UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Danijel D. Milinčić

Sporedni proizvodi vinske industrije kao izvor bioaktivnih jedinjenja: karakterizacija i mogućnost primene u prehrambenoj industriji

Doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Danijel D. Milinčić

By-products of winemaking industry as source of bioactive compounds: characterisation and possibility of its applications in food industry

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

Mentor

dr Mirjana B. Pešić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije

dr Slađana Stanojević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Aleksandar Ž. Kostić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Aleksandar Petrović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Nemanja Stanisavljević, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI)

dr Uroš Gašić, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju (IBISS)

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

Zahvalnica

Najveći deo ove doktorske disertacije je urađen u laboratorijama Katedre za Hemiju i biohemiju, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Deo eksperimenata je urađen u laboratorijama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI); Katedre za analitičku hemiju, Hemijskog fakulteta; i Instituta za biološka istraživanja (IBISS), Univerziteta u Beogradu.

Zahvaljujem se mlekari „Selecta", Inđija, što su mi obezbedili uzorke kozijeg mleka.

Zahvaljujem se vinariji „Vinska kuća Milinčić", Aleksandrovac, Župa, što su mi obezbedili uzorke komine.

Dr Mirjana B. Pešić, redovni profesor, je rukovodila ovom doktorskom disertacijom i najvećim delom doprinela da ova doktorska disertacija bude uspešno izvedena i realizovana. Duboko poštovanje i zahvalnost dugujem profesorki Miri Pešić, na svom znanju koje je nesebično delila samnom tokom izrade ove doktorske disertacije, predanosti, efikasnosti, sugestijama, savetima tokom pisanja ove disertacije i zajedničkim tumečenjima rezultata ne samo iz ove disertacije, već i šire. Hvala profesorki što mi je ukazala poverenje, verovala u mene, i što mi je svojom pozitivnom energijom davala snagu, volju i podršku svo vreme tokom izrade ove disertacije i zajedničkog rada u laboratoriji. Posle svakog našeg razgovora, granice mog saznanja, eksperimentalnih dostignuća i samopouzdanja su pomerane.

Zahvalan sam dr. Aleksandru Ž. Kostiću, vanrednom profesoru, što je učestvovao u realizaciji ove doktorske disertacije. Iskreno sam mu zahvalan na bezrezervnoj pomoći tokom laboratorijskog rada, sugestijama, korisnim savetima i podršci koju mi je pružao kada god mi je bilo teško. Hvala što ste svojom energijom, šarmom i smehom doprineli da mi svaki rad na fakultetu bude ispunjen radošću.

Duboko poštovanje i zahvalnost dugujem dr Miroljubu Baraću, redovnom profesoru, što mi je nesebično delio savete, korisne sugestije i svoja laboratorijska iskustva; koja su mi pomogla u realizaciji ove doktorske disertacije i naučno-istraživačkom radu.

Duboko poštovanje i zahvalnost dugujem dr Slađani Stanojević, redovnom profesoru, na svakoj pomoći u laboratorijskom radu, savetima, sugestijama i podršci tokom izrade ove doktorske disertacije.

Iskreno poštovanje i zahvalnost dugujem dr Živoslavu LJ. Tešiću, profesoru u penziji, koji mi je nesebično otvorio vrata svoje laboratorije na Hemijskom fakultetu, omogućio detaljnu karakterizaciju polifenolnih profila i samim tim značajno doprineo u realizaciji ove doktorske disertacije. Hvala na podršci i svim konstruktivnim sugestijama.

Iskreno poštovanje i zahvalnost dugujem, dr Urošu Gašiću, višem naučnom saradniku, na svim uspešno urađenim i istumačenim polifenolnim karakterizacijama, korisnim sugestijama, zajedničkoj saradnji i prijateljskim razgovorima.

Iskreno poštovanje i zahvalnost dugujem, dr Nemanji Stanisavljeviću, višem naučnom saradniku, koji je od početka bio uključen u izradi ove doktorske disertacije, i koji je svojim idejama, znanjem, sugestijama i laboratorijskim radom značajno doprineo u realizaciji iste. Hvala mu na poverenju koje mi je ukazao, pažljivom čitanju ove disertacije, korekcijama, zajedničkom naučno-istraživačkom radu, predanosti i prijateljskim razgovorima.

Iskreno poštovanje i zahvalnost dugujem dr Aleksandru Petroviću, vanrednom profesoru; dr Jeleni Miočinović, redovnom profesoru; dr Bojani Vidović, vanrednom profesoru; dr Viktoru Nedoviću, redovnom profesoru; dr Stevi Leviću, vanrednom profesoru; dr Vladimiru Pavloviću, redovnom profesoru; dr Vladi Racu, vanrednom profesoru; dr Bojani Špirović Trifunović; dr Tomislavu Tostiju; dr Nebojši Banjcu, vanrednom profesoru; dr Svetlani Soković Bajić; dr Milanu Kojiću; dr Jeleni Lađarević; dr Ljilji Prokić, vanrednom profesoru; dr Aleksandri Dramićanin; dr Marini Hovjecki; mr Stefanu Kolašincu; i Milanu Damajnoviću, na pomoći, doprinosu i sugestijama tokom izrade i realizacije ove doktorske disertacije.

Veliko hvala Dejanu Ipaču, dragom prijatelju, na podršci i pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije. Veliko hvala Neši, Nadi, Slaviši na podršci tokom izrade ove disertacije. Veliko hvala Dragici Ipač, na podršci i finalnoj obradi ove disertacije.

Hvala mojim dragim prijateljima i kolegama na razumevanju i bezuslovnoj podršci tokom izrade ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem mojoj porodici, svojim roditeljima, sestri, dedi i babi, koji su mi bili oslonac i bezuslovna podrška, tokom izrade ove disertacije i generalno u životu. Hvala im za svu ljubav koju su mi pružili i koju mi pružaju, za večiti osmeh na mom licu, za razumevanje, strpljenje i snagu koju mi daju.

Na kraju, posebnu zahvalnost dugujem mojoj Mici, za bezgraničnu ljubav, podršku i strpljenje tokom izrade ove doktorske disertacije. Hvala što si uvek bila uz mene, hvala na razumevanju kada ti nisam bio potpuno posvećen, kada sam noćima pisao radove i kada sam svakodnevno do kasno uveče radio na fakultetu.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svojoj porodici i mojoj Mici!

Beograd, 2023

Autor

Danijel D. Milinčić

Sporedni proizvodi vinske industrije kao izvor bioaktivnih jedinjenja: karakterizacija i mogućnost primene u prehrambenoj industriji

Izvod

U okviru ove doktorske disertacije su okarakterisana fenolna jedinjenja pokožice i semenki izdvojenih iz nefermentisane komine internacionalnih i autohtonih sorti grožđa, kao i fermentisane komine vinske sorte Prokupac. Dijetna vlakna, rastvorni ugljeni hidrati (mono- i oligosaharidi) i masne kiseline u semenkama komine grožđa su dodatno okarakterisani. Odabrani ekstrakti fenolnih jedinjenja su korišćeni u formulaciji funkcionalnih aditiva na bazi proteina kozijeg mleka i kozijih jogurata dobijenih korišćenjem starter kultura i odabranog *Lactobacillus plantarum* soja. Utvrđen je efekat matriksa hrane (meso/žitarice, proteini kozijeg mleka, dijetna vlakna (inulin), proteini mleka/dijetna vlakna), na biodostupnost fenolnih jedinjenja iz pokožice i semenki grožđa nakon *in vitro* digestije. Za postizanje ovih ciljeva koriščene su: spektrofotometrijske, hromatografske, elektroforetske i DNK-zasnovane tehnike, zajedno sa spektroskopskim, fizičko-hemijskim i biohemijskim analizama.

Brašna semenki izdvojenih iz nefermentisane komine dobar su izvor nerastvornih/ukupnih dijetnih vlakana, zaostalih monosaharida (glukoza i fruktoza) i nutritivno vrednih masnih kiselina (linolne i oleinske kiseline). Procijanidini i katehin su dominantna fenolna jedinjenja u semenkama, dok su u pokožicama najzastupljeniji flavonoli, kao i derivati malvidina i peonidina iz klase antocijana. Liofilizacija fermentisane komine Prokupca i njenih konstituenata ima neznatan uticaj na sadržaj dominatnih fenolnih jednjenja koja su ispoljila dobra antioksidativna svojstva. Ekstrakt pokožice pokazao je ćelijsku antioksidativnu aktivnost na humanim ćelijama kolorektalnog adenokarcinoma, dok se ekstrakt liofilisane šepurine pokazao kao dobar izvor stilbenoida.

Dodatkom ekstrakta semenki grožđa i inulin/ekstrakt praha u termički tretirano kozije mleko utvrđeno je prisustvo polifenol-protein interakcija, prvenstveno procijanidina sa serum protein/kazein kompleksima. Dobijeni funkcionalni aditivi su pokazali dobra antioksidativna svojstva, dok su 0,1% vodeni rastvori pokazali dobra emulgujuća i loša peniva svojstva. Predloženi su modeli distribucije fenolnih jedinjenja između serum i micelarne faze kozijeg mleka, kao i distribucije kazeinskih micela na međufazama ulje/voda i vazduh/voda u emulzijama i penama formiranim od odabranih funkcionalnih aditiva. Jogurt od kozijeg mleka sa dodatim ekstraktom semenki grožđa, fermentisan starter kulturom i *L. plantarumom*, je pokazao dobra teksturna i senzorna svojstva. Ovaj liofilisani jogurt je pokazao bolja antioksidativna i emulgujuća svojstva u poređenju sa drugim liofilisanim jogurtima. Svi liofilisani jogurti, koji su fermentisani sa *L. plantarum*-om, pokazali su visoku vijabilnost ćelija (>10^8 CFU/g SM).

Biodostupnost fenolnih jedinjenja iz pokožice i semenki grožđa nakon *in vitro* digestije bila je različita i zavisna od sastava matriksa, i kretala se od 6,03% za matriks kozije mleko/inulin do 50.9% za matriks meso/žitarice. Proteini nisu detektovani u rastvornim frakcijama digeriranih funkcionalnih aditiva jer su potpuno hidrolizovani nakon *in vitro* gastrointestinalne digestije.Digerirani funkcionalni aditivi pokazali su smanjena (osim kod meso/žitarice matriksa) antioksidativna svojstva u odnosu na nedigerirane uzorke, što je bilo u korelaciji sa smanjenom biodostupnošću fenolnih jedinjenja.

Na osnovu dobijenih rezultat može se zaključiti da komina vinske sorte Prokupac i njeni konstituenti, mogu biti jeftin izvor fenolnih jedinjenja pogodnih za razvoj funkcionalnih prehrambenih proizvoda, dok njeno korišćenje istovremeneo omogućava zaštitu životne sredine.

Ključne reči: komina grožđa, semenka, pokožica, Prokupac, kozije mleko, fenolna jedinjenja-protein interakcije, funkcionalni aditivi, koziji jogurt, biodostupnost, matriks hrane

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Nauka o konzervisanju i vrenju

UDK: 663.26:579.222(043.3)

By-products of winemaking industry as source of bioactive compounds: characterisation and possibility of its applications in food industry

Abstract

The aim of this doctoral dissertation was characterisation of phenolic compounds of skins and seeds separated from non-fermented pomace of international and indigenous grape varieties, as well as phenolic profiles of fermented pomace of the Prokupac grape variety. Dietary fiber, soluble carbohydrates (mono- and oligosaccharides), and fatty acids from grape pomace seed extracts were also characterised. Selected phenolic extracts were used in the formulation of functional additives based on goat milk protein and goat yogurts produced with the utilisation of starter culture and selected *Lactobacillus plantarum* strain. The effect of food matrices (meat/cereal, goat's milk protein, dietary fiber (inulin), goat's milk protein/dietary fiber) on the bioaccessibility of phenolic compounds from skin and grape seeds after *in vitro* digestion was evaluated. Spectrophotometric, chromatographic, electrophoretic, and DNA-based techniques together with spectroscopy, physicochemical and biochemical analyses were used to achieve these aims.

Grape seed flours of non-fermented pomaces are a good source of insoluble/total dietary fiber, residual monosaccharides (glucose and fructose), and nutritionally valuable fatty acids (linoleic and oleic acids). Procyanidins and catechin were dominant in the seeds, while flavonols, malvidin and peonidin derivatives were the most common phenolic compounds in the skins. Lyophilization of fermented Prokupac pomace and its constituents has a slight effect on the dominant phenolic compounds that showed good antioxidant properties. The skin extract exerted cellular antioxidant activity on adenocarcinoma cells, while extract of lyophilized pomace stems showed as a good source of stilbenoids.

After the addition of seed extract and inulin/extract powder to thermally treated goat milk, the presence of polyphenol-protein interactions were recorded, primarily procyanidin with serum protein/caseins (WP/CN) complex. Furthermore, obtained functional additives showed good antioxidant properties, whereas 0.1% water solutions showed good emulsifying properties but poor foaming techno-functional properties. Models of phenolic compounds distribution between serum and micellar phases in thermally treated goat milk, as well as the distribution of casein micelles at the oil/water and air/water interfaces in emulsions and foams of selected functional additives were proposed. Goat yogurt with seed extract fermented with starter culture and *L. plantarum* showed good textural and sensory properties. This lyophilized yogurt showed better antioxidant and emulsifying properties compared to other lyophilised yoghurts. All lyophilized yoghurts, fermented with *L. plantarum*, showed high cell viability (>10^8 CFU/g SM).

The bioaccessibility of individual phenolic compounds from grape skins and seeds were different and dependent on the composition of the food matrix. The bioaccessibility ranged from 6.03% for goat milk/inulin matrix to 50.9% for meat/cereals matrix. Proteins were not detected in the soluble fractions of digested functional additives, because its completely hydrolyzed after *in vitro* digestion. The digested samples showed reduced (except for meat/cereal matrix) antioxidant properties compared to their undigested samples,which were related to the reduced bioaccessibility of phenolics.

Based on the obtained results it can be concluded that grape pomace of the Prokupac variety can be a cheap source of phenolic compounds suitable for the development of functional food products, while its utilisation allows, at the same time, enviroment protection.

Keywords: grape pomace, seed, skin, Prokupac, goat milk, phenolic compounds-protein interactions, functional additives, goat yogurt, bioaccessibility of phenolic compounds, food matrix

Scientific field: Technological engineering

Scientific subfield: The science of food preservation and fermentation

UDK: 663.26:579.222(043.3)

Skraćenice

ABAP	2,2-azobis(2-amidinopropan)dihidrohlorid
AA	Askorbinska kiselina
ABTS$^{\bullet+}$	2,2-azino-bis/3-etil-benotiazolin-6-sulfonska kiselina
ABTS$^{\bullet+}$ test	Sposobnost sakupljanja ABTS$^{\bullet+}$ radikal katjona
BSA	Goveđi serum albumin
CNM	Kazeinska micela
CFU	"Colony forming units"-Broj vijabilnih bakterija
CAA	Ćelijska antioksidativna aktivnost
CE	Katehin ekvivalent
CUPRAC	Kupri jon redukujuća antioksidativna moć
CAA	Ćelijska antioksidativna aktivnost
DCFH-DA	2,7-dihlorofluorescin diacetat
DF	Stepeni slobode
DPE	Digeriran ekstrakt pokožice
DPER	Biodostupnost fenolnih jedinjenja posle *in vitro* digestije ekstrakta pokožice
DM	Digeriran matriks hrane
DMR	Biodostupnost fenolnih jedinjenja (flavan-3-ola) nakon *in vitro* digestije matriksa hrane
DPE/M	Digeriran ekstrakt pokožice u prisustvu matriksa hrane
DPE/MR	Biodostupnost fenolnih jedinjenja iz ekstrakta pokožice nakon *in vitro* digestije u prisustvu matriksa hrane
DPE/MTR	Biodostupnost fenolnih jedinjenja nakon *in vitro* digestije ekstrakta pokožice u prisustvu matriksa hrane
DSE	Digeriran ekstrakt semenke
DSER	Biodostupnost fenolnih jedinjenja (flavan-3-ola) nakon *in vitro* digestije ekstrakta semenke
DSE/M	Digeriran ekstrakt semenke u prisustvu matriksa hrane
DSE/MR	Biodostupnost fenolnih jedinjenja (flavan-3-ola) iz ekstrakta semenke nakon *in vitro* digestije u prisustvu matriksa hrane
DSE/MTR	Ukupna biodostupnost fenolnih jedinjenja (flavan-3-ola) nakon *in vitro* digestije ekstrakta semenke u prisustvu matriksa hrane
DPPH$^{\bullet}$	2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate
DPPH$^{\bullet}$ test	Sposobnost sakupljanja DPPH$^{\bullet}$ radikala
DTME3R	Biodostupnost fenolnih jedinjenja nakon *in vitro* digestije TME3 funkcionalnog aditiva
DTM	Digerirano odmašćeno termički tretirano kozije mleko
DTME3	Digeriran TME3 funkcionalni aditiv
DCC	Digestivni koktel sa enzimima
DTMI	Digeriran prah termički tretirano kozije mleko/ekstrakt semenke
DIE	Digeriran sprej osušen prah inulin/ekstrakt semenke
DIER	Biodostupnost fenolnih jedinjenja nakon *in vitro* digestije inulin/ekstrakt sprej osušenog praha
DTMIE3	Digeriran TMIE3 funkcionalni aditiv
DTMIE3R	Biodostupnost fenolnih jedinjenja nakon *in vitro* digestije TMIE3 funkcionalnog aditiva
ESI	Indeks stabilnosti emulzije
EAI	Indeks aktivnosti emulzije
EDTA	Etilendiaminotetrasirćetna kiselina
ES	Ekstrakciono sredstvo
EG	Etil-galat
E	Vodeni ekstrakt semenki korišćen u formulaciji aditiva
FRP	Sposobnost redukcije Fe^{3+} jona (Redukujuća moć)
FCC	Sposobnost heliranja Fe^{2+} jona
GC	Gasna hromatografija
GID	Simulirana *in vitro* gastrointestinalna digestija
GAE	Evivalent galne kiseline
HPAEC	Jonoizmenjivačka hromatografija visokih performansi
HPS aktivnost	Sposobnost uklanjanja vodonik peroksida
HCA	Hijerarhijska klaster analiza
HB	Hidroksibenzoeva kiselina
HC	Hidroksicimetna kiselina
HMW	Proteinski kompleksi velikih molekulskih masa

IA	Indeks atherogenosti
IT	Indeks trombogenosti
Ig	Imunoglobulini
IE	Sprej osušeni prah inulin/ekstrakt semenke
I	Inulin
IE/WP	Kompleksi inulin/fenolna jedinjenja/denaturisani serum proteini
I/WP	Kompleksi inulin/denaturisani serum proteini
IE/WP/CN	Kompleksi inulin/fenolna jedinjenja/denaturisani serum proteini/kazeini
IVP	% ukupnih, pojedinačnih klasa i pojedinačnih fenolnih jedinjenja vezanih za inulin
KP	Kapacitet pene
LMW	Standard molekulskih masa
Lf	Laktoferin
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid
MNMK	Mono-nezasićene masne kiseline
MK	Masne kiseline
MAC	Sadržaj ukupnih monomernih antocijana
M3G	Malvidin-3-*O*-glukozid
MS	Srednje sume kvadrata
MA	Razblažen matriks hrane
MKo	Digestija matriksa hrane kontrola (t_0)
M	Odmašćeno sirovo kozije mleko
MVP	% ukupnih, pojedinačnih klasa i pojedinačnih fenolnih jedinjenja vezanih za proteine mleka
MIVP	% ukupnih, pojedinačnih klasa i pojedinačnih fenolnih jedinjenja vezanih za proteine mleka/inulin matriks
NDV	Nerastvorna dijetna vlakna
Native-PAGE	Nativna poliakrilamidna gel elektroforeza
NMK	Nezasićene masne kiseline
ORAC	Kapacitet apsorpcije kiseoničnog radikala
PNMK	Poli-nezasićene masne kiseline
PCA	Analiza glavnih komponenti
PAC	Sadržaj ukupnih pro(anto)cijanidina
PA	Pro(anto)cijanidini
PE	Razblažen ekstrakt pokožice
PEK	Digestija ekstrakta pokožice kontrola (t_0)
PE/MK	Digeriran ekstrakt pokožice u prisustvu matriksa hrane (t_0)
P_{jo}	Jogurt bez ekstrakta, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem
PE_{jo}	Jogurt sa ekstraktom, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem
PM	Termički tretirano (pasterizovano) punomasno kozije mleko (90°C, 5min)
Po	Liofilisano mleko+odabrani *L. plantarum* soj
P	Liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem
PEo	Liofilisano mleko/ekstrakt+odabrani *L.plantarum* soj
PE	Liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem
QE	Kvercetin ekvivilent
RDV	Rastvorna dijetna vlakna
ROS	Reaktivni kiseonični radikali
Ri	% ukupnih, pojedinačnih klasa i pojedinačnih fenolnih jedinjenja u digeriranim TME, IE i TMIE3 uzorcima koji je određen u odnosu na njihove sadržaj u polaznim rekonstituisanim uzorcima
SM	Suva masa uzorka određena sušenjem na 105°C
SDS	Natrijum-dodecyl sulfat
SDS-R-PAGE	SDS poliakrilamidna gel elektroforeza u redukujućim uslovima
SDS-NR-PAGE	SDS poliakrilamidna gel elektroforeza u neredukujućim uslovima
SEM	Skenirajuća elektronska mikroskopija
SP	Stabilnost pene
Sušenje TV	Sušenje toplim vazduhom
SG	Sorta grožđa
SS	Sume kvadrata
SE	Razblažen ekstrakt semenke
SEK	Digestija ekstrakta semenke kontrola (t_0)
SE/MK	Digeriran ekstrakt semenke u prisustvu matriksa hrane (t_0)

SSF	Simuliran saliva fluid (pljuvačni sok)
SGF	Simuliran gastrični fluid
SIF	Simuliran intestinalni fluid
S_{jo}	Jogurt bez ekstrakta fermentisan sterterom
SE_{jo}	Jogurt obogaćen ekstraktom fermentisan starterom
SOES	Sprej osušen ekstrakt semenke, koji je rekostituisan u 80%metanoli+0,1%HCl
SK	Standard glavnih proteina kravljeg mleka
SEP_{jo}	Jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom i odabranim *L. plantarum* sojem zajedno
SPM	Sirovo punomasno kozije mleko
So	Liofilisano mleko+starter kultura
S	Liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan starter kulturom
SEo	Liofilisano mleko/ekstrakt+starter kultura
SE	Liofilisan jogurt koji je obogaćen ekstraktom, fermentisan starter kulturom
SEPo	Liofilisano mleko/ekstrakt+starter kultura+odabrani *L.plantarum* soj
SEP	Liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom i odabranim *L. plantarum* sojem zajedno
TPC	Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja
TFC	Sadržaj ukupnih flavonoida
TRAP	Ukupni antioksidativni parameter hvatanja radikala
TOSCA	Ukupni kapacitet hvatanja oksi radikala
TAC	Ukupna antioksidativna aktivnost (*in vitro* fosfomolibden redukujuća moć)
TEAC	Trolox ekvivalent antioxidativni kapacitet
TMF3O	Ukupni monomerni flavan-3-oli
TPAtip	Ukupni procijanidin izomeri A tip
TPBtip	Ukupni procijanidin izomeri B tip
TPGI	Ukupni procijanidin galat izomeri
TF3O	Ukupni flavan-3-oli
TDGK	Ukupni derivati galne kiseline
THBK	Hidroksibenzoeva kiselina i njeni derivati
THCK	Hidroksicimetna kiselina i njeni derivati
TFK	Ukupne fenolne kiseline
TFL	Ukupni flavonol aglikoni i glikozidi
TST	Ukupni stilbenoidi
TAN	Ukupni antocijani
TPC_{OR}	Ukupna fenolna jedinjenja određena UHPLC Orbitrap MS (MS^4) kvantifikacijom
TAD	Ukupni aromodendrin derivati
TQD	Ukupni kvercetin derivati
TSD	Ukupni siringetin derivati
TMD	Ukupni miricetin derivati
TID	Ukupni izoramnetin derivati
TKD	Ukupni kampferol derivati
TLD	Ukupni laricitrin derivati
TCiD	Ukupni cijanidin derivati
TDeD	Ukupni delfinidin derivati
TMaD	Ukupni malvidin derivati
TPeoD	Ukupni peonidin derivati
TPelD	Ukupni pelargonidin derivati
TPetD	Ukupni petunidin derivati
TM	Termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min)
TME1	Funkcionalni aditiv na bazi odmašćenog termički tretiranog kozjeg mleka obogaćen ekstraktom semenke, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/ekstrakt pre sprej sušenja 0,2mg/ml
TME2	Funkcionalni aditiv na bazi odmašćenog termički tretiranog kozjeg mleka obogaćen ekstraktom semenke, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/ekstrakt pre sprej sušenja 0,4mg/ml
TME3	Funkcionalni aditiv na bazi odmašćenog termički tretiranog kozjeg mleka obogaćen ekstraktom semenke, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/ekstrakt pre sprej sušenja 0,6mg/ml
TMI	Model prah termički tretirano kozije mleko/inulin

TMIE1	Funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozjeg mleka sa dodatkom sprej osušenog praha inulin/ekstrakt, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) mešavini pre sprej sušenja 0,1mg/ml
TMIE2	Funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozjeg mleka sa dodatkom sprej osušenog praha inulin/ekstrakt, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) mešavini pre sprej sušenja 0,2mg/ml
TMIE3	Funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozjeg mleka sa dodatkom sprej osušenog praha inulin/ekstrakt, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) mešavini pre sprej sušenja 0,3mg/ml
UDV	Ukupna dijetna vlakna
UHPLC	Ultra-efikasna tečna hromatografija
VK	Vinska kiselina
WP/CN	Kompleksi denaturisani serum proteini/kazeini
WP	Serum proteini
WP kompleksi	Kompleksi denaturisanih serum proteina
ZMK	Zasićene masne kiseline
°Bx	Stepen briksa
100% Me	Ekstrakciono sredstvo 100% metanol+0,1%HCl
50% Et	Ekstrakciono sredstvo 50% etanol (50:50 etanol/H_2O)
80% Me	Ekstrakciono sredstvo 80% metanol+0,1%HCl
αs1-CN	αs1-kazein
αs2-CN	αs2-kazein
β-CN	β-kazein
κ-CN	κ-kazein
γ-CN	γ-kazein
β-LG	β-laktoglobulini
α-LA	α-laktalbumin

Sadržaj

1. Uvod ... *1*
2. Pregled literature ... *4*
2.1. Grožđe-Internacionalne i autohtone sorte ... *4*
2.1.1. Konstituenti bobice grozda ... *5*
2.2. Komina-sporedni proizvod vinske industrije ... *5*
2.2.1. Hemijski sastav komine i njenih konstituenata (pokožica, semenka i šepurina) ... *7*
2.2.1.1. Dijetna vlakna ... *7*
2.2.1.2. Rezidualni (zaostali) ugljeni hidrati (mono- i oligosaharidi) ... *9*
2.2.1.3. Proteini ... *9*
2.2.1.4. Lipidi ... *9*
2.2.1.5. Vitamini ... *10*
2.2.1.6. Minerali ... *10*
2.3. Komina i njeni konstituenti kao izvor fenolnih jedinjenja ... *10*
2.3.1. Fenolne kiseline i stilbeni ... *11*
2.3.2. Flavonoidi ... *13*
2.3.3. Obrada komine i ekstrakcija fenolnih jedinjenja ... *15*
2.3.4. Analitičke metode u karakterizaciji fenolnih jedinjenja ... *16*
2.3.5. Funkcionalna svojstva i biološka aktivnost fenolnih jedinjenja komine i njenih konstituenata ... *17*
2.4. Kozije mleko ... *20*
2.4.1. Uticaj termičkog tretmana na proteine kozijeg mleka ... *21*
2.4.2. Proteini kozijeg mleka: Funkcionalna svojstva i ponašanje tokom in vitro i in vivo gastrointestinalne digestije ... *22*
2.4.3. Tehno-funkcionalna svojstva proteina kozijeg mleka ... *24*
2.5. Primena komine i njenih konstituenata u prehrambenoj industriji ... *25*
2.5.1. Primena brašna komine, pokožice i semenke u formulaciji prehrambenih proizvoda ... *25*
2.5.2. Primena ekstrakta fenolnih jedinjenja komine, pokožice i semenke u formulaciji prehrambenih proizvoda ... *30*
2.5.2.1. Fermentisani mlečni napici na bazi kozijeg mleka obogaćeni funkcionalnim dodacima ... *34*
2.5.3. Funkcionalni aditivi na bazi proteina mleka i ektrakata komine, semenke i pokožice ... *34*
2.5.4. Lactobacillus plantarum i njegova tanazna aktivnost ... *35*
2.5.4.1. Funkcionalna, fizičko-hemijska i senzorna svojstva fermetisanih mlečnih napitaka na bazi kozijeg mleka korišćenjem različitih sojeva Lactobacillus plantarum ... *35*
2.6. Modeli simulirane gastrointestinalne digestije za određivanje biodostupnosti fenolnih jedinjenja . *36*
2.6.1. Primena modela in vivo i in vitro digestije u analizi biodostupnosti fenolnih jedinjenja i njihovih funkcionalnih svojstava ... *38*
2.6.2. In vitro digestija grožđa, vina, komine, pokožice, semenke, šepurine i/ili njihovih fenolnih ekstrakata ... *39*
2.6.3. Uticaj različitih matriksa hrane na biodostupnost fenolnih jedinjenja iz grožđa, vina, komine, pokožice, semenke, šepurine i/ili njihovih fenolnih ekstrakata ... *44*
2.6.4. Interakcije fenolnih jedinjenja sa proteinima ... *47*
2.6.4.1. Uticaj mleka na biodostupnost fenolnih jedinjenja ... *48*
3. Materijal i metode ... *49*
3.1. Tehnološki parametri grožđa ... *49*
3.2. Priprema brašna semenki i pokožica izdvojenih iz nefermentisane komine ... *49*
3.2.1. Priprema uzoraka brašna semenki/pokožica za gasnu hromatografiju (GC) i jonoizmenjivačku hromatografiju visokih performansi (HPAEC) ... *49*
3.2.1.1. GC analiza masnih kiselina ... *49*
3.2.1.2. HPAEC analiza mono- i oligosaharida ... *50*
3.2.2. Određivanje dijetnih vlakana ... *50*
3.2.3. Priprema fenolnih ekstrakata semenki/pokožica za hromatografsku analizu ... *51*
3.3. Priprema brašna/ekstrakta fermentisane komine Prokupca i njenih konstituenata ... *51*
3.4. Priprema funkcionalnih aditiva na bazi proteina kozijeg mleka ... *52*
3.4.1. Priprema mešavina mleko/ekstrakt semenke ... *52*

3.4.2. Priprema mešavina mleka sa prahom inulin/ekstrakt semenke ... 52
3.4.3. Dobijanje funkcionalnih aditiva sprej sušenjem obogaćenog mleka – neferementisani funkcionalni aditivi ... 53
3.4.3.1. Zeta (ζ) potencijal i veličina čestica nefermentisanih funkcionalnih aditiva ... 53
3.5. Priprema funkcionalnih kozijih jogurata i liofolisanih kozijih jogurta kao funkcionalnih aditiva. 53
3.5.1. Lactobacillus plantarum soj korišćen u proizvodnji jogurta ... 54
3.5.1.1. Bakterijski sojevi ... 54
3.5.1.2. Spektrofotometrijski test tanazne aktivnosti sojeva ... 54
3.5.1.3. Izolacija i prečišćavanje hromozomalne DNK ... 55
3.5.1.4. PCR reakcija za detekciju prisustva gena za tanaze tanALp i tanBLp ... 55
3.5.2. Teksturalna svojstva dobijenih jogurata ... 56
3.5.3. Senzorna analiza ... 56
3.5.4. Priprema liofilizovanih jogurata – fermentisani funkcionalni aditivi ... 56
3.5.4.1. Određivanje ukupnog broja vijabilnih bakterijskih ćelija ... 57
3.6. Priprema funkcionalnih aditiva za određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja, antioksidativnih i tehno-funkcionalnih svojstava ... 57
3.6.1. Priprema za UHPLC-DAD MS/MS analizu ... 57
3.6.2. Priprema za analizu ukupnih fenolnih jedinjenja, antioksidativne aktivnosti i tehno-funkcionalnih svojstava ... 57
3.7. Simulirana in vitro gastrointestinalna digestija (GID) ... 57
3.7.1. Biodostupnost fenolnih jedinjenja nakon digestije ... 59
3.7.2. Priprema uzoraka pre i nakon digestije za elektroforetsku analizu ... 60
3.8. Metode i instrumentalne tehnike korišćene u doktorskoj disertaciji ... 60
3.8.1. UV-VIS spektrofotometrija ... 60
3.8.1.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, sadržaj ukupnih flavonoida, sadržaj ukupnih monomernih antocijana, sadržaj ukupnih proantocijanidina ... 60
3.8.1.2. Sadržaj proteina ... 61
3.8.1.3. Antioksidativna svojstva ... 61
3.8.1.3.1. Sposobnost redukcije Fe^{3+} jona (redukujuća moć) - FRP ... 61
3.8.1.3.2. Sposobnost sakupljanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala - $ABTS^{\bullet+}$ test ... 61
3.8.1.3.3. Sposobnost heliranja jona Fe^{2+} - FCC ... 62
3.8.1.3.4. Ukupni antioksidativni kapacitet - TAC ... 62
3.8.1.3.5. Sposobnost sakupljanja $DPPH^{\bullet}$ radikala – $DPPH^{\bullet}$ test ... 62
3.8.1.3.6. Merenje relativne sposobnosti sakupljanja $DPPH^{\bullet}$ radikala - $DPPH^{\bullet}$ RDSC ... 62
3.8.1.3.7. Sposobnost uklanjanja vodonik peroksida - HPS aktivnost ... 63
3.8.1.4. Citotoksična svojstva ... 63
3.8.1.4.1. MTT test ... 63
3.8.1.4.2. Test sposobnosti sakupljanja unutarćelijskih reaktivnih vrsta - CAA ... 64
3.8.2. Hromatografska analiza fenolnih jedinjenja ... 64
3.8.2.1. UHPLC-DAD MS/MS analiza fenolnih jedinjenja ... 64
3.8.2.2. UHPLC Orbitrap MS^4 analiza fenolnih jedinjenja ... 65
3.8.3. Elektroforetske tehnike ... 65
3.8.4. ATR-FTIR spektroskopija ... 66
3.8.5. Raman spektroskopija ... 66
3.8.6. SEM mikroskopija ... 66
3.9. Tehno-funkcionalna svojstva ... 67
3.9.1. Određivanje emulgujućih svojstava ... 67
3.9.2. Određivanje penivih svojstava ... 67
3.10. Statistička obrada podataka ... 67
4. Rezultati i diskusija ... 69
4.1. Karakterizacija brašna semenki i pokožica izdvojenih iz nefermentisane komine ... 69
4.1.1. Tehnološki parametri analiziranog grožđa ... 69
4.1.2. Profil masnih kiselina u brašna nefermentisane semenke ... 69
4.1.2.1. Nutritivni parametri kvaliteta brašna nefermentisane semenke ... 70
4.1.2.2. PCA i HCA analiza masno-kiselinskog sastava brašna neferementisane semenke ... 72
4.1.3. Profil mono- i oligosaharida brašna nefermentisane semenke i pokožice ... 73
4.1.3.1. PCA i HCA analiza mono- i oligosaharida brašna nefermentisane semenke ... 74

