pokazuju veću antioksidativnu aktivnost.

Pri razmatranju bioaktivnih jedinjenja jestivih biljnih ulja, od posebne važnosti je sastav i sadržaj masnih kiselina, s obzirom da organizmu obezbeđuju najveću količinu energije. Osim toga, pojedine masne kiseline imaju esencijalnu ulogu u pravilnom funkcionisanju organizma, a mogu da deluju i protektivno kod različitih zdravstvenih poremećaja. Poređenjem sastava, odnosno sadržaja masnih kiselina, nisu zabeležene značajne razlike između suncokretovog ulja i dobijenog ekstrakta. Rezultati pokazuju da su u navedenim uzorcima najzastupljenije nezasićene masne kiseline (~54,5%), zatim mononezasićene masne kiseline (~36,5%) i zasićene masne kiseline (~9%). Najzastupljenije masne kiseline u suncokretovom ulju i dobijenom ekstraktu su

linolna i oleinska kiselina; 54,78% linolne i 35,84% oleinske kod suncokretovog ulja, odnosno 54,33% linolne i 36,42% oleinske kiseline kod ekstrakta. U sastavu masnih kiselina suncokretovog ulja i ekstrakta prisutne su i palmitinska (5,84%, odnosno 5,95%), stearinska (3,47%, odnosno 3,21%) i palmitoleinska kiselina u tragovima. Prema navedenim rezultatima može se zaključiti da suncokretovo ulje pripada grupi jestivih ulja oleinsko-linolnog tipa, što je u skladu sa literaturnim podacima. Prema Panda i sar. (2016) komercijalno suncokretovo ulje sadrži oko 90% nezasićenih masnih kiselina (linolna i oleinska), a preostalih 10% čine zasićene masne kiseline (palmitinska i stearinska). Na sastav masnih kiselina utiče raznolikost između vrsta, životna sredina i uslovi rasta suncokreta. Tokom ispitivanja suncokreta gajenih u regionu istočnog Mediterana, Akkaya (2016) je izvestio da visoke temperature i niže količine kiše tokom vremena sazrevanja semena povećavaju sadržaj oleinske kiseline. Visok sadržaj oleinske kiseline doprinosi otpornosti ulja na visoke temperature i oksidaciju, što je povoljno jer prehrambena industrija zahteva visokokvalitetna biljna ulja.

5.1.2. Antioksidativna i farmakološka aktivnost suncokretovog ulja i ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe

Oštećenje ćelija indukovano porastom broja slobodnih radikala, odnosno pojavom oksidativnog stresa, manifestuje se peroksidacijom membranskih i unutarćelijskih lipida, oksidativnim oštećenjem membranskih i unutarćelijskih proteina, kao i molekula nukleinskih kiselina. Sva pomenuta oštećenja, pojedinačno i zajedno, narušavaju integritet ćelija, i kao takva su povezana sa razvojem nekih bolesti, ali i sa starenjem (Finkel, 2003). Poznato je da funkciju uklanjanja i inaktiviranja slobodnih radikala u organizmu vrši sistem antioksidativne zaštite. Endogeni antioksidativni sistemi (enzimi superoksid-dismutaza - SOD, katalaza - CAT i enzimi glutation redoks ciklusa) imaju presudnu funkciju u borbi protiv oksidativnog stresa, ali se ne može zanemariti i značaj antioksidanata koji se unose hranom. S obzirom na ograničenja iz bezbednosnih razloga kada je u pitanju upotreba sintetičkih antioksidanata, prirodni antioksidanti dobijeni iz biljnih materijala i njihovih sporednih proizvoda privlače sve veće interesovanje prehrambene industrije, kao i samih potrošača (Shahidi i Ambigaipalan, 2015). Konstatacije autora Ju i sar. (2010) i Li i sar. (2007) su da lipofilni antioksidanti (karotenoidi, tokoferoli i

masne kiseline), izolovani iz različitih izvora, poseduju brojne biološke aktivnosti i na taj način doprinose poboljšanju zdravlja ljudi.

Za određivanje efikasnosti karotenoida kao antioksidanata i mehanizma njihovog delovanja, koristi se širok spektar eksperimentalnih metoda, od jednostavnih spektrofotometrijskih antioksidativnih testova, preko biološki relevantnijih baziranih na ćelijama, do kompleksnijih i najpreciznijih koji uključuju životinjske modele i kliničke studije na ljudima. Pri razmatranju biološke aktivnosti prirodnih komponenti i proizvoda, treba imati u vidu da ekstrakti predstavljaju kompleksne mešavine različitih jedinjenja, te biološki efekat koji ispoljavaju može biti rezultat sinergije svih molekula ili pak delovanja samo onih najdominantnijih. U ovakvim sistemima, koncept sinergizma je od velikog značaja, pa je za procenu biološke aktivnosti neophodno ispitati uticaj ekstrakta, a ne samo njegovih pojedinačnih komponenti (Vladić, 2017).

Tabela 9. Antioksidativna i farmakološka aktivnost suncokretovog ulja i ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe

Aktivnost	Suncokretovo ulje	Ekstrakt
Antioksidativna aktivnost ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$)		
β-karoten metoda (AA_{BCB})	$31,69 \pm 2,82^{\text{a}}$	$159,54 \pm 6,95^{\text{b}}$
Redukciona sposobnost (RP)	$11,16 \pm 0,17^{\text{a}}$	$30,04 \pm 1,51^{\text{b}}$
Farmakološka aktivnost (% inhibicije)		
Antihiperглиkemijska aktivnost (AHgA)	$41,32 \pm 1,03^{\text{a}}$	$49,01 \pm 1,23^{\text{b}}$
Antiinfamatorna aktivnost (AIA)	$34,72 \pm 0,84^{\text{a}}$	$53,28 \pm 0,96^{\text{a}}$

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju;

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija ($n = 3$).

Antioksidativna aktivnost suncokretovog ulja i ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe određena je spektrofotometrijskim testovima, od kojih je jedan zasnovan na potencijalu inhibicije lipidne peroksidacije (β -karoten metoda), a drugi na transferu elektrona (redukciona sposobnost). Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 9. Naime, antioksidant reaguje u zavisnosti od svoje hemijske prirode, što za rezultat ima dobijanje različitih vrednosti aktivnosti

za svaki od primenjenih testova. Kako dobijene vrednosti često mogu biti u slaboj korelaciji, potrebno je izvesti više različitih testova da bi se sa sigurnošću mogla utvrditi antioksidativna aktivnost ispitivanog jedinjenja ili uzorka.

β -Karoten metoda (AA_{BCB}) za procenu antioksidativne aktivnosti uzoraka, zasniva se na oksidativnoj degradaciji β -karotena u emulziji β -karoten-linolna kiselina. Do oksidacije β -karotena dolazi tokom slobodnoradikalske reakcije sa radikalima karakterističnim za oksidaciju lipida, prilikom čega β -karoten gubi dvostruke veze. Dodatkom antioksidanta u sistem sprečava se apstrakcija vodonika iz dialilnih metilenskih grupa linolne kiseline, čime se indirektno sprečava oksidacija β -karotena. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da je obogaćivanje suncokretovog ulja karotenoidima iz sporednog proizvoda prerade šargarepe značajno uticalo na proces inhibicije lipidne peroksidacije, te se AA_{BCB} povećala sa 31,69 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ na 159,54 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ ekstrakta. Kao što je već napomenuto, α -tokoferol se smatra efikasnim antioksidantom u hidrofobnom okruženju, sa izraženom sposobnošću da stabilizuje slobodne radikale i transformiše perokside u stabilne proizvode, zaustavljajući na taj način tok lančane reakcije. Prema Fiedor i Burda (2014), β -karoten i α -tokoferol mogu delovati sinergistički kao efikasni "hvatači" radikala. Isti autori su izvestili da je inhibicija lipidne peroksidacije, kao rezultat zajedničkog delovanja ova dva antioksidanta, veća od zbira njihovih pojedinačnih aktivnosti, čime je potvrđen značaj njihovog sinergističkog delovanja. Prisustvo karotenoida u ekstraktima paradajza (Guil-Guerrero, 2009) i zelenih mikroalgi *Spirulina platensis* (Mendiola i sar. 2007; Santoyo i sar. 2006), *Chlorella vulgaris* (Rodriguez-Garcia i Guil-Guerrero, 2008), *Nannochloropsis gaditana* (Millao i Uquiche, 2016) takođe je pokazalo uticaj na ostvarene AA_{BCB} vrednosti u lipidnom model sistemu, odnosno emulziji β -karoten-linolna kiselina.

Redukciona sposobnost (RP), odnosno sposobnost doniranja elektrona antioksidanata ili ekstrakata koji ih sadrže, može da posluži kao značajan indikator njihove aktivnosti. Jedinjenja sa redukcionom sposobnošću, kao elektron donori prekidaju lanac radikalskih reakcija konvertovanjem slobodnih radikala u neradikalske proizvode (Ayoub i sar. 2016). Prisustvo antioksidanata u ispitivanim ekstraktima izazivaju redukciju Fe^{3+} u Fe^{2+} jon, što se, u zavisnosti od njihove aktivnosti, može uočiti promenom žute boje reakcione smeše u različite nijanse zelene i plave. RP ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe (30,04 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$) značajno je veća u odnosu na suncokretovo ulje (11,16 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$). Navedeni rezultati su u

skladu sa rezultatima Muller i sar. (2011), koji su pokazali da većina karotenoida poseduje sposobnost redukcije gvožđe(II)-hlorida, kao i to da neki od njih poseduju veću redukcionu sposobnost od α -tokoferola. Redukciona sposobnost karotenoida je u značajnoj korelaciji sa brojem konjugovanih dvostrukih veza u molekulu. Prema navedenim autorima, od svih ispitanih karotenoida najveću redukcionu sposobnost pokazao je likopen.

Sve veći broj epidemioloških istraživanja pokazuju da ishrana bogata namirnicama sa visokim sadržajem bioaktivnih jedinjenja i visokim antioksidativnim potencijalom može imati ulogu u smanjenju rizika od nastajanja brojnih oboljenja. S tim u vezi, upotreba funkcionalnih namirnica i njihovih bioaktivnih komponenti se smatra novim pristupom u prevenciji i lečenju dijabetesa i pratećih komplikacija (Bahadoran i sar. 2013; Katalinić i sar. 2010). Dijabetes mellitus predstavlja metaboličku bolest koju karakteriše hiperglikemija uslovljena poremećajem u sekreciji insulina, poremećajem u njegovom dejstvu, ili prisustvo oba poremećaja (American Diabetes Association, 2010). Praktično, svaki oblik dijabetesa je izazvan smanjenom koncentracijom insulina u krvi (nedostatak insulina) i smanjenom osetljivošću perifernih tkiva na insulin (periferna insulinska rezistencija). Kontrola hiperglikemije je od suštinskog značaja u strategiji lečenja dijabetesa. Jedan od glavnih pristupa za uspostavljanje kontrole nad postprandijalnom hiperglikemijom je sprečavanje apsorpcije ugljenih hidrata u gastrointestinalnom traktu nakon uzimanja hrane, što se postiže inhibicijom hidrolizujućih enzima kao što su α -glukozidaza i α -amilaza (Kwon i sar. 2006). α -Glukozidaza je enzim koji se nalazi u intestinalnom traktu čoveka i uključen je u završni korak digestije ugljenih hidrata (razgradnju skroba i disaharida do glukoze), dok je α -amilaza uključena u razgradnju dugolančanih ugljenih hidrata (Nair i sar. 2013). Sintetički lekovi koji deluju kao inhibitori α -glukozidaze (npr. akarboza, registrovana kao Glucobay[®], Bayer AG), poseduju niz neželjenih efekata, što je dovelo do intenziviranja u istraživanju alternativnih lekova sa minimalnim nuspojavama. U tom svetlu, posebno su se istakli inhibitori ovih enzima iz prirodnih izvora, odnosno ekstrakata različitih biljnih vrsta, voća i povrća, koji pored efikasnosti poseduju i prednosti u pogledu pristupačnosti, bezbednosti i prihvatljivosti od strane potrošača.

Potencijal inhibitornog efekta (AHgA) suncokretovog ulja i ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe na α -glukozidazu, određen je u *in vitro* eksperimentalnim uslovima a dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 9. Za oba uzorka određeno je da poseduju aktivnost inhibicije prema α -glukozidazi veću od 40% (suncokretovo ulje AHgA=41,32%; ekstrakt

sporednog proizvoda prerade šargarepe (AHgA=49,01%). Kao rezultat dugogodišnjeg istraživanja u okviru potencijalnog inhibitornog efekta konstituenta hrane na α -glukozidazu, mnogi naučnici su potvrdili aktivnost nezasićenih masnih kiselina, prisutnih u uljaricama, prema ovom enzimu (Mehmood i sar. 2008; Teng i Chen, 2017). U studijama navedenih autora je takođe istaknuto da nezasićene masne kiseline, koje se mogu naći u uljanoj komponenti gljiva, biljaka i životinja, poseduju izraženu efikasnost u kontroli šećera u krvi, a samim tim i potencijal za prevenciju dijabetesa. Sa druge strane, Javadi i sar. (2014) su objavili značajnu aktivnost inhibicije α -tokoferola prema α -glukozidazi. Nakon kliničkog ispitivanja pacijenata sa dijabetesom tipa II, grupa istraživača potvrdila je korisne efekte oralne suplementacije ovim vitaminom u visokim dozama, kako u regulaciji hiperglikemije, tako i u poremećajima koji obično prate ovo oboljenje (Darko i sar. 2002; Liu i sar. 2006; Regensteiner i sar. 2003). Izloženost hroničnoj hiperglikemiji može uzrokovati mikrovaskularne komplikacije u retini, bubregu ili perifernim nervima, ali i makrovaskularne komplikacije kao što su infarkt miokarda, moždani udar i bolest perifernih arterija (Egan i Dinneen, 2014). U skladu sa prethodno navedenim činjenicama mogu se objasniti i male razlike u AHgA ispitivanih uzoraka, s obzirom da među njima nisu detektovane značajne razlike u sadržaju masnih kiselina i α -tokoferola. U naučnoj literaturi se takođe mogu naći izveštaji koji podržavaju koncept valorizacije sporednih proizvoda različitih biljnih vrsta i njihovu potencijalnu upotrebu u prehrambenoj industriji kao funkcionalnih dodataka ishrani i/ili u farmaceutskoj industriji za dobijanje antihiperglikemijskih terapijskih sredstava. Neki od primera ekstrakata sporednih proizvoda, koji poseduju aktivnost inhibicije prema α -glukozidazi, su ekstrakti kore čajevca (Wang i sar. 2012), pulpe i kore patlidžana (Kwon i sar. 2008) i ljuske šipka (Cam i Icyer, 2013).

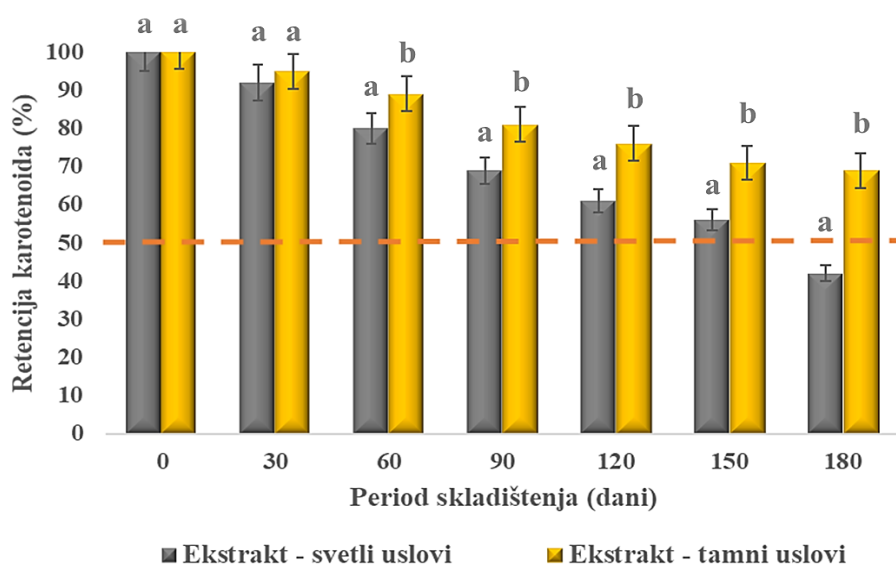
Inflamacija je složeni biološki odgovor organizma na unutrašnje i spoljašnje štetne stimuluse kao što su patogeni, mrtve ćelije, poremećaj metabolizma, fizička oštećenja i druge iritirajuće materije. Ova reakcija predstavlja odgovor tela koja ima za cilj da zaštiti organizam putem uklanjanja štetnog stimulusa i započinjanja procesa ozdravljenja tkiva. To se pokreće oslobađanjem hemijskih medijatora iz oštećenog tkiva, npr. citokina, koji pojačavaju simptome same upale (dolazi do povišenja telesne temperature, bola, stvaranja edema, itd.). U većini slučajeva je potrebno ublažiti simptome imunog odgovora, te se u tu svrhu primenjuju antiinflamatorni lekovi. Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAID) deluju upravo tako što smanjuju produkciju hemijskih medijatora, ali njihova klinička upotreba je ograničena zbog niza

neželjenih efekata poput oštećenja gastrointestinalnog trakta i bubrega, kao i povećanog rizika od kardiovaskularnih tegoba (Guinoiseau et al. 2013). Stoga, broj istraživanja u pravcu određivanja protivupalnog delovanja komponenti iz prirodnih izvora znatno se povećao poslednjih godina.

U ovoj doktorskoj disertaciji, test denaturacije proteina, odnosno albumina iz jaja, sproveden je u cilju *in vitro* procene antiinflamatorne aktivnosti (AIA) suncokretovog ulja i ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe. Denaturacija proteina tkiva je jedan od dobro dokumentovanih uzroka inflamatornih bolesti i bolesti artritisa, s obzirom da proizvodnja autoantigena u pojedinim bolestima artritisa može biti posledica denaturacije proteina *in vivo* (Umpathi i sar. 2010). Prema podacima prikazanim u tabeli 9, određena aktivnost inhibicije denaturacije proteina za suncokretovo ulje i ekstrakt sporednog proizvoda prerade šargarepe je 34,72%, odnosno 53,28%. Kao referentni lek ili pozitivna kontrola, u ovom slučaju korišćen je natrijum diklofenak, a koji je pri koncentraciji od 20 mg/ml ispoljio AIA od 77,47%. Već je dokazano da konvencionalni NSAID, kao što su fenilbutazon i indometazin, ne deluju samo inhibicijom proizvodnje endogenog prostaglandina blokiranjem enzima ciklooksigenaze (COX) već i sprečavanjem denaturacije proteina (Ullah i sar. 2014). Gunathilake i sar. (2018) ispitivali su antiinflamatorno delovanje ekstrakata šest različitih vrsta lisnatog povrća, i to *Cassia auriculata*, *Passiflora edulis*, *Sesbania grandiflora*, *Olex zeylanica*, *Gymnema lactiferum*, *Centella asiatica*, koji su se istakli po sadržaju polifenola, karotenoida i antioksidativne aktivnosti. U koncentracionom opsegu od 25-100 µg/ml ispitivane vrste lisnatog povrća pokazale su AIA od 36-75%. Ekstrakt listova *C. auriculata* ispoljio je značajno viši nivo inhibicije denaturacije proteina u odnosu na ostale proučavane vrste u istoj studiji, dok je ekstrakt listova *C. asiatica* pokazao najnižu antiinflamatornu aktivnost. Kompletan poredak AIA ispitivanih ekstrakata lisnatog povrća je: *C. auriculata* > *P. edulis* > *O. zeylanica* > *G. lactiferum* > *S. grandiflora* > *C. asiatica*. Dodatno, dobijene vrednosti AIA su ispitivane u korelaciji sa vrednostima sadržaja bioaktivnih jedinjenja, a u cilju procene korelacionih odnosa analiziran je Pirsonov koeficijent korelacije (r). Rezultati korelacione studije navedenih autora, sugerišu visoke vrednosti korelacije sa flavonoidima ($r=0,842$), fenolima ($r=0.741$), ali i sa karotenoidima ($r=0.735$).

5.1.3. Održivost karotenoida u ekstraktu sporednog proizvoda prerade šargarepe tokom perioda skladištenja

Svetlost, pored temperature i prisustva kiseonika, predstavlja značajan faktor koji se uzima u obzir u procesu oksidacije uljanih ekstrakata tokom skladištenja, naročito ako sadrže fotoosetljiva jedinjenja poput karotenoida. Prema Caponio i sar. (2005), istraživanje o izmenama kroz koje ovakvi ekstrakti prolaze tokom roka trajanja, kao i upoređivanjem promena koje se javljaju tokom skladištenja u uslovima svetlosti i tame, mogu pružiti korisne informacije.



Slika 24. Retencija karotenoida tokom perioda skladištenja (180 dana) ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe u svetlim i tamnim uslovima

Stubići označeni različitim slovima statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija ($n = 3$)

Radi procene održivosti karotenoida, ekstrakt sporednog proizvoda prerade šargarepe skladišten je na sobnoj temperaturi (25 °C) u trajanju od 180 dana u svetlim uslovima (uslovima dnevne svetlosti) i u tamnim uslovima. Tokom perioda skladištenja ekstrakta, spektrofotometrijskom metodom praćen je sadržaj karotenoida svakih 30 dana, a rezultati su prikazani kao retencija ovih pigmentata za dati period (slika 25).

Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u retenciji karotenoida ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe skladištenog u uslovima dnevne svetlosti i uslovima bez prisustva iste, zabeležene su nakon 60 dana skladištenja, i takav trend je zadržan sve do kraja ispitivanog perioda. Svetli uslovi skladištenja ekstrakta u velikoj meri su uticali na sadržaj karotenoida, te je nakon 180 dana zabeleženo smanjenje sadržaja ovih jedinjenja za više od 50%. U slučaju skladištenja ekstrakta u tamnim uslovima, tokom ispitivanog perioda sadržaj karotenoida se smanjio za ~30%. Takođe, navedenim rezultatima svedoče i izračunate vrednosti kinetičkih parametara, odnosno brzina degradacije (k) i vreme poluživota ($t_{1/2}$) karotenoida u ispitivanom ekstraktu sporednog proizvoda prerade šargarepe (tabela 10).

Tabela 10. Vrednosti brzine degradacije (k) i vremena poluživota ($t_{1/2}$) karotenoida tokom perioda skladištenja (180 dana) ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe u svetlim i tamnim uslovima

Parametar	Ekstrakt ₁₈₀ svetli uslovi	Ekstrakt ₁₈₀ tamni uslovi
Brzina degradacije - k (dan ⁻¹)	0,0048	0,0022
Vreme poluživota - $t_{1/2}$ (dan)	144,41	315,07
R^2	0,99	0,99

Smanjenje sadržaja karotenoida tokom skladištenja u saglasnosti je sa rezultatima drugih istraživača. Vacca i sar. (2006) su proučavali promene u parametrima kvaliteta i sadržaja karotenoida ekstra devičanskog maslinovog ulja, izloženih svetlosti i tami tokom skladištenja u periodu od 18 meseci. Analiza podataka pokazala je da su svi ispitivani parametri pretrpeli značajne promene tokom skladištenja, dok su se za period od osam meseci karotenoidi smanjili za 30%. Što se tiče ekspozicije, skladištenje u mraku dalo je bolje rezultate u očuvanju kvaliteta ulja.

5.1.4. Boja ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe

U prehrambenoj industriji, najčešće korišćen sistem boja je CIE Lab sistem. Stoga, boja ispitivanih uzoraka ekstrakta (pre i nakon perioda skladištenja) izražena je preko L^* , a^* i b^* vrednosti, kao i preko vrednosti ugla boje (h°) i hrome (C^*) (tabela 11). Vrednost h° predstavlja položaj određene boje u točku boja, pri čemu je crvenoljubičasta na uglu od 0° odnosno 360° , žuta na 90° , plavozelena na 180° i plava na 270° . Vrednost C^* predstavlja zasićenost boje uzorka, pri čemu visoke vrednosti ukazuju na tzv. žive boje.

Tabela 11. CIE Lab hromatski parametri ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe pre skladištenja (Ekstrakt) i nakon 180 dana skladištenja (Ekstrakt₁₈₀)

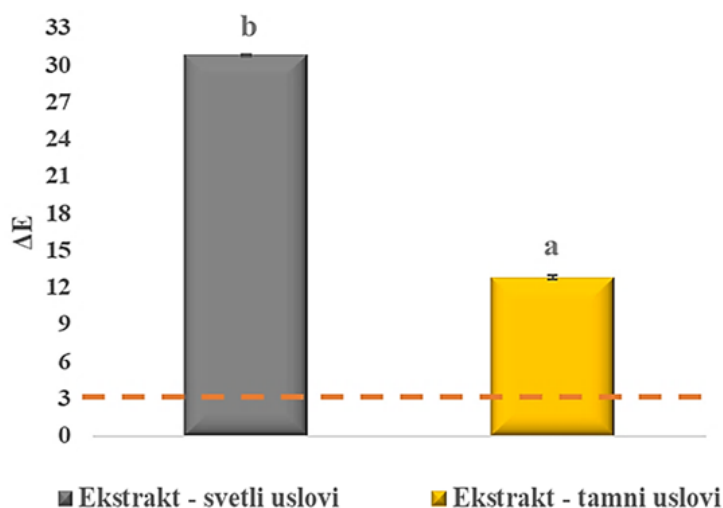
<i>CIE Lab</i>	Ekstrakt	Ekstrakt ₁₈₀ svetli uslovi	Ekstrakt ₁₈₀ tamni uslovi
L*	53,19 ± 0,09 ^a	64,00 ± 0,00 ^b	57,61 ± 0,01 ^a
a*	16,66 ± 0,05 ^c	-8,01 ± 0,03 ^a	6,85 ± 0,05 ^b
b*	62,50 ± 0,22 ^b	47,54 ± 0,01 ^a	69,55 ± 0,03 ^b
C*	64,68 ± 0,23 ^b	48,21 ± 0,01 ^a	69,89 ± 0,03 ^b
h°	75,08 ± 0,01 ^a	99,57 ± 0,03 ^c	84,37 ± 0,05 ^b

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju;

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 3$).

Na osnovu prikazanih rezultata može se uočiti da u ispitivanom uzorku dominira narandžasta boja (visoke a^* i b^* vrednosti; $a^*=16,66$ i $b^*=62,50$), koju odražavaju prisutni pigmenti u sporednom proizvodu prerade šargarepe. Svi parametri, počev od osvetljenosti, preko boje, do nijanse, značajno su se menjali tokom perioda skladištenja od 180 dana, a prisustvo, odnosno odsustvo dnevne svetlosti tokom navedenog perioda pokazao se kao značajan faktor u determinisanju nastalih promena. Za izražavanje promene u boji, koja je nastala usled različitih uslova i perioda skladištenja, korišćena je veličina ΔE , a dobijeni rezultati su prikazani na slici 26.

Prema Francis i Clydesdale (1975) nastala razlika u boji se može definisati kao ona koja nije uočljiva ljudskim okom ($\Delta E < 1$), nije značajna za ljudsko oko ($1 < \Delta E < 3$) ili je razlika tolika da je uočljiva ljudskim okom ($\Delta E > 3$). Schläpfer (2002) predlaže preciznije definisane granice u vidljivosti postojećih razlika u boji. Prema ovom autoru, razlika u boji se može definisati kao ona koja se ne vidi ljudskim okom ($\Delta E < 0,2$), razlika u boji koja se ne primećuje ljudskim okom ($\Delta E = 0,2-1$), razlika u boji koja se vidi ljudskim okom ($\Delta E = 1-3$), razlika u boji koja se dobro vidi ($\Delta E = 3-6$) i očigledna odstupanja boje ($\Delta E > 6$).



Slika 25. Ukupna razlika boje ΔE nakon 180 dana skladištenja ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe u svetlim i tamnim uslovima

Stubići označeni različitim slovima statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija ($n = 3$)

Rezultati parametra ΔE jasno sugerišu promene u granicama vidljivosti golim okom ($\Delta E > 3$), kako za uslove skladištenja ekstrakta u prisustvu i bez prisustva dnevne svetlosti. Međutim, statistički izraženije promene vezuju se za ekstrakt koji je skladišten u uslovima dnevne svetlosti, što se može korelirati sa rezultatima iz prethodnog poglavlja, odnosno održivosti karotenoida tokom perioda skladištenja. Osvetljenost ovog uzorka (L^*) bila je značajno niža u odnosu na inicijalni ekstrakt, kao i vrednosti parametara koji ukazuju na udeo crvene (a^*) i žute boje (b^*). Posledice promene ovih parametara, a pre svega parametra a^* , uticale su na promene vrednosti h° i C^* , koje kao takve sugerišu žute nijanse umerenijeg intenziteta. Sa druge strane, nakon 180

dana skladištenja ekstrakta u tamnim uslovima, nije došlo do statistički značajnih ($p < 0,05$) promena parametara L^* , b^* i C^* , dok se intenzitet crvene boje (a^*) značajno smanjio, a ugao boje (h°) pomerio ka žutim nijansama.

5.1.5. Mikrobiološki profil ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe

U skladu sa postavljenim ciljevima disertacije, podatak od izuzetnog značaja, pre prelaska na sledeću fazu rada, bila je mikrobiološka ispravnost pripremljenog ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe. Kao što može da se vidi u tabeli 12, mikrobiološki profil ovog ekstrakta obuhvatio je niz testiranih parametara koji mogu ukazati na postojanje mikrobiološke kontaminacije, kao i stepen higijene procesa proizvodnje istog. Dobijeni rezultati su poređeni sa kriterijumima definisanim u Vodiču za mikrobiološke kriterijume hrane (2011). Utvrđene vrednosti svih testiranih parametara mikrobiološke bezbednosti ekstrakta su u skladu sa dobrom laboratorijskom praksom, s obzirom da nije bilo prisutne kontaminacije. Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da je testirani ekstrakt prihvatljiv za dalju upotrebu sa mikrobiološkog aspekta, te da je kreiranje daljeg procesa praćenja mikrobiološke bezbednosti proizvodnje ciljanog prehrambenog proizvoda sa dodatkom ovog ekstrakta olakšano.

Tabela 12. Mikrobiološki profil ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe

Parametar	Ekstrakt
Aerobne mezofilne bakterije (log CFU/g) ¹	< 1
Enterobacteriaceae (log CFU/g) ¹	< 1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaris</i> (log CFU/g)	< 1
<i>Streptococcus thermophilus</i> (log CFU/g)	< 1
Kvasci i plesni (log CFU/g) ¹	< 1

¹ Dozvoljena vrednost je do 1 log CFU/g

5.2. Optimizacija inkapsulacije karotenoida iz ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe *freeze* i *spray drying* tehnikama

Izuzetan nutritivni i funkcionalni profil ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe, kao i ograničena stabilnost prisutnih jedinjenja u formi ekstrakta, bili su osnov ideje o njihovoj stabilizaciji tehnikama inkapsulacije pre uključivanja u finalni prehrambeni proizvod. U mnogim tehnološkim procesima optimizacija je postala neizbežan korak za postizanje maksimalnog kvaliteta proizvoda. Konkretno, razvoj novih prehrambenih proizvoda iziskuje mnogobrojne probne eksperimente, kako na laboratorijskom nivou, tako i u pilot postrojenjima ili industrijskim pogonima. S obzirom na obim posla i utrošak resursa koji prethode dobijanju rezultata primenljivih u praksi, povećanje efikasnosti istraživanja je od izuzetnog značaja za prehrambenu industriju. U cilju prevazilaženja navedenih ograničenja i unapređenja postupka za formulisanje novog proizvoda, razvijene su različite matematičke i statističke tehnike zasnovane na dizajniranju eksperimenta.

Eksperimentalni dizajn definiše se kao planirani pristup nekom naučnom problemu, sa ciljem da se odredi uzročno-posledična veza između zavisnih i nezavisnih parametara nekog procesa. Njegova osnovna svrha je da se prikupi maksimalna količina relevantnih podataka, uz minimalan utrošak vremena, eksploataciju uređaja i sirovina (Čolović, 2014).

Metoda odzivne površine (eng. *Response Surface Methodology* - RSM) spada u najčešće korišćene postupke statistički planiranih eksperimenata (Myers i Montgomery, 1995). Postupak odzivne površine prvi su opisali Box i Wilson (1951), a može se definisati kao empirijska statistička tehnika primenjena za regresionu analizu podataka dobijenih iz adekvatno planiranih eksperimenata simultanim rešavanjem sistema jednačina (Allen, 2006; Myers i Montgomery, 1995). Svaka od jednačina naziva se funkcija odziva, a njen geometrijski prikaz se naziva odzivna površina (Brereton, 2003).

RSM se u kombinaciji sa različitim eksperimentalnim dizajnima uspešno primenjuje u optimizaciji parametara inkapsulacije, u cilju dobijanja funkcionalnih dodataka sa mogućnošću primene u funkcionalnoj hrani. U naučnoj literaturi prisutni su mnogobrojni primeri, kako sa aspekta optimizacije procesnih parametara inkapsulacije (Kha i sar. 2014; Chuyen i sar. 2019), tako i sa aspekta optimizacije odnosa sastojaka u formulaciji (Davidov-Pardo i sar. 2013; Cano-

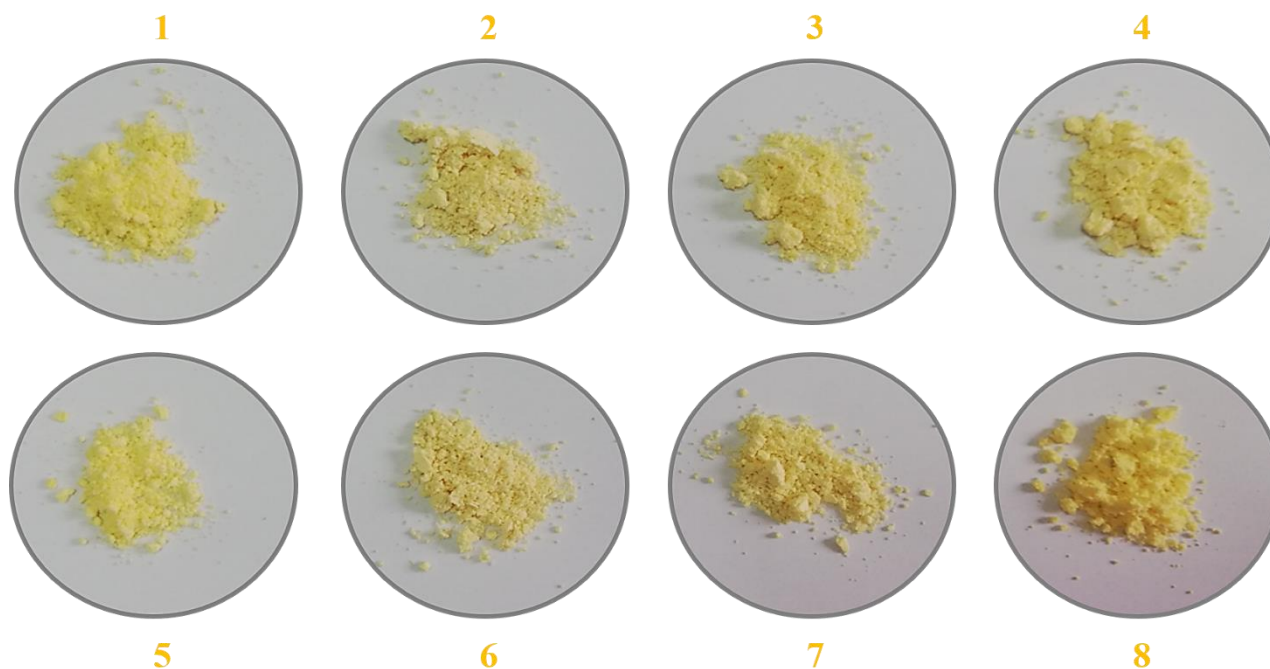
Higuita i sar. 2015). RSM se uglavnom fokusira na probleme u kojima se posmatra samo jedan odziv, odnosno jedna zavisno promenljiva karakteristika (Čolović, 2014). Međutim, prilikom razvijanja nekog proizvoda ili procesa, kako bi se dobilo adekvatno rešenje posmatrano sa različitih aspekata, neophodno je uskladiti više odziva istovremeno (Jeong i Kim, 2009). U literaturi se ovakav problem uglavnom naziva "problem višestrukih odziva" ili "*multi-response*". Kada se govori o "*multi-response*" studijama, postavljeni cilj se najčešće rešava kroz sledeće faze (Bezerra i sar. 2008):

- (1) Izbor nezavisnih promenljivih sa glavnim uticajem na ispitivani sistem,
- (2) Izbor eksperimentalnog dizajna i izvođenje eksperimenata,
- (3) Matematičko-statistički tretman eksperimentalnih rezultata,
- (4) Provera adekvatnosti modela,
- (5) Verifikacija slaganja modela sa predviđenim vrednostima i
- (6) Definisane optimalnih vrednosti za sve ispitivane promenljive.

Uspešan proces inkapsulacije oslanja se na postizanje visokog sadržaja i efikasnosti inkapsulacije ciljanih jedinjenja, čime se obezbeđuju njihova funkcionalna svojstva u finalnom proizvodu. Primena metode odzivne površine (RSM) u formulaciji funkcionalnih dodataka na bazi inkapsuliranih karotenoida iz ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe omogućila je uvođenje kriterijuma po kojima je optimizacija sprovedena. Odabirom *Simplex Centroid* dizajna smeše kao eksperimentalnog plana, udeli ispitivanih nosača karotenoida – maltodekstrina (MD), proteina surutke (PS) i inulina (IN), kao nezavisno promenljive, varirani su na četiri nivoa sa jednom ponovljenom tačkom, dajući ukupno osam eksperimenata – formulacija. Kao zavisno promenljive, odnosno odzivi, praćeni su ukupan sadržaj karotenoida (TCar), efikasnost inkapsulacije (EI) i antioksidativna aktivnost određena β -karoten metodom (AA_{BCB}). Rezultati dobijeni primenom pomenutog eksperimentalnog plana dati su u tabeli 13. Isti model je primenjen za definisanje optimalne smeše nosača za inkapsulaciju ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe *freeze drying* tehnikom, odnosno tehnikom liofilizacije, i *spray drying* tehnikom, odnosno sušenjem u struji toplog vazduha, a izgledi dobijednih formulacija prikazani su na slikama 27 i 28.



Slika 26. Izgled različnih formulacija inkapsulata ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* tehnikom



Slika 27. Izgled različnih formulacija inkapsulata ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *spray drying* tehnikom

Tabela 13. Simplex Centroid eksperimentani dizajn i vrednosti dobijenih odziva za različite formulacije nosača ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih a) *freeze drying* tehnikom i b) *spray drying* tehnikom

Formulacija nosača	Nezavisno promenljive			Zavisno promenljive – odzivi		
	A	B	C	TCar	EI	AA _{BCB}
a) Freeze drying						
1	0,5	0	0,5	1,13 ± 0,14 ^{cd}	15,00 ± 0,82 ^b	65,89 ± 1,50 ^d
2	0	1	0	1,35 ± 0,10 ^e	54,03 ± 3,32 ^c	69,43 ± 2,76 ^c
3	0,33	0,33	0,33	1,01 ± 0,17 ^{bc}	47,89 ± 1,17 ^d	52,41 ± 1,73 ^c
4	0	0,5	0,5	0,94 ± 0,03 ^b	59,77 ± 3,52 ^f	50,88 ± 0,88 ^{bc}
5	1	0	0	0,68 ± 0,07 ^a	0 ± 0,00 ^a	37,94 ± 1,12 ^a
6	0	1	0	1,30 ± 0,12 ^{de}	56,14 ± 1,58 ^{ef}	69,85 ± 3,10 ^e
7	0,5	0,5	0	1,00 ± 0,06 ^{bc}	21,59 ± 3,29 ^c	49,63 ± 1,21 ^{bc}
8	0	0	1	0,99 ± 0,10 ^{bc}	21,80 ± 4,81 ^c	48,52 ± 1,52 ^b
b) Spray drying						
1	0,5	0	0,5	0,62 ± 0,05 ^{bc}	3,56 ± 0,01 ^b	32,85 ± 1,54 ^d
2	0	1	0	0,69 ± 0,08 ^c	65,81 ± 0,32 ^g	32,42 ± 1,31 ^d
3	0,33	0,33	0,33	0,58 ± 0,01 ^b	36,00 ± 0,41 ^d	27,42 ± 0,89 ^c
4	0	0,5	0,5	0,93 ± 0,02 ^e	49,87 ± 0,21 ^c	41,90 ± 1,13 ^f
5	1	0	0	0,35 ± 0,10 ^a	0 ± 0,00 ^a	12,44 ± 1,90 ^a
6	0	1	0	0,68 ± 0,03 ^{bc}	62,97 ± 0,54 ^f	31,45 ± 1,30 ^d
7	0,5	0,5	0	0,71 ± 0,04 ^c	29,64 ± 0,31 ^c	37,07 ± 1,25 ^c
8	0	0	1	0,42 ± 0,09 ^a	0 ± 0,00 ^a	20,04 ± 0,51 ^b

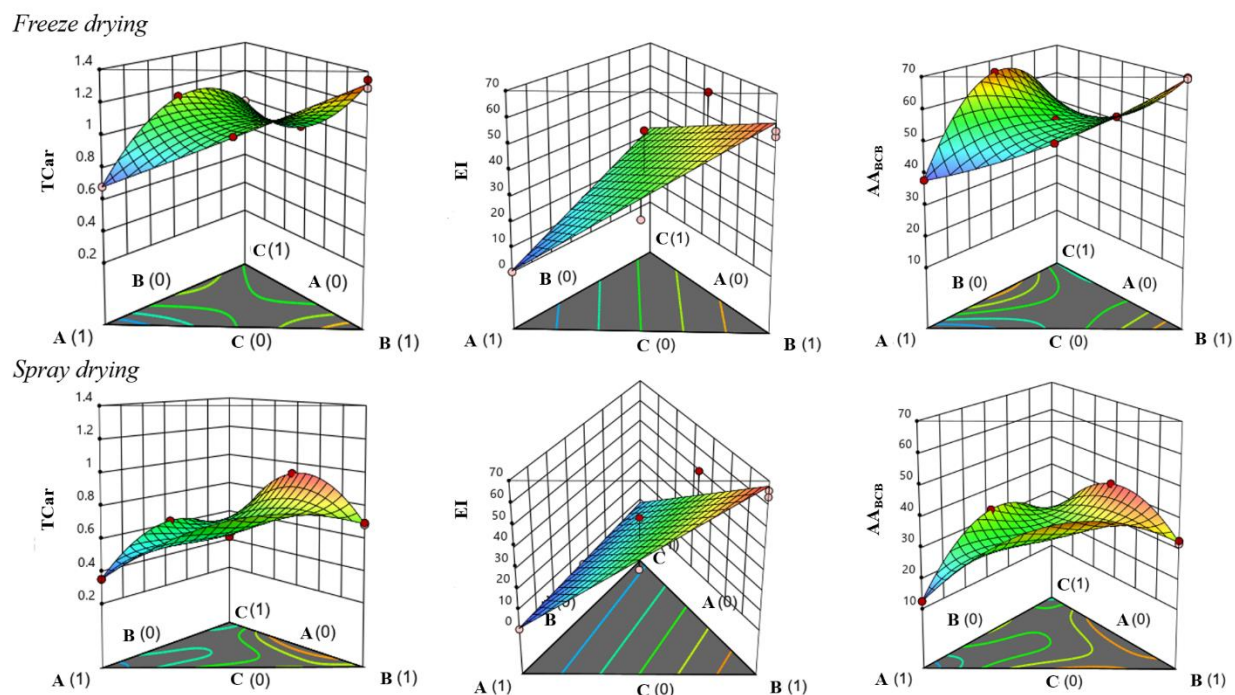
A – maltodekstrin; B – proteini surutke; C – inulin;

TCar – ukupan sadržaj karotenoida (mg β-karotena/100 g); EI – efikasnost inkapsulacije (%);

AA_{BCB} - antioksidativna aktivnost određena β-karoten metodom (μmol TE/100 g).

Za svaku tehniku inkapsulacije, vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju; Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 3$).

U cilju lakšeg sagledavanja uticaja primenjenih nosača na ispitivane parametre (odzive), dobijeni rezultati prikazani su i grafički na slici 29.