4.1.4. Dijetna vlakna brašna neferementisane semenke i pokožice ... *78*
4.1.5. Fenolni profil ekstrakata brašna neferementisane semenke i pokožice ... *78*
4.1.5.1. UHPLC-DAD MS/MS kvantifikacija fenolnih jedinjenja ... *78*
4.1.5.2. UHPLC Orbitrap MS identifikacija i karakterizacija fenolnih jedinjenja (izuzev antocijana) u ekstraktima nefermentisane semenke i pokožice ... *83*
4.1.5.3. UHPLC Orbitrap MS identifikacija, karakterizacija i kvantifikacija antocijana u ekstraktima nefermentisane pokožice ... *86*
4.1.5.4. Spektrofotometrijska analiza ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida, proantocijanidina i monomernih antocijana u ekstraktima semenki i pokožica ... *89*
4.2. Karakterizacija ekstrakata fermentisane komine Prokupca i njenih konstituenata ... *94*
4.2.1. Hromatografska analiza ... *94*
4.2.1.1. UHPLC-DAD MS/MS kvantifikacija fenolnih jedinjenja (osim flavan-3-ola i antocijana) netretirane i sušene komine Prokupca ... *94*
4.2.1.2. UHPLC Orbitrap MS karakterizacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja u ekstrakatu liofilisanih uzoraka komine Prokupca ... *96*
4.2.1.3. UHPLC Orbitrap MS karakterizacija i kvantifikacija antocijana u netretiranoj i sušenoj komini Prokupca ... *103*
4.2.1.4. UHPLC Orbitrap MS karakterizacija i kvantifikacija flavan-3-ola i procijanidina u netretiranoj i sušenoj semenki komine Prokupac ... *105*
4.2.2. Sadržaj ukupnih i specifičnih klasa fenolnih jedinjenja u netretiranoj i sušenoj komini Prokupca i njenim konstituentima ... *105*
4.2.3. Antioksidativna svojstva vodenih ekstrakata liofilisanih uzoraka komine i njenih konstituenata *107*
4.2.4. Citotoksična svojstva i ćelijska antioksidativna aktivnost ekstrakata liofilisanih uzoraka komine i njenih konstituenata ... *109*
4.3. Primena ekstrakta semenke fermentisane komine Prokupca u formulaciji prehrambenih proizvoda i aditiva ... *113*
4.3.1. UHPLC Orbitrap MS karakterizacija fenolnih jedinjenja semenke iz fermentisane komine Prokupca ... *113*
4.3.2. Nefermentisani funkcionalni aditivi na bazi proteina kozijeg mleka obogaćeni ekstraktom semenke - TME funkcionalni aditivi ... *116*
4.3.2.1. UHPLC-DAD MS/MS analiza fenolnih ekstrakata TME funkcionalnih aditiva i ekstrakta semenke ... *116*
4.3.2.2. Sadržaj proteina u TME funkcionalnim aditivima ... *117*
4.3.2.3. Elektroforetska analiza proteina TME funkcionalnih aditiva ... *118*
4.3.2.4. Veličina čestice i ζ-potencijal TME funkcionalnih aditiva ... *121*
4.3.2.5. ATR-FTIR karakterizacija TME funkcionalnih aditiva ... *122*
4.3.2.6. Raman karakterizacija TME funkcionalnih aditiva ... *125*
4.3.2.7. Morfološke karakteristike TME3 funkcionalnog aditiva ... *128*
4.3.2.8. Šematski prikaz distribucije fenolnih jednjenja u TME funkcionalnim aditivima ... *129*
4.3.2.9. Tehno-funkcionalna svojstva TME funkcionalnih aditiva ... *130*
4.3.2.10. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativna svojstva TME funkcionalnih aditiva ... *135*
4.3.3. Nefermentisani funkcionalni aditivi na bazi proteina kozijeg mleka obogaćeni prahom inulin/ekstrakt semenke-TMIE funkcionalni aditivi ... *139*
4.3.3.1. UHPLC-DAD MS/MS analiza fenolnih ekstrakata TMIE i IE funkcionalnih aditiva ... *139*
4.3.3.2. Sadržaj proteina u TMIE funkcionalnim aditivima ... *140*
4.3.3.3. Elektroforetska analiza TMIE funkcionalnih aditiva ... *141*
4.3.3.4. Veličina čestice i ζ-potencijal TMIE funkcionalnih aditiva ... *144*
4.3.3.5. ATR-FTIR karakterizacija TMIE funkcionalnih aditiva ... *145*
4.3.3.6. Raman karakterizacija TMIE funkcionalnih aditiva ... *148*
4.3.3.7. Morfološke karakteristike IE, TMI i TMIE3 funkcionalnih aditiva ... *151*
4.3.3.8. Šematski prikaz TMIE funkcionalnih aditiva ... *152*
4.3.3.9. Tehno-funkcionalna svojstva TMIE funkcionalnih aditiva ... *154*
4.3.3.10. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativna svojstva TMIE funkcionalnih aditiva ... *159*
4.3.4. Funkcionalni jogurti obogaćeni ekstraktom semenke ... *163*
4.3.4.1. Teksturalna svojstva jogurta ... *163*

4.3.4.2. Senzorna analiza jogurta ... *164*
4.3.5. Fermentisani funkcionalni jogurti obogaćeni ekstraktom semenke ... *165*
4.3.5.1. UHPLC-DAD MS/MS analiza fenolnih jedinjenja iz metanolnih ekstrakata liofilisanih jogurta ... *165*
4.3.5.2. Sadržaj ukupnih ekstraktibilnih proteina liofilisanih jogurta ... *168*
4.3.5.3. Elektroforetska analiza liofilisanih jogurta ... *168*
4.3.5.4. ATR-FTIR karakterizacija liofilisanih jogurta ... *171*
4.3.5.5. Raman karakterizacija liofilisanih jogurta ... *174*
4.3.5.6. Morfološka karakterizacija liofilisanih jogurta ... *177*
4.3.5.7. Tehno-funkcionalna svojstva liofilisanih jogurta ... *178*
4.3.5.8. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativna svojstva liofilisanih jogurta ... *180*
4.3.5.9. Određivanje vijabilnosti bakterijskih starter kultura nakon liofilizacije fermentisanih proizvoda - protektivna svojstva liofilisanih jogurata ... *183*
4.4. Uticaj matriksa hrane na antioksidativna svojstva i biodostupnost fenolnih jedinjenja ... *185*
4.4.1. Uticaj kompleksnog matriksa hrane na bazi mesa i žitarica na biodostupnost i antioksidativna svojstva fenolnih jedinjenja pokožice i semenke komine grožđa ... *185*
4.4.1.1. Fenolna jedinjenja u polaznim ekstraktima pokožice i semenke ... *185*
4.4.1.2. Profil fenolnih jedinjenja digeriranog ekstrakta pokožice i semenke grožđa bez prisustva matriksa hrane ... *186*
4.4.1.3. Profil fenolnih jedinjenja digeriranog ekstrakta pokožice i semenke grožđa u prisustva matriksa hrane ... *187*
4.4.1.4. Spektrofotometrijska analiza ... *195*
4.4.1.4.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja ... *195*
4.4.1.4.2. Sadržaj ukupnih flavonoida ... *196*
4.4.1.4.3. Sadržaj ukupnih proantocijanidina ... *197*
4.4.1.5. Antioksidativna svojstva ... *197*
4.4.1.5.1. Redukujuća moć ... *198*
4.4.1.5.2. Sposobnost sakupljanja/uklanjanja $ABTS^{\bullet+}$ *radikala* ... *199*
4.4.1.5.3. Sposobnost heliranja jona Fe^{2+} ... *200*
4.4.2. Uticaj proteinskog matriksa na biodostupnost i antioksidativna svojstva fenolnih jednjenja semenke komine grožđa – nefermentisan funkcionalni aditiv TME3 ... *202*
4.4.2.1. Profil fenolnih jedinjenja digeriranog ekstrakta semenke u prisustva proteinskog matriksa ... *202*
4.4.2.2. Elektroforetska analiza nefermentisanog funkcionalnog aditiva TME3 nakon in vitro digestije ... *205*
4.4.2.3. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativna svojstva ... *207*
4.4.3. Uticaj dijetnih vlakana i kompleksnog matriksa koji uključuje proteine i vlakna ... *210*
4.4.3.1. Profil fenolnih jedinjenja digeriranih ekstrakta semenke u prisustva vlakana i kompleksnog protein/vlakna matriksa – nefermentisani funkcionalni aditivi, IE i TMIE3 ... *210*
4.4.3.2. Elektroforetska analiza kompleksnog protein/vlakna matriksa nakon in vitro digestije ... *212*
4.4.3.3. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativna svojstva ... *214*
4.4.4. Poređenje biodostupnosti ukupnih i pojedinačnih fenolnih jedinjenja ... *216*
5. Zaključak ... *218*
6. Reference ... *223*
7. Prilozi ... *257*
7.1 Tabele ... *257*
7.2. Slike ... *267*
8. Biografija autora ... *271*
Izjava o autorstvu ... *272*
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije ... *273*
Izjava o korišćenju ... *274*

1. Uvod

Tehnološkim procesom proizvodnje vina se generišu značajne količine sporednih proizvoda, znanih kao komina (oko 10-30% od ukupne mase grožđa), koji se smatraju otpadnim materijalom i zahtevaju bezbedno odlaganje. Istovremeno, u brojnim zemljama raste ekološka svest, posebno u visoko razvijenim vinogradarskim i vinarskim regionima, što dovodi do razvoja unapređenih tehnologija za tretman komine od grožđa, pri čemu se dobijaju različiti proizvodi sa dodatom vrednošću. Zavisno od primenjenog tehnološkog procesa i sorte grožđa, hemijski sastav komine može biti različit. Komina grožđa se uglavnom sastoji od pokožice i semenke, i može se koristiti kao bogat izvor fenolnih jedinjenja koja poseduju širok spektar bioloških aktivnosti, kao što su antioksidativna, antimikrobna, antikancerogena, anti-inflamatorna i anti-dijabetska aktivnost, odnosno poseduju hepatoprotektivno, kardioprotektivno i neuroprotektivno dejstvo. Pokazano je da su ekstraktibilna fenolna jedinjenja grožđa locirana najviše u semenki (~60-70%), oko 28-35% u pokožici, a samo 10% u pulpi. Brojne studije su potvrdile dominantno prisustvo antocijana, poput 3-*O*-glikozida malvidina, peonidina, cijanidina, petunidina i delfinidina u pokožici, dok se semenka odlikuje visokim sadržajem katehina i proantocijanidina, znanih kao flavan-3-oli. Iz navedenih razloga, komina se smatra kao ekonomski prihvatljiv izvor za izolaciju, ekstrakciju i iskorišćenje navedenih biološki aktivnih komponenata, prvenstveno fenolnih jedinjenja. Većina studija koje se bave analizom fenolnih jedinjenja iz komine grožđa koriste tečnu hromatografiju visokih performansi (UHPLC) za njihovu karakterizaciju i kvantifikaciju. Štaviše, u literaturi se mogu naći detaljne hromatografske karaketrizacije fenolnih jedinjenja i procenjena antioksidativna akitivnost ekstrakata dobijenih iz komina različitih internacionalnih sorti grožđa. Međutim, mali broj studija se bavi karakterizacijom fenolnih jedinjenja komine i njenih konstituenata kod autohtonih sorti grožđa.

Gledano sa industrijskog aspekta, adekvatno iskorišćenje i primena fenolnih jedinjenja iz komine grožđa ima nekoliko ograničenja. Imajući u vidu da se velike količine komine generišu u kratkom vremenskom periodu, lako dolazi do hemijskih i mikrobioloških transformacija komine zbog visokog sadržaja vlage. Da bi se očuvala komina i njeni konstituenti, i produžila njihova primena, neophodno je adekvatna obrada/prerada, što u većini slučajeva obuhvata različite postupke sušenja kao što su sušenje tolim vazduhom (sušare) ili sušenje zamrzavanjem (liofilizacija). Međutim, postavlja se pitanje isplativosti, kao i efekat navedenih tretmana na profil fenolnih jedinjenja i njihovu antioksidativnu aktivnost. Analiza pojedinačnih fenolnih jedinjenja i procena antioksidativne aktivnosti fenolnih ekstrakata kao parametara za procenu efikasnosti procesuiranja komine različitim postupcima sušenja nije do sada razmatrana. Takođe, dodatno se razmatra primena različitih ekstrakcionih sredstava, jer se fenolna jedinjenja lako rastvaraju u sistemu rastvarača kao što su vodeni rastvori alkohola zbog njihove polarne prirode. Međutim, uspešna implementacija fenolnih jedinjenja zavisi od medijuma u kom su fenolna jedinjenja konačno rekonstituisana, a finalna rekonstitucija ekstrakata fenolnih jedinjenja u vodi značajno povećava njihovu upotrebu u prehrambenom sektoru.

Potražnja za funkcionalnim sastojcima hrane sve više raste, jer su savremeni potrošači sve više zainteresovani za svoje lično zdravlje, i očekuju da hrana bude zdrava, funkcionalna i visoko produktivna u sprečavanju različitih bolesti. Efikasna valorizacija fenolnih jedinjenja i razvoj novih proizvoda sa dodatom vrednošću u prehrambenoj industriji su od interesa i za potrošače i za industriju. Trenutni trend prehrambenih inovacija je baziran na razvoju zdravije i održive hrane, i iskorišćenju novih prehrambenih sastojaka ili prirodnih bioaktivnih jedinjenja ekstrahovanih iz nus-proizvoda prehrambene industrije. Proizvodi poput hleba, biskvita, fermentisanih mlečnih proizvoda (jogurt, sir), sladoledi, kobasice mogu biti uspešno obogaćeni fenolnim ekstraktima vinske komine ili nutritivno bogatim samlevenim prahom komine, ili njenim konstituenatima (semenka i pokožica). Međutim, primena fenolnih jedinjenja u formulaciji prehrambenih proizvoda je često ograničena njihovom malom rastvorljivošću, stabilnošću i biodostupnošću. Iz tog razloga, prehrambena industrija nastoji da razvije prirodne aditive i suplemente, koji uključuju fenolna jedinjenja i doprinose njihovom poboljšanom transportu, isporuci i usvojivosti. Problem usvojivosti se često

prevazilazi mikro- ili nanoinkapsulacijom fenolnih jedinjenja, a dobijeni inkapsulati se dalje mogu koristiti za poboljšanje fizičko-hemijskih i funkcionalnih svojstava hrane.

U poslednjoj deceniji su ispitivani različiti tipovi mikro- i nanonosača, međutim korišćenje nativne kazeinske micele je tek nedavno privuklo pažnju nauke. Proteini mleka imaju visoku nutritivnu vrednost, dobra senzorna i tehno-funkcionalna svojstva (emulgujuća, viskozna, gelirajuća i film-formirajuća svojstva), što ih čini veoma pogodnim sastojcima za primenu u različitim mlečnim i prehrambenim proizvodima. Proteini mleka su veoma kompleksni matriksi sa kazeinskim micelama koje su odgovorne za formiranje strukture i teksture različitih mlečnih proizvoda. Interakcije bioaktivnih jedinjenja sa kazeinskim micelama su od velike važnosti u dizajniranju različitih mlečnih formulacija. Do sada su funkcionalni proizvodi na bazi mleka uglavnom formulisani korišćenjem proteina kravljeg mleka, pa je neophodan dalji razvoj funkcionalnih proizvoda na bazi proteina drugih vrsta mleka. Kozije mleko poslednjih decenija privlači veliku pažnju potrošača, naučnika iz oblasti hrane i tehnologa. Stoga, jedan od obećavajućih sastojaka hrane mogu biti upravo proizvodi na bazi proteina kozijeg mleka zbog jedinstvenih nutritivnih i funkcionalnih svojstava ovog mleka. Kozije mleko ima čitav niz prednosti u odnosu na kravlje mleko, jer sadrži proteine visoke biološke vrednosti, esencijalne masne kiseline, dobru biodostupnost minerala i značajan sadržaj vitamina. Pored navedenog, kozije mleko se može koristiti kao nosač funkcionalnih komponenti, kao što su bioaktivna jedinjenja, prebiotičke supstance i probiotičke bakterije. Ako se uzme u obzir da kozije mleko ima različit sadržaj pojedinačnih kazeina i serum proteina (veći sadržaj α-laktalbumina, a manji sadržaj β-laktoglobulina), različitu strukturu kazeinske micele (CNM) i toplotno-indukovane WP/CN komplekse, u poređenju sa kravljim mlekom, može se očekivati i njihova različita sposobnost u vezivanju fenolnih jedinjenja. Međutim, funkcionalne prednosti kozijeg mleka i dalje su nedovoljno istražene, eksploatisane od strane mlečne industrije i potrošača u celini. Sa druge strane, iako je potencijal komine u produkciji visoko vrednih fenolnih jedinjenja opširno proučavan, ona i dalje predstavlja ekonomski i ekološki problem, koji zahteva nove načine valorizacije čime bi se smanjio otpad iz vinske industrije. Ako se uzme u obzir činjenica da su proteini kozijeg mleka deficitarni u sadržaju fenolnih jedinjenja, njihovo obogaćivanje ekstraktima komine grožđa predstavlja obećavajući model za razvoj novih funkcionalnih prehrambenih proizvoda i aditiva. Razvoj različitih funkcionalnih proizvoda na bazi proteina kozijeg mleka, takođe omogućava bolje razumevanje interakcije između proteina i fenolnih jedinjenja.

Biološka aktivnost fenolnih jedinjenja je često ograničena zbog smanjene biodostupnosti koja direktno zavisi od količine fenolnih jedinjenja koja se oslobode iz složenog matriksa hrane tokom digestije. Poslednjih godina su intenzivno proučavane interakcije između konstituenata hrane (matriksa) i fenolnih jedinjenja. Utvrđeno je da komponente hrane poput proteina, ugljenih-hidrata i lipida, značajno utiču na biodostupnost fenolnih jedinjenja, njihovu digestibilnost i antioksidativnu aktivnost. Biodostupnost fenolnih jedinjenja iz grožđa u prisustvu različitih matriksa hrane je oskudno ispitivana. Samo nekoliko studija analizira biodostupnost fenolnih jedinjenja grožđa u prisustvu kompleksnih matriksa, kao što su mlečni proizvodi, proizvodi od jaja ili pekarski proizvodi. Prema dostupnim saznanjima, biodostupnost fenolnih jedinjenja semenki/pokožica grožđa u prisustvu matriksa koji uključuju: (1) meso i ugljene hidrate; (2) proteine kozijeg mleka; (3) dijetna vlakna (inulin); i (4) proteine i dijetna vlakna, nije do sada ispitivana.

Cilj ove doktorske disertacije je bio da se ispita upotreba komine i njenih konstituenata (pokožica i semenka) kao značajnih izvora biološki aktivnih jedinjenja u formulaciji fermentisanih mlečnih proizvoda (kozijeg jogurta) i funkcionalnih aditiva na bazi proteina kozijeg mleka, kao i da se ispita biodostupnost fenolnih jedinjenja u kompleksnim matriksima hrane tokom *in vitro* digestije. Da bi se postigao ovaj cilj urađeno je sledeće:

- detaljna karakterizacija i nutritivna vrednost brašna semenki i pokožica izdvojenih iz nefermentisanih komina različitih autohtonih i internacionalnih sorti grožđa;

- detaljna karakterizacija, antioksidativna aktivnost i citotoksična svojstva fenolnih ekstrakata različito prerađene (sušene toplim vazduhom i liofilisane) fermentisane komine Prokupca i njenih konstituenata (semenka, pokožica i šepurina);

- primena fenolnih ekstrakata semenki Prokupca za dobijanje funkcionalnih aditiva na bazi kozijeg mleka i jogurata fermentisanih starter kulturom i/ili selekcionisanim sojem bakterija mlečne kiseline (*Lactobacillus plantarum*), sa ciljem da se poveća biodostupnost fenolnih jedinjenja i poboljša antioksidativna aktivnost dobijenih aditiva;

- određivanje fizičkih i tehno-funkcionalnih svojstava dobijenih funkcionalnih aditiva, kao ključni parametri koji određuju njihovu dalju primenu u prehrambenim formulacijama;

- na osnovu dobijenih podataka, predložiti modele distribucije fenolnih jedinjenja između serum i micelarne faze mleka, kao i kazeinskih micela na kontaktnim međufaznim površinama ulje/voda i vazduh/voda;

- određivanje biodostupnosti fenolnih jedinjenja pokožice i semenki grožđa tokom *in vitro* gastrointestinalne digestije u prisustvu različitih matriksa hrane (meso i žitarice; proteini kozijeg mleka; dijetna vlakna (inulin); proteini mleka i dijetna vlakna).

Dobijeni rezultati bi trebalo da podstaknu iskorišćenje i buduću primenu komine, nus-proizvoda iz vinske industrije, kao jedan od vidova cirkularne ekonomije, kao i da podstaknu razvoj funkcionalnih aditiva na bazi proteina kozijeg mleka. Ispitivanje biodostupnosti fenolnih jedinjenja u prisustvu različitih matriksa hrane trebalo bi da doprinese boljem razumevanju funkcionalnih svojstava fenolnih jedinjenja nakon digestije u gastrointestinalnom traktu i razvoju novih funkcionalnih prehrambenih proizvoda u skladu sa ciljanom biodostupnošću.

2. Pregled literature

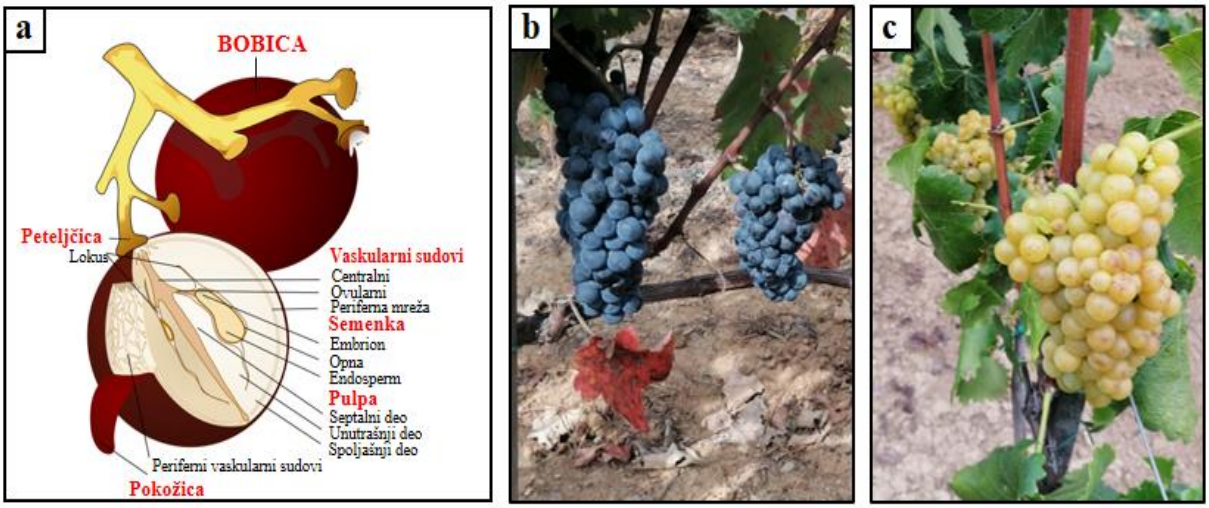
2.1. Grožđe-Internacionalne i autohtone sorte

Grožđe je plod biljke iz roda Vitis, koji obuhvata oko 60 vrsta vinove loze, među kojima je *Vitis vinifera* L., najpoznatija, najdominantnije prisutna na tržištu i najčešće uzgajana vrsta (Jackson, 2000a; Venkitasamy et al., 2019). Štaviše, grožđe je najčešće i najopsežnije uzgajana biljna kultura u svetu (7,4 milion ha), sa godišnjom proizvodnjom od 77,8 miliona tona prema popisu iz 2018. godine (OIV, 2019). Globalni razvoj i rast u oblasti vinogradarstva se može pripisati faktorima kao što su povećana međunarodna trgovina, poboljšani globalni prihodi, tehnološke inovacije u proizvodnji, skladištenju i preradi, valorizacija sporednih proizvoda vinske industrije i razvoj novih funkcionalnih proizvoda (Venkitasamy et al., 2019). U svetu se uzgaja čak 10000 različitih sorti vinove loze, među kojima se 33 sorte uzgajaju na oko 50% svetske vinogradarske površine (Venkitasamy et al., 2019). Predhodna statistika pokazuje da se najveći deo grožđa (oko 75% svetske proizvodnje) koristi za vinsku industriju (Beres et al., 2017), dok se ostatak grožđa koristi za konzumaciju u svežem ili suvom obliku, za proizvodnju sokova i drugih prehrambenih proizvoda (Coelho et al., 2020; Venkitasamy et al., 2019). Prema OIV (2019) izveštaju, čak 57% ukupne svetske proizvodnje čine vinske sorte, 36% stone sorte, dok su 7% sorte koje se koriste za sušenje. Neke vinske sorte grožđa se uzgajaju u više zemalja širom sveta (npr. Cabernet Sauvignon, Merlot, Tempranillo, Chardonnay, Riesling, Sauvignon blanc), pa se nazivaju internacionalnim sortama (OIV, 2017), dok su sa druge strane neke sorte lokalnog karaktera i pripadaju autohtonim sortama. Sorta Cabernet Sauvignon je najčešće uzgajana i dominantna sorta grožđa na svetu (>5% svetske površine vinove loze), dok se Merlot uzgaja u čak 37 zemalja (OIV, 2017). Sorta Muscat Hamburg se deklariše u svetu kao karakteristična stona sorta grožđa (FAO-OIV, 2016), međutim ona se može koristiti i za proizvodnju vina zbog svog specifičnog muskatnog mirisa i ukusa. Pod autohtonim sortama se podrazumevaju sorte koje se vekovima uzgajaju u određenoj oblasti i koje su prilagođene specifičnim uslovima i karakteristikama regiona u kome se gaje (zemljište, topografija, klima, biološko okruženje i vinogradarska praksa). Autohtone vinske sorte su predmet proučavanja i deo brojnih publikacija poslednjih godina, prvenstveno sorte grožđa iz zemalja koje imaju dugu „vinsku“ tradiciju, kao što su Italija (Lucarini et al., 2020; Restuccia et al., 2017), Španija (Di Lecce et al., 2014; Guerrero et al., 2009; Pérez Navarro et al., 2019), Francuska (Lorrain et al., 2011), Argentina (Antoniolli et al., 2015) i Portugal (Perestrelo et al., 2012).

Uzgoj vinove loze u Srbiji je odavno prisutan, o čemu svedoče oznake specifičnih geografskih regiona (Metohija, Vranje, Župa, Šumadija, Srem) i karakterističnih sorti (npr. Skadarka, Tamjanika, Prokupac, Smederevka) (Tomic et al., 2017). Proizvodnja grožđa i vina u Srbiji je jedna od značajnijih grana poljoprivredne proizvodnje, dok je izvoz vina i drugih alkoholnih pića na bazi grožđa duplo veći nego u protekloj deceniji. Zbog dobrog geografskog položaja, idealnih klimatskih i zemljišnih faktora, u Srbiji se uzgaja veliki broj različitih sorti grožđa, čija je proizvodnja poslednjih godina u opsegu od 100-200 hiljada tona (zabeleženo za period od 2013-2017) (Simonovic et al., 2019). U Srbiji se dominantno uzgajaju internacionalne sorte (Cabernet Sauvignon, Merlot, Chardonnay, Sauvignon blanc i Italijanski riesling), međutim poslednjih godina sve je veći fokus na kultivaciji autohtonih sorti grožđa i promociji vina od ovih sorti (pre svih Prokupac i Tamjanika (Slika 2.1b,c)) (Jakšić, 2015). Ove autohtone sorte se dominantno gaje u velikom vinskom regionu Srbije, poznat kao „Tri Morave“ i karakteristične su za Župsko vinogorije (Tomic et al., 2017), a njihovu kultivaciju dodatno subvencioniše i Vlada Srbije. U ovom regionu se pored autohtonih sorti, dominantno uzgajaju internacionalne sorte Cabernet Sauvignon, Merlot, Sauvignon blanc i Italijanski riesling (Tomic et al., 2017).

2.1.1. Konstituenti bobice grozda

Grozd vinove loze se sastoji od bobice (92-97%) i šepurine (3-8%) (Zoffoli & Latorre, 2011). Struktura i tip grozda je sortna karakteristika, sa izraženim razlikama kod vinskih (sitni i zbijeni) i stonih (rastresiti) sorti grožđa. Šepurina grozda se sastoji od osnovnog dela koji je pričvršćen za vinovu lozu, i njenih grananja koja se završavaju peteljčicama za koju su pričvršćene bobice (Jackson, 2000b). Bobice grožđa su različitih veličina, oblika (okrugle ili duguljaste), sa glatkom površinom koja je okružena finim slojem kutina (nerastvorni polimerni matriks izgrađen od hidroksi masno-kiselinskih estara) i voska (kutikula)(Venkitasamy et al., 2019; Zoffoli & Latorre, 2011).

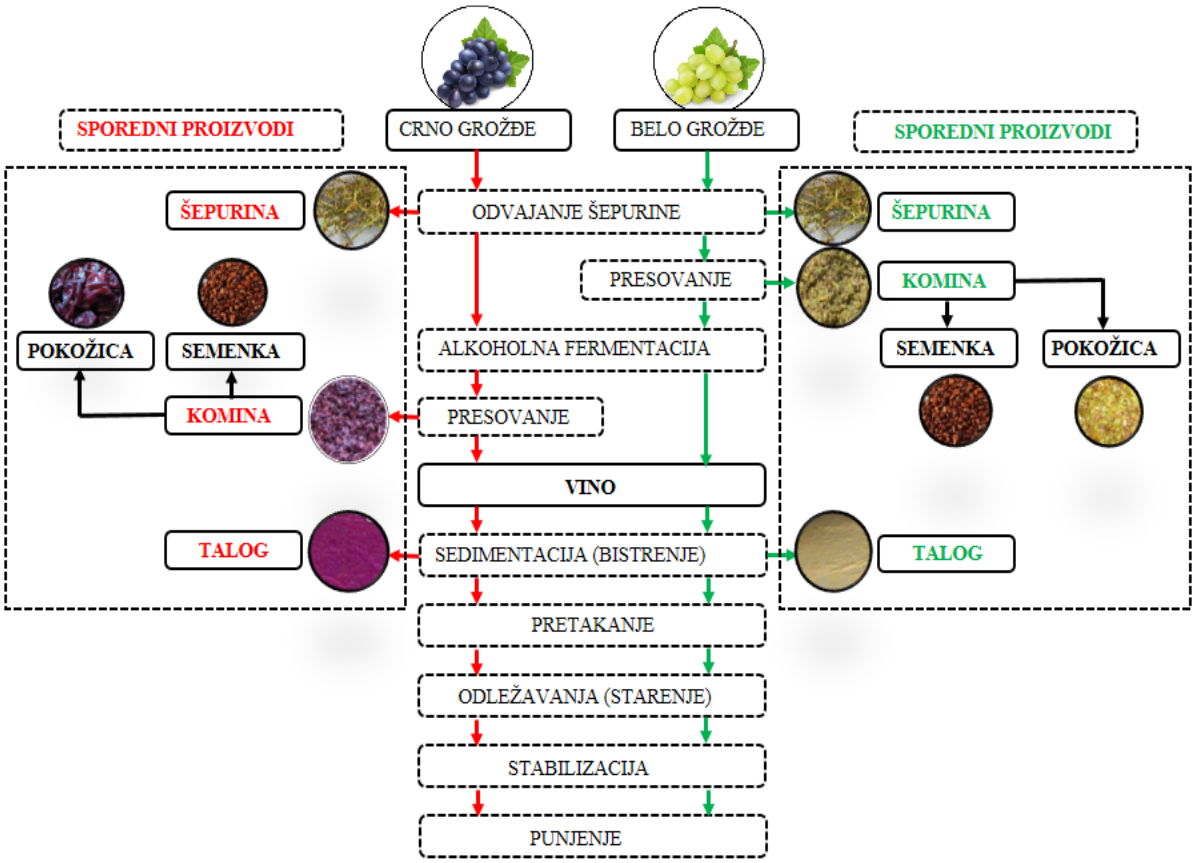


Slika 2.1. (a) Konstituenti bobice grožđa (preuzeto sa https://en.wikipedia.org/wiki/Grape#/media/File:Wine_grape_diagram_en.svg); **(b)** Crna autohtona sorta grožđa Prokupac (lična arhiva); **(c)** Bela autohtona sorta grožđa Tamjanika (lična arhiva).

Bobica se sastoji od egzokarpa (pokožica), mezokarpa (pulpa) i endokarpa (semenka i tkivo oko semenki sa zaštitnom kutikulom) (Slika 2.1a). Egzokarp je spoljni omotač bobice, koji se sastoji od hipodermisa i egzokarpa u kom se akumuliraju fenolna jedinjenja, bojene materije (antocijani, karoten i hlorofil) i većina aromatičnih jedinjenja. Mezokarp (oko 80% ukupne težine bobice) je izgrađen od oko 30 slojeva ćelija sa velikim vakuolama koje sadrže tečnu fazu i akumuliraju šećere tokom zrenja. U ovim vakuolama su takođe koncentrisana neka fenolna jedinjenja i kiseline (prvenstveno vinska kiselina) koje opadaju tokom sazrevanja bobice (Jackson, 2000b). Semenka bobice se sastoji od omotača (opne), endosperma i embriona. Tokom sazrevanja bobice se sintetišu regulatori rasta koji utiču na veličinu bobice i broj semenki koje se u njoj razvijaju. Bobice semenih sorti grožđa mogu da sadrže od dve do četiri semenke (Jackson, 2000b; Pinelo et al., 2006; Zoffoli & Latorre, 2011).

2.2. Komina-sporedni proizvod vinske industrije

Nakon tradicionalne proizvodnje vina, fermentacijom šire (dobija se ceđenjem dezintegrisanog grožđa) ili cele dezintegrisane mase grožđa, dobija se vino i značajna količina sporednih proizvoda. U sporedne proizvode vinske industrije (10-30% ukupne mase grožđa), se ubrajaju vinski talog, komina i njeni konsituenti pokožica, semenka, ostatak pulpe i šepurina (Beres et al., 2017; Hogervorst et al., 2017; Muhlack et al., 2018) (Slika 2.2).



Slika 2.2. Šematski prikaz proizvodnje vina i sporedni proizvodi koji nastaju tokom proizvodnog procesa.

Bobica grožđa sadrži nutritivna i visoko vredna jedinjenja, kao što su ugljeni hidrati, masne kiseline, vitamini, minerali i fenolna jedinjenja (Kurt et al., 2017). Međutim, treba napomenuti da je sastav bobice varijabilan i zavisi od klimatskih uslova, vinogradarske prakse, sorte, zrelosti i sanitarnih uslova (García-Lomillo & González-SanJosé, 2017; Venkitasamy et al., 2019). Tokom proizvodnje vina većina navedenih jedinjenja se ekstrahuje iz grožđa i prelazi u širu i vino; međutim, značajna količina ipak ostaje zadržana u komini grožđa (Kammerer et al., 2004). Sastav komine je različit zavisno od procesa proizvodnje i tipa vina. U proizvodnji crvenih vina, celokupna dezintegrisana masa grožđa (pokožica, pulpa i semenke) fermentiše, a cilj fermentacije je transformacija šećera u alkohol, i difuzija nutrijenata i fenolnih (bioaktivnih) jedinjenja u vino. Tokom fermentacije, formirani sloj komine na površini tečne faze se konstantno orošava vinom, kako bi se postigla što bolja maceracija i ekstrakcija prvenstveno bojenih jedinjenja iz pokožice (Venkitasamy et al., 2019). Šepurina se najčešće uklanjaju odmah nakon istovara grožđa, a pre fermentacije, korišćenjem ruljača, jer njihovo prisustvo tokom fermentacije može negativno da utiče na senzoriku vina. Međutim, neki tehnološki procesi proizvodnje ostavljaju deo šepurine u dezintegrisanoj masi, kako bi se obezbedile (pojačale) kiseline i tanini u vinu, što samim tim uključuje prisustvo šepurine u komini (Dwyer et al., 2014). Sa druge strane, u proizvodnji roze i belog vina fermentiše samo šira (grožđani sok). U proizvodnji roze vina se najčešće koriste crne sorte grožđa, samo je razlika u tehnološkom postupku proizvodnje u odnosu na crveno vino. Pokožica i semenke se od pulpe odvajaju presovanjem, korišćenjem različitih tipova presa (najčešće se koriste pneumatske prese) (Beres et al., 2017; Venkitasamy et al., 2019). Neki tehnološki procesi proizvodnje uključuju maceraciju pre presovanja, usled čega deo aromatičnih i fenolnih jedinjenja prelazi u širu. Treba napomenuti da komina dobijena presovanjem pulpe sadrži značajne količine prostih šećera (prvenstveno glukoze i fruktoze), koji zaostaju na površini pokožice i semenke ili su poreklom od zaostale pulpe (García-Lomillo & González-SanJosé, 2017; Mendes et al., 2013). Pored komine, talog (sediment) je još jedan sporedni proizvod vinske industrije koji treba spomenuti i koji nastaje nakon fermentacije i stabilizacije, i crvenih i belih vina (Devesa-Rey et al., 2011).

Ukupna količina komine grožđa koja se generiše širom sveta iznosi milione tona na godišnjem nivou, što pokreće pitanje upravljanja otpadom, kako sa ekološkog, tako i sa ekonomskog aspekta (Muhlack et al., 2018). Količina komine koja se generiše tokom proizvodnje vina zavisi od sorte grožđa, načina presovanja i fermentacije (Beres et al., 2017; Dwyer et al., 2014). U većini zemalja u svetu postoji povećana ekološka svest, što dovodi do razvoja naprednih tehnologija koje imaju za cilj valorizaciju i tretman komine. Pored tradicionalnog iskorišćenja komine grožđa kao materijal za kompostiranje ili hrana za stoku, brojne studije ističu značaj iskorišćenja ekstrahovanih komponenati iz komine (fenolna jedinjenja i dijetna vlakna) i njihovu primenu u proizvodnji antioksidativno i nutritivno vrednih prehrambenih proizvoda (Dwyer et al., 2014; Fontana et al., 2013; Ilyas et al., 2021; Muhlack et al., 2018). Komina se takođe može koristiti kao supstrat za gajenje pečuraka i dobijanje vinske kiseline, semenke iz komine za dobijenje ulja, dok se lignocelulozni hidrolizati komine mogu koristiti kao fermentacioni supstrati za proizvodnju različitih produkata, kao što su mlečna kiselina, biosurfaktanti, enzimi, proteini (Chowdhary et al., 2021). Osim navedenog, komina grožđa je dobra bioenergetska sirovina, čijim se biološkim tretmanom i termohemijskom konverzijom mogu dobiti energija, bioetanol, biogas, gorivo, ugalj, metan i biopolimeri (Chowdhary et al., 2021; Muhlack et al., 2018), ili može imati specijalne ekološke namene u remedijaciji kao biosorbent (Devesa-Rey et al., 2011). Potencijalno iskorišćenje komine u prehrambenoj industriji ima nekoliko benefita: (1) smanjenje ekološki zagađujućih sporednih proizvoda koji se akumuliraju u procesu vinifikacije; (2) smanjenje troškova odlaganja otpada i mogućnost dodatnih prihoda; (3) obostrana korist za potrošače i industriju zbog valorizacije bioaktivnih komponenata (Barba et al., 2016; Coelho et al., 2020).

2.2.1. Hemijski sastav komine i njenih konstituenata (pokožica, semenka i šepurina)

U većini slučajeva, pokožica i semenka su glavni konstituenti komine (Beres et al., 2017), dok udeo šepurine u komini zavisi od tehnološkog procesa i specifičnog sastava vina (Dwyer et al., 2014). U literaturi se mogu naći različite vrednosti za udeo semenki u komini, 38-52% (računato na suvu masu) (Brenes et al., 2016) ili 7-26% (računato na svežu masu)(Baydar & Akkurt, 2001; Jiang et al., 2011), što može biti posledica sortne karakteristike grožđa koje je korišćeno u proizvodnji vina. Udeo pokožice u komini varira od 5 do 10% (računato na suvu masu) (Brenes et al., 2016). Zavisno od tehnološkog procesa i procesuirane sorte grožđa, komina ima varijabilan sadržaj ukupnih rastvornih komponenata. Sveža komina generalno ima visok sadržaj vode i drugih jedinjenja kao što su dijetna vlakna, organske kiseline, fenolna jedinjenja (tanini, fenolne kiseline i flavonoidi), proteini, lipidi, polisaharidi, minerali, vitamini i zaostali ugljeni hidrati (mono- i oligosaharidi), čiji je sadržaj varijabilan zavisno od tipa komine (Muhlack et al., 2018).

Udeo šepurine u komini varira od 0,54 do 1,84% (računato na svežu masu). Dominantna jedinjenja u šepurini su celuloza (30,3%), hemiceluloza (21,0%), lignin (17,4%), proteini (6,1%), fenolna jedinjenja i minerali (Jiang et al., 2011; Prozil et al., 2012). Pokožica sadrži značajne količine dijetnih vlakana, fenolnih jedinjenja, vitamina i minerala (Coelho et al., 2020). Semenke najviše sadrže vlakna (oko 40%), lipide (10-20%), proteine (oko 10%), fenolna jedinjenja (flavan-3-ola i prcianidina) i minerale (Beres et al., 2017; Dimou & Koutelidakis, 2016).

2.2.1.1. Dijetna vlakna

Dijetna vlakna se definišu kao polimerni ugljeni hidrati koji sadrže deset ili više monomernih jedinica, otporna su na varenje (nisu hidrolizovani endogenim enzimima) i ne adsorbuju se u tankom crevu ali mogu imati jednu ili više fizioloških i zdravstvenih koristi (FAO/WHO, 2010). Komina i njeni konstituenti su dobar izvor dijetnih vlakana (Hanuaovský et al., 2020; Jiang et al., 2011), prvenstveno polisaharida iz ćelijskog zida i lignina (Beres et al., 2017; Venkitasamy et al., 2019). Uglavnom su analizirana dijetna vlakna komine internacionalnih sorti grožđa (Cabernet Sauvignon, Merolt, Shyraz, Pinot noar)(Arnous & Meyer, 2008; Corbin et al., 2015; González-Centeno et al., 2010; Jiang et al., 2011; Minjares-Fuentes et al., 2014). Sadržaj vlakana u komini autohtonih sorti grožđa (Prokupac, Tamjanika, Smederevka), prema dostupnim podacima nije do sada analiziran. Prema istraživanju koje su sproveli Saura-Calixto et al. (1991), nije pokazana značajna razlika u količini ukupnih vlakana

potvrđenih u komini crne Grenache (60,8%) i bele Airen (59,0%) sorte grožđa, računato na suvu masu komine. Slične vrednosti su dobili Karnopp, Margraf, et al. (2017), analizirajući kominu Bordo grožđa (63,88%). Sa druge strane, Sousa et al. (2014) i Beres et al. (2016), su prijavili značajno manji sadržaj dijetnih vlakana u komini od Benitaka sorte grožđa (46,17%) i komini od Pinot noar-a (51,38%), dok su Llobera and Cañellas (2007), prijavili značajno viši sadržaj ukupnih vlakana za kominu crne sorte Manto Negro (74,5%). Ovo znači da je sadržaj dijetnih vlakana varijabilan i predstavlja sortnu karakteristiku. Veće razlike među sortama se javljaju za ukupna dijetna vlakna koja uključuju kondenzovane tanine i nedigestibilne proteine (Saura-Calixto et al., 1991). Ukupna dijetna vlakna čine nerastvorne i rastvorne frakcije dijetnih vlakana. Nerastvorna dijetna vlakna, prvenstveno lignin frakcije nerastvorne u kiselinama ili tzv. Klason lignini, su prijavljeni kao dominantna dijetna vlakna u komini crnih (39,7-45,1%) i belih (41,2%) sorti grožđa (Arnous & Meyer, 2008; Deng et al., 2011; Saura-Calixto et al., 1991). Glavni konstituenti nerastvornih vlakana su celuloza, hemiceluloza i lignin, što je oko 88% i 93% ukupnih vlakana u komini crne i bele sorte grožđa (Saura-Calixto et al., 1991). Sa druge strane, rastvorna vlakna se uglavnom sastoje od uronskih kiselina (Coelho et al., 2020; Llobera & Cañellas, 2007). U literaturi se mogu naći različite vrednosti za sadržaj rastvornih vlakana u komini, 4,0-7,3% (Saura-Calixto et al., 1991), 9,76% (Sousa et al., 2014), 0,72-1,72% (Deng et al., 2011) ili 8,04% (Karnopp, Margraf, et al., 2017). Udeo nerastvornih i rastvornih frakcija je često varijabilan i zavisi od sorte grožđa, klimatskih uslova i tehnološkog postupka (Coelho et al., 2020). Sve ove frakcije nakon hidrolize daju širok spektar monomera, koji se dalje mogu koristiti u industriji (Devesa-Rey et al., 2011). Najčešći monosaharidi koji ulaze u sastav vlakana komine su ramnoza, arabinoza, ksiloza, manoza, galaktoza, glukoza i uronske kiseline (galakturonska kiselina) (Beres et al., 2016; Deng et al., 2011; Ferreira et al., 2013; González-Centeno et al., 2010).

Ćelijski zid pokožice uglavnom sadrži neutralne polisaharide (celuloza, ksiloglukan, arabinan, galaktan, ksilan i manan)(30%), kisele pektinske supstance koje su uglavnom metil esterifikovane (20%), proteine (<5%), nerastvorne proantocijanidine, lignin i fenolna jedinjenja povezana sa lignin-ugljenohidratnom mrežom (15%) (Chamorro et al., 2012; Pinelo et al., 2006). Glavni pektinski polisaharid koji se nalazi u pokožici je homogalakturonan (ramnogalakturonan I i II) (Pinelo et al., 2006). Pektini iz grožđa, komine i šepurine su nisko metil-esterifikovani, jer je manje od 50% uronskih jedinica esterifikovano (González-Centeno et al., 2010). Ovi pektini iz komine se mogu ultrazvučnom ekstrakcijom uspešno izdvojiti (Minjares-Fuentes et al., 2014), i dalje koristiti u hrani kao agensi za geliranje i zgušnjavanje (Beres et al., 2017). Ukupni sadržaj dijetnih vlakana, nerastornih i rastvornih frakcija, dobijen za pokožicu izdvojenu iz komine Bordo grožđa je redom 54,81, 51,02, i 3,79% (Karnopp, Margraf, et al., 2017). Šepurina dominantno sadrži Klason lignine (17,4-47,3%), glukane (25,3-36,3%), celulozu/hemicelulozu (13,9-30,3%), ksilan (10,0-14,9%) i arabinan (3,7-3,9%) (Ping et al., 2011; Prozil et al., 2012; Spigno et al., 2008). Semenka je bogatija u sadržaju vlakana od pokožice. Gül et al. (2013) su pokazali da brašna semenki izdvojenih iz komine crne (Öküzgözü) i bele (Narince) sorte grožđa imaju 72,78% i 72,45% ukupnih dijetnih vlakana. Štaviše, Yedro et al. (2015), ističu da se semenka grožđa kao lignocelulozni ostatak uglavnom sastoji od tri ugljeno-hidratne frakcije, kao što su hemiceluloza, celuloza i lignin.

Dijetna vlakna iz komine ili voća imaju bolji odnos nerastvornih/rastvornih vlakana, nižu kalorijsku vrednost i bolja funkcionalna svojstva, u poređenju sa vlaknima dobijenim iz žitarica (Beres et al., 2017; Deng et al., 2011; Dimou & Koutelidakis, 2016; González-Centeno et al., 2010). Dijetna vlakna su često povezana sa proantocijanidinima i drugim ekstraktibilnim polifenolima, što rezultira u formiranju takozvanih „antioksidativnih dijetnih vlakana“, koja pokazuju dobra funkcionalna svojstva (Beres et al., 2016; Das et al., 2020; Saura-Calixto, 1998). Dijetna vlakna imaju nekoliko zdravstveno koristnih efekata, kao što su regulacija adsorbcije glukoze, prevencija gojaznosti, smanjenje holesterola u krvi i smanjenje rizika od kardiovaskularnih oštećenja (Coelho et al., 2020). Dalje, vlakna iz komine, pokožice i semenke se mogu koristiti kao agensi za želiranje i vezivanje vode (O'Shea et al., 2012), ili se kao sastavni deo brašna komine mogu uspešno inkorporirati u različite prehrambene proizvode, čime dopinose funkcionalnim, nutritivnim, fizičko-hemijskim,

teksturnim i senzornim svojstvima proizvoda (Beres et al., 2019; Das et al., 2020; García-Lomillo & González-SanJosé, 2017).

2.2.1.2. Rezidualni (zaostali) ugljeni hidrati (mono- i oligosaharidi)

U grožđu, zavisno od sorte i klimatskih uslova, sadržaj šećera može varirati od 12 do 28% (Jackson, 2003), čemu najviše doprinose fruktoza i glukoza, zatim saharoza, dok su drugi mono- i oligosaharidi često prisutni u tragovima (de Oliveira et al., 2019; Kurt et al., 2017). Većina ukupnih rastvornih šećera je koncentrisana u pulpi ili širi (grožđanom soku) (Blanch et al., 2011). Komina koja nije fermentisala ima visok sadržaj rastvornih šećera (37,6-77,5% SM), dok je sadržaj šećera u fermentisanoj komini nizak i zavisi od fermentacionog procesa i ciljanih vina koja se proizvode (1,3-4,6%) (Corbin et al., 2015; Deng et al., 2011; Llobera & Cañellas, 2007). Prema dostupnim podacima, sadržaj glukoze u komini varira od 0,21 do 26,34%, dok sadržaj fruktoze varira od 0,38-8,91% (Antonić et al., 2020). Pokazano je da fino samlevena komina Benitaka sorte grožđa sadrži značajne količine upravo glukoze i fruktoze (Sousa et al., 2014). Pokožica i semenka sadrže male količine monosaharida (npr. glukoza, fruktoza, galaktoza arabinoza, manoza), disaharida i oligosaharida (Bordiga et al., 2019; Imperio et al., 2021; Varandas et al., 2004). Međutim, na površini pokožice i semenke, koje su odvojene od komine neposredno nakon presovanja grožđa, zaostaju značajne količine rastvornih šećera (prvenstveno glukoze i fruktoze), zbog stalnog kontakta sa pulpom. Koncentracija mono- i oligosaharida u fino samlevenom brašnu pokožica i semenki grožđa izdvojenih iz nefermentisanih komina je retko ispitivana. Međutim, njihova koncentracija u komini, pokožici i semenki nije zanemarljiva, jer utiče na nutritivnu vrednost prehrambenih proizvoda koji su obogaćeni ovim konstituentima, što zahteva njihovu analizu.

2.2.1.3. Proteini

Sadržaj proteina u komini je varijabilan, u opsegu od 3,57% do 14,17%, (Antonić et al., 2020; Beres et al., 2016; Deng et al., 2011; Karnopp, Margraf, et al., 2017; Llobera & Cañellas, 2007), što zavisi od sorte grožđa i sporednih proizvoda koji nastaju u proizvodnji vina (Coelho et al., 2020). Najčešće su frakcionisani i ispitivani proteini semenke grožđa, korišćenjem različitih elektroforetskih tehnika i masene spektroskopije (Gazzola et al., 2014; Gianazza et al., 1989; Wu & Lu, 2004; Zhou et al., 2010; Zhou et al., 2011). Glavni protein iz endosperma *Vitis vinifera* semenki je globulin (oko 400 kDa, nativna elektroforeza) (Gianazza et al., 1989). Međutim, novije studije su pokazale da frakcije rastvorljive u solima (albumini i globulini) čine čak 58,4% ukupno ekstrahovanih proteina iz semenke grožđa (Gazzola et al., 2014). Albuminske frakcije semenki različitih sorti grožđa, analizirane SDS-PAGE-om u neredukujućim uslovima, su pokazale dominantnu polipeptidnu traku na 60kDa, dok je dominantna traka globulinske frakcije na 40kDa (43 kDa). U redukujućim uslovima kod obe frakcije se identifikuju dominantne trake u opsegu od 31-45kDa i oko 25kDa (Gazzola et al., 2014; Zhou et al., 2011). Proteini semenke grožđa pokazuju dobra tehno-funkcionalna svojstva (rastvorljivost i emulgujuća svojstva), što omogućava njihovu primenu u formulaciji različitih prehrambenih proizvoda (Zhou et al., 2011).

2.2.1.4. Lipidi

Semenke grožđa zavisno od sorte sadrže od 3,91 do 19,6% ulja (Baydar & Akkurt, 2001; Beres et al., 2017; Fernandes et al., 2013; Gül et al., 2013; Lachman et al., 2015). Stoga je jasno zašto se decenijama unazad semenka koristila za proizvodnju ulja, a ovaj vid primene je široko komercijalizovan u nekim zemljama. Ulje semenki grožđa dominantno sadrži nezasićene masne kiseline, kao što su linolna i oleinska masna kiselina (više od 89%), zatim slede zasićene masne kiseline (palmitinska i stearinska masna kiselina) (Fernandes et al., 2013; Lachman et al., 2015; Lutterodt et al., 2011). Linolna masna kiselina je dominantna i njen sadržaj varira od 60-78%, zatim sledi oleinska kiselina sa udelom od 10-24%, palmitinska (5-9%) i stearinska (2-6%), dok su ostale masne kiseline prisutne u tragovima (Beres et al., 2017; Fernandes et al., 2013; Lachman et al., 2015). Treba napomenuti da je ulje semenki grožđa deficitarno u sadržaju ω-3-masnih kiselina (Fernandes

et al., 2013; Lachman et al., 2015). Masno-kiselinski profili ulja semenki internacionalnih sorti grožđa kao što su Cabernet Sauvignon, Merlot, Muscat Hamburg i Riesling su intenzivno analizirani (Baydar & Akkurt, 2001; Beveridge et al., 2005; Lachman et al., 2015; Malićanin et al., 2014; Szabó et al., 2021). Sa druge strane, poslednjih godina sve više se analiziraju masno-kiselinski profili ulja semenki autohtonih sorti grožđa gajenih u Srbiji, kao što su Prokupac i njegovi klonovi, Smederevka i Crna Tamjanika (Dabetic et al., 2020; Milanović et al., 2021; Zdunić et al., 2019). Sva ova istraživanja su bazirana na optimizaciji i profilisanju ulja koje je ekstrahovano različitim ekstrakcionim tehnikama iz semenki grožđa (Beveridge et al., 2005; Malićanin et al., 2014). Retke su studije koje imaju za cilj primenu brašna semenki i komine u formulaciji prehrambenih proizvoda i procenu njihovog masno-kiselinskog profila sa nutritivnog aspekta (Yi et al., 2009). Pokazano je da ulje semenki Prokupca izdvojenih iz komine, ima manji sadržaj polinezasićenih masnih kiselina, viši sadržaj zasićenih masnih kiselina i najbolji antioksidativni kapacitet, u poređenju sa nekim internacionalnim sortama (Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot noar i Gamay)(Milanović et al., 2021), što podstiče primenu semenki od autohtonih sorti grožđa i valorizaciju otpada iz vinske industrije. Pored navedenog, Yi et al. (2009), su pokazali visok sadržaj polinezasićenih masnih kiselina, dobar PNMK/ZMK i ω-6/ω-3 odnos, u uzorcima fino samlevenog brašna komine, koja se može okarakterisati kao potencijalno dobar suplement ishrani. Uzimajući u obzir predhodne činjenice, veoma je važno definisati masno-kiselinski profil brašna semenki i komine, jer njihovom inkorporacijom u prehrambene proizvode, masne kiseline doprinose nutritivnoj vrednosti proizvoda, dok dominantno prisutne esencijalne masne kiseline smanjuju rizik od brojnih bolesti (Wijendran & Hayes, 2004).

2.2.1.5. Vitamini

Komina, pokožica i semenka takođe mogu biti dobar izvor nekih vitamina, kao što su vitamin C, A i E (Abdrabba & Hussein, 2015; Coelho et al., 2020; Dimou & Koutelidakis, 2016; Gómez-Mejía et al., 2021). Vitamin C je prethodno potvrđen u brašnu komine Beniteka grožđa (26,25 mg/100g) (Sousa et al., 2014), i pokožici sorte grožđa Sultana (9,80 mg/100g) (Abdrabba & Hussein, 2015). Tokoferoli (vitamin E) i tokotrienoli su nađeni u ulju izdvojenom iz komine i semenki grožđa (Fernandes et al., 2013; Göktürk Baydar et al., 2007). Pokazano je da ulja iz komine imaju značajno viši sadržaj ukupnih i pojedinačnih tokoferola (α-; γ-; i δ-tokoferol), od ulja izdvojenog iz semenke (Göktürk Baydar et al., 2007). Sadržaj α-tokoferola je potvrđen u ulju izdvojenom iz semenki sorti Cabernet Sauvignon, Merlot i Prokupac koje su gajene u Srbiji (Malićanin et al., 2014; Milanović et al., 2021). Ukupni tokoferoli (0,17 mg/100g FW), α-tokoferol (0,05 mg/100g FW), i γ-tokoferol (0,119 mg/100g FW), su takođe nađeni u brašnu semenki izdvojenih iz komine Albarino grožđa (Gómez-Mejía et al., 2021), što dodatno doprinosi njihovoj funkcionalnosti.

2.2.1.6. Minerali

Sadržaj minerala u komini grožđa je jako varijabilan i zavisi od klimatskih uslova, vinogradarske prakse, procesa proizvodnje vina i trajanja procesa maceracije. Literaturno prijavljene vrednosti za sadržaj minerala (pepela) u komini, pokožici i semenki su redom u rasponu od 0,9-7,0%, 0,42-1,3%, i 0,33-3,8% (Abdrabba & Hussein, 2015; Coelho et al., 2020; Hanuaovský et al., 2020). Kalijum, kalciju, natrijum, fosfor, sumpor i magnezijum se najčešće akumuliraju i lokalizuju u pokožici. Ovi minerali su takođe nađeni i u semenki samo u manjim količinama (Abdrabba & Hussein, 2015; García-Lomillo & González-SanJosé, 2017).

2.3. Komina i njeni konstituenti kao izvor fenolnih jedinjenja

Fenolna jedinjenja predstavljaju najbrojniju i široko rasprostranjenu grupu bioaktivnih molekula u prirodnim proizvodima (npr. voće, povrće, kakao, kafa, vino, čajevi)(Gharras, 2009). Poslednjih godina, fenolna jedinjenja privlače posebnu pažnju naučnika širom sveta zbog svog pozitivnog uticaja na zdravlje ljudi. Poznati fenomen „Francuski paradoks“ najbolje pokazuje pozitivan uticaj fenolnih jedinjenja iz vina i njihov efikasan kardioprotektivni efekat (Xia et al., 2013).

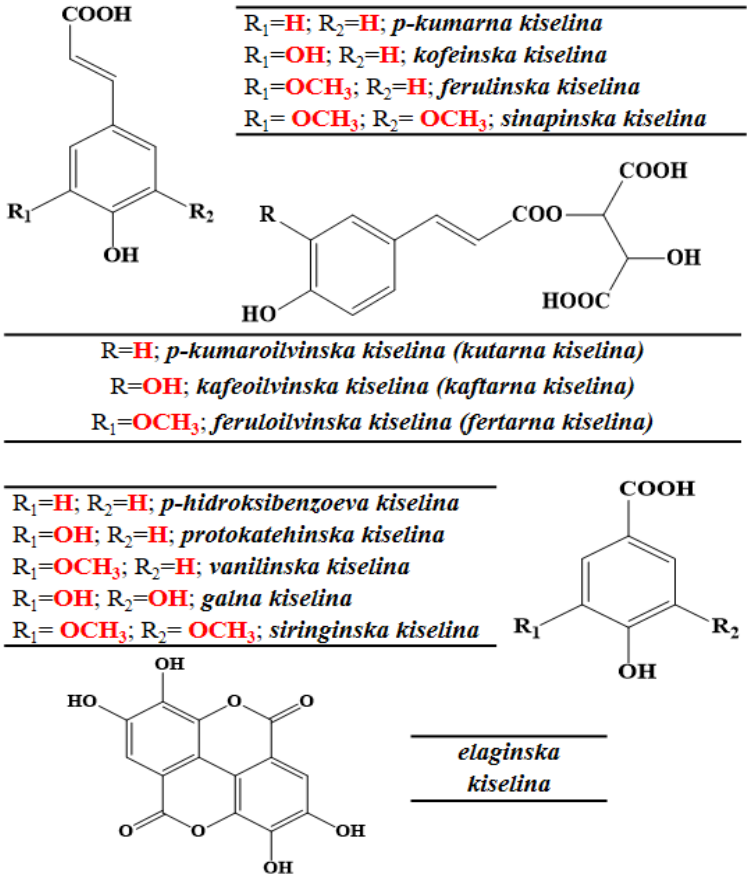
Fenolna jedinjenja poseduju zajedničku hemijsku strukturu, koja se sastoji od jednog ili više aromatičnih prstenova koji su supstituisani najčešće hidroksilnim ili nekim drugim grupama. Ova jedinjenja se najčešće sintetišu kroz fenilpropanoid metabolizam koji uključuje prisustvo prekursora koji se sintetišu kroz dva metabolička puta: put šikiminske kiseline (odgovoran za produkciju prekursora za većinu fenolnih jedinjenja) i put malonske kiseline. Polimerna fenolna jedinjenja nastaju iz fenolnih (polifenolnih) monomera. Na primer, u sintezi hidrolizabilnih tanina učestvuju hidroksibenzoeve kiseline (galna i elaginska), dok pro(anto)cijanidini nastaju kondenzacijom flavan-3-ola. Postoji više od 8000 različitih fenolnih jedinjenja, koja se mogu klasifikovati u dve karakteristične grupe: flavonoidi i neflavonoidi (fenolne kiseline, tanini, kumarini, lignani i stilbeni) (Alara et al., 2021; De la Rosa et al., 2019). Grožđe predstavlja značajan izvor fenolnih jedinjenja, koja su najčešće lokalizovana u pokožici (28-35%), semenki (60-70%) i šepurini, dok je njihov udeo u pulpi značajno manji i ne prelazi 10% (Gođevac et al., 2010; Pantelić et al., 2016). Međutim, sadržaj fenolnih jednjenja u grožđu je varijabilan i zavisi od više faktora kao što su sorta grožđa, sastav zemljišta, klimatski uslovi, vinogradarska praksa, geografsko poreklo, faza zrelosti, godina proizvodnje i potencijalne gljivične infekcije (Garrido & Borges, 2013; Mitic et al., 2012).

U toku procesa proizvodnje vina se stvara velika koiličina sporednih proizvoda (komina, semenka, pokožica i stabljika), koji se mogu koristiti kao bogat izvor visoko vrednih fenolnih jedinjenja. Ova jedinjenja poseduju širok spektar bioloških aktivnosti, kao što su antioksidativna, anti-kancerogena, anti-inflamatorna, kardioprotektivna aktivnost (Lei et al., 2020; Unusan, 2020; Yu & Ahmedna, 2013). Pored brojnih ekoloških pitanja, potencijalna upotreba sporednih proizvoda vinske industrije daje mogućnost poboljšanja kvaliteta prehrambenih proizvoda i iskorišćenja visoko vrednih fenolnih jedinjenja (Beres et al., 2017; Muhlack et al., 2018). Pretpostavlja se da oko 70% ukupnih fenolnih jedinjenja zaostaje u komini grožđa nakon procesuiranja, dok najveći deo ekstraktibilnih fenolnih jedinjenja potiče iz semenke koja čini od 38-52% sporednih proizvoda vinske industrije (Beres et al., 2017). Semenka sadrži značajnu količinu flavan-3-ola, pro(anto)cijanidina i fenolnih kiselina (Di Lecce et al., 2014; Gođevac et al., 2010), pokožica dominantno sadrži flavonole i antocijane (Pantelić et al., 2016; Pérez Navarro et al., 2019; Šuković et al., 2020), dok šepurina dominantno sadrži stilbene i pro(anto)cijanidine (Anastasiadi et al., 2012) (Tabela 1P). Pokožica belih sorti grožđa sadrži značajno manje fenolnih jedinjenja u poređenju sa pokožicom crnih sorti grožđa, jer ne sadrži antocijane. Međutim, komina od belih sorti grožđa je često izložena kratkoj maceraciji usled čega većina rastvornih polifenola i fenolnih kiselina ostaje zadržana u komini, dok se komina od crnih sorti grožđa konstantno orošava tokom fermentacije pri čemu dolazi do konstantne ekstrakcije antocijana i drugih fenolnih jedinjenja iz pokožice (Coelho et al., 2020; Venkitasamy et al., 2019).

2.3.1. Fenolne kiseline i stilbeni

Fenolne kiseline sadrže fenolni prsten koji je supstituisan sa karboksilnom grupom ili bočnim ugljovodoničnim nizom na čijem se kraju nalazi karboksilna grupa, kao i sa jednom ili više hidroksi i/ili metoksi grupa. Zavisno od strukture bočnog ugljovodoničnog niza, fenolne kiseline se mogu podeliti u dve grupe: hidroksibenzoeve kiseline (derivati benzoeve kiseline, C_6-C_1) i hidroksicimetne kiseline (derivati cimetne kiseline, C_6-C_1) (De la Rosa et al., 2019). Fenolne kiseline detektovane u semenki, pokožici, šepurini i komini najčešće egzistiraju u slobodnom ili konjugovanom obliku sa monosaharidima (najčešće sa glukozom) i/ili vinskom kiselinom (Garrido & Borges, 2013). Strukturne formule nekih fenolnih kiselina i njihovih derivata nađenih u komini, pokožici, semenki i šepurini prikazane su na slici 2.3. ***p-Hidroksibenzoeve kiseline*** **(**u daljem tekstu hidroksibenzoeve kiseline) detektovane u komini i njenim konstituentima su *p*-hidroksibenzoeva kiselina, protokatehinska kiselina, gentizinska kiselina, galna kiselina, hininska kiselina, vanilinska kiselina, siringinska kiselina i njihovi derivati (dimerne forme, metil/etil estri, glikozidi) (Tabela 1P). Galna kiselina je dominantno kvantifikovana fenolna kiselina u semenkama autohtonih i internacionalnih sorti grožđa gajenih u Srbiji (Dabetić et al., 2020; Gođevac et al., 2010; Mandić et al., 2008; Natić et al., 2021; Pantelić et al., 2016). Semenke izdvojene iz komine belih sorti grožđa imaju dominantan sadržaj galne i protokatehinske kiseline (Kammerer et al., 2004), dok su metil i etil estri fenolnih

kiselina, prvenstveno etil- i metil-galat identifikovani kod uzoraka komine i semenki koje su prošle proces fermentacije (Lingua et al., 2016). Elaginska kiselina (dimerni derivat galne kiseline) obično nastaje tokom starenja vina i može biti marker zrelosti (odležavanja) vina u barik buradima (Garrido & Borges, 2013), međutim ova kiselina i/ili njeni glukozidi su takođe kvantifikovani u komini (196-1040 mg/kg SM), semenki i pokožici grožđa (Pasini Deolindo et al., 2019; Pintać et al., 2018; Šuković et al., 2020). Visoka koncentracija elaginske kiseline nađena je u semenki autohtone sorte Prokupac (Gođevac et al., 2010; Pantelić et al., 2016) i njegovim klonovima (Zdunić et al., 2019). Pored navedenog, galna i elaginska kiselina su gradivne jedinice hidrolizabilnih galotanina i elagitanina (Garrido & Borges, 2013).



Slika 2.3. Strukturne formule nekih fenolnih kiselina i njihovih derivata nađenih u komini, pokožici, semenki i šepurini

Hidroksicimetne kiseline su veoma zastupljena grupa fenolnih jedinjenja u komini, semenki, pokožici i šepurini (Tabela 1P). Glavni predstavnici ove grupe su: cimetna kiselina, *p*-kumarinska kiselina, kofeinska kiselina, (*trans*) ferulinska kiselina i sinapinska kiselina. Ove fenolne kiseline se najčešće estarski vezuju za šećere, hininsku ili vinsku kiselinu. Najčešće su detektovani njihovi estri sa vinskom kiselinom (diestri), kao što su *cis*/*trans* izomerne forme fertarne kiseline (feruloilvinska kiselina), kaftarne kiseline (kofeoilvinska kiselina) i kutarne kiseline (kumaroilvinska kiselina), koje -najčešće egzistiraju u pokožici i komini (Di Lecce et al., 2014; Ji et al., 2015; José Jara-Palacios et al., 2014; Kammerer et al., 2004; Lingua et al., 2016; Perestrelo et al., 2012; Pérez Navarro et al., 2019; Šuković et al., 2020). Značajno prisustvo hidroksicimetnih estara vinske kiseline u pokožici je verovatno zbog ostataka pulpe, pošto su ovi derivati najviše koncentrisani u pulpi (Kammerer et al., 2004). Ciklizacijom *cis*-2-hidroksicimetne kiseline i njenih derivata nastaju laktoni poznatiji kao ***kumarini*** (Garrido & Borges, 2013). U komini, semenki i pokožici Cabernet Sauvignon-a, Merlot-a, Riesling-a i Prokupac-a detektovan je kumarin eskuletin i njegov glikozid eskulin (Pantelić et al., 2016; Pintać et al., 2018). Eskuletin nastaje ciklizacijom kofeinske kiseline.

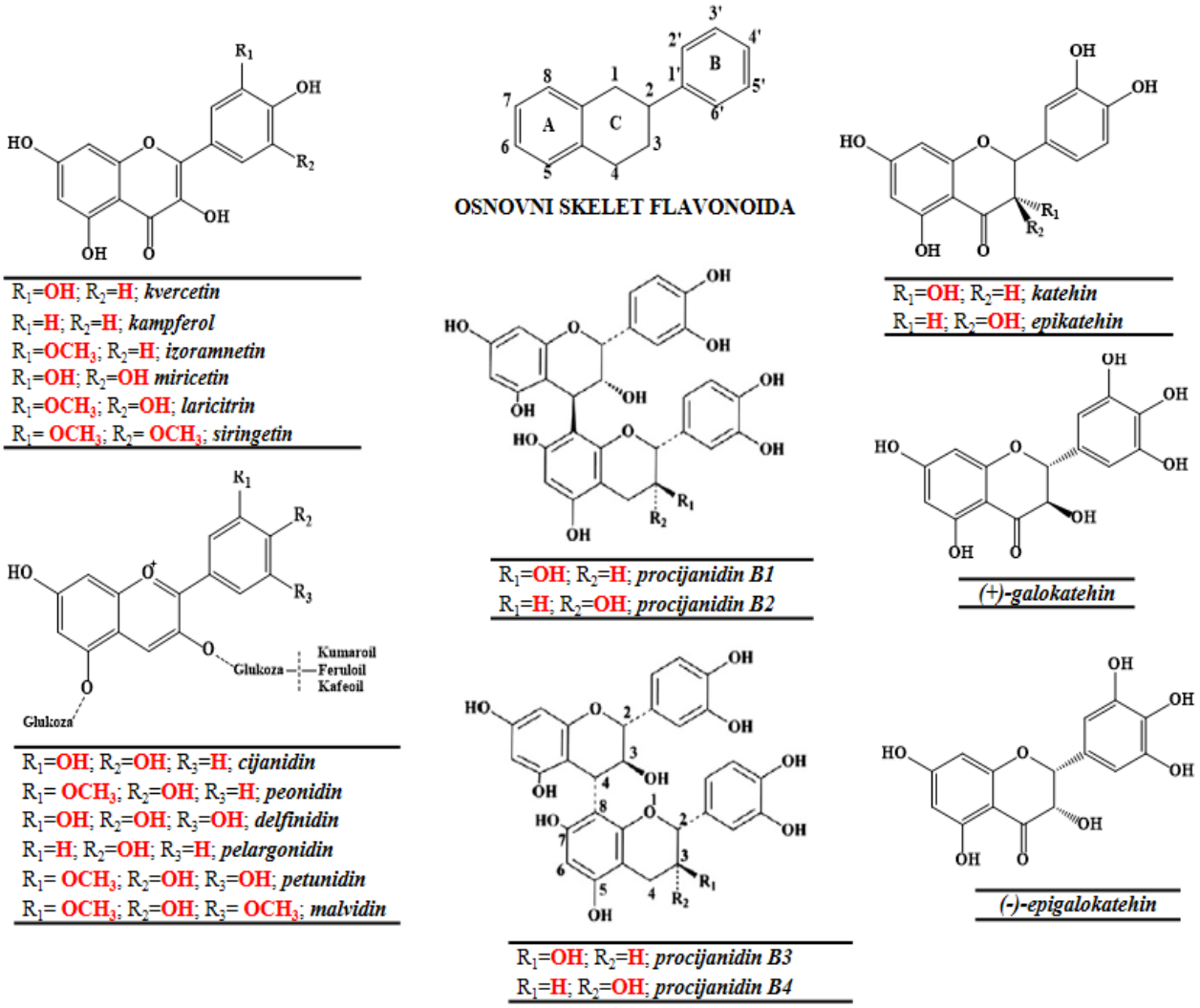
Stilbeni ($C_6C_2C_6$) se sastoje od dva aromatična prstena koji su povezani etenskim mostom. Najpoznatiji stilben je resveratrol i njegov glikozid piceid, koji mogu biti u *cis* i *trans* obliku, i kao takvi egzistiraju u komini, semenki, pokožici i šepurini (Anastasiadi et al., 2012; Di Lecce et al., 2014; Katalinić et al., 2010; Perestrelo et al., 2012; Pérez Navarro et al., 2019; Šuković et al., 2020)(Tabela 1P). Veće koncentracije *cis*-resveratrola su pronađene u vinu, dok se u grožđu ovaj oblik resveratrola nalazi u tragovima (Garrido & Borges, 2013). U semenki i pokožici grožđa su identifikovani dimer, trimer i tetramer resveratrola (Šuković et al., 2020). Oligomerno-oksidacioni oblici resveratrola, poznatiji kao viniferini (uglavnom Ɛ-viniferin) su dominantno prisutni u peteljki grožđa (Anastasiadi et al., 2012; Ferreyra, Bottini, et al., 2021; Leal et al., 2020; Quero et al., 2021).