Slika 28. Odzivne površine za TCar - ukupan sadržaj karotenoida (mg β -karotena/100 g), EI – efikasnost inkapsulacije (%) i AA_{BCB} - antioksidativna aktivnost određena β -karoten metodom ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$), kao funkcije formulacije nosača ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe (A-maltodekstrin, B-proteini surutke, C-inulin) dobijenih *freeze* and *spray drying* tehnikama

5.2.1. Uticaj primenjenih nosača na ispitivane parametre - odzive

Na osnovu prikazanih rezultata (tabela 13; slika 29) može se zaključiti da, pored uticaja primenjenih nosača na ispitivane parametre (TCar, EI, AA_{BCB}) značajan uticaj ima i tehnika sušenja ovih inkapsulata. Ukupan sadržaj karotenoida (TCar) u inkapsulatima dobijenim *freeze drying* tehnikom bilo je u opsegu od 0,68 do 1,35 mg β -karotena/100 g, pri čemu je najmanji sadržaj pokazala formulacija 5 (nosač - maltodekstrin), a najveći sadržaj formulacija 2 (nosač - proteini surutke). Sa druge strane, opseg TCar u inkapsulatima dobijenim *spray drying* tehnikom bio je od 0,35 do 0,93 mg β -karotena/100 g, a najvećem sadržaju doprinela je binarna smeša

nosača, odnosno smeša proteina surutke i inulina (formulacija 4). Takođe, formulacija 5, koja se odnosi na primenu čistog maltodekstrina kao nosača, i za *spray drying* tehniku je pokazala najnižu vrednost TCar. Lošem potencijalu maltodekstrina za inkapsulaciju karotenoida svedoče i rezultati efikasnosti inkapsulacije (EI), na osnovu kojih zaključujemo prisustvo ovih jedinjenja samo na površini čestica. Prema Cano-Higueta i sar. (2015), čist maltodekstrin poseduje nisku površinsku aktivnost, što je i uzrok slabe sposobnosti inkapsulacije bioaktivnih jedinjenja. Međutim, u kombinaciji sa materijalima koji imaju izražene sposobnosti emulgovanja, maltodekstrin može pokazati veoma dobre rezultate. Navedene vrednosti opsega TCar značajno su niže ukoliko se uporede sa dobijenim vrednostima za *freeze drying* tehniku. Ovo se može objasniti raspršivanjem emulzije u sitne kapljice, pri čemu se povećava specifična površina koja biva direktno izložena visokoj temperaturi. U slučaju liofilizacije, pripremljena emulzija nosača i aktivne komponente se suši direktno, bez prethodne atomizacije i izlaganja toploti (Saikia i sar. 2015). Najviše vrednosti EI karotenoida postignute su primenom proteina surutke kao nosača (formulacija 2 i 6) i smešom proteina surutke i inulina (formulacija 4), što se odnosi na obe tehnike inkapsulacije. Što se tiče antioksidativne aktivnosti (AA_{BCB}) proizvedenih inkapsulata obema tehnikama, dobijene vrednosti bile su u korelaciji sa TCar. Korelaciju između sadržaja karotenoida i inhibicije lipidne peroksidacije u lipidnom model sistemu, odnosno emulziji β -karoten-linolna kiselina, potvrdili su i Hanachi i Naghavi (2016), kao i Hidalgo i sar. (2019).

5.2.2. Provera modela

U cilju procene adekvatnosti postavljenih fitovanih modela korišćena je analiza varijanse (ANOVA) i deskriptivna statistika, a dobijeni rezultati za sve modelovane odzive dati su u tabeli 14. Dobijeni rezultati su opisani primenom linearnog modela, a koeficijenti regresionih jednačina, koji odgovaraju ispitivanim promenljivim, su dobijeni korišćenjem metode najmanjih kvadrata. Jednačine kojima je moguće predvideti vrednosti ispitivanih odziva u primenjenom eksperimentalnom domenu su date u tabeli 15.

Od statističkih parametara koji služe za procenu adekvatnosti modela, prikazani su: rezidual, *lack of fit* vrednost, p-vrednost, koeficijent determinacije (R^2) i korigovani koeficijent determinacije ($Adj-R^2$). *Lack of fit* vrednost poredi rezidualnu grešku sa "čistom" eksperimentalnom greškom izračunatom iz ponavljanja u izabranoj tački, pri čemu ukoliko je

lack of fit značajna ($p < 0,05$), odabrani model nije adekvatan. Kako su sve vrednosti *lack of fit* veće od 0,05, može se zaključiti da nema značajnog nedostatka u fitovanju, kao i to da su predloženi regresioni modeli za sve odzive adekvatni. Koeficijent determinacije, kao jedan od statističkih kriterijuma, pokazuje koliki je deo varijacija zavisne promenljive objašnjen regresionim modelom, a njegova vrednost kreće se u opsegu $0 \leq R^2 \leq 1$. Za sve ispitivane odzive dobijena je vrednost $R^2 \geq 0,8$, odnosno više od 80% varijacija ispitivanih odziva se može objasniti predloženim regresionim jednačinama. Prema Joglekar i May (1987), kriterijum prihvatljivosti postavljenih fitovanih modela je vrednost $R^2 > 0,8$, te možemo reći da je isti zadovoljen.

Prema dobijenim podacima iz tabele 15, može se uočiti da je za obe tehnike inkapsulacije, a posebno za *freeze drying* tehniku, interakcija parametara AC (maltodekstrin + inulin) doprinela povećanju vrednosti TCar i AA_{BCB}. Međutim, u slučaju EI za obe tehnike inkapsulacije, dobijeni rezultati opisani su primenom linearnog modela, prikazujući pozitivan i relevantan uticaj parametra B, odnosno proteina surutke. Interakcija parametara BC (proteini surutke + inulin) imala je pozitivan uticaj na inkapsulate dobijene *spray drying* tehnikom, dok se u slučaju *freeze drying* tehnike ova kombinacija pokazala kao negativna. Interakcija sva tri ispitivana parametra ABC (maltodekstrin + proteini surutke + inulin) bila je značajna samo za *spray drying* tehniku.

Tabela 14. Jednačine modela koje predviđaju vrednosti odziva u ispitanom eksperimentalnom domenu

<i>Freeze drying</i>
$\text{TCar} = 0.68A + 1.33B + 0.99C - 0.04AB + 1.15AC - 0.90BC$ $\text{EI} = 0.5A + 59.2B + 33.3C$ $\text{AA}_{\text{BCB}} = 37.9A + 69.6B + 48.5C - 16.6AB + 90.6AC - 31.5BC - 117.4ABC$
<i>Spray drying</i>
$\text{TCar} = 0.35A + 0.69B + 0.42C + 0.77AB + 0.94AC + 1.51BC - 7.09ABC$ $\text{EI} = 0.6A + 67.9B + 8.7C$ $\text{AA}_{\text{BCB}} = 12.4A + 31.9B + 20.0C + 59.5AB + 66.4AC + 63.7BC - 408.3ABC$

Tabela 15. Analiza varijanse (ANOVA) fitovanja polinomnim modelom drugog reda

	TCar		EI		AA _{BCB}	
a) Freeze drying						
	df	Suma kvadrata	df	Suma kvadrata	df	Suma kvadrata
Model	5	0,0628**	2	1428,8*	6	154,5*
Linearna smeša	2	0,1010**	2	1428,8*	2	220,3**
AB	1	0,0001			1	12,6
AC	1	0,0631**			1	342,3**
BC	1	0,0419*			1	45,1*
ABC					1	11,6
Rezidual	2	0,0008	5	141,7		
Lack of fit	1	0,0003	4	176,6		
p-vrednost	1	0,0013	1	2,2	1	0,1
R ²		1,00		0,80		1,00
Adj-R ²		0,98		0,72		1,00
b) Spray drying						
Model	6	0,0379*	2	2462,6**	6	103,2
Linearna smeša	2	0,0454*	2	2462,6**	2	104,1*
AB	1	0,0269*			1	161,1*
AC	1	0,0368*			1	183,9*
BC	1	0,1036*			1	184,2*
ABC	1	0,0425*			1	140,8*
Rezidual			5	73,3		
Lack of fit			4	90,6		
p-vrednost	1	0,0001	1	4,0	1	0,5
R ²		1,00		0,93		1,00
Adj-R ²		1,00		0,90		0,99

* značajan ($p \leq 0,05$); ** visoko značajan ($p \leq 0,01$); A – maltodekstrin; B – proteini surutke; C – inulin;

TCar – ukupan sadržaj karotenoida (mg β -karotena/100 g); EI – efikasnost inkapsulacije (%);

AA_{BCB} - antioksidativna aktivnost određena β -karoten metodom (μ mol TE/100 g);

5.2.3. Odabir optimalne formulacije nosača za inkapsulaciju karotenoida iz ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe

Postupak optimizacije podrazumeva odabir optimalnih vrednosti nezavisno promenljivih veličina sa ciljem postizanja željenog izlaza, odnosno odziva. U cilju odabira optimalnih formulacija nosača za inkapsulaciju karotenoida iz ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe *freeze* i *spray drying* tehnikama, odnosno inkapsulata koji će dalje biti ispitivani, korišćena je optimizacija više odziva ili tzv. "*muti-response*" studija. Ovom optimizacijom se u obzir uzimaju tri odziva istovremeno, a kao kriterijumi su postavljene maksimalne vrednosti za TCar, EI i AA_{BCB}. Rezultati "*muti-response*" optimizacije prikazani su u tabeli 16, kao i predviđene i dobijene vrednosti odziva.

Tabela 16. Rezultati "*muti-response*" optimizacije formulacije nosača ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe za inkapsulaciju a) *freeze drying* tehnikom i b) *spray drying* tehnikom

Predviđene vrednosti nezavisno promenljivih			Predviđene vrednosti zavisno promenljivih			Dobijene vrednosti zavisno promenljivih - odzivi		
A	B	C	TCar	EI	AA _{BCB}	TCar	EI	AA _{BCB}
a) Freeze drying								
0	1	0	1,33	59,21	69,64	1,31 ± 0,02	63,69 ± 3,69	70,06 ± 5,13
b) Spray drying								
0	0,71	0,29	0,92	50,74	41,58	0,87 ± 0,01	53,78 ± 1,26	41,23 ± 2,69

A – maltodekstrin; B – proteini surutke; C – inulin;

TCar – ukupan sadržaj karotenoida (mg β-karotena/100 g); EI – efikasnost inkapsulacije (%);

AA_{BCB} - antioksidativna aktivnost određena β-karoten metodom (μmol TE/100 g).

Za *freeze drying* tehniku inkapsulacije, formulacija nosača koja se sastoji od 100% proteina surutke daje optimalni uzorak u skladu sa postavljenim kriterijumima. Predviđene vrednosti TCar, EI i AA_{BCB} bile su 1,33 mg β-karotena/100 g, 59,21% i 69,64 μmol TE/100 g.

Za *spray drying* tehniku, kao najprikladnija formulacija nosača izdvojena je smeša od 71% proteina surutke i 29% inulina. Predviđene vrednosti za dobijeni optimalni uzorak su: $TCar=0,92$ mg β -karotena/100 g, $EI=50,74\%$ i $AA_{BCB}=41,58$ μ mol TE/100 g.

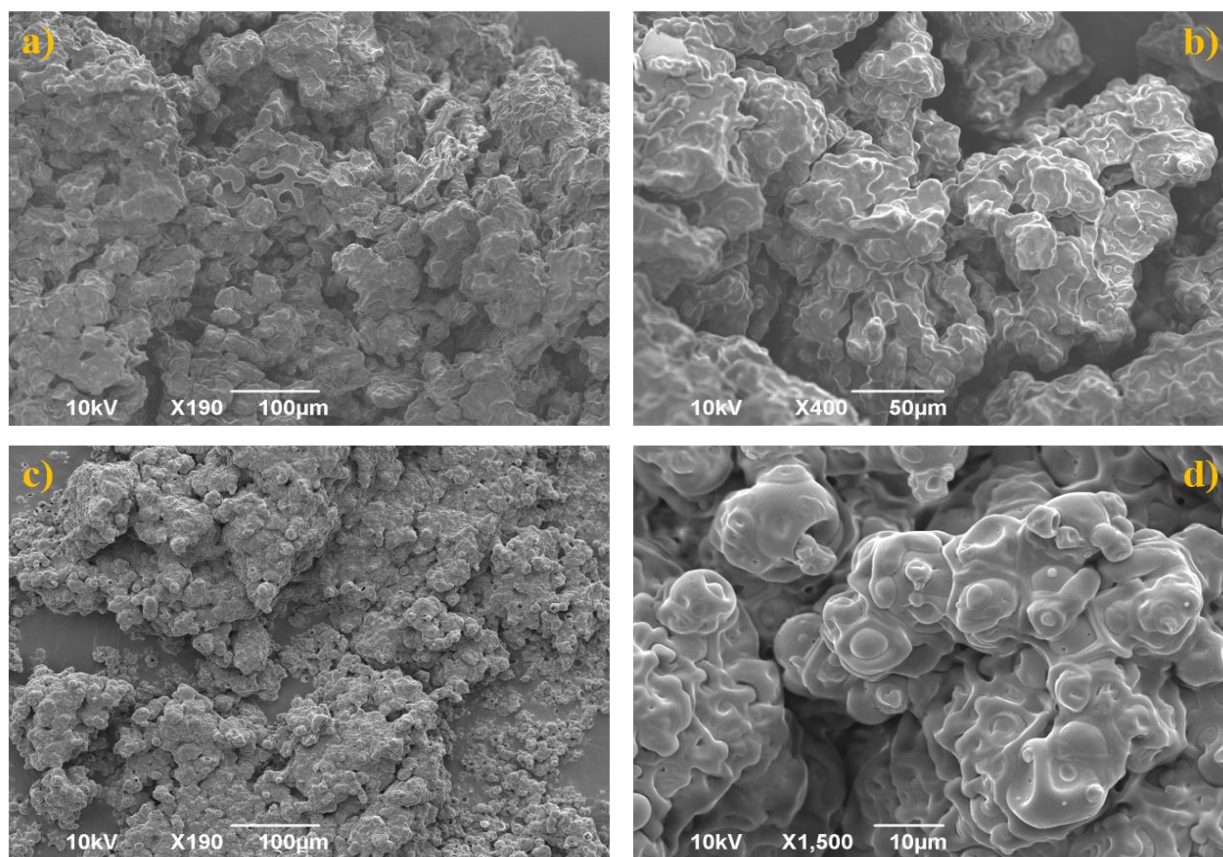
Finalni korak u primeni RSM optimizacije jeste eksperimentalna provera predviđenih vrednosti modelovanih odziva za proizvoljno odabrane kombinacije nezavisno promenljivih. U skladu sa tim, postupak provere predviđenih vrednosti ispitivanih odziva ($TCar$, EI i AA_{BCB}) sproveden je na optimalnoj formulaciji inkapsulata dobijenog *freeze drying* tehnikom (FDI) i optimalnoj formulaciji inkapsulata dobijenog *spray drying* tehnikom (SDI). S obzirom da se svi dobijeni rezultati nalaze unutar intervala poverenja od 95%, slaganje dobijenih rezultata sa predviđenim vrednostima se može definisati kao zadovoljavajuće.

Kao što je prethodno naglašeno, priroda nosača aktivne komponente predstavlja jedan od najuticajnih faktora na efikasnost inkapsulacije, ali i na druge fizičko-hemijske karakteristike proizvoda. U ovom slučaju, visok udeo laktoze u proteinu surutke doprinosi povećanju brzine očvršćavanja kapsula tokom procesa sušenja, pri čemu kapljice uljanog ekstrakta bivaju "zarobljene" u suvoj matrici (Bylaite i sar. 2001). Štaviše, adsorbovanjem na površini ulje/voda, ili pak vezivanjem, zarobljavanjem ili stvaranjem neke vrste prevlake preko aktivne materije, proteini formiraju tzv. omotač koji je neophodan za zaštitu inkapsuliranih bioaktivnih jedinjenja. Profil funkcionalnosti materijala nosača koji su optimalni za sušenje raspršivanjem u struji toplog vazduha uključuje efikasnu emulzifikaciju, što nije bilo moguće postići sa visokim udelom inulina u formulaciji. Iz tog razloga, niže vrednosti efikasnosti inkapsulacije su primećene u ogledima sa visokim koncentracijama ugljenih hidrata u formulaciji nosača. Dobijeni rezultati predstavljaju još jednu potvrdu u nizu, da se ugljeni hidrati ne preporučuju kao nosači bioaktivnih jedinjenja bez prisustva nekog površinski aktivnog sastojka, s obzirom da kao pojedinačne komponente ne poseduju svojstvo emulgovanja. Međutim, uključivanje nekog dela ugljenih hidrata u formulaciju nosača može poboljšati svojstva inkapsulata tokom procesa sušenja, što je bio slučaj u ovoj studiji, ali i u mnogim drugim ogledima prikazanim u naučnoj literaturi (Sheu i Rosenberg, 1995; Kagami i sar. 2003; de Barros Fernandes i sar. 2013). Poboljšanje ovih karakteristika se takođe može objasniti formiranjem "kore" oko kapljica emulzije u kontaktu sa toplim vazduhom.

5.3. Karakterizacija inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze* i *spray drying* tehnikama

5.3.1. Morfološke karakteristike inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe

Morfološke karakteristike optimalnih inkapsulata ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe analizirane su skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) pod različitim uvećanjima, a dobijeni rezultati prikazani su na slici 30.



Slika 29. SEM mikrografije inkapsulata dobijenog *freeze drying* tehnikom (FDI) sa uvećanjem od a) 190 i b) 400, i optimalnog inkapsulata dobijenog *spray drying* tehnikom (SDI) sa uvećanjem od c) 190 i d) 1500

Rezultati mikroskopske analize pokazuju da se inkapsulati dobijeni *freeze* and *spray drying* tehnikama sastoje od čestica nepravilne strukture, različite veličine i poroznosti. Pored toga, obe tehnike inkapsulacije su dale čestice koje su grupisane u agregate različitih dimenzija, što se može objasniti prisustvom dela neinkapsuliranog uljanog ekstrakta na površinama čestica. Prema Moayyedi i sar. (2019), nepravilnosti u vidu udubljenja ili bora na površini uzoraka dobijenih *freeze drying* metodom, posledica su temperature smrzavanja i niske temperature sušenja. Sa druge strane, formiranje konkaviteta na površinama čestica inkapsulata osušenog *spray drying* tehnikom, pripisuje se skupljanju čestica usled naglog gubitka vlage nakon hlađenja (Silva i sar. 2013). Veoma slične SEM mikrografije inkapsulata uljanih ekstrakata različitog porekla (moringa, kora i jestivi deo gorke dinje, čia, suncokret) objavljene su od strane brojnih autora (Us-Medina i sar. 2018; Premi i Sharma, 2017; Chuyen i sar. 2019; Kha i sar. 2014; Le Priol i sar. 2019).

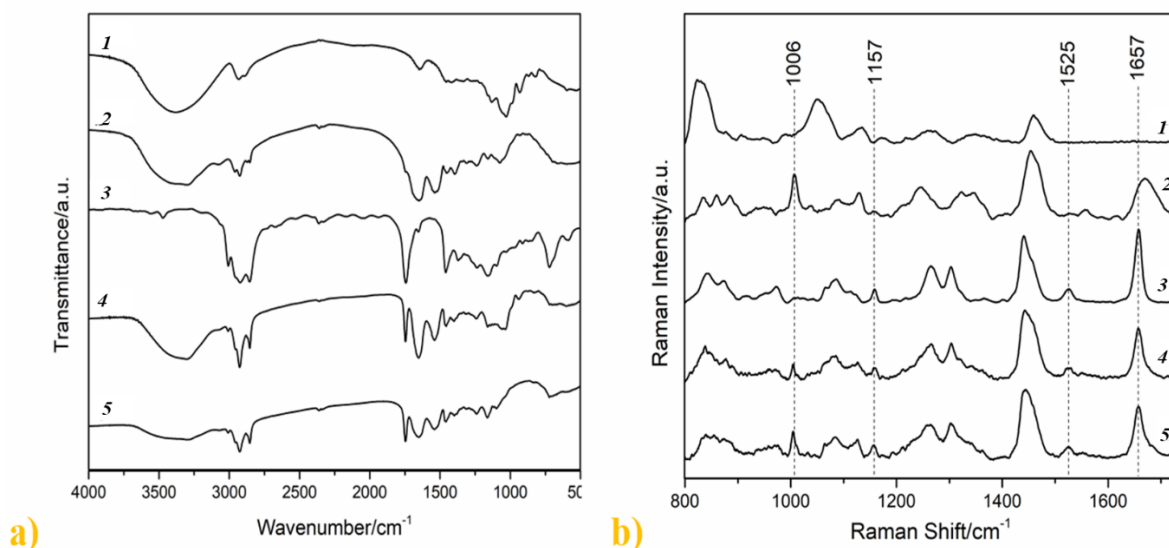
5.3.2. FTIR i Raman spektroskopska analiza inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe

FTIR analiza je korišćena za karakterizaciju dobijenih optimalnih inkapsulata u cilju identifikacije i analize potencijalnih funkcionalnih grupa između nosača i ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe. Na slici 31a dati su rezultati FTIR spektroskopske analize, gde su pod 1 i 2 prikazani spektri nosača inulina i proteina surutke, zatim pod 3 spektar ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe, dok su pod 4 i 5 prikazani spektri optimalnih inkapsulata dobijenih *freeze* i *spray drying* tehnikama.

Na osnovu dobijenih spektara može se zaključiti da trake koje se pripisuju karotenoidima, kao aktivnim komponentama ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe, odgovaraju pre svega trakama iz ekstrakcionog medijuma, odnosno suncokretovog ulja. Isti trend se može primetiti i kod spektara ispitivanih optimalnih inkapsulata. Međutim, nakon inkapsulacije, trake koje se odnose na ekstrakt sporednog proizvoda prerade šargarepe preklapljene su trakama koje potiču od proteina surutke, kao dominantnog nosača u ovima inkapsulatima. S obzirom na hemijska svojstva nosača i ekstrakta i dobijenih rezultata FTIR analize, smatra se da su ova jedinjenja formirala fizičku smešu unutar inkapsulata, bez značajnih hemijskih interakcija. Ovo može ukazivati na dobar odnos nosača i ekstrakta za inkapsulaciju, što posledično dovodi do

formiranja zadovoljavajuće zaštite oko karotenoida iz ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe.

Raman spektroskopska analiza upotrebljena je za procenu efikasnosti inkapsulacije analizom površinski vezanog ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe (slika 31b). S obzirom da suncokretovo ulje, inulin i proteini surutke dominiraju u optimalnim formulacijama, njihove trake služile su kao "markeri" za razlikovanje traka koje potiču od ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe. Na osnovu prikazanih rezultata, može se uočiti da trake koje potiču od inulina i proteina surutke, jasno razdvajaju ova dva nosača od ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe, u kom dominiraju trake koje potiču od suncokretovog ulja. Prema Camorani i sar. (2015) trake na 1157 cm^{-1} i 1525 cm^{-1} u spektru 3, koji se odnosi na ekstrakt sporednog proizvoda prerade šargarepe, posledica su prisustva karotenoida. Traka na $\sim 1008\text{ cm}^{-1}$, takođe karakteristična za karotenoide, u ovom slučaju je verovatno prekrivena spektrima suncokretovog ulja, ili u slučaju inkapsulata spektrima proteina surutke na $\sim 1006\text{ cm}^{-1}$, u blizini položaja fenilalanin trake (Zhao i sar. 2004). Raman analizom su kod oba optimalna inkapsulata jasno potvrđene trake karakteristične za ekstrakt, odnosno aktivne komponente, što ukazuje na njihovu prisutnost na površini inkapsulata. Ovakvi rezultati su očekivani, s obzirom je prethodno utvrđen sadržaj površinskih karotenoida, prilikom određivanja efikasnosti inkapsulacije istih.



Slika 30. a) FTIR i b) Raman spektri inulina (1), proteina surutke (2), ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe (3), FDI (4) i SDI (5) inkapsulata

5.3.3. Fizičke karakteristike inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe

U okviru fizičkih karakteristika inkapsulata ispitivani su parametri kvaliteta važni za njihovu praktičnu primenu kao prahova, s obzirom da je takva forma krajnji rezultat procesa inkapsulacije. U pitanju su, pre svega, vrednosti aktivnosti vode, sadržaja vlage i higroskopnosti, kao glavne determinante za stabilnost i mikrobiološku aktivnost inkapsulata. Na svim proizvodnim nivoima poželjan je maksimalan prinos uz odgovarajući kvalitet finalnog proizvoda. U cilju poređenja ekonomske opravdanosti korišćenja tehnika inkapsulacije, procena efikasnosti sušenja u pogledu prinosa inkapsulata je od izuzetnog značaja kada su u pitanju procesi liofilizacije i sušenja u struji toplog vazduha. Rastvorljivost u vodi je takođe značajan parametar u karakterizaciji praškastih formi, s obzirom da se u prehrambenoj industriji inkapsulat sa visokim indeksom rastvaranja smatra proizvodom željenih karakteristika. Rezultati navedenih parametara predstavljeni su u tabeli 17.

Tabela 17. Aktivnost vode, sadržaj vlage, higroskopnost, prinos i rastvorljivost inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* (FDI) i *spray drying* tehnikama (SDI)

Karakteristika	FDI	SDI
Aktivnost vode	0,18 ± 0,00 ^b	0,16 ± 0,00 ^a
Sadržaj vlage (%)	4,05 ± 0,03 ^b	3,35 ± 0,01 ^a
Higroskopnost (g_{vode}/100g)	2,10 ± 0,01 ^a	8,45 ± 0,11 ^b
Prinos inkapsulata (%)	98,32 ± 2,56 ^b	75,61 ± 3,48 ^a
Rastvorljivost (%)	58,72 ± 0,27 ^b	56,79 ± 0,98 ^a

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju;

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 3$).

Aktivnost vode (aw vrednost) definiše se kao količina slobodne vode, odnosno kao donja granica slobodne vode za rast mikroorganizama i biohemijske reakcije u hrani. U osnovi, aw vrednosti ispod 0,6 smatraju se mikrobiološki stabilnim, dok vrednosti od 0,2 do 0,4 osiguravaju

stabilnost prehrambenog proizvoda od tamnjenja i hidrolitičke reakcije, lipidne oksidacije, autooksidacije i enzimske aktivnosti. Za FDI i SDI inkapsulate, zabeležene su ekstremno niske aw vrednosti (manje od 0,2) na osnovu čega se može zaključiti da predstavljaju mikrobiološki stabilne sastojke sa mogućnošću primene u različitim prehrambenim proizvodima. Pored aw vrednosti, u oblasti nauke o bezbednosti hrane, sadržaj vlage je takođe bitna karakteristika koja utiče na mikrobiološku stabilnost, reološke i morfološke karakteristike dobijenih inkapsulata. Sadržaj vlage predstavlja sastav vode u sistemu, i u direktoj je vezi sa efikasnošću sušenja. U sistemima kao što su inkapsulati biljnih ekstrakata poželjan je mali sadržaj vlage, što osigurava produženo vreme trajanja i stabilnosti ekstrakata sa smanjenom mogućnošću mikrobiološke kontaminacije tokom skladištenja i manipulacijom istih. Prema Ramakrishnan i sar. (2018) niska aw vrednost i nizak sadržaj vlage takođe doprinose sprečavanju pojave aglomeracije i pojave poznate kao *caking* (sjedinjavanje čestica/pojava "pogače" usled lepljivosti). U dobijenim inkapsulatima vrednosti sadržaja vlage su manji od 5%, što je u okviru opsega kojima se ispunjava zahtev kvaliteta za ovu vrstu proizvoda. Ukoliko uporedimo dobijene rezultate sa aspekta primenjene tehnike, može se videti da su niže vrednosti navedenih parametara zabeležene za inkapsulat dobijen *spray drying* tehnikom. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima objavljenim od strane Quispe-Condori i sar. (2011) i Caliskan i Dirim (2016), koji upućuju da je pri visokoj ulaznoj temperaturi, kao u slučaju *spray drying* tehnike, brzina prenosa toplote veća i pruža pokretačku silu za isparavanje vlage. Tengse i sar. (2017) su takođe došli do zaključka da viša ulazna temperatura može smanjiti relativnu vlažnost vazduha koji se ubrizgava u komoru za sušenje i ubrzava prenos toplote između vazduha i napojne smeše, što rezultira nižim sadržajem vlage u dobijenom proizvodu.

Higroskopnost se definiše kao sposobnost materijala da apsorbuje vlagu iz okolne sredine. Budući da je mobilnost vode glavni pokretač enzimskih i hemijskih reakcija, što rezultira pogoršanjem kvaliteta i promenom fizičkih svojstava inkapsulata, higroskopnost je važan faktor za predviđanje njihove stabilnosti. Niske vrednosti higroskopnosti smatraju se poželjnom karakteristikom inkapsulata, s obzirom da se visoka higroskopnost povezuje sa većom tendencijom ka vezivanju vode i pojavom lepljivosti (Tonon i sar. 2008). Prema Nurhadi i sar. (2012) praškaste forme koje imaju higroskopnost manju od 20% su zadovoljavajućeg kvaliteta i smatraju se nehigroskopnim. Kako su dobijene vrednosti ispod navedene granice, nakon sedam dana skladištenja inkapsulata u eksikatoru u uslovima relativne vlažnosti od 75%, moglo se

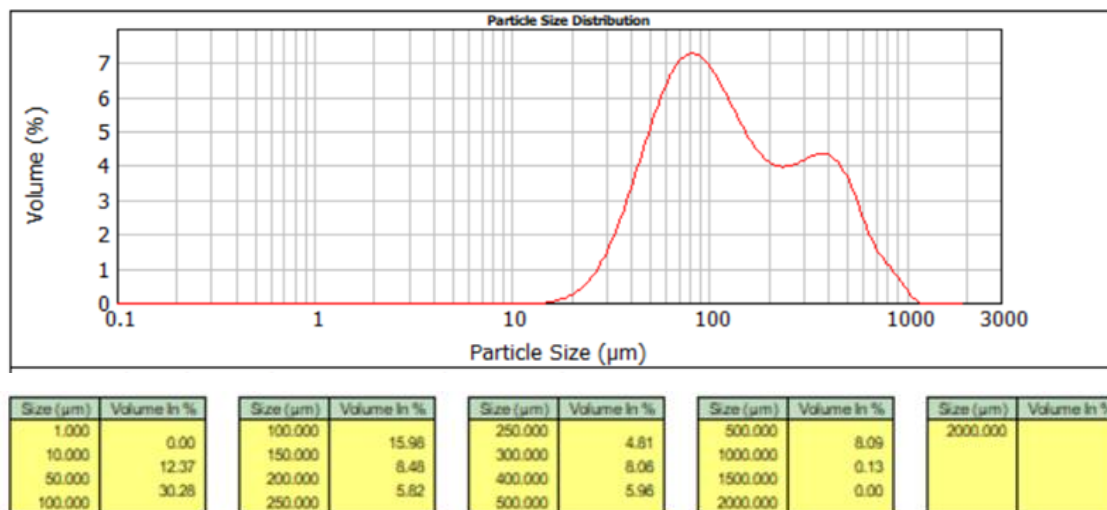
konstatovati da su oba uzorka nehigroskopna. Inkapsulat dobijen *freeze drying* tehnikom, tokom ispitivanog vremenskog perioda pokazao je higroskopnost u vrednosti od 2,10 g_{vode}/100 g, dok je inkapsulat dobijen *spray drying* metodom pokazao četiri puta veću vrednost (8,45 g_{vode}/100 g), što ukazuje na njegov jači kapacitet za privlačenje molekula vode u kontaktu sa okolnom sredinom. Prema de Souza i sar. (2015) temperatura sušenja ima značajan uticaj na higroskopnost, te inkapsulati dobijeni na većim temperaturama poseduju veće vrednosti s obzirom da se u takvim uslovima dobijaju poroznije čestice pri čemu je olakšana apsorpcija vode. Dobijeni rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su u skladu sa navedenom konstatacijom. Takođe, dobijeni rezultati su u skladu i sa konstatacijom predstavljenom od strane Mishra i sar. (2014) i Caparino i sar. (2012), koji su izvestili da je higroskopnost praha u korelaciji sa njegovim sastavom, odnosno vrstom nosača. Optimalna smeša nosača za SDI, za razliku od FDI, u svom sastavu sadrži i inulin, koji je uticao na higroskopnost uzorka zbog visokog afiniteta inulina prema vodi, zasnovanog na prisustvu velikog broja hidrofilnih grupa. Sličan zaključak objavljen je i u studiji Barros Fernandes i sar. (2014). Sa druge strane, pojedini autori ukazuju na korelaciju između između sadržaja vlage i higroskopnosti praha (Santana i sar. 2013; Tonon i sar. 2008). Međutim, ova korelacija nije potvrđena od strane drugih autora (Ahmed i sar. 2010; Bicudo i sar. 2015), te iz tog razloga ne može biti generalizovana.

Freeze drying tehnikom ostvaren je oko 20% veći prinos inkapsulata u odnosu na *spray drying* tehniku. Iako pruža mnogobrojne prednosti, visoka cena sušenja, kao osnovna mana liofilizacije, limitira njenu široku primenu. Kada je u pitanju *spray drying* tehnika, kao najčešći problem izdvaja se lepljivost tokom sušenja i zaostajanje na zidovima komore za sušenje. Lepljivost se može definisati fenomenima poznatim kao kohezija i adhezija. Kohezija je pojava lepljivosti između čestica, dok je adhezija pojava lepljivosti između čestica i zida komore za sušenje ili ciklona (Vladić, 2017). Efikasna proizvodnja inkapsulata *spray drying* tehnikom, u pogledu onemogućavanja pojave lepljivosti tokom sušenja, ostvaruje se odabirom odgovarajućeg nosača. Prema literaturnim podacima, animalni proteini su dali dobre rezultate, i u slučaju kada se koriste sami i kada se kombinuju sa ugljenim hidratima (Šeregelj i sar. 2019; Hugget i sar. 2018; Rodea-Gonzales i sar. 2012; Escalona-Garcia i sar. 2016). Međutim, i među animalnim proteinima postoje izvesne razlike u efikasnosti sušenja i prinosa koji se ostvaruje. Nu Ton i sar. (2016) su ispitivali efikasnost različitih proteinskih nosača za inkapsulaciju ulja semena rambutana *spray drying* tehnikom. Primenom natrijum kazeinata i želatina u ove svrhe ostvaren

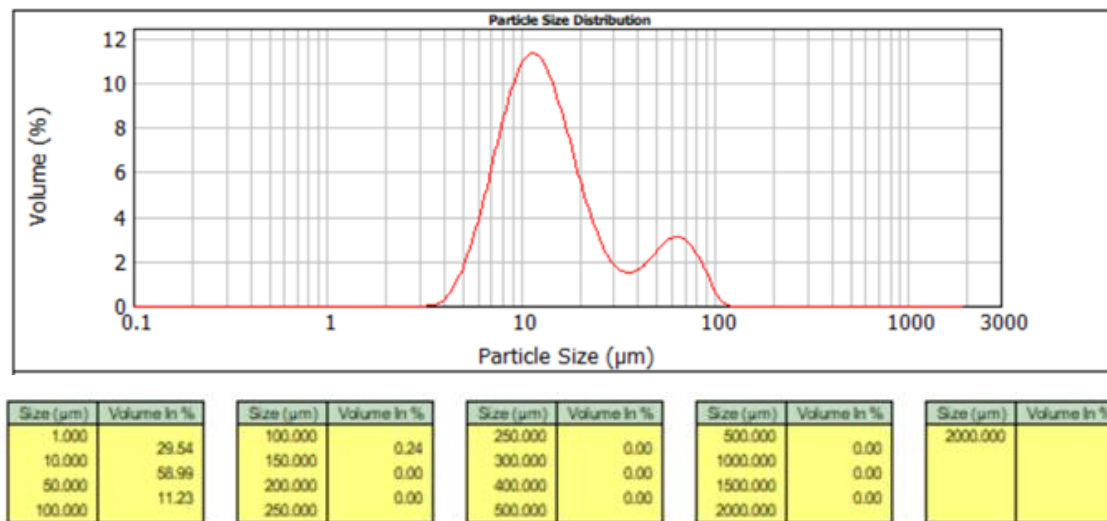
je nizak prinos inkapsulata (25,6-28,5%), dok je sa proteinima surutke zabeležen prinos od 72,5%. To donekle može biti objašnjeno visokim viskozitetom emulzije koji je odlika nosača poput natrijum kazeinata i želatina. Sa druge strane, proteini surutke poseduju dobre osobine emulgovanja i formiranje filma, kao i nisku viskoznost, što je doprinelo boljim rezultatima u pogledu prinosa inkapsulata. Naime, ovaj rezultat je u skladu sa prinosom koji je ostvaren za SDI optimalni inkapsulat. Efikasnost sušenja veća od 50% navodi se kao kriterijum uspešnog sušenja u laboratorijskim uslovima, te se dobijeni rezultati mogu smatrati dobrim prinosom za obe tehnike.

Indeks rastvorljivosti je fizička karakteristika inkapsulata koja predstavlja sposobnost njegovog rastvaranja u vodi. Dobijeni inkapsulati ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe imaju relativno visoku vrednost indeksa rastvorljivosti u vodi, što iznosi oko 55%. Morfologija inkapsulata ima veliki uticaj na rastvorljivost, te se smatra da je kod uzoraka kompaktnije strukture, bez pukotina i praznina, otežano prodiranje vode, a samim tim i rastvaranje. Ovakva struktura se obično povezuje sa inkapsulatima na bazi proteinskih nosača, čime se objašnjavaju niže vrednosti rastvorljivosti ukoliko se uporede, na primer, sa ugljenohidratnim nosačima (Kalušević, 2016).

Veličina čestica i njihova distribucija predstavljaju veoma bitne karakteristike inkapsulata, koje utiču na svojstva i performanse intermedijarnih i finalnih proizvoda. Takođe, u velikoj meri mogu uticati na prirodu i efikasnost proizvodnog procesa (Chan i sar. 2008). Različite studije istakle su značaj veličine čestica kada se koriste inkapsulirana bioaktivna jedinjenja u funkcionalnoj hrani. U nekim slučajevima, čestice većih dimenzija u funkcionalnoj hrani mogu biti nepoželjne zbog neugodnog osećaja u ustima, dok u drugim mogu biti poželjne, odnosno kada je cilj dobijanje proizvoda sa vidljivim elementima. Sa druge strane, smanjenje veličine čestica bioaktivnih jedinjenja može poboljšati njihovu biodostupnost, svojstva isporuke, rastvorljivost, a samim tim i biološku aktivnost (Shegokar i Muller, 2010). Polidisperznost, odnosno uniformnost čestica je još jedan parametar značajan za kinetiku oslobađanja inkapsuliranih sastojaka, s obzirom da čestice iste veličine pokazuju istu brzinu oslobađanja (Ramos, 2011). Raspodela veličina čestica inkapsulata ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe određena je pomoću uređaja Mastersizer 2000 metodom laserske difrakcije, a dobijeni rezultati prikazani su na slici 32.

a) *Freeze drying*

Dsr – 195,98 µm; d(0,1) – 46,33 µm; d(0,5) – 118,61 µm; d(0,9) – 465,98 µm; Span – 3,54

b) *Spray drying*

Dsr – 20,94 µm; d(0,1) – 7,12 µm; d(0,5) – 13,23 µm; d(0,9) – 54,52 µm; Span – 3,58

Slika 31. Raspodela veličine čestica inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih a) *freeze drying* i b) *spray drying* tehnikama

Na osnovu prikazanih rezultata mogu se uvideti značajne razlike u veličinama čestica inkapsulata, koje potiču od primenjenih tehnika sušenja. Srednji prečnik čestica FDI inkapsulata iznosi 195,98 μm . Takođe, rezultati merenja raspodele veličine čestica pokazuju da 10% čestica ima prečnik manji od 46,33 μm , 50% čestica manji prečnik od 118,61 μm , a 90% čestica ima prečnik manji od 465,98 μm . Srednji prečnik čestica SDI inkapsulata iznosi 20,94 μm , na osnovu čega se može zaključiti da su čestice ovog uzorka znatno manje od FDI inkapsulata. Raspodela veličina čestica za SDI uzorak pokazuje da 10% čestica ima prečnik manji od 7,12 μm , 50% čestica ima manji prečnik od 13,23 μm , dok 90% čestica ima prečnik manji od 54,52 μm . Veće dimenzije liofiliziranih čestica mogu se objasniti niskom temperaturom procesa i nedostatkom snage za razbijanje smrznutih kapljica, odnosno za promenu površine tokom sušenja (Chen i sar. 2012). U literaturi se mogu naći podaci i da od različitih metoda i brzine smrzavanja uzorka zavise veličina kristala leda, a samim tim i veličina čestica i mogućnost njihove agregacije. Prema Abdelwahed i sar. (2006), što su kristali leda manji, njihova specifična površina je veća, a mehaničko naprezanje koje pri tome nastaje je manje. Manji kristali leda uzrok su manje mogućnosti agregacije čestica koja se može dogoditi tokom mehaničkog naprezanja. Međutim, kada se uopšteno diskutuje o liofiliziranim inkapsulatima, veličina čestica nije od presudnog značaja, jer se ona često reguliše naknadim usitnjavanjem ili mlevenjem (Kalušević, 2016). Sa druge strane, *spray drying* tehnika se smatra pogodnom metodom za proizvodnju malih i uniformnih čestica, s obzirom da prolaze kroz sistem za raspršivanje pre ulaska u komoru za sušenje (Correia i sar. 2017).

Inkapsulati sporednog proizvoda prerade šargarepe okarakterisani su i u pogledu nasipne i tapkane gustine, na osnovu čega su izraženi indeks kompresibilnosti, Hausnerov odnos i protočne karakteristike za ispitivane uzorke. Poznavanje tih karakteristika je od fundamentalnog značaja sa aspekta daljeg procesuiranja, skladištenja, pakovanja i transporta. Rezultati ovih analiza prikazani su u tabeli 18.

Značajno veće vrednosti nasipne i tapkane gustine određene su za uzorak koji je dobijen tehnikom sušenja u struji toplog vazduha. Slučaj nižih vrednosti nasipne i tapkane gustine inkapsulata, kada je u pitanju tehnika liofilizacije, zabeležen je i u studijama Kalušević (2016) i Calin-Sanchez i sar. (2013). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je inkapsulat dobijen tehnikom sušenja u struji toplog vazduha znatno pogodniji sa tehnološkog aspekta. Navedeni rezultat se može objasniti manjom veličinom čestica inkapsulata dobijenih ovom

tehnikom. Slična opažanja predstavljena su u studijama Caliskan i Dirim (2016) i Šeregelj i sar. (2019). Pored toga, može se reći da i sastav optimalne smeše ima značajan uticaj na nasipnu gustinu inkapsulata. Optimalna smeša nosača za SDI uzorak, pored proteina surutke sadrži i udeo inulina, čije je smeštanje u prostorima između čestica lakše zbog manjih dimenzija koje ga karakterišu. Sličan zaključak su objavili i Barros-Fernandes i sar. (2013) koji su ispitivali fizičko-hemijske karakteristike inkapsulata etarskog ulja ruzmarina dobijenog *spray drying* tehnikom uz primenu mešavine proteina surutke i inulina kao nosača. Prema njima, sa povećanjem udela inulina u smeši povećavale su se i vrednosti nasipne i tapkane gustine.

Tabela 18. Nasipna i tapkana gustina, Indeks kompresibilnosti, Hausnerov odnos i svojstvo proticanja inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* (FDI) i *spray drying* tehnikama (SDI)

Karakteristika	FDI	SDI
Nasipna gustina (g/ml)	0,26 ± 0,02 ^a	0,34 ± 0,06 ^b
Tapkana gustina (g/ml)	0,38 ± 0,04 ^a	0,49 ± 0,05 ^b
Indeks kompresibilnosti (%)	31,58 ± 0,05 ^b	30,61 ± 0,07 ^a
Hausnerov odnos	1,46 ± 0,05 ^a	1,44 ± 0,07 ^a
Protočnost	Zadovoljavajuća	Zadovoljavajuća
Kohezivnost	Visoka	Visok

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju;

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 3$).

Indeks kompresibilnosti ili Carr index, predstavlja parametar za kategorizaciju inkapsulata prema svojstvu proticanja. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da oba inkapsulata spadaju u kategoriju zadovoljavajuće protočnosti. Što se tiče svojstva kohezivnosti, kategorisanih na osnovu vrednosti Hausnerovog odnosa, inkapsulati ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe svrstani su u kategoriju visoke kohezivnosti čestica.

5.3.4. Oksidativna stabilnost inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe

Oksidativna stabilnost ili održivost proizvoda na bazi biljnih ulja predstavlja vreme za koje se ona mogu sačuvati od intenzivnog procesa autooksidacije. Kvarenje biljnih ulja uzrokovano oksidativnim procesom je najčešći tip kvarenja, a predstavlja proces oksidacije nezasićenog ugljovodoničnog lanca masnih kiselina. Poznavanje stabilnosti ili održivosti ovakvih proizvoda je od izuzetnog značaja, kako bi se moglo unapred odrediti vreme bez bitnih promena kvaliteta. Proizvodi autooksidacije u malim količinama daju uljima neprijatan miris i ukus, te na taj način narušavaju senzorska svojstva proizvoda. Danas se u praksi za određivanje oksidativne stabilnosti ulja najčešće primenjuje test ubrzane oksidacije ulja poznat kao Rancimat test. Rancimat test temelji se na ubrzanom kvarenju ulja pri povišenim temperaturama uz konstantno prodivavanje vazduha, pri čemu se indukcioni period određuje na osnovu količine izdvojenih kratkolančanih isparljivih organskih kiselina. Indukcionni period (vreme u satima) ukazuje na otpornost ulja prema oksidaciji. Što je indukcionni period duži, to je i održivost ulja veća. Rezultati određivanja indukcionog perioda na bazi Rancimat testa za uzorke optimalnih inkapsulata uljanog ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe predstavljeni su u tabeli 19.