2.3.2. Flavonoidi

Flavonoidi imaju zajednički fenilbenzopiran skelet ($C_6C_3C_6$), koji se sastoji od dva aromatična prstena A i B, koji su spojeni preko heterocikličnog piran (pirilijum) prstena C (kondenzovan preko kiseoničnog mosta) (Slika 2.4). Razlikuju se šest klasa flavonoida: flavonoli, flavoni, flavan-3-oli, flavanoni, antocijanidini i izoflavoni. Ova podela flavonoida je na osnovu razlike u strukturi, koja uključuje raspored hidroksi i/ili metoksi supstituenata i položaja dvostruke veze. Prsten C ne mora uvek biti u obliku heterocikličnog prstena, već može biti i otvoren niz, što predstavlja zasebnu grupu flavonoida koji se nazivaju halkoni (Bravo & Mateos, 2008; De la Rosa et al., 2019). Flavonoidi u komini, pokožici i semenki najčešće egzistiraju u formi glikozida, pri čemu formiraju *O*-glikozide sa monosaharidima ili disaharidima. Prema literaturnim podacima, semenka sadrži značajno veću koncentraciju flavonoida u poređenju sa pokožicom (Di Lecce et al., 2014; Pantelić et al., 2016).

Flavan-3-oli u svojoj strukturi nemaju dvostruku vezu između C_2 i C_3 atoma, nemaju okso grupu na C_4 atomu i sadrže supstituisanu OH grupu na C_3 atomu (C prsten) (De la Rosa et al., 2019). Monomeri, dimeri, oligomeri i polimeri flavan-3-ola su dominantna fenolna jedinjenja u semenki grožđa, ali se mogu naći i u pokožici, šepurini i komini (Tabela 1P). Flavan-3-oli su često spojeni sa galatima, dok se retko mogu naći u formi glikozida (Garrido & Borges, 2013). Glavni predstavnici flavan-3-ola koji su nađeni u semenkama su katehin, (*epi*)katehin (stereoizomer katehina), galokatehin, epigalokatehin (stereoizomer galokatehina) i njihovi galati (Luo et al., 2017; Pantelić et al., 2016). Oligomerni flavan-3-oli se nazivaju procijanidini ili proantocijanidini, dok se polimerne forme nazivaju kondenzovani tanini (De la Rosa et al., 2019). U komini i njenim konstituentima, prvenstveno semenki dominantno su potvrđeni dimeri, trimeri i tetrameri (B-tip) procijanidina (B1, B2, B3, B4, B5, B7 i C1) koji se sastoje od monomernih flavan-3-ola spojenih jednom C-C vezom, zatim (A tip) procijanidina kod kojih su monomerne jedinice flavan-3-ola spojene sa dve C-C veze, i procijanidin galati (Ćurko et al., 2014; Gođevac et al., 2010; José Jara-Palacios et al., 2014; Mandić et al., 2008; Pérez Navarro et al., 2019; Rodríguez Montealegre et al., 2006).

Flavonoli ili ***3-hidroksiflavoni*** zajedno sa antocijanima i flavan-3-olima čine dominantno prisutna fenolna jedinjenja u komini, pokožici i semenki grožđa. Flavonoli su uglavnom lokalizovani u pokožici i to najčešće u obliku 3-*O*-glikozida, ili ređe u formi 7-*O*-glikozida i aglikona. Najčešće identifikivani flavonoli su kvercetin, miricetin, izoramnetin, siringetin, laricitrin, kampferol, taksifolin, i njihovi glikozidi (najčešće su vezani sa glukozom, galaktozom, ramnozom i arabinozom), diglukozidi i heksuronidi (najčešće glukuronid) (Lingua et al., 2016; Luo et al., 2017; Pintać et al., 2018) (Tabela 1P). Pored navedenih formi flavonola, kvercetin-3-*O*-rutinozid (rutin) i kampferol-3-*O*-rutinozid su detektovani u semenki, pokožici, šepurini i komini (Tahmaz et al., 2021), dok su u pokožici detektovani i neki kompleksni kumaroil derivati siringetina i kampferola (Ji et al., 2015). Kvercetin i njegovi derivati su dominantno pronađeni flavonoli u pokožici internacionalnih (Merolt, Cabernet Sauvignon, Rieling) i autohtonih sorti grožđa (Smederevka, Prokupac i Crna Tamjanika) (Dabetić et al., 2020; Ivanova et al., 2011; Kammerer et al., 2004; Pantelić et al., 2016; Rodríguez Montealegre et al., 2006).



Slika 2.4. Strukturne formule flavonola, flavan-3-ola, pro(anto)cijanidina, antocijana i antocijan derivata nađenih u komini, semenki, pokožici ili šepurini grožđa

Antocijanidini ili derivati 2-fenilbenzopirilijuma (flavilijum katjon), su bezbojni i nestabilni molekuli, koji se u prirodi retko nalaze u aglikonskoj formi. U pokožici grožđa je identifikovano šest antocijanidina (cijanidin, peonidin, delfinidin, pelargonidin, petunidin i malvidin), koji se najčešće nalaze u formi glikozida (antocijani). Antocijani imaju veću stabilnost i bolju rastvorljivost, u poređenju sa antocijanidinima (De la Rosa et al., 2019; Garrido & Borges, 2013). Antocijani su najčešće nađeni u formi antocijanidin-3-*O*-monoglukozida ili 3,5-*O*-diglukozida; međutim, šećerni ostaci mogu biti i galaktoza, ramnoza, arabinoza, ramnozilglukoza, glukozilglukoza (soforoza) i ksilozilglukoza (sambubioza) (Tabela 1P). Antocijani su odgovorni za boju pokožice grožđa, pre svih derivati malvidina koji su dominantni u pokožicama crnih sorti grožđa iz vrste *Vitis vinifera*. Međutim, antocijani su jako osetljivi na visoke temperature, prisustvo kiseonika i promenu pH sredine, usled čega podležu, degradaciji, strukturnoj transformaciji ili menjaju boju. Dominantno prisustvo malvidin-3-*O*-glukozida i peonidin-3-*O*-glukozida je potvrđeno u sortama grožđa Cabernet Sauvignon, Merlot, Muscat Hamburg i Prokupac (Lorrain et al., 2011; Mitic et al., 2012). Antocijani se takođe akumuliraju u lišću vinove loze tokom starenja i pulpi nekih specifičnih „bojadiser“ sorti grožđa. Pored navedenog, u pokožici grožđa se često mogu naći različiti acetil, kofeoil i kumaroil derivati antocijana, kao i piroantocijani koji nastaju kondenzacijom antocijana sa piruvatom i acetaldehidom (vitisin A i B)(Fraige et al., 2014; Lingua et al., 2016; Pantelić et al., 2016; Pérez Navarro et al., 2019; Šuković et al., 2020). Antocijanski profil je relativno ustaljen za svaku sortu grožđa i zavisi od porekla i vrste vinove loze, stepena zrelosti i vremenskih uslova (Obreque et al., 2013), dok koncentracije antocijana mogu značajno da variraju i zavise od godine berbe, ekoloških i

agronomskih faktora (Bindon et al., 2011; Garrido & Borges, 2013). Količina antocijana u komini je varijabilna i zavisi od tehnološkog procesa, sorte grožđa, trajanja i uslova vinifikacije (Bindon et al., 2011).

Flavanoni i ***flavoni*** nisu karakteristične komponente nađene u grožđu i komini. Međutim, neki flavanoni (naringenin, hesperetin, eriodiktiol i njihovi glukozidi) i flavoni (apigenin, luteolin i njihovi 7-*O*-glukozidi) su u malim količinama detektovani u semenki, pokožici i komini (Tabela 1P)(Pantelić et al., 2016; Perestrelo et al., 2012; Pintać et al., 2018).

2.3.3. Obrada komine i ekstrakcija fenolnih jedinjenja

Sveža komina ima visok sadržaj vode, koji varira zavisno od porekla komine i primenjenog pritiska tokom presovanja. Međutim, visok sadržaj vode ograničava naknadnu primenu komine, jer negativno utiče na njenu hemijsku, mikrobiološku i enzimsku stabilnost (García-Lomillo & González-SanJosé, 2017). Ovo je jako važno, jer se u kratkom vremenskom periodu generišu velike količine komine, koju je potrebno preraditi i procesuirati, kako bi se sprečila degradacija i obezbedila dalja valorizacija komine. Do sada su najčešće korišćeni različiti konzervansi (metabisulfiti i benzoati) i njihova kombinacija sa γ-zračenjem kako bi se održao sadržaj antocijana i produžio rok trajanja komine (Augustine et al., 2013; Ayed et al., 1999). Sve više se ispituju i koriste različite metode sušenja (sušenje toplim vazduhom ili liofilizacija) za obradu komine (García-Lomillo & González-SanJosé, 2017; Hogervorst et al., 2017; Larrauri et al., 1997; Planinić et al., 2015; Tseng & Zhao, 2012). Pokazano je da liofilisani uzorci komine i pokožice imaju viši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, antocijana i flavonola u poređenju sa uzorcima koji su dehidrisani u konvencijalnoj i vakum sušnici (Tseng & Zhao, 2012). Međutim, pokazano je da liofilisani uzorci komine imaju najveće gubitke tokom skladištenja, što se pripisuje njihovoj poroznoj strukturi koja povećava kontakt sa vazduhom i doprinosi oksidaciji fenolnih jedinjenja (García-Lomillo & González-SanJosé, 2017; Tseng & Zhao, 2012). Suprotno prethodnom istraživanju, Larrauri et al. (1997) nisu našli značajnu razliku u sadržaju ekstraktibilnih fenolnih jedinjenja i kondenzovanih tanina za pokožicu koja je liofilisana i sušena u sušnici na 60°C, a značajno smanjenje fenolnih jedinjenja je tek primećeno u uzorcima komine koji su sušeni na 100°C i 140°C. Ispitujući efekat temperature i vreme sušenja na prinos ekstraktibilnih fenolnih jedinjenja, Planinić et al. (2015) su pokazali da sušenje komine na 70°C, 90min daje najbolje rezultate. Treba napomenuti da je liofilizacija jako skup postupak i često nije pogodna tehnika za obradu velike količine komine (García-Lomillo & González-SanJosé, 2017). Većina ovih istraživanja ima preliminarni karakter i baziran je na proceni uticaja različitih tretmana kroz spektrofotometrijsku analizu ciljanih klasa fenolnih jedinjenja. Uticaj liofilizacije i sušenja toplim vazduhom na sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja u komini i njenim konstituentima nije do sada analiziran.

Ekstrakcija, izolacija, karakterizacija i kvantifikacija predstavlja sledeći korak u iskorišćenju komine i visoko vrednih fenolnih jedinjenja (Fontana et al., 2013). Brojna istraživanja su bazirana na ekstrakciji, valorizaciji i primeni fenolnih jedinjenja iz komine i njenih konstituenata (Fontana et al., 2013; García-Lomillo & González-SanJosé, 2017), što predstavlja jednu od inovativnih strategija za iskorišćenje otpada (López-Belchí et al., 2021). Tehnike ekstrakcije su dosta istraživane poslednjih godina, kako bi se dobile dovoljne količine fenolnih jedinjenja za njihovu potencijalnu komercijalizaciju (Galanakis, 2012). Izbor ekstrakcije zavisi od kvalitativnog i kvantitativnog sastava ekstrakta, biljnog materijala i fizičko-hemijskih svojstava jedinjenja koja se ekstrahuju (rastvorljivost, polarnost, hidrofobnost i termička stabilnost) (Coelho et al., 2020; Hogervorst et al., 2017). Ne postoji standardni metod ekstrakcije, ali se za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz komine, semenke, pokožice i šepurine najčešće koristi čvrsto-tečna ekstrakcija, praćena mehaničkim mešanjem ili korišćenjem ultrazvuka (Alara et al., 2021; Coelho et al., 2020; Fontana et al., 2013; Ilyas et al., 2021) (Tabela 1P). Čvrsto-tečna ekstrakcija se zasniva na kontaktu čvrstog matriksa sa ekstrakcionim sredstvom, pri čemu dolazi do migracije rastvornih molekula (transporta mase) iz čvrstog materijala (Coelho et al., 2020; Fontana et al., 2013). Efikasnost ekstrakcije se može poboljšati i kontrolisati promenama u gradijentu koncentracije, koeficijentu difuzije ili graničnom sloju, ili izborom adekvatnih eksperimentalnih prametara kao što su temperatura, vreme ekstrakcije, pH vrednost, odnos čvrstog

materijala i ekstrakcionog sredstva, veličina čestica, mešanje i polarnost rastvarača (Coelho et al., 2020; Fontana et al., 2013; Hogervorst et al., 2017; Pinelo et al., 2005). Metanol, etanol, aceton i voda su najčešće korišćeni za ekstrakciju fenolnih jeidnjenja iz komine i njenih konstituenata (Pinelo et al., 2005; Spigno et al., 2007). Međutim, efikasnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz semenke i pokožice je bolja u polarnim voda-alkohol rastvorima (vodeni rastvori metanola, etanola) i vodenim rastvorima acetona, zbog polarne prirodne ovih molekula (Kallithraka et al., 1995; Yilmaz & Toledo, 2006). Spigno et al. (2007) su pokazali da je povećanje koncentracija fenolnih jedinjenja u ekstraktu pokožice crne sorte grožđa Barbera posledica povećanja udela vode u etanolu (od 10% do 60%), pri čemu je 50% etanol označen kao optimalno ekstrakciono sredstvo. Etanol je dostupano i jeftino ekstrakciono sredstvo, ima GRAS status i poželjniji je u slučaju kasnijeg korišćenja ekstrakta u prehrambenoj industriji (Fontana et al., 2013). Sa druge strane, metanol (100%, 80% ili 50% metanol) se pokazao kao najbolje ekstrakciono sredstvo za antocijane iz komine (Pintać et al., 2018) i monomerne flavan-3-ole iz semenke (Kallithraka et al., 1995). Pintać et al. (2018) predlažu 80% metanol kao najbolju opciju u industriji ako se želi visok prinos fenolnih jedinjenja iz komine. Međutim, ekstrakti koji se dalje koriste u prehrambenoj industriji često zahtevaju dodatnu obradu, uparavanje na vakum uparivaču kako bi se uklonio alkoholni ekstrakcioni agens i finalnu rekonstituciju u vodi. Vreme ekstrakcije, temperatura i pH ekstrakcionog sredstva su jako bitni parametri koji utiču na stabilnost, iskorišćenje i efikasnosti ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz komine (Fontana et al., 2013; Vatai et al., 2009). Pokazano je da temperatura ekstrakcije na 60°C i primena „zakišeljenih“ ekstrakcionih medijuma (najčešće sadrže od 0,1 do 1% HCl) utiču na povećanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i antocijana u ekstraktu pokožice grožđa (Vatai et al., 2009). Većina fenolnih jedinjenja se izvlači iz matriksa ekstrakcijom u dva koraka, dok se primenom ekstrakcije u tri koraka najčešće postiže neznatno povećanje u sadržaju fenolnih jedinjenja (Fontana et al., 2013). Za ekstrakciju vezanih fenolnih jedinjenja neophodno je primeniti alkalnu, kiselu ili enzimsku hidrolizu. Poslednjih godina se sve više analiziraju napredne ekstrakcione tehnike, kao što su mikrotalasna ekstrakcija, superkritična CO_2 ekstrakcija, ekstrakcija toplom vodom pod pritiskom, ekstrakcija primenom pulsnog električnog polja i visoko-naponskog električnog pražnjenja (Alara et al., 2021; Coelho et al., 2020; Fontana et al., 2013; Ilyas et al., 2021). Međutim, navedene tehnike su još u fazi razvoja ili se primenjuju na laboratorijskom nivou, zahtevaju visoke troškove održavanja, stručni kadar i još uvek nije detaljno ispitana bezbednost primene dobijenih ekstrakata (Coelho et al., 2020; Fontana et al., 2013). Nedostaci ekstrakcije čvrsto-tečno su velika potrošnja ekstrakcionog sredstva i energije, međutim ovaj tip ekstrakcije je moguće primeniti u industriji, iako je njegova trenutna „scale-up“ primena minimalna (Coelho et al., 2020).

2.3.4. Analitičke metode u karakterizaciji fenolnih jedinjenja

U analizi fenolnih jedinjenja se najviše koriste različite spektrofotometrijske metode, koje su razvijene sa ciljem da se odredi sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, sadržaj različitih klasa fenolnih jedinjenja (ukupni flavonoidi, ukupni antocijani, ukupni flavonoli) i antioksidativna aktivnost dobijenih ekstrakata. Ove metode su bazirane na različitim principima i koriste se za određivanje različitih supstituisanih grupa koje su sastavni deo fenolnih molekula (Fontana et al., 2013). Međutim, pomenute metode nisu specifične samo za fenolna jedinjenja i često daju širok spektar informacija o analiziranim ekstraktima. Iz navedenog razloga, ekstrakte je neophodno dodatno analizirati korišćenjem različitih hromatografskih tehnika kako bi se postigla preciznija identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih fenolnih jedinjenja.

Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja je često polazni metodološki pristup u karakterizaciji ekstrakata dobijenih iz komine, semenke, pokožice ili šepurine, jer daje korisne informacije o relativnom sastavu uzorka. Postoji više metoda koje se koriste, međutim najčešće se primenjuje kolorimetrijski metod, poznatiji kao Folin-Ciocalteu-ov test (Gülçin, 2012). Dobijeni podaci za ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja i *in vitro* antioksidativnu aktivnost, se mogu uspešno iskoristiti za procenu biološke aktivnosti ekstrakata komine i njenih konstituenta. Međutim, u slučaju višekomponentnih uzoraka F-C reagens se može redukovati i drugim ne-fenolnim

jedinjenjima (proteini, aminokiseline, neki ugljeni hidrati), što daje prividno veću koncentraciju ukupnih fenolnih jedinjenja (Gülçin, 2012; Prior et al., 2005). Kod multikomponentnih uzoraka, ova metoda meri njihov ukupan redukcioni kapacitet (Huang et al., 2005).

Zbog kompleksne prirode dobijenih uzoraka, sve je veći fokus na primeni visoko osetljivih i selektivnih analitičkih metoda za karakterizaciju fenolnih ekstrakata iz komine i njenih konstituenata. Zbog polarne prirode fenolnih jedinjenja iz komine, najčešće korišćena analitička tehnika za karakterizaciju i kvantifikaciju fenolnih jedinjenja je tečna hromatografija (separaciona metoda), preciznije tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) i ultra-efikasna tečna hromatografija (UHPLC) (Fontana et al., 2013). Odabir adekvatne kolone, sistema rastvarača, primena odgovarajućeg detektora i dostupnost standarda, daje mogućnost za razdvajanje, detekciju i kvantifikaciju pojedinačnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima. Najčešće korišćeni detektori u analizi fenolnih jedinjenja grožđa, komine, semenke, pokožice i šepurine su DAD (*diode* ili *photodiode array detector*), fluoroscentni detektor (*fluorescence detector*) i maseni detektor (MS ili tandem MS/MS detektor) (Tabela 1P). HPLC-DAD tehnika se pokazala kao efikasna u analizi fenolnih jedinjenja, međutim ova tehnika ima često ograničenu primenu kod kompleksnih ekstrakata koji sadrže strukturno slična fenolna jedinjenja, što može dovesti do pogrešne analize pikova (Fontana et al., 2013). Primena HPLC-MS tehnike u analizi fenolnih ekstrakata doprinosi poboljšanoj identifikaciji i strukturnoj karakterizaciji pojedinačnih fenolnih jedinjenja. Primena masenog detektora visoke rezolucije (kao što su Orbitrap ili qToF) daje mogućnost utvrđivanja hemijskih struktura i identifikaciju nepoznatih jedinjenja u analiziranim ekstraktima pokožica i semenki grožđa (Drosou et al., 2015; Ji et al., 2015; Pérez Navarro et al., 2019). Poslednjih godina se sve više koriste sledeći detektori: (1) maseni detektor sa tri kvadrupola (Di Lecce et al., 2014; Luo et al., 2017; Natić et al., 2021; Pantelić et al., 2016), (2) *ion trap* (MS^n) (Perestrelo et al., 2012; Rockenbach et al., 2012), (3) ToF (*time of flight*) (Di Lecce et al., 2014) i (4) *OrbiTrap* (Natić et al., 2021; Šuković et al., 2020), za identifikaciju i kvantifikaciju fenolnih jedinjenja u semenki, pulpi, pokožici i komini grožđa.

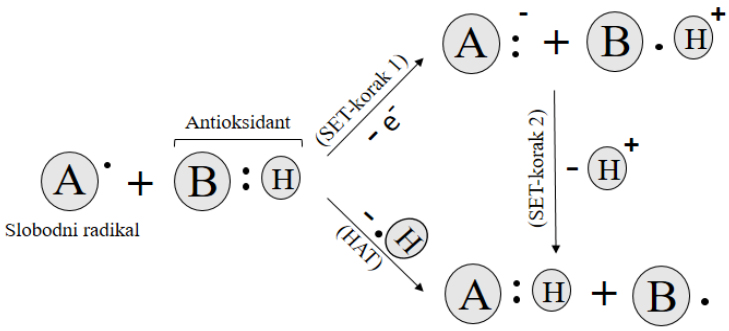
Većina predhodnih istraživanja je fokusirana na karakterizaciji komina regionalno važnih i dominantno uzgajanih sorti grožđa, iz Argentine (Antoniolli et al., 2015), Nemačke (Kammerer et al., 2004), SAD (Deng et al., 2011), Brazila (Ribeiro et al., 2015; Rockenbach et al., 2012), Portugala (Oliveira et al., 2015; Peixoto et al., 2018), Grčke (Anastasiadi et al., 2012; Drosou et al., 2015); Francuske (Ky et al., 2014), i Srbije (Pintać et al., 2018). Ove studije na regionalno važnim i široko uzgajanim sortama grožđa su pokazale dominantno prisustvo antocijanidin-3-*O*-glikozida u pokožicama crnih sorti grožđa, flavan-3-ola i proantocijanidina u semenkama, i stilbena u šepurini grožđa. Uprkos činjenici da su fenolni ekstrakti komina brojnih sorti grožđa već okarakterisani, komine većine autohtonih sorti još uvek nisu detaljno analizirane, kao što su komine Prokupca ili Tamjanike. Ove dve sorte grožđa su najpoznatije i široko gajene autohtone sorte u Župi, poznatom vinskom regionu u centralnoj Srbiji (Zdunić et al., 2019). Prethodno je pokazano da semenka Prokupca ima najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) u poređenju sa semenkama drugih crnih (Caberne Sauvignon, Merlot, Caberne Franc, Sangiovese, Shiraz) i belih (Riesling, Chardonnay, Sauvignon Blanc, Welschriesling, Pinot Gris, Petra) sorti grožđa (Pantelić et al., 2016). Fenolni profili nekih autohtonih sorti grožđa (pokožica, semenka i pulpa), kao što su Prokupac, Smederevka, Bagrina, Župljanka, Začinak, Crna Tamjanika, Vranac, prethodno su publikovani (Dabetić et al., 2020; Mitic et al., 2012; Natić et al., 2021; Pantelić et al., 2016; Zdunić et al., 2019), međutim još uvek nedostaje detaljna UHPLC-LTQ *Orbitrap* karakterizacija fenolnih jedinjenja fermentisane i nefermentisane komine od navedenih autohtonih sorti.

2.3.5. Funkcionalna svojstva i biološka aktivnost fenolnih jedinjenja komine i njenih konstituenata

Brojna bioaktivna jedinjenja imaju zaštitini efekat protiv štetnih nus-proizvoda oksidativnog metabolizma, kao što su reaktivni kiseonični i/ili drugi slobodni radikali (Gülçin, 2012; Power et al., 2013). Ove reaktivne vrste nastale tokom normalnih fizioloških reakcija u organizmu su sposobne da egzistiraju nazavisno i podstiču oksidativne lančane reakcije koje mogu dovesti do ozbiljnih problema na ćelijskom nivou (Gülçin, 2012; Power et al., 2013). ROS u fiziološkim koncetracijama je

neophodan za normalno funkcionisanje ćelije. Međutim, veće ROS koncentracije mogu da izazovu oštećenje proteina, lipida, nukleinskih kiselina i DNK, što stimuliše nastajanje lančanih slobodno radikalskih reakcija i mutacija (Gülçin, 2012). U organizmu mogu nastati i druge toksične neradikalske ROS vrste, kao što su vodonik peroksid (H_2O_2), hipohloriti, peroksinitriti ili singletni kiseonik ($^1O_2$). Vodonik peroksid nastaje u organizmu kao nus-produkt oksidativnog metabolizma od superoksid radikal anjona ($O_2^{\bullet-}$). Preko Fentonove reakcije u prisustvu jona metala se generišu OH radikali ($OH^{\bullet}$), koji su poznati kao najreaktivniji kiseonični radikali koji mogu oštetiti biomolekule (Gülçin, 2012). Ovaj molekul može lako da difunduje između ćelija i može da učestvuje u transdukciji signala koji regulišu ekspresiju gena (Gülçin, 2012).

Hrana i biljni ekstrakti su dobar izvor različitih bioaktivnih molekula (fenolna jedinjenja, vitamini, karotenoidi) koji poseduju potencijalno dobru antioksidativnu i antiradikalsku aktivnost. Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina i njihovih derivata zavisi od: (1) broja i položaja supstisuisanih hidroksilnih grupa; (2) prisustva drugih supstituenata i njihovog položaja u odnosu na OH grupu(e) (Rice-Evans et al., 1996; Sroka & Cisowski, 2003). Pokazano je da derivati hidroksicimetne kiseline imaju veći antioksidativni kapacitet u poređenju sa derivatima hidroksibenzoeve kiseline. Međutim, aktivnost ovih derivata u okviru klase zavisi od položaja (*o*, *m* ili *p*) hidroksilne grupe, sternih smetnji susednih inertnih grupa (metoksi grupa), glikozilacije i tendencije da grade estre ili laktone (Dziedzic & Hudson, 1984; Göçer & Gülçin, 2011; Gülçin, 2012). Sa druge strane, flavonoidi su veoma efikasni antioksidanti sposobni da „hvataju“ slobodne radikale, heliraju neke metale, moduliraju aktivnost različitih enzima i interaguju sa specifičnim receptorima. Na ovaj način flavonoidi štite od kardiovaskularnih, kancerogenih i drugih bolesti, ali je njihova aktivnost često ograničena zbog male biodostupnosti i apsorbcije (Gülçin, 2012). Antioksidativna i biološka aktivnost flavonoida takođe zavisi od njihove strukture i strukturnih grupa koje su odgovorne za uklanjanje radikala, kao što su: (1) katehol deo B-prstena; (2) 2,3 dvostruka veza u konjugaciji sa 4-okso grupom u C-prstenu; (3) prisustvo hidroksilnih grupa na C_3 i C_5 poziciji; (4) glikozilacija; i (5) raspored/broj hidroksilnih i metoksi grupa (Rice-Evans et al., 1997; Rice-Evans et al., 1996). Pojedinačna testiranja flavonoida su pokazala da kvercetin, miricetin, miricetin-3-rutinozid, (*epi*)galokatehin, monomerni flavan-3-ol galati i antocijani (prvenstveno cijanidin, delfinidin i malvidin glukozidi) ispoljavaju visoku antioksidativnu aktivnost (Rice-Evans et al., 1997; Rice-Evans et al., 1996; Tabart et al., 2009). Visokoj antioksidativnoj aktivnosti kvercetina i miricetina doprinosi veliki broj slobodnih hidroksilnih supstituenta i sposobnost izmene položaja dvostruke veze u C prstenu koja omogućava delokalizaciju elektrona između A i B prstena i stabilizaciju radikala nakon donacije vodonika (Rice-Evans et al., 1996). Ovi flavonoidi su dominantno nađena u pokožici, semenki i komini grožđa što objašnjava visok antioksidativni potencijal njihovih fenolnih ekstrakata (Xia et al., 2013).



Slika 2.5. Šematski prikaz neutralisanja slobodnih radikala baziran na SET i HAT reakcionim mehanizmima (preuzeto iz Miguel-Chávez (2017))

Princip neutralisanja ROS i drugih slobodnih radikala bioaktivnim jedinjenjima je zasnovan na tri različita mehanizma delovanja: prenosu atoma vodonika (HAT) (Slika 2.5), prenosu pojedinačnih

elektrona (SET) (Slika 2.5) i sposobnosti heliranja prelaznih metala (Granato et al., 2018; Gülçin, 2012; Power et al., 2013; Prior et al., 2005). Ovi mehanizmi se mogu pratiti kroz nekoliko brzih, skrining *in vitro* antioksidativnih metoda. Metode zasnovane na SET mehanizmu (Trolox ekvivalent antioxidativni kapacitet (TEAC), Sposobnost redukcije jona gvožđa ili redukujuća moć (FRP), Kupri jon redukujuća antioksidativna moć (CUPRAC), Sposobnost sakupljanja $DPPH^{\bullet}$ radikala ($DPPH^{\bullet}$ test), Sposobnost sakupljanja ABTS radikal katjona ($ABTS^{\bullet+}$ test)) mere sposobnost potencijalnog antioksidanta ili ekstrakta da prenosi elektrone i vrši neutralizaciju radikala ili redukciju pro-oksidantnih metala. Metode bazirane na HAT mehanizmu (Kapacitet apsorpcije kiseoničnog radikala (ORAC), Ukupni antioksidativni parametar hvatanja radikala (TRAP), Inhibicija LDL oksidacije, Ukupni kapacitet hvatanja oksi radikala (TOSCA), β-karoten test obezbojavanja (β-karoten „*bleaching*“ test) i hemiluminiscentni test), nisu zavisne od rastvarača i pH sredine, i prate sposobnost antioksidanta ili ekstrakta da sakuplja („hvata“) i neutrališe slobodne radikale (Granato et al., 2018; Gülçin, 2012; Miguel-Chávez, 2017). Ovi testovi su jeftini, laki za izvođenje, ne zahtevaju visoko osetljivu opremu i mogu se koristiti za određivanje aktivnosti specifičnih molekula i multikomponentnih ekstrakata (Granato et al., 2018). Neki mikroelementi poput gvožđa su neophodni za normalnu fiziološku funkciju ćelije. Međutim, joni gvožđa (Fe^{2+} i Fe^{3+}) u višku mogu delovati kao pro-oksidanti i učesnici Fentonovih reakcija tokom kojih se ubrzano formiraju visoko reaktivni hidroksilni i peroksidni radikali (Halliwell & Gutteridge, 1990). Mera sposobnosti supstanci da heliraju jone gvožđa u višku, predstavlja simulacija njihovog uticaja u sprečavanju *in vivo* Fentonove reakcije koja doprinosi potencijalnom oksidativnom oštećenju ćelije. Pored navedenog, često se procenjuje redukujuća moć, koja meri kapacitet ekstrakta da donira elektron i redukuje potencijalne pro-oksidante (npr. Fe^{3+} jone) (Gülçin, 2012). Fenolna jedinjenja su pokazala dobra svojstva u sprečavanju lipidne oksidacije u hrani. Metode koje određuju sposobnost ekstrakta da sakuplja „hvata“ slobodne radikale ($DPPH^{\bullet}$ ili $ABTS^{\bullet+}$), predstavljaju simulaciju realnog sistema i mere sposobnost ekstrakta da prekine lančane reakcije peroksidacije (Gülçin, 2012). Pokazano je da galokatehin i (*epi*)galokatehin galat pokazuju najvišu $DPPH^{\bullet}$ aktivnost u poređenju sa drugim monomernim flavonoidima i nekim fenolnim kiselinama (Tabart et al., 2009). Fenolni ekstrakti grožđa, komine, pokožice i semenke pokazuju dobru antioksidativnu aktivnost i sposobnost sakupljanja slobodnih radikala, što je prethodno pokazano u nekoliko studija korišćenjem nevedenih brzih *in vitro* antioksidativnih testova (Dabetić et al., 2020; Ky et al., 2014; Pantelić et al., 2016; Peixoto et al., 2018; Rockenbach et al., 2011; Tahmaz et al., 2021; Xia et al., 2013; Yu & Ahmedna, 2013). Kao što je poznato, najzastupljenija fenolna jedinjenja u semenkama grožđa su flavan-3-oli i pro(anto)cijanidini. Napredne studije su pokazale da ova jedinjenja efikasno smanjuju koncentraciju slobodnih radikala, sprečavaju njihovu propagaciju, heliraju neke metalne jone sa svojim *o*-difenolnim grupama, vezuju ciljne proteine i moduliraju puteve ćelijske signalizacije, regulišu ćelijske procese (proliferaciju i apoptozu) i stimulišu mitohondrijalnu upotrebu kiseonika (Y. Chen et al., 2020; Unusan, 2020). Fenolni ekstrakti komine, pokožice i semenke pokazuju potencijalno pozitivan efekat na zdravlje ljudi jer smanjuju rizik od hroničnih bolesti kao što su kancer, dijabetes melitus, inflamatorne i kardiovaskularne bolesti (Unusan, 2020; Xia et al., 2013; Yu & Ahmedna, 2013). Pored bioloških aktivnosti, ovi ekstrakti mogu da se koriste kao funkcionalni aditivi ili kao potencijalna zamena za sintetičke antioksidante u brojnim prehrambenim proizvodima (Beres et al., 2017). Fenolna jedinjenja iz komine, zajedno sa drugim antioksidativnim jedinjenjima mogu minimizirati oksidaciju lipida ili mogu imati antimikrobno dejstvo protiv bakterija koje izazivaju kvarenja u hrani (Fontana et al., 2013; Perumalla & Hettiarachchy, 2011; Yu & Ahmedna, 2013).

Primena kolorimetrijskih *in vitro* metoda može poslužiti kao prvi korak u proceni antioksidativne aktivnosti analiziranih uzoraka. Međutim za detaljniju analizu antioksidativne aktivnosti potrebna je detaljna hromatografska karakterizacija pojedinačnih fenolnih jedinjenja, primena *in vitro* biloških testova koji koriste ćelijske linije, određivanje biodostupnosti fenolnih jedinjenja u simuliranim *in vitro* uslovima, i ukoliko je to moguće, *in vivo* i kliničke studije (Granato et al., 2018; Kellett et al., 2018). Antioksidativnu aktivnost fenolnih ekstrakata je poželjno odrediti posle njihove *in vitro* gastrointestinalne digestije. Biodostupnost fenolnih jedinjenja je u takvim modelima često niska,

zbog uticaja sredine i njihove interakcije sa komponentama digestivnog fluida, što značajno modulira antioksidativnu aktivnost (Pineda-Vadillo et al., 2016; Stanisavljević et al., 2015). Dobijeni razultati su verodostojniji u proceni funkcionalnosti fenolnih jedinjenja. Određivanje ćelijske antioksidativne aktivnosti daje relevantnije rezultate u poređenju sa rezultatima *in vitro* antioksidativnih testova, jer se bazira na aspektima kao što su unos, metabolizam i lokacija antioksidativne komponente unutar ćelija (Wolfe & Liu, 2007). Do sada je primenjeno nekoliko različitih testova za procenu citotoksične i ćelijske antioksidativne aktivnosti ekstrakata komine, semenke, pokožice i šepurine. Ovi testovi koriste različitite modele kancerogenih ćelija kao što su HepG2, HeLa, Caco-2, HT-29, CRL2072, MCF-7, MDA-MB-231, PLP2, NCI-H460 i A43 (Jara-Palacios et al., 2015; Mohansrinivasan et al., 2015; Nechita et al., 2012; Peixoto et al., 2018; Pérez-Ortiz et al., 2019; Quero et al., 2021). Pokazano je da fenolna jedinjenja iz komine mogu biti potencijalni inhibitori proliferacije ćelija adenokarcinoma (Caco-2) (Jara-Palacios et al., 2015), dok su ekstrakti semenki pokazali efekat na HeLa (Nechita et al., 2012) i MCF-7 ćelije (Peixoto et al., 2018). Pored navedenog, Singha and Das (2015) su pokazali da ekstrakt pokožice grožđa može imati jaku protektivnu aktivnost protiv oksidativnog stresa izazvanog H_2O_2 u tkivu jetre *ex vivo*. U istoj studiji, tretman različitim ekstraktima pokožica je pokazao povećan sadržaj redukovanog glutationa i smanjen nivo peroksidacije lipida. Samo par studija je analiziralo potencijalno inhibitornu prirodu pojedinačnih fenolnih jedinjenja iz komine, semenke i pokožice na rast kancerogenih ćelija (Jara-Palacios et al., 2015; Peixoto et al., 2018), pa su stoga neophodna buduća istraživanja iz ove oblasti.

U složenom biološkom sistemu je veoma teško predvideti ponašanje fenolnih jedinjenja. Pretpostavlja se da *in vivo* produkti metabolizma fenolnih jedinjenja (metilovani i glukuronidni oblici), često imaju smanjenu antioksidativnu aktivnost, zbog blokade hidroksilnih grupa. Štaviše, koncentracija flavonoida u plazmi *in vivo* modela, često je nedovoljna da bi se ispoljio antioksidativni efekat (Halliwell, 2008).

2.4. Kozije mleko

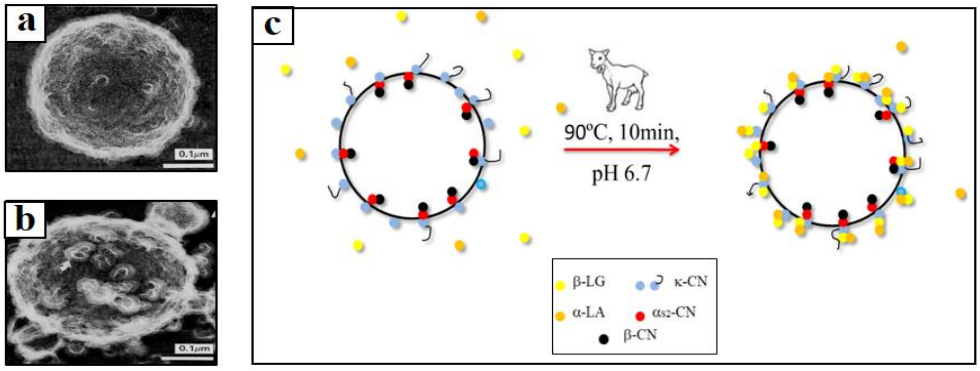
Proizvodnja kozijeg mleka ima porast u industriji širom sveta, a tržišni trendovi sugerišu da će se do 2030. godine proizvodnja povećati za približno 53% (FAOSTAT, 2018). U Srbiji je poslednjih godina uzgoj koza u stalnom porastu za 20-30% (Petrovic et al., 2017). Rastuće interesovanje potrošača za kozije mleko i mlečne proizvode je povezano sa nutritivnim i funkcionalnim svojstvima ovih proizvoda, kao što su: kvalitetni proteini, bolja svarljivost lipida i niža alergena svojstva u poređenju sa kravljim mlekom, kao i prisustvo funkcionalnih jedinjenja uglavnom dobijenih iz proteina (Verruck et al., 2019). Funkcionalna jedinjenja, prvenstveno konjugovana linolna kiselina i bioaktivni peptidi, ispoljavaju širok spektar bioloških aktivnosti, kao što su anti-aterogena, antioksidativna, anti-trombogena, anti-inflamatorna i antikancerogena aktivnost (Barac et al., 2017; Korhonen, 2009; Power et al., 2013; Verruck et al., 2019). Pored navedenog, oligosaharidi potvrđeni u kozijem mleku pokazuju značajna antigena svojstva i podstiču rast crevne flore kod novorođenčadi (Martinez-Ferez et al., 2006).

Kozije mleko sadrži dobar balans hranljivih materija, predstavlja dobar izvor azota i esencijalnih aminokiselina. Sastav kozijeg mleka (lipidi, proteini, laktoza i minerali), može da varira u zavisnosti od genetskih, fizioloških i ekoloških faktora. Mlečna masnoća u kozijem mleku je najčešće u formi globula koje se otežano agregiraju prirodno pri hlađenju, jer im nedostaje aglutinin koji je odgovoran za agregaciju kapljica masnoće u kravljem mleku. Manja veličina kapljica masnoće i razlike u masno-kiselinskom sastavu (prisustvo kaprinske, kaprilne i kapronske masne kiseline) dopinose boljoj svarljivosti kozijeg mleka u poređenju sa kravljim mlekom (Verruck et al., 2019). Poseban fokus je na proteinima kozijeg mleka koji se mogu klasifikovati u dve grupe: (1) kazeini (αs1-; αs2-; β-; κ-kazein) i serum proteini (α-laktalbumin, β-laktoglobulin, serum albumin i imunoglobulin). Kazeini su najzastupljeniji proteini u mleku i predstavljaju 74% ukupnih proteina kozijeg mleka, sa najvećim udelom β-kazeina (Verruck et al., 2019). U prirodnom mleku, kazeini su organizovani u vidu molekularnih agregata znanih kao kazeinske micele (CNM) (Dalgleish, 2014; Dalgleish & Corredig,

2012), koje su u osnovi formiranja strukture i teksture mlečnih proizvoda. Nativna micela kozijeg kazeina je veća od nativne micele kravljeg kazeina, što se pripisuje razlikama u strukturi dominantnih kazeina sa različitim brojem fosfoserinskih regiona (β-CN kod kozijeg mleka i αs-CN kod kravljeg mleka), koji omogućavaju umrežavanje u unutrašnjosti kazeinskih micela (Horne, 2006; Pešić et al., 2016). Micele su stabilizovane „trepljastim“ slojem („hairy layer“) κ-CN, koji viri sa površine micela, stvara sternu stabilizaciju i sprečava da se micele međusobno prožimaju (Dalgleish, 2014).

2.4.1. Uticaj termičkog tretmana na proteine kozijeg mleka

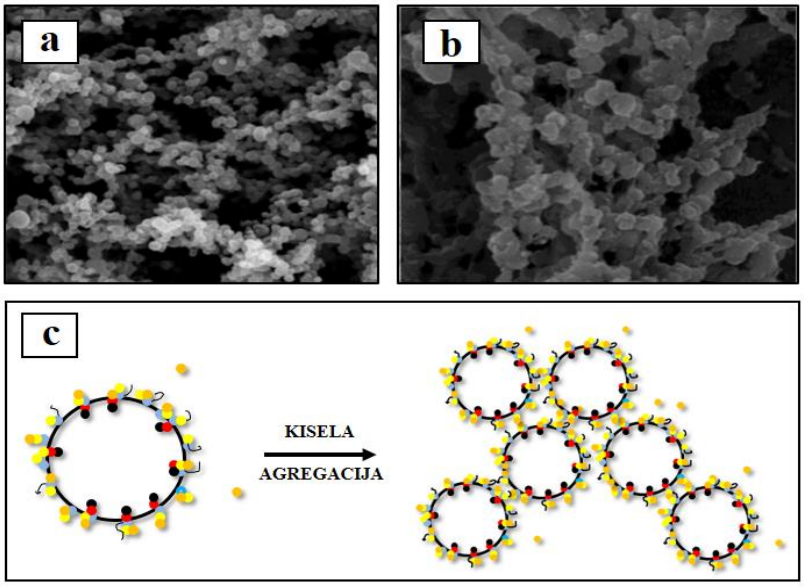
U brojnim tehnološkim procesima, termička obrada mleka i mlečnih proizvoda je veoma važna operacija, jer utiče na poboljšanje teksturalnih i senzornih svojstava finalnih proizvoda. Tokom termičke obrade dolazi do formiranja proteinskih kompleksa između denaturisanih serum proteina (α-LA i β-LG) i kazeina (Slika 2.6). Sastav, struktura i distribucija ovih kompleksa na površini CNM, kao i između micelarne i serum faze mleka, zavisi od parametara tehnološke obrade mleka (pH mleka, temperatura i vreme obrade) i vrste mleka koje se obrađuju (Pesic et al., 2012; Pesic et al., 2014). Kazeinska micela kozijeg mleka ima različitu strukturu u poređenju sa CNM kravljeg mleka, zbog različitog kazeinskog sastava (veći sadržaj β-CN i αs2-CN, odnosno niži sadržaj αs1-CN), koji utiču na strukturu termički-indukovanih proteinskih kompleksa. U izgradnji termički-indukovanih kompleksa proteina kozijeg mleka učestvuju sva tri kazeina (αs2-CN, β-CN, i κ-CN), koji doprinose ravnomernoj distribuciji i jačoj interakciji denaturisanih serum proteina, formirajući serum protein/kazeni komplekse (WP/CN) na površini CNM (Pesic et al., 2012)(Slika 2.6c). Sa druge strane, kod termički tretiranog kravljeg mleka, kompleksi se formiraju između denaturisanih serum proteina i κ-CN (WP/κ-CN) (Anema, 2021; Corredig & Dalgleish, 1999; Dalgleish & Corredig, 2012; Pešić et al., 2016; Pesic et al., 2012; Pesic et al., 2014). Rekacije denaturisanih serum proteina (WP) sa β-CN su hidrofobne, jer β-CN ne poseduju Cys ostatke, dok reakcije WP sa αs2-CN i κ-CN mogu biti hidrofobne i kovalentne (Anema, 2021; Pesic et al., 2012). U slučaju termičkog tretmana (90°C, 10min), na prirodnom pH kozijeg mleka (6,7), denaturisani serum proteini nisu otkriveni kao deo rastvornih kompleksa. Pod istim uslovima, u serum fazi kozijeg mleka je detektovan nizak procenat nativnih serum proteina, dok je više od 95% serum proteina kozijeg mleka (α-LA i β-LG) denaturisano i agregirano sa kazeinima na površini CNM (Pesic et al., 2012). Mali procenat denaturisanih β-LG može biti u rastvornim kompleksima sa κ-CN, pri višim pH (6,9 i 7,1), dok su denaturisani α-LA vezani za micelu, nezavisno od pH sredine (6,5; 6,7; 6,9; i 7,1) (Pesic et al., 2014).



Slika 2.6. (a) Površina kazeinske micele sirovog mleka; (b) Površina kazeinske micele termički tretiranog mleka, (preuzeto iz Kalab et al. (1983)); (c) Šematski prikaz termički-indukovanih interakcija između kazeinske micele i denaturisanih serum proteina (90°C, 10min) kozijeg mleka, pri pH 6,71 (preuzeto iz Pesic et al. (2012)).

Pokazano je da termički tretman kozijeg mleka nema uticaj na aktivnost sirila i vreme zgrušavanja (koagulacije) (Montilla et al., 1995). Međutim, formirani kompleksi kozijeg mleka utiču na funkcionalna svojstva, tehno-funkcionalna svojstva, strukturu gruša, reološka svojstva, kao i na izmenjenu konzistenciju i viskozitet kiselog gela (Hovjecki et al., 2020; Pešić et al., 2016; Pešić, 2018). Prisustvo agregata serum proteina na površini micele utiče na kiselu agregacija micela u blizini

njihove izoelektrične tačke, kontroliše stvaranje trodimenzionalne mreže i formiranje gela (Dalgleish, 2014; Dalgleish & Corredig, 2012) (Slika 2.7).



Slika 2.7. (a) Struktura kiselog gela sirovog mleka (micele su razdvojene unutar gela); (b) Struktura kiselog gela termički tretiranog mleka (micele su spojene WP, koji su vezani za njihovu površinu i koji formiraju „niti“ među micelama) (preuzeto iz Dalgleish (2014)); (c) Šematski prikaz kisele agregacije termički tretiranog kozijeg mleka (Pešić et al., 2011).

2.4.2. Proteini kozijeg mleka: Funkcionalna svojstva i ponašanje tokom in vitro i in vivo gastrointestinalne digestije

Mali broj studija izveštava o antioksidativnim svojstva kozijeg mleka ili njihovih proteina (Alyaqoubi et al., 2014; Barac et al., 2019; Barac, Pešić, et al., 2016; Khan et al., 2019). Uglavnom je fokus na bioaktivnim peptidima koji se oslobađaju iz kazeina (α-; β-; i κ-CN) i serum proteina (α-LA i β-LG), tokom *in vitro* gastrointestinalne digestije i/ili tokom obrade hrane (Barac et al., 2017; Korhonen, 2009; Power et al., 2013). Proteolizom kozijeg mleka nastaju peptidi koji deluju kao „hvatači“ radikala, helatori metala, redukcioni agensi i inhibitori peroksidacije lipida (De Gobba et al., 2014; Power et al., 2013). Antoksidativna aktivnost proteina i peptida je povezana sa njihovim aminokiselinskim sastavom, lokacijom aminokiselina u sekvenci/strukturi i njihovom hidrofobnošću. Upravo lokacija aminokiselina unutar sekvence proteina/peptida određuju njihovu dostupnost enzimima i podložnost proteolitičkom cepanju (Power et al., 2013). Tokom gastrointestinalne digestije proteina mogu nastati različiti peptidi, zavisno od aktivnosti proteinaza, rezistencije proteina/peptida na gastrintestinalne uslove i strukture pratećeg matriksa hrane.

Biološka aktivnost oslobođenih peptida zavisi od njihove biodostupnosti. Iako neodražavaju fiziološke uslove ćelija, testovi bazirani na ćelijskim kulturama se često koriste za *in vitro* određivanje biodostupnosti, metabolizma i biološke aktivnosti peptida (Power et al., 2013). Pored navedenog, većina studija koristi statički ili dinamički *in vitro* gastrointestinalni model za praćenje proteolize proteina kozijeg mleka (kozije infant formule) tokom digestije i određivanje funkcionalnosti oslobođenih peptida (Hodgkinson et al., 2018; Inglingstad et al., 2010; Kopf-Bolanz et al., 2014; Maathuis et al., 2017; Nehir El et al., 2015; Pinho et al., 2021; Simsek et al., 2017; Ye et al., 2019). Istraživanja su pokazala da peptidne frakcije dobijene na kraju gastrične i intestinalne faze primenom *in vitro* COST INFOGEST statičke i dinamičke digestije obranog mleka u prahu pokazuju dobru aproksimaciju sa *in vivo* dobijenim rezultatima (Egger et al., 2019; Sanchón et al., 2018). Postepeno stvaranje peptida je bilo uporedivo kod oba *in vitro* modela digestije (Egger et al., 2019; Sanchón et al., 2018), što potencijalno ukazuje na pouzdanost u interpretaciji dobijenih rezultata korišćenjem *in vitro* digestionih modela.

Kazeini imaju fleksibilnu, prirodno denaturisanu strukturu, koja je dobro organizovana u formi micele. Sa druge strane, serum proteini imaju globularnu i dobro organizovanu trodimenzionalnu strukturu (Dupont & Tomé, 2020). Ove strukturne razlike utiču na ponašanje kazeina i serum proteina u gastrointestinalnim uslovima i na njihovu podložnost hidrolizi od strane digestivnih enzima (Dupont & Tomé, 2020). Kazeini imaju relativno otvorenu strukturu što ih čini veoma osetljivim na proteolizu pepsinom tokom gastrične faze digestije, što nije slučaj sa serum proteinima koji su u ovoj fazi digestije izuzetno otporni na proteolizu, prvenstveno β-LG (Dupont & Tomé, 2020; Egger et al., 2019). *In vitro* simulirani gastrični modeli koji uključuju različite pH uslove gastrične faze, koncentraciju enzima i vreme inkubacije, pokazuju efikasniju digestibilnost kazeina kozijeg mleka (infant formula na bazi kozijeg mleka) u poređenju sa kazeinima kravljeg mleka (infant formula na bazi kravljeg mleka), i potvrđuju opšte poznatu činjenicu da je β-LG slabo digeriran u svim uslovim gastrične digestije (Hodgkinson et al., 2018; Kopf-Bolanz et al., 2014; Ye et al., 2019). β-LG kozijeg mleka pokazuje blago povećanu digesibilnost samo u simuliranim *in vitro* gastričnim uslovima koji uključuje nisku pH (3) i povećanu koncentraciju enzima (Hodgkinson et al., 2018). Takođe je pokazana visoka otpornost (rezistentnost) α-LA kozijeg mleka tokom digestije u gastričnoj i duodenalnoj (dvanaestopalačno crevo) fazi (Inglingstad et al., 2010). Razlike u digestibilnosti kozijeg i kravljeg mleka ili njihovih infant formula se mogu pripisati razlikama u sastavu njihovih kazeinskih micela (Ye et al., 2019). Peptidi (većina poreklom iz β-CN) oslobođeni tokom gastrične digestije kozijeg mleka se značajno razlikuju od peptida kravljeg mleka. Štaviše, i peptidi koji su identifikovani na istim retencionim vremenima za oba uzorka, pokazali su veći intenzitet kod frakcija kozijeg mleka (Hodgkinson et al., 2018; Hodgkinson et al., 2019). Pokazano je da kazeini sporo oslobađaju aminokiseline u plazmi nakon obroka (Dupont & Tomé, 2020), što se pripisuje njihovoj sposobnosti da formiraju koagulum (nerastvorni pelet) u gastričnim uslovima (Egger et al., 2019; X. Wang et al., 2018). Konkretno kod kozijeg mleka, posle 60min ostaje mali deo koaguluma (nerastvornog peleta) koji nije digeriran u simuliranoj gastričnoj fazi male dece i odojčadi, što nije slučaj sa kravljim mlekom (Hodgkinson et al., 2018). Pretpostavlja se da koagulum proteina nastaje u gastričnoj fazi kao posledica niske pH i proteolitičke aktivnosti pepsina (X. Wang et al., 2018; Ye et al., 2019). Nehir El et al. (2015) su pokazali da je na kraju *in vitro* gastrične digestije stepen hidrolize proteina kozijeg mleka i kefira ~27%, dok je na kraju *in vitro* duodenalne (intestinalne) digestije stepen hidrolize viši od 80%. Ista studija je pokazala da frakcije dobijene nakon *in vitro* digestije kozijeg mleka i kefira imaju značajno povećanu α-amilaza inhibitornu aktivnost, antioksidativnu aktivnost (6-7 puta) i kapacitet vezivanja kalcijuma (2-5 puta). Dalje, dodatak inulina (4% w/w) u koziji kefir nije pokazao značajan uticaj na viskozitet, proteolizu i cepanje proteina tokom *in vitro* gastrointestinalne digestije, dok su oslobođene peptidne frakcije <10kDa pokazale umerenu ACE-inhibitornu aktivnost (Simsek et al., 2017). Pored navedenog, pokazano je da oslobođeni minerali, aminokiseline i peptidi tokom *in vitro* digestija obranog UHT mleka sprečavaju povećanje bazalnih ROS radikala u crevnom epitelu, smanjuju formiranje NO u ćelijama makrofaga i ispoljavaju citoprotektivni efekat na intestinalnom nivou (Pinho et al., 2021).

U većini slučajeva mleko se termički obrađuje i priprema za konzumaciju, što zahteva dodatna saznanja o ponašanju termički tretiranih proteina mleka tokom digestije. Poznato je da sirovo kozije i kravlje mleko brže digestuje od njihovih termički tretiranih mleka, a oslobođeni peptidi imaju izmenjen profil i u većini slučaja poboljšanu funkcionalnost (Almaas et al., 2006; Power et al., 2013). Termički tretirano kozije mleko povećava otpornost (rezistentnost) kazeina i smanjuje njihovu digestibilnost u simuliranim gastrointestinalnim uslovima, jer je površina CNM „prekrivena“ denaturisanim i agregiranim serum proteinima koji otežavaju pristup digestivnim enzimima (Almaas et al., 2006; Barbé et al., 2013). Sa druge strane, termički tretman modifikuje trodimenzionalnu strukturu serum proteina, dolazi do „otvaranja“ globularne strukture, a β-LG i α-LA postaju osetljiviji na delovanje digestivnih enzima (Barbé et al., 2013; Inglingstad et al., 2010). Predhodne činjenice su u saglasnosti sa *in vivo* modelom koji je pokazao da termički tretman kravljeg mleka (90°C, 10min) produžava vreme zadržavanja mleka u želucu (~97min), u poređenju sa netretiranim mlekom

(~73min)(Barbé et al., 2013). Ista studija sugeriše da se enzimski formirani gel termički tretiranog mleka još duže vreme zadržava u želucu (~127min).

2.4.3. Tehno-funkcionalna svojstva proteina kozijeg mleka

Svaka promena na površini CNM, menja tehno-funkcionalna i tehnološka svojstva mleka (Barac, Pešić, et al., 2016; Barac et al., 2013; Barac, Smiljanić, et al., 2016; Pešić et al., 2016), čime se pozitivno ili negativno utiče na brojne procese u mlečnoj industriji, kao što su proizvodnja sira, jogurta, obranog mleka u prahu ili UHT mleka (Pešić et al., 2016).

Većina prehrambenih proizvoda su multikomponentni koloidni sistemi, koji sadrže proteine, polisaharide i lipide. Ovi prehrambeni proizvodi zahtevaju upotrebu površinski aktivnih komponenata tokom proizvodnje, kako bi se obezbedila njihova stabilnost i dobra prihvatljivost proizvoda. Proteini mleka su poznate površinski aktivne komponente, jer imaju dobra tehno-funkcionalna svojstva i široko se koriste u formulaciji brojnih mlečnih proizvoda (Kinsella & Melachouris, 2009). Dobra emulgujuća i peniva svojstva proteina su povezana sa njihovom sposobnošću da smanje međufazni napon između hidrofobnih i hidrofilnih komponenti u hrani (Damodaran, 2005).

Emulzije igraju ključnu ulogu u formulaciji i prihvatljivosti namirnica. Prehrambeni proizvodi koji se nalaze u formi emulzija (majonez, dresinzi, formule za odojčad, kremovi, likeri), zahtevaju adekvatnu pripremu kako bi se obezbedila stabilnost kapljica ulja i sprečili neželjeni procesi (flokulacija ili agregacija) koji obično nastaju tokom dužeg vremena skladištenja (Dalgleish, 1997). Efikasnost proteina kao emulgatora zavisi od strukture proteina, brzine adsorbcije, adsorbovane količine na međufaznoj površini i uslova sredine. Parametri kao što su indeks stabilnosti i indeks aktivnosti emulzije, često služe za procenu emulgujućih svojstava brojnih aditiva. Poznato je da se amfifilni β-CN i αs1-CN lako adsorbuju na međufaznu površinu i pokazuju dobra emulgujuća svojstva. Sa druge strane, serum proteini su manje površinski aktivni od kazeina, što se može pripisati njihovoj globularnoj strukturi (Pešić, 2011). U većini slučajeva su u prehrambenim emulzijama uključeni svi proteini mleka. Pokazano je da netretirani i termički tretirani proteini kozijeg mleka bolje stabilišu emulziju (veći ESI), ali imaju manju sposobnost formiranja emulzije (manji EAI), u poređenju sa proteinima kravljeg i ovčijeg mleka (Pešić, 2011). Dalje, termički tretman kozijeg mleka utiče na povećanje indeksa stabilnosti i smanjenje indeksa aktivnosti emulzije u poređenju sa netretiranim (sirovim) kozijim mlekom. U literaturi se mogu naći različite EAI vrednosti za kozije mleko, zavisno od primenjene temperature i dužine trajanja tretmana (90°C, 10min> 65°C, 30min> 85°C, 15s ≈ 125°C, 4s ≈ 135°C, 4s> netretiran uzorak) (Pešić et al., 2013; X. Zhao et al., 2020). Emulgujuća svojstva termički tretiranog kozijeg mleko su takođe pH zavisna (X. Y. Li et al., 2020; Pešić et al., 2013). Pešić et al. (2013), su pokazali povećanu stabilnost i smanjenu sposobnost formiranja emulzije termički tretiranog kozijeg mleka (90°C, 10min) sa povećanjem pH vrednosti od 6,5 do 6,9.

Sposobnost formiranja i stabilizacija pene su veoma važni parametri u proizvodnji brojnih proizvoda (npr. penasti kolači, bombone, sufle, topinzi, šlagovi, glazure, sladoledi), jer utiču na njihovu strukturu i teksturu, tokom ili nakon obrade (Kinsella & Melachouris, 2009). Na formiranje i stabilnost pene u hrani najviše utiču proteini, jer se brzo apsorbuju na vazduh/voda međufazama (Foegeding & Davis, 2011). Peniva svojstva proteina zavise od vrste, koncentracije proteina i uslova sredina u kojoj se proteini nalaze. Poznato je da serum proteini daju stabilnije pene od kazeina, jer se gusto pakuju na međufaznoj površini i sprečavaju približavanje susednih mehurića vazduha (Pešić, 2011). Međutim, model koji uključuje sve proteine mleka daje realističniji pristup u proceni penivih svojstava. Primena termičkog tretmana i pH promene, značajno modifikuje peniva svojstva kozijeg mleka (X. Y. Li et al., 2020; X. Zhao et al., 2020). Pokazano je da termički tretman (90°C, 10min) kozijeg mleka značajno povećava sposobnost formiranja i stabilnost pene, u poređenju sa netretiranim (sirovim) kozijim mlekom (Pešić, 2014). Sa druge strane, pH promene utiču na pojavu rastvornih kompleksa, menjaju jonizaciju proteina, distribuciju hidrofobnih grupa i strukturu proteina, što

značajno modifikuje adsorbciju proteina na vazduh/voda međufazi i rezultira u smanjenju/povećanju kapaciteta i stabilnosti pene (X. Y. Li et al., 2020; Pešić, 2011).

Razvoj protein-polifenol konjugata kao novih površinski aktivnih komponenata je izazvao veliko interesovanje poslednjih godina. Između proteina i fenolnih jedinjenja se najčešće formiraju međumolekulske interakcije (vodonične veze, elektrostatičke i hidrofobne interakcije), koje menjaju konformaciju proteina (Quan et al., 2019). Iako su formirane interakcije najčešće reverzibilne, one značajno utiču na funkcionalna i tehno-funkcionalna svojstva (rastvorljivost, emulgujuća svojstva, geliranje i peniva svojstva) formiranih protein-polifenol konjugata (Diaz et al., 2022; Quan et al., 2019). Do sada je samo nekoliko studija ispitivalo tehno-funkcionalna svojstva model protein-polifenol konjugata, kao što su laktoferin-procijanidin (Li et al., 2021), α-laktoalbumin-procijanidin (Prigent et al., 2009), albumin-instant zeleni čaj (Wu et al., 2007), natrijum kazeinat-taninska kiselina (Zhan et al., 2018), ovalbumin-taninska kiselina (Y. Chen et al., 2018) i β-laktoglobulin-katehin (Yi et al., 2015). Međutim, prema dostupnim literaturnim podacima, tehno-funkcionalna svojstava kompleksnih sistema kao što je kozije mleko obogaćeno fenolnim ekstraktom semenki grožđa i prebioticima, nisu do sada ispitivana. Obzirom da se dodatkom fenolnih ektrakta povećava funkcionalnost kozijeg mleka (Komes et al., 2017; Kostić et al., 2021), neophodno je razmotriti emulgujuća i peniva svojstva ovih kompleksnih sistema, od kojih zavisi njihova primena u formulaciji različitih prehrambenih proizvoda.

2.5. Primena komine i njenih konstituenata u prehrambenoj industriji

2.5.1. Primena brašna komine, pokožice i semenke u formulaciji prehrambenih proizvoda

Prve ideje o revalorizaciji komine još 70-ih godina prošlog veka, bile su fokusirane na eksploataciju jedinjenja zadržanih u komini. Najčešći pristup u valorizaciji komine je bio dobijanje ekstrakata, koji se dalje mogu koristiti u izvornoj formi ili se dodatno mogu prečistiti, koncentrisati i izolovati kako bi se dobili ekstrakti specifičnih jedinjenja. Proizvodnja „enocijanina“ (antocijana izdvojenih iz komine crvenog vina, malvidin-3-*O*-glukozid) je bio jedan od prvih predloga valorizacije komine, a njegova primena se proširila na prehrambenu (boja za hranu, E163), farmaceutsku i kozmetičku industriju širom sveta. Ekstrakt pro(anto)cijanidina iz semenke grožđa („Endotelon“) je komercijalizovan u Francuskoj i korišćen u medicinske svrhe, dok je ulje dobijeno iz semenki grožđa globalno prihvaćen proizvod koji se koristi decenijama unazad (García-Lomillo & González-SanJosé, 2017). Međutim, sve više studija ističe važnost upotrebe cele komine, semenke, pokožice ili njihovog fino samlevenog brašna i praha, gde se različite klase bioaktivnih jedinjenja kombinuju zajedno i omogućavaju poboljšanu fortifikaciju proizvoda, što rezultira boljim nutritivnim i funkcionalnim svojstvima ovih proizvoda (Aksoylu Özbek et al., 2015; García-Lomillo & González-SanJosé, 2017; Hoye & Ross, 2011; Soto et al., 2012). Ovaj pristup je ekonomičniji, ima manji uticaj na životnu sredinu i omogućava potpunije iskorišćenje komine i njenih visoko vrednih jedinjenja (vlakana, proteina, minerala, vitamina, i fenolnih jedinjenja)(García-Lomillo & González-SanJosé, 2017). Postoji nekoliko kategorija namirnica, poput onih na bazi žitarica, mlečnih ili mesnih proizvoda, koji su uspešno obogaćeni fino samlevenim brašnom komine, semenke i pokožice grožđa (Antonić et al., 2020; Beres et al., 2017; Cutrim & Cortez, 2018; García-Lomillo & González-SanJosé, 2017; Kandylis et al., 2021; Sridhar & Charles, 2021).

Predhodne studije koje su ispitivale efekat dodavanja brašna komine i njenih konstituenata u proizvode poput hleba (Aghamirzaei et al., 2015; Hoye & Ross, 2011; Meral & Doğan İ, 2013; Mildner-Szkudlarz & Bajerska, 2013; Mildner-Szkudlarz et al., 2011; Yu, 2015), biskvita (Acun & Gül, 2014; Aksoylu Özbek et al., 2015; Fernández-Fernández et al., 2022; Karnopp et al., 2015; Mildner-Szkudlarz et al., 2013), mafina (Mildner-Szkudlarz et al., 2015; Walker et al., 2014), palačinki ili pasti (Marinelli et al., 2015; Soto et al., 2012), najčešće prate udeo dijetnih vlakana i fenolnih jedinjenja kao potvrdu funkcionalnih svojstava obogaćenih proizvoda i određuju njihovu senzornu prihvatljivost (Tabela 2.1). Povećanje udela brašna semenki, pokožica ili cele komine u proizvodima je očekivano uticalo na povećanu antioksidativnu aktivnost, nutritivnu vrednost, sadržaj

vlakana i ukupnih fenolnih jedinjenja (Acun & Gül, 2014; Mildner-Szkudlarz et al., 2011; Walker et al., 2014; Yu, 2015). Međutim, senzorna prihvatljivost i fizičke karakteristike proizvoda (reološka svojstva, tekstura, boja) su najčešće odlučujući faktor u definisanju optimalnog udela brašna u proizvodu (Soto et al., 2012). U većini slučajeva proizvodi od žitarica obogaćeni sa brašnom komine, semenke ili pokožice imaju smanjen glikemijski indeks, povećan osećaj sitosti i deklarišu se kao "izvor vlakana"(Fernández-Fernández et al., 2022; García-Lomillo & González-SanJosé, 2017). Brašno semeneki takođe predstavlja dobar izvor lipida (linolne masne kiseline). Brašna nefermentisane komine, semenke i pokožice mogu da sadrže značajne količine zaostalih šećera, što takođe utiče na nutritivnu vrednost obogaćenih prehrambenih proizvoda, i može imati važnu ulogu i uticaj na zdravlje ljudi (Beres et al., 2017; García-Lomillo & González-SanJosé, 2017). Mildner-Szkudlarz and Bajerska (2013) su pokazali da hleb obogaćen liofilisanim brašnom pokožica potencijalno snižava nivo ukupnog holesterola, nivo LDL holesterola i sprečava lipidnu peroksidaciju, a povećava antioksidativnu aktivnost i nivo HDL holesterola kod pacova sa hiperholesterolemijom. Sa druge strane, povećan udeo brašna semenki pokazuje negativan uticaj na reološka svojstva testa (Aghamirzaei et al., 2015; Meral & Doğan İ, 2013). Udeo brašna semenke i komine iznad 5% u hlebu smanjuje sjaj i zapreminu vekne, i povećava teksturalna svojstva kao što su tvrdoća, gumivost i poroznost (Hoye & Ross, 2011; Mildner-Szkudlarz et al., 2011; Yu, 2015). Povećanje udela brašna pokožice je takođe uticalo na smanjenje sjaja, žute boje i tvrdoće biskvita (Mildner-Szkudlarz et al., 2013). Štaviše, pokazano je da udeo brašna komine (20%) u mafinima snižava negativan uticaj termičkog tretmana, jer doprinosi smanjenju sadržaja toksičnih produkata glikacije (N^{ε}-(karboksimetil)lizina) koji nastaju tokom pečenja.