Tabela 19. Oksidativna stabilnost (h) ekstrakta i inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* (FDI) i *spray drying* tehnikama (SDI)

Temperatura	Ekstrakt	FDI	SDI
<i>Indukcionni period</i>			
100 °C	6,10 ± 0,03 ^a	8,55 ± 0,40 ^c	7,10 ± 0,30 ^b
110 °C	3,00 ± 0,03 ^a	4,25 ± 0,21 ^c	3,50 ± 0,10 ^b

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju;

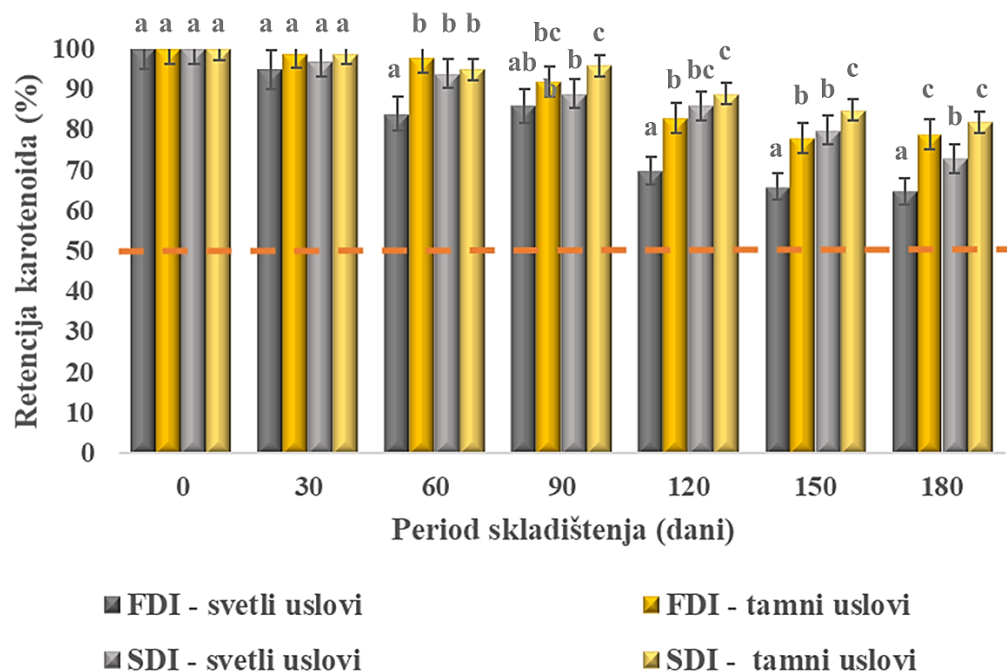
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 3$).

Indukcioni period ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe pri 100 °C iznosio je 6,10 h, dok je pri uslovima od 110 °C indukcioni period iznosio 3,00 h. Prema objavljenim literaturnim podacima, ulje se može smatrati stabilnim ako ima najmanje 6 h indukcionog vremena, te se može zaključiti da je uljani ekstrakt sporednog proizvoda prerade šargarepe u skladu sa navedenim propisima (EH141112, 2003).

Sa druge strane, duži indukcioni period određen je kod optimalnih inkapsulata, što potvrđuje uspešnost postupka inkapsulacije ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe. Ukoliko izvršimo komparaciju optimalnih uzoraka, inkapsulacijom ekstrakta *freeze drying* tehnikom povećan je indukcioni period za ~30%, dok je nakon inkapsulacije ekstrakta *spray drying* tehnikom zabeleženo povećanje za ~15%. Šturm i sar. (2019) su takođe objavili slična zapažanja o značajnijem povećanju indukcionog perioda nakon inkapsulacije neparafinisanog propolisa *freeze drying* tehnikom. Osim primenjene tehnike, na oksidativnu stabilnost inkapsuliranih ekstrakata veliki uticaj pokazuju i primenjeni nosači aktivnih komponenti. Tome svedoči istraživanje Lim i sar. (2012) koji su ispitivali oksidativnu stabilnost inkapsuliranog ulja semena pitaje *spray drying* tehnikom. U zavisnosti od primenjenog nosača za inkapsulaciju ovog ulja zabeležene su vrednosti indukcionog perioda od 5,20 do 38 h.

5.3.5. Održivost karotenoida inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe

Kao što je opisano u poglavlju 5.1.3. za ispitivanje održivosti karotenoida u ekstraktu sporednog proizvoda prerade šargarepe, na isti način procenjena je i održivost karotenoida nakon inkapsulacije ekstrakta *freeze* i *spray drying* tehnikama pod optimalnim uslovima. Rezultati retencije karotenoida tokom 180 dana skladištenja FDI i SDI optimalnih inkapsulata u svetlim i tamnim uslovima prikazani su na slici 33, dok su kinetički parametri u pogledu brzine degradacije (k) i vremena poluživota ($t_{1/2}$) dati u tabeli 20.



Slika 32. Retencija karotenoida tokom perioda skladištenja (180 dana) inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* (FDI) i *spray drying* tehnikama (SDI) u svetlim i tamnim uslovima

Stubići označeni različitim slovima statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija ($n = 3$)

Tabela 20. Vrednosti brzine degradacije (k) i vremena poluživota ($t_{1/2}$) karotenoida tokom perioda skladištenja (180 dana) inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* (FDI) i *spray drying* tehnikama (SDI) u svetlim i tamnim uslovima

Parametar	FDI	FDI	SDI	SDI
	svetli uslovi	tamni uslovi	svetli uslovi	tamni uslovi
Brzina degradacije - k (dan^{-1})	0,0026	0,0016	0,0017	0,0011
Vreme poluživota - $t_{1/2}$ (dan)	266,60	433,22	407,73	630,13
R²	0,94	0,91	0,96	0,93

Dobijeni rezultati pokazuju da je nakon perioda od 180 dana, retencija karotenoida veća kod SDI optimalnog inkapsulata, a odnosi se i na svetle i na tamne uslove skladištenja. Tokom navedenog perioda, najveća retencija karotenoida zabeležena je za SDI uzorak koji je skladišten u tamnim uslovima (82%), dok je najmanju retenciju pokazao FDI uzorak skladišten u uslovima dnevne svetlosti (65%). Međutim, ukoliko se uporedi retencija ovih pigmenata pre inkapsulacije (u ekstraktu, poglavlje 5.1.3.) i nakon inkapsulacije, može se potvrditi zaštitni efekat obe tehnike, odnosno i *freeze* i *spray drying* inkapsulacije.

Monicka i sar. (2017) su ispitivali stabilnost karotenoida iz pulpe bundeve inkapsuliranih na maltodekstrinu i smeši maltodekstrina i gume arabike *spray drying* tehnikom. Tokom perioda skladištenja od 60 dana u tamnim uslovima, zabeležena je retencija karotenoida od 82,07% za inkapsulat gde je kao nosač upotrebljena smeša maltodekstrina i gume arabike, dok je manja retencija ostvarena u slučaju inkapsulacije karotenoida sa čistim maltodekstrinom (70,74%). Premi i Sharma (2017) su takođe potvrdili efikasnost *spray drying* tehnike tokom ispitivanja stabilnosti skladištenja inkapsuliranog ulja moringe (*Moringa olifera*).

5.3.6. Boja inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe

Boja je fizička, ali ujedno i senzorna karakteristika koja u velikoj meri doprinosi prihvatljivosti proizvoda od strane potrošača. Postojanost, odnosno stabilnost boje je značajan parametar kvaliteta prehrambenih proizvoda, te se ovo svojstvo proverava u gotovo svim fazama tehnološkog postupka proizvodnje, skladištenja i prodaje. Boja uzoraka inkapsulata uslovljena je bojom ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe, a dobijene L^* , a^* i b^* vrednosti, kao i vrednosti ugla boje (h°) i hrome (C^*) za FDI i SDI inkapsulate prikazane su u tabeli 21.

FDI inkapsulat karakteriše manja osvetljenost ($L^*=82,44$) i veći intenzitet žute boje ($b^*=37,72$) u poređenju sa SDI inkapsulatom ($L^*=89,04$; $b^*=24,90$). Tamniju boju i izraženiju žutu nijansu FDI inkapsulata potvrđuje i viša vrednost hrome ($C^*=37,72$), što se može objasniti većim sadržajem karotenoida na površini inkapsulata dobijenog ovom tehnikom. Takođe, razlike u boji mogu biti uslovljene i razlikama u veličinama čestica, s obzirom da manje čestice u slučaju SDI inkapsulata, doprinose povećanju osvetljenja i smanjenju intenziteta žute boje. Generalno, dobijeni rezultati su očekivani, jer se i među literaturnim podacima često nalaze takve razlike L^* vrednosti inkapsulata dobijenih *freeze* i *spray drying* tehnikama. Jedan od

primera je rezultat istraživanja Ogrodowska i sar. (2019) koji su ispitivali uticaj navedenih tehnika sušenja na kvalitet inkapsuliranih bio ulja. Slične rezultate objavili su i autori koji su istraživali inkapsulaciju ekstrakta pulpe manga (Sharma i sar. 2013) i ulja semena bundeve (Ogrodowska i sar. 2017).

Tabela 21. CIE Lab hromatski parametri inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* (FDI) i *spray drying* tehnikama (SDI)

CIE Lab	FDI	SDI
L*	82,44 ± 0,03 ^a	89,04 ± 0,00 ^b
a*	-0,10 ± 0,03 ^a	-2,12 ± 0,01 ^b
b*	37,72 ± 0,07 ^b	24,90 ± 0,05 ^a
C*	37,72 ± 0,04 ^b	24,99 ± 0,05 ^a
h°	90,15 ± 0,04 ^a	94,86 ± 0,01 ^b

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju;

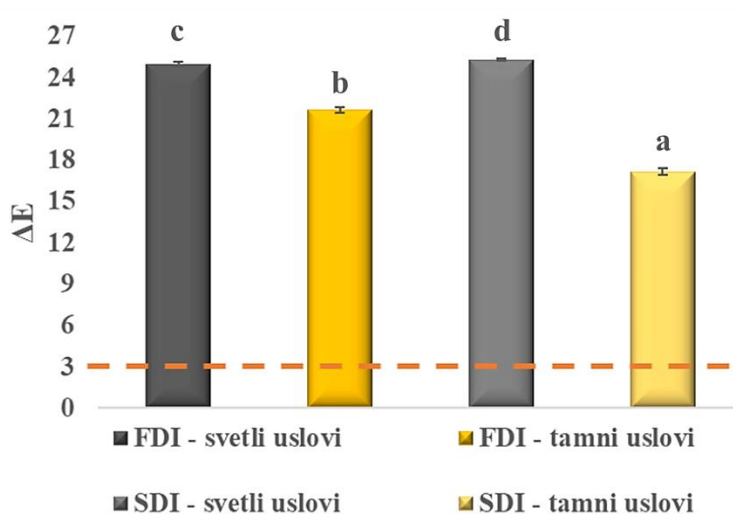
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 3$).

U tabeli 22 dati su i CIE Lab parametri nakon 180 dana skladištenja inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe u svetlim i tamnim uslovima, a na slici 34 je prikazana ukupna promena boje ΔE . Tokom perioda skladištenja inkapsulata u svetlim i u tamnim uslovima, došlo je do značajnih promena, naročito u pogledu L* parametra. Iako se očekivalo da će L* vrednost tokom perioda skladištenja da raste, zabeleženo je smanjenja osvetljenosti ispitivanih inkapsulata. Što se tiče parametra b*, zapaža se smanjenje vrednosti tokom perioda od 180 dana, što je u skladu sa retencijom karotenoida u ovim inkapsulatima. Međutim, iako je došlo do niza navedenih promena u CIE Lab parametrima, vrednosti ugla boje (h°) i dalje sugerišu žute nijanse FDI i SDI inkapsulata.

Tabela 22. CIE Lab hromatski parametri inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* (FDI) i *spray drying* tehnikama (SDI) nakon 180 dana skladištenja u svetlim i tamnim uslovima

CIE Lab	FDI ₁₈₀	FDI ₁₈₀	SDI ₁₈₀	SDI ₁₈₀
	svetli uslovi	tamni uslovi	svetli uslovi	tamni uslovi
L*	67,96 ± 0,32 ^a	66,22 ± 0,07 ^b	68,67 ± 0,14 ^b	70,60 ± 0,07 ^b
a*	-0,41 ± 0,01 ^a	-0,29 ± 0,01 ^b	-0,49 ± 0,04 ^b	-0,93 ± 0,01 ^b
b*	17,39 ± 0,06 ^b	23,37 ± 0,27 ^a	10,01 ± 0,11 ^a	12,80 ± 0,13 ^a
C*	17,40 ± 0,07 ^b	23,37 ± 0,26 ^a	10,03 ± 0,10 ^a	12,84 ± 0,12 ^a
h°	91,37 ± 0,03 ^a	90,71 ± 0,01 ^b	92,82 ± 0,24 ^b	94,18 ± 0,06 ^b

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju;
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 3$).



Slika 33. Ukupna razlika boje ΔE nakon 180 dana skladištenja inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* (FDI) i *spray drying* tehnikama (SDI) nakon 180 dana skladištenja u svetlim i tamnim uslovima

Stubići označeni različitim slovima statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 3$)

5.3.7. Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe

Sadržaji bioaktivnih jedinjenja u inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe predstavljani su u tabeli 23. Sadržaj karotenoida, tokoferola i tokotrienola, određeni su HPLC metodom, dok je sadržaj proteina određen metodom po Kjeldalu.

Tabela 23. Sadržaj karotenoida (mg/kg), tokoferola (mg/kg) i proteina (mg/100 g) u inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* (FDI) i *spray drying* tehnikama (SDI)

Sadržaj	FDI	SDI
Karotenoidi (mg/kg)		
α-karoten	6,49 ± 0,42 ^b	5,90 ± 0,27 ^a
β-karoten	17,70 ± 1,04 ^b	16,22 ± 0,50 ^a
cis-β-karoten	3,83 ± 0,68 ^b	3,91 ± 0,28 ^a
Ukupan sadržaj karotenoida	28,02 ± 2,14^b	26,03 ± 1,05^a
Tokoferoli (mg/kg)		
α-tokoferol	229,65 ± 0,27 ^b	216,24 ± 5,91 ^a
β-tokoferol	10,06 ± 0,60 ^b	8,99 ± 0,52 ^a
γ-tokoferol	4,27 ± 0,24 ^b	2,89 ± 0,30 ^a
Ukupan sadržaj tokoferola	243,98 ± 0,56^b	228,13 ± 5,09^a
Proteini (mg/100 g)	42,51 ± 0,03^b	31,32 ± 0,02^a

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($P < 0,05$) razlikuju;

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 3$).

U FDI inkapsulatu određen je ukupan sadržaj karotenoida od 28,02 mg/kg, pri čemu je β-karoten prisutan u najvećoj koncentraciji (17,70 mg/kg), potom α-karoten (6,49 mg/kg) i cis-β-karoten (3,83 mg/kg). SDI uzorak karakteriše nešto niži sadržaj karotenoida i iznosi 26,04 mg/kg, odnosno 16,22 mg/kg β-karotena, 5,90 mg/kg α-karotena i 3,91 mg/kg cis-β-karotena.

Ukupan sadržaj tokoferola u FDI i SDI inkapsulatima iznosio je 243,98 mg/kg, odnosno 228,13 mg/kg. α -Tokoferol je detektovan kao najdominantniji homolog u ispitivanim uzorcima, sa ukupnim sadržajem od 94%, a preostalih 6% odnosili su se na β -tokoferol (4%) i γ -tokoferol (2%).

Basu i del Vecchio (2001) su takođe ispitivali mogućnost dobijanja funkcionalnih dodataka u vidu inkapsulata, koji bi uključivanjem u različite prehrambene proizvode doprineli povećanju sadržaja karotenoida i tokoferola. Navedeni cilj su ostvarili inkapsulacijom ulja kanole sa α -ciklodekstrinom. Funkcionalne dodatke bogate ovim jedinjenjima prijavili su i Durante i sar. (2020), kao rezultat ispitivanja inkapsulacije ulja paradajza sa ciklodekstrinima. Takođe, Chuyen i sar. (2019) su predstavili značajne rezultate kada je reč o dobijanju inkapsulata sa visokim sadržajem karotenoida i tokoferola. U tu svrhu, sproveli su optimizaciju procesnih parametara *spray drying* tehnike za inkapsulaciju ulja kore gorke dinje sa proteinima surutke.

Shodno primenjenim nosačima, sadržaj proteina u ispitivanim inkapsulatima je bio očekivano visok. Kako je čist protein optimalan nosač za inkapsulaciju ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe *freeze drying* tehnikom, za ovaj inkapsulat određen je viši sadržaj proteina, u odnosu na inkapsulat dobijen *spray drying* tehnikom gde je udeo proteina surutke 71%. Stoga, ukupan sadržaj proteina određen u FDI i SDI inkapsulatima iznosi 42,51 i 31,32 mg/100 g. Proteini surutke spadaju u nutritivno najvrednije proteine zahvaljujući sastavu koji karakteriše veliki udeo esencijalnih aminokiselina i visoka bioraspoloživost u organizmu. Naime, pored toga što imaju ulogu nosača bioaktivnih jedinjenja, proteini surutke poseduju brojna bioaktivna svojstva zbog čega su našli primenu u funkcionalnoj hrani, a naročito u proizvodima koje odlikuje nizak sadržaj proteina. β -Laktoglobulin je najzastupljeniji protein surutke sa udelom od 50-60%, a njegov značaj se ogleda u pozitivnom delovanju na razvoj mišića, visokom nivou cisteina koji podstiče sintezu važnog antioksidanta - glutationa, pozitivno utiče na rast probiotičkih kultura *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* u crevima te pokazuje prebiotička svojstva, i utiče na imunitet vezivanjem retinske kiseline čiji je pozitivan uticaj na proliferaciju limfocita i aktivnost T-ćelija dokazan *in vitro* (Krunić, 2017). α -Laktalbumin je drugi po važnosti protein surutke sa ukupnim udelom od 20%. Deluje kao prebiotik stimulišući rast "dobrih" bakterija, podstiče stvaranje antigena, deluje stimulatивно na B-limfocite i T ćelije, poseduje antimikrobnu, antikancerogenu i antihipertenzivnu aktivnost. α -Laktalbumin pozitivno deluje i na stres usled

velike koncentracije triptofana, aminokiseline koja učestvuje u sintezi serotonina, poznatog kao hormona sreće (Marcus i sar. 2005).

5.3.8. Sadržaj furozina u inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe

Maillard-ove reakcije ili reakcije neenzimskog tamnjenja su hemijske reakcije koje se odigravaju između aminokiselina i redukujućih šećera kod temperaturno tretirane i uskladištene hrane, i praćene su stvaranjem konstituenata prepoznatljive arome, žutih, crvenih i mrkih pigmenata. Furozin je jedinjenje koje se formira hidrolizom Amadori jedinjenja, nastalih kao intermedijernih proizvoda tokom Maillardovih reakcija, i predstavlja indeks oštećenja izazvanih toplotom u prehrambenim proizvodima.

Sadržaj furozina u optimalnim inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe pratio je sadržaj proteina u njima, a dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 24. Visoke vrednosti furozina su posledica prisustva proteina surutke, čija priprema zahteva različite termičke tretmane. Prema Hidalgo i sar. (2019), viši sadržaj aminokiselina stimuiše Maillardovu reakciju i stvaranje ovih pigmenata, čime se može objasniti viši sadržaj furozina u FDI inkapsulatu.

Tabela 24. Sadržaj furozina u optimalnim inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* (FDI) i *spray drying* tehnikama (SDI)

Sadržaj	FDI	SDI
Furozin (mg/100 g proteina)	487,03 ± 9,52 ^b	407,21 ± 4,11 ^a

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($P < 0,05$) razlikuju;

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 3$).

5.3.9. Antioksidativna i farmakološka aktivnost inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe

Bioaktivnost inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe u pogledu antioksidativne i farmakološke aktivnosti prikazana je u tabeli 25. Određivanje bioaktivnosti *in vitro* ne odražava u potpunosti fiziološke uslove u ćeliji, odnosno, ne uzima u obzir biološku dostupnost i metabolizam bioaktivnih jedinjenja. Iz tih razloga, uzorci su podvrgnuti *in vitro* simuliranoj gastrointestinalnoj digestiji, nakon čega je određena bioaktivnost kroz različite testove.

Tabela 25. Antioksidativna i farmakološka aktivnost inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* (FDI) i *spray drying* tehnikama (SDI)

Aktivnost	FDI	SDI
Antioksidativna aktivnost ($\mu\text{molTE}/100\text{ g}$)		
β-karoten metoda (AA_{BCB})	$70,11 \pm 3,02^{\text{b}}$	$43,28 \pm 2,96^{\text{a}}$
Redukciona sposobnost (RP)	$12,86 \pm 0,03^{\text{b}}$	$10,19 \pm 0,87^{\text{a}}$
Farmakološka aktivnost (% inhibicije)		
Antihiperглиkemijska aktivnost (AHgA)	$32,14 \pm 1,66^{\text{b}}$	$27,21 \pm 0,93^{\text{a}}$
Antiinfamatorna aktivnost (AIA)	$41,58 \pm 1,95^{\text{b}}$	$21,07 \pm 0,48^{\text{a}}$

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju;

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija ($n = 3$).

Varenje je složen proces pri čemu se hrana razlaže na nutrijente neophodne za energiju, rast i obnavljanje ćelija. U toku varenja, hrana se pre svega mehanički usitnjava, nakon čega dolazi do enzimske hidrolize makromolekula, odnosno makronutrijenata, i oslobađanja manjih molekula tj. mikronutrijenata, koji putem apsorpcije dospevaju u krvotok. Mehanička dezintegracija hrane se odvija uglavnom u ustima i želucu, dok se u tankom i debelom crevu odigrava enzimska razgradnja i apsorpcija nutrijenata i vode. U idealnim okolnostima, digestija hrane bi trebala da se proučava *in vivo* na ljudima, međutim, ovo je često tehnički neizvodljivo,

neinventivno i etički upitno. Poslednjih godina razvila se potreba za *in vitro* sistemima koji simuliraju *in vivo* uslove. U tu svrhu, prvo su uvedeni statički modeli, a potom i dinamički *in vitro* digestivni sistemi. Interesovanje naučne zajednice za ovakav vid istraživanja beleži značajan napredak u poslednje dve decenije. Ono oko čega se naučnici slažu je da dobar *in vitro* digestivni sistem treba da obezbedi u kratkom vremenskom periodu precizne rezultate i tako posluži kao brzo sredstvo za procenu karaktersitika hrane. Pored toga, važna je mogućnost poređenja rezultata različitih laboratorija, što je vremenom uslovalo standardizaciju *in vitro* digestivnih sistema. U okviru ove disertacije, sprovedena je upravo jedna takva standardizovana metoda za statički model *in vitro* digestivnog sistema, nazvan InfoGest, prema istoimenoj internacionalnoj mreži koja se bavi istraživanja na polju *in vitro* digestivnih sistema.

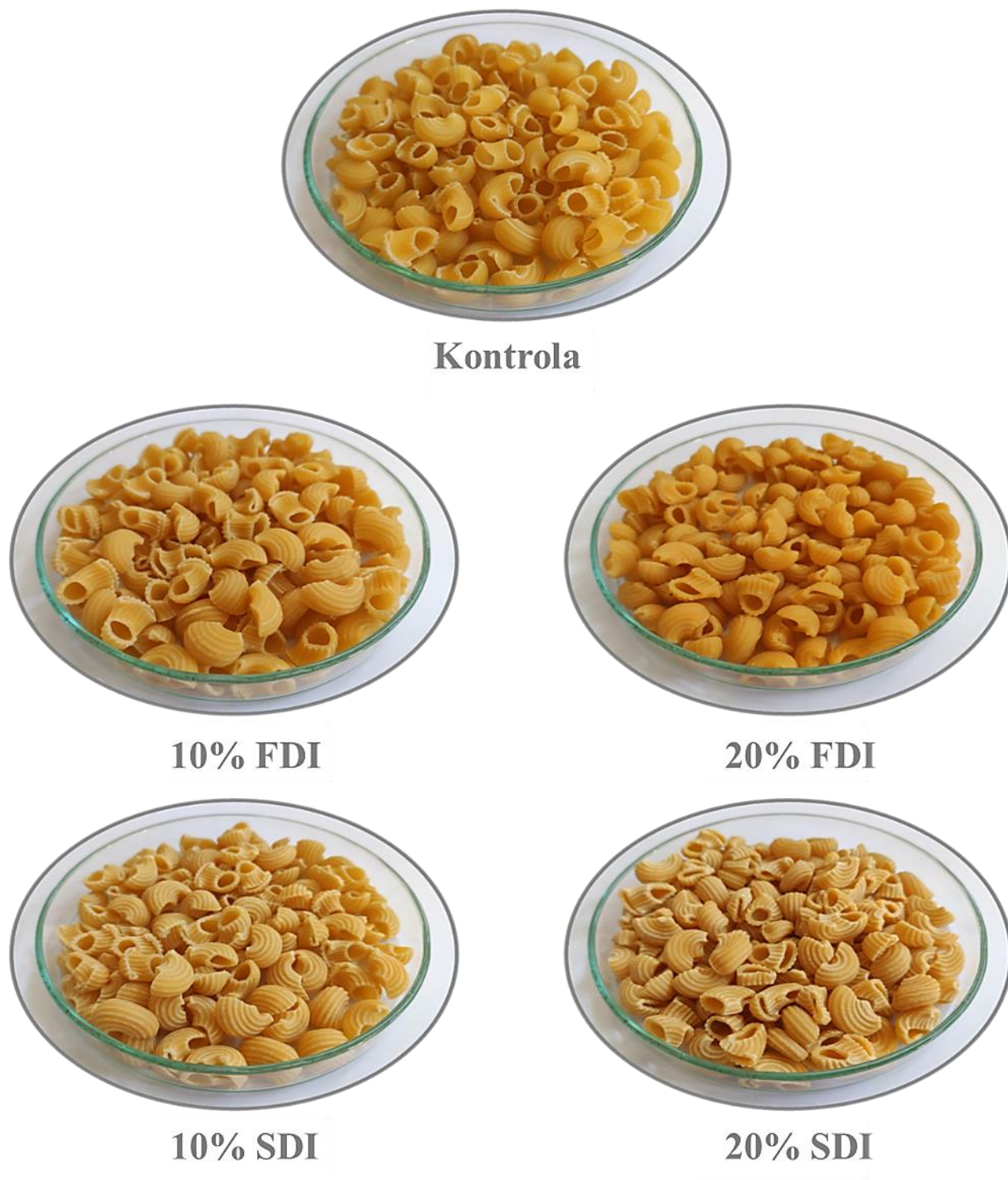
InfoGest statički model obuhvatao je digestiju u ustima, želucu i crevima. Digestija u ustima simulirana je mešanjem ispitivanog uzorka sa simuliranom pljuvačkom i α -amilazom u trajanju od dve minute na temperaturi od 37 C°. Nakon toga je sledila faza varenja u želucu, gde je bilo najvažnije ispravno definisanje pH (pH 3), s obzirom da je u *in vivo* uslovima pH promenljiv i zavisi od puferskog kapaciteta hrane. U cilju oponašanja realnih uslova, vreme simulirane digestije u želucu bilo je 2h uz prisustvo pepsina kao enzima. Digestija u crevima je bila poslednja, a ujedno i najsloženija faza, u kojoj je pH podešen na 7, a želudačni efluent izložen delovanju pankreatina u trajanju od 2h. Nakon završene simulirane *in vitro* gastrointestinalne digestije određena je bioaktivnost ispitivanih uzoraka, koja označava transport nutrijenata ili bioaktivne komponente i njihovo usvajanje od strane cijnog tkiva, komunikaciju sa biomolekulima, njihovu biotransformaciju u toku metabolizma i izazivanje fizioloških odgovora.

Iz tabele 25 može se zaključiti da oba inkapsulata poseduju značajna biološka svojstva nakon *in vitro* simulirane gastrointestinalne digestije, što ukazuje na mogućnost njihove primene kao funkcionalnih dodataka u različitim prehrambenim proizvodima. Kao što je već naglašeno, smatra se da je sinergističko delovanje α -tokoferola i β -karotena odgovorno za dobijene rezultate ukupne antioksidativne aktivnosti FDI i SDI inkapsulata. Inhibicija aktivnosti α -glukozidaze inkapsulatima sporednog proizvoda šargarepe nudi potencijal za dijabetičare tipa II da kontrolišu glikemiju putem ishrane i dijetetskih sredstava. Antiinflamatorno delovanje ovih funkcionalnih dodataka je takođe potvrđeno metodom antidenaturacije albumina iz jaja. Ipak, treba napomenuti da navedeni funkcionalni dodaci nisu lek u suzbijanju bolesti i ne mogu da mu budu zamena, ali su dobra zaštita od njih.

5.4. Primena inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe u proizvodnji testenine

Savremeni trend proizvodnje funkcionalne hrane nameće poboljšanje kvaliteta prehrambenih proizvoda, uključujući i testeninu, čija je važnost gotovo izjednačena sa važnošću hleba. Testeničarski proizvodi naboljeg kvaliteta dobijaju se od krupice tvrde pšenice (*Triticum durum*) - semoline, koja obezbeđuje dobra teksturna svojstva, održivost kvaliteta pri kuvanju i intenzivnu žutu boju testenine, koja potiče od karotenoida prisutnih u durum pšenici. Međutim, u našoj zemlji, zbog nedostatka durum pšenice i njene znatno više cene, za proizvodnju testenine obično se koristi brašno ili krupica meke pšenice (*Triticum aestivum* spp. *vulgare*). Kako bi se postigao bolji kvalitet i žuta boja testenine, u ovakve proizvode se dodaju jaja ili prehrambene boje. Imajući u vidu činjenicu da je testenina, na bazi obe vrste pšenice, siromašna proteinima i esencijalnim aminokiselinama, vitaminima i mineralima, kao i naučna saznanja o korelaciji između toksičnosti i upotrebe veštačkih boja za hranu, sve veći broj istraživanja posvećen je kreiranju formulacija testenina sa poboljšanim nutritivnim i funkcionalnim svojstvima.

Krajnji cilj istraživanja u okviru ove disertacije bio je definisanje sirovinskog sastava i postupka proizvodnje testenine sa dodatim karotenoidima u formi inkapsulata, koji bi zahvaljujući fiziološkom efektu pružili novu zdravstvenu dimenziju gotovog proizvoda. Paleta testeničarskih proizvoda prisutnih na tržištu ukazuje na nepostojanje proizvoda ove vrste, što se može i opravdati niskom stabilnošću karotenoida i njihovoj sklonosti ka degradaciji tokom procesa proizvodnje i izlaganju visokoj temperaturi prilikom sušenja proizvoda, kao i tokom pripreme, onosno kuvanja testenine. Stoga, od velikog značaja je bilo pronaći adekvatne načine stabilizacije karotenoida koji bi omogućili njihovu primenu u cilju poboljšanja nutritivnog kvaliteta i zdravstvene efikasnosti proizvoda. Korišćenje inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* i *spray drying* tehnikama kao funkcionalnih dodataka predstavljaju novinu u proizvodnji testenine, gde je bitno odrediti nivo supstitucije u formulaciji, što je ograničeno tehnološkim kvalitetom i senzorskim profilom krajnjeg proizvoda. Proizvedeni uzorci su: testenina na bazi semoline kao kontrolni uzorak, testenina obogaćena sa 10 i 20% FDI inkapsulata (10% FDI; 20% FDI) i testenina obogaćena sa 10 i 20% SDI inkapsulata (10% SDI; 20% SDI) (slika 35).



Slika 34. Testenina na bazi semoline (kontrola) obogaćena sa 10 i 20% optimalnih inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* tehnikom (10% FDI; 20% FDI) i *spray drying* tehnikom (10% SDI; 20% SDI)

5.4.1. Sadržaj proteina i bioaktivnih jedinjenja u osnovnoj sirovini testenine - krupica durum pšenice (semolina)

Među najvažnije aspekte kvaliteta durum pšenice ubrajaju se sadržaj i kvalitet proteina, pri čemu sadržaj proteina ima veći uticaj na finalni kvalitet testenine (Pagani i sar. 2007). U poređenju sa ostalim vrstama pšenice, durum pšenica ima veći udeo proteina i kreće se od 9 do 18 g/100 g (Shewry i sar. 2002). Kako bi se dobila testenina željenog kvaliteta, krupica bi trebala da sadrži najmanje 11% proteina. Tvrda pšenica sa visokim sadržajem proteina daje krupicu uniformne veličine čestica i sa smanjenim udelom skroba. Od krupice tvrde pšenice sa većim sadržajem proteina proizvodi se testenina koja je čvrsta i elastična, i koja tokom kuvanja dobro bubri, uz minimalne gubitke organske materije, a ostaje čvrsta do trenutka serviranja i ne lepi se. Sa druge strane, testenina napravljena od krupice sa niskim sadržajem proteina je veoma lomljiva i ima malu čvrstoću, gubici organske materije tokom kuvanja su uvećani, a kuvana testenina se lepi (Škrobot, 2016).

Sadržaj proteina u ispitivanom uzorku krupice durum pšenice, odnosno semoline, određen je metodom po Kjeldalu, i iznosi 11,41 mg/100 g (tabela 26). Viši sadržaj proteina u uzorku durum pšenice (12,6 g/100 g) zabeležen je u studiji Brandolini i sar. (2015). Sadržaj proteina u pšeničnom zrnju uslovljen je kako genetskim, tako i faktorima životne sredine (Hadži-Tašković Šukalović i sar. 2013). Takođe, važno je napomenuti da sadržaji proteina, ugljenih hidrata, mineralnih materija, vitamina i antioksidativnih fitonutrijenata znatno variraju između različitih frakcija zrna pšenice (Liyana-Pathirana i Shahidi, 2007). U skladu sa tim, funkcionalna i nutritivna svojstva raznih tipova brašna su različite, kao i njihova podobnost za različite prehrambene proizvode.

Sa aspekta kvaliteta durum pšenice sadržaj karotenoida predstavlja bitan indikator, s obzirom da intenzivna žuta boja krupice potiče upravo od visokog sadržaja karotenoida prisutnih u zrnju pšenice. Prema Moore i sar. (2005) sadržaj ukupnih karotenoida u zrnju durum pšenice se kreće od 0,8 do 2,7 $\mu\text{g/g}$. Glavni karotenoid durum pšenice je ksantofil lutein, koji čini od 86-94% ukupnih karotenoida (Abdel-Aal i sar. 2007; Digesu i sar. 2009). Karotenoidi kao što su zeaksantin, α -karoten, β -karoten i β -kriptoksantin su prisutni u manjim količinama, i kreću se od 3-5% ukupnih karotenoida (Panfili i sar. 2004; Fratianni i sar. 2005; Abdel-Aal i sar. 2007; Digesu i sar. 2009). Tokom prerade, odnosno mlevenja pšenice, smanjuje se sadržaj karotenoida,

s obzirom da se u najvećim količinama nalaze u aleuronskim slojevima, klicama i semenu, koji se preradom odstranjuju. Tokom mlevenja, lutein pokazuje visoku stabilnost i biva očuvan u velikoj meri, što nije slučaj i sa β -karotenom (Borrelli i sar. 2008).

Sadržaj ukupnih karotenoida u ispitivanom uzorku krupice durum pšenice je 5,13 mg/kg, što je znatno više u odnosu na zabeležen sadržaj ukupnih karotenoida u istraživanjima Morre i sar. (2005) i Durante i sar. (2019). Kao što je prikazano u tabeli 26, lutein je dominantan karotenoid i čini 95% ukupnih karotenoida ispitivane krupice tvrde pšenice, dok preostalih 5% čini zeaksantin. Navedeni udeli određenih karotenoida su u skladu sa tvrdnjama Abdel-Aal i sar. (2007), kao i Digesu i sar. (2009).

Tabela 26. Sadržaj proteina (mg/100 g), karotenoida (mg/kg) i tokoferola (mg/kg) u krupici durum pšenice (semolina)

Sadržaj	Semolina
Proteini (mg/100 g)	11,41 ± 0,00
Karotenoidi (mg/kg)	
Lutein	4,85 ± 0,04
Zeaksantin	0,28 ± 0,00
Ukupan sadržaj karotenoida	5,13 ± 0,04
Tokoferoli (mg/kg)	
α -tokoferol	3,54 ± 0,02
α -tokotrienol	4,06 ± 0,12
β -tokoferol	0,44 ± 0,11
β -tokotrienol	25,43 ± 0,44
Ukupan sadržaj tokoferola	33,47 ± 0,47

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija ($n = 3$).

Veći udeo navedenih pigmenata predstavlja i veći intenzitet žute boje dobijene krupice, ali žuta boja krupice ne rezultira uvek i žutom bojom proizvedene testenine. Tokom procesa proizvodnje testenine dolazi do degradacije pigmenata, što je rezultat oksidativnih reakcija koje uključuju peroksidaciju nezasićenih masnih kiselina lipooksigenazom, dok polifenol oksidaza i

peroksidaza doprinose stvaranju nepoželjne smeđe boje tokom sušenja testenine. Iz tih razloga, poželjan je niži sadržaj enzima u sirovini (Hidalgo i sar. 2010.; Fu i sar. 2013.). Hidalgo i sar. (2010.) utvrdili su da je gubitak karotenoidnih pigmenata manji prilikom upotrebe vakuuma tokom mešanja, a samim tim limitirane dostupnosti kiseonika i aktivnosti lipooksigenaze.

Zrno durum pšenice odlikuje i bogat sadržaj tokoferola i tokotrienola. Prema Lampi i sar. (2010) koncentracija ukupnih tokoferola i tokotrienola u pšeničnom zrnu ima vrednost od 27,6 i 79,7 $\mu\text{g/g}$. U okviru ove disertacije, β -tokotrienol je određen kao dominantan tokol u krupici durum pšenice (25,4 mg/kg), zatim α -tokotrienol (4,1 mg/kg), α -tokoferol (3,5 mg/kg), i β -tokoferol (0,4 mg/kg). Sličan profil tokoferola i tokotrienola izvestili su Laddomada i sar. (2015). Isti autori su izvestili da sadržaj β -tokotrienola značajano varira između različitih sorti tvrde pšenice, dok drugi tokoli, osim što su manje zastupljeni, pokazuju manje varijacije među uzorcima. Sa druge strane, Durante i sar. (2019) su objavili prisustvo α -tokoferola (0,85 mg/100 g), γ -tokoferola (0,30 mg/100 g) i α -tokotrienola (0,57 mg/100 g) u ispitivanom uzorku Vertola semoline.

5.4.2. Sadržaj furozina u krupici durum pšenice (semolina)

Za durum semolinu, koja je korišćena u formulaciji za proizvodnju testenina u okviru doktorske disertacije, određen je sadržaj furozina od 7,32 mg/100 g proteina (tabela 27).

Tabela 27. Sadržaj furozina u krupici durum pšenice (semolina)

Sadržaj	Semolina
Furozin (mg/100 g proteina)	7,32 \pm 1,30

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija (n = 3).

Hidalgo i Brandolini (2011) ispitivali su sadržaj furozina u različitim tipovima pšeničnog brašna, odnosno brašna od tvrde durum pšenice (Creso), meke pšenice (Blasco, Pagani i Eureka), kao i einkorn pšenice (Monlis, Sal9830 i L92). Dobijene vrednosti za sadržaj furozina kod navedenih sorti pšenice kretale su se od 3,5 do 14,8 mg/100 g proteina. Brašna od einkorn, odnosno jednozrne pšenice, pokazala su mali sadržaj furozina (u proseku 5,5 \pm 1,32 mg/100 g

proteina), dok su brašna od poliploidne pšenice pokazala šire varijacije i više srednje vrednosti (brašna od meke pšenica - $7,7 \pm 4,41$ mg/100 g proteina; Creso - $12,5 \pm 2,06$ mg/100 g proteina). Guerra-Hernandez i sar. (1999) su odredili sadržaj furozina od 13,7 mg/100 g proteina u pšeničnom brašnu koje se koristi za pripremu hrane za bebe, dok istraživanje Resmini i Pellegrino (1990) ukazuje na niže vrednosti furozina, i to 1-3 mg/100 g proteina za brašno od meke pšenice i 3-9 mg/100 g proteina za brašno od tvrde durum pšenice. Navedene razlike se mogu pripisati uslovima sušenja, mlevenja i skladištenja brašna, što naglašavaju i visoke vrednosti furozina brašna meke pšenice čija su zrna prethodno sušena na 60-141 °C (oko 48 mg/100 g proteina) (Rufian-Henares i sar. 2009).

5.4.3. Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u nekuvanoj i kuvanoj testenini

Supstitucija dela semoline inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe, uopšteno gledano, doprinela je značajnom ($p < 0,05$) povećanju sadržaja ispitivanih bioaktivnih jedinjenja, karotenoida i tokoferola. Povećanje sadržaja navedenih jedinjenja pratio je trend povećanja udela inkapsulata u formulaciji testenine (tabela 28).

Sadržaj ukupnih karotenoida iznosio je 6,09 i 6,38 mg/kg za uzorke nekuvane testenine sa udelom inkapsulata od 10%, što predstavlja 56,15%, odnosno 63,59% veći sadržaj karotenoida u odnosu na kontrolni uzorak. Sa druge strane, za udeo inkapsulata od 20% u formulaciji testenine određen je sadržaj karotenoida od 7,77 i 8,53 mg/kg, odnosno 99,23% i 118,72% veći sadržaj u odnosu na kontrolni uzorak testenine. Takođe, ukoliko se uporedi sadržaj karotenoida sa stanovišta dodatih inkapsulata u formulaciju testenine, supstitucija semoline sa FDI inkapsulatom rezultirala je višim vrednostima u oba slučaja. Ovakav rezultat je i očekivan, s obzirom da je viši sadržaj karotenoida određen upravo za ovu vrstu inkapsulata.

Lutein i zeaksantin su prisutni u svim uzorcima testenine, a potiču iz osnovne sirovine za njihovu proizvodnju - semoline. Supstitucija dela semoline FDI i SDI inkapsulatima obezbedila je da se u proizvedenoj testenini detektuju i karotenoidi koji nisu prisutni u kontrolnom uzorku. U obogaćenoj testenini FDI i SDI inkapsulatima, uvećan sadržaj karotenoida posledica je prisustva inkapsuliranog ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe, bogatog pre svega β -karotenom, α -karotenom i *cis*- β -karotenom. Takođe, sadržaj ksantofila, luteina i zeaksantina, u uzorcima proizvedene testenine u direktnoj je vezi sa nivoom supstitucije semoline, te se uočava

trend smanjenja sadržaja ovih jedinjenja uključivanjem inkapsulata kao funkcionalnog dodatka u formulaciju.

Tabela 28. Sadržaj karotenoida (mg/kg) i tokoferola (mg/kg) u nekuvanim uzorcima testenine; Testenina na bazi semoline (kontrola), testenina na bazi semoline obogaćena sa 10 i 20% optimalnih inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* tehnikom (10% FDI; 20% FDI) i *spray drying* tehnikom (10% SDI; 20% SDI)

Sadržaj	Kontrola	10% FDI	20% FDI	10% SDI	20% SDI
Karotenoidi (mg/kg)					
α-karoten	nd ^a	0,74 ± 0,01 ^c	1,24 ± 0,05 ^c	0,58 ± 0,01 ^b	1,00 ± 0,09 ^d
β-karoten	nd ^a	1,71 ± 0,05 ^c	3,29 ± 0,25 ^c	1,43 ± 0,00 ^b	2,67 ± 0,31 ^d
cis-β-karoten	nd ^a	0,62 ± 0,05 ^b	1,11 ± 0,01 ^c	0,51 ± 0,04 ^b	1,05 ± 0,12 ^c
Lutein	3,61 ± 0,41 ^d	3,17 ± 0,05 ^b	2,78 ± 0,14 ^a	3,38 ± 0,21 ^c	2,92 ± 0,04 ^a
Zeaksantin	0,29 ± 0,10 ^d	0,14 ± 0,03 ^b	0,12 ± 0,01 ^a	0,19 ± 0,02 ^c	0,14 ± 0,03 ^b
Ukupan sadržaj karotenoida	3,90 ± 0,31^a	6,38 ± 0,03^b	8,53 ± 0,44^d	6,09 ± 0,40^b	7,77 ± 0,59^c
Tokoferoli (mg/kg)					
α-tokoferol	3,91 ± 0,26 ^a	18,55 ± 0,57 ^b	40,50 ± 0,20 ^d	20,13 ± 0,51 ^c	36,89 ± 1,00 ^c
β-tokoferol	2,54 ± 0,42 ^a	4,50 ± 0,06 ^b	4,97 ± 0,79 ^b	3,17 ± 0,30 ^a	4,87 ± 0,40 ^b
γ-tokoferol	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a
α-tokotrienol	3,67 ± 0,32 ^c	2,38 ± 0,13 ^{ab}	2,38 ± 0,10 ^b	2,80 ± 0,00 ^{ab}	2,23 ± 0,07 ^a
β-tokotrienol	23,44 ± 1,46 ^b	19,07 ± 0,30 ^a	19,37 ± 0,43 ^a	20,43 ± 0,47 ^a	19,34 ± 0,38 ^a
Ukupan sadržaj tokoferola	33,56 ± 1,81^a	44,50 ± 0,69^b	67,22 ± 1,12^c	46,53 ± 0,68^b	63,34 ± 1,04^c

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($P < 0,05$) razlikuju;

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 3$).

Obogaćivanje testenine sa 10% FDI, odnosno 10% SDI rezultiralo je povećanjem sadržaja ukupnih tokoferola za 32,62%, odnosno 38,65% u odnosu na kontrolni uzorak, dok je sa udelom ovih inkapsulata u nivou od 20% sadržaj ukupnih tokoferola povećan za 100,29%,

odnosno 88,74% (tabela 28). Ovom porastu najviše su doprineli α - i β -tokoferol iz inkapsuliranog uljanog ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe.