Mlečni proizvodi, kao što su sir, jogurt, fermentisano mleko i sladoled takođe mogu biti obogaćeni brašnom komine, semenke i pokožice (Kandylis et al., 2021). Mlečni proizvodi su inkorporacijom brašna dodatno obogaćeni u sadržaju deficitarnih vlakana i fenolnih jedinjenja koji doprinose povećanju njihove funkcionalnosti. Pokazano je da inkorporacija brašna komine, semenke i pokožice povećava antioksidativnu i antidijabetsku aktivnost mlečnih proizvoda, modulira sastav crevne mikroflore i održava broj starter/probiotskih kultura tokom skladištenja proizvoda (Demirkol & Tarakci, 2018; Fernández-Fernández et al., 2022; Frumento et al., 2013; Roberta Marchiani et al., 2016). U proizvodnji funkcionalnih mlečnih napitaka je veoma bitna vrsta mleka, predtretman mleka koji se primenjuje u proizvodnji i sirovina koja se inkorporira u matriks, jer od toga najčešće zavise fizičkohemijske karakteristike proizvoda (Kandylis et al., 2021). Brašna fermenitisane/nefermentisane komine, semenke i pokožice od različitih sorti grožđa imaju varijabilan sastav konstituenata (lipida, vlakana, ugljenih hidrata, proteina, polifenola), koji može značajno uticati na funkcionalna, tehno-funkcionalna svojstva, fizičko-hemijske karakteristike matriksa, viabilnost sterter i probiotskih kultura i senzorna svojstva. Predhodne studije su pokazale da brašna komine i semenke nemaju uticaj na promenu pH jogurta (Brahmi et al., 2020; Mammadova et al., 2020), dok brašno pokožice smanjuje pH vrednost koaguluma i povećava kiselost jogurta (Roberta Marchiani et al., 2016). Jogurti obogaćeni brašnom komine često sadrže vinsku i jabučnu kiselinu, kao i glukozu i fruktozu koje su poreklom iz grožđa ili vina (Roberta Marchiani et al., 2016). Brašno komine i pokožice nije pokazalo uticaj na sinerezis (Demirkol & Tarakci, 2018; Karnopp, Oliveira, et al., 2017; Tseng & Zhao, 2013), ali modifikuje teksturu jogurta (Karnopp, Oliveira, et al., 2017; Roberta Marchiani et al., 2016). Vlakna iz brašna komine mogu delovati kao stabilizatori (sprečavaju pokretljivost vode), čime utiču na čvrstinu i konzistenciju jogurta (Cruz et al., 2013; Kandylis et al., 2021). Pored toga, jogurt sa brašnom pokožice ili semenke ima povećanu hrapavost koja negativno utiče na glatkoću, kremivost i klizavost proizvoda (Kandylis et al., 2021). Generalno, dodavanje brašna komine utiče na smanjenu senzornu prihvatljivost od strane potrošača, pa se iz tog razloga sve češće ispituje optimimalna količina dodate sirovine koja ne rezultira negativnim senzornim karakteristikama (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Primena brašna komine, semenke i pokožice u formulaciji proizvoda na bazi žitarica i mlečnih proizvoda[1]

Proizvod	*Komina ili deo komine*	*Udeo brašna u formulaciji*	*Zapažanja (funkcionalna i senzorna svojstva)*	*Reference*
PROIZVODI NA BAZI ŽITARICA				
Hleb	**Brašno semenke**	**0; 2,5; 5; 7,5; i 10%**	Povećan sadržaj dijetnih vlakana; Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Smanjenje sjaja i zapremine vekne; Smanjenje čvrstoće i poroznosti; Senzorno prihvatljiv hleb (5%).	(Hoye & Ross, 2011)
	Brašno semenke	**5; 10; 15; 20; i 25 %**	Povećan sadržaj dijetnih vlakana; Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Negativan efekat na reološka svojstva testa (>10%).	(Aghamirzaei et al., 2015)
	Brašno semenke	**2,5; 5; i 7,5%**	Povećan sadržaj dijetnih vlakana; Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida; Povećan sadržaj katehina i galne kiseline (HPLC); Poboljšana antioksidativna aktivnost (DPPH$^{\bullet}$; TEAC); Smanjena tvrdoća i zapremina vekne; Poboljšana reološka svojstva testa.	(Meral & Doğan İ, 2013)
	Brašno cele komine	**0; 5; i 10%**	Povećan sadržaj dijetnih vlakana (UDV, RDV i NDV); Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida; Poboljšana antioksidativna aktivnost (TEAC); Smanjenje zapremine i težine vekne; Tamnija boja vekne; Senzorno prihvatljivi svi model hlebovi.	(Yu, 2015)
	Brašno cele komine	**4; 6; 8; i 10%**	Povećan sadržaj dijetnih vlakana (UDV, RDV i NDV); Poboljšana antioksidtivna aktivnost (FRAP i DPPH$^{\bullet}$); Povećan sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja (HPLC); Povećana čvrstoća, gumivost i žvakljivost; Smanjena kohezivnost i hrskavost.	(Mildner-Szkudlarz et al., 2011)
	Brašno pokožice	**4; 6; 8; i 10%**	Povećan sadržaj dijetnih vlakana (UDV, RDV i NDV); Poboljšana antioksidativna aktivnost (FRAP); Povećan sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja (HPLC); Snižen ukupni holesterol, LDL-holesterol I lipidna peroksidacija (TBARS); Povišen HDL holesterol.	(Mildner-Szkudlarz & Bajerska, 2013)
	Brašno komine	**6; 10; i 15%**	Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida; Poboljšana antioksidativna aktivnost (DPPH$^{\bullet}$ i FRAP); Lepljiva i manje elastična tekstura; Tamna boja kriške; Pojačan after-taste i osećaj peska u ustima.	(Šporin et al., 2018)
Hleb Mafini Brownies	**Bršno crne i bele komine**	**5; 10; i 15% 5; 10; 15; i 20% 10; 15; 20; i 25%**	Povećan sadržaj dijetnih vlakana; Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Poboljšana antioksidativna aktivnost (DPPH$^{\bullet}$); Promene u teksturi; Senzorno prihvatljiv brownies (15 i 20%), hleb i mafini (5 i 10%).	(Walker et al., 2014)
Biskviti	**Brašno komine**	**0; 10; 20; i 30%**	Povećan sadržaj dijetnih vlakana (UDV, RDV i NDV); Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Povećan sadržaj galne kiseline (HPLC); Poboljšana antioksidativna aktivnost (DPPH$^{\bullet}$); Senzorno prihvatljiv proizvod (10%).	(Mildner-Szkudlarz et al., 2013)
	Brašno pokožice	**0,5 i 20%**	"izvor dijetnih vlakana"; Poboljšana antioksidtivna aktivnost (ABTS$^{\bullet+}$); Senzorno prihvatljiv proizvod.	(Fernández-Fernández et al., 2022)
	Brašno semenke	**5%**	Povećan sadržaj dijetnih vlakana; Snižava lipidnu peroksidaciju.	(Aksoylu Özbek et al., 2015)
	Brašno cele komine	**2; 4; 6; i 8%**	Povećan sadržaj dijetnih vlakana; Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Poboljšana antioksidativna aktivnost (DPPH$^{\bullet}$); Senzorno prihvatljivi biskviti (4 i 6%).	(Theagarajan et al., 2019)
	Brašno cele komine	**20; 25; i 30%**	Povećan sadržaj dijetnih vlakana; Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Poboljšana antioksidativna aktivnost (DPPH$^{\bullet}$).	(Karnopp et al., 2015)

	Brašno komine i semenke	**0; 5; 10; i 15%**	Povećan sadržaj dijetnih vlakana; Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Poboljšana antioksidativna aktivnost (DPPH$^{\bullet}$); Održiva čvrstoća i frakturabilnost tokom skladištenja; Senzorno prihvatljivi biskviti (5%).	(Acun & Gül, 2014)
Mafini	**Brašno pokožice**	**0; 10; 20; i 30%**	Smanjen sadržaj CML koji nastaje tokom pečenja (20%).	(Mildner-Szkudlarz et al., 2015)
	Brašno crne i bele komine	**0; 10; i 20%**	"izvor dijetnih vlakana"; Povećana tvrdoća i žvakljivost; Smanjena elastičnost i kohezivnost; Senzorno prihvatljivi mafini (10%).	(Ortega-Heras et al., 2019)
	Brašno crne i bele pokožice	**5; 7,5; i 10%**	Povećan sadržaj dijetnih vlakana (UDV, RDV i NDV); Smanjena kohezivnost; Senzorno prihvtljivi mafini, bez promene boje, ukusa i teksture.	(Bender et al., 2017)
Ekstrudirane žitarice	**Brašno semenke** **Brašno pokožice**	**10; 15; i 20%**	Povećan sadržaj dijetnih vlakana; Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Smanjenje čvrstoće; Senzorno prihvatljiv proizvod (15 i 20%).	(Oliveira et al., 2013)
Barovi od žitarica ***Palačinke*** ***Rezanci***	**Brašno semenke**	**5; 20; 25; 30%**	Poboljšana antioksidativna aktivnost; Senzorno su prihvatljivi barovi od žitarica (5%); Senzorno neprihvatljivi, palačinke (25%) i rezanci (20%).	(Soto et al., 2012)
Pasta	**Brašno crne i bele pokožice**	**3; 6; i 9%**	Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Povećan sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja (HPLC); Poboljšana antioksidativna aktivnost (FRAP); Senzorno prihvatljiv proizvod (6%).	(Gaita et al., 2020)
	Brašno pokožice	**2,5; 5; i 7,5%**	Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Povećan sadržaj ukupnih kondenzovanih tanina; Povećan sadržaj monomernih antocijana; Povećan sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja (HPLC); Poboljšana antioksidtivna aktivnost (ABTS$^{\bullet+}$); Prihvatljivost arome, naknadnog ukusa i teksture ne zavisi od koncentracije dodatog brašna; Senzorno najprihvatljivija testenina (2,5%).	(Sant'Anna et al., 2014)
		MLEČNI PROIZVODI		
Jogurt	**Brašno crno i bele pokožice**	**6 g/kg jogurta (posle fermentacije)**	Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Poboljšana antioksidativna aktivnost (DPPH$^{\bullet}$); Kvantifikovani pojedinačni fenoli (HPLC); Povećan sinerezis; Smanjen pH; Gubitak teksture; Senzorna prihvatljivost smanjena.	(Roberta Marchiani et al., 2016)
	Brašno pokožice sa/bez grožđanog soka	**0,17-1 g/100g**	Povećan sadržaj ukupnih vlakana; Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Poboljšana antioksidativna aktivnost (DPPH$^{\bullet}$); Povećana čvrstoća i konzistencija; Senzorno prihvatljiv proizvod.	(Karnopp, Oliveira, et al., 2017)
	Brašno komine	**2; 4; i 6%**	Povećan sadržaj ukupnih vlakana; Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Poboljšana antioksidativna aktivnost.	(Mammadova et al., 2020)
	Brašno semenke	**/**	Nema značajne razlike u fizičko-hemijskim karakteristikama (pH i viskozitet); Dobra senzorna prihvatljivost proizvoda (treniran i ne-treniran panel); Tamnija boja jogurta.	(Brahmi et al., 2020)
	Brašno pokožice	**0,5 i 20%**	"izvor dijetnih vlakana"; Poboljšana antioksidativna aktivnost (ABTS$^{\bullet+}$); Povećana inhibicija α-glukozidaze (antidiabetska aktivnost); Digestija jogurta pokazuje uticaj na smanjeno formiranje ROS-a izazvano terc-butil hidroperoksidom u CCD-18Co ćelijama debelog creva i RAW264.7 makrofagama; Senzorno prihvatljiv jogurt.	(Fernández-Fernández et al., 2022)
	Brašno nefermentisane komine	**0; 1; 3; i 5 g/100g mleka**	Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Poboljšana antioksidativna aktivnost (DPPH$^{\bullet}$); Viabilne (održive) starter kulture tokom čuvanja proizvoda; Nema uticaja na sinerezis; Promena u boji proizvoda; Senzorna prihvatljivi jogurti.	(Demirkol & Tarakci, 2018)

Fermentisano mleko	**Brašno fermentisane i ne-fermentisane komine**	/	Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Poboljšana antioksidativna aktivnost; Održiv broj probiotske kulture (*L. acidophilus* LA-05) tokom čuvanja jogurta (14 dan); Smanjeno vreme fermentacije.	(Frumento et al., 2013)
Probiotski koziji jogurt	**Brašno Isabel grožđa**	**15; 20; 25 g/100mL (posle fermentacije)**	Smanjen sadržaj proteina; Snižen pH tokom čuvanja; Održiv broj probiotske kulture (*L. acidophilus* LA-05) tokom čuvanja jogurta (7-8 log CFU mL^{-1}); Smanjen sinerezis tokom čuvanja (20g/100mL); Smanjena jačina (snaga) gela; Pozitivan uticaj na boju i viskoznost (20g/100mL); Senzorno najprihvatljiviji jogurt 20g/100mL.	(Silva et al., 2017)
Jogurt Dresing	**Brašno komine**	**1; 2; i 3% 0,5; 1; i 2%**	Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Poboljšana antikosidativna aktivnost ($DPPH^{\bullet}$); Promene u boji; Nema uticaja na sinerezis; Smanjen viskozitet; Senzorno prihvatljiv jogurt (1%), dressing (0,5 i 1%).	(Tseng & Zhao, 2013)
Tvrdu i polutvrdi sir (Toma i chedder)	**Brašno komine**	**0,8 i 1,6%**	Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Poboljšana antioksidativna aktivnost ($DPPH^{\bullet}$); Nema razlike u proteolizi (tokom zrenja) u odnosu na kontrolu uzorak; Nema uticaja sterter i ne-starter kulture u odnosu na kontrolni uzorak; Nema uticaja na fizičko-hemijske parameter.	(R. Marchiani et al., 2016)

[1]Skraćenice: UDV-ukupna dijetna vlakna; NDV- nerastvorna dijetna vlakna: RDV – rastvorna dijetna vlakna

2.5.2. Primena ekstrakta fenolnih jedinjenja komine, pokožice i semenke u formulaciji prehrambenih proizvoda

Poslednjih godina je porasla potražnja potrošača za funkcionalnom hranom na globalnom tržištu, pre svega zbog pozitivnog uticaja na zdravlje ljudi (Sridhar & Charles, 2021). Primena ekstrakata fenolnih jedinjenja komine, semenke i pokožice u formulaciji prehrambenih proizvoda je predmet brojnih istraživanja, upravo zbog globalne dostupnosti sirovine i ekološke satisfakcije. Ovi ekstrakti mogu biti korišćeni kao funkcionalni dodaci hrane, kao potencijalna zamena sa sintetičke aditive ili u formulaciji aktivnih ambalažnih filmova/prevlaka (Y. Chen et al., 2020; Perumalla & Hettiarachchy, 2011; Sridhar & Charles, 2021). U formulaciji različitih prehrambenih proizvoda se najčešće dodaju vodeni ili liofilisani ekstrakti fenolnih jedinjenja, a zatim se prati njihov uticaj na funkcionalna i fizičko-hemijska svojstva proizvoda. Mlečni proizvodi su vodeći prehrambeni proizvodi u oblasti funkcionalne hrane, zauzimaju čak 40% tržišta funkcionalne hrane. Funkcionalni mlečni proizvodi su opšte prihvaćeni i sve češće su uključeni u ishranu potrošača svih starosnih doba (Kandylis et al., 2021). Upravo mlečni proizvodi predstavljaju idealan matriks za inkorporaciju ekstrakata fenolnih jedinjenja komine, semenke i pokožice, jer doprinose poboljšanju funkcionalnosti ovih proizvoda. Ekstrakti fenolnih jedinjenja grožđa, komine, pokožice i semenke su najčešće inkorporirani u fermenisane mlečne proizvode, kao što su jogurt, kefir i fermentisano mleko (Tabela 2.2). Ovi fermentisani proizvodi imaju jedinstvene karakteristike i smatraju se idealnim „nosačima“ probiotskih bakterija, što ima ključnu ulogu u njihovoj širokoj prihvatljivosti od strane potrošača. Ekstrakti fenolnih jedinjenja mogu biti dodati u mleko ili jogurt pre procesa fermentacije ili posle fermentacije (kišeljenja i formiranja koaguluma), što može značajno da utiče na karakteristike finalnog proizvoda (Kandylis et al., 2021). Pokazano je da dodatna suplementacija probiotskih proizvoda sa ekstraktima iz komine doprinosi povećanju antioksidativne i antidijabetske aktivnosti (Akdeniz & Kavak, 2019; Carullo et al., 2020; Iriondo-DeHond et al., 2020; Yadav et al., 2017), međutim neophodna su dodatna *in vitro* i *in vivo* istraživanja kako bi se definisao uticaj na zdravlje ljudi.

Sa druge strane, dodatak ekstrakta komine obično menja fizičko-hemijska i senzorna svojstva proizvoda, što direktno utiče na njihovu prihvatljivost. Stoga je neophodno definisati parametre kao što su brzina acidifikacije, vreme fermentacije, jačina gela, kapacitet zadržavanja vode, sinerezis, viabilnost starter i probiotskih kultura, tekstura, boja i ukus proizvoda (Cutrim & Cortez, 2018; Kandylis et al., 2021; Sridhar & Charles, 2021). Dodatak ekstrakata fenolnih jedinjenja može imati različite uticaje na sinerezis i teksturu, što zavisi od sastava mleka i ekstrakta, kao i fenolna jedinjenja-protein interakcija. Fenolna jedinjenja lako interaguju sa proteinima, čime se narušava njihova umrežena struktura, smanjuje se kapacitet zadržavanja vode, povećavaju se pore u matriksu gela i povećava sinerezis. Sa druge strane, fenolna jedinjenja-protein interakcije mogu takođe uticati na stabilnost kazeinske mreže čime se smanjuje sinerezis (Kandylis et al., 2021). U literaturi se mogu naći kontradiktorni rezultati za sinerezis, neki autori sugerišu da dodatak ekstrakata fenolnih jedinjenja ne utiče na sinerezis (Dimitrellou et al., 2020; Tseng & Zhao, 2013), dok drugi ističu da dodatak ekstrakta povećava (Barat & Ozcan, 2017) ili smanjuje (Dabija, 2018; Iriondo-DeHond et al., 2020) sinerezis. Ekstrakti fenolnih jedinjenja takođe mogu uticati na brzinu acidifikacije i vreme fermentacije (de Souza de Azevedo et al., 2018; Felix da Silva et al., 2017). Fenolna jedinjenja iz ekstrakta mogu potencijalno da uspore aktivnost starter kultura što objašnjava produženo vreme fermentacije (Felix da Silva et al., 2017). Većinu fermentisanih proizvoda sa ekstraktom komine karakterišu održive starter i probiotske kulture tokom prerade i skladištenja (Chouchouli et al., 2013; de Souza de Azevedo et al., 2018; Felix da Silva et al., 2017; Iriondo-DeHond et al., 2020). Fenolna jedinjenja iz ekstrakta najverovatnije neutrališu kiseonik koji može biti toksičan za mikroorganizme (Talwalkar & Kailasapathy, 2004), čime imaju pozitivan efekat na održivost mikrobnih kultura. Većina proizvoda sa ekstraktima komine, semenke i pokožice pokazuju dobru senzornu prihvatljivost i visoku preferenciju potrošača (Akdeniz & Kavak, 2019; Axten et al., 2008; Barat & Ozcan, 2017; Dos Santos et al., 2017; Felix da Silva et al., 2017; Silva et al., 2022). Ekstrakt semenke grožđa u mleku je pokazao manji nivo gorčine i trpkosti u poređenju sa brašnom semenki ili fenolnim

ekstraktom jabuke (Axten et al., 2008). Antocijanski ekstrakt pokožice grožđa su pokazali veliki uticaj na promenu boje fermentisanih napitaka, što je negativno prihvaćeno od strane potrošača (Jaimes et al., 2018), dok ekstrakt semenke nije značajno uticao na promenu boje proizvoda (Chouchouli et al., 2013).

Tabela 2.2. Primena ekstrakta grožđa, komine, semenke i pokožice u formulaciji jogurta i fermentisanih napitaka

Proizvod	***Mleko***	***Ekstrakt***	***Mikrobna vrste uključena u fermentaciji***	***Glavna zapažanja***		***Reference***
				Funkcionalna svojstva	***Senzorna i teksturna svojstva***	
Probiotski jogurt Jogurt	Komercijalno pasterizovano mleko	**Ekstrakt grožđa (0; 1,5; i 3 g/L)**	*Streptococcus thermophilus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus acidophilus Bifidobacterium bb12 bifidum*	Zadržana probiotska svojstva tokom čuvanja.	Dodatak ekstrakta produžava fermentaciju; Mekša tekstura jogurta; Povećan sinerezis; Promenjena reološka svojstva; Smanjena brzina acidifikacije i čvrstina gela; Senzorno prihvatljivi proizvodi.	(Felix da Silva et al., 2017)
	UHP pripremljeno kravlje mleko	**Ekstrakt komine, semenke i šepurine + inulin (fruktan)**	*Streptococcus thermophiles Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*	Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Poboljšana antoksidativna aktivnost (ORAC i $ABTS^{\bullet+}$); Antidijabetska aktivnost (inhibira α-glukozidazu); Viabilne (održive) starter kulture tokom čuvanja proizvoda (21 dan).	Dobra senzorna prihvatljivost proizvoda (ekstrakt +inulin); Stabilna fizičko-hemijska i teksturna (čvrstoća i konzistencija) svojstva tokom čuvanja (21 dan); Smanjen sinerezis (komina i pokožica).	(Iriondo-DeHond et al., 2020)
	/	**Ekstrakt semenke (0,25 i 0,5%)**	*Streptococcus thermophilus Lactobacillus bulgaricus*	/	Smanjen sinerezis; Povećan kapacitet zadržavanja vode; Smanjen viskozitet; Senzorno prihvatljiv proizvod (ukus, tekstura, osećaj u ustima).	(Dabija, 2018)
	Kravlje mleko	**Nekapsulisan i inkapsulisan ekstrakt semenke (1%)**	Starter culture NCDC 166 i NCDC 263 (YC-281)	Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Povećan sadržaj galne kiseline, epikatehina i procijanidina B2 (HPLC); Poboljšana antiokidativna aktivnost (ORAC i $DPPH^{\bullet}$); Viabilne (održive) starter kulture tokom čuvanja proizvoda.	Izmenjena boja (neinkapsulisan ekstrakt); Povećan kapacitet zadržavanja vode i viskozitet (inkapsulisan ekstrakt).	(Yadav et al., 2017)
	Kravlje mleko	**Liofilisan ekstrakt semenke (0,1; 0,15; i 0,2%)**	/	Poboljšana antioksidativna aktivnost ($DPPH^{\bullet}$).	Dobra senzorna prihvatljivost proizvoda (0,1%); Negativna senzorna percepcija (0,2%) Snižena pH.	(Akdeniz & Kavak, 2019)
	/	**Antocijanski ekstrakt iz grožđa+ corozo ekstrakt (11,8%)**	/	Poboljšana antioksidativna aktivnost (ORAC i $ABTS^{\bullet+}$).	Proizvod se nije svideo konzumerima (56% ispitanika) (bledo roza boja).	(Jaimes et al., 2018)
	Komercijalno kravlje mleko + odmašćeno mleko u prahu	**Sok od grožđa (50 ml/L mleka)**	*Streptococcus thermophiles Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* (Lyofast Y 436 A)	Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Poboljšana antioksidativna aktivnost; Viabilna (održiva) starter kultura *S. thermophilus* tokom čuvanja proizvoda.	Intenzivna crvena boja proizvoda; Nema značajne razlike u fizičkohemijskim; karakteristikama (pH, kapacitet zadržavanja vode, sinerezis);	(Dimitrellou et al., 2020)
	Punomasno i odmašćeno kravlje mleko	**Ekstrakt semenke (100mg suvog ekstrakta /150g jogurta)**	*Lactobacillus bulgaricus Streptococcus thermophilus*	Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Povećan sadržaj galne kiseline, epikatehina, katehina i kofeinske kiseline (HPLC); Poboljšana antiokidativna aktivnost (FRAP i $DPPH^{\bullet}$); Viabilne (održive) starter kulture tokom čuvanja proizvoda.	Nema uticaja na pH; Nema uticaja na konzistenciju, boju i ukus.	(Chouchouli et al., 2013)
	/	**Ekstrakt grožđa i kalusa vinove loze**	/	Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Povećan sadržaj ukupnih antocijana; Poboljšana antioksidativna aktivnost ($DPPH^{\bullet}$).	Senzorno prihvatljivi svi jogurti (tekstura, aroma, izgled).	(Karaaslan et al., 2011)

	/	**Tečni i liofilisani ekstrakt komine (ml ili g ekstrakta tako da ukupnih fenola bude kao u 2% komini)**	*Streptococcus thermophiles* *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* *Lactobacillus acidophilus* *Bifidobacterium lactis*	Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Poboljšana antikosidativna aktivnost ($DPPH^{\bullet}$).	Promene u boji; Nema uticaja na sinerezis; Povećan viskozitet.	(Tseng & Zhao, 2013)
Kefir	Kravlje mleko	**Ekstrakt semenke i pokožice (1; 5; i 10 mg/10mL)**	/	Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Poboljšana antioksidativna aktivnost ($DPPH^{\bullet}$ i $ABTS^{\bullet+}$); Inhibicija enzima povezanih sa metaboličkim sindromom (α-amilaza; α-glukozidaza; i lipaza).	/	(Carullo et al., 2020)
Fermentisani mlečni napitak	/	**Sok od grožđa (1:1)**	*Streptococcus thermophilus* *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* *Lactobacillus acidophilus* *Bifidobacterium lactis*	Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Poboljšana antiokidativna aktivnost ($DPPH^{\bullet}$); Viabilne (održive) starter kulture tokom čuvanja proizvoda.	Povećan sinerezis tokom čuvanja (28 dan); Održiva pH tokom čuvanja (28 dan); Dobra senzorna prihvatljivost proizvoda (tekstura, miris, ukus, boja i intenzitet arome).	(Barat & Ozcan, 2017)
	Termički tretirano odmašćeno mleko	**Ekstrakt komine (sadržaj fenola bude 80mg/L fermentisanog mleka)**	*Streptococcus thermophilus* *Lactobacillus acidophilus*	Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (smanjuje se tokom čuvanja); Viabilne (održive) starter kulture tokom čuvanja proizvoda.	Smanjeno vreme fermentacije; Povećana brzina acidifikacije; Smanjeno vreme fermentacije.	(de Souza de Azevedo et al., 2018)
	Odmašćeno mleko	**Ekstrakt komine (2,09 mgCAE/mL)**	*Streptococcus thermophilus* TA040 *Lactobacillus acidophilus* LAC4	Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Poboljšana antioksidativna aktivnost ($DPPH^{\bullet}$); Viabilne (održive) starter kulture tokom čuvanja proizvoda.	/	(Aliakbarian et al., 2015)
Probiotsko fermentisani mlečni napitak	**Kozije mleko**	**Ekstrakt komine (2 g/100g) + Sok grožđa (15 g/100g)**	*Lactobacillus acidophilus* LA-5 *Lactobacillus rhamnosus* HN001 *Streptococcus thermophiles*	Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Zadržana probiotička svojstva tokom čuvanja (održive probiotske culture).	Održana čvrstina, konzistencija, kohezivnost i viskozitet tokom čuvanja (28 dan); Dobra senzorna prihvatljivost.	(Dos Santos et al., 2017)
Fermentisani mlečni napitak	**Kozije mleko**	**Inkapsulisan ekstrakt komine (6%) + sok grožđa (20%)**	*Lactobacillus rhamnosus* *Streptococcus thermophilus*	Povećan sadržaj dijetnih vlakana (UDV, NDV i RDV); Povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; Poboljšana antioksidativna aktivnost; Povećan sadržaj oleinske masne kiseline; Održive starter kulture u intestinalnom traktu koje imaju pozitivan uticaj na mikrobiotu creva.	/	(Freire et al., 2017)
Probiotski jogurt	**Kozije mleko**	**Izabel grožđe (20g/100 mL)+brašno komine (2g/100mL)**	*Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (YF-L903) *Lactobacillus acidophilus La-05*	Smanjen sadržaj proteina; Povećan sadržaj pojedinačni fenolnih jedinjenja (HPLC); Poboljšana antoksitadivna aktivnost ($DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ i ORAC); Održiv (visok) broj *Lactobacillus acidophilus* La-05 tokom čuvanja jogurta.	Niža pH od kontrole; Promene u boji; Dobra senzorna prihvatljivost i visoka preferencija potrošača (suplementacija jogurta maskira karakterističan miris kozijeg jogurta).	(Silva et al., 2022)

2.5.2.1. Fermentisani mlečni napici na bazi kozijeg mleka obogaćeni funkcionalnim dodacima

Kozije mleko nije puno eksploatisano kao kravlje mleko, stoga u literaturi nema puno radova čiji su predmet ispitivanja fermentisani napitci na bazi kozijeg mleka koji su obogaćeni funkcionalnim dodatkom ili ekstraktima fenolnih jedinjenja. Do sada su proizvedeni koziji jogurti sa dodatkom jujuba pulpe (Feng et al., 2019), brašnom i ekstraktom *Rhus coriara* lišća (Perna et al., 2018; Simonetti et al., 2021), brašnom *Pilosocereus gounellei* (xique-xique) kaktusa (Dantas et al., 2022), homogenizovanim Isabel grožđem (Silva et al., 2017) i mešavinom Isabel grožđe/brašno komine (Silva et al., 2022). Pored navedenog, prijavljeni su koziji fermentisani mlečni napitci sa dodatkom licuri voća (Souza et al., 2020), mešavine grožđe/ekstrakt komine (Dos Santos et al., 2017) i mešavine sok grožđa/inkapsulisan ekstrakt komine (Freire et al., 2017). Kombinacija grožđa i/ili ekstrakta komine sa kozijim fermentisanim napitkom daje jedinstven proizvod koji ima visoku funkcionalnost, poboljšanu antioksidativnu aktivnost, dobru digestibilnost, smanjena alergena svojstva i održive starter/probiotičke kulture tokom skladištenja (Dos Santos et al., 2017; Silva et al., 2017; Silva et al., 2022). Koziji jogurti sa dodatkom mešavine Isabel grožđe/ekstrakt komine su pokazali poboljšanu antioksidativnu aktivnost i povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, kao i dominantno prisustvo katehina, miricetina, kaftarne kiseline i malvidin-3-*O*-glukozida (Silva et al., 2022). Štaviše, pokazano je da ovi napitci imaju pozitivan uticaj na metabolizam mikrobiote creva, jer utiču na povećanje antioksidativnog kapaciteta, proizvodnju kratkolančanih masnih kiselina i smanjenje koncentracije amonijum jona (Freire et al., 2017). Pored navedenog, koziji jogurt sa dodatkom različitih udela homogenizovanog Izabel grožđa su pokazali održiv ili smanjen sinerezis i kapacitet zadržavanja vode tokom skladištenja (Silva et al., 2017). Ove razlike se mogu pripisati različitoj koncentraciji unetih fenolnih jedinjenja u matriks i postojanju specifičnih kazein-fenolna jedinjenja interakcija (Kandylis et al., 2021). Dodatak mešavine grožđe/ekstrakt komine u kozije napitke je pokazao održivu teksturu (čvrstina, konzistencija, kohezivnost i viskozitet) (Dos Santos et al., 2017), dobru senzornu prihvatljivost i visoku preferenciju kod potrošača, jer potencijalno maskira karakterističan koziji miris (Silva et al., 2022). Priprema, karakterizacija i procena antioksidativnih svojstava fermentisanog napitka na bazi kozijeg mleka obogaćenog fenolnim ekstraktima semenke grožđa do sada nije ispitivana.

2.5.3. Funkcionalni aditivi na bazi proteina mleka i ektrakata komine, semenke i pokožice

Mleko se nameće kao obećavajući nosač bioaktivnih jedinjenja u formulaciji funkcionalnih aditiva. Pokazano je da kazeinske micele kravljeg mleka mogu biti nanonosači za β-karoten (Moeller et al., 2017) i vitamin D2 (Moeller et al., 2018), ili mogu da vezuju polifenole, što značajno utiče na sposobnost geliranja micele (Haratifar & Corredig, 2014) i poboljšava micelarnu stabilnost kazeina (O'Connell et al., 1998). Pored navedenog, model sistemi koji uključuju kombinaciju punomasnog i/ili obranog mleka sa sokom grožđa, sprečavaju degradaciju visoko vrednih fenolnih jedinjenja, povećavaju antioksidativnu aktivnost i sinergistički smanjuju stvaranje lipidnih radikala (He et al., 2016; Kılıç Bayraktar et al., 2019; Lamothe et al., 2019). Takođe je pokazano da mleko/proteini mleka efikasno inkapsuliraju i interaguju sa flavan-3-olima (Lorenz et al., 2007), poboljšavaju njihovu biodostupnost (Moser et al., 2014) i transepitelnu adsorbciju (Xie et al., 2013) nekih specifičnih derivata katehina iz čaja, koji je bogat izvor flavan-3-ola. Štaviše, termički tretman mleka vodi ka „obogaćivanju“ površine kazeinske micele sa kompleksnim serum protein agregatima (Pesic et al., 2012), koji povećavaju verovatnoću vezivanja proteina sa fenolnim jedinjenjima (Taterka & Castillo, 2015) i jačaju fenolna jedinjenja-kazein interakcije (Rahimi Yazdi & Corredig, 2012). Dakle, mleko predstavlja idealan matriks za isporuku bioaktivnih komponenata, koje zajedno sa biokomponentama iz mleka mogu pružiti dodatne zdravstvene koristi. Iako je većina ovih istraživanja sprovedena na kravljem mleku, od nedavno je posebna požnja posvećena proučavanju kozijeg mleka.

Razmatrajući korisne aspekte kozijeg mleka u poređenju sa kravljim mlekom, razlike između CNM ova dva tipa mleka, kao i potrebu za razvojem novih funkcionalno inovativnih proizvoda od strane potrošača, istraživanja o proteinima kozijeg mleka kao nosača bioaktivnih komponenti može biti obećavajuće u razvoju funkcionalne hrane. Do sada su uspešno razvijeni napitci kozijeg mleka obogaćenog različitim ekstraktima medicinskog bilja (Komes et al., 2017) i *Tinospora cordifolia* (giloy) sokom sa/bez dodatkom biljnog ekstrakta (Sharma et al., 2021), kao i funkcionalni prah odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka koji je obogaćen polenom (Kostić et al., 2021). Prema saznanju, priprema, karakterizacija i antioksidativna aktivnost funkcionalnih aditiva na bazi proteina kozijeg mleka obogaćenih ekstraktima semenke grožđa do sada nisu ispitivana.

2.5.4. Lactobacillus plantarum i njegova tanazna aktivnost

Lactobacillus plantarum je gram pozitivna nepokretna i nesporulišuća bakterija mlečne kiseline koja je široko rasprostranjena. Predstavlja deo mikrobiote mnogih namirnica i hraniva, uključujući mlečne proizvode, meso, ribu, fermentisane proizvode od povrća i voća (vinska komina, kiseli kupus, kiselo povrće, kiselo testo) i silažu, takođe je prirodni stanovnik ljudske i životinjske sluznice (npr. usne duplje i gastrointestinalnog trakta). *Lactobacillus plantarum*, korišćen u kontrolisanoj fermentaciji, obično je povezan sa poželjnim svojstvima mnogih fermentisanih namirnica i često se dodaje kao jedini ili jedan od sastojaka starter kultura, kako bi se poboljšao kvalitet ovih fermentisanih proizvoda (Corsetti & Valmorri, 2011). Ova bakterijska vrsta se pored razvijenog i diverzifikovanog proteolitičkog sistema, po kome je čitav rod *Lactobacillus* poznat, odlikuje i enzimskim sistemom za razgradnju fenolnih jedinjenja. Pošto je *Lactobacillus plantarum* vrsta bakterija mlečne kiseline koja se najčešće susreće u fermentaciji biljnih materijala koji su bogati taninima npr. masline, grožđana šira i fermentisano povrće, gotovo svi sojevi vrste *Lactobacillus plantarum* poseduju tanaznu aktivnost. Biohemijski put za degradaciju tanina kod *Lactobacillus plantarum*-a, uključuje delovanje tanaze i galat dekarboksilaze kako bi se dekarboksilovala galna kiselina formirana delovanjem tanaze. Tanaza (tanin acil hidrolaza, E.C. 3.1.1.20) pripada serinskim esterazama i katalizuje hidrolizu estarskih i depsidnih veza u hidrolizabilnim taninima, kompleksnim taninima i estrima galne kiseline, dok enzim galatdekarboksilaza (E.C. 4.1.1.59) katalizuje razgradnju galne kiseline do pirogalola (Rodríguez-Durán et al., 2011). Tanaze imaju široku primenu u prehrambenoj industriji kao sredstvo za bistrenje u proizvodnji instant čajeva, nekih vina, piva, voćnih sokova, bezalkoholnih pića na bazi kafe, kao i u proizvodnji galne kiseline, koja se kasnije može koristi za sintezu propilgalata, snažnog antioksidansa (Aguilar & Gutie´rrez-Sa´nchez, 2001). U studiji Jiménez et al. (2014), identifikovana su dva gena za tanaznu aktivnost kod *Lactobacillus plantarum*-a ATCC 14917. To su bile sekvence tanBLp i tanALp. Sekvenca tanBLp je bila prisutna kod svih sojeva (kodira intracelularnu formu tanaze koja je indukuje prisustvom metil-galata), dok je tanALp (kodira ekstracelularnu konstitutivno eksprimiranu izoformu) bila prisutna kod veoma malog broja sojeva.

2.5.4.1. Funkcionalna, fizičko-hemijska i senzorna svojstva fermetisanih mlečnih napitaka na bazi kozijeg mleka korišćenjem različitih sojeva Lactobacillus plantarum

Svega nekoliko različitih sojeva vrste *Lactobacillus plantarum* su potencijalno korišćeni u fermentaciji i formulaciji napitaka od kozijeg mleka. Ovi probiotski sojevi su najčešće korišćeni u kombinaciji sa jogurtnim starter kulturama (Bergillos-Meca et al., 2015; Dan et al., 2019; Mahmoudi et al., 2020; Moreno-Montoro et al., 2018), dok su ređe korišćeni kao samostalni u fermentaciji (L. Chen et al., 2018; Hashemi & Gholamhosseinpour, 2020; Yurliasni et al., 2019). Pokazano je da ultrazvučni tretman kozijeg mleka (15min, 30kHz, 60% amplituda) stimuliše rast nekih sojeva *Lactobacillus plantarum* (LP3 i LU5) tokom fermentacije, a dobijeni fermentisani napitci su pokazali α-amilaza i α-glukozidaza inhibitorna svojstva, antikancerogenu (Caco-2 i T4056 ćelije) aktivnost, dobru sposobnost neutralisanja $DPPH^{\bullet}$ radikala i povećan sadržaj potencijalno prisutnih egzopolisaharida (Hashemi & Gholamhosseinpour, 2020). Dalje, kozije mleko fermentisano novim neselekcionisanim sojem *Lactobacillus plantarum* L69 je pokazalo visoku ACE-inhibitornu aktivnost, što se objašnjava njihovom proteolitičkom aktivnošću i nastankom bioaktivnih peptida.

Visoka ACE-inhibitorna aktivnost je pokazana i u uslovima simulirane *in vitro* gastrointestinalne digestije (59,89%), što se može objasniti gastrointestinalnom „rezistencijom“ L69 peptida (hidrolizata) ili nastankom novih ACE-inhibitornih peptida tokom digestije (L. Chen et al., 2018). Kombinacija starter kultura i *L. plantarum* C4 je uspešno primenjena u fermentaciji ultrafiltracijom koncentrovanog obranog kozijeg mleka pri čemu je dobijen novi fermentisani proizvod koji ima nizak sadržaj laktoze i masti, visok udeo proteina i minerala, dobru sposobnost zadržavanja Ca, kao i veću usvojivost Ca i Mg u poređenju sa komercijalnim (srodnim) proizvodima. Za isti proizvod je potvrđen održiv broj bakterijskih sojeva nakon skladištenja i *in vitro* gastrointestinalne digestije što je posebno važno za ispoljavanje funkcionalnih karakteristika probiotičkog soja (Bergillos-Meca et al., 2015; Moreno-Montoro et al., 2018). Dodatak *Lactobacillus plantarum* probiotskih sojeva (*Lactobacillus plantarum* BA12 i P-8) u nove proizvode od kozijeg mleka nisu pokazali uticaj na fizičko-hemijska svojstva proizvoda kao što su pH, sinerezis, kapacitet zadržavanja vode, boja, vikozitet i teksturni parametri, u poređenju sa kontrolnim uzorkom (fermentisan samo sa starter kulturom) (Dan et al., 2019; Mahmoudi et al., 2020). Pored toga, fermentisani koziji napitci sa *Lactobacillus plantarum* sojevima su imali dobru senzornu prihvatljivost koja je uporediva sa komercijalno dostupnim proizvodima (Dan et al., 2019; Mahmoudi et al., 2020; Moreno-Montoro et al., 2018; Souza et al., 2020). Sve predhodne studije su bazirane na proizvodnji probiotskih fermentisanih kozijih napitaka, jedino su Souza et al. (2020) prijavili mogućnost dobijanja fermentisanih kozijih napitaka korišćenjem autohtonih *Lactobacillus plantarum* sojeva i njihovu dodatnu suplementaciju sa licuri voćem. Ovaj proizvod je imao bolju senzornu prihvatljivost i visoku preferenciju od strane potrošača u odnosu na model napitke koji su fermentisani sa komercijalnim kulturama. Primena različitih *Lactobacillus plantarum* sojeva u fermentaciji kozijeg napitaka i/ili proizvodnji fermentisanih funkcionalnih aditiva koji su obogaćeni ekstraktom semenke grožđa do sada nije ispitivana.

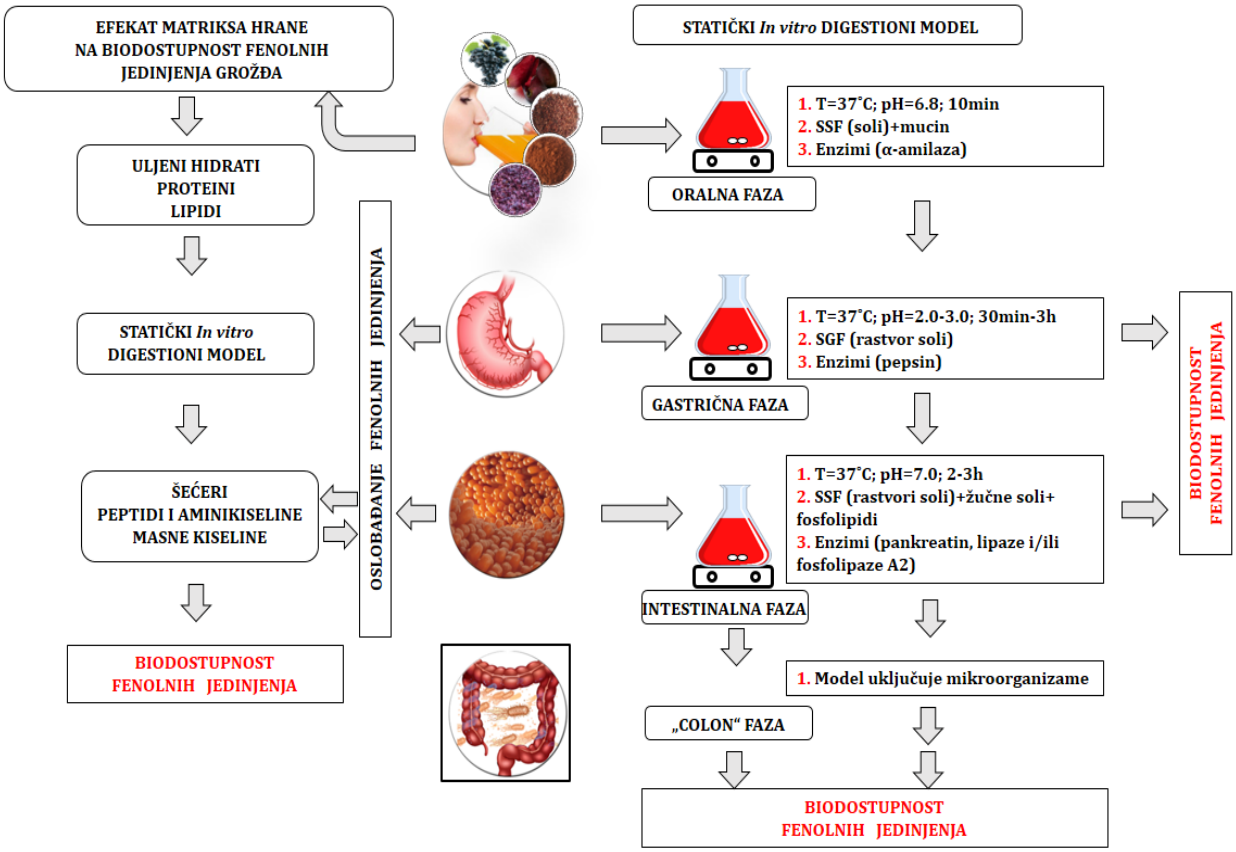
2.6. Modeli simulirane gastrointestinalne digestije za određivanje biodostupnosti fenolnih jedinjenja

Modeli za gastrointestinalnu digestiju se generalno dele u dve grupe: *in vitro* (statički i dinamički modeli) i *in vivo* modeli. *In vitro* modeli se češće koriste za određivanje biodostupnosti fenolnih jedinjenja jer su brzi, bezbedni za primenu i nemaju etička ograničenja kao što je to slučaj u *in vivo* eksperimentima. *In vitro* studije simuliraju fiziološke uslove i događaje koji se dešavaju tokom digestije u gastrointestinalnom traktu ljudi. Ovi modeli se najčešće primenjuju na hrani i uključuju tri oblasti digestivnog sistema (usta, želudac i creva). Glavni parametri *in vitro* gastrointestinalnih modela su temperatura, mešanje, vreme trajanja i enzimski sastav pljuvačke, gastrične i intestinalne (duodenalni i žučni sok) tečnosti (Tabela 2.3). Pored navedenog, napredne *in vitro* studije koriste ćelijske linije (Caco 2 ćelije) koje oponašaju sluzokožu creva za proučavanje aktivnog transporta žučnih kiselina i bioaktivnih molekula (fenolnih jedinjenja) (Braga et al., 2018; Fernández-García et al., 2009). *In vitro* studija ima analitički pristup, jer se koristi za potvrdu uticaja različitih faktora na biodostupnost bioaktivnih jedinjenja i za analizu uticaja sastava matriksa hrane na proces digestije. U analizi fenolnih jedinjenja uglavnom se koriste statički *in vitro* modeli, jer su dinamički *in vitro* modeli skuplji, zahtevniji za izvođenje i otežana je interpretacija dobijenih rezultata (C. Li et al., 2020; Raquel Lucas-González et al., 2018; McClements, 2021). Statički *in vitro* modeli digestije su do sada uspešno korišćeni za praćenje biodostupnosti fenolnih jedinjenja iz grožđa, komine i vina sa ili bez matriksa hrane (Tabela 2.3).

Statički *in vitro* simulirani gastrointestinalni modeli se razlikuju po svojoj sofisticiranosti, preciznosti i jednostavnosti korišćenja (Slika 2.8). Najčešće se koristi standardizovani *in vitro* model digestije koji je predložen od strane COST INFOGEST mreže (Brodkorb et al., 2019; Minekus et al., 2014). Međutim, prema podacima iz literature, mogu se naći različiti statički *in vitro* modeli digestije koji koriste različite uslove: pH, brzinu mešanja, vreme inkubacije i sastav digestivnih tečnosti, kako bi simulirali uslove u ustima, želucu i crevima (Thakur et al., 2020). Sastav digestivnog fluida i koncentracije korišćenih supstanci široko variraju između različitih modela, i zavise od ciljeva istraživanja (Gonçalves et al., 2021). U svim modelima, temperatura se održava na 37°C u svim

fazama digestije, dok je pH promenljiva i specifična za svaku fazu: oralna faza (pH~6-7), gastrična faza (pH~1-5), i intestinalna faza (pH~6-7). Fiziološki uslovi (npr. tip i količina enzima, soli, puferi i emulgatori) se razlikuju u različitim *in vitro* digestivnim modelima, što može značajno da utiče na ponovljivost, poređenje i konačnu interpretaciju dobijenih rezultata (Gonçalves et al., 2021; Kostić et al., 2021; C. Li et al., 2020).

Simulirana oralna faza u laboratorijskom modelu uključuje mešanje ekstrakata ili matriksa sa simuliranim saliva fluidom (pljuvačnim sokom) pod određenim uslovima (5-10min, T=37°C, i pH 6,5-6,8). Glavni faktori koji utiču na ponašanje fenolnih jedinjenja u ovoj fazi su: (1) interakcije sa salivom; (2) interakcije sa mucinom; (3) i interakcije sa enzimima koji se koriste u ovoj fazi (najčešće se koristi samo α-amilaza). Nakon oralne faze, „bolus“ se meša sa simuliranim gastričnim fluidom pod određenim uslovima (1-2h, T=37°C, i pH 1-5) i dodaje se enzim, najčešće pepsin svinjskog želudca (retki su modeli koji dodatno uključuju i gastričnu lipazu). Nakon gastrične faze, „humus“ se meša sa simuliranim intestinalnim fluidom pod određenim uslovima (2h, T=37°C, i pH 6-8), koji najčešće sadrži žučne soli i pankreatin svinjskog pankreasa (mešavina amilaze, lipaze i proteinaze), dok kompleksniji model dodatno uključuje male organske molekule, koenzime, fosfolipide i fosfolipazu A2. Žučne soli su sastavni deo svih *in vitro* digestivnih modela sa značajnom funkcijom u digestiji lipida i solubilizaciji lipofilnih fenolnih jedinjenja. Nakon intestinalne digestije, dijaliza i centrifugiranje se najčešće koriste za odvajanje biodostupne frakcije koja se dalje analizira (Grgić et al., 2020; C. Li et al., 2020; Marie et al., 2014; Minekus et al., 2014; Thakur et al., 2020; Wojtunik-Kulesza et al., 2020). Neki *in vitro* modeli uključuju i fazu debelog creva („*colon*“ faza) koja sadrži složen mikrobni ekosistem koji fermentiše komponente hrane koje nisu mogle biti razložene u gornjem delu gastrointestinalnog trakta. Fenolna jedinjenja se u „*colon*“ fazi zavisno od strukture prevode u metabolite kao što su fenol aglikoni, urolitin, hidroksifenolsirćetna kiselina, hidroksifenilpropionska kiselina i fenilvalerolaktoni (Grgić et al., 2020; Marie et al., 2014; Wojtunik-Kulesza et al., 2020).



Slika 2.8. Šematski prikaz statičkog *in vitro* modela digestije za analizu biodostupnosti fenolnih jedinjenja iz grožđa, komine, pokožice, semenke sa/bez prisustva matriksa hrane.

2.6.1. Primena modela in vivo i in vitro digestije u analizi biodostupnosti fenolnih jedinjenja i njihovih funkcionalnih svojstava

Biodostupna frakcija molekula se definiše kao skup biomolekula koji se oslobađaju iz matriksa u gastrointestinalnom traktu, postaju dostupni za crevnu absorpciju i potencijalno ispoljavaju bioaktivnost (Grgić et al., 2020; Thakur et al., 2020). Stoga, biodostupnost je ključni parametar u određivanju funkcionalne i nutritivne efikasnosti biomolekula, jer organizam najčešće neiskoristi sve nutrienate i bioaktivne komponenata iz hrane (Fernández-García et al., 2009). Na smanjenu *in vivo* biodostupnost fenolnih jedinjenja utiče nekoliko faktora kao što su: smanjeno oslobađanje fenolnih jedinjenja iz matriksa hrane, niska rastvorljivost ili formiranje nerastvornih kompleksa u digestivnom traktu, interakcija sa proteinima pljuvačnog soka, osetljivost na pH uslove, niska permeabilnost kroz sluzokožu creva i molekularne transformacije u digestivnom traktu (Grgić et al., 2020; Marie et al., 2014; Thakur et al., 2020; Wojtunik-Kulesza et al., 2020). Digestija hrane počinje u ustima, pri čemu su žvakanje i lučenje pljuvačke dva komplementarna oralna mehanizma. Za čvrstu hranu, oralna obrada utiče na smanjenje veličine čestica hrane i formiranje „bolusa“, dok se sa druge strane tečnosti samo razblažuju sa salivom (C. Li et al., 2020). Mastikacija (žvakanje) i niska pH želuca pokreću oslobađanje fenolnih jedinjenja iz omekšanog i dezintegrisanog matriksa hrane (Lorenzo et al., 2019). Fenolna jedinjenja se dalje rastvaraju u digestivnom fluidu gastrične i intestinalne faze, apsorbuju, metabolišu i ispoljavaju biološku aktivnost. Međutim, fenolna jedinjenja se najčešće nalaze u formi estara, glikozida i polimera koji se ne mogu *in vivo* apsorbovati u ovim oblicima, već podležu transformaciji pod uticajem crevne mikroflore (β-glukozidaze, β-ramnozidaze i esteraze) i enzima koji katališu reakcije glukuronidacije, metilacija ili sulfonacija pri čemu nastaju derivati fenolnih jedinjenja koji imaju izmenjena funkcionalna svojstva (Lorenzo et al., 2019; Tarko et al., 2013). Brojne *in vivo* studije su pokazale izuzetno nizak nivo apsorpcije antocijana, koji u gastrointestinalnom traktu nestaju posle samo nekoliko sati od konzumacije, jer se brzo transformišu u metabolite koji se potencijalno dalje apsorbuju (F. Han et al., 2019). Na biodostupnost antocijana i njihovu absorpciju utiče njihova hidrofilna/hidrofobna priroda, broj hidroksilnih grupa i šećerni (mono- ili oligosaharidni) ostatak u strukturi. U prisustvu mikroflore creva najčešće dolazi do uklanjanja glikozidnih veza i cepanja prstena antocijanidina, izuzev u slučaju antocijanidina koji su povezani sa pentozama i kiselinama koji pokazuju povećanu otpornost na razgradnju (Braga et al., 2018; F. Han et al., 2019). Oligomerna i polimerna jedinjenja takođe prolaze kroz biotransformaciju čime se smanjuje njihova molekulska masa i formiraju derivati koji se lakše apsorbuju (Lorenzo et al., 2019). Procijanidini se u gastrointestinalnim uslovima lako degradiraju do svojih flavan-3-ol monomera (najčešće katehin i epikatehin) koji se dalje apsorbuju i metabolišu (Unusan, 2020). Jako je teško pratiti formirane metabolite fenolnih jedinjenja koji nastaju u *in vivo* modelima, pa se sve više koriste *in vitro* modeli kako bi se analizirao uticaj matriksa hrane i efekat simuliranih gastrointestinalnih uslova na biodostupnost fenolnih jedinjenja (Thakur et al., 2020).

Kod *in vitro* modela, biodostupnost fenolnih jedinjenja najviše zavisi od karakteristika matriksa sirovine (voća ili povrća) i hrane, od fizioloških uslova koji se sreću u različitim fazama digestije (uključujući koncentraciju enzima i pH) i fizičko-hemijskih svojstava fenolnih molekula. Hidrofilno/lipofilna ravnoteža je ključna u solubilizaciji hidrofilnih fenolnih jedinjenja u vodenoj fazi intestinalnog digesta i restruktuiranju lipofilnih fenolnih jedinjenja u fazu mešane micele (Marie et al., 2014). Interakcije između matriksa hrane i fenolnih jedinjenja tokom *in vitro* digestije su puno proučavane u protekloj deceniji i detaljno su opisane (Jakobek, 2015). Na biodostupnost fenolnih jedinjenja mogu uticati skoro sve glavne komponente hrane, kao što su proteini, ugljeni hidrati, lipidi (Jakobek, 2015; Ozdal et al., 2013) ili vlakna (González-Aguilar et al., 2017; Raquel Lucas-González et al., 2018). Pokazano je da struktura, sastav matriksa hrane i efekat kodigestije fenolnih jedinjenja sa različitim komponentama hrane utiču na njihovu biodostupnost, digestibilnost i antioksidativnu aktivnost (Pineda-Vadillo et al., 2016; Wang et al., 2017). Na primer, matriks hrane koji je bogat proteinima ili ugljenim hidratima može potencijalno uticati na zaštitu procijanidina, pri čemu se poboljšava njihovo iskorišćenje i funkcionalnost (Jakobek, 2015). Povećanje biodostupnosti fenolnih jedinjenja se takođe može postići njihovom inkapsulacijom u odgovarajuće nosače koji su rezistentni

(otporni) na gastrointestinalne uslove, koji kontrolisano oslobađaju fenolna jedinjenja na ciljanim mestima i poboljšavaju njihovu absorpciju (Grgić et al., 2020). Tokom *in vitro* digestije antocijani i/ili procijanidini lako polimerizuju ili reaguju sa enzimima i komponentama digestivnog koktela, što takođe utiče na njihovu biodostupnost i ograničava iskorišćenje (Cirkovic Velickovic & Stanic-Vucinic, 2018; F. Han et al., 2019; Podsędek et al., 2014; Wojtunik-Kulesza et al., 2020).

Većina fenolnih jedinjenja (sa nekoliko izuzetaka), smatra se umereno do visoko rastvornim u vodi. Stoga biodostupnost ne zavisi samo od micelarizacije, već prevenstveno zavisi od oslobađanja iz matriksa i solubilizacije fenolnih jedinjenja u vodenoj fazi (Marie et al., 2014). Za efikasnu mecelarizaciju lipofilnih fenolnih jedinjenja je neophodno prisustvo žučnih soli i enzima pankreasa (Marie et al., 2014). Fenolna jedinjenja koja se teško oslobađaju iz matriksa (pro(anto)cijanidini) ili lako degradiraju tokom digestije (antocijani) često imaju malu biodostupnost i smanjena funkcionalna svojstva. U intestinalnoj fazi, biodostupnost i stabilnost fenolnih jedinjenja uglavnom zavisi od pH sredine (Braga et al., 2018). Čisti standardi kofeinske kiseline, galne kiseline, katehina, kvercetina i resveratrola su pokazali stabilnost u gastričnim uslovima, dok se nakon intestinalne digetije u umereno alkalnoj sredini njihov sadržaj smanjio redom za 24,9; 43,3; 7,2; 5,8; i 69,5% u odnosu na sadržaj u polaznom rastvoru (Tagliazucchi et al., 2010). Neke studije su pokazale značajne gubitke katehina nakon *in vitro* digestije, što može biti posledica njihove interakcije sa digestivnim enzima, koji ga „maskiraju“ i čine teško detektibilnim (Bermúdez-Soto et al., 2007; Laurent et al., 2007). Kvantifikacija antocijana nakon *in vitro* digestije je često komplikovana upravo zbog pH zavisne ravnoteže njihovih strukturnih oblika i kopigmentacije. Elagitanini su takođe osetljivi na uticaj kisele ili bazne sredine, jer mogu postepeno da hidrolizuju, daju heksahidroksidifensku kiselinu koja prelazi u elaginsku kiselinu (Marie et al., 2014). U analizi stabilnosti i potencijalnih funkcionalnih svojstva fenolnih jedinjenja nakon *in vitro* digestije najčešće se koriste hromatografske tehnike i *in vitro* screning antioksidativni testovi (Raquel Lucas-González et al., 2018). Treba napomenuti da je antioksidativna aktivnost takođe pH zavisna, zbog deprotonovanja hidroksilnih grupa prisutnih na aromatičnim prstenovima fenolnih jedinjenja što može povećati ili smanjiti antioksidativni kapacitet (Tagliazucchi et al., 2010).

2.6.2. In vitro digestija grožđa, vina, komine, pokožice, semenke, šepurine i/ili njihovih fenolnih ekstrakata

Biodostupnost ukupnih fenolnih jedinjenja, određenih klasa fenolnih jedinjenja ili dominantnih fenolnih komponenti nakon *in vitro* gastrične, intestinalne i „*colon*“ digestije grožđa, vina, komine, pokožice, semenke, šepurine ili njihovih ekstrakata je sumirana u Tabeli 2.3. Na *in vitro* biodostupnost fenolnih jedinjenja iz čvrstih matriksa grožđa, komine i njihovih konstituenata pre svega utiče sastav matriksa i brzina oslobađanja fenolnih jedinjenja tokom digestije. Kompleksni matriksi grožđa, komine i njenih konstituenata sadrže dijetna vlakna, proteine i lipide koji mogu da vezuju fenolna jedinjenja i moduliraju njihovu biodostupnost (Raquel Lucas-González et al., 2018). Dominantno prisutna dijetna vlakna efikasno interaguju sa hidroksilnim grupama fenolnih jedinjenja, što smanjuje prisustvo ovih jedinjenja u gastrointestinalnom koktelu, smanjuje njihovu biodostupnost i antioksidativni potencijal (Jakobek & Matić, 2019). Samo fenolna jedinjenja koja se oslobađaju u intestinalnom traktu mogu biti potencijalno dostupna u tankom crevu. U *in vitro* oralnoj fazi se često oslobađa samo mali deo fenolnih jedinjenja, koja se zadržavaju u strukturi bobice, pokožice ili semenke. Fenolna jedinjenja se iz čvrstih matriksa intenzivnije oslobađaju tokom *in vitro* gastrične i intestinalne digestije kao posledica različitih pH uslova, ili čak u „*colon* fazi“ zbog delovanja mikororganizama koji razgrađuju biljni matriks (Tagliazucchi et al., 2010). Sa druge strane, biodostupnost fenolnih jedinjenja tokom digestije vina ili ekstrakata grožđa/komine direktno zavisi od pH uslova u gastrointestinalnoj fazi, kao i sposobnosti fenolnih jedinjenja da interaguju sa enzimima i komponentama digestivnog koktela. Pokazano je da fenolna jedinjenja iz ekstrakta komine grožđa imaju bolju gastričnu stabilnost i veću biodostupnost nakon intestinalne faze, u poređenju sa fenolnim jedinjenjima iz brašna komine (Beres et al., 2019). Nekoliko studija je pokazalo povećan sadržaj ukupnih fenolnih kiselina, flavonola, flavan-3-ola ili specifičnih fenolnih

jedinjenja kao što su katehin, ekipaktehin ili neki procijanidini, nakon gastrične digestije grožđa, vina, grožđanog sedimenta, ekstrakta komine, semenke, pokožice i šepurine, u odnosu na nedigerirane uzorke (Chen et al., 2016; da Silva Haas et al., 2019; José Jara-Palacios et al., 2018; Laurent et al., 2007; Lingua et al., 2018). Ovo povećanje sadržaja fenolnih jedinjenja u gastričnoj fazi se pripisuje povećanom oslobađanju fenolnih jedinjenja iz matriksa, čemu verovatno doprinosi „kisela“ sredina i delovanje digestivnih enzima (Chen et al., 2016). Na kraju intestinalne faze, biodostupnost za većinu fenolnih jedinjenja je smanjena. Sve studije na model uzorcima kao što su grožđe, komina, semenka ili pokožica, pokazuju smanjenu biodostupnost flavonola (kvercetina, kampferola, izoramnetina, miricetina, siringetina, laricitrina i njihovih glikozida) i fenolnih kiselina (Garbetta et al., 2018; José Jara-Palacios et al., 2018; Lingua et al., 2018; Wang et al., 2017). Antocijani su u većini slučajeva stabilni u gastričnoj fazi, jer se u uslovima niske pH nalaze u obliku crvenog flavilium jona (da Silva Haas et al., 2019). Međutim, u intestinalnoj fazi, usled izmenjenih pH uslova, antocijani prelaze u bezbojni karbinol oblik ili podležu biokonverziji, što ograničava njihovu detekciju i može doprineti pogrešnoj proceni njihove biodostupnosti (Braga et al., 2018). Niska biodostupnost ukupnih antocijana je potvrđena nakon intestinalne digestije grožđa (Lingua et al., 2018; Tagliazucchi et al., 2010), vina (McDougall et al., 2005), komine (Haminiuk et al., 2017; Wang et al., 2017), i liofilisanog sedimenta soka od grožđa (da Silva Haas et al., 2019). Niska biodostupnost je potvrđena i na dominantno detektovanim pojedinačnim antocijanima grožđa nakon intestinalne digestije. Preciznije, potvrđena biodostupnost za peonidin-3-*O*-glukozid, malvidin-3-*O*-glukozid i malvidin-3-acetilglukozid, je bila redom: 25,6%, 9,4% i 8,7% (Lingua et al., 2018).

Smanjen sadržaj katehina i epikatehina nakon *in vitro* intestinalne digestije može biti zbog smanjene stabilnosti ovih jedinjenja u alkalnim uslovima, njihove tendenciji da se oksidišu, polimerizuju ili zbog sposobnosti da interaguju sa digestivnim enzimima (Chen et al., 2016; Garbetta et al., 2018; Laurent et al., 2007; Lingua et al., 2019). Ograničena biodostupnost procijanidina je zbog njihove velike molekulske mase i smanjene rastvorljivosti u digestivnoj tečnosti (Chen et al., 2016). Međutim, suprotno predhodnim rezultatima, José Jara-Palacios et al. (2018), su prijavili značajno povećanje u sadržaju protokatehinske kiseline, katehina, epikatehina, kao i procijanidin B1, B2 i njihovog galata, nakon intestinalne digestije. Ovo povećanje monomernih i dimernih flavan-3-ola objašnjavaju kao posledicu degradacije trimer i tetramer procijanidina koji nisu detektovani na kraju digestije. Pored navedenog, Ferreyra, Torres-Palazzolo, et al. (2021) su potvrdili povećan sadržaj Ɛ-viniferina nakon digestije šepurine grožđa, što može biti povezano sa depolimerizacijom oligomernih stilbenoida. Međutim, ponašanje fenolnih jedinjenja u simuliranim *in vitro* gastrointestinalnim uslovima još uvek nije razjašnjeno i zahteva dodatna istraživanja na različitim model sistemima. Samo nekoliko studija analizira biodostupnost fenolnih jedinjenja iz semenke i pokožice grožđa, bazirajući se na COST INFOGEST protokolu *in vitro* digestije (Gomes et al., 2019; José Jara-Palacios et al., 2018). Nedostaju detaljni profili fenolnih jedinjenja, koji bi doveli do bolje interpretacije rezultata. Digestija fenolnog ekstrakta semenke Prokupca (bogata u sadržaju flavan-3-ola i procijanidina) sa i bez matriksa, kao i detaljna karakterizacija pojedinačnih fenolnih jedinjenja, prvenstveno flavan-3-ola i procijanidina, do sada nije rađena, a može značajno doprineti u razumevanju biodostupnosti ovih jedinjenja i njihovog ponašanja u uslovima simulirane gastrointestinalne digestije.

Tabela 2.3. Biodostupnost fenolnih jedinjenja nakon *in vitro* gastrične, intestinalne i „*colon*“ digestije grožđa, vina, komine, pokožice, semenke, šepurine ili njihovih ekstrakata

Proizvod	***Fenolna jedinjenja***	***Gastrična faza GF (uslovi)***	***Biodostupnost GF (%)***	***Intestinalna faza IF(uslovi)***	***Biodostupnost IF (%)*** *(u odnosu na početnu količinu/uzorak)*	***Biodostupnost "colon" faza (%)***	***Zapažanja/napomene***	***Reference***
"Red Globe" grožđe (ceo grozd)	[1]Ukupna fenolna jedinjenja [1]Ukupni flavonoidi [1]Ukupni antocijani	1. Pepsin (300 U/mL) 2. T=37°C; pH 2,0; τ=2h	60,63% 48,19% 35,71%	1. Pankreatin (0,8 g/L); žučne soli (25 mg/mL) 2. T=37°C; pH 7,5; τ=2h 3. Digesta (centrifugiranje)	62,38% 56,07% 7,63%	/	Antioksidativna svojstva digeriranog uzorka (tokom IF) 1. $ABTS^{\bullet+}$ ↑ 2. FRAP ↑	(Tagliazucchi et al., 2010)
Ekstrakt semenke grožđa	[2]Katehin [2]Epikatehin [2]Procijanidin B2 [2]Procijanidin B3	1. Pepsin (800-1000 U/mg proteina) 2. T=37°C; pH 2,0; τ=1h; 55 obrtaja/min	98,3% 96,6% 109,3% 124,9%	1. Pankreatin (2 g/L); ekstrakt žučne soli (25 mg/mL) 2. prisustvo/odsustvo Caco-2 ćelija 3. T=37°C; pH 7,0; τ=2h	Odsustvo/prisustvo Caco-2 ćelija (ekstrakt) 56,1/n.d % 14,7/n.d % n.d/n.d n.d/n.d	/	Iskorišćenje katehina nakon intestinalne digestije od ~59% se povećava na oko 98%, nakon ekstrakcije acetonitrilom koji "demaskira" katehin vezan za digestivne enzime	(Laurent et al., 2007)
Crveno vino	[2]Ukupna fenolna jedinjenja [2]Ukupni antocijani [2]Malvidin-3-O-glukozid [2]Vitisin A malvidin-3-O-glukozid [2]Vitisin A, malvidin-3-O-acetil glukozid	1. Pepsin (315 U/mL) 2. T=37°C; pH 1,7; τ=2h; 100rpm	66,4% 99,1% / / /	1. Pankreatin (4 mg/mL); žučne soli (25 mg/mL) 2. T=37°C; pH 7,5; τ=2h 3. Digesta (dijaliza)	Posle dijalize (IN) 7,2% 3,7% 0,2% 9,1% 16,4%	39,7% 34,1% 0,9% 27,8% 58,5%	/	(McDougall et al., 2005)
Komina grožđa (brašno i ekstrakt)	[1]Ukupna fenolna jedinjenja	1. "*porcine*" pepsin 2. T=37°C; pH 2,0; τ=2h 3. Digesta (filtracija; 5kDa membrane)	Retentat/permeat (mg/g) 0,82/2,86% (brašno) 58,22/35,23% (ekstrakt)	1. "*porcine*" pankreatin 2. T=37°C; pH 7,0; τ=2h 3. Digesta (filtracija; 5kDa membrane)	Retentat/permeat (mg/g) 24,16/5,76% (brašno) 68,32/4,21% (ekstrakt)	/	Antioksidativna svojsta digeste (u odnosu na polazni uzorak) 1. TEAC (retentan/permeat) ↑ 2. ORAC (retentat/permeat) ↑ **COST INFOGEST digestija**	(Beres et al., 2019)
Sok grožđa (*Vitis vinifera* L.)	[1]Ukupna fenolna jedinjenja	1. pepsin (pepsin/sok; 1:10 w/w) 2. T=37°C; pH 2,0; τ=1h	/	1. Tripsin (tripsin/sok; 1:10 w/w) 2. T=37°C; pH 6,0; τ=2h 3. Digesta (centrifugiranje)	Posle intestinalne digestije sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je duplo veći	/	Antioksidativna svojsta digeste (u odnosu na polazni uzorak) 1. FRAP ↑ 2. α-glukozidaza inhibiciona aktivnost ↑ 3. α-amilaza inhibiciona aktivnost (nema značajne razlike)	(He et al., 2017)
Voćni miks (sa udelom koncetrata grožđa Airen sorte)	[1]Ukupna fenolna jedinjenja	1. pepsin (0,02g/g uzorka) 2. T=37°C; pH 2,0; τ=2h, 120 obrtaja/min	/	1. Pankreatin (0,005g/g uzorka); žučne soli (0,03g/g uzorka) 2. T=37°C; pH 6,5-7,2; τ=2h 3. Digesta (centrifugiranje)	90,26% (voćni sok) 91,51% (voćni sok+Fe) 76,52% (voćni sok+Zn) 76,52%(voćni sok+Fe+Zn)		Antioksidativna svojstva digeste (u odnosu na polazni uzorak) 1. ORAC ↑ (za sve uzorke) 2. $ABTS^{\bullet+}$ ↑ (za sve uzorke)	(Cilla et al., 2011)
Komina (Merlot); liofilisani ekstrakt	[2]Ukupna fenolna jedinjenja [2]Ukupne derivati galne kiseline [2]Ukupni flavan-3-oli i procijanidini [2]Katehin/epikatehin [2]Ukupni flavonoli [2]Ukupni antocijani	1. pepsin (0,32g/100mL) 2. T=37°C; pH 1,2; τ=2h, 150rpm	/	1. Pankreatin (0,15g/100mL); žučne soli (0,9/100mL) 2. T=37°C; pH 6,0; τ=1h; 150rpm	12,85% 1,47% 12,1% 24,34/23,69% 15,46% 16,03%	12,88% 1,49% 12,35% 19,80/20,96% 14,80% 15,16%	Funkcionalna svojsta posle *colon* fermentacije (u odnosu na polazni uzorak) 1. $DPPH^{\bullet}$ ↓ 2. Redukujuća svojstva↑ 3. β-karoten "*bleaching*" inhibicija↓ 4. Citotoksična svojstva (MCF-7; NCI-H460; HepG2) ↑	(Corrêa et al., 2017)