U naučnoj literaturi postoje brojna istraživanja koja su se bavila ispitivanjem uticaja različitih aditiva biljnog porekla na povećanje sadržaja prehrambenih vlakana, minerala, vitamina i antioksidanata u testeničarskim proizvodima.

Adengunwa i sar. (2012) su pripremali nudle obogaćene osušenom i sprasenom šargarepom u nivou od 10%, a ukupan sadržaj karotenoida iznosio je 1,8 mg/100 g nudli. Isti autori su izvestili da su očekivane vrednosti sadržaja karotenoida bile znatno veće, kao i to da je degradiranje ovih jedinjenja posledica procesnih parametara proizvodnje nudli.

Dalla Costa i sar. (2016) su ispitivali uticaj supstitucije dela brašna meke pšenice (*T. aestivum*) brašnom sporednog proizvoda prerade šargarepe u formulaciji testenine, na povećanje sadržaja pojedinačnih i ukupnih karotenoida. U navedenim uzorcima identifikovani su lutein, zeaksantin, kriptoksantin, α -karoten, β -karoten i retinol, koji potiču iz brašna sporednog proizvoda prerade šargarepe, s obzirom da u kontrolnom uzorku testenine nisu detektovani karotenoidi. Sadržaj ukupnih karotenoida u nekuvanim uzorcima kretao se od 87,25 μ g/100 g testenine za udeo brašna sporednog proizvoda prerade šargarepe od 10%, do 172,82 μ g/100 g testenine za udeo od 20%.

Padalino i sar. (2017) ispitivali su uticaj dodatka ljuske paradajza na povećanje sadržaja karotenoida i dijetetskih vlakana u špagetama. Njihovi rezultati su pokazali da se sadržaj likopena povećao od 0,032 mg/100 g špageta (kontrola) do 1,12 mg/100 g špageta (špagete sa 15% brašna ljuske paradajza), dok se sadržaj β -karotena povećao od 4,04 mg/100 g špageta (kontrola) do 13,36 mg/100 g špageta (špagete sa 15% brašna ljuske paradajza).

Lucas-Gonzales i sar. (2020) pratili su povećanje ukupnog sadržaja karotenoida u špagetama proizvedenim supstitucijom dela semoline brašnom sporednog proizvoda japanske jabuke, koji zaostaje nakon ceđenja soka. Ukupan sadržaj karotenoida, izražen kao mg α -karotena/100 g špageta, kretao se od 1,37 (kontrola) do 4,49 za udeo brašna sporednog proizvoda japanske jabuke od 6%. Iako u ovoj studiji nisu određivani pojedinačni karotenoidi, navedeni autori smatraju da povećanju ukupnog sadržaja karotenoida doprinose β -kriptoksantin i β -karoten iz japanske jabuke.

Iako se radi o malom broju, u istraživanjima novijih datuma mogu se pronaći i primeri testenine obogaćene inkapsuliranim bioaktivnim jedinjenjima, što ukazuje da je prehrambenoj

industriji finalni kvalitet funkcionalnog proizvoda, i obezbeđivanje niza prednosti uslovljene inkapsulacionim tehnikama, od izuzetne važnosti.

Primer jedne takve studije predstavljena je od strane Durante i sar. (2019) koji su ispitivali dodatak ulja bundeve ili inkapsuliranog ulja bundeve sa α -ciklodekstrinom u formulaciju špageta, i dobili proizvode sa povećanim sadržajem fitosterola, skvalena, karotenoida, tokoferola i nezasićenih masnih kiselina. Inkorporiranjem inkapsuliranog ulja bundeve povećao se sadržaj prehrambenih vlakana u ovoj vrsti testenine, kao i stabilnost navedenih bioaktivnih jedinjenja tokom procesa proizvodnje.

Sa druge strane, Zen i sar. (2019) su ispitivali mogućnost proizvodnje zelene testenine, dodatkom inkapsulirane spiruline osnovnoj formulaciji proizvoda. Inkapsulacija je i u ovom radu potvrdila pozitivan uticaj na zaštitu antioksidativnog kapaciteta mikroalgi, a sa tim i njihovu potencijalnu primenu kao aditiva u funkcionalnoj hrani.

Kuvanje testenine dovelo je do sniženja sadržaja bioaktivnih jedinjenja, a dobijeni profil za sve ispitivane uzorke prikazan je u tabeli 29. Takođe, radi boljeg sagledavanja potencijalne primene inkapsulata dobijenih različitim tehnikama sušenja u proizvodnji testenine sa poboljšanim nutritivnim i funkcionalnim karakteristikama, rezultati su izraženi i kao procenat smanjenja, odnosno gubitka karotenoida i tokoferola nakon kuvanja (slika 36). Na osnovu prikazanih rezultata mogu se uočiti značajno veći gubici karotenoida u uzorcima testenine sa FDI inkapsulatima (22,49% za 10% FDI testeninu i 18,40% za 20% FDI testeninu), u odnosu na uzorke obogaćene sa SDI inkapsulatima (2,30% za 10% SDI testeninu i 11,84% za 20% SDI testeninu). S obzirom da je u prethodnom poglavlju navedeno da inkapsulat dobijen *freeze drying* tehnikom (FDI) poseduje veći sadržaj površinski vezanih karotenoida od inkapsulata koji je dobijen *spray drying* tehnikom (SDI), može se objasniti njihovo lakše otpuštanje tokom kuvanja testenine, a samim tim i krajnji procenat gubitka ovih jedinjenja. Kada je reč o tokoferolima, zabeležen je gubitak od 3,91 i 7,46% za 10% SDI i 10% FDI testeninu, dok su za 20% SDI i 20% FDI testeninu ove vrednosti bile veće, odnosno 12,17 i 11,23%.

U studiji Durante i sar. (2019), nakon kuvanja testenine obogaćene liofiliziranim inkapsulatima ulja bundeve i α -ciklodekstrina takođe je zabeležen gubitak karotenoida od 23,08%, dok je sadržaj tokoferola ostao nepromenjen. Sa druge strane, Tainara de Moares i sar. (2015) su ispitivali mogućnost obogaćivanja testenine osušenim sporednim proizvodom prerade pomorandže, prateći funkcionalne i tehnološke karakteristike proizvoda. Značajno veći gubici

karotenoida su zabaleženi nakon kuvanja ovih uzoraka, odnosno od 77,21 do 82,22%, u zavisnosti od udela osušenog funkcionalnog dodatka. Iz navedenih rezultata može se jasno videti značaj inkapsulacije bioaktivnih jedinjenja pre inkorporiranja u proizvode koji se podvrgavaju termičkoj obradi.

Tabela 29. Sadržaj karotenoida (mg/kg) i tokoferola (mg/kg) u kuvanim uzorcima testenine; Testenina na bazi semoline (kontrola), testenina na bazi semoline obogaćena sa 10 i 20% optimalnih inkapsulata sporednog proizvod prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* tehnikom (10% FDI; 20% FDI) i *spray drying* tehnikom (10% SDI; 20% SDI)

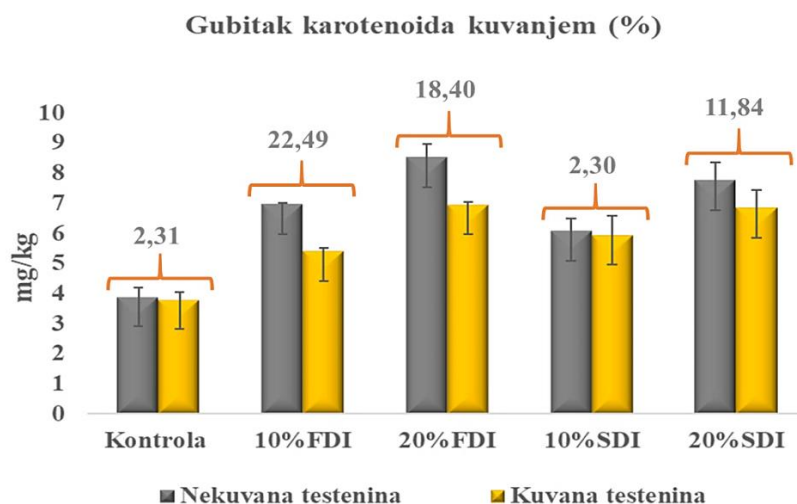
Sadržaj	Kontrola	10% FDI	20% FDI	10% SDI	20% SDI
Karotenoidi (mg/kg)					
α-karoten	nd ^a	0,50 ± 0,01 ^b	0,86 ± 0,06 ^c	0,56 ± 0,05 ^b	0,80 ± 0,13 ^c
β-karoten	nd ^a	1,17 ± 0,00 ^b	2,28 ± 0,30 ^c	1,37 ± 0,20 ^b	2,13 ± 0,16 ^c
cis-β-karoten	nd ^a	0,52 ± 0,03 ^b	1,04 ± 0,10 ^c	0,46 ± 0,02 ^b	0,94 ± 0,08 ^c
Lutein	3,63 ± 0,22 ^c	3,08 ± 0,07 ^{abc}	2,66 ± 0,20 ^a	3,41 ± 0,33 ^{bc}	2,85 ± 0,19 ^{ab}
Zeaksantin	0,18 ± 0,01 ^d	0,13 ± 0,02 ^b	0,12 ± 0,02 ^a	0,16 ± 0,01 ^c	0,12 ± 0,02 ^a
Ukupan sadržaj karotenoida	3,81 ± 0,23^a	5,41 ± 0,09^b	6,96 ± 0,67^c	5,95 ± 0,62^b	6,85 ± 0,59^c
Tokoferoli (mg/kg)					
α-tokoferol	2,92 ± 0,09 ^a	16,91 ± 1,88 ^b	31,79 ± 1,28 ^c	19,31 ± 0,07 ^b	32,99 ± 2,34 ^c
β-tokoferol	2,67 ± 1,55 ^a	2,63 ± 0,17 ^a	4,00 ± 0,74 ^b	2,44 ± 0,05 ^a	2,59 ± 0,61 ^a
γ-tokoferol	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a
α-tokotrienol	2,97 ± 0,11 ^b	2,25 ± 0,27 ^a	1,91 ± 0,04 ^a	2,72 ± 0,08 ^b	2,02 ± 0,24 ^a
β-tokotrienol	21,41 ± 0,97 ^c	19,40 ± 0,34 ^{ab}	19,28 ± 0,27 ^{ab}	20,25 ± 0,02 ^{ab}	18,03 ± 0,47 ^a
Ukupan sadržaj tokoferola	29,97 ± 0,38^a	41,18 ± 1,97^b	59,67 ± 1,71^c	44,71 ± 0,22^b	55,63 ± 2,43^c

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($P < 0,05$) razlikuju;

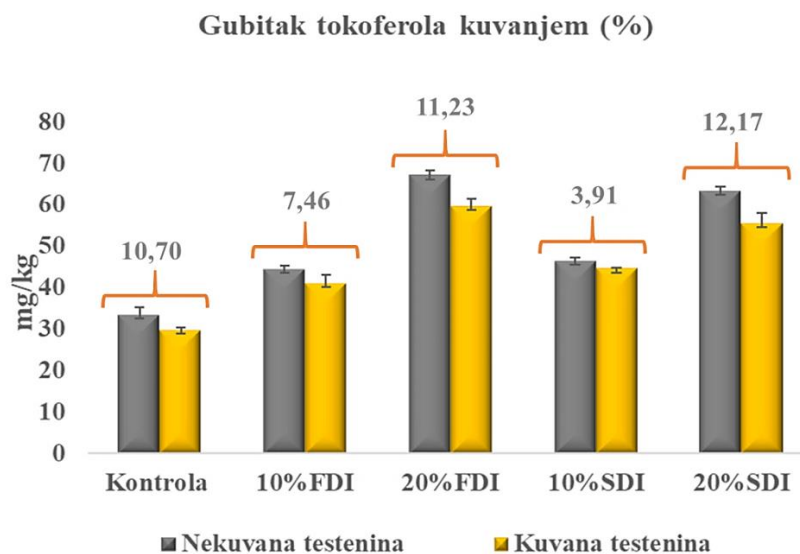
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 3$).

Na osnovu prikazanog profila iz tabele 29, može se zaključiti da kuvani uzorci testenine obogaćeni sa 10% FDI sadrže 41,99% više karotenoida i 37,40% više tokoferola u odnosu na kontrolni uzorak, dok kuvana 10% SDI testenina sadrži 56,17% više karotenoida i 49,18% više tokoferola. Što se tiče kuvane 20% FDI testenine, sadržaji karotenoida i tokoferola su viši za 82,68% i 99,10%, a kod kuvane 20% SDI testenine zabeleženi su viši sadržaji ovih jedinjenja za 79,79% i 85,62% u odnosu na kontrolni uzorak testenine.

a)



b)



Slika 35. Gubitak a) karotenoida i b) tokoferola kuvanjem testenine

5.4.4. Sadržaj furozina u nekuvanoj testenini

Uprkos niskom sadržaju furozina u semolini, nakon proizvodnje kontrolne testenine, njegov sadržaj se povećao na 75,61 mg/100 g proteina (tabela 30). Prema Brandoini i sar. (2018), prisustvo furozina u suvoj testenini je dokumentovano od strane brojnih istraživača, kao i to da se njegov sadržaj može dovesti u vezu sa uslovima sušenja proizvoda. Međutim, sa povećanjem udela optimalnih inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe zapaža se i povećanje sadržaja furozina u ispitivanim uzorcima testenine. Uzorci obogaćeni SDI inkapsulatom pokazali su niži sadržaj furozina (10% SDI=220,00 mg/100 g proteina; 20% SDI=386,62 mg/100 g proteina) u odnosu na testeninu obogaćenu FDI inkapsulatom (10% FDI=304,01 mg/100 g proteina; 20% FDI=425,53 mg/100 g proteina). Kao što je slučaj sa samim inkapsulatima, ovo povećanje količine furozina kod uzoraka obogaćenih FDI inkapsulatom objašnjava se povećanjem sadržaja proteina koji potiču od nosača primenjenog za inkapsulaciju karotenoida. Rezultati ispitivanja Gallegos-Infante i sar. (2010) takođe potvrđuju povećanje sadržaja furozina u pasti nakon dodatka brašna od pasulja. Giannetti i sar. (2013) su prijavili sadržaj furozina u opsegu od 45 do 209 mg/100 g proteina u uzorcima domaće testenine, dok je u uzorcima industrijski proizvedene testenine sadržaj furozina dostigao vrednosti od 390 do 562 mg/100 g proteina. Ovi rezultati se slažu i sa rezultatima drugih autora (Tirelli, 1998; De Noni i Pagani, 2010) koji su korelirali koncentracije furozina u rasponu od 400 do 700 mg/100 g proteina sa visokim uslovima sušenja testenine (> 75 °C).

Tabela 30. Sadržaj furozina u nekuvanim uzorcima testenine na bazi semoline (kontrola), testenine na bazi semoline obogaćene sa 10 i 20% optimalnih inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* tehnikom (10% FDI; 20% FDI) i *spray drying* tehnikom (10% SDI; 20% SDI)

Sadržaj	Kontrola	10% FDI	20% FDI	10% SDI	20% SDI
Furozin (mg/100 g)					
	75,61 ± 8,50 ^a	304,01 ± 12,50 ^c	425,53 ± 16,32 ^e	220,00 ± 17,65 ^b	386,62 ± 4,66 ^d

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($P < 0,05$) razlikuju;

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 3$).

5.4.5. Antioksidativna i farmakološka aktivnost kuvane testenine

U tabeli 31 prikazana je bioaktivnost kuvanih uzoraka testenine na bazi semoline (kontrola) i testenine na bazi semoline obogaćene inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe. Bioaktivnost je određena kroz različite testove nakon što su uzorci bili podvrgnuti *in vitro* simuliranoj gastrointestinalnoj digestiji, pri čemu su definisana antioksidativna, antihiperglikemijska i antiinflamatorna svojstva testenine.

Tabela 31. Antioksidativna i farmakološka aktivnost kuvanih i digestiranih uzoraka testenine; Testenina na bazi semoline (kontrola), testenina na bazi semoline obogaćena sa 10 i 20% optimalnih inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* tehnikom (10% FDI; 20% FDI) i *spray drying* tehnikom (10% SDI; 20% SDI)

Aktivnost	Kontrola	10% FDI	20% FDI	10% SDI	20% SDI
Antioksidativna aktivnost ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$)					
β-karoten metoda (AA_{BCB})	9,78 \pm 1,31 ^a	19,89 \pm 0,69 ^c	26,33 \pm 0,12 ^c	17,70 \pm 0,27 ^b	24,79 \pm 0,07 ^d
Redukciona sposobnost (RP)	4,84 \pm 0,03 ^a	6,23 \pm 0,36 ^c	8,61 \pm 0,04 ^c	5,91 \pm 0,19 ^b	7,11 \pm 0,02 ^d
Farmakološka aktivnost (% inhibicije)					
Antihiperglikemijska aktivnost (AHgA)	16,15 \pm 0,58 ^a	20,03 \pm 0,11 ^c	26,60 \pm 0,63 ^c	17,36 \pm 0,98 ^b	23,97 \pm 0,04 ^d
Antiinfamatorna aktivnost (AIA)	10,12 \pm 0,97 ^a	19,75 \pm 0,23 ^c	25,41 \pm 0,15 ^d	13,66 \pm 1,06 ^b	20,01 \pm 0,31 ^c

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($P < 0,05$) razlikuju;

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija ($n = 3$).

Prema svim ispitivanim parametrima antioksidativne, farmakološke i antiproliferativne aktivnosti, dodatkom inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe u formulaciju testenine postignut je značajan pomak u funkcionalnim svojstvima u odnosu na kontrolni uzorak. Antioksidativna aktivnost kontrolne testenine (AA_{BCB}=9,78 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$; RP=4,84 μmol

TE/100 g) dostigla je veće vrednosti nakon obogaćivanja formulacije sa 10 i 20% FDI (AA_{BCB} od 19,89 i 26,33 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$; RP od 6,23 i 8,61 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$) kao i sa 10 i 20% SDI (AA_{BCB} od 17,70 i 24,79 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$; RP od 5,91 i 7,11 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$). Povećanje antioksidativne aktivnosti testenine nakon obogaćivanja testenine lipofilnim antioksidantima, kao što su karotenoidi i tokoferoli potvrđeno je i u radovima Durante i sar. (2019), Laus i sar. (2017) i Padalino i sar. (2017). Potencijal ispitivanih uzoraka da inhibiraju α -glukozidazu raste sa nivoom supstitucije semoline FDI i SDI inkapsulatima, a najveća aktivnost je primećena kod 20% FDI testenine (26,60%), a potom 20% SDI (23,97%). Antiinflamatorna aktivnost takođe prati trend povećanja udela inkapsulata u testenini, a najviše zabeležene vrednosti su 25,41% (20% FDI) i 20,01% (20% SDI).

Kako u ovom slučaju bioaktivnost zavisi od apsorpcije lipofilnih nutrijenata, odnosno karotenoida i tokoferola, neophodno je njihovo oslobađanje iz matrice hrane, a potom prenos u emulgovane kapljice masti u želucu i njihovo naknadno uključivanje u mešane micelle zajedno sa proizvodima lipolize u tankom crevu. Micelarizacija je proces koji zavisi od adekvatne sekrecije žuči i pankreasa, jer se mešane micelle formiraju delovanjem soli žučnih kiselina, fosfolipida i produkata hidrolize prehrambenih proizvoda. Poslednjih godina sprovedena su mnoga istraživanja na temu biodostupnosti karotenoida i tokoferola iz voća i povrća, a sa druge strane, zabeležen je veoma mali broj ovih istraživanja za jedinjenja kao što su tokoferoli. Trenutni fokus naučnih istraživanja je proširivanje znanja o biološkoj dostupnosti ovih jedinjenja iz proizvoda na bazi žita, gde se svrstava između ostalog i testenina. Dosadašnja saznanja sugerišu lošiju biodostupnost karotenoida i tokoferola iz testenine u poređenju sa voćem i povrćem, što je posledica njihovog uključivanja u složenu mrežu proteina i skroba. U navedenim studijama preovlađuje mišljenje da ksantofili (lutein i zeaksantin), prisutni u testenini na bazi durum pšenice, imaju veću biodostupnost od karotena i tokoferola, s obzirom da predstavljaju jedinjenja sa -OH grupama koje doprinose njihovoj solubilizaciji na površini fosfolipidnih kapljica masti a time i olakšanom prenosu u same micelle. Međutim, prema Werner i Bohm (2011) izvesna količina karotenoida oslobađa se iz matrice hrane enzimima mikroflora debelog creva, što ih čini dostupnim za apsorpciju u ovom delu digestivnog trakta. Pored toga, dokazano je i da neapsorbovani karotenoidi i tokoferoli mogu imati važnu ulogu u zaštiti samog gastrointestinalnog trakta od oksidativnih oštećenja, čime se smanjuje učestalost upale i pojave kancera (Halliwell i sar. 2000).

5.4.6. Mikrobiološki profil testenine

U tabeli 32 prikazani su rezultati mikrobiološkog profila ispitivanih uzoraka testenine. Kontrolni uzorak, kao i uzorci testenine sa inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe, sa mikrobiološkog stanovišta su bezbedni za konzumiranje.

Tabela 32. Mikrobiološki profil testenine

Parametar	Kontrola	10% FDI	20% FDI	10% SDI	20% SDI
Aerobne sporogene bakterije (log CFU/g) ¹	1,20	1,20	1,30	1,00	1,40
Enterobacteriaceae (log CFU/g) ²	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
<i>Staphylococcus aureus</i> (log CFU/g) ¹	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
<i>Salmonella</i> spp. (d/nd) ³ u 25 g	nd	nd	nd	nd	nd
Kvasci i plesni (log CFU/g)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

¹ Dozvoljena vrednost je do 2 log CFU/g; ² Dozvoljena vrednost je do 1 log CFU/g; ³ ne sme biti detektovan; nd – nije detektovana

Utvrđen broj aerobnih sporogenih bakterija u ispitivanim uzorcima je ispod 2 log CFU/g, što je u okviru propisanih granica za ovu vrstu prehrambenog proizvoda, preporučenim od strane vodiča za mikrobiološke kriterijume za hranu (2011). Mikroorganizmi kao što su Enterobacteriaceae i *Staphylococcus aureus* bili su ispod granice detekcije, a *Salmonella* nije detektovana u ispitivanim uzorcima testenine. S obzirom na to da je *Salmonella* spp. patogen koji se prenosi hranom, a *Staphylococcus aureus* je sastavni deo normalne flore ljudske kože, nosa i sluznice, može se zaključiti da je tokom procesa proizvodnje testenine ostvaren odgovarajući nivo higijene. Takođe, na osnovu prikazanih rezultata ne mogu se uočiti značajne razlike u broju ispitivanih mikroorganizma između kontrolnog uzorka testenine i testenine obogaćene FDI i SDI

inkapsulatima. Može se zaključiti da uključivanje inkapsulata kao funkcionalnih dodataka u formulaciju testenine ne utiče na promene mikrobiološkog profila iste.

5.4.7. Boja nekuvane i kuvane testenine

Rezultati određivanja parametara boje nekuvanih uzoraka testenine prikazani su u tabeli 33. Uključivanje inkapsuliranog ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe u formulaciju testenine rezultiralo je dobijanjem proizvoda sa većim udelom crvene boje (veće vrednosti a^*) i većim udelom žute boje (veće vrednosti b^*) u odnosu na kontrolni uzorak. Promene u boji testenine nastale dodatkom ovih inkapsulata odražavaju sastav karotenoida u sporednom proizvodu prerade šargarepe. Vrednost parametra b^* kontrolnog uzorka ($b^*=36,88$) sugeriše na žute tonove testenine, koji su posledica prisutnih ksantofila u semolini. Dodatkom FDI inkapsulata u formulaciju testenine, za nivo supstitucije od 10%, odnosno 20% zabeležene su vrednosti parametra b^* od 39,50, odnosno 44,95. Isti trend je primećen i za parametar a^* , koji je za navedene uzorke iznosio 0,44 (10% FDI) i 2,63 (20% FDI). Sa druge strane, dodatkom SDI inkapsulata nije uočen trend rasta vrednosti parametra b^* u odnosu na kontrolni uzorak testenine: $b^*=34,46$ (10% SDI) i $b^*=36,84$ (20% SDI), dok je parametar a^* pokazao više vrednosti: $a^*=0,11$ (10% SDI) i $a^*=1,73$ (20% SDI). Ovakav rezultat posledica je niskog intenziteta žute boje ove vrste inkapsulata, što je posledica *spray drying* tehnike sušenja i manje veličine čestica.

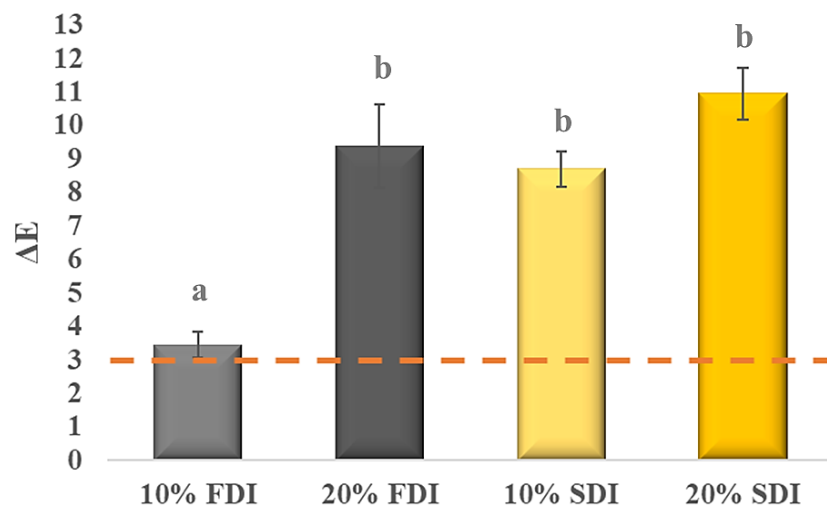
Razlika u boji testenina dobijenih supstitucijom dela semoline inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe se dobro vidi i golim okom, o čemu svedoče vrednosti za parametar ΔE ($\Delta E > 3$ za sve ispitivane uzorke; slika 37) (Schläpfer, 2002).

Tabela 33. Boja nekuvanih uzoraka testenine

CIE Lab	Kontrola	10% FDI	20% FDI	10% SDI	20% SDI
L*	56,97 ± 0,82 ^a	58,42 ± 0,84 ^{ab}	59,53 ± 2,46 ^b	65,21 ± 1,39 ^c	67,20 ± 1,86 ^c
a*	-1,26 ± 0,35 ^a	0,44 ± 0,25 ^b	2,63 ± 0,37 ^d	0,11 ± 0,21 ^b	1,73 ± 0,50 ^c
b*	36,88 ± 1,36 ^b	39,50 ± 0,90 ^c	44,95 ± 2,28 ^d	34,46 ± 1,35 ^a	36,84 ± 1,51 ^b

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($P < 0,05$) razlikuju;

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 10$).



Slika 36. Ukupna razlika boje ΔE nekuvane testenine na bazi semoline obogaćene sa 10 i 20% optimalnih inkapsulata sporednog proizvoda prerađene šargarepe dobijenih *freeze drying* tehnikom (10% FDI; 20% FDI) i *spray drying* tehnikom (10% SDI; 20% SDI) u odnosu na kontrolni uzorak

Stubići označeni različitim slovima statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija ($n = 10$)

Proces kuvanja testenine značajno je uticao na povećanje svetloće ispitivanih uzoraka (L^*), ali i na smanjenje intenziteta crvenih (a^*) i žutih tonova (b^*). Rezultati određivanja parametara boje kuvanih uzoraka testenine prikazani su u tabeli 34.

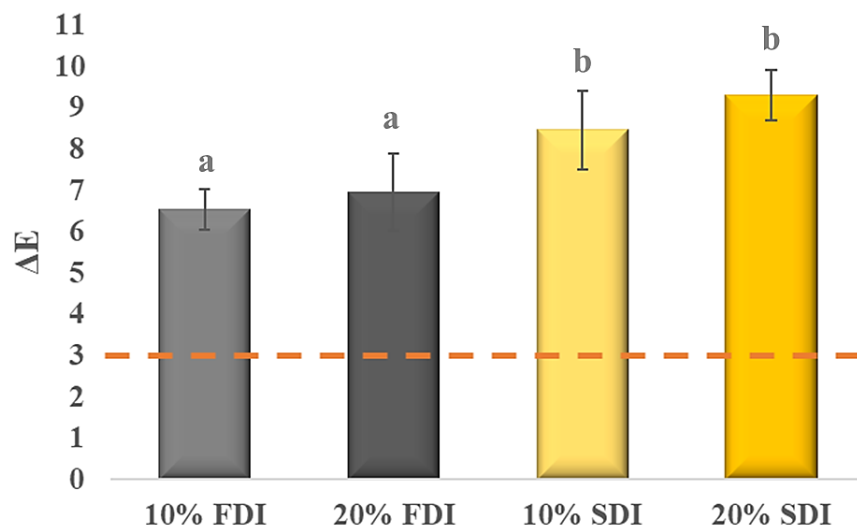
Tabela 34. Boja kuvanih uzoraka testenine

CIE Lab	Kontrola	10%FDI	20%FDI	10%SDI	20%SDI
L*	74,86 \pm 1,54 ^a	76,79 \pm 1,27 ^b	76,80 \pm 1,54 ^b	75,31 \pm 1,31 ^{ab}	76,81 \pm 1,49 ^b
a*	-4,85 \pm 0,14 ^a	-3,46 \pm 0,20 ^b	-0,99 \pm 0,41 ^c	-3,82 \pm 0,25 ^b	-1,34 \pm 0,63 ^c
b*	24,06 \pm 2,10 ^a	24,79 \pm 1,66 ^a	27,81 \pm 1,21 ^b	30,32 \pm 2,54 ^c	30,75 \pm 1,73 ^c

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($P < 0,05$) razlikuju;

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija ($n = 10$).

Razlika u boji kuvanih uzoraka testenine obogaćene inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe u odnosu na kontrolni uzorak, takođe je vidljiva golim okom ($\Delta E > 3$), što se može videti iz priloženih rezultata na slici 38.



Slika 37. Ukupna razlika boje ΔE kuvane testenine na bazi semoline obogaćene sa 10 i 20% optimalnih inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* tehnikom (10% FDI; 20% FDI) i *spray drying* tehnikom (10% SDI; 20% SDI) u odnosu na kontrolni uzorak

Stubići označeni različitim slovima statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija ($n = 10$)

5.4.8. Kvalitet kuvane testenine

Tokom kuvanja testenine dolazi do formiranja kompleksne porozne strukture proteinske mreže sa zarobljenim granulama skroba, koja kao takva omogućava razmenu čvrstih materija i vode. Važno je istaći da se apsorpcija vode od strane proteina i skroba ne odvija istom brzinom, kao i to da dominacija jednog od ova dva fenomena definiše ponašanje testenine tokom kuvanja i njen finalni kvalitet. Naime, hidratacija proteina započinje u kontaktu sa vodom, pri čemu dolazi do povećanja zapremine i naprežanja testenine, kao i stvaranja pukotina na površini i u unutrašnjosti testenine. Apsorpcija vode kroz proteinski matriks stvara difuzioni gradijent, koji se formira od površine ka centralnom delu testenine, a tokom njegovog nastanka dolazi do

bubrenja i želatinizacije skroba (Škrobot, 2016). U slučaju kada je fenomen koagulacije proteina dominantan, kao rezultat nastaje snažan proteinski matriks sa inkorporiranim granulama skroba kroz koji voda sporo prodire i želatinizacija se odvija postepeno. Kao rezultat dobija se testenina vrlo dobrog kvaliteta. Sa druge strane, ukoliko se bubrenje i solubilizacija skroba odvijaju brže, amiloza će se osloboditi u vodu od kuvanja, a amilopektin će zaostati na površini testenine i povećaće njenu lepljivost. U ovom slučaju, kao rezultat se dobija testenina lošeg kvaliteta (Bustos i sar. 2015; Škrobot, 2016).

Na tehnološki kvalitet testenine u najvećoj meri utiču kvalitet osnovne sirovine, dodatak drugih sirovina i procesni parametri. S obzirom da je jedan od ciljeva doktorske disertacije definisanje nivoa supstitucije semoline inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe u odnosu na tehnološki kvalitet finalnog proizvoda, procenjeni su parametri koji definišu kvalitet kuvane testenine. U tu svrhu određeni su pre svega optimalno vreme kuvanja, procenat raskuvavanja, koeficijent povećanje zapremine, količina apsorbirane vode i lepljivost (tabela 35).

Na osnovu prikazanih rezultata iz tabele 35, primećuje se da se optimalno vreme kuvanja testenine povećalo usled dodatka inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe u formulaciju testenine sa 13 minuta na 14, odnosno 15 minuta, u zavisnosti od primenjenog nivoa supstitucije. Može se zaključiti da je povećanje optimalnog vremena kuvanja testenine u direktoj vezi sa povećanjem sadržaja proteina u ispitivanim uzorcima. Kaur i sar. (2012) objavili su slična zapažanja o uticaju dodatih proteina iz biljnih izvora u formulaciju testenine na produžetak optimalnog vremena kuvanja. Oh i sar. (1985) su takođe potvrdili da se optimalno vreme kuvanja nudli linearno povećava sa sadržajem proteina. Obogaćivanje formulacije testenine proteinima jestivih insekata, kao što su popci, takođe je rezultiralo povećanjem optimalnog vremena kuvanja za +1 minut, u zavisnosti od nivoa supstitucije proteinskim prahom (Duda i sar. 2019).

Procenat raskuvavanja testenine svrstava se među važne parametre za definisanje njenog kvaliteta, a ukazuje na gubitak čvrste materije tokom kuvanja testenine. Udeo inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe pokazao se kao značajan faktor pri određivanju gubitka čvrste materije tokom kuvanja. Prema Larrosa i sar. (2016) manji gubitak čvrste materije tokom kuvanja ukazuje na bolji kvaitet testenine. Naime, Bustos i sar. (2011) smatraju da je testenina od krupice durum pšenice zadovoljavajućeg kvaliteta ukoliko gubici čvrste materije prilikom kuvanja nisu veći od 7-8%, pa se može zaključiti da su ispitivani uzorci testenine prihvatljivi sa

stanovišta ovog parametra (3,50-4,61%). Pagani i sar. (1989) su zaključili da kvalitet i količina proteina utiču na formiranje kompaktnije mreže proteina koja bolje zadržava čvrste materije tokom kuvanja. Manji procenat raskuvavanja obogaćene testenine na bazi semoline su odredili i sledeći autori: Fradique i sar. (2013) nakon supstitucije dela semoline (0,5, 1 i 2%) mikroalgama *Isochrysis galbana* i *Diacronema vlkianum*; Wood (2009) nakon supstitucije dela semoline (10, 15, 20, 25 i 30%) brašnom od leblebija; Li i sar. (2012) nakon supstitucije dela pšeničnog brašna sa visokim sadržajem proteina (1, 2 i 3%) zelenim čajem u prahu; Duda i sar. (2019) nakon supstitucije dela semoline (5, 10 i 15%) proteinima insekata

Tabela 35. Parametri kvaliteta kuvane testenine na bazi semoline obogaćene sa 10 i 20% optimalnih inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* tehnikom (10% FDI; 20% FDI) i *spray drying* tehnikom (10% SDI; 20% SDI) u odnosu na kontrolni uzorak

Parametar kvaliteta	Kontrola	10% FDI	20% FDI	10% SDI	20% SDI
Optimalno vreme kuvanja (min)	13 ^a	14 ^b	15 ^c	14 ^b	15 ^c
Procenat raskuvavanja (%)	4,61 ± 0,01 ^b	3,83 ± 0,11 ^a	4,44 ± 0,03 ^b	3,50 ± 0,12 ^a	4,21 ± 0,26 ^b
Koeficijent povećanja zapremine	3,00 ± 0,1 ^a	3,00 ± 0,1 ^a	3,00 ± 0,1 ^a	2,71 ± 0,1 ^b	2,86 ± 0,0 ^b
Apsorpcija vode (%)	144,1 ± 1,1 ^c	136,9 ± 1,6 ^b	137,3 ± 1,2 ^b	126,9 ± 1,3 ^a	128,6 ± 1,3 ^a
Lepljivost (g)	77,40 ± 9,04 ^c	3,16 ± 0,66 ^a	2,48 ± 0,15 ^a	41,90 ± 3,58 ^b	2,32 ± 0,38 ^a

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($P < 0,05$) razlikuju;

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 3$).

Prema Dick i Youngs (1988) zapremina visokokvalitetne tesenine se trostruko povećava nakon kuvanja. Vrednosti koeficijenta povećanja zapremine za ispitivane uzorke testenine kreću se od 2,7 (10% SDI) do 3 (kontrola, 10% FDI i 20% FDI), što ukazuje na zadovoljenje kriterijuma datog parametra kvaliteta.

Apsorpcija vode tokom kuvanja testenine u direktnoj je korelaciji sa bubrenjem i želatinizacijom skroba. Prema Bustos i sar. (2015) postavljeni kriterijumi za apsorpciju vode, koji se odnose na tradicionalnu durum testeninu, su u intervalu od 150-200 g/100 g testenine. Na osnovu prikazanih rezultata u tabeli 35 može se zaključiti da je apsorpcija vode proizvedenih uzoraka testenine ispod preporučenog opsega. Može se zaključiti i da se supstitucija semoline inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe pokazala kao statistički značajan parametar, pri čemu se uviđa pad indeksa apsorpcije vode kod svih obogaćenih uzoraka. Slična zapažanja objavili su Ramya i sar. (2015), Desai i sar. (2018), i Yousif i sar. (2003), uz objašnjenje da sa povećanjem sadržaja proteina i formirane proteinske mreže dolazi do smanjenja sadržaja i slabije dostupnosti skroba. Takođe, smanjenje apsorpcije vode za uzorke testenine obogaćene SDI inkapsulatom može se objasniti karakteristikama inulina, koji se pored proteina surutke nalazi u optimalnoj smeši nosača ekstrakta. Budući da je inulin izuzetno hidrofilan, smatra se da u konkurenciji sa skrobom poseduje veći afinitet vezivanja vode, što dalje rezultira smanjenjem bubrenja skroba (Tudorica i sar. 2002).

Još jedan parametar kvaliteta kuvane testenine koji predstavlja direktnu vezu sa udelom i želatinizacijom skroba, jeste lepljivost. Na osnovu prikazanih rezultata u tabeli 35 može se primetiti da je obogaćivanje testenine FDI i SDI inkapsulatima značajno doprinelo smanjenju lepljivosti, nezavisno od nivoa supstitucije semoline ovim inkapsulatima. Ispitujući teksturne osobine obogaćene testenine brašnom leblebija, Wood (2009) je ukazao da viši sadržaj proteina u formulaciji smanjuje lepljivost špageta. Prema Lamacchia i sar. (2007) formiranje snažne proteinske mreže sprečava prodiranje vode do granula skroba, njihovo ispiranje, te izlazak amiloze iz strukture, što direktno utiče na smanjenje lepljivosti testenine. Takođe, polazeći od činjenice da su navedeni inkapsulati nosači uljanog ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe, lipofilna priroda aktivnih materija može dodatno potkrepiti smanjenje lepljivosti obogaćenih uzoraka testenine.

5.4.9. Senzorska ocena testenine

Ukupna dopadljivost proizvoda, kao i dopadljivost pojedinačnih senzorskih svojstava, boja nekuvane testenine, ukus, aroma i tekstura kuvane testenine, ocenjeni su od strane panela polutreniranih ocenjivača (4 muškarca, 11 žena, starosti od 23 do 45 godina) uz primenu

hedonske skale sa 9 kategorija, pri čemu je 1 = izuzetno mi se ne dopada, 5 = niti mi se dopada, niti mi se ne dopada, 9 = izuzetno mi se dopada. Smatra se da testenina ima prihvatljiva senzorska svojstva za potrošače, ukoliko je srednja ocena ukupne prihvatljivosti veća od 5 (niti mi se dopada, niti mi se ne dopada). Rezultati testa dopadljivosti prikazani su u tabeli 36.

Tabela 36. Senzorska ocena testenine na bazi semoline obogaćene sa 10 i 20% optimalnih inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* tehnikom (10% FDI; 20% FDI) i *spray drying* tehnikom (10% SDI; 20% SDI) u odnosu na kontrolni uzorak.

Parametar	Kontrola	10% FDI	20% FDI	10% SDI	20% SDI
Ukupna dopadljivost	6,86 ± 1,35 ^b	7,43 ± 0,79 ^b	2,86 ± 1,58 ^a	6,29 ± 1,60 ^b	1,86 ± 0,90 ^a
Boja nekuvane testenine	7,14 ± 0,69 ^{cd}	7,71 ± 0,95 ^d	5,29 ± 2,43 ^{bc}	3,86 ± 1,57 ^{ab}	2,86 ± 1,07 ^a
Tekstura	7,43 ± 1,13 ^b	6,57 ± 1,40 ^b	3,29 ± 0,49 ^a	6,29 ± 1,38 ^b	3,43 ± 0,98 ^a
Ukus	6,71 ± 0,76 ^b	7,14 ± 0,69 ^b	2,43 ± 1,40 ^a	7,00 ± 0,82 ^b	2,14 ± 1,07 ^a
Aroma	6,57 ± 1,13 ^b	6,86 ± 1,07 ^b	2,29 ± 1,50 ^a	6,86 ± 1,35 ^b	1,86 ± 1,07 ^a

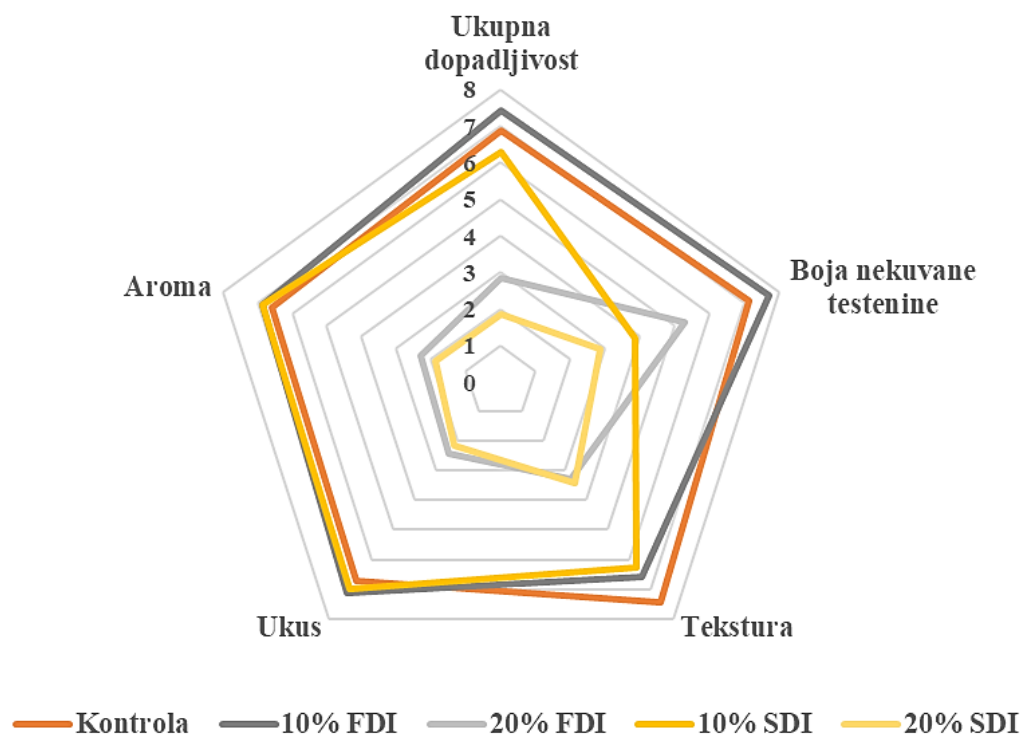
Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($P < 0,05$) razlikuju;

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 15$).

Sagledavajući rezultate senzorske analize, zaključuje se da različiti udeli inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe predstavljaju statistički značajan faktor u ocenjivanju ispitivanih uzoraka testenine. Statistička analiza je pokazala da panelisti preferiraju testeninu sa manjim sadržajem inkapsulata, odnosno testeninu sa 10% FDI i 10% SDI. Zanimljivo je da su kod 10% FDI testenine, svi ispitivani parametri, osim teksture, ocenjeni bolje od kontrolnog uzorka testenine. Testenina sa 10% SDI ocenjena je bolje u pogledu ukusa i arome, dok se negativan uticaj SDI inkapsulata na ostale parametre može pripisati parametrima boje. Testenina sa 20% FDI, odnosno 20% SDI, ocenjena je znatno lošije u pogledu svih testiranih atributa, što je verovatno posledica velike količine inkapsuliranog uljanog ekstrakta u ovakvoj vrsti proizvoda.

Rezultati senzorske analize ispitivanih uzoraka testenine prikazani su i pomoću "pauk" dijagrama (slika 39). Kod ovog tipa dijagrama multivarijantni podaci su prikazani na dvodimenzionalnom grafiku koji ima onoliko osa koliko ima promenljivih, a uglovi između osa

su jednaki. Dužine osa odgovaraju opsegu merenja, pri čemu vrednost u centru odgovara najmanjoj veličini, a vrednosti u uglu osa odgovaraju maksimalnoj veličini promenljive. Svako senzorsko svojstvo predstavljeno je na jednoj osi, a vrednosti za različita svojstva istog uzorka spojene su linijom. Mana ovakvog prikaza rezultata je ta što se ne prikazuju statistički parametri.



Slika 38. Senzorska ocena testenine uz primenu testa dopadljivosti

5.4.10. Nutritivni profil testenine

Kako je postavljeni cilj ove disertacije podrazumevao proizvodnju testenine sa poboljšanim funkcionalnim i nutritivnim svojstvima, u kontrolnom uzorku testenine i uzorcima koji su prema senzorskim svojstvima ocenjeni kao prihvatljivi za potrošače (10% FDI i 10% SDI), određen je sadržaj makronutrijenata, odnosno proteina, masti i ugljenih hidrata. Supstitucija dela semoline (10%) inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe odrazila se na promene sadržaja svih ispitivanih makronutrijenata, te su dobijeni proizvodi sa povećanim sadržajem proteina, masti i celuloze, i smanjenim sadržajem ukupnih ugljenih hidrata i skroba.

Povećanje sadržaja proteina rezultat je uključivanja proteina surutke u formulaciju, dok je povećanje sadržaja masti uzrokovano inkapsuliranim uljanim ekstraktom sporednog proizvoda prerade šargarepe.

Tabela 37. Hemijski sastav (g/100 g) testenine na bazi semoline (kontrola) i testenine obogaćene sa 10% optimalnih inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih *freeze drying* i *spray drying* tehnikom (10% FDI; 10% SDI)

Parametar	Kontrola	10%FDI	10%SDI
Sirovi proteini	13,84	16,86	15,53
Masti	0,79	4,13	4,32
Ukupni ugljeni hidrati	4,24	3,18	3,39
Sirova celuloza	0,19	0,25	0,25
Skrob	65,57	59,31	59,02
Vlaga	9,63	9,81	9,60
Pepeo	0,84	0,91	0,87

Sa nutritivne tačke gledišta, testenina predstavlja proizvod kog odlikuje oskudan sadržaj proteina. Iz tog razloga, veliki broj istraživanja je usmeren ka proizvodnji testenine obogaćene proteinima, pri čemu su se koristila brašna različitih vrsta žita, pseudožita ili mahunarki, ili pak izolati i koncentracije proteina surutke, soje, pasulja i graška (Škrobot, 2016; Petitot i sar. 2010; Sudha i Leelavathi, 2012; Zhao i sar. 2005; Chillo i sar. 2008a; Wood, 2009; Chillo i sar. 2008b). Što se tiče sadržaja masti, osim što su značajne za podmirivanje energetskih potreba organizma, veoma su važan deo svakodnevne izbalansirane ishrane. Ukoliko se pogleda sadržaj masnih kiselina koji potiče iz inkapsuliranog ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe, i činjenica da linolna kiselina, koja je najzastupljenija u ovom slučaju, poseduje brojne biološke funkcije, može se reći da primenjeni koncept obogaćivanja testenine i sa ovog aspekta doprinosi poboljšanju kvaliteta proizvoda. Naime, mnoge studije upravo linolnu kiselinu povezuju sa smanjenjem rizika od srčanih obojenja, s obzirom da dokazano utiču na porast HDL čestica i snižavaju nivo triglicerida u krvi (Kesavulu i sar. 2002).

Sumiranjem dobijenih rezultata u okviru postavljenog cilja za dobijanje novog funkcionalnog proizvoda, testenina na bazi semoline sa povećanim sadržajem karotenoida se može svrstati u grupu "testenina sa dodacima" (Pravilnik o kvalitetu žita, mlinskih i pekarskih proizvoda i testenina (Službeni glasnik RS br. 68/16 i 56/18, član 58). Na osnovu preporučenih RDA vrednosti za karotenoide (Biesalski i sar. 1997), konzumacijom jedne porcije testenine (85 g) sa 10% FDI optimalnog inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe može se obezbediti 23% preporučenog dnevnog unosa, dok se konzumacijom porcije testenine sa 10% SDI optimalnog inkapsulata može obezbediti 25% preporučenog dnevnog unosa karotenoida.

Uzimajući u obzir peporučene RDA vrednosti za vitamin E (α -tokoferol) (EFSA, 2015a), konzumiranjem porcije 10% FDI testenine može se obezbediti 9,6% preporučenog dnevnog unosa, dok konzumiranje porcije 10% SDI testenine može obezbediti 10,93% preporučenog dnevnog unosa ovog vitamina. Generalno, uključivanjem ispitivanih inkapsulata kao funkcionalnih dodataka u formulaciju testenine postigao se značajan pomak u funkcionalnim i nutritivnim svojstvima, pri čemu se dobio proizvod koji može da parira komercijalno dostupnim proizvodima namenjenim populaciji koja teži zdravijem stilu života.

5.5. Inkapsulacija karotenoida iz ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe tehnikom elektrostatičke ekstruzije

U poslednje dve decenije, značajno mesto u proizvodnji mikročestica sa inkapsuliranim bioaktivnim materijalom zauzele su ekstruzione tehnike usled relativno jednostavnog i ekonomičnog postupka proizvodnje. Elektrostatička ekstruzija kao metoda za inkapsulaciju široko se primenjuje u različitim oblastima biotehnologije, farmaceutske, kozmetičke i prehrambene tehnologije. Tehnika elektrostatičke ekstruzije se zasniva na primeni elektrostatičke sile koja deluje na površinu meniskusa rastvora polimera na vrhu igle/kapilare, usled čega dolazi do generisanja velikog broja kapljica, koje formiraju mikročestice u tzv. rastvoru za očvršćavanje. Osnovna prednost ove metode nad klasičnom ekstruzijom je kontrola veličine čestica i dobijanje čestica željenog prečnika. Kod elektrostatičke ekstruzije veličina čestica zavisi od više faktora: fizičkih karakteristika rastvora polimera, protoka kojim se rastvor potiskuje, prečnika igle, rastojanja između igle i rastvora i primenjenog napona. Karakteristike materijala koji se koriste kao nosači u procesu inkapsulacije imaju najveći uticaj na svojstva inkapsulirane aktivne komponente. Za inkapsulaciju se koriste biorazgradivi materijali koji omogućavaju formiranje zaštitnog sloja između unutrašnje faze inkapsulata i okruženja. Svojstva materijala kao što su dobra kompatibilnost sa aktivnim sastojkom, dobro formiranje filmova, kontrolisano propuštanje gasova i vodene pare su svakako među najvažnijim koje materijal nosača treba da poseduje.

U ovom poglavlju su predstavljeni rezultati inkapsulacije ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe uz korišćenje Ca-alginata kao nosača. Stvaranje gela Ca-alginata je vršeno izmenom jona Na^+ iz alginata jonima Ca^{2+} iz rastvora za geliranje. U okviru preliminarnih istraživanja (rezultati nisu prikazani) određeni su parametri za dobijanje čestica željene veličine i karakteristika, a to su: maseni udeo ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe - 25%; protok smeše za inkapsulaciju - 40 ml/h; napon - 3 kV; promer igle - 0,7 mm; rastojanje između vrha igle i površine rastvora za geliranje - 2,5 cm. Završna faza pripreme čestica je bila njihovo sušenje metodom liofilizacije, a izgled hidrogel i liofiliziranih čestica predstavljen je na slici 40. Dobijene čestice su dalje analizirane u svojstvu dimenzije i morfologije, hemijskih svojstava, efikasnosti inkapsulacije, bioaktivnosti i održivosti karotenoida tokom skladištenja.



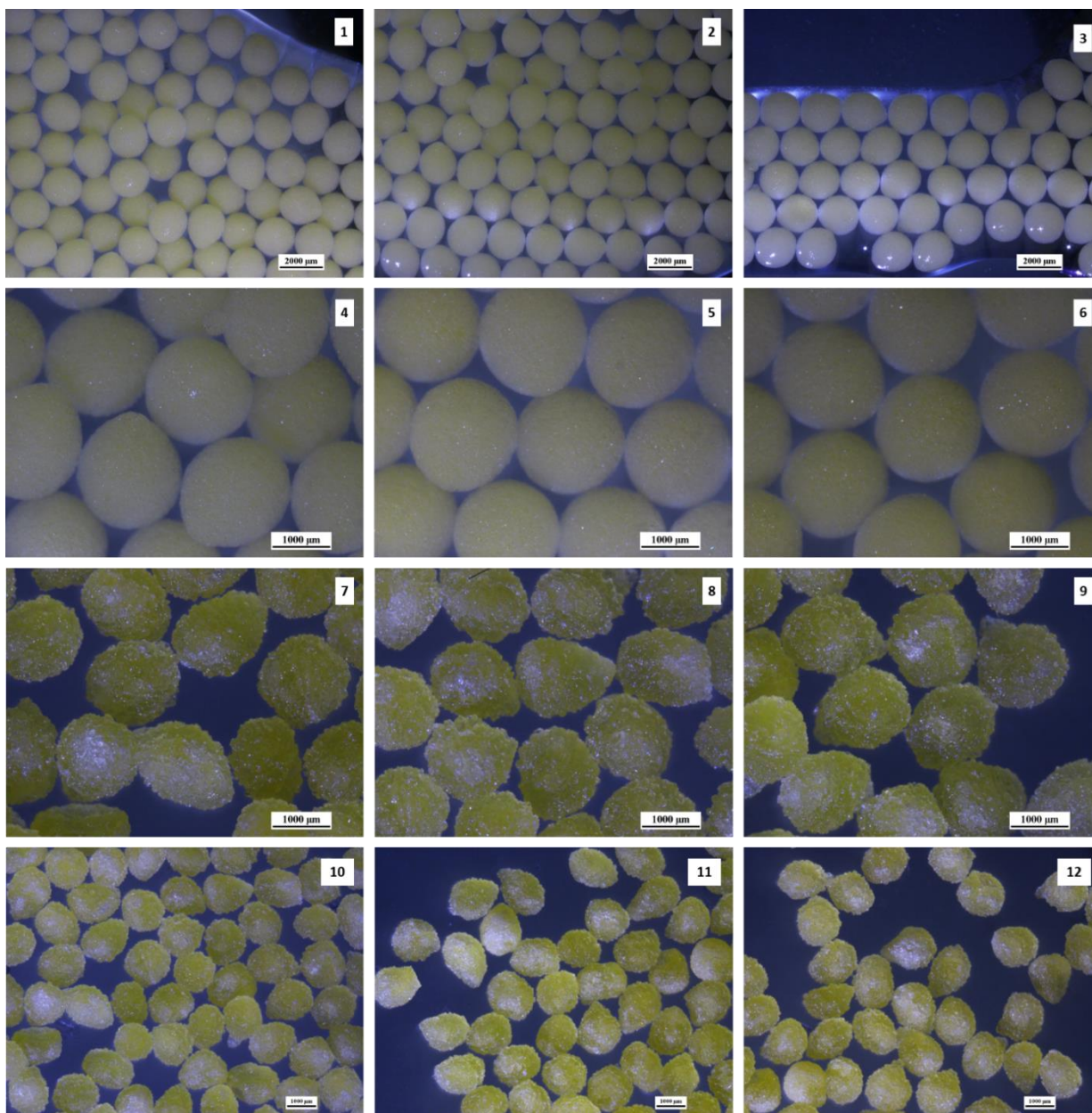
Slika 39. Izgled hidrogel i liofiliziranih čestica inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenog tehnikom elektrostatičke ekstruzije

5.6. Karakterizacija inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenog tehnikom elektrostatičke ekstruzije

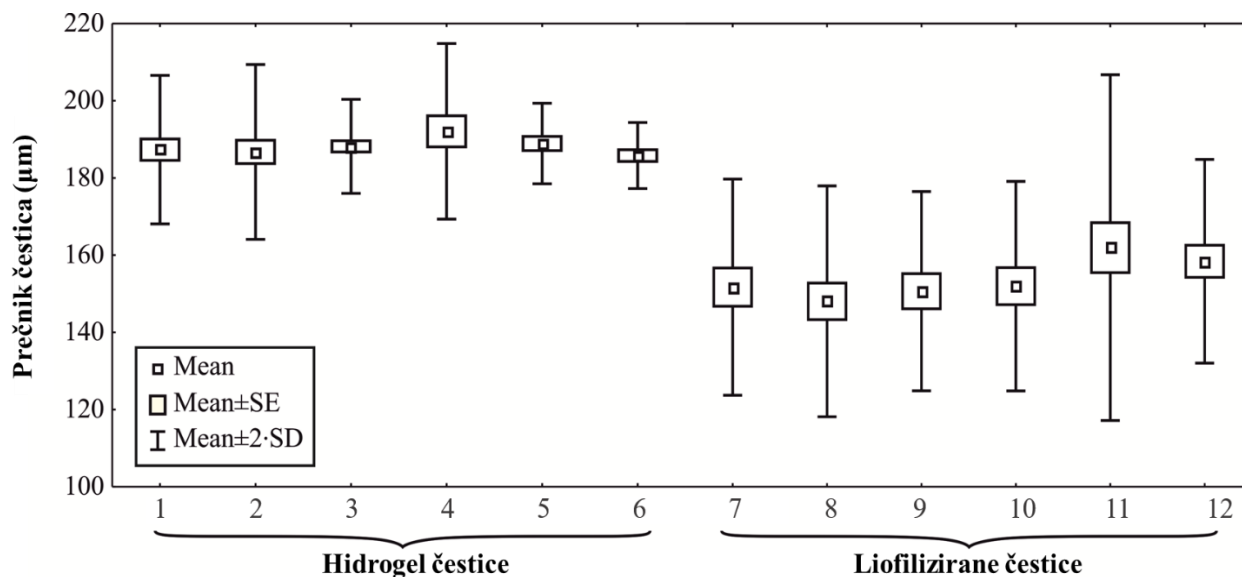
5.6.1. Analiza veličine hidrogel i liofiliziranih čestica inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe

Osušena forma inkapsulata ovog tipa je poželjna prilikom potencijalne primene u prehrambenim proizvodima, te je u ovoj fazi istraživanja ispitivan uticaj sušenja na veličinu čestica. Iako se liofilizacija kategoriše kao skup postupak, ova metoda se smatra pogodnom zbog mogućnosti očuvanja termolabilnih jedinjenja kao što su karotenoidi iz sporednog proizvoda prerade šargarepe, a samim tim i očuvanje njihovih nutritivnih i bioaktivnih svojstava. Konvencionalne metode sušenja (npr. sušenje u sušnici) svrstavaju se u industrijski isplativije metode, ali usled visokih temperatura, osim dehidratacije materijala, dolazi i do promena u kvalitetu i kvantitetu bioaktivnih jedinjenja. Takođe, promene mogu biti i u pogledu organoleptičkih svojstava, pa je zbog pojave lepljivosti, higroskopnosti i aglomeracije čestica primena ovih inkapsulata ograničena u prehrambenim proizvodima.

Analiza veličine hidrogel i liofiliziranih čestica inkapsulata ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe sprovedena je binokularnim mikroskopom. Merenja veličine čestica su predstavljena u šest prikaza za hidrogel (1-6) i šest prikaza za liofilizirane čestice inkapsulata (7-12) (slika 41), dok je prosečna veličina analiziranih čestica prikazana na slici 42.



Slika 40. Izgled hidrogel (1-6) i liofiliziranih (7-12) čestica inkapsulata ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenog tehnikom elektrostatičke ekstruzije



Slika 41. Raspodela srednjih vrednosti prečnika hidrogel (1-6) i liofiliziranih čestica (7-12) inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe

U ovom istraživanju, nakon liofilizacije veličina čestica je redukovana za oko 20%. Prosečna veličina hidrogel čestica je u rasponu od 185,80 µm do 192,08 µm, dok su odgovarajuće veličine liofiliziranih čestica bile u rasponu od 148,65 µm do 162,45 µm (tabela 38).

Tabela 38. Prosečna veličina i faktor sferičnosti hidrogel i liofiliziranih čestica inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe

Veličina i oblik	Hidrogel čestice	Liofilizirane čestice
Prosečna veličina čestica (µm)	188,15 ± 2,20 ^b	154,36 ± 5,22 ^a
Faktor sferičnosti	0,01 ± 0,00 ^a	0,01 ± 0,00 ^a

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($P < 0,05$) razlikuju;

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 6$).

Za utvrđivanje odstupanja od sfernog oblika čestica korišćen je faktor sferičnosti; nulta vrednost ukazuje na savršenu sferu, dok veće vrednosti ovog faktora ukazuju na veće deformacije u obliku (Kokina i sar. 2019). Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 38, može se

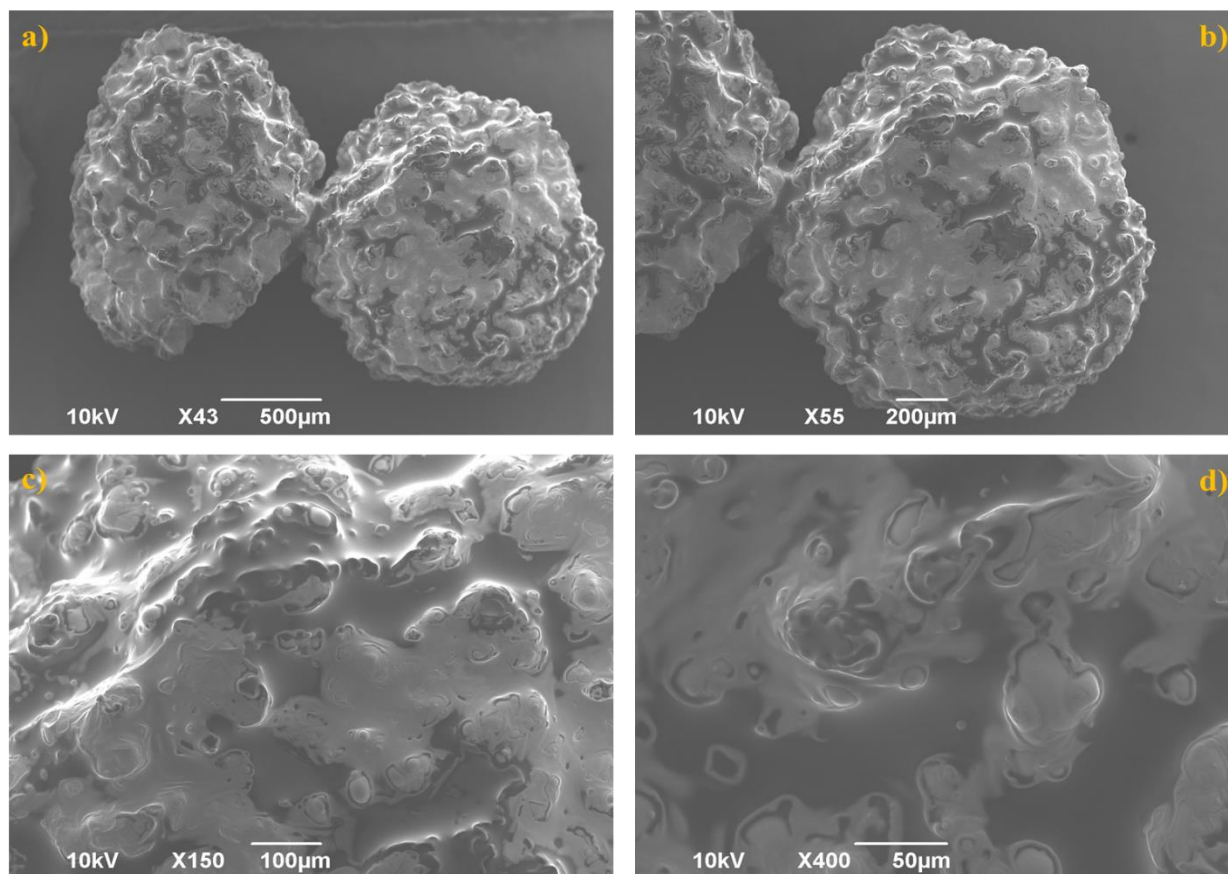
zaključiti da su sve dobijene hidrogel čestice imale sferni oblik. Nakon sublimacije vode iz matrice hidrogela, sferičnost čestica ostaje i dalje nepromenjena, što ukazuje da je dodata zapremina ekstrakata sporednog proizvoda prerade šargarepe pogodna za stabilizaciju ovom tehnikom inkapsulacije. Očigledno je da u ovom slučaju uljani ekstrakt deluje kao punioc, sprečavajući lomljenje kapsula nakon liofilizacije, pa je upotreba emulgatora i stabilizatora nepotrebna.

5.6.2. Morfološke karakteristike inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe

Proučavanje morfoloških karakteristika dobijenih čestica na bazi alginata je od velikog značaja, s obzirom da površinska morfologija sistema, zajedno sa njegovom unutrašnjom strukturom, u velikoj meri utiče, ako ne i predodređuje njihovu potencijalnu primenu. Morfološke karakteristike liofiliziranih čestica inkapsulata ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe analizirane su skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) pod različitim uvećanjima, a dobijeni rezultati prikazani su na slici 43.

SEM mikrografije sugerišu da, usled povećanja zapremine vode nakon kristalizacije, liofilizacija hidrogel čestica vodi do stvaranja porozne površinske strukture i pukotina. Preciznije, usled gubitka vlage može doći do stvaranja šupljina u strukturi hidrogela što je praćeno kontrakcijom mreže gela, deformacijom sferičnog oblika i smanjenja veličine. Uprkos navedenim nedostacima, na osnovu dostupnih literaturnih podataka može se zaključiti da je primenjeni postupak optimalan za sušenje proizvedenih čestica tehnikom elektrostatičke ekstruzije. Naime, sušenje primenom visokih temperatura u slučaju hidrogelova, zbog visokog sadržaja vlage praćeno je naglim isparavanjem velike količine vode, što dovodi do mnogo intenzivnije deformacije oblika i izražene poroznosti čestica. Ovo je potvrđeno istraživanjem od strane Smrdel i sar. (2008) u okviru kog su poređene tri metode sušenja Ca-alginatnih čestica: liofilizacija, sušenje u *fluid bed* uređaju i sušenje na sobnoj temperaturi. U navedenom radu je pokazano da su uslovi sušenja u velikoj meri uticali na oblik i morfologiju čestica, uključujući površinsku i unutrašnju strukturu čestica. Liofilizirane čestice su bile najveće po veličini, odnosno ostale su gotovo nepromenjene veličine kao i pre sušenja. Međutim, rezultati su takođe pokazali da liofilizacija dovodi i do pojave pora na mestima gde su se nalazili kristali leda, koji

je naglo sublimovao, te nije bilo dovoljno vremena da se matriks čestica kontrahuje i zatvori nastale pore. U okviru preostale dve metode sušenja gubitak vlage odvijao se znatno sporije, pa se i matriks čestica postepeno kontrahovao, dovodeći do smanjenja veličine čestica i veće deformacije sferičnog oblika. Na SEM mikrografijama nije primećena agregacija čestica.



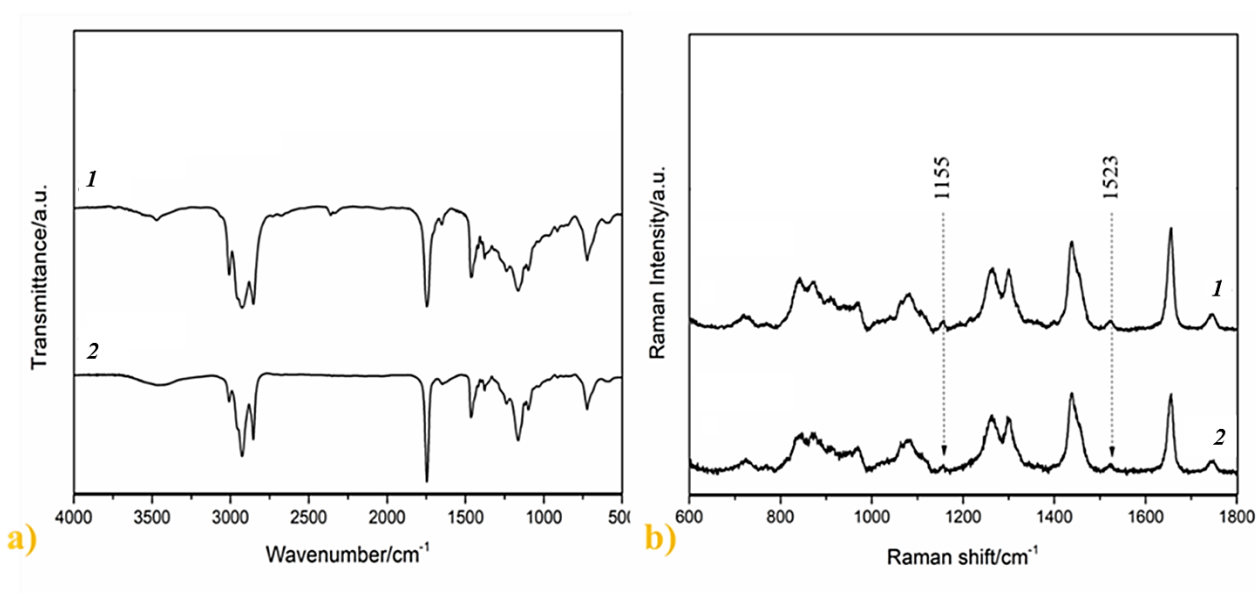
Slika 42. SEM mikrografije liofiliziranih čestica inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenog tehnikom elektrostatičke ekstruzije sa uvećanjem od a) 43, b) 55, c) 155 i d) 400

5.6.3. FTIR i Raman spektroskopska analiza liofiliziranih čestica inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe

Na slici 44a dati su rezultati FTIR spektroskopske analize, gde su izloženi spektri ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe i njegove inkapsulirane forme tehnikom elektrostatičke ekstruzije. Spektar koji se odnosi na ispitivani ekstrakt prikazuje trake koje potiču

od suncokretovog ulja, dok spektar inkapsuliranog ekstrakta pored ovih traka poseduje široku traku na oko 3500 cm^{-1} koja potiče najverovatnije od -OH grupa alginatnog nosača. Trake koje potiču od alginata preklapaju se sa trakama iz lipidne faze (tj. ulja i ekstrahovanih karotenoida) zbog relativno niskog sadržaja alginata u formulaciji kapsula. Rezultati FTIR analize ne sugerišu jaku interakciju između alginata i smeše ulje/karotenoidi, što ukazuje da nakon formiranja kapsula Ca-alginata ove dve faze najverovatnije ostaju razdvojene.

Rezultati Raman spektroskopske analize predstavljeni su na slici 44b. Ramanov spektar ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe pokazuje izražene trake na 1155 cm^{-1} i 1523 cm^{-1} . Ove trake su bliske trakama koje su u literaturi opisane kao karakteristične za karotenoide i potiču od istezanja i C=C vibracija u ravni (1155 cm^{-1}) i istezanja C=C vibracija (1523 cm^{-1}) (Schulz i Baranska, 2007). Nakon inkapsulacije, prisustvo suncokretovog ulja i ekstrahovanih karotenoida na površini čestica Ca-alginata mogu se uočiti uz pomoć karakterističnih traka. Ovi rezultati su očekivani, uzimajući u obzir količinu dodatog ulja, kao i činjenicu da kapsule nisu dodatno isprane organskim rastvaračem za uklanjanje površinski prisutnog ulja.



Slika 43. a) FTIR i b) Raman spektri ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe (1) i inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe tehnikom elektrostatičke ekstruzije (2)

5.6.4. Efikasnost inkapsulacije karotenoida i njihova održivost tokom skladištenja

Generalno, da bi metoda inkapsulacije bila uspešna mora se obratiti pažnja na dostizanje i zadržavanje visokog sadržaja materijala u jezgru, čime se osiguravaju njegova funkcionalna svojstva u konačnom proizvodu. Efikasnost inkapsulacije je parametar koji se smatra ključnim korakom u karakterizaciji kvaliteta inkapsulata i odgovara procentu koncentracije inkapsuliranog jedinjenja po ukupnoj koncentraciji dodatog jedinjenja (Couvreur i sar. 2002). Ukupan sadržaj karotenoida u dobijenim liofiliziranim česticama inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe određen je spektrofotometrijskom metodom i iznosi 3,65 mg β -karotena na 100 g čestica, dok je efikasnost inkapsulacije iznosila 72,63% (tabela 39). Stabilnost inkapsuliranih jedinjenja tokom perioda skladištenja se mora uzeti u obzir prilikom definisanja uspešnosti procesa inkapsulacije, te je u tu svrhu praćena retencija karotenoida u liofiliziranim česticama inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe tokom perioda skladištenja od 90 dana na sobnoj temperaturi (25 ± 5 °C) u boci od tamnog stakla.

Tabela 39. Ukupan sadržaj karotenoida (mg β -karotena/100 g), efikasnost inkapsulacije (%) i retencija karotenoida (%) u inkapsulatu sporednog proizvoda prerade šargarepe

Parametar	Inkapsulat
Ukupan sadržaj karotenoida	3,65 \pm 0,02
Efikasnost inkapsulacije	72,63 \pm 0,31
Održivost karotenoida tokom skladištenja	
30 dana	93,11 \pm 1,10
60 dana	89,65 \pm 0,91
90 dana	81,54 \pm 1,73

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija (n = 3).

Posle ispitivanog perioda skladištenja na sobnoj temperaturi, zadržavanje sadržaja karotenoida inkapsuliranog u alginatnim česticama iznosilo je više od 80% od početne količine. Ovi rezultati su pokazali da je alginatna matrica poboljšala stabilnost karotenoida obezbeđujući fizičku barijeru koja ograničava difuziju kiseonika, prooksidanata ili slobodnih radikala u jezgro čestice gde mogu da stupe u interakciju sa karotenoidima (Zhang i sar. 2016). Na osnovu prikazanih rezultata, može se zaključiti da je elektrostatička ekstruzija još jedna u nizu dobrih strategija za dobijanje inkapsulata sa visokim sadržajem stabilnih karotenoida, spremnim za upotrebu ili njihovo uključivanje u sledeći tehnološki proces.

Slični rezultati objavljeni su od strane Calvo i Santagapita (2017) koji su poredili efikasnost inkapsulacije likopena (ekstrahovanog iz ljubičastog grejpfruta maslinovim uljem) u odnosu na primenjeni nosač, tj. alginat, trehalozu i hitozan. U ovom istraživanju, najveća efikasnost inkapsulacije likopena zabeležena je primenom hitozana (> 80%), dok je za alginat i trehalozu određena vrednost od ~70%. Sa druge strane, u studiji Lin i sar. (2016), koji su ispitivali inkapsulaciju astaksantina tehnikom elektrostatičke ekstruzije, optimizacijom formulacije emulzije (koncentracija aginata, koncentracija CaCl₂ i Tween 20), brzine i vremena mešanja emulzije, kao i veličine igle, postignuta je efikasnost inkapsulacije ovog jedinjenja od 100%. S obzirom na zavidne rezultate efikasnosti inkapsulacije i stabilizacije bioaktivnih jedinjenja koje može obezbediti ova tehnika inkapsulacije, preporučuje se njihovo uključivanje u različite funkcionalne prehrambene proizvode, od mlečnih proizvoda do poslastica, grickalica i bombona.

5.6.5. Antioksidativna i farmakološka aktivnost inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe

U cilju utvrđivanja potencijalnog biološkog efekta ovog specifičnog sastojka, primenjeni su testovi koji uključuju antioksidativnu aktivnost (antioksidativni kapacitet izbeljivanja β-karotena i redukciona sposobnost), antihiperглиkemijsku i antiinflamatornu aktivnost, a dobijeni rezultati prikazani su tabeli 40. Rezultati pokazuju da je antioksidativna aktivnost određena β-karoten metodom bila veća (73,68 μmol TE/100 g) od redukcionne moći, koja se zasniva na mehanizmu redukcije jona gvožđa (20,19 μmol TE/100 g). Liofilizirane čestice inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe su pokazale vrednost AHgA od 26,87%. Coyne i sar.

(2005) i Ford i sar. (1999) su potvrdili da su serumski karotenoidi u obrnutoj korelaciji sa dijabetesom tipa 2 i narušenim metabolizmom glukoze. Pored toga, Ylonen i sar. (2003) takođe su utvrdili da unos karotenoida u ishrani smanjuje koncentraciju glukoze u plazmi. Rezultati AIA dobijenih čestica inkapsulata pokazuju inhibiciju denaturacije proteina u nivou od 21,36%, što ukazuje na potencijal inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenog metodom elektrostatičke ekstruzije za njihovo uključanje u ljudsku ishranu.

Tabela 40. Antioksidativna i farmakološka aktivnost liofiliziranih čestica inkapsulata ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe

Aktivnost	Inkapsulat
Antioksidativna aktivnost ($\mu\text{molTE}/100\text{g}$)	
β-karoten metoda (AA_{BCB})	$73,68 \pm 2,11$
Redukciona sposobnost (RP)	$20,19 \pm 1,67$
Farmakološka aktivnost (% inhibicije)	
Antihiperглиkemijska aktivnost (AHgA)	$26,87 \pm 0,97$
Antiinfamatorna aktivnost (AIA)	$21,36 \pm 0,06$

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija ($n = 3$).

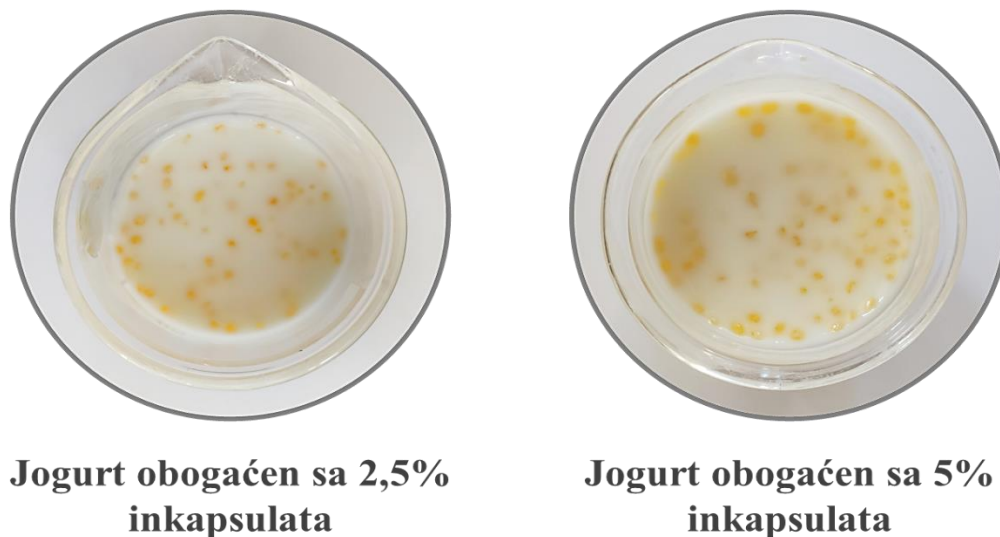
5.7. Primena inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe u proizvodnji jogurta

Fermentisani mlečni proizvodi predstavljaju veoma raznovrsnu grupu proizvoda. Blagotvorna svojstva jogurta učinila su ovaj mlečni proizvod široko rasprostranjenim širom sveta. Zbog dobrih senzornih osobina, lake svarljivosti i odgovarajućih dijetetskih svojstava, proizvodnja i potrošnja ove grupe proizvoda je poslednjih godina u velikom porastu. Prema Pravilniku o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura (Sl. glasnik, br. 34/14) navodi se da se u fermentisane proizvode od mleka ubrajaju jogurt, kiselo mleko, fermentisani proizvodi od mleka sa probiotskim bakterijama, kefir i drugo. Jogurt je prema navedenom Pravilniku definisan

kao proizvod dobijen fermentacijom mleka delovanjem simbiotske kulture *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Ovaj mlečni fermentisani proizvod ima višestruku ulogu u ljudskom zdravlju jer obezbeđuje veliku količinu prirodnih hranljivih sastojaka i poboljšava mikrofloru probiotičkim sojevima i drugim mlečno-kiselinskim bakterijama (MKB). Mollakhalili Meybodi i sar. (2020) su potvrdili da upotreba jogurta dovodi do tolerancije na patogene i poboljšava imuni sistem, apsorpciju laktoze i osnovnih minerala.

Naučni fokus na polju fermentisanih mlečnih proizvoda postepeno se usmeravao na obogaćivanje jogurta različitim bioaktivnim komponentama kako bi se obezbedio proizvod sa boljim hranljivim, senzornim, fizičko-hemijskim i reološkim svojstvima u poređenju sa tradicionalnim proizvodima. Jogurt je pogodan matriks za obogaćivanje različitim bioaktivnim jedinjenjima. Danas tržište hrane daje širok spektar formulacija jogurta pripremljenih uz dodatak specifičnih aditiva kao što su boje i antioksidanti. Međutim, kao što je već naglašeno, zabrinutost potrošača za bezbednost, kada je u pitanju primena veštačkih boja i aditiva u prehrambenim proizvodima, podstaklo je razvoj i primenu onih na prirodnoj bazi.

Prema standardima Codex Alimentarius za mleko i mlečne proizvode, koje su kreirale Organizacija za hranu i poljoprivredu (FAO) i Svetska zdravstvena organizacija (WHO), nemlečni, nekarakteristični sastojci mogu biti prisutni u maksimalnom udelu od 50% (m/m) finalnog proizvoda. Sa tim u vezi, u cilju definisanja novog potencijalnog funkcionalnog proizvoda, izvršeno je obogaćivanje jogurta prethodno inkapsuliranim karotenoidima sporednog proizvoda prerade šargarepe tehnikom elektrostatičke ekstruzije, u nivou od 2,5 i 5%. Izgled obogaćenih uzoraka jogurta liofiliziranim česticama inkapsulata predstavljen je na slici 45. Dobijeni uzorci okarakterisani su u pogledu ukupnog sadržaja karotenoida i bioaktivnih svojstava, parametara boje, mikrobiološke ispravnosti, zatim kinetike vijabilnosti mlečno-kiselinskih bakterija, pH vrednosti i sadržaja karotenoida, kao i senzorke prihvatljivosti obogaćenog jogurta.



Slika 44. Jogurt obogaćen sa 2,5% i 5% liofiliziranih čestica inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe

5.7.1. Ukupan sadržaj karotenoida, antioksidativna i farmakološka aktivnost jogurta

Na osnovu kvalitativne analize uzoraka jogurta zabeležen je porast sadržaja karotenoida u uzorcima sa većim udelom liofiliziranih čestica inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe (slika 46). Iz epidemioloških studija se može zaključiti da treba obezbediti nivo β -karotena u plazmi od 0,4 mmol/l kako bi se iskoristio preventivni zdravstveni potencijal. To se može postići sa unosom β -karotena od 2–4 mg/dan (Biesalski i sar. 1997). Uzimajući u obzir nivoe β -karotena prisutnih u uzorcima obogaćenog jogurta, jedna šolja jogurta (180 g) sa 2,5% liofiliziranih čestica inkapsulata može da ispuni 8% datog zahteva, dok čaša jogurta sa 5% liofiliziranih čestica inkapsulata ispunjava 16% dnevne potrebe za β -karotenom.

Bioaktivnost ispitanih uzoraka jogurta, u smislu antioksidativnih, antihiperlipidemijskih i antiinflamatornih aktivnosti, proučavana je nakon *in vitro* simuliranog gastrointestinalnog varenja primenom InfoGest statičkog modela, a dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 41.

Tabela 41. Antioksidativna i farmakološka aktivnost komercijalnog jogurta (kontrola) i jogurta obogaćenog inkapsulatom sporednog proizvoda prerade šargarepe u nivou od 2,5% i 5%.

Aktivnost	Kontrola	2,5%	5%
Antioksidativna aktivnost ($\mu\text{molTE}/100\text{g}$)			
β-karoten metoda (AA_{BCB})	0,00 \pm 0,00 ^a	4,21 \pm 0,03 ^b	9,36 \pm 0,01 ^c
Redukciona sposobnost (RP)	0,00 \pm 0,00 ^a	1,69 \pm 0,01 ^b	3,11 \pm 0,04 ^c
Farmakološka aktivnost (% inhibicije)			
Antihiperглиkemijska aktivnost (AHgA)	4,36 \pm 0,01 ^a	11,26 \pm 0,01 ^b	13,91 \pm 0,23 ^c
Antiinfamatorna aktivnost (AIA)	0,00 \pm 0,00 ^a	10,13 \pm 0,06 ^b	15,27 \pm 0,07 ^c

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($P < 0,05$) razlikuju;

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija ($n = 3$).

Ispitivani kontrolni tj. komercijalni jogurt nije sadržao karotenoide. Mnogi autori su otkrili da obogaćivanje jogurta lipofilnim antioksidantima kao što su karotenoidi, omogućava poboljšanje njegovih antioksidativnih svojstava (Gad i sar. 2015; Patel i sar. 2019), što takođe potvrđuju i dobijeni rezultati.

U naučnoj literaturi dokumentovana su i istraživanja o potencijalnoj primeni inkapsuliranih karotenoida u proizvodnji jogurta u cilju dobijanja proizvoda sa provitaminskim i antioksidativnim karakteristikama. U studiji Rutz i sar. (2016) sintetički β -karoten i pamino ulje inkapsulirani su sa smešom hitozana i karboksimetilceluloze kao nosača metodom koacervacije, kao i smešom hitozana i Na-tripolifosfata metodom jonskog geliranja. Dobijeni inkapsulati inkorporirani su u prehrambene sisteme kao što su jogurt i hleb, pri čemu se postigla bolja bioraspoloživost β -karotena u intestinalnom traktu. Toniazzi i sar. (2014) ispitivali su mogućnost inkapsulacije β -karotena u liposome, stabilizovanih ksantanom i guar gumom. Lipozomi sa β -karotenom dobijeni su *spray drying* metodom, nakon čega je ispitana njihova potencijalna primena kao prehrambene boje u proizvodnji jogurta. Na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika dobijenog proizvoda, pre svega boje i teksture, potvrđena je prednost primene ovih lipozoma kao funkcionalnog dodatka za postizanje crvene boje jogurta, kao i brojnih zdravstvenih efekata.

5.7.2. Boja jogurta

Na osnovu prikazanih vrednosti parametara L^* , a^* i b^* u tabeli 42, mogu se uočiti značajne razlike ($P < 0,05$) između početnih vrednosti b^* kontrolnog jogurta i obogaćenih uzoraka. Dobijeni rezultati su u skladu sa povećanjem žute/narandžaste boje jogurta, smanjujući tendenciju ka beloj vizuelizaciji na kontrolnom jogurtu. Uzimajući u obzir strukturu liofiliziranih čestica inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenog metodom elektrostatičke ekstruzije, koje nisu rastvorene u medijumu jogurta, L^* parametri su visoki za sve uzorke i kreću se u rasponu od 79,22 do 79,32%. Štaviše, nakon perioda skladištenja od 28 dana na temperature od 4 °C, primećena je veća zastupljenost žute boje za obogaćene uzorke jogurta, što je direktno uticalo i na promene vrednosti L^* i a^* . Ovi rezultati su u korelaciji sa oslobađanjem dela karotenoida iz liofiliziranih čestica inkapsulata u medijum jogurta tokom perioda skladištenja. Veće promene primećene su kod jogurta obogaćenog sa 5% inkapsulata (veći ΔE ; $\Delta E=5,69$), što se očekivalo pošto je u jogurt dodata veća koncentracije ukupnih karotenoida.

Tabela 42. CIE Lab hromatski parametri kontrolnog jogurta i obogaćenog jogurta sa 2,5 i 5% liofiliziranih čestica inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe izmereni prvog dana i nakon 28 dana skladištenja

<i>CIE Lab</i>	Kontrola	2,5%	5%
<i>Prvi dan skladištenja</i>			
L*	79,32 ± 0,01 ^a	79,28 ± 0,04 ^a	79,11 ± 0,03 ^b
a*	-2,91 ± 0,06 ^b	-2,89 ± 0,01 ^b	-2,83 ± 0,0 ^a
b*	7,92 ± 0,04 ^c	8,01 ± 0,01 ^a	8,03 ± 0,01 ^a
<i>Nakon 28 dana skladištenja</i>			
L*	78,43 ± 0,02 ^a	77,83 ± 0,03 ^b	76,01 ± 0,01 ^c
a*	-1,94 ± 0,01 ^c	-0,93 ± 0,01 ^b	-0,56 ± 0,01 ^a
b*	8,06 ± 0,02 ^a	11,80 ± 0,01 ^b	12,23 ± 0,02 ^c
ΔE	1,32 ± 0,01 ^a	4,51 ± 0,01 ^b	5,69 ± 0,01 ^c

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($P < 0,05$) razlikuju;

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 3$).

5.7.3. Mikrobiološki profil liofiliziranih čestica inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe i jogurta

Mikrobiološki profil alginata kao nosača, inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe i jogurta predstavljen je u tabeli 43. Na početku eksperimenta kontrolni jogurt je testiran u skladu sa ISO standardima sa ciljem otkrivanja patogena i drugih mikroorganizama koji se prenose hranom.

Na osnovu prikazanih rezultata, poredeći sa kriterijumima definisanim u Vodiču za mikrobiološke kriterijume za hranu (2011), može se zaključiti da je sa mikrobiološkog aspekta inkapsulat bio prikladan za dalju primenu, odnosno higijena tokom procesa inkapsulacije je bila na zadovoljavajućem nivou uz dobru laboratorijsku praksu. Takođe, kontrolni jogurt je imao odgovarajući mikrobiološki profil za potencijalnu konzumaciju, s obzirom da nije primećeno prisustvo ispitivanih mikroorganizama nakon procesa fermentacije i pakovanja.

Tabela 43. Mikrobiološki profil alginata, inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe i jogurta

Parametar	Alginat	Inkapsulat	Jogurt
Aerobne mezofilne bakterije (log CFU/g)¹	< 1	< 1	< 1
Sporogene bakterije (log CFU/g)	< 1	< 1	-*
Enterobacteriaceae (log CFU/g)¹	< 1	< 1	< 1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaris</i> (log CFU/g)	< 1	< 1	9,24
<i>Streptococcus thermophilus</i> (log CFU/g)	< 1	< 1	9,65
<i>Listeria monocytogenes</i> (d/nd)² u 25g uzorka	-	-	nd
<i>Staphylococcus aureus</i> (log CFU/g)¹	-	-	< 1
<i>Salmonella</i> spp. (d/nd)² u 25g uzorka	-	-	nd
Kvasci i plesni (log CFU/g)¹	< 1	< 1	< 1

¹ Dozvoljena vrednost je do 1 log CFU/g; ² ne sme biti detektovan; * analiza nije naznačena za vrstu uzorka; nd - nije detektovana; Dozvoljene vrednosti odnose se na ispitani ili sličan proizvod, odnosno dominantnu komponentu

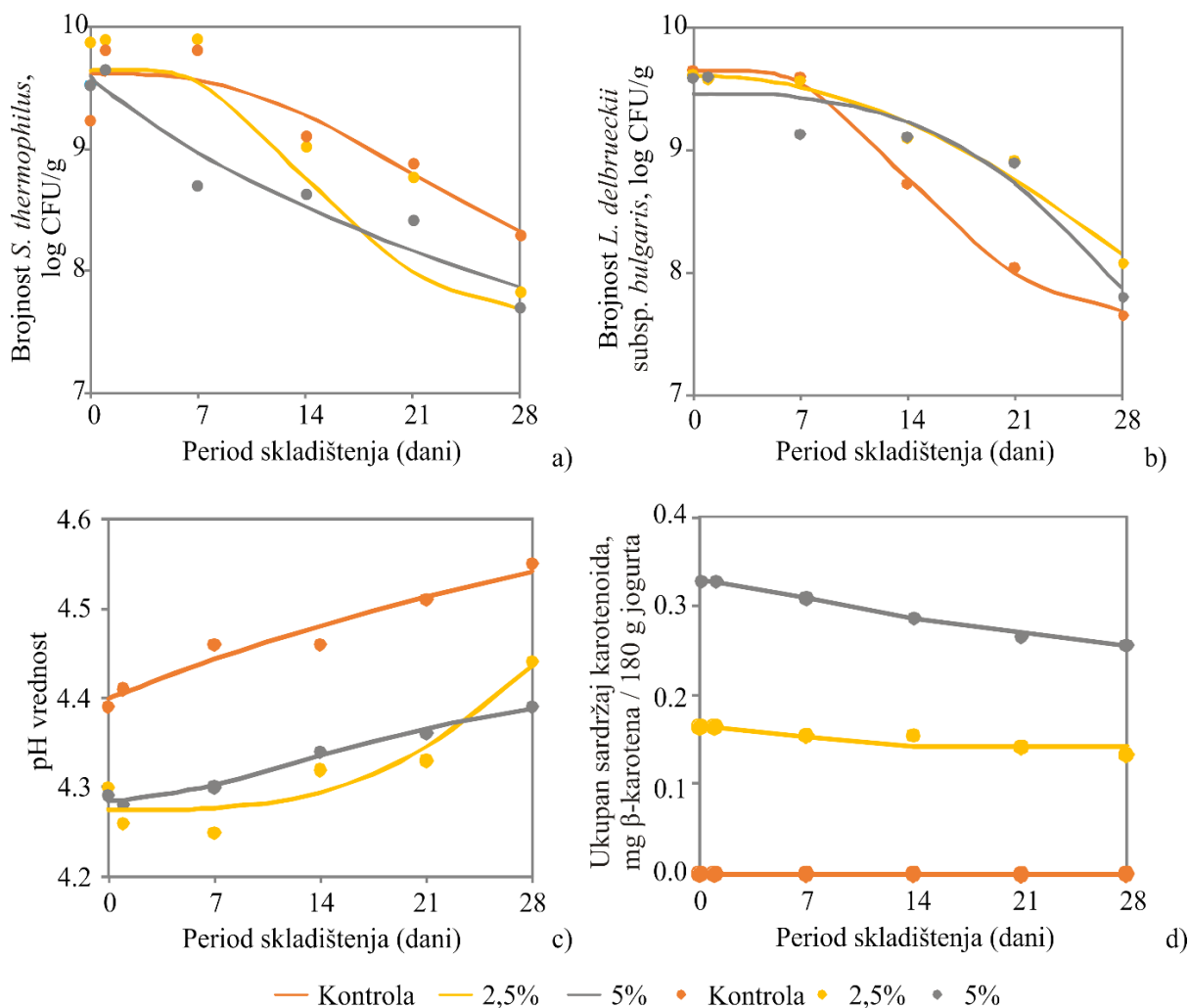
5.7.4. Kinetička studija vijabilnosti mlečno-kiselinskih bakterija, pH vrednosti i karotenoida

Proces fermentacije jogurta može da obezbedi odgovarajuću koncentraciju vijabilnih mlečno-kiselinskih bakterija, ali je održavanje njihove vijabilnosti tokom perioda skladištenja od posebnog značaja (Mollakhalili Meybodi i sar. 2020). Prema Mollakhalili Meybodi i sar. (2020) vijabilnost ovih bakterija u jogurtu može biti pod uticajem komponenata hrane kao što su bioaktivne komponente, faktora povezanih sa procesom proizvodnje, kao i mikrobiološke kontaminacije. Iz tih razloga, vijabilnost mlečno-kiselinskih bakterija je praćena tokom perioda skladištenja od 28 dana na 4 °C (slika 46). Definisane kinetičkih modela je urađeno uzimajući u obzir brojnost ciljanih bakterija, ali i pH vrednosti jogurta i sadržaja karotenoida.

Kao što je prikazano na slici 46, u okvirima kinetičkih modela koji su formirani na osnovu eksperimentalnih podataka postoje razlike između kontrolnog i uzoraka jogurta koji su obogaćeni karotenoidima. Naime, eksperimentalni rezultati vijabilnosti mlečno-kiselinskih bakterija (*Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaris*), pH vrednosti jogurta, kao i sadržaj β -karotena tokom perioda skladištenja, korišćeni su za definisanje kinetičkih parametara i prilagođavanje kinetičkih modela. Svi ispitani parametri su u funkciji perioda skladištenja, uključujući eksperimentalne podatke i definisane karakteristike krive kinetičkih modela. Pored toga, u tabeli 44 su sumirani koeficijenti regresije kinetičkih modela, koji objašnjavaju trendove (brzinu i intenzitet) ispitivanih procesa.

Na početku perioda skladištenja, brojnost *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaris* je bio iznad 9,5 log CFU/ml, dok je pH vrednost jogurta bila 4,4. Brojnost MKB kulture u oba obogaćena jogurta se nije promenio u poređenju sa kontrolnim uzorkom, što sugerise da dodavanje inkapsuliranih karotenoida primarno nije uticalo na vijabilnost fermentacione kulture. Prikazane krive za ispitivane parametre (slike 46a i 46b) imaju opadajući trend, koji je bio očekivan zbog činjenice da su prethodne studije Mani-Lopez i sar. (2014) ukazale na mogućnost smanjenja održivosti u rasponu između 7% i 33% tokom perioda skladištenja. Prema dobijenim kinetičkim modelima (slike 46a i 46b, tabela 44), statistički izračunata brojnost mlečno-kiselinskih bakterija dobro se uklapa sa eksperimentalnim podacima. Za predloženi model uzoraka obogaćenog jogurta, svi koeficijenti determinacije bili su veći od 0,92. Na kraju perioda skladištenja za obogaćeni jogurt sa 2,5% inkapsulata, brojnost *S.*

thermophilus i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaris* je bio 8,08, odnosno 7,83 log CFU/g, dok je jogurt obogaćen 5% inkapsulata sadržao 7,81, odnosno 7,71 log CFU/g. Od velikog značaja je naglasiti da su dobijene vrednosti iznad preporučenog terapijskog minimuma od 6 log CFU/g za zdravstveno poboljšavajući efekat jogurta (Senadeera i sar. 2018).



Slika 45. Kinetička studija vijabilnosti bakterija, pH vrednosti i sadržaja karotenoida tokom perioda skladištenja: a) *Streptococcus thermophilus*; b) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaris*; c) praćenje pH vrednosti; g) praćenje ukupnog sadržaja karotenoida

Početne vrednosti pH obe vrste obogaćenog jogurta u poređenju sa kontrolnim uzorkom su imale nižu početnu vrednost. Uočeno je da su kinetički parametri za jogurt sa 2,5% inkapsulata blago izmenjeni nakon 14 dana skladištenja u odnosu na kontrolni jogurt, dok je jogurt koji sadrži 5% inkapsulata zadržao sličan kinetički model kao kontrolni uzorak. Prema dobijenom kinetičkom modelu za pH vrednosti, statistički izračunata koncentracija pH vrednosti jogurta dobro se uklapala sa eksperimentalnim podacima sa svim koeficijentima determinacije većim od 0,893.

Kinetički modeli sadržaja karotenoida u ispitivanim uzorcima jogurta predstavljeni su na slici 46d. Za dobijene modele, koeficijenti determinacije su bili 1,000, 0,586 i 0,993 za kontrolni uzorak, jogurt sa 2,5% jogurt sa 5% inkapsulata. Sadržaj karotenoida u obogaćenom jogurtu bio je neznatno promenjen tokom perioda skladištenja, uočavajući opadajuće trendove za oba testirana jogurta (slika 46d). Ovi rezultati su u korelaciji sa svojstvima boje uzoraka (videti potpoglavlje 5.7.2.).

Tabela 44. Koeficijent regresije vijabilnosti MKB, pH vrednosti i ukupnog sadržaja karotenoida tokom perioda skladištenja

Koeficijent	Vijabilnost						pH		Ukupan sadržaj karotenoida			
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaris</i>			<i>S. thermophilus</i>								
	Kontrola	2,5%	5,0%	Kontrola	2,5%	5,0%	Kontrola	2,5%	5,0%	Kontrola	2,5%	5,0%
d	7,328	1,280	2,557	7,487	0,698	-1,868	4,948	5,000	4,454	0,000	0,130	0,161
a	9,613	9,937	9,602	9,645	9,608	9,461	4,398	4,275	4,285	0,000	0,160	0,320
c	25,731	53,986	101,603	15,443	60,287	51,954	78,458	40,423	22,043	0,100	7,190	26,675
b	2,899	1,798	0,867	3,853	2,133	2,942	1,009	3,407	1,877	0,100	25,945	1,490

Dobra korelacija između eksperimentalnih merenja i rezultata izračunatih prema kinetičkim modelima prikazana je u tabeli 45. Predstavljeni četvoroparametarski sigmoidni matematički model (za MKB vijabilnost i pH vrednosti tokom predviđenog perioda skladištenja) se može definisati kao jednostavan, robusan i tačan (svi koeficijenti utvrđivanja veći od 0,832). Matematički modeli imali su zanemarljiv nedostatak u pogledu fitovanja, što znači da su svi

modeli predstavili podatke na zadovoljavajući način. Visok r^2 je indikator da je uračunata varijacija i da su se podaci na zadovoljavajući način uklopili u predloženi model.

Tabela 45. Test korelacije eksperimentalnih merenja i rezultata predviđenih predloženim modelom tokom perioda skladištenja

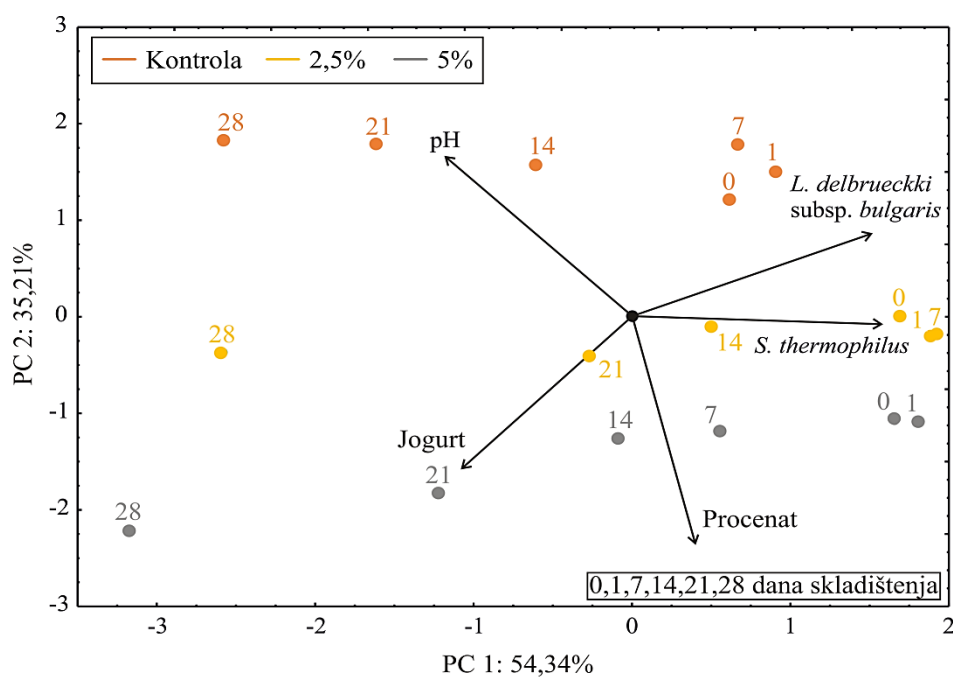
	χ^2	RMSE	MBE	MPE	r^2	Skew	Kurt	SD	Var.
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgari</i>									
Kontrola	0,140	0,216	0,000	1,974	0,832	-0,619	-0,572	0,237	0,056
2,5%	0,055	0,136	-0,003	1,297	0,969	0,197	-1,154	0,149	0,022
5,0%	0,099	0,182	0,006	1,934	0,925	-0,166	-1,748	0,199	0,040
<i>Streptococcus thermophilus</i>									
Kontrola	0,005	0,041	0,000	0,417	0,997	0,214	-1,831	0,045	0,002
2,5%	0,025	0,091	-0,003	0,831	0,972	0,483	0,010	0,099	0,010
5,0%	0,088	0,171	-0,002	1,717	0,920	-0,653	-1,007	0,187	0,035
pH vrednost									
Kontrola	0,000	0,012	0,000	0,234	0,950	-0,314	-0,217	0,013	0,000
2,5%	0,001	0,020	0,000	0,433	0,893	0,274	-2,064	0,022	0,000
5,0%	0,000	0,004	0,000	0,096	0,988	0,003	-2,457	0,005	0,000
Ukupan sadržaj karotenoida									
Kontrola	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2,5%	0,000	0,012	0,000	5,253	0,586	0,000	2,500	0,000	0,013
5,0%	0,000	0,003	0,000	0,823	0,993	-0,614	0,512	0,000	0,003

χ^2 – redukovan chi-kvadrat; RMSE – greška srednjeg kvadrata; MBE – srednja greška bias-a; MPE – srednja procentualna greška; r^2 – koeficijent determinacije; Skew. – eng. skewedness; Kurt. – eng. kurtosis; SD – standardna devijacija; Var. – varijansa.

Takođe, može se zaključiti da dodatak inkapsuliranih karotenoida nije pokazao statistički značajnu razliku u vijabilnosti MKB tokom celokupnog perioda skladištenja. Oba obogaćena jogurta, kao i kontrolni jogurt, nisu se promenili tokom 28 dana na 4 °C sa mikrobiološkog aspekta, ali jesu zbog delovanja oslobođenih karotenoida. Naime, blage promene boje i pH

vrednosti u poslednjih 7 dana perioda skladištenja sugerišu da bi rok upotrebe obogaćenih jogurta trebao biti 21 dan na 4 °C.

Analiza glavnih komponenti (eng. *principal component analysis*, u daljem tekstu PCA) sprovedena je na predstavljenim podacima u cilju vizuelizacije korelativnih odnosa između posmatranih parametara i ispitivanih uzoraka. Sa dijagrama se vidi da je PCA analizom dobijen model koji se sastojao od dve glavne komponente pri čemu je objašnjeno više od 70% ukupne varijanse, a koje su uzete u obzir prema Kaiserovom kriterijumu (Kaiser, 1960). Prva glavna komponenta (PC1) je objasnila 54,34% ukupne varijanse, dok je druga glavna komponenta (PC2) objasnila 35,21%. Biplot dijagram (slika 47) pokazuje da su *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* imale najveći pozitivan uticaj na PC1, objašnjavajući 33,0%, odnosno 30,3% varijanse, dok su pH vrednost (19,0%) i jogurt (15,7%) imali najveći negativan uticaj na PC1. Sa druge strane, pH vrednost je imala glavni pozitivan uticaj na PC2 pokazujući 23,8% varijanse, dok su jogurt (21,6%) i liofilizirane čestice inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe (48,2%) imale najveći negativan uticaj. Generalno, na početku skladištenja vrsta MKB kulture uticala je na kvalitet ispitivanih uzoraka, dok su uticaji pH vrednosti i jogurta bili izraženiji na kraju perioda skladištenja.



Slika 46. PCA biplot dijagram obogaćenog jogurta liofiliziranim česticama inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe

5.7.5. Senzorska ocena jogurta

U cilju procene senzorskih karakteristika obogaćenih jogurta inkapsulatom sporednog proizvoda prerade šargarepe u odnosu na komercijalni jogurt (kontrolni uzorak), sproveden je test dopadljivosti uz primenu hedonske skale sa 9 kategorija. Ukupna dopadljivost, boja, ukus, aroma i tekstura jogurta ocenjeni su od strane panela polutreniranih ocenjivača (4 muškarca, 11 žena, starosti od 23 do 45 godina). Na osnovu primenjene skale, smatra se da jogurt ima prihvatljiva senzorska svojstva za potrošače ukoliko je srednja ocena ukupne prihvatljivosti veća od 5 (niti mi se dopada, niti mi se ne dopada). Rezultati testa dopadljivosti prikazani su u tabeli 46, dok je "pauk" dijagram prikazan na slici 48.

Tabela 46. Senzorska ocena obogaćenog jogurta sa 2,5 i 5% liofiliziranih čestica inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe u odnosu na komercijalni jogurt (kontrola)

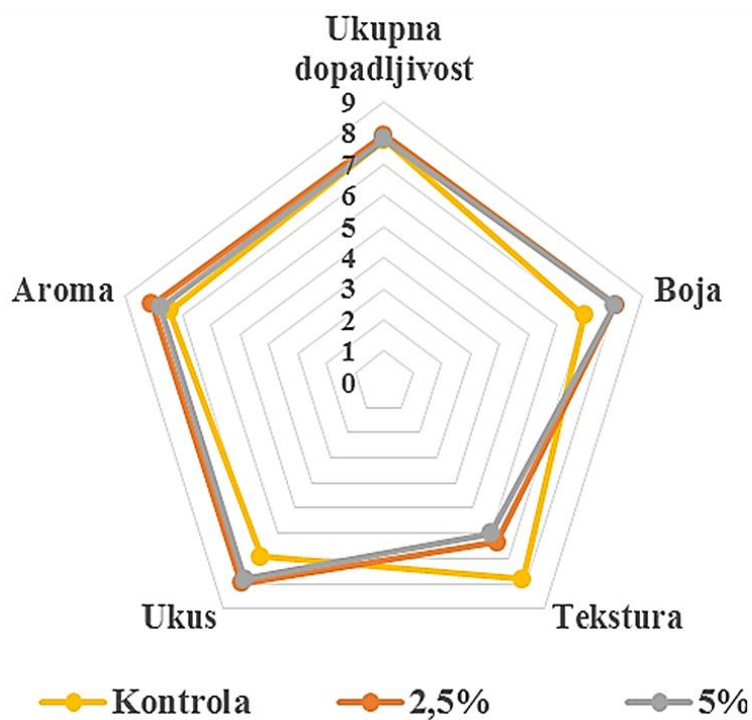
Parametar	Kontrola	2,5%	5%
Ukupna dopadljivost	7,77 ± 0,53 ^a	7,92 ± 0,65 ^a	7,79 ± 0,58 ^a
Boja	6,96 ± 0,93 ^a	8,03 ± 1,21 ^b	8,01 ± 1,96 ^b
Tekstura	7,82 ± 1,46 ^c	6,34 ± 0,87 ^b	5,99 ± 0,75 ^a
Ukus	6,91 ± 0,30 ^a	7,97 ± 0,52 ^b	7,83 ± 1,63 ^b
Aroma	7,44 ± 1,11 ^a	8,06 ± 1,78 ^b	7,74 ± 1,01 ^{ab}

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno ($P < 0,05$) razlikuju;

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 15$).

Na osnovu prikazanih rezultata, može se zaključiti da je obogaćivanje jogurta liofiliziranim česticama inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe imalo pozitivan uticaj na ukupnu dopadljivost, boju, aromu i ukus u odnosu na komercijalni jogurt, odnosno kontrolni uzorak. Negativan uticaj obogaćivanja odrazio se na teksturne osobine jogurta, što se može pripisati veličini čestica inkapsulata. Moghaddas Kia i sar. (2017) takođe su naveli da su senzorske karakteristike proizvoda, a naročito tekstura, u značajnoj korelaciji sa veličinom čestica inkapsulata kojim se obogaćuje namirnica. Sa druge strane, Krasaekoopt i Tandhanskul (2008) zabeležili su bolje rezultate senzorske analize za jogurt na bazi jagode koji je obogaćen

alginatnim česticama sa inkapsuliranim probioticima, gde su zrnastu teksturu poistovetili sa komadićima voća koji se često nalaze u obogaćenim jogurtima.



Slika 47. Senzorska ocena jogurta uz primenu testa dopadljivosti

6. Zaključak

U okviru ove disertacije sprovedena su ispitivanja primene klasične metode ekstrakcije za valorizaciju karotenoida iz sporednog proizvoda prerade šargarepe, primenom rastvarača koji je u skladu sa principima "zelene" hemije. U nastavku istraživanja izvršena je inkapsulacija dobijenog ekstrakta različitim tehnikama - *freeze drying* ili liofilizacija, *spray drying* ili sušenje u struji toplog vazduha i elektrostatička ekstruzija. U okviru fizičko-hemijskih karakteristika ispitani su parametri kvaliteta koji su značajni za njihovu primenu kao funkcionalnih dodataka u prehrambenim proizvodima. U završnom delu rada sprovedeno je ispitivanje primene inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe u proizvodnji testenine i jogurta sa poboljšanim nutritivnim i funkcionalnim svojstvima, kao i ispitivanje senzorske prihvatljivosti dobijenih proizvoda.

Na osnovu dobijenih rezultata karakterizacije ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Liofilizirani sporedni proizvod prerade šargarepe ekstrahovan je klasičnom metodom uz primenu suncokretovog ulja kao ekstragensa. Sadržaj ukupnih karotenoida u ekstraktu iznosio je 60,63 mg/kg, a najdominantniji karotenoid je β -karoten (40,10 mg/kg). Ukupan sadržaj tokoferola u ekstraktu iznosio je 514,70 mg/kg, a najzastupljeniji izomer bio je α -tokoferol (488,80 mg/kg). Od masnih kiselina najzastupljenije su linolna (~54,5%) i oleinska kiselina (36%), zatim palmitinska (~ 3,3%), stearinska (~5,9%) i palmitoleinska u tragovima.
- Ekstrakt sporednog proizvoda prerade šargarepe pokazao je izraženiju antioksidativnu i farmakološku aktivnost u odnosu na suncokretovo ulje, čime je potvrđena efikasnost karotenoida kao antioksidanata, ali i njihovog sinergističkog delovanja sa tokoferolima. Antioksidativna aktivnost ekstrakta određena β -karoten metodom i redukciona sposobnost iznosile su 159,54 i 30,04 $\mu\text{molTE}/100\text{ g}$, dok su antihiperglikemijska aktivnost i antiinflamatorna aktivnost imale vrednost od 49,01 i 53,28%.
- Tokom perioda skladištenja ekstrakta na sobnoj temperaturi (25 °C) u trajanju od 180 dana u tamnim uslovima (bez uticaja dnevne svetlosti) spektrofotometrijskom metodom utvrđena je retencija karotenoida ~70%, dok je pri skladištenju u svetlim uslovima (uslovima dnevne svetlosti) zabeleženo smanjenje ovih jedinjenja za više od 50%.

Navedenim rezultatima svedoče i izračunate vrednosti kinetičkih parametara, odnosno brzine degradacije (k) i vreme poluživota ($t_{1/2}$).

- CIE Lab hromatski parametri sugerišu da u ispitivanom ekstraktu dominira narandžasta boja ($a^*=16,66$; $b^*=62,50$), koju uslovljavaju prisutni pigmenti u sporednom proizvodu prerade šargarepe. Nakon perioda skladištenja od 180 dana uočene su promene u granicama vidljivosti golim okom ($\Delta E > 3$), a statistički izraženije promene zabeležene su za ekstrakt koji je skladišten u svetlim uslovima.
- Rezultati mikrobiološkog profila su potvrdili ispravnost pripremljenog ekstrakta u skladu sa dobrom laboratorijskom praksom, odnosno njegovu prihvatljivost za dalju upotrebu.

Na osnovu dobijenih rezultata optimizacije inkapsulacije karotenoida iz sporednog proizvoda prerade šargarepe freeze i spray drying tehnikama mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Za dobijanje optimalnih inkapsulata, za obe tehnike inkapsulacije, korišćena je optimizacija više odziva ili "multi-response" optimizacija. Za *freeze drying* tehniku inkapsulacije, formulacija nosača koja se sastoji od 100% proteina surutke daje optimalni uzorak u skladu sa postavljenim kriterijumima, odnosno najvećim sadržajem karotenoida, najvećom efikasnošću karotenoida i najvećom antioksidativnom aktivnošću. Za *spray drying* tehniku, kao najprikladnija formulacija nosača izdvojila se smeša od 71% proteina surutke i 29% inulina.
- Proverom predviđenih vrednosti ispitivanih odziva na optimalnim inkapsulatima dobijenim *freeze drying* (FDI) i *spray drying* tehnikom (SDI), potvrđeno slaganje dobijenih rezultata unutar poverenja od 95%.

Na osnovu dobijenih rezultata karakterizacije optimalnih inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih freeze i spray drying tehnikama mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Rezultati ispitivanja morfoloških karakteristika pokazali su da se FDI i SDI inkapsulati sastoje od čestica nepravilne strukture, različite veličine i poroznosti. Pored toga, obe tehnike inkapsulacije su dale čestice koje su grupisane u agregate različitih dimenzija, što je posledica neinkapsuliranog uljanog ekstrakta na njihovim površinama.

- Za oba inkapsulata, FTIR spektroskopska analiza pokazala je da nema značajnih hemijskih interakcija između aktivne komponente, odnosno ekstrakta i nosača, što ukazuje da su ova jedinjenja formirala fizičku smešu unutar inkapsulata. Raman spektroskopskom analizom su potvrđene trake karakteristične za ekstrakt, odnosno aktivne komponente, što ukazuje na njegovu prisutnost na površini inkapsulata.
- U FDI i SDI inkapsulatima zabeležene su izuzetno niske vrednosti aktivnosti vode (manje od 0,2), te je jedan od zaključaka da predstavljaju mikrobiološke stabilne sastojke sa mogućnošću primene u različitim prehrambenim proizvodima. Takođe, određen sadržaj vlage u navedenim uzorcima je manji od 5%, što je u okviru opsega kojim se ispunjava zahtev kvaliteta za ovu vrstu proizvoda. Nakon sedam dana skladištenja inkapsulata u uslovima relativne vlažnosti od 75%, utvrđena je nehigroskopna priroda oba inkapsulata. Ispitivane fizičke karakteristike inkapsulata su prihvatljive sa aspekta primene.
- *Freeze drying* tehnikom ostvaren je oko 20% veći prinos inkapsulata u odnosu na *spray drying* tehniku, ali se generalno može zaključiti da se dobijeni rezultati za obe tehnike mogu smatrati dobrim prinosom. FDI i SDI inkapsulati pokazuju i visoke vrednosti indeksa rastvorljivosti u vodi (oko 55%).
- Analiza raspodele veličine čestica pokazala je značajne razlike između dobijenih inkapsulata, koje potiču od primenjenih tehnika sušenja. *Freeze drying* tehnika daje inkapsulate većih dimenzija, sa utvrđenim srednjim prečnikom od 195,98 μm , dok se *spray drying* tehnika smatra pogodnom metodom za proizvodnju manjih čestica, s obzirom da prolaze kroz sistem za raspršivanje (srednji prečnik - 20,94 μm).
- Značajno veće vrednosti nasipne i tapkane gustine određene su za SDI uzorak, te je inkapsulat dobijen ovom tehnikom pogodniji sa tehnološkog aspekta. U pogledu indeksa kompresibilnosti i Hausnerovog odnosa, oba inkapsulata spadaju u kategoriju zadovoljavajuće protočnosti i visoke kohezivnosti.
- Rezultati određivanja oksidativne stabilnosti na bazi Rancimat testa potvrdili su duži indukcioni period za FDI i SDI inkapsulate u odnosu na ekstrakt sporednog proizvoda prerade šargarepe.
- Tokom perioda skladištenja inkapsulata na sobnoj temperaturi (25 °C), u trajanju od 180 dana, u svetlim i tamnim uslovima, najveća retencija karotenoida zabeležena je za SDI

inkapsulat koji je skladišten u tamnim uslovima (82%), dok je najmanju retenciju pokazao FDI inkapsulat skladišten u uslovima dnevne svetlosti (65%).

- Boja inkapsulata uslovljena je bojom ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe. Kod FDI inkapsulata izraženija je žuta boja ($b^*=37,72$) u poređenju sa SDI inkapsulatom ($b^*=24,90$). Nakon perioda skladištenja od 180 dana zabeležene su značajne promene u CIE Lab parametrima, što je u skladu i sa retencijom karotenoida u ovim inkapsulatima.
- Sadržaj karotenoida (28,02 mg/kg), tokoferola (243,98 mg/kg), proteina (425,51 mg/100 g) i furozina (487,03 mg/100 g proteina) bio je viši u FDI inkapsulatu. Nešto niži sadržaji određeni su kod SDI inkapsulata, odnosno 26,03 mg/kg karotenoida, 228,13 mg/kg tokoferola, 31,32 mg/100 g proteina i 407,21 mg/100 g proteina.
- Kada je reč o antioksidativnoj i farmakološkoj aktivnosti, nakon *in vitro* simulirane gastrointestinalne digestije značajno više vrednosti zabeležene su za FDI uzorak.

Na osnovu dobijenih rezultata karakterizacije testenine obogaćene inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenih freeze i spray drying tehnikama mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Supstitucija dela krupice durum pšenice (semoline) inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe, odrazila se na promene sadržaja gotovo svih ispitivanih jedinjenja. Porast udela inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe u formulaciji testenine doprineo je povećanju sadržaja karotenoida, tokoferola i furozina. Pored jedinjenja koja su prisutna u inkapsulatima, u svim uzorcima testenine detektovano je prisustvo luteina i zeaksantina, kao i α - i β -tokotrienola koji su potiču od durum pšenice.
- Sadržaj ukupnih karotenoida za uzorke nekuvane testenine sa udelom FDI i SDI inkapsulata od 10% povećan je za 56,15% i 63,59%, dok je za udeo ovih inkapsulata od 20% određen 99,23%, odnosno 118,72% veći sadržaj u odnosu na kontrolni uzorak. Obogaćivanje testenine sa 10% FDI, odnosno 10% SDI rezultiralo je povećanjem sadržaja ukupnih tokoferola za 32,62%, odnosno 38,65%, dok je sa udelom ovih inkapsulata u nivou od 20% sadržaj ukupnih tokoferola povećan za 100,29%, odnosno 88,74%

- Tokom kuvanja testenine sadržaj ukupnih karotenoida smanjio se u opsegu od 2,30% do 22,49%, pri čemu su veći gubici zabeleženi za uzorke testenine obogaćene FDI inkapsulatima. Veći gubici karotenoida kod ovih uzoraka koreliraju sa prisustvom ovih jedinjenja na površini inkapsulata. Gubitak tokoferola tokom kuvanja testenine bio je u opsegu od 3,91% do 12,17%.
- Rezultati antioksidativne i farmakološke aktivnosti kuvanih i digestiranih uzoraka testenine ukazuju da se sa povećanjem udela inkapsulata u formulacijama povećava i antioksidativna, antihiperглиkemijska i antiinflamatorna efikasnost.
- Tokom procesa proizvodnje testenine ostvaren je zadovoljavajući nivo higijene. Takođe, nisu uočene značajne razlike u broju ispitivanih mikroorganizama između kontrolnog uzorka testenine i obogaćenih uzoraka, na osnovu čega se zaključuje da je uključivanje inkapsulata kao funkcionalnih dodataka bezbedno sa mikrobiološkog stanovišta.
- Instrumentalnim određivanjem boje ustanovljeno je da obogaćeni uzorci testenine imaju veći udeo crvene boje (više vrednosti a*) i veći udeo žute boje (više vrednosti b*), a razlike u boji nastale usled supstitucije dela semoline inkapsulatima sporednog proizvoda prerade šargarepe vidljive su golim okom. Kuvane testenine su svetlije, sa smanjenim intenzitetom crvenih i žutih tonova u odnosu na nekuvane uzorke.
- Supstitucija dela semoline FDI i SDI inkapsulatima doprinosi promenama u kvalitetu kuvanih testenina, koje se ogledaju u povećanju vremena kuvanja testenine, smanjenju procenta raskuvavanja testenina, smanjenju sposobnosti apsorpcije vode i lepljivosti, u odnosu na kontrolni uzorak. Promene koeficijenta povećanja zapremine zabeležena je samo kod uzoraka obogaćenih SDI inkapsulatom.
- Na osnovu rezultata senzorske ocene testenine, uz primenu panela polutreniranih ocenjivača, može se zaključiti da je bolji senzorski kvalitet postignut kod testenine obogaćene sa 10% FDI i 10% SDI inkapsulata. Kada je u pitanju testenina sa 10% FDI inkapsulata, svi ispitivani parametri osim teksture su ocenjeni bolje od kontrolnog uzorka, dok je testenina sa 10% SDI ocenjena bolje u pogledu ukusa i arome.
- Testenina boljeg senzorskog kvaliteta imala je veći sadržaj makronutrijenata (proteina, masti i celuloze) u odnosu na kontrolnu testeninu.
- Na osnovu preporučenih RDA vrednosti za karotenoide, konzumacijom jedne porcije testenine (85 g) sa 10% FDI optimalnog inkapsulata sporednog proizvoda prerade

šargarepe može se obezbediti 23% preporučenog dnevnog unosa, dok se konzumacijom porcije testenine sa 10% SDI optimalnog inkapsulata može obezbediti 25% preporučenog dnevnog unosa karotenoida. Uzimajući u obzir preporučene RDA vrednosti za vitamin E (α -tokoferol), konzumiranjem porcije 10% FDI testenine može se obezbediti 9,6% preporučenog dnevnog unosa, dok konzumiranje porcije 10% SDI testenine može obezbediti 10,93% preporučenog dnevnog unosa ovog vitamina.

Na osnovu dobijenih rezultata karakterizacije inkapsulata sporednog proizvoda prerade šargarepe dobijenog tehnikom elektrostatičke ekstruzije mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Rezultati mikroskopske analize hidrogel i liofiliziranih čestica inkapsulata ekstrakta sporednog proizvoda prerade šargarepe ukazali su na redukciju veličine čestica za oko 20% nakon procesa sušenja, kao i to da su sve dobijene čestice imale sferni oblik. Na SEM mikrografijama se ne uočava agregacija čestica, dok su primetne pukotine i izražena porozna površinska struktura čestica.
- FTIR spektroskopska analiza pokazala je da ne postoji jaka interakcija između alginata i smeše ulje/karotenoidi, odnosno da nakon formiranja kapsula Ca-alginata ove dve faze najverovatnije ostaju razdvojene. Raman spektroskopskom analizom potvrđeno je prisustvo suncokretovog ulja i ekstrahovanih karotenoida na površini čestica Ca-alginata.
- Za dobijeni inkapsulat određeni su ukupan sadržaj karotenoida od 3,65 mg β -karotena/100g, efikasnost inkapsulacije od 72,63% i retencija karotenoida od 81,54% nakon perioda skladištenja od 90 dana na sobnoj temperaturi ($25 \pm 5^\circ\text{C}$).
- Antioksidativna aktivnost određena β -karoten metodom i redukciona sposobnost inkapsulata iznosile su 73,68 i 20,19 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$, dok su vrednosti antihiperglikemijske i antiinflamatorne aktivnosti inkapsulata bile 26,87% i 21,36%.

Na osnovu dobijenih rezultata karakterizacije jogurta obogaćenog inkapsulatom sporednog proizvoda prerade šargarepe mogu se izvesti sledeći zaključci:

- U odnosu na kontrolni uzorak, uzorci obogaćenog jogurta pokazali su poboljšana antioksidativna, antihiperглиkemijska i antiinflamatorna svojstva, proučavana nakon *in vitro* simuliranog gastrointestinalnog varenja.
- Instrumentalnim merenjem parametara boje uočene su značajne razlike između početnih vrednosti parametra b^* kontrolnog jogurta i obogaćenih uzoraka. Nakon perioda skladištenja od 28 dana, primećena je veća zastupljenost žute boje za obogaćene uzorke jogurta, što je direktno uticalo i na promene vrednosti L^* i a^* . Ovi rezultati su u korelaciji sa oslobađanjem karotenoida iz inkapsulata u medijumu jogurta tokom perioda skladištenja.
- Higijena tokom procesa inkapsulacije je bila na zadovoljavajućem nivou uz dobru laboratorisku praksu. Mikrobiološki profil kontrolnog jogurta je bio odgovarajući za konzumaciju, s obzirom da prisustvo kontaminenata nije primećeno nakon procesa fermentacije i pakovanja jogurta.
- Dodatak inkapsuliranih karotenoida nije pokazao statistički značajan uticaj na vijabilnost mlečno-kiselinskih bakterija tokom celokupnog perioda skladištenja. Dobile vrednosti broja mlečno-kiselinskih bakterija (*Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbreuckii* subsp. *bulgaris*) su iznad preporučenog minimuma od 6 log CFU/ml za zdravstveno poboljšavajući efekat jogurta.
- Jogurt obogaćen inkapsulatom (2,5 i 5%), kao i kontrolni jogurt, nisu se promenili tokom 28 dana skladištenja na 4 °C sa mikrobiološkog aspekta, dok su primetne promene uzrokovane oslobađanjem karotenoida iz inkapsulata i promenom pH vrednosti. Blage promene boje i pH u poslednjih 7 dana perioda skladištenja sugerišu da bi rok upotrebe obogaćenog jogurta trebao biti 21 dan na 4 °C.
- Na osnovu kinetičkih studija vijabilnosti mlečno-kiselinskih bakterija, pH vrednosti i ukupnog sadržaja karotenoida utvrđena je mikrobiološka i fizičko-hemijska stabilnost obogaćenog jogurta tokom celokupnog perioda skladištenja.
- Na osnovu senzorskih ocena jogurta od strane panela polutreniranih ocenjivača, obogaćivanje jogurta inkapsulatom sporednog proizvoda prerade šargarepe imalo je

pozitivan uticaj na ukupnu dopadljivost, aromu i ukus u odnosu na komercijalni jogurt. Negativan uticaj obogaćivanja odrazio se na teksturne osobine jogurta.

- Na osnovu preporučenih RDA vrednosti za karotenoide, konzumiranjem jedne čaše jogurta (180 g) sa 2,5% inkapsulata može se obezbediti 8% datog zahteva, dok čaša jogurta sa 5% inkapsulata ispunjava 16% dnevnih potreba za karotenoidima.

7. Literatura

Abdel-Aal, E.M., Young, J.C., Rabalski, I., Hucl, P., Fregeau-Reid, J. (2007). Identification and quantification of seed carotenoids in selected wheat species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 787-794.

Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 30, 1688-1713.

Adegunwa, M.O., Bakare, H.A., Akinola, O.F. (2012). Enrichment of noodles with soy flour and carrot powder. *Nigerian Food Journal*, 30, 74-81.

Agbaje, E.O., Fageyinbo, M.S., Alabi, O.O. (2017). Gastro-duodenal protective effect of aqueous leaf extract of *Daucus carota* sativus Linn. (Apiaceae) in rats and its possible mechanism of action. *The Journal of Phytopharmacology*, 6, 156-163.

Aglawe, N., Bobade, H.P. (2018). Utilization of carrot pomace powder for preparation of sweet fried cookies (Shankarpali) based on various blends. *International Journal of Engineering Research & Technology*, 7, 237-240.

Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N., Aminabhavi, T.M. (2004). Recent advances on chitosan-based microand nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 100, 5-28.

Aguirre Calvo, T.R., Busch, V.M., Santagapita, P.R. (2017). Stability and release of an encapsulated solvent-free lycopene extract in alginate-based beads. *Food Science and Technology*, 77, 406-412.

Ahmad, I., Khalique, A., Junaid, M., Shahid, M.Q., Imran, M., Rashid, A.A. (2020). Effect of polyphenol from apple peel extract on the survival of probiotics in yoghurt ice cream. *International Journal of Food Science & Technology*, 55, 2580-2588.

Ahmad, T., Cawood, M., Iqbal, Q., Ariño, A., Batool, A., Tariq, R., Azam, M., Akhtar, S. (2019). Phytochemicals in *Daucus carota* and their health benefits-Review article. *Foods*, 8, 424.

Ahmed, M., Akter, M.S., Lee, J., Eun, J. (2010). Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *Food Science and Technology*, 43, 1307-1312.

Akkaya, M.R., Cil, A., Cil, A.N., Yuce, H., Kola, O. (2019). The influence of sowing dates on the oil content and fatty acid composition of standard, mid-oleic and high-oleic types of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Food Science and Technology*, 39, 448-453.

Alam, M.S., Gupta, K., Khaira, H., Javed, M. (2013). Quality of dried carrot pomace powder as affected by pretreatments and methods of drying. *Agricultural Engineering International*, 15, 236-243.

Alasalvar, C., Al-Farsi, M., Quantick, P.C., Shahidi, F., Wiktorowicz, R. (2005). Effect of chill storage and modified atmosphere packaging (MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots. *Food Chemistry*, 89, 69-76.

Alasalvar, C., Grigor, J.M., Zhang, D., Quantick, P.C., Shahidi, F. (2001). Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1410-1416.

Alexander, N., Rowe, S., Brackett, R.E., Burton-Freeman, B., Hentges, E.J., Kretser, A., Klurfeld, D.M., Meyers, L.D., Mukherjea, R., Ohlhorst, S. (2015). Achieving a transparent, actionable framework for public-private partnerships for food and nutrition research. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 101, 1359-1363.

Allen, T.T. (2006). *Introduction to engineering statistics and six sigma: statistical quality control and design of experiments and systems*. Springer Science & Business Media.

Al-Saikhan, M.S., Howard, L.R., Miller, JrJC. (1995). Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum*, L.). *Journal of Food Science*, 60, 341-343.

Anastas, P.T., Warner, J.C. (1998). Principles of green chemistry. In: Anastas, P.T. (Ed), *Green chemistry: Theory and practice*, pp. 29-56.

Anderson, L.K. (1975). Extraction of carotenoid pigment from shrimp processing waste. US Patent 3,906, 112.

Angkananon, W., Anantawa, V. (2015). Effects of spray drying conditions on characteristics, nutritional value and antioxidant activity of Gac fruit aril powder. *Review of Integrative Business & Economics Research*, 4, 1-11.

Ariahu, C.C., Kamaldeen, O.S., Yusufu, M.I. (2020). Kinetic and thermodynamic studies on the degradation of carotene in carrot powder beads. *Journal of Food Engineering*, 288, 110145.

Arioui, F., Ait Saada, D., Cheriguene, A. (2016). Physicochemical and sensory quality of yogurt incorporated with pectin from peel of *Citrus sinensis*. *Food science & Nutrition*, 5, 358–364.

Arscott, S. Tanumihardjo, S. (2010). Carrots of many colors provide basic nutrition and bioavailable phytochemicals acting as a functional food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 223-239.

Ayerdi Gotor, A., Berger, M., Labalette, F., Centis, S., Dayde, J., Calmon, A. (2015). Comparative analysis of fatty acids, tocopherols and phytosterols content in sunflower cultivars (*Helianthus annuus*) from a three-year multi-local study. *φYTON*, 84, 14-25.

Ayoub, M., de Camargo, A.C., Shahidi, F. (2016). Antioxidants and bioactivities of free, esterified and insoluble-bound phenolics from berry seed meals. *Food Chemistry*, 197, 221-232.

Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Azizi, F. (2013). Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 12, 43.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.

Bao, B., Chang, K.C. (1994). Carrot pulp chemical composition, colour and water-holding capacity as affected by blanching. *Journal of Food Science*, 59, 1159–1161.

Baranska, M., Schulz, H., Baranski, R., Nothnagel, T., Christensen, L.P. (2005). *In situ* simultaneous analysis of polyacetylenes, carotenoids and polysaccharides in carrot roots. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 6565-6571.

Baranski, R., Maksylewicz-Kaul, A., Nothnagel, T., Cavagnaro, P.F., Simon, P.W., Grzebelus, D. (2012). Genetic diversity of carrot (*Daucus carota* L.) cultivars revealed by analysis of SSR loci. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59, 163-170.

Barbosa, M.I.M.J., Borsarelli, C.D., Mercadante, A.Z. (2005). Light stability of spray dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food Research International*, 38, 989-994.

Baria, B., Upadhyay, N., Singh, A. K., Malhotra, R.K. (2019). Optimization of 'green' extraction of carotenoids from mango pulp using split plot design and its characterization. *Food Science and Technology*, 104, 186–194.

Basu, H.N., Del-Vecchio, A. (2001). Encapsulated carotenoid preparations from high-carotenoid canola oil and cyclodextrins and their stability. *The Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 375–380.

Bertolino, M., Barbosa-Pereira, L., Ghirardello, D., Botta, C., Rolle, L., Guglielmetti, A., Borotto Dalla Vecchia, S., Zeppa, G. (2019). Coffee silver skin as nutraceutical ingredient in yogurt: its effect on functional properties and its bioaccessibility. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 4267-4275.

Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escaleira, L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76, 965-977.

Bicudo, M.O.P., J6, J., de Oliveira, G.A., Chaimsohn, F.P., Sierakowski, M.R., de Freitas, R.A., Ribani, R.H. (2015). Microencapsulation of juçara (*Euterpe edulis* M.) pulp by spray drying using different carriers and drying temperatures. *Drying Technology*, 33, 153-161.

Biesalski, H.K., Böhles H., Esterbauer, H., Fürst, P., Gey, F., Hundsdörfer, G., Kasper, H., Sies, H., Weisburger, J. (1997) Antioxidant vitamins in prevention. *Clinical Nutrition*, 16, 151-155.

Biesalski, H.K., Böhles, H., Esterbauer, H., Furst, P., Gey, F., Hundsdorfer, G., Kasper, H., Sies, H., Weisburger, J. (1997). Antioxidant vitamins in prevention. *Clinical Nutrition*, 16, 151-155.

Bohm, V., Otto, K., Weissleder, F. (1999). Yield of juice and carotenoids of the carrot juice production. Symposium Jena-Thuringen. Germany, pp. 115-119.

Borgogna, M., Bellich, B., Zorzin, L., Lapasin, R., Cesàro, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterization of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122, 416-423.

Bornkessel, S., Broring, S., Omta, S.O., van Trijp, H. (2014). What determines ingredient awareness of consumers? A study on ten functional food ingredients. *Food Quality and Preference*, 32, 330-339.

Borowska, E.J., Pitat, B., Narwojsz, A., Urban, P. (2017). The effect of drying methods on the content of selected bioactive compounds and fibre in carrot pomace. *Polish Journal of Natural Science*, 32, 11-321.

Borrelli, G.N., De Leonardis, A.M., Platani, C., Troccoli, A. (2008). Distribution along durum wheat kernel of the components involved in semolina colour. *Journal of Cereal Science*, 48, 494-502.

Bragazzi, N. L., Martini, M., Saporita, T. C., Nucci, D., Gianfredi, V., Maddalo, F., Di Capua, A., Tovani, F. and Marensi, L. (2017). Nutraceutical and functional food regulations in the European Union. In: Nair, S. (Ed.), *Developing New Functional Food and Nutraceutical Products*. Academic Press, San Diego, pp. 309-322.

Brandolini, A., Hidalgo, A., Gabriele, S., Heun M. (2015). Chemical composition of wild and feral diploid wheats and their bearing on domesticated wheats. *Journal of Cereal Science*, 63, 122–127.

Brandolini, A., Lucisano, M., Mariotti, M., Hidalgo, A. (2018). A study on the quality of einkorn (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum*) pasta. *Journal of Cereal Science*, 82, 57-64.

Brereton, R.G. (2007). *Applied chemometrics for scientists*. John Wiley & Sons.

Brigellius-Flohem R., Traber, M.G. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*, 13, 1145-1155.

Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal*, 9, 1551-1558.

Browne, D., Williams, M.A., Maxwell, A.P., McGuinness, B., Passmore, P., Silvestri, G., Woodside, J.V., McKay, G.J. (2019). Serum xanthophyll carotenoids are associated with estimated glomerular filtration rate in an aged cohort. *Scientific Reports*. 9, 17068.

Burges, D., Hickey, A. (2007). Microsphere technology and applications. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 3rd edition, Swarbrick J. (Ed), Informa Healthcare. New York, pp. 2328-2338.

Burton, G.W., Ingold, K.U. (1984). Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224, 569-573.

Bustos, M. C., Pérez, G. T., León, A. E. (2015). Structure and quality of pasta enriched with functional ingredients. *RSC Advances*, 5, 30780–30792.

Bustos, M.C., Pérez, G.T., León, A.E. (2011). Effect of four types of dietary fiber on the technological quality of pasta. *Food Science and Technology International*, 17, 213–219.

Bylaitė, E., Rimantas Venskutonis, P., Maždpierienė, R. (2001). Properties of caraway (*Carum carvi* L.) essential oil encapsulated into milk protein-based matrices. *European Food Research and Technology*, 212, 661–670.

Cai, Y.Z., Corke, H. (2000). Production and properties of spray-dried amaranthus betacyanin pigments. *Journal of Food Science*, 65, 1248-1252.

Caldeira, C., De Laurentiis, V., Corrado, S., van Holsteijn, F., Sala, S. (2019). Quantification of food waste per product group along the food supply chain in the European Union: a mass flow analysis. *Resources, Conservation and Recycling*, 149, 479-488.

Calín-Sánchez, A., Adam Figiel, A., Hernández, F., Melgarejo, P., Lech, K., Carbonell-Barrachina, A.A. (2013). Chemical composition, antioxidant capacity, and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) arils and rind as affected by drying method. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 1644–1654.

Caliskan, G., Dirim, S.N. The effect of different drying processes and the amounts of maltodextrin addition on the powder properties of sumac extract powders. *Powder Technology*, 287, 308-314.

Cam, M., Icyer, N.C., Erdogan, F. (2014). Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *Food Science and Technology*, 55, 117-123.

Camorani, P., Chiavaro, E., Cristofolini, L., Paciulli, M., Zaupa, M., Visconti, A., Fogliano, V., Pellegrini, N. (2015). Raman spectroscopy application in frozen carrot cooked in different ways and the relationship with carotenoids. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 95, 2185-2191.

Cano-Higuita, D.M., Velez, H.A.V., Telis, V.R.N. (2015). Microencapsulation of turmeric oleoresin in binary and ternary blends of gum Arabic, maltodextrin and modified starch. *Ciencia Agrotecnologia*, 36, 173-182.

Caparino, O.A., Tang, J., Nindo, C.I., Sablani, S.S., Powers, J.R., Felman, J.K. (2012). Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (Philippine ‘Carabao’ var.) powder. *Journal of Food Engineering*, 111, 135-148.

Caponio, F., Bilancia, M.T., Pasqualone, A., Sikorska, E., Gomes, T. (2005). Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage. *European Food Research Technology*, 221, 92-98.

Casanova, F, Santos, L. (2016). Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application--a review. *Journal of Microencapsulation*, 33, 1-17.

Chan, L.W., Tan, L.H., Heng, P.W.S. (2008). Process analytical technology: application to particle sizing in spray drying. *AAPS PharmSciTech*, 9, 259-266.

Chandra, P., Kishore, K., Ghosh, A.K. (2015). Assessment of antisecretory, gastroprotective, and *in vitro* antacid potential of *Daucus carota* in experimental rats. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 6, 329-335.

Chen, C., Chi, Y., Xu, W. (2012). Comparisons on the functional properties and antioxidant activity of spray dried and freeze-dried egg white protein hydrolysate. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 5342-2352.

Chillo, S., Laverse, J., Falcone, P. M., Protopapa, A., Del Nobile, M. A. (2008a). Influence of the addition of buckwheat flour and durum wheat bran on spaghetti quality. *Journal of Cereal Science*, 47, 144-152.

Chillo, S., Laverse, J., Falcone, P.M., Del Nobile, M.A. (2008b). Quality of spaghetti in base amaranthus wholemeal flour added with quinoa, broad bean and chick pea. *Journal of Food Engineering*, 84, 101-107.

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

Cho, A.S., Jeon, S.M., Kim, M.J., Yeo, J., Seo, K.J., Choi, M.S., Lee, M.K. (2010). Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 937-943.

Christensen, L.P., Brandt, K. (2006). Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: occurrence, bioactivity and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 683-693.

Chuyen, H.V., Roach, P.D., Golding, J.B., Parks, S.E., Nguyen, M.H. (2019). Encapsulation of carotenoid-rich oil from Gac peel: Optimisation of the encapsulating process using a spray drier and the storage stability of encapsulated powder. *Powder Technology*, 344, 373-379.

Čolak, E. (2012). Povezanost oksidativnog stresa, inflamacije i dislipidemije u patogenezi senilne degeneracije makule. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet Beograd.

Čolović, D. (2014). Ispitivanje uticaja procesa ekstrudiranja na dobijanja i stabilnost funkcionalnog hraniva za životinje n abazi lanenog semena. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.

Consensus Document (1999): Scientific Concepts of Functional Foods in Europe. *British Journal of Nutrition*, 81, 1-27.

Coppens, P., Fernandes da Silva, M., Pettman S. (2006). European regulations on nutraceuticals, dietary supplements and functional foods: A framework based on safety. *Toxicology*, 221, 59-74.

Corrêa-Filho, L.C., Lourenço, M.M., Moldão-Martins, M., Alves, V.D. (2019). Microencapsulation of β -carotene by spray drying: Effect of wall material concentration and drying inlet temperature. *International Journal of Food Science*, 2019, 8914852.

Correia, R., Grace, M.H., Esposito, D., Lila, M.A. (2017). Wild blueberry polyphenol-protein food ingredients produced by three drying methods: comparative physico-chemical properties, phytochemical content, and stability during storage. *Food Chemistry*, 235, 76-85.

Couvreur, P., Barratt, G., Fattal, E., Legrand, P., Vauthier, C. (2002). Nanocapsule Technology: A Review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 19, 99-134.

Coyne, T., Ibiebele, T.I., Baade, P.D., Dobson, A., McClintock, C., Dunn, S., Leonard, D., Shaw, J. (2005). Diabetes mellitus and serum carotenoids: findings of a population-based study in Queensland, Australia. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82, 685-693.

Czepa, A., Hofmann, T. (2004). Quantitative studies and sensory analyses on the influence of cultivar, spatial tissue distribution, and industrial processing on the bitter off-taste of carrots (*Daucus carota* L.) and carrot products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4508-4514.

Da Silva Dias, J.C. (2014). Nutritional and health benefits of carrots and their seed extracts. *Food and Nutrition Science*, 5, 2147-2156.

Da Silva, H.R.P., Iwassa, I.J., Marques, J., Postau, N., Stevanato, N., da Silva, C. (2020). Enrichment of sunflower oil with β -carotene from carrots: Maximization and thermodynamic

parameters of the β -carotene extraction and oil characterization. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44, e14399.

Dalla Costa, A.P., Silveira Thys, R.C., De Oliveira, A., Hickmann Flores, S., (2016). Carrot flour from minimally processed residue as substitute of β - Carotene commercial in dry pasta prepared with common wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Food Quality*, 39, 590-598.

Darko, D., Dornhorst, A., Kelly, F.J., Ritter, J.M., Chowienczyk, P.J. (2002). Lack of effect of oral vitamin C on blood pressure, oxidative stress and endothelial function in Type II diabetes. *Clinical Science (Lond)*, 103, 339-44.

Davidov-Pardo, G., Arozarena, I., Marín-Arroyo, M.R. (2013). Optimization of a wall material formulation to microencapsulate a grape seed extract using a mixture design of experiments. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 941–951.

De Andrade Lima, M., Kestekoglou, I., Charalampopoulos, D., Chatzifragkou, A. (2019). Supercritical fluid extraction of carotenoids from vegetable waste matrices. *Molecules*, 24, 466.

De Barros Fernandes, R.V., Vilela Borges, S., Alvarenga Botrel, D., de Oliveira, C.R. (2013). Physical and chemical properties of encapsulated rosemary essential oil by spray drying using whey protein–inulin blends as carriers. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 1522-1529.

De Lima, J.G., Brito-Oliveira, T.C., de Pinho, S.C. (2016). Characterization and evaluation of sensory acceptability of ice creams incorporated with beta-carotene encapsulated in solid lipid microparticles. *Food Science and Technology*, 36, 664-671.

De Noni, I., Pagani, M.A. (2010). Cooking properties and heat damage of dried pasta as influenced by raw material characteristics and processing conditions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 465-472.

De Oliveira Cavalcanti Medeiros, A.K., de Carvalho Gomes, C., de Araújo Amaral, M.L.Q., de Medeiros, L.D.G., Medeiros, I., Lopes Porto, D., Soares Aragão, C.F., Maciel, B.L.L., de Araújo Morais, A.H., Souza Passos, T. (2019). Nanoencapsulation improved water solubility and color

stability of carotenoids extracted from Cantaloupe melon (*Cucumis melo* L.). Food Chemistry, 270, 562-572.

Desai, A., Brennan, M.A., Brennan, C.S. The effect of semolina replacement with protein powder from fish (*Pseudophycis bachus*) on the physicochemical characteristics of pasta. Food Science and Technology, 89, 52-57.

Dias, D.R., Botrel, D.A., Fernandes, R.V.D.B., Borges, S.V. (2017). Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. Current Opinion in Food Science, 13, 31-37.

Dick, J.W., Youngs, V.L. (1988). Evaluation of durum wheat, semolina, and pasta in the United States. In: Fabriani, G., Lintas, C. (Eds), Durum Wheat: Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, pp. 237–248.

Digesu, A.M., Platani, C., Cattivelli, L., Mangini, G., Blanco, A. (2009). Genetic variability in yellow pigment components in cultivated and wild tetraploid wheats. Journal of Cereal Science, 50, 210-218.

Direktiva Evropskog parlamenta. (2008). Directive 2008/98/EC on waste (Waste Framework Directive). <https://ec.europa.eu/environment/waste/framework/>

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

Donati, I., Paoletti, S. (2009). Material Properties of Alginates. In: Rehm, H.A.B. (Ed.), Alginates: Biology and Applications. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-54.

Duda, A., Adamczak, J., Chełmińska, P., Juskiewicz, J., Kowalczewski, P. (2019). Quality and nutritional/textural properties of durum wheat pasta enriched with cricket powder. Foods, 8.

Dulinski, R., Byczynski, L., Karbowski, A. (2020). The effect of *Arthrospira platensis* (spirulina) addition on the content of selected mineral elements, carotenes, and antioxidant potential in alginate gel beads. International Journal of Food Engineering, 16, 4.

Durante, M., Lenucci, M.S., Gazza, L., Taddei, F., Nocente, F., De Benedetto, G.E., De Caroli, M., Piro, G., Mita, G. (2019). Bioactive composition and sensory evaluation of innovative spaghetti supplemented with free or α -cyclodextrin chlated pumpkin oil extracted by supercritical CO₂. *Food Chemistry*, 294, 112-122.

Dutta, D., Chaudhuri, U.R., Chakraborty, R. (2005). Review, structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. *African Journal of Biotechnology*, 4, 1510-1520.

EFSA (European Food Safety Authority) (2015a). Parma, Italy, scientific opinion on dietary reference values for vitamin E as α -tocopherol. *EFSA Journal*, 13, 4149.

Egan, A.M., Dinneen, S.F. (2014). What is diabetes? *Diabetes: Basic facts*, 42, 679-681.

Ellwood, K.C., Trumbo, P.R. Kavanaugh, C.J. (2010). How the US food and drug administration evaluates the scientific evidence for health claims. *Nutrition Reviews*, 68,114-121.

El-Messery, T.M., El-Said, M.M., Shahein, N.M., El-Din, H.M.F., Farrag, A. (2019). Functional yoghurt supplemented with extract orange peel encapsulated using coacervation technique. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 22, 231-238.

Elvira-Torales, L.I., García-Alonso, J., Periago-Castón, M.J. (2019). Nutritional importance of carotenoids and their effect on liver health: A Review. *Antioxidants*, 8, 229.

Escalona-García, L. A., Pedroza-Islas, R., Natividad, R., Rodríguez-Huezo, M.E., CarrilloNavas, H., Perez-Alonso, C. (2016). Oxidation kinetics and thermodynamic analysis of chia oil microencapsulated in a whey protein concentrate-polysaccharide matrix. *Journal of Food Engineering*, 175, 93-103.

Esposito, F., Arlotti, G., Bonifati, A.M., Napolitano, A., Vitale, D., Fogliano, V. (2005). Antioxidant activity and dietary fibre in durum wheat bran by-products. *Food Research International*, 38, 1167-1173.

European Pharmacopeia. 8th ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM); 2014.

Falconer, M.E., Fishwick, M.J., Land, D.G., Sayer, E.R. (1964). Carotene oxidation and off flavor development in dehydrated carrot. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 15, 897-901.

Fang, Z., Ruth Comino, P., Bhesh Bhandari, B. (2013). Effect of encapsulation of D-limonene on the moisture adsorption property of β -cyclodextrin. *Food Science and Technology*, 51, 164-169.

FAO (2011). *Global food losses and food waste: extent, causes and prevention*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

FAO, FAOSTAT (2017). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Pérez-Gálvez, A. (2009). *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29, 751-760.

Fiedor, J., Burda, K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6, 466-488.

Finkel T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion in Cell Biology*, 15, 247-254.

Ford, E.S., Will, J.C., Bowman, B.A., Narayan, K.M. (1999). Diabetes mellitus and serum carotenoids: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *American Journal of Epidemiology*, 149, 168-76.

Fradique, M., Batista, A.P., Nunes, M.C., Gouveia, L., Bandarra, N.M., Raymundo, A. (2013). *Isochrysis galbana* and *Diacronema vlkianum* biomass incorporation in pasta products as PUFA's source. *Food Science and Technology*, 50, 312-319.

Francis, F.J., Clydesdale, F.M. (1975). *Food colorimetry: Theory and applications*. The Avi publishing company, INC, Wesport, Connecticut, USA.

Fратиanni, A., Irano, M., Panfili, G., Acquistucci, G. (2005). Estimation of color of durum wheat. comparison of WSB, HPLC, and reflectance colorimeter measurements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 2373-2378.

Frewer, L., Gremmen, B. (2007). Consumer's interests in food processing waste management and co-product recovery. In: Waldron, K. (Ed), Handbook of waste management and co-product recovery in food processing. CRC Press, Boca Raton, pp. 3-19.

Fu, B.X., Schlichting, L., Pozniak, C.J., Singh, A.K. (2013). Pigment loss from semolina to dough: Rapid measurement and relationship with pasta colour. *Journal of Cereal Science*, 57, 560-566.

Gad, A.S., Ghita, E.I., El-Din, H.M.F., Badran, S.M.A., Elmessery, T.M. (2015). Evaluation yogurt fortified with vegetable and fruit juice a natural source of nutritional sciences. *International Journal of Food and Nutritional Sciences*, 4, 21-28.

Gahruie, H., Hadi Eskandari, M., Mesbahi, G. (2019). Development of functional yogurt fortified with wheat germ and strawberry as functional ingredients. *Progress in Nutrition*, 21, 388-389.

Galanakis, C.M. (2015). Food waste recovery processing technologies and industrial techniques. Academic Press, London.

Gallegos-Infante, J.A., Rocha-Guzman, N.E., Gonzalez-Laredo, R.F., Ochoa-Martínez, L.A., Corzo, N., Bello-Perez, L.A., Medina-Torres, L., Peralta-Alvarez, L.E. (2010). Quality of spaghetti pasta containing Mexican common bean flour (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 119, 1544-1549.

Gayas, B., Shukla, R.N., Khan, B.M. (2012). Physico-chemical and sensory characteristics of carrot pomace powder enriched defatted soy flour fortified biscuits. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 2, 1-5.

Giannetti, V., Boccacci Mariani, M., Mannino, P. (2013). Furosine as a pasta quality marker: Evaluation by an innovative and fast chromatographic approach. *Journal of Food Science*, 78, 994-999.

Goldberg, I. (2012). Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals, Springer Science & Business Media.

- Goneim, G.A., Ibrahim, F.Y., El-Shehawy, S.M. (2011). Carrot leaves: Antioxidative and nutritive values. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 2, 201-211.
- Gopalan, C., Ramasastry, B.V., Balasubramanian, S.C. (1991). Nutritive value of Indian foods. National Institute of Nutrition, Hyderabad, p47.
- Goula, A.M., Adamopoulos, K.G. (2008). Effect of maltodextrin addition during spray drying of tomato pulp in dehumidified Air: II. Powder properties. *Drying Technology*, 26, 726-737.
- Goula, A.M., Ververi, M., Adamopoulou, A., Kaderides, K. (2017). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 821–830.
- Grabowski, J.A., Truong, V.D., Daubert, C.R. (2008). Nutritional and rheological characterization of spray dried sweet potato powder. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 41, 206-216.
- Gregurek, Lj., Tonković, K. (2008). Jogurt-potrošnja i trendovi. *Prehrambena industrija-Mleko i mlečni proizvodi*, 19, 1-2, 7-9.
- Grunert, K.G. (2005). Food quality and safety: consumer perception and demand. *European Review of Agricultural Economics*, 32, 369-391.
- Guadarrama-Lezama, A.Y., Dorantes-Alvarez, L., Jaramillo-Flores, M.E., Pérez-Alonso, C., Niranjana, K., Gutiérrez-López, G.F., Alamilla-Beltrán, L. (2014). Preparation and characterization of non-aqueous extracts from chilli (*Capsicum annuum* L.) and their microencapsulates obtained by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 112, 29-37.
- Guerra-Hernández, E., Corzo, N., García-Villanova, B. (1999). Maillard reaction evaluation by furosine determination during infant cereal processing. *Journal of Cereal Science*, 29, 171-176.
- Guil-Guerrero, J.L., Reboloso-Fuentes, M.M. (2009). Nutrient composition and antioxidant activity of eight tomato (*Lycopersicon esculentum*) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 123-129.

Guinoiseau, E., Lorenzi, V., Luciani, A., Muselli, A., Costa, J., Casanova, J., Berti, L. (2013). Biological properties and resistance reversal effect of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, 2, pp. 1073-1080.

Gunathilake, K.D.P.P., Ranaweera, K.K.D.S., Rupasinghe, H.P.V. (2018). *In Vitro* anti-inflammatory properties of selected green leafy vegetables. *Biomedicines* 6, 107.

Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., Van Otterdijk, R., Meybeck, A. (2011). *Global food losses and food waste. Extend, causes and prevention*. Rome: Food and agriculture organization of the United Nations.

Hadži-Tašković Šukalović, V., Dodig, D., Žilić, S., Basić, Z., Kandić, V., Delić, N., Miritescu, M. (2013). Genotypic and environmental variation of bread and durum wheat proteins and antioxidant compounds. *Romanian Agricultural Research*, 30.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2006). *Free radicals in biology and medicine*, Ed 4. Oxford Clarendon Press.

Halliwell, B., Zhao, K., Whiteman, M. (2000). The gastrointestinal tract: A major site of antioxidant action? *Free Radical Research*, 33, 819-830.

Hanachi, P., Naghavi, F.S. (2016). Evaluation of antioxidant activity of *R. slooffiae*, *R. mucilaginoso* extracts. *Electronic Physician*, 8, 3110-3115.

Hasler, C. (2002). Functional foods: benefits, concerns and challenges - a position paper from the American Council on Science and Health. *The Journal of Nutrition*, 132, 3772-3781.

Hassan, M., Barakat, H. (2018). Effect of carrot and pumpkin pulps adding on chemical, rheological, nutritional and organoleptic properties of ice cream. *Food and Nutrition Sciences*, 9, 969-982.

Hernández-Carranza, P., Jattar-Santiago, K.Y., Avila-Sosa, R., Pérez-Xochipa, I., Guerrero-Beltrán, J.A., Ochoa-Velasco, C.E., Ruiz-López, I.I. (2019). Antioxidant fortification of yogurt with red cactus pear peel and its mucilage. *CyTA - Journal of Food*, 17, 824-833.

- Hernández-Ortega, M., Kissangou, G., Necoechea-Mondragón, H., Sánchez-Pardo, M., Ortiz-Moreno, A. (2013). Microwave dried carrot pomace as a source of fiber and carotenoids. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 1037-1046.
- Hidalgo, A., Brandolini, A. (2011). Heat damage of water biscuits from einkorn, durum and bread wheat flours. *Food Chemistry*, 128, 471–478.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Pompei, C., Piscozzi, R. (2006). Carotenoids and tocopherols of einkorn wheat (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum* L.). *Journal of Cereal Science*, 44, 182–193.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Pompei, C. (2010). Carotenoids evolution during pasta, bread and water biscuit preparation from wheat flours. *Food Chemistry*, 121, 746-751.
- Hidalgo, A., Rossi, M., & Pompei, C. (1995). Furosine as a freshness parameter of shell eggs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1673–1677.
- Hidalgo, A., Tumbas Šaponjac, V., Četković, G., Šeregelj, V., Čanadanović-Brunet, J., Chiosa, D., Brandolini, A. (2019). Antioxidant properties and heat damage of water biscuits enriched with sprouted wheat and barley. *Food Science and Technology*, 114, 108423.
- Hiranvarachat, B., Devahastin, S. (2014). Enhancement of microwave-assisted extraction via intermittent radiation: Extraction of carotenoids from carrot peels. *Journal of Food Engineering*, 126, 17-26.
- Holland, B., Unwin, J.D., Buss, D.H. (1991). *Vegetables, herbs and spices: Fifth supplement to McCance and Widdowson's*, London.
- Horuz, T.I., Belibagli, K.B. (2018). Nanoencapsulation of carotenoids extracted from tomato peels into zein fibers by electrospinning. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 759-766.
- Hu, Y., Kou, G., Chen, Q., Li, Y., Zhou, Z. (2019). Protection and delivery of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) peel extracts by encapsulation of whey protein concentrate nanoparticles. *Food Science and Technology*, 99, 24-33.

Huggett, J., Nowak, E., Markwick, K.R., Mutukumira, A.N., Keener, H. (2018). Encapsulation of curcumin by milk and whey powders using spray drying. *Advances in Food Processing and Technology*, 114.

Hussein, G., Sankawa, U., Goto, H., Matsumoto, K., Watanabe, H. (2006). Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of Natural Products*, 69, 443–449.

Vodič za mikrobiološke kriterijume za hranu. (2011). Republika Hrvatska, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja.

MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE, RIBARSTVA I RURALNOG RAZVOJA

IFIC – International Food Information Council Foundation. (2009). Background on Functional Foods: Food Insight. <http://www.foodinsight.org/Content/6/functionalfoodsbackgrounder.pdf>

Iličić, M. (2010). Optimizacija tehnološkog procesa proizvodnje funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.

Indrawati, R., Sukowijoyo, H., Indriatmoko, Wijayanti, R.D.E., Limantara, L. (2015). Encapsulation of Brown Seaweed pigment by freeze drying: characterization and its stability during storage. *Procedia Chemistry*, 14, 353-360.

Ivanov G.Y., Dimitrova, M.R. (2019). Functional yogurt fortified with phenolic compounds extracted from strawberry press residues and fermented with probiotic lactic acid bacteria. *Pakistan Journal of Nutrition*, 18, 530-537.

Jalgaonkar, K., Jha, S.K., Mahawar, M.K. (2018). Influence of incorporating defatted soy flour, carrot powder, mango peel powder, and moringa leaves powder on quality characteristics of wheat semolina- pearl millet pasta. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42, e13575.

Jaros, D., Rohm, H. (2001). A research note identification of sensory color optima of strawberry yogurt. *Journal of Food Quality*, 24, 79–86.

Javadi, N., Abas, F., Abd Hamid, A., Simoh, S., Shaari, K., Ismail, I.S., Mediani, A., Khatib, A. (2014). GC-MS-based metabolite profiling of *Cosmos caudatus* leaves possessing alpha-glucosidase inhibitory activity. *Journal of Food Science*, 79-1130-1136.

Jeong, I.J., Kim, K.J. (2009). An interactive desirability function method to multiresponse optimization. *European Journal of Operational Research* 195, 412-426.

Jinapong, N., Suphantharika, M., Jannong, P. (2008). Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 84, 194-205.

Joglekar, A.M., May, A.T. (1987). Product excellence through design of experiments. *Cereal Foods World*, 32, 857.

Jones, P.J., Jew, S. (2007). Functional food development: concept to reality. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 387-390.

Joubert, T.G.G., Boelema, B.H. Daiber, K.C. (1994). The production of carrots. *Vegetable and Ornamental Plant Institute, Pretoria, South Africa*.

Ju, J., Picinich, S. C., Yang, Z., Zhao, Y., Suh, N., Kong, A.-N., Yang, C. S. (2010). Cancer-preventive activities of tocopherols and tocotrienols. *Carcinogenesis*, 31, 533-542.

Kadian, S.S., Garg, M. (2012). Pharmacological effects of carotenoids: A review. *Pharmacological Science and Research*, 6, 42-48.

Kagami, Y., Sugimura, S., Fujishima, N., Matsuda, K., Kometani, T., Matsumura, Y. (2003). Oxidative stability, structure, and physical characteristics of microcapsules formed by spray drying of fish oil with protein and dextrin wall materials. *Journal of Food Science*, 68, 2248-2255.

Kaiser, H. F. (1960). The application of electronic computers to factor analysis. *Educational and Psychological Measurement*, 20, 141–151.

Kalić, M. (2020). Fizičko-hemijska karakterizacija mikrokapsula ribljeg ulja inkorporiranih u čokoladni matriks. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet Novi Sad.

Kaluđerski, G., Filipović, N. (1990). Metode ispitivanja kvaliteta brašna, pekarskih i testeničarskih proizvoda: Određivanje kvaliteta testenine. Cvetnik, Novi Sad.

Kalušević, A. (2016). Mikroinkapsulacija bioaktivnih jedinjenja iz sporednih proizvoda prehrambene industrije. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet u Beogradu.

Kammerer, D., Carle, R., Schieber, A. (2004b). Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) and evaluation of their color properties. *European Food Research and Technology*, 219, 479-486.

Kapsak, W.R., Rahavi, E.B., Childs, N.M., White, C. (2011). Functional foods: consumer attitudes, perceptions, and behaviors in a growing market. *Journal of the American Dietetic Association*, 111, 804-10.

Karlović, D., Andrić, N. (1996). Kontrola kvaliteta semena uljarica [Quality control of oil seeds], Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad, Savezno ministarstvo za nauku tehnologiju i razvoj, Savezni zavod za standardizaciju, Beograd.

Kaur, G., Sharma, S., Nagi, H.P.S., Dar, B.N. (2012). Functional properties of pasta enriched with variable cereal brans. *Journal of Food Science and Technology*, 49, 467-474.

Kesavulu, M.M., Kameswararao, B., Apparao, C., Kumar, E.G., Harinarayan, C.V. (2002). Effect of omega-3 fatty acids on lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in type 2 diabetic patients. *Diabetes & Metabolism*, 28, 20-26.

Kha, T.C., Nguyen, M.H., Roach, P.D. (2010). Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *Journal of Food Engineering*, 98, 385-392.

Kha, T.C., Nguyen, M.H., Roach, P.D., Stathopoulos, C.E. (2014). Microencapsulation of Gac oil by spray drying: Optimization of wall material concentration and oil load using response surface methodology. *Drying Technology*, 32, 385-397.

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

Koch, T.C., Goldman, I.L. (2005). Relationship of carotenoids and tocopherols in a sample of carrot root-color accessions and carrot germplasm carrying Rp and rp Alleles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 325-331.

Kokina, M., Salević, A., Kalušević, A., Lević, S., Pantić, M., Pljevljakušić, D., Šavikin, K., Shamtsyan, M., Nikšić, M., Nedović, V. (2019). Characterization, antioxidant and antibacterial activity of essential oils and their encapsulation into biodegradable material followed by freeze drying. *Food technology and biotechnology*, 57, 282–289.

Kostić, T.I., Isailović, D.B., Đorđević, B.V., Lević, M.S., Nedović, A.V., Bugarski, M.B. (2012). Elektrostatička ekstruzija kao disperziona tehnika za inkapsulaciju ćelija i biološki aktivnih supstanci. *Hemijska industrija*, 66, 505-517.

Kotake-Nara, E., Nagao, A. (2011). Absorption and metabolism of xanthophylls. *Marine Drugs*, 9, 1024-1037.

Kotilainen, L., Rajalahti, R., Ragasa, C., Pehu, E. (2006). Health enhancing foods: Opportunities for strengthening the sector in developing countries. *Agriculture and Rural Development Discussion Paper* 30.

Krasaekoopt, W., Tandhanskul, A. (2008). Sensory and acceptance assessment of yogurt containing probiotic beads in Thailand. *Kasetsart Journal - Natural Science*, 42, 99-106.

Krunić, T. (2017). *Proizvodnja i primena bioaktivnih proteina i peptida surutke*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet Beograd.

Kumar, N., Kumar, L. (2011). Development of carrot pomace and wheat flour based cookies. *International Journal of Pure and Applied Science and Technology*, 1, 5-11.

Kumar, N., Sarkar, B.C., Sharma, H.K. (2010a). Development and characterization of extruded product of carrot pomace, rice flour and pulse powder. *African Journal of Food Science*, 4, 703-717.

Kumar, N., Sarkar, B.C., Sharma, H.K. (2010b). Development and characterization of extruded product using carrot pomace and rice flour. *International Journal of Food Engineering*, 6, 7.

Kumari, S., Grewal, R.B. (2007). Nutritional evaluation and utilization of carrot pomace powder for preparation of high fiber biscuits. *Journal of Food Science and Technology*, 44, 56-58.

Kwak, N.S., Jukes, D. J. (2001). Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control*, 12, 99-107.

Kwon, Y.I., Apostolidis, E., Shetty, K. (2008). *In vitro* studies of eggplant (*Solanum melongena*) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *Bioresource Technology*, 99, 2981-2988.

Kwon, Y.I., Vatter, D.A. Shetty, K. (2006). Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 15, 107–118.

Laddomada, B., Durante, M., Minervini, F., Garbetta, A., Cardinali, A., D'Antuono, I., Caretto, S., Blanco, A., Mita, G. (2015). Phytochemical characterization and anti-inflammatory activity of extracts from the whole-meal flour of Italian durum wheat cultivars. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 3512–3527.

Lajšić, S., Grujić-Injac, B. (1998). *Hemija prirodnih proizvoda*, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.

Lamacchia, C., Di Luccia, A., Baiano, A., Gambacorta, G., La Gatta, B., Pati, S., La Notte, E. (2007). Changes in pasta proteins induced by drying cycles and their relationship to cooking behaviour. *Journal of Cereal Science*, 46, 58–63.

Lampi, A.M., Nurmi, T., Piironen, V. (2010). Effects of the environment and genotype on tocopherols and tocotrienols in wheat in the health grain Diversity Screen. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 9306-9313.

Larrosa, V., Lorenzo, G., Zaritzky, N., Califano, A. (2016). Improvement of the texture and quality of cooked gluten-free pasta. *Food Science and Technology*, 70, 96-103.

Laus, M.N., Soccio, M., Alfarano, M., Pasqualone, A., Lenucci, M. S., Di Miceli, G., Pastore, D. (2017). Different effectiveness of two pastas supplemented with either lipophilic or hydrophilic/phenolic antioxidants in affecting serum as evaluated by the novel antioxidant/oxidant balance approach. *Food Chemistry*, 221, 278–288.

Le Priol, L., Dagmey, A., Morandat, S., Saleh, K., El Kirat, K., Nasterenko, A. (2019). Comparative study of plant protein extracts as wall materials for the improvement of the oxidative stability of sunflower oil by microencapsulation. *Food Hydrocolloids*, 95, 105-115.

Lee, A., Thurnham, D.I., Chopra, M. (2000). Consumption of tomato products with olive oil but not sunflower oil increases the antioxidant activity of plasma. *Free Radical Biology & Medicine*, 29, 1051–1055.

Lević, S. (2014). Inkapsulacija aroma u karnauba vosku, alginatu i polivinil-alkoholu. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet Beograd.

Lević, S., Kalušević, A., Đorđević, V., Bugarski, B., Nedović, V. (2014). Savremeni procesi inkapsulacije u tehnologiji hrane. *Hrana i ishrana*, 55, 7-12.

Levin, G., Mokady, S. (1995). Incorporation of all-*trans*- or 9-*cis*-beta-carotene into mixed micelles in vitro. *Lipids*, 30, 177-179.

Li, C., Ding, Q., Nie, S.P., Zhang, Y.S., Xiong, T., Xie, M.Y. (2014). Carrot juice fermented with *Lactobacillus plantarum* NCU116 ameliorates type 2 diabetes in rats. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 62, 11884-11891

Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102, 771-776.

Li, M., Zhang, J.H., Zhu, K.X., Peng, W., Zhang, S.K., Wang, B., Zhu, Y.J., Zhou, H.M. (2012). Effect of superfine green tea powder on the thermodynamic, rheological and fresh noodle making properties of wheat flour. *Food Science and Technology*, 46, 23-28.

Li, Y., Fabiano-Tixier, A.S., Tomao, V., Cravotto, G., Chemat, F. (2013). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. *Ultrasonic Sonochemistry*, 20, 12-18.

Lim, H., Tan, C., Bakar, J., Ng, S. (2012). Effects of different wall materials on the physicochemical properties and oxidative stability of spray-dried microencapsulated red-fleshed pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) seed oil. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 1220-1227.

Lin, A.Y., Huang, S.T., Wahlqvist, M.L. (2009). Waste management to improve food safety and security for health advancement. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 18, 538-545.

Lin, L., Congping, S., Xiangyang, C., Qing, W., Wenchao, J., Hui, L., Jiayang, T., Wei, W., Sen, L., Shuzhen, G. (2020). Chlorogenic acids in cardiovascular disease: A review of dietary consumption, pharmacology, and pharmacokinetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 6464-6484.

Lin, S.F., Chen, Y.C., Chen, R.N., Chen, L.C., Ho, H.O., Tsung, Y.H., Sheu, M.T., Liu, D.Z. (2016). Improving the stability of astaxanthin by microencapsulation in calcium alginate beads. *PloS one*, 11, e0153685.

Liu, K.L., Chen, H.W., Wang, R.Y., Lei, Y.P., Sheen, L.Y., Lii, C.K. (2006). DATS reduces LPS-induced iNOS expression, NO production, oxidative stress, and NF-kappaB activation in RAW 2647 macrophages. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 54, 3472-3478.

Liu, R.H. (2003). Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 517-520.

Liu, R.H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer Prevention: Mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 134, 3479-3485.

Liyana-Pathirana, C.M., Shahidi, F. (2007). The antioxidant potential of milling fractions from bread wheat and durum. *Journal of Cereal Science*, 45, 238-247.

Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Álvarez, J.Á., Chaves-Lopez, C., Shkempi, B., Moscaritolo, S., Fernandez-Lopez, J., Sacchetti, G. (2020). Persimmon flours as functional ingredients in spaghetti: chemical, physico-chemical and cooking quality. *Food Measure* 14, 1634-1644.

Lukač Bulatović, M. (2010). Ekonomska efikasnost proizvodnje i prerade važnijih voćnih vrsta u Republici Srbiji. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet Novi Sad.

Ly, W., Zhang, M. (2017). Main current vegetable drying technology I. Hot airflow drying and related combination drying. In: M. Zhang, B. Bhandari, Z. Fang (Eds.), *Handbook of drying of vegetables and vegetable products. Main current vegetable drying technology I. Hot airflow drying and related combination drying*. CRC Press, . Boca Raton, pp. 3–21.

Madureira, A.R., Pereira, C.I., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E., Malcata, F.X. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40, 1197-1211.

Mani-Lopez, E., Palou, E., Lopez-Malo, A. (2014). Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 97, 2578-2590.

Manojlović, V., Nedović, V.A., Kailasapathy, K., Zuidam, J.N. (2010). Encapsulation of Probiotics for use in Food Products. In: Zuidam, N.J., Nedovic, V.A (Eds.), *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing*. Springer, Dordrecht, pp. 269-301.

Manojlovic, V., Rajic, N., Djonlagic, J., Obradovic, B., Nedovic, V., Bugarski, B. (2008). Application of electrostatic extrusion - flavour encapsulation and controlled release. *Sensors*, 8, 1488-1496.

Markus, C.R., Jonkman, L.M., Lammers, J.H.C.M., Deutz, N.E.P., Messer, M., Rigtering, N. (2005). Evening intake of alpha-lactalbumin raises brain tryptophan availability and improves morning alertness and brain measures of attention. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 1026-1033.

Marshall, K. (2004). Therapeutic applications of whey protein, alternative medicine review. *Journal of Clinical Therapeutic*, 9, 136-156.

Maslovarić, M. (2017). Ispitivanje nutritivne vrednosti osušenog jabučnog tropa i mogućnosti njihove upotrebe u industrijskoj proizvodnji hrane za životinje. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.

Mehmood, S., Orhan, I., Ahsan, Z., Aslan, S., Gulfraz, M. Fatty acid composition of seed oil of different *Sorghum bicolor* varieties. *Food Chemistry*, 109, 855-859.

Mendiola, J.A., Jaime, L., Santoyo, S., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibañez, E., Señoráns, F.J. (2007). Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 102, 1357-1367.

Mihalcea, L., Turturică, M., Ghinea, I.O., Barbu, V., Ioniță, E., Cotârleț, M., Stănciuc, N. (2017). Encapsulation of carotenoids from sea buckthorn extracted by CO₂ supercritical fluids method within whey proteins isolates matrices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 42, 120-129.

Miletić, I., Šobajić, S., Đorđević, B. (2008). Functional foods and their role in the improvement of health status. *Journal of Medical Biochemistry*, 27, 367-370.

Millao, S., Uquiche, E. (2016). Antioxidant activity of supercritical extracts from *Nannochloropsis gaditana*: Correlation with its content of carotenoids and tocopherols. *The Journal of Supercritical Fluids*, 111, 143-150.

Minekus, M., M. Alming, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bour-lieu, F. Carrière, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, L. Egger, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. Mackie, S. Marze, D. J. McClements, O. Ménard, I. Recio, C. N. Santos, R. P. Singh, G. E. Vegarud, M. S. J. Wickham, W. Weitschies, and A.

Brodkorb. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - An international consensus. *Food & Function*, 5, 1113–112.

Mishra, P., Mishra, S., Lata Mahanta, C. (2014). Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Emblica officinalis*) juice powder. *Food and Bioproducts Processing*, 92, 252-258.

Moayyedi, M., Eskandari, M.H., Rad, A.H.E., Ziaee, E., Khodaparast, M.H.H., Golmakani, M.T. (2018). Effect of drying methods (electrospraying, freeze drying and spray drying) on survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC7469. *Journal of Functional Foods*, 40, 391-399.

Moghaddas Kia, E., Ghasempour, Z., Ghanbari, S., Pirmohammadi, R. and Ehsani, A. (2018). Development of probiotic yogurt by incorporation of milk protein concentrate (MPC) and microencapsulated *Lactobacillus paracasei* in gellan-caseinate mixture. *British Food Journal*, 120, 1516-1528.

Mohammad, H.S., Ghasemi, Y. (2016). Spray-drying microencapsulation of β -carotene contents in powdered *Dunaliella salina* biomass. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8, 1533-1536.

Mollakhalili Meybodi, N., Mohammad Mortazavian, A., Masoumeh, A., Nematollahi A. (2020). Probiotic viability in yoghurt: A review of influential factors. *International Dairy Journal*, 109, 104793.

Monicka, A.A., Rani, C.I., Rajkumar, P. (2017). Storage stability and antioxidant activity of encapsulated carotenoid from pumpkin Pulp. *Madaras Agricultural Journal*, 104, 415-419.

Montonen, J., Knekt, P., Järvinen, R., Reunanen, A. (2004). Dietary antioxidant intake and risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 27, 362-366.

Moore, J., Hao, Z., Zhou, K., Luther, M., Costa, J., Yu, L. (2005). Carotenoid, tocopherol, phenolic acid and antioxidant properties of Maryland-grown soft wheat. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 6649-6657.

- Morch, Y., Donati I., Strand B., Skjak-Brak G. (2006). Effect of Ca^{2+} , Ba^{2+} , and Sr^{2+} on alginate microbeads. *Biomacromolecules*, 7, 1471-1480.
- Muller, L., Frohlich, K., Bohm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129, 139-148.
- Mulyadi, N.M., Widyaningsih, T.D., Wijayanti, N., Indrawati, R., Heriyanto, Limantara, L. (2017). Microencapsulation of Kabocha pumpkin carotenoids. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 8, 381-386.
- Mustafa, A., Trevino, L.M., Turner, C. (2012). Pressurized hot ethanol extraction of carotenoids from carrot by-products. *Molecules*, 17, 1809–1818.
- Myers, R.H., Montgomery, C.M. (1995). *Response surfaces methodology: process and product optimization using designed experiments*. John Wiley, New York.
- Nadeem, H.S., Torun A.M., Ozdemir, F. (2011). Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. *Food Science and Technology*, 44, 1626-1635.
- Nagarajaiah, S.B., Prakash, J. (2015). Nutritional composition, acceptability, and shelf stability of carrot pomace-incorporated cookies with special reference to total and β -carotene retention. *Cogent Food & Agriculture*, 1, 1039886.
- Nagata, M., Yamashita, I. (1992). Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Journal of Japan Society for Food Science and Technology*, 39, 925-928.
- Nair, S.S., Kavrekar, V., Mishra, A. (2013). *In vitro* studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. *European Journal of Experimental Biology*, 3, 128–132.
- Nawirska, A., Kwasniewska, M. (2005). Dietary fiber fractions from fruit and vegetable processing waste. *Food Chemistry*, 91, 221–225.

Ndubuisi Ezejiofor, T.I., Enebaku, U.E., Ogueke, E. (2014). Waste to wealth- value recovery from agrofood processing wastes using biotechnology: A Review. *British Biotechnology Journal*, 4, 418-481.

Nedović, V. (1999). Imobilisani ćelijski sistemi u fermentaciji piva. Zadužbina Andrejević, Beograd.

Nedović, V., Bugarski, B., Mantzouridou, F., Paraskevopoulou, A., Naziri, E., Koupantsis, T., Trifković, K., Drvenica, I., Balanč, B., Đorđević, V. (2016). Recent advances and applications of encapsulated microbial and non-microbial active agents in the manufacture of food and beverages, In: V. Ravishankar Rai (Ed.), *Advances in Food Biotechnology*. Wiley Blackwell, New Jersey, pp. 635-680.

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806–1815.

Nedović, V., Kalušević, A., Manojlović, V., Petrović, T., Bugarski, B. (2013). Encapsulation Systems in the Food Industry in Advances. In: Yanniotis, S., Taoukis, P., Stoforos, N.G., Karathanos, V.T. (Eds.), *Food Process Engineering Research and Applications*. Food Engineering Series 2013. Encapsulation Systems in the Food Industry in Advances. Springer, pp. 229-253.

Nedovic, V., Manojlovic, V., Pruesse, U., Bugarski, B., Djonlagic, J., Vorlop, K.D. (2006). Optimization of the electrostatic droplet generation process for controlled microbead production- single nozzle system. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 12, 53-57.

Nedović, V.A., Obradović, B., Leskošek-Čukalović, I., Trifunović, O., Pešić, R., Bugarski, B. (2001). Electrostatic generation of alginate microbeads loaded with brewing yeast. *Process Biochemistry*, 37, 17-22.

Nicolle, C., Cardinault, N., Aprikian, O., Busserolles, J., Grolier, P., Rock, E., Demigne, C., Mazur, A., Scalbert, A., Amouroux, P., Remesy, C. (2003). Effect of carrot intake on cholesterol metabolism and on antioxidant status in cholesterol-fed rat. *European Journal of Nutrition*, 42, 254–261.

Nu Ton, M.N., Thi Tran, T.T., Man Le., V.V. (2016). Microencapsulation of rambutan seed oil by spray-drying using different protein preparations. *International Food Research Journal*, 23, 123-128.

Nunes, I.L., Mercadante, A.Z. (2007). Encapsulation of lycopene using spray-drying and molecular inclusion processes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, 893-900.

Nurhadi, B., Andoyo, R., Indrato, M., Indrato R. (2012). Study the properties of honey powder produced from spray drying and vacuum drying method. *International Food Research Journal* 19, 907-912.

Obradović, D. (2008). Fermentisana mleka - Savremeni trendovi, *Biotehnologija u stočarstvu*, 101.

Ogrodowska, D., Tanska, M., Brandt, W. (2017). The influence of drying process conditions on the physical properties, bioactive compounds and stability of encapsulated pumpkin seed oil. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 1265–1280.

Ogrodowska, D., Tanska, M., Brandt, W., Czaplicki, S. (2019). The influence of emulsion drying on the fatty acid composition, bioactive compounds content and oxidative stability of encapsulated bio-oils. *CYTA – Journal of Food*, 17, 949-959.

Oh, N.H., Seib, P.A., Ward, A.B., and Deyoe, C.W. (1985). Noodles. IV. Influence of flour protein, extraction rate, particle size, and starch damage on the quality characteristics of dry noodles. *Cereal Chemistry*, 62, 441-446.

Ohama¹, H., Ikeda, H., Moriyama, H. (2006). Health foods and foods with health claims in Japan. *Toxicology*, 221, 95-111.

Omayma, A.E., Abdel Nasser, B.S. (2013). Carotenoids. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2, 225-234.

Ordoñez-Santos, L.E., Martínez-Girón, J., Villamizar-Vargas, R.H. (2018). Encapsulation of β -carotene extracted from peach palm residues: a stability study using two spray-dried processes. *DYNA*, 85 128-134.

O'Shea, N., Arendt, E. K., Gallagher, E. (2012). Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 1-10.

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction—antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucoamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315.

Padalino L., Conte A., Lecce L., Likyova D., Sicari V., Maria Pellicanò T., Poiana M., Alessandro Del Nobile M. (2017). Functional pasta with tomato by-product as a source of antioxidant compounds and dietary fibre. *Czech Journal of Food Science*, 35, 48-56.

Padovani, R.M., Amaya-Farfán, J. (2006). Procurement of β -carotene, lycopene, lutein and zeaxanthin in households of Brazil's urban areas. *Segurança Alimentar e Nutricional*, 13, 49-63.

Pagani, M. A., Resmini, P., Dalbon, G. (1989). Influence of the extrusion process on characteristics and structure of pasta. *Food Microstructure*, 8, 173–182.

Pagani, M.A., Lucisano, M., Mariotti, M. (2007). Traditional Italian Products from Wheat and Other Starchy Flours. In: Hui, Y. H. (Ed.), *Handbook of Food Products Manufacturing: Principles, bakery, beverages, cereals, cheese, confectionary, fats, fruits, and functional foods*. Wiley-Interscience, Hoboken, pp. 327-388.

Palozza, P. (1998). Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems. *Nutrition Reviews*, 56, 257-265.

Palozza, P., Krinsky, N.I. (1992). Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 297, 184-187.

Panda, A.K., Sridhar, K., Prakash, B., Rama Rao, S.V., Raju, M.V.L.N. (2016). Acidulated sunflower soapstock as an energy source in the diet of broiler chickens. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 16, 337-344.

Panfili, G., Fratianni, A., Irano, M. (2004). Improved normal-phase high-performance liquid chromatography procedure for the determination of carotenoids in cereals. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 6373-6377.

Park, K., Yeo, Y. (2007). Microencapsulation Technology. In: Swarbrick J. (Ed), Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 3rd edition. Informa Healthcare, New York, pp. 2315-2327.

Patel, P., Jethani, H., Radha, C., Vijayendra, S.V.N., Mudliar, S.N., Sarada, R., Chauhan, V.S. (2019). Development of a carotenoid enriched probiotic yogurt from fresh biomass of *Spirulina* and its characterization. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 3721-3731.

Pereira, G.I.S., Pereira, R.G.F.A, Barcelos, M.F.P., Morais, A.R. (2003). Carrot leaf chemical evaluation aiming its use in human feeding. *Ciência e Agrotecnologia*, 27, 852-857.

Petitot, M., Boyer, L., Minier, C., Micard, V. (2010). Fortification of pasta with split pea and faba bean flours: Pasta processing and quality evaluation. *Food Research International*, 43, 634–641.

Petrović, L. (2010). Dobijanje ekstrakta nevena (*Calendula officinalis* L.) ugljendioksidom pod pritiskom i njegovo mikrokapsuliranje u sistemu polimer-površinski aktivna materija. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.

Petzoldt, C. (2008). Carrots. IPM program. New York.

Pojić, M., Hadnađev, M., Dapčević Hadnađev, T., Mišan, A., Sakač, M., Šarić, B. (2014). Testenina obogaćena konopljinim brašnom: Novi testeničarski proizvod. *Hrana i ishrana* (Beograd), 55, 37-42.

Poyrazoglu, E.S., Ozat, E.T., Coksari, G., Ozat, E., Konar, N. (2017). Effect of various process conditions on efficiency and colour properties of *Pistacia terebinthus* oil encapsulated by spray drying. *International Journal of Food Engineering*, 3, 132-135.

Pravilnik o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura. (2014). Službeni glasnik RS br. 34/14

Pravilnik o metodima fizičkih i hemijskih analiza za kontrolu kvaliteta žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzo smrznutih testa. (1988). Službeni list SFRJ, br. 74/88.

Pravilnik o voćnim sokovima i određenim srodnim proizvodima namenjenim za ljudsku upotrebu. (2018). Službeni glasnik RS br. 103/18.

- Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda. (2017). Službeni glasnik RS br. 7/17.
- Pravilniku o kvalitetu žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzo smrznutih testa. (1995; 2016; 2018). Službeni glasnik RS br. 52/95, 68/16 i 56/18.
- Premi, M., Sharma, H.K. (2017). Effect of different combinations of maltodextrin, gum arabic and whey protein concentrate on the encapsulation behavior and oxidative stability of spray dried drumstick (*Moringa oleifera*) oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1232-1240.
- Prince, M.R., Frisoli, J.K., Goetschkes, M.M., Stringham, J.M., LaMuraglia, G.M. (1991). Rapid serum carotene loading with high-dose beta-carotene: Clinical implications. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 17, 343–347.
- Prochaska, L.J., Nguyen, X.T., Donat, N., Piekutowski, W.V. (2000). Effects of food processing on the thermodynamic and nutritive value of foods: literature and database survey. *Medical Hypotheses*, 54, 254-262.
- Prüsse, U., Bilancetti, L., Bučko, M., Bugarski, B., Bukowski, J., Gemeiner, P., Lewinska, D., Manojlovic, V., Massart, B., Nastruzzi, C., Nedovic, V., Poncelet, D., Siebenhaar, S., Tobler, L. Azzurra Tosi, Alica Vikartovská, Klaus-Dieter Vorlop (2008). Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chemical Papers*, 62, 364-374.
- Purohit, A.J., Gogate, P.R. (2015). Ultrasound-assisted extraction of β -carotene from waste carrot residue: Effect of operating parameters and type of ultrasonic irradiation. *Separation Science and Technology*, 50, 1507-1517.
- Quek, S.Y., King Chok, N., Swedlund, P. (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46, 386-392.
- Quispe-Condori, S., Aranda Saldana, M.D., Temelli, F. (2011). Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. *Food Science and Technology*, 44, 1880-1887.

Rafalowski, R., Zegarska, Z., Kuncewicz, A., Borejszo, Z. (2008). Fatty acid composition, tocopherols and beta-carotene content in Polish commercial vegetable oils. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7, 278-282.

Ramakrishnan, Y., Mohd Adzahan, N., Yusof, Y.A., Muhammad, K. (2018). Effect of wall materials on the spray drying efficiency, powder properties and stability of bioactive compounds in tamarillo juice microencapsulation. *Powder Technology*, 328, 406-414.

Ramos, B.G.Z. (2011). Biopolymers employed in drug delivery, in: *Biopolymers: biomedical and environmental applications*. Scrivener Publishing, Salem, MA, USA, pp. 559-573.

Ramya, N.S., Prabhasankar, P., Gowda, L.R., Modi, V.K., Bhaskar, N. (2015). Influence of freeze-fried shrimp meat in pasta processing qualities of Indian T. durum wheat. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 24, 582-596.

Ranveer, Rahul C., Gatade, Abhijeet A., Kamble, Harshwardhan A., Sahoo, Akshya K. (2015). Microencapsulation and storage stability of lycopene extracted from tomato processing waste. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58, 953-960.

Rascón, M.P., Beristain, C.I., García, H.S., Salgado, M.A. (2011). Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum arabic and soy protein isolate as wall materials. *Food Science and Technology*, 44, 549-557.

Reboul, E. (2013). Absorption of vitamin A and carotenoids by the enterocyte: focus on transport proteins. *Nutrients*, 5, 3563-3581.

Reboul, E. (2019). Mechanisms of carotenoid intestinal absorption: Where do we stand? *Nutrients*, 11, 838.

Regensteiner, J.G., Popylisen, S., Bauer, T.A., Lindenfeld, J., Gill, E., Smith, S., Oliver-Pickett, C.K., Reusch, J.E., Weil, J.V. (2003). Oral L-arginine and vitamins E and C improve endothelial function in women with type 2 diabetes. *Vascular Medicine*. 8, 169–175.

Reiter, M., Stuparić, M., Neidhart, S., Carle, R. (2003). The role of process technology in carrot juice cloud stability. *Food Science and Technology*, 36, 165-172.

Resmini, P., Pellegrino, L., Batelli, G. (1990). Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by a direct HPLC method. *Italian Journal of Food Science*, 3, 173-183.

Roberfroid, M.B. (2000b). Defining functional foods. In: Gibson, G.R., Williams, C.M. (Eds), *Functional Foods. Concept to Product*. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. pp 9-25.

Roberfroid, M.B. (2002). Global view on functional foods: European perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88, 133-138.

Rodea-González, D.A., Cruz-Olivares, J., Román-Guerrero, A., Rodríguez-Huezo, M.E., Vernon-Carter, E.J., Pérez-Alonso, C. (2012). Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *Journal of Food Engineering*, 111, 102-109.

Rodriguez, E.B., Vidallon, M.L.P., Mendoza, D.J.R., Reyes, C.T. (2016). Health- promoting bioactivities of betalains from red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton and Rose) peels as affected by carbohydrate encapsulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 4679-4689.

Rodriguez-Amaya, D.B. (2001). *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. ILSI Human Nutrition Institute. One Thomas Circle, NW, Washington DC, 20005-5802, 64.

Rodriguez-Garcia, I., Guil-Guerrero, J.L. (2008). Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chemistry*, 108, 1023-1026.

Romano, A., Toraldo, G., Cavella, S., Masi, P. (2007). Description of leavening of bread dough with mathematical modelling. *Journal of Food Engineering*, 83, 142–148.

Rosenfeld, H.J., Samuelsen, R.T., Lea, P. (1998a). The effect of temperature on sensory quality, chemical composition and growth of carrots (*Daucus carota* L.). I. Constant diurnal temperature. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 73, 275–288.

Rowe, R., Sheskey, P., Quinn, M. (2009). Handbook of pharmaceutical excipients, 6th ed. Pharmaceutical Press, London, 20-21, pp.622-623.

Rufián-Henares, J.A., Delgado-Andrade, C. (2009). Effect of digestive process on Maillard reaction indexes and antioxidant properties of breakfast cereals. Food Research International, 42, 394–400.

Russ, W., Meyer-Pittroff, R. (2004). Utilizing waste products from the food production and processing industries. Critical reviews in food science and nutrition, 44, 57-62.

Rutz, J.K., Borges, C.D., Zambiasi, R.C., da Rosa, C.G., da Silva, M.M. (2016). Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. Food Chemistry, 202, 324-333.

Ryan, E., Galvin, K., O'Connor, T.P., Maguire, A.R., O'Brein, N.M. (2007). Phytosterol, squalene, tocopherol content and fatty acid profile of selected seeds, grains, and legumes. Plant Foods Human Nutrition, 62, 85–91.

Saarela, M. (2011). Functional foods: Concept to product, Elsevier.

Saavedra-Leos, M.Z., Leyva-Porras, C., Martínez-Guerra, E., Pérez-García, S.A., Aguilar-Martínez, J.A., Álvarez-Salas, C. Physical properties of inulin and inulin–orange juice: Physical characterization and technological application. Carbohydrate Polymers, 105, 10-19.

Sachindra, N.M., Mahendrakar, N.S. (2005). Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. Bioresource Technology, 96, 1195-200.

Saikia, S., Mahnot, N.K., Mahanta, C.L. (2015). Optimisation of phenolic extraction from *Averrhoa carambola* pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. Food Chemistry, 171, 144–152.

Saini, R.K., Keum, Y.S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. Food Chemistry, 240, 90-103.

Salević, A., Kalušević, A., Lević, S., Nedović, V. (2018). Encapsulation of bioactive compounds derived from fruit processing by-products. *Journal of Agricultural Sciences*, 63, 113-137.

Santana, P., Huda, N., Yang, T.A. (2015). Physicochemical properties and sensory characteristics of sausage formulated with surimi powder. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 1507-1515.

Santoyo, S., Herrero, M., Señorans, F.J., Cifuentes, A., Ibanez, E., Jaime, L. (2006). Functional characterization of pressurized liquid extracts of *Spirulina platensis*. *European Food Research and Technology*, 224, 75.

Šarić, B. (2016). Iskorišćenje tropa borovnice i maline u formulaciji bezglutenskog keksa sa dodatom vrednošću. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.

Schläpfer, K. (2002). *Farbmetrik in der grafischen Industrie*. UGRA, St. Gallen, ISBN 3-9520403-1-2.

Schulz, H., Baranska, M. (2007). Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 43, 13-25.

Seabra, L.M.J., Pedrosa, L.F.C. (2010). Astaxanthin: structural and functional aspects. *Revista de Nutrição*, 23, 1041–1050.

Seljaseen, R., Kristensen, H.L., Lauridsen, C., Wyss, G.S., Kretzschmar, U. (2013). Quality of carrots as affected by pre- and postharvest factors and processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2611-2626.

Senadeera, S. S., Prasanna, P. H. P., Jayawardana, N. W. I. A., Gunasekara, D. C. S., Senadeera, P., Chandrasekara, A. (2018). Antioxidant, physicochemical, microbiological, and sensory properties of probiotic yoghurt incorporated with various *Annona* species pulp. *Heliyon*, 4, e00955.

Šeregelj, V., Četković, G., Čanadanović-Brunet, J., Tumbas-Šaponjac, V., Vulić, J., Stajčić, S. (2017). Extraction and encapsulation of bioactive compounds from carrots. *Acta Periodica Technologica*, 48, 261-273.

Šeregelj, V., Tumbas Šaponjac, V., Lević, S., Kalušević, A., Četković, G., Čanadanović-Brunet, J., Nedović, V., Stajčić, S., Vulić, J., Vidaković, A. (2019). Application of encapsulated natural bioactive compounds from red pepper waste in yogurt. *Journal of Microencapsulation*, 36, 704-714.

Shahidi, F., Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897.

Shahidi, F., Chandrasekara, A. (2010). Hydroxycinnamates and their *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities. *Phytochemistry Reviews*, 9, 147–170.

Sharma, L., Singh, R., Chandra, M. (2017). Acceptability evaluation of fibre rich cookies using carrot pomace and lotus stem. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 2, 18-20.

Sharma, M., Kadam, D.M., Chadha, S., Wilson, R.A., Gupta, R.K. (2013). Influence of particle size on physical and sensory attributes of mango pulp powder. *International Agrophysics*, 27, 323-328.

Sharoba, A.M., Farrag, M.A., Abd El-Salam, A.M. (2013). Utilization of some fruits and vegetables waste as a source of dietary fiber and its effect on the cake making and its quality attributes. *Journal of Agroalimentary Processes and Technology*, 19, 429-444.

Shegokar, R., Muller, R. H. (2010). Nanocrystals- Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *International Journal of Pharmaceutics* 399, 129-139.

Sheu, T.Y., Rosenberg, M. (1995). Microencapsulation by spray drying ethyl caprylate in ehey protein and carbohydrate wall systems. *Journal of Food Science*, 60, 98-103.

Shewry, P.R., Halford, N.G., Belton, P.S., Tatham, A.S. (2002). The structure and properties of gluten: An elastic protein from wheat grain. *Philosophical Transactions Royal Society London* 357, 133-142.

Shi, J., Mittal, G., Kim, E., Jun Xue, S. (2007). Solubility of carotenoids in supercritical CO₂. *Food Reviews International*, 23, 341-371.

Shu, B., Yu, W., Zhao, Y., Liu, X. (2006). Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 76, 664-669.

Shyamala, B.N., Jamuna, P. (2010). Nutritional content and antioxidant properties of pulp waste from *Daucus carota* and *Beta vulgaris*. *Malaysian Journal of Nutrition*, 16, 397-408.

Silva, P.I., Stringheta, P.C., Teófilo, R.F., de Oliveira, I.R.N. (2013). Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering*, 117, 538–544.

Singh, B., Panesar, P.S., Nanda, V. (2006). Utilization of carrot pomace for the preparation of a value added product. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 1, 22-27.

Siregar, T.M., Margareta, M. (2019). Microencapsulation of carotenoids from Red melinjo (*Gnetum gnemon* L.) peels extract. *Journal of Physics: Conference series*, 1351, 012031.

Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B., Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review. *Appetite*, 51, 456-467.

Škrobot, D. (2016). Senzorski, nutritivni i funkcionalni profil integralne testenine sa dodatkom heljadinog brašna. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.

Sloan, A.E. (2004). The top ten functional food trends. *Food Technology*, 58, 28-51.

Smrdel, P., Bogataj, M., Podlogar, F., Planinšek, O., Zajc, N., Mazaj, M., Kaučič, V., Mrhar, A. (2006). Characterization of calcium alginate beads containing structurally similar drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 32, 623-633.

Soltoft, M., Bysted, A., Madsen, K.H., Mark, A.B., Bugel, S.G., Nielsen, J., Knuthsen, P. (2011). Effects of organic and conventional growth systems on the content of carotenoids in carrot roots, and on intake and plasma status of carotenoids in humans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 767–775.

Soltoft, M., Nielsen, J., Holst Laursen, K., Husted, S., Helkoh, U., Knuthsen, P. (2010). Effects of organic and conventional growth systems on the content of flavonoids in onions and phenolic acids in carrots and potatoes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 10323-10329.

Song, J., Fan, L., Forney, C.F., Hildebrand, P.D., Jordan, M.A., Renderos, W., McRae, K.B. (2003). Ozone and 1-MCP treatments affect the quality and storage life of fresh carrots. *Acta Horticulturae*, 628, 295-301.

Souza, A.L.R., Hidalgo-Chávez, D.W., Pontes, S.M., Gomes, F.S., Cabral, L.M.C., Tonon, R.V. (2018). Microencapsulation by spray drying of a lycopene-rich tomato concentrate: Characterization and stability. *Food Science and Technology*, 91, 286-292.

Souza, V.B., Thomazini, M., Balieiro, J.C.C., Favaro Trindade, C.S. (2015). Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). *Food and Bioproducts Processing*, 93, 39-50.

Spence, J.T. (2006). Challenges related to the composition of functional foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 4-6.

SRPS EN ISO 6579-1:2017. Mikrobiologija lanca hrane — Horizontalna metoda za otkrivanje, određivanje broja i serotipizaciju *Salmonella* — Deo 1: Otkrivanje *Salmonella* spp.

SRPS EN ISO 11290-1:2017. Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za otkrivanje i određivanje broja *Listeria monocytogenes* i *Listeria* spp. – Deo 1: Metoda otkrivanja-

SRPS EN ISO 6888-1:2008. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za određivanje broja koagulaza-pozitivnih stafilokoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste) - Deo 1: Tehnika upotrebom agara po Berd-Parkeru.

SRPS EN ISO 21528-2:2017. Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za otkrivanje i određivanje broja Enterobacteriaceae – Deo 2: Tehnika brojanja kolonija.

SRPS ISO 4833-1:2013. Mikrobiologija lanca hrane — Horizontalna metoda za određivanje broja mikroorganizama - Deo 1: Brojanje kolonija na 30 °C tehnikom nalivanja ploče.

SRPS ISO 21527-2:2009. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za određivanje broja kvasaca i plesni - Deo 2: Tehnika brojanja kolonija u proizvodima sa aktivnošću vode manjom od 0,95 ili jednakom 0,95.

SRPS ISO 7889:2011. Jogurt - Određivanje broja karakterističnih mikroorganizama — Tehnika brojanja kolonija na 37 °C.

SRPS EN ISO 6886:2017. Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla – Određivanje oksidativne stabilnosti (test ubrzane oksidacije).

Stahl, W., Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24, 345-351.

Stahl, W., Sies, H. (2012). Photoprotection by dietary carotenoids: concept, mechanisms, evidence and future development. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56, 287-295.

Stalikas, S.D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 90, 3268-3295.

Stanton, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Sinderen, D.V. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 198-203.

Statista (2019). U.S. Functional Foods Market - Statistics & Facts. <https://www.statista.com/topics/1321/functional-foods-market/>

Steinmetz, K.A., Potter, J.D. (1991). Vegetables, fruit and cancer II. Mechanisms. *Cancer Causes Control* 2, 427-442.

Stojanović, R., Belscak-Cvitanović, A., Manojlović, V., Komes, D., Nedović, V., Bugarski, B. (2012). Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 685-696.

Stojanović, Ž., Barjolle, D. (2012). Socio-economic and demographic profile of traditional and functional food consumers in Serbia. *Marketing*, 43, 41-48.

Šturm, L., Črnivec, I.G.O., Istenič, K., Ota, A., Megušar, P., Slukan, A., Humar, M., Lević, S., Nedović, V., Kopinč, R., Deželak, M., Gonzales, A.P., Ulrih, N.P. (2019). Encapsulation of non-dewaxed propolis by freeze-drying and spray-drying using gum Arabic, maltodextrin and inulin as coating materials. *Food Bioproducts Processing*, 116, 196-211.

Sudha, M.L., Leelavathi, K. (2012). Effect of blends of dehydrated green pea flour and amaranth seed flour on the rheological, microstructure and pasta making quality. *Journal of Food Science and Technology*, 49, 713–720.

Sun, T., Simon, P.W., Tanumihardjo, S.A. (2009). Antioxidant phytochemicals and antioxidant capacity of biofortified carrots (*Daucus carota* L.) of various colors. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 4142-4147.

Suri, S., Ruan, G., Winter, J., Schmidt C. (2013). *Microparticles and nanoparticles, Classes of Materials Used in Medicine, Biomaterials Science*, 3rd Edition, Elsevier, pp.360-388.

Tainara de Moares, C., Alessandro de Oliveira, R., Roberta Cruz Silveira, T., Simone Hickmann, F. (2015). Effects of orange by-product fiber incorporation on the functional and technological properties of pasta. *Food Science and Technology*, 35, 546-551.

Tanaka, T., Kojima, T., Kawamori, T., Wang, A., Suzui, M., Okamoto, K., Mori, H. (1993). Inhibition of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids. *Carcinogenesis*, 14, 1321–1325.

Tanska, M., Zadernowski, R., Konopka, I. (2007). The quality of wheat bread supplemented with dried carrot pomace. *Polish Journal of Natural Sciences*, 22, 126–136.

Tavares, T.G., Contreras, M.M., Amorim, M., Martín-Álvarez, P.J., Pintado, M.E., Recio, I., Malcata, F.X. (2011). Optimization, by response surface methodology, of degree of hydrolysis, antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolyzates obtained with cardoon extract. *International Dairy Journal*, 21, 926-933.

Tawil, M., Bekdash, A., Mroueh, M., Daher, C.F., Abi-Habib, R.J. (2015). Wild carrot oil extract is selectively cytotoxic to human acute myeloid leukemia cells *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 16, 761-767.

Teng, H., Chen, L. (2017). α -Glucosidase and α -amylase inhibitors from seed oil: A review of liposoluble substance to treat diabetes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 3438-3448.

Tengse, D.D., Priya, B. Kumar, P.A.R. (2017). Optimization for encapsulation of green tea (*Camellia sinensis* L.) extract by spray drying technology. *Food Measure* 11, 85–92.

Thies, C. (2005). Microencapsulation. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 16, 317-327.

Tirelli A. (1998). Improved method for the determination of furosine in food by capillary electrophoresis. *Journal of Food Protection*, 61, 1400-1404.

Tiwari, U., Rawson, A., Valverde, J., Reilly, K., Brunton, N., Cummins, E. (2013). A farm- to-fork model to evaluate the level of polyacetylenes in processed carrots. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 1626-1639.

Tonessen H., Karlsen J. (2002). Alginate in drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28, 621-630.

Toniazzo, T., Berbel, I.F., Cho, S., Fávoro-Trindade, C.S., Moraes, I.C.F., Pinho, S.C. (2014). β -carotene-loaded liposome dispersions stabilized with xanthan and guar gums: Physico-chemical stability and feasibility of application in yogurt. *Food Science and Technology*, 59, 1265-1273.

Tonon, R.V., Brabet, C., Hubinger, M.D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 88, 411-418.

Truscott, T.G. (1996). β -carotene and disease: a suggested pro-oxidant and anti-oxidant mechanism and speculations concerning its role in cigarette smoking. *Journal of Photochemistry and Photobiology B.*, 35, 233-235.

Tucker, J.M., Townsend, D.M. (2005). Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 59, 380-387.

Tudorică, C.M., Kuri, V., Brennan, C.S. (2002). Nutritional and physicochemical characteristics of dietary fiber enriched pasta. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 347–356.

Tumbas Šaponjac, V., Četković, G., Čanadanović-Brunet, J., Pajin, B., Djilas, S., Petrović, J., Vulić, J. (2016). Sour cherry pomace extract encapsulated in whey and soy proteins: Incorporation in cookies. *Food Chemistry*, 207, 27-33.

Tumbas Šaponjac, V., Girones-Vilaplana, A., Djilas, S., Meno, P., Četković, G., Moreno, D., Čanadanović-Brunet, J., Vulić, J., Stajčić, S., Krunić, M. (2014). Anthocyanin profiles and biological properties of caneberry (*Rubus* spp.) press residues. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 2393–2400.

Ubbink, J., Krüger, J. (2006). Physical approaches for the delivery of active ingredients in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 2006, 244-254.

Ullah, A.M., Zaman, S., Juhara, F., Akter, L., Tareq, S.M., Masum, E.H., Bhattacharjee, R. (2014). Evaluation of antinociceptive, *in vivo* & *in vitro* anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Curcuma zedoaria* rhizome. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 346-358.

Ullah, N., Ullah, S., Khan, A., Ullah, I., Badshah, S. (2018). Preparation and evaluation of carrot and apple blended Jam. *Journal of Food Processing and Technology*, 9, 725.

Umopathy, E., Ndebia, E.J., Meeme, A., Adam, B., Menziwa, P., Nkeh-Chungag, B.N., Iputo, J.E. (2010). An experimental evaluation of *Albuca setosa* aqueous extract on membrane stabilization, protein denaturation and white blood cell migration during acute inflammation. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 789-795.

Upadhyay, A., Sharma, H.K., Sarkar, B.C. (2008). Characterization of dehydration kinetics of carrot pomace. *Agricultural Engineering International*, X.

Us-Medina, U., Julio, L., Segura-Campos, M.R., Ixtaina, V.Y., Tomás, M.C. (2018). Development and characterization of spray-dried chia oil microcapsules using by-products from chia as wall material. *Powder Technology*, 334, 1-8.

Us-Medina, U., Julio, L.M., Segura-Compos, M.R., Ixtaina, V.Y., Tomas, M.C. (2018). Development and characterization of spray-dried chia oil microcapsules using by-products from chia as wall material. *Powder Technology*, 334, 1-8.

Vacca, V., Del Caro, A., Poiana, M., Piga, A. (2006). Effect of storage period and exposure conditions on the quality of basana extra-virgin olive oil. *Journal of Food Quality*, 29, 139-150.

Van-Bremeen, R.B., Pajkovic, N. (2008). Multitargeted therapy of cancer by lycopene. *Cancer Letters*, 269, 339-351.

Vladić, J. (2017). Savremene metode ekstrakcije rtanjskog čaja (*Satureja montana* L.), hemijski sastav i biološka aktivnost odabranih ekstrakata. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.

Vulić, J., Šeregelj, V., Kalušević, A., Lević, S., Nedović, V., Tumbas Šaponjac, V., Čanadanović-Brunet, J., Četković, G. (2019). Bioavailability and bioactivity of encapsulated phenolics and carotenoids isolated from red pepper waste. *Molecules*, 24, 2837.

Wagner, L.A., Warthesen, J.J. (1995). Stability of spray-dried encapsulated carrot carotenes. *Journal of Food Science*, 60, 1048-1053.

Walde, S.G., Math, R.G. Chakkarvarthi, A., Rao, D.G. (1992). Preservation of carrots by dehydration techniques-A Review. *Indian Food Packer*, 46, 37-42.

Wandrey, C., Bartkowiak, A., Harding, E.S. (2010). Materials for Encapsulation. In: Zuidam, N.J., Nedovic, V.A (Eds.), Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing. Springer, Dordrecht, pp. 31-100.

Wang, Y. F., Wang, J., Wu, J., Xu, P., Wang, Y. Q., Gao, J. J., Hochstetter, D. (2014). *In vitro* antioxidant activity and potential inhibitory action against α -glucosidase of polysaccharides from fruit peel of tea (*Camellia sinensis* L.). Journal of Zhejiang University Science B, 15, 173–180.

Wang, Y., Wang, L. (2000). Structures and properties of commercial maltodextrins from corn, potato, and rice starches. Starch, 52, 296,304.

Werner, S., Bohm, V. (2011). Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from pasta: Evaluation of an *in vitro* digestion model. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 59, 1163-1170.

West, C.E., Castenmiller, J.J.J.M. (1998). Quantification of the "SLAMENGI" factors for carotenoid bioavailability and bioconversion. International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 68, 371-377.

Wood, J.A. (2009). Texture, processing and organoleptic properties of chickpea-fortified spaghetti with insights to the underlying mechanisms of traditional durum pasta quality. Journal of Cereal Science, 49, 128–133.

Wu, B., Wang, B., Ma, H., Xu, B., Pan, Z. (2017). Highly efficient vegetable drying technology II: Infrared radiation drying and related combination drying. In: Zhang, M., Bhandari, B., Fang, Z. (Eds.), Handbook of drying of vegetables and vegetable products. CRC Press, Boca Raton, pp. 66–80.

Yadav, S., Pathera, A.K., Islam, R.U., Malik, A.K., Sharma, D.P. (2018). Effect of wheat bran and dried carrot pomace addition on quality characteristics of chicken sausage. Asian-australasian Journal of Animal Sciences, 31, 729-737.

Yamamoto, J., Naemura, A., Ijiri, Y., Ogawa, K., Suzuki, T., Shimada, Y., Giddings, J.C. (2008). The antithrombotic effects of carrot filtrates in rats and mice. Blood Coagulation & Fibrinolysis, 19, 785-792.

Ylönen, K., Alfthan, G., Groop, L., Saloranta, C., Aro, A., Virtanen, S.M. (2003). Dietary intakes and plasma concentrations of carotenoids and tocopherols in relation to glucose metabolism in subjects at high risk of type 2 diabetes: the Botnia Dietary Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 1434-1441.

Yonekura, L., Nagao, A. (2007). Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 107-115.

Yonekura, L., Nagao, A. (2009). Soluble fibers inhibit carotenoid micellization *in vitro* and uptake by Caco-2 cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 196-199.

Young, A.J., Lowe, G.M. (2001). Minireview, antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385, 20-27.

Yousif, A.M., Cranston, P., Deeth, H.C. (2003). Incorporation of bovine dry blood plasma into biscuit flour for the production of pasta. *Food Science and Technology*, 36, 295–302.

Yu, G., Bei, J., Zhao, J., Li, Q., Cheng, C. (2018). Modification of carrot (*Daucus carota* Linn. var. *Sativa* Hoffm.) pomace insoluble dietary fiber with complex enzyme method, ultrafine comminution, and high hydrostatic pressure. *Food Chemistry*, 257, 333-340.

Zaini, R., Clench, M.R., Le Maitre, C.L. (2011). Bioactive chemicals from carrot (*Daucus carota*) juice extracts for the treatment of leukemia. *Journal of Medicinal Food*. 14, 1303-1312.

Zaunschirm, M., Pignitter, M., Kienesberger, J., Hernler, N., Riegger, C., Eggersdorfer, M., Somoza, V. (2018). Contribution of the ratio of tocopherol homologs to the oxidative stability of commercial vegetable oils. *Molecules*, 23, 206.

Zen, C.K., Tiepo, C.B.V., da Silva, R.V., Reinehr, C.O., Gutokoski, L.C., Oro, T., Colla, L.M. (2019). Development of functional pasta with microencapsulated *Spirulina*: technological and sensorial effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100, 2018-2026.

Zgheib, P., Daher, C.F., Mroueh, M., Nasrallah, A., Taleb, R.I., El-Sibai, M. (2014). *Daucus carota* pentane/diethyl ether fraction inhibits motility and reduces invasion of cancer cells. *Chemotherapy*, 60, 302-309.

Zhang, D., Hamauzu, Y. (2004). Phenolic compounds and their antioxidant properties in different tissues of carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 2, 95-100.

Zhang, Z., Zhang, R., McClements, D.J. (2016). Encapsulation of β -carotene in alginate-based hydrogel beads: Impact on physicochemical stability and bioaccessibility. *Food Hydrocolloids*, 61, 1-10.

Zhao, Y. Ma, C.Y. Yuen, S.N. Phillips, D.L. (2004). Study of succinylated food proteins by Raman spectroscopy. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 1815-1823.

Zhao, Y.H., Manthey, F.A., Chang, S.K.C., Hou, H.J., Yuan, S. (2005). Quality characteristics of spaghetti as affected by green and yellow pea, lentil and chickpea flour. *Journal of Sensory Science*, 70, 371–376.

Zuidam, N.J., Shimoni, E. (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In Zuidam, N.J., Nedovic, V.A (Eds.), *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing*. Springer, Dordrecht, pp. 3-29.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Vanja Šeregelj, master inženjer tehnologije
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Gordana Četković, redovni profesor
Naslov rada: NR	Inkapsulirani karotenoidi iz sporednog proizvoda prerade šargarepe u funkcionalnoj hrani
Jezik publikacije: JP	Srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	Srpski/engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2021.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
Fizički opis rada: FO	7 poglavlja, 254 stranice, 47 slika, 46 tabela, 450 literaturnih navoda
Naučna oblast: NO	Tehničko-tehnološke nauke
Naučna disciplina: ND	Farmaceutsko inženjerstvo, Hemija prirodnih proizvoda

Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Sporedni proizvodi prerade šargarepe, karotenoidi, "zelena" ekstrakcija, funkcionalna hrana, inkapsulacija, testenina, jogurt, kvalitativne i kvantitativne karakteristike, funkcionalna svojstva, senzorska svojstva
UDK	
Čuva se: ČU	U biblioteci Tehnološkog fakulteta Novi Sad Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	
<p>Predmet istraživanja ove doktorske disertacije bila je inkapsulacija karotenoida iz sporednog proizvoda prerade šargarepe, u cilju njihove stabilizacije i dobijanja funkcionalnih sastojaka sa mogućnošću primene u funkcionalnoj hrani. U okviru navedenog cilja kreirani su novi, kvalitetni testeničarski proizvodi, kao i mlečno-fermentisani proizvod (jogurt).</p> <p>Rezultati istraživanja pružaju nova saznanja o stepenu redukcije karotenoda, tokom postupka pripreme i skladištenja obogaćenih proizvoda. Uspešno realizovana istraživanja ukazala su na stepen stabilnosti karotenoida iz sporednog proizvoda prerade šargarepe inkapsulacijom ovih jedinjenja razičitim tehnikama, čime je potvrđena i opravdanost primene istih u proizvodnji funkcionalne hrane.</p> <p>Na ovaj način se obezbeđuju funkcionalni proizvodi koji sadrže dovoljnu količinu visokovrednih jedinjenja koja imaju veću bioraspoloživost i finalan zdravstveni efekat. Zbog niza prednosti inkapsulirane forme ekstrakta imaju veliki potencijal primene kao funkcionalnih dodataka, ali i boja, u prehrambenim proizvodima.</p> <p>Istraživanja u okviru disertacije omogućavaju dobijanje inovativnih proizvoda koji proširuju paletu nutritivno vrednih proizvoda i doprinose kvalitetnijoj ishrani potrošača. Upotrebom sporednih proizvoda prerade voća i povrća smanjuje se količina otpada i doprinosi zaštiti životne sredine, povećava dobit proizvođača kroz poboljšanje iskorišćenja sirovine i konkurentnosti na tržištu.</p>	
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	29.11.2018.
Datum odbrane: DO	

<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>dr Senka Vidović, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, predsednik</p> <p>dr Gordana Četković, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, mentor</p> <p>dr Aleksandra Ranitović, docent, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, član</p> <p>dr Anamarija Mandić, naučni savetnik, Naučni instituti za prehrambene tehnologije, Univerzitet u Novom Sadu, član</p> <p>dr Viktor Nedović, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet Beograd, Univerzitet u Beogradu</p>
---	---

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY
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	Vanja Šregelj, MSc
Mentor: MN	Gordana Ćetković, PhD, full professor
Title: TI	Encapsulated carotenoids from carrot processing waste in functional food
Language of text: LT	Serbian, Latin
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2021
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Serbia, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Physical description: PD	7 chapters, 254 pages, 47 figures, 46 tables, 450 references
Scientific field SF	Technical – technological sciences
Scientific discipline SD	Pharmaceutical engineering, Natural product chemistry

Subject, Key words SKW	Carrot processing waste, carotenoids, "green" extraction, functional food, encapsulation, pasta, yogurt, qualitative and quantitative characteristics, functional properties, sensory properties
UC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology Novi Sad, 21000 Novi Sad, Serbia, Bulevar cara Lazara 1
Note: N	None
Abstract: AB	<p>The subject of this PhD thesis was the encapsulation of carotenoids from carrot processing waste, as well as their possible utilization as additives in functional food. Within the thesis aims a new, nutrient-rich, fine pasta products and milk-fermented product (yogurt) were created.</p> <p>Results of the research provide new knowledge about the degree of carotenoids reduction during process of preparation and storage of enriched products. Successfully realized research have indicated the degree of carotenoids stability from carrot processing waste by encapsulation based on different techniques, and justification of application of this approach in the functional food production.</p> <p>In this way, functional products which contain a sufficient amount of high-value compounds, with higher bioavailability and final health effect are provided. Due to a number of advantages, encapsulated form of this carotenoid extract have a great potential for application like food additives and colorants, ie. functional ingredients in food industry. Research in the framework of the thesis allow obtaining innovative products which expand the range of nutritionally valuable products and contribute to the quality of consumers diet. Using by-products of processing fruits and vegetables reduces the amount of waste and contributes to the protection of environment, increases the profit of producers by improving the efficiency of raw materials and market competitiveness.</p>
Accepted on Senate on: AS	29.11.2018.
Defended: DE	

Thesis Defend Board:
DB

Senka Vidović, PhD, associate professor,
Faculty of Technology Novi Sad, University of
Novi Sad, chairman

Gordana Četković, PhD, full professor, Faculty
of Technology Novi Sad, University of Novi
Sad, mentor

Aleksandra Ranitović, PhD, assistant professor,
Faculty of Technology Novi Sad, University of
Novi Sad, member

Anamarija Mandić, PhD, senior research
fellow, Institute of Food Technology, Novi Sad,
University of Novi Sad, member

Viktor Nedović, PhD, full professor, Faculty of
Agriculture Belgrade, University of Belgrade,
member

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Инкапсулирани каротеноиди из споредног производа прераде шаргарепе у функционалној храни
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет Нови Сад, лабораторије на предметима Органска хемија, Хемија хране, Хемија природних производа, Микробиологија. б) Универзитет у Милану, Департман за науку о храни, заштити животне средине и нутриционизму (ДеФЕНС), Милано, Италија. в) Савет за истраживања у пољопривреди и анализу аграрне економије (Цреа) - истраживачко одељење за селекцију житарица и унапређење биљних сорти, Сант Анђело Лодиђиано, Италија. г) Научни институт за прехранбене технологије, Универзитет у Новом Саду.
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Истраживања обухваћена овом докторском дисертацијом финансирана су од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, кроз пројекат “Развој производа и адитива од воћа и поврћа са високим садржајем биоактивних једињења” Евиденциони број пројекта: ТР 31044
1. Опис података
1.1 Врста студије
<i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> Докторска дисертација _____
1.2 Врсте података
а) квантитативни б) квалитативни
1.3. Начин прикупљања података
а) анкете, упитници, тестови б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи в) генотипови: навести врсту _____ г) административни подаци: навести врсту _____

- д) узорци ткива: навести врсту споредни производ прераде шаргарепе
- ђ) снимци, фотографије: навести врсту фотографије уређаја, испитивани узорци и микроскопски приказ испитиваних узорака
- е) текст, навести врсту литература
- ж) мапа, навести врсту _____
- з) остало: описати web садржај

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

- а) Excel фајл, датотека .xls
- б) SPSS фајл, датотека _____
- в) PDF фајл, датотека _____
- г) Текст фајл, датотека .doc
- д) JPG фајл, датотека .jpeg
- е) Остало, датотека статистички софтвер Statistica 10.0; Design-Expert 10.0

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- а) број варијабли велики број
- б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) велики број

1.3.3. Поновљена мерења

- а) да
- б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) временски размак између поновљених мера је између неколико минута и неколико дана
- б) варијабле које се више пута мере односе се на све експерименталне анализе (укупан садржај каротеноида, токоферола, антиоксидативна активност, фармаколошка активност итд.)
- в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

- а) Да
- б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

- а) експеримент, навести тип хемијска анализа
- б) корелационо истраживање, навести тип Simplex Centroid Mixture експериментални дизајн, Principal component analysis – PCA analiza
- ц) анализа текста, навести тип тумачење добијених резултата, извођење закључака и поређење са литературним подацима
- д) остало, навести шта _____

2.1.2 *Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).*

- Лабораторијски лиофилизатор, модел Alpha 2-4 LSC
- Спреј сушач Büchi mini B-290
- Електростатички систем за инкапсулацију, VAR V1 Nisco Encapsulation Unit
- Ital past Mac 30 Pasta Maker Extruder
- Спектрофотометар, Multiscan GO
- Обрада података статистички софтвер Statistica 10.0. и Design-Expert 10.0

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? _____
- б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да **Не**
- в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан применом различитих статистичких тестова и одбацивањем екстремних вредности.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Поређењем добијених резултата истраживања са литературним подацима извршена је контрола уноса података у матрицу.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијум Универзитета Нови Сад.

3.1.2. URL адреса накнадно

3.1.3.

DOI

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2. Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3. Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? _____

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да Не

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности

(https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да **Не**

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

- а) јавно доступни
- б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области
- ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Вања Шерегељ, vanjaseregelj@tf.uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Вања Шерегељ, vanjaseregelj@tf.uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Вања Шерегељ, vanjaseregelj@tf.uns.ac.rs