	[2]Peonidin/malvidin-3-O-glukozid				14,59/9,98%	13,89/9,1%	5. Antimikrobna svojtva ↓ ili nema značajne razlike	
Grožđe Vino (Syrah)	[2]Ukupna fenolna jedinjenja [2]Ukupne fenolne kiseline [2]Ukupni flavonoli [2]Ukupni flavan-3-oli i procijanidini [2]Katehin [2]Epikatehin [2]Ukupni antocijani [2]Peonidin-3-glukozid [2]Malvidin-3-glukozid [2]Malvidin-3-acetil-glukozid	1. pepsin 450 U/g(mL) (40mg/mL) 2. T=37°C; pH 2,0; τ=2h	Grožđe/vino 68,55/127,47% 80,2/143,11% 73,11/129,65% 138,6/179,66% 325,5/160,42% 379,9/246,31% 45,07/100,82 31,6/125,67% 55,5/116,32% 56,36/61,72%	1. Pankreatin (1,2mg/g(mL)); žučne soli (5,6mg/g(mL)) 2. T=37°C; pH 7,5; τ=2h 3. Digesta (dijaliza)	Grožđe Ne-D(D)/ Vino Ne-D(D) 4,71(7,94)/6,31(4,82)% 24,7(60,2)/13,5(4,4)% 1,69(4,15)/3,35(2,78)% 5,76(27,7)/15,4(16,3)% 18,7(87,6)/17,4(21,6)% 12,7(62,9)/18,9(14,1)% 9,84(10,2)/6,9(6,13)% 25,6(25,7)/15,1(15,5)% 9,2(,9,4)/7,2(4,8)% 9,13(8,75)/8,4(6,9)%	/	Antioksidativna svojstva D/Ne-D frakcije posle intestinalne digestije grožđa/vina (u odnosu na polazni uzorak) 1. $ABTS^{\bullet+}$ ↓ 2. FRAP ↓ 3. $DPPH^{\bullet}$ ↓ **COST INFOGEST digestija**	(Lingua et al., 2018)
Ekstrat semenke i pokožice (sirov i prečišćen)	[2]Proantocijanidini (procena na osnovu stepena polimerizacije proantocijanidina (mDP))	1. Pepsin (315 U/mL) 2. T=37°C; pH 1,7; τ=2h; 100rpm	mDP ekstrakt stabilni 1. mDP 6 (sirovi ekstrakti) 2. mDP 10 (prečišćeni ekstrakti) 3. mDP ekstrakata pokožice povećani	1. Pankreatin (4 mg/mL); žučne soli (25 mg/mL) 2. T=37°C; pH /; τ=2h 3. Digesta (dijaliza; membrana 12kDa)	Proantocijanidini u ekstraktima semenke i pokožice u velikoj meri degradirani (do 80%) (ekstrakti semenke su otporniji)	/	ACE inhibitorna aktivnost posle intestinalne i colon digestije 1. sirovi ekstrakti semenke i pokožice imaju očuvanu aktivnost 2. prečišćeni ekstrakti semenke i pokožice posle colon faze nisu imali sposobnost ACE-inhibicije	(Fernández & Labra, 2013)
Grožđe Semenka Pulpa Pokožica (Bordo (B) i Niagara (N))	[1]Ukupna fenolna jedinjenja	1. Pepsin (2000 U/mL) 2. T=37°C; pH 3,0; τ=2h	/	1. Pankreatin (800 U/mL); žučne soli (25 mg/mL) 2. T=37°C; pH 7,0; τ=2h 3. Digesta (centrifugiranje)	Biodostupnost u odnosu na početni uzorak 1. Grožđe N (n.r.); B ↑ 2. Pokožica N (n.r.); B↑ 3. Pulpa N↑; B↑ 4. Semenka N (n.r.); B↑	/	Antioksidativna svojstva digeste (u odnosu na polazni uzorak) 1. grožđe ↑; pokožica ↓; pulpa ↑; semenka (n.r.) (Niagara) 2. grožđe ↑; pokožica ↑; pulpa ↑; semenka ↑ (Bordo) **COST INFOGEST digestija**	(Gomes et al., 2019)
Grožđe i vino (miks dve sorte Chardonay i Viognier)	[1]Ukupna fenolna jedinjenja [2]Ukupna fenolna jedinjenja [2]Katehin	1. Pepsin (450 U/mL) 2. T=37°C; pH 2,0; τ=2h	MIKS grožđe/vino **37/74%** / /	1. Pankreatin (1,2mg/g(mL)); žučne soli (5,6 mg/g(mL)) 2. T=37°C; pH 7,5; τ=2h 3. Digesta (dijaliza)	MIKS grožđe Ne-D(D) / vino Ne-D(D) 13(18)/34(33)% 1,60(3,85)/40,9(30,3)% 0 (0)/10,25 (0)%	/	Antioksidativna svojstva D/Ne-D frakcije posle intestinalne digestije grožđa/vina (u odnosu na polazni uzorak) 1. $ABTS^{\bullet+}$ ↓ 2. FRAP ↓ 3. $DPPH^{\bullet}$ ↓	(Lingua et al., 2019)
Ekstrakt pokožice	[2]Ukupna fenolna jedinjenja [2]Procijanidin B1 [2]Katehin [2]Kvercetin-3-glukozid [2]Kvercetin-3-glukuronid [2]Kaftarna kiselina [2]Kutarna kiselina	1. Pepsin (40mg/mL) 2. T=37°C; pH 2,5; τ=1h	/	1. "porcine"lipase (2mg/mL); pankreatin (4mg/mL); žučne soli (24 mg/mL) 2. T=37°C; pH 5,3-6,5; τ=2h 3. Digesta (centrifugiranje)	65,59% 47,31% 53,82% 43,31% 51,79% 80,21% 66,77%	/	Ekstrakt pokožice posle *in vitro* digestije pokazuje smanjen uticaj u modulaciji ROS i GSH procenjen na HT-29 intestinalnim ćelijama	(Garbetta et al., 2018)
Vino	[2]*Trans*-resveratrol [2]Hlorogenska kiselina [2]Kofeinska kiselina [2]*p*-kumarna kiselina [2]3-(4-hidroksifenil) propionska kiselina	1. Pepsin (40mg/mL) 2. T=37°C; pH 2,0; τ=2h	Belo/crveno vino 80,5/120,2% 40/81,8% 122,3/79,1% 87,8/96,8% n.d/n.d	1. Pankreatin (0,02g); žučne soli (0,12g) 2. T=37°C; pH 6,0-7,4; τ=2,5h 3. "*colon*" faza (dodatak mikroflore)	Belo/crveno vino 74,4/117,9% 23,1/68,9% 133,9/65,6% 82,0/91,8% n.d./100% (13,23µg/mL)	Belo/crveno vino 67,2/56,86% 12,3/4,19% 11,6/128,1% 78,02/86,3% n.d./100% (9,80µg/mL)	Antioksidativna aktivnost posle intestinalne digestije i "*colon*" fermentacije (u odnosu na polazni uzorak) 1. $ABTS^{\bullet+}$ ↓	(Gumienna et al., 2011)
Liofilisan sediment iz soka od grožđa		1. Pepsin (2000 U/mL)	B/I sediment	1. Pankreatin (800 U/mL); žučne soli (10mol/L)	Bordo Ne-D(D) /Isabel Ne-D(D)	/	Antioksidativna svojstva D/Ne-D frakcije posle intestinalne digestije sedimenta grožđa	(da Silva Haas et al., 2019)

(Isabel (I) i Bordo (B))	[2]Ukupna fenolna jedinjenja [2]Ukupne fenolne kiseline [2]Ukupni flavan-3-oli [2]Katehin [2]Epikatehin [2]Ukupni antocijani [2]Malvidin-3,5-diglukozid	2. T=37°C; pH 3,0; τ=2h	95,3/142,6% 132,2/149,9% 98,7/150% 97,2/135,8% 100/196,9% 84,6/131,7% 86,8/111,1%	2. T=37°C; pH 7,0; τ=2h 3. Digesta (centrifugiranje)	6,7(54,9)/2,54(14,4)% 13,1(71,9)/14,5(65,5)% 6,0(49)/3,0(14,2)% 5,2(49,8)/0,41(2,0)% 7,0(48,1)/11,5(54,5)% 6,5(57,5)/0,2(8,0)% 7,4(59,8)/n.d. (0,1)%		(u odnosu na polazni uzorak) 1. ABTS$^{\bullet+}$ ↓ 2. DPPH$^{\bullet}$ ↓ **COST INFOGEST digestija**	
Vino (Cabernet Sauvignon (CS) i Chardonnay (C))	[2]Ukupna fenolna jedinjenja	1. pepsin (450U/mL) 2. T=37°C; pH 1,2; τ=2h	Crveno/belo vino 118,3/82,8% (niska konz.) 124,1/83,9% (umerena konz.) 131,6/89,8% (prekmerena konz)	1. Pankreatin (4 mg/mL); žučne soli (25 mg/mL) 2. T=37°C; pH 7,5; τ=2h 3. Digesta (dijaliza (pasivna difuzija); membrana 12kDa) 4. "*colon*" fermentacija	Crveno/belo vino 54,0/43,7% (niska konz.) 56,2/43,7% (umerena konz.) 74,0/45,7% (prekmerena konz)	Crveno/belo vino 27,2/20,6% (niska konz.) 30,4/22,3% (umerena konz.) 41,6/25,0% (prekmer. konz)	Funkcionalna svojsta posle *colon* fermentacije (u odnosu na polazni uzorak) 1. α-glukozidaza inhibiciona aktivnost ↓ 2. α-amilaza inhibiciona aktivnost ↓ **COST INFOGEST digestija**	(Sun et al., 2020)
Ekstrakt komine (K), pokožice (Po), šepurine (Pe), ostataka pulpe i semenke (S)	[1]Ukupna fenolna jedinjenja [2]Ukupna fenolna jedinjenja [2]Fenolne kiseline [2]Flavanoli [2]Katehin [2]Epikatehin [2]Flavonoli [2]Kvercetin-3-O-glukozid	1. "*porcine*" pepsin 2. T=37°C; pH 3,0; τ=2h	K/Po/Pe/S 31,3/79,3/93,8/34,6% 128/233/140/123% 118/0/156/99% 125,8/197,8% (S/Pe) 102,8% (S) 30/47/27/0% 40,6% (Pe)	1. Pankreatin (800U/mL); ekstrakt žučnih soli (20 mg) 2. T=37°C; pH 7,5; τ=2h	K/Po/P/S 49,8/101/112,9/38,7% 156,4/58,44/153,5/91,4% 75/355/92/62% 228/0/201/97% 110,3/330,9% (S/Pe) 101,2% (S) 47/72/48/0% 70,1% (Pe)	/	Antioksidativna svojstva K,Pe, Po, S posle intestinalne digestije (u odnosu na polazni uzorak) 1. ORAC↓ 2. DPPH$^{\bullet}$ ↓ **COST INFOGEST digestija**	(José Jara-Palacios et al., 2018)
Loza (cane; L) i šepurina (bunch; Pe) (cv Malbec)	[1]Ukupna fenolna jedinjenja [2]Fenolne kiseline [2]Stilbeni [2]Ɛ-viniferin [2]Katehin [2]Flavonoli	1. "*porcine*" pepsin 2. T=37°C; pH 2,0; τ=1h	L/Pe 58,9/80,4% 124,3/92,8% 44,3/0% 46,6/0% 73,2/88,1% 51,8/79,4%	1. Pankreatin; ekstrakt žučnih soli (20g/L) 2. T=37°C; pH 6,8; τ=2h	L/Pe 73,9/20,3% 87,6/27,2 129,9/51,6% 136,6/51,6% 29,6/12,1% 52,2/61,9%	/	Antioksidativna svojstva loze i šepurine posle intestinalne digestije (u odnosu na polazni uzorak) 1. ORAC: loza ↑ i šepurina (nema razlike) 2. DPPH$^{\bullet}$: loza ↓ i šepurina ↓	(Ferreyra, Torres-Palazzolo, et al., 2021)
Komina (Tempranillo)	[2]Ukupna fenolna jedinjenja [2]Galna kiselina [2]Elaginska kiselina [2]Flavonoli [2]Antocijani	1. "*porcine*" pepsin 2. T=37°C; pH 2,0; τ=2h	96,8% 100,7% 99,3% 88,8% 65,8%	1. Pankreatin; ekstrakt žučnih soli (12mg/mL) 2. T=37°C; pH 7,5; τ=2h 3. Digesta (centrifugiranje)	85,5% 96,4% 86,2% 66,1% 0%	/	Antioksidativna svojstva posle intestinalne digestije komine (u odnosu na polazni uzorak) 1. ABTS$^{\bullet+}$ ↓ 2. FRAP ↓ 3. ORAC ↓	(Wang et al., 2017)
Suvo grožđe (Sultana)	[1]Ukupna fenolna jedinjenja	1. Pepsin 2. T=37°C; pH 1,7; τ=2h; 100rpm	97,88%	1. Pankreatin (4 mg/mL); žučne soli (25 mg/mL) 2. T=37°C; pH 7,0; τ=2h 3. Digesta (dijaliza)	7,86% (D-frakcija) 102,5% (Ne-D frakcija)	/	Antioksidativna svojstva D/Ne-D frakcije posle intestinalne digestije suvog grožđa (u odnosu na polazni uzorak) 1. ABTS$^{\bullet+}$: D ↓ i Ne-D↓ 2. DPPH$^{\bullet}$: D ↓ i Ne-D↑ 3. FRAP: D ↓ i Ne-D↑ 4. CUPRAC: D↓ i Ne-D↑	(Kamiloglu et al., 2014)
Semenka grožđa	[1]Ukupna fenolna jedinjenja [2] Ukupna fenolna jedinjenja [2]Galna kiselina [2]Katehin-hidrat [2]Epikatehin	1. "*porcine*" pepsin 2. T=37°C; pH 2,0; τ=1h; 95rpm	Crvena /bela sorta 140,9/107,4% 25,9/81,8% 65,2/137,4% 29,7/47,2% 31,4/55,8%	1. Pankreatin (4 mg/mL); glikodeoksiholat (0,04g/mL); taurodeoksiholat (0,025g/mL) 2. T=37°C; pH 7,4; τ=2h	Crvena /bela sorta 55,5/107% 33,4/25,5% n.d. 24/0% 11,8/0%	/	Antioksidativna svojstva semenke posle intestinalne digestije (u odnosu na polazni uzorak) 1. ABTS$^{\bullet+}$ ↓ 2. FRAP ↓ 3. DPPH$^{\bullet}$ ↓	(Chen et al., 2016)

[1]Spektrofotometrijski određeni; [2]HPLC kvantifikacija; n.d.-nije detektovan; n.r.-nema značajne razlike; Ne-D-frakcija unutar vreće za dijalizu (dostupna "colon" fazi); D-frakcija koja je potencijalno biodostupna nakon intestinalne digestije.

2.6.3. Uticaj različitih matriksa hrane na biodostupnost fenolnih jedinjenja iz grožđa, vina, komine, pokožice, semenke, šepurine i/ili njihovih fenolnih ekstrakata

In vitro digestija fenolnih jedinjenja uglavnom je ispitivana na matriksima bogatim fenolnim jedinjenjima, kao što su voće, povrće (Dufour et al., 2018) ili esktrakti komine grožđa (Garbetta et al., 2018; José Jara-Palacios et al., 2018; Wang et al., 2017) (poglavlje 2.6.2). Tek nekoliko studija prati uticaj matriksa hrane na biodostupnost fenolnih jedinjenja (Tabela 2.4). Matriksi hrane bogati u sadržaju proteina, ugljenih hidrata ili lipida pokazuju različite efekte na digestibilnost i biodostupnost fenolnih jedinjenja (Raquel Lucas-González et al., 2018). Stoga, biodostupnost fenolnih jedinjenja u kompleksnim matriksima hrane zavisi od: (1) strukture i rastvorljivosti fenolnih jedinjenja; (2) sastava, teksture, granulacije i digestibilnosti matriksa; (3) interakcije fenolnih jedinjenja sa makrokonstituentima (proteini, ugljeni hidrati i lipidi), njihovim hidrolizatima (peptidima, masnim kiselinama i oligosaharida) i digestivnim enzimima; i (4) sastava digesta (Cirkovic Velickovic & Stanic-Vucinic, 2018; Hiolle et al., 2020; Jakobek, 2015; Jakobek & Matić, 2019; Podsędek et al., 2014; Sęczyk et al., 2021). Fenolna jedinjenja su najčešće povezana sa makromolekulima iz matriksa reverzibilnim interakcijama (hidrofobne interakcije, vodonične veze i Van der Wals-ove interakcije) ili retko kovalentnim vezama koje se mogu javiti u slučaju proteina (Jakobek, 2015; Ozdal et al., 2018). Ove interakcije utiču na poboljšanu oksidativnu stabilnost fenolnih jedinjenja tokom gastrointestinalne digestije. Međutim u većini slučajeva prisustvo matriksa ograničava oslobađanje fenolnih jedinjenja u digestivnom traktu, što smanjuje njihovu biodostupnost i sposobnost da ispolje biološke efekte (Jakobek, 2015; Sęczyk et al., 2021). Sengul et al. (2014), su publikovali zanimljivu model studiju koja pokazuje kako matriksi različite hrane i pojedinačne komponente hrane utiču na biodostupnost fenolnih jedinjenja, prvenstveno antocijana. Analiza pojedinačnih komponenti je pokazala da proteini (sojini protein, kazein, proteini mesa) doprinose smanjenju ukupnih antocijana, posmatrano u odnosu na sadržaj ukupnih antocijana u frakciji dobijenoj nakon gastrične faze. Sa druge strane, neki ugljeni hidrati i masne kiseline (stearinska i linolenska kiselina) su povećali ili očuvali sadržaj ukupnih antocijana u rastvorljivoj frakciji nakon *in vitro* intestinalne digestije. Kombinacija fenolnih jedinjenja sa vlaknima takođe utiču na biodostupnost fenolnih jedinjenja tokom *in vitro* digestije. Fenolna jedinjenja se vezuju za površinu vlakana i delimično oslobađaju u gastričnoj i intestinalnoj fazi. Neapsorbovana fenolna jedinjenja ostaju zadržana na površini vlakana koji ih dalje „nose“ do „*colon*“ faze gde se oslobađaju delovanjem bakterija (Jakobek & Matić, 2019). Tek nekoliko studija ispituje uticaj inulina na biodostupnost fenolnih jedinjenja. Dodatak inulina u pire kupine (Tomas et al., 2020) ili paradajz sos (Tomas et al., 2017), je uticao na smanjenu biodostupnost fenolnih jedinjenja i produženo oslobađanje fenolnih kiselina, lignana i fenolnih jedinjenja male molekulske mase u „*colon*“ fazi. Dalje, inulin-„jussara“ ekstrakt mikrokapsule su pokazale nisku biodostupnost antocijana nakon *in vitro* intestinalne digestije, jer su većina antocijana zadržani u nerastvornoj frakciji (Bernardes et al., 2019). Ponašanje fenolnih jedinjenja iz ekstrakta semenke grožđa u modelu sa inulinom ili još kompleksnijim matriksom inulin-proteini mleka nisu do sada analizirana.

Samo nekoliko studija sa bavi matriksima hrane koje nisu prirodno bogati fenolnim jedinjenjima, kao što su mlečni proizvodi, proizvodi od jaja, pekarski proizvodi ili formulacija ovsene kaše i mleka (Cebeci & Şahin-Yeşilçubuk, 2014; Karakaya et al., 2016; Pineda-Vadillo et al., 2016; Pineda-Vadillo et al., 2017; Sengul et al., 2014). Pokazano je da kompleksni matriksi hrane kao što su mleko, hleb i jogurt utiču na smanjenje ukupnih fenolnih jedinjenja i antocijana nakon *in vitro* intestinalne digestije, i to u obe frakcije (dijalizabilna/nedijalizabilna frakcija)(Sengul et al., 2014). Dodavanje ekstrakta grožđa u matrikse hrane na bazi mleka i jaja u velikoj meri utiče na oslobađanje i rastvorljivost antocijana i procijanidina tokom digestije, prvenstveno u čvrstim matriksima (palačinke i omlet) (Pineda-Vadillo et al., 2016). Ista sudija je pokazala da su obogaćeni matriksi imali povećanu antioksidativnu aktivnost na kraju intestinalne digestije, čemu pored oslobođenih fenolnih jedinjenja doprinose i hidrolizati matriksa hrane.

Tabela 2.4. Uticaj različitih matriksa na biodostupnost i antioksidativna svojstva fenolnih komponenti grožđa, komine i njihovih konstituenata nakon *in vitro* gastrointestinalne digestije

Brašno/ekstrakt	***Matriks***	***Fenolna jedinjenja (efekat matriksa u odnosu na kontrolni uzorak brašna/ekstrakta; posmatrano nakon intestinalne digestije)***	***Antioksidativna svojstva nakon intestinalne digestije***	***Reference***
Ekstrakt grožđa (Eminol®)	Kontrola (ekstrakt+voda) 1. Milkšejk (MŠ) 2. Kremasti desert (KD) 3. Palačinke (P) 4. Omlet (O)	Ukupna biodostupnost (biodostupna fenolna jedinjenja u digestibilnoj i nedigestibilnoj frakciji) [2]Ukupni antocijani (MŠ ↑; KD n.u.; P ↑; O ↑) [2]Ukupni pro(anto)cijanidini (MŠ ↑; KD ↑; P ↓; O ↑) [1]Ukupna fenolna jedinjenja (MŠ ↓; KD ↓; P ↓; O n.u.)	(posmatrano u odnosu na isti uzorak nakon oralne faze) 1. FRAP Digestibilna frakcija (MŠ ↓; KD ↓; P ↑; O ↑) Nedigestibilna frakcija (MŠ ↑; KD ↑; P ↓; O ↑) Zbir frakcija (MŠ n.r.; KD n.r.; P ↑; O ↑) 2. ORAC Digestibilna frakcija (MŠ ↑; KD ↑; P ↑; O ↑) Nedigestibilna frakcija (MŠ ↑; KD ↑; P ↑; O ↑) Zbir frakcija (MŠ ↑; KD ↑; P ↑; O ↑)	(Pineda-Vadillo et al., 2016)
Ekstrakt grožđa (Eminol®)	Kontrola (ekstrakt+voda) 1. Milkšejk (MŠ) 2. Kremasti desert (KD) 3. Palačinke (P) 4. Omlet (O)	Ukupna biodostupnost (biodostupna fenolna jedinjenja u digestibilnoj i nedigestibilnoj frakciji) [2]Delfinidin-3-*O*-glukozid (MŠ ↑; KD n.u.; P ↑; O ↑) [2]Cijanidin-3-*O*-glukozid (MŠ↑; KD n.u.; P ↑; O ↑) [2]Petunidin-3-*O*-glukozid (MŠ ↑; KD ↑; P ↑; O ↑) [2]Peonidin-3-*O*-glukozid (MŠ ↑; KD ↑; P ↑; O ↑) [2]Malvidin-3-*O*-glukozid (MŠ ↑; KD ↑; P ↑; O ↑) [2]Metilpiranomalvidin-3-*O*-glukozid (MŠ ↑; KD ↑; P ↑; O↑) [2]Peonidin-3-*O*-acetilglukozid (MŠ ↑; KD ↑; P ↑; O ↑) [2]Delfinidin-3-*O*-kumaroilglukozid (n.d.) [2]Malvidin-3-*O*-acetilglukozid (MŠ ↑; KD ↑; P ↑; O ↑) [2]Petunidin-3-*O*-kumaroilglukozid (MŠ n.u.; KD n.u.; P↑; O↑) [2]Peonidin-3-*O*-kumaroilglukozid (MŠ n.u.; KD n.u.; P ↑; O ↑) [2]Malvidin-3-*O*-kumaroilglukozid (MŠ n.u.; KD n.u.; P ↑; O ↑)	/	(Pineda-Vadillo et al., 2017)
Ekstrakt grožđa (Eminol®)	1. Biskviti 2. Lepinje	Biodostupnost (računata u odnosu na isti uzorak pre digestije) 1. Biskviti+antocijani (57,26%) 2. Biskvit+antocijani+dokosoheksanska kiselina (8,83%) 3. Lepinja-antocijani (57,30%) 4. Lepinja+antocijani+dokosoheksanska kiselina (n.d.)	/	(Karakaya et al., 2016)
Crveno vino (CV) i belo vino (BV)	Juvitana infant formula (20% ćureće meso; 25% kukuruzna pasta; 10% krompir pasta; 5% brašno pirinča; 0,1% NaCl; voda)	[1]Ukupna fenolna jedinjenja **NKV** (CV n.u.; BV n.u.); **UKV** (CV n.u.; BV n.u.); **VKV** (CV ↓; BV n.u.) [1]Ukupni antocijani **NKV** (CV n.u.); UKV (CV n.u.); **VKV** (CV↑) [2]Ukupni flavan-3-oli **NKV** (CV ↑; BV n.u.); **UKV** (CV n.u.; BV n.u.); **VKV** (CV n.u.; BV n.u.) [2]Ukupne fenolne kiseline **NKV** (CV n.u.; BV n.u.); **UKV** (CV ↓; BV n.u.); **VKV** (CV ↑; BV n.u.)	(posmatrano u odnosu na uzorak vina bez matriksa; nakon intestinalne digestije) 1. DPPH$^{\bullet}$ **NKV** (CV n.r.; BV ↑); **UKV** (CV n.r.; BV n.r.); **VKV** (CV ↑; BV n.r.) 2. ABTS$^{\bullet+}$ **NKV** (CV ↓; BV n.r.); **UKV** (CV n.r.; BV ↑); **VKV** (CV ↑; BV n.r.) 3. ORAC **NKV** (CV ↑; BV ↑); **UKV** (CV ↑; BV ↑); **VKV** (CV ↑; BV n.r.) 4. FRAP **NKV** (CV n.r.; BV n.r.); **UKV** (CV ↑; BV n.r.); **VKV** (CV ↑; BV n.r.)	(Sun et al., 2020)

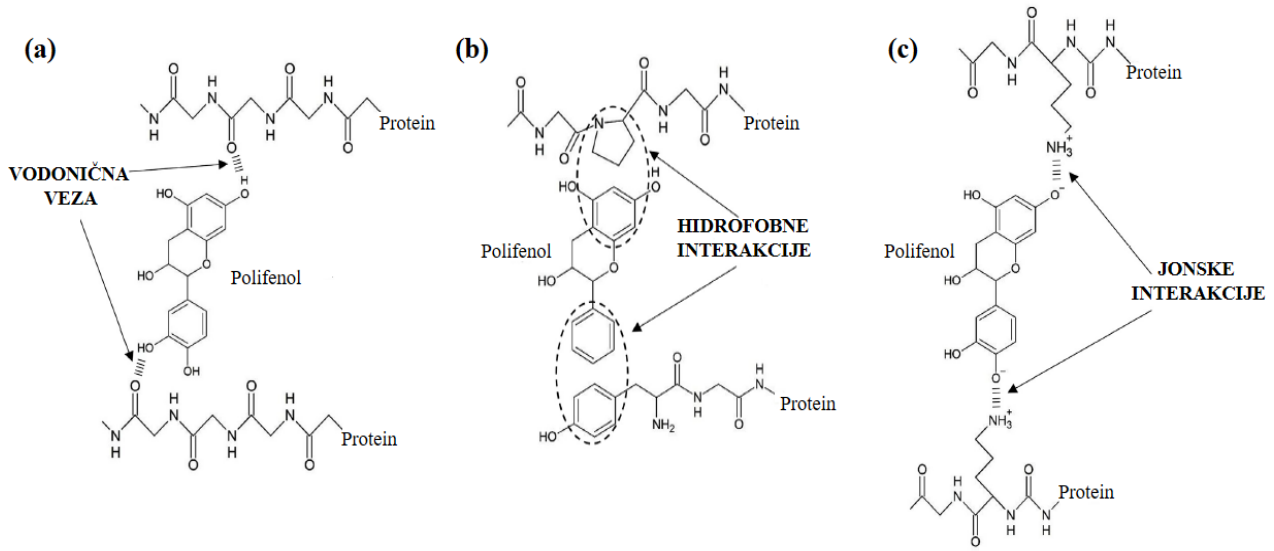
1. Isabel grožđe (IG) 2. Isabel grožđe+brašno komine (IGB)	**Kozije mleko (probiotski jogurt)**	/	(posmatrano u odnosu na isti uzorak pre digestije) *Model digestije sa enzimima* 1. $ABTS^{\cdot+}$ Jogurt+IG ↑; Jogurt+IGB ↑ 2. ORAC Jogurt+IG ↑; Jogurt+IGB ↑	(Silva et al., 2022)
Sok od grožđa	Kravlje mleko 1. Punomasno mleko (PM) 2. Obrano mleko (OM)	[1]Ukupna fenolna jedinjenja (PMS ↑; OMS ↑) [2]Kofeoilvinska kiselina (PMS ↓; OMS ↓) [2]Epikatehin (PMS ↓; OMS ↓) [2]Proantocijanidin (PMS ↑; OMS ↓) [2]Glukozid-protokatehinske kiselina (PMS ↑; OMS ↑)	(posmatrano u odnosu na isti uzorak pre digestije) 1. $ABTS^{\cdot+}$ Punomasno mleko+sok grožđa ↑ (PMS) Obrano mleko+sok grožđa ↑ (OMS)	(He et al., 2016)
Sok od grožđa (Concord sorta)	1. Ultrafiltrirani permeat 2. Kisela surutka 3. Punomasno mleko 4. Obrano mleko	/	(posmatrano u odnosu na isti uzorak pre digestije) 1. FRAP Ultrafirtrirani permeat+sok grožđa (n.r.) Kisela surutka+sok grožđa (n.r.) Punomasno mleko+sok grožđa ↑ Obrano mleko+sok grožđa (n.r.)	(Lamothe et al., 2019)
Voćni napitak (sa udelom koncetrata grožđa Airen sorte) (VN)	Obrano mleko	[1]Ukupna fenolna jedinjenja VN+mleko ↑ VN+Fe+mleko ↑ VN+Zn+mleko (n.u.) VN+Fe+Zn+mleko (n.u.)	(posmatrano u odnosu na isti uzorak pre digestije) VN+mleko (ORAC↑; ABTS↑) VN+Fe+mleko (ORAC↑; ABTS↑) VN+Zn+mleko (ORAC↑; ABTS↑) VN+Fe+Zn+mleko (ORAC↑; ABTS↑)	(Cilla et al., 2011)
Voćni napitak (sa udelom koncetrata grožđa) (VN)	Obrano mleko	***VN+Fe+mleko*** [2]Ukupna fenolna jedinjenja ↓ [2]Derivati hidroksicimetne kiseline ↓ [2]Ukupni flavoni ↓ [2]Ukupni flavan-3-oli ↓ [2]Ukupni flavanoni ↓	/	(Cilla et al., 2009)

[1]Spektrofotometrijski određeni; [2]HPLC kvantifikacija; n.r.-nema značajne razlike u antioksidativnoj aktivnosti; n.d.-nisu detektovani; n.u.-nema uticaja na biodostupnost fenolnih jedinjenja; "↑"-povećana biodostupnost fenolnih jedinjenja/veća antioksidativna aktivnost; "↓"-snižena biodostupnost fenolnih jedinjenja/niža antioksidativna aktivnost; NKV-niska konzumacija vina; UKV-umerena konzumacija vina; VKV-visoka konzumacija vina.

Uključivanje antocijana u matrikse hrane može biti efikasan način njihove zaštite tokom intestinalne digestije ili efikasan metod za ciljanu isporuku antocijana u različitim delovima digestivnog trakta (Pineda-Vadillo et al., 2017). Pekarski proizvodi obogaćeni sa ekstraktom pokožice grožđa su pokazali visoku biodostupnost antocijana na kraju intestinalne digestije, međutim, biodostupnost antocijana je značajno smanjena dodatkom dokozaheksaenske kiseline u formulaciji biskvita i lepinje (Karakaya et al., 2016). Prema pretraženim literaturnim podacima, uticaj kompleksnih matriksa hrane koji uključuju meso i ugljene hidrate na biodostupnost fenolnih jedinjenja tokom *in vitro* digestije je malo pročuvan (Stanisavljević et al., 2015; Sun et al., 2020). Poznato je da su lipidi u mesu veoma podložni peroksidaciji tokom kuvanja mesa i gastrointestinalne digestije, što rezultira stvaranjem proizvoda oksidacije lipida, koji mogu imati toksični i štetni efekat na zdravlje ljudi (Vieira et al., 2017). Pretpostavka je da se učestalost pojave karcinoma i vaskularnih bolesti povezana sa velikom konzumacijom mesa, može smanjiti dodavanjem/primenom antioksidanata u ishrani, prvenstveno kada se zajedno koriste u pripremi ili konzumaciji mesa (Vieira et al., 2017). Stoga, obogaćivanje obroka na bazi mesa sa biljnim fenolnim jedinjenjima, može biti obećavajuća strategija za ublažavanje navedenih zdravstvenih rizika. Stanisavljević et al. (2015) su pokazali da dodatak matriksa (infant formula koja simulira standardni obrok) u sok aronije, smanjuje sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, antioksidativnu aktivnost (DPPH$^{\cdot}$ i FRP) i sadržaj pojedinačnih antocijana tokom *in vitro* digestije. Suprotno prethodnoj studiji, Sun et al. (2020) su koristeći identičan matriks pokazali veću biodostupnost fenolnih jedinjenja iz vina nakon „*colon*“ digestije i bolju biološku aktivnost. Zbog kontradiktornih rezultata i malog broja studija koji se bave ovim problemom, nedostaju dodatna istraživanja kako bi se procenio efekat kompleksnog matriksa na biodostupnost fenolnih jedinjenja.

2.6.4. Interakcije fenolnih jedinjenja sa proteinima

Interakcije fenolnih jedinjenja i proteina su u fokusu istraživanja velikog broja studija, i sumirane su kroz nekoliko preglednih radova (Bandyopadhyay et al., 2012; Jakobek, 2015; Ozdal et al., 2013; Ozdal et al., 2018; Zhang et al., 2021). Između fenolnih jedinjenja i proteina su uglavnom zastupljene hidrofobne interakcije koje su naknadno stabilizovane vodoničnim vezama, ali se takođe dodatno mogu javiti van der Wals-ove i jonske interakcije (Jakobek, 2015) (Slika 2.9).



Slika 2.9. Tipovi interakcija između fenolnih jedinjenja i proteina: (a) vodonična veza; (b) hidrofobne interakcije; i (c) jonske interakcije (preuzeto iz Quan et al. (2019)).

Strukturna fleksibilnost, broj OH grupa i molekulska masa fenolnih jednjenja imaju ključnu ulogu u njihovim interakcijama sa proteinima (Jakobek, 2015). Najčešće su proučavane interakcije između fenolnih jedinjenja čaja, kafe i kakaoa sa proteinima mleka (Bandyopadhyay et al., 2012; Ozdal et al., 2013; Ozdal et al., 2018). Pokazano je da se fenolna jedinjenja čaja (dominiraju flavan-3-oli)

dominantno vezuju sa proteinima mleka, kazeinima ili serum proteinima (β-LG) hidrofobnim interakcijama (Hasni et al., 2011; Kanakis et al., 2011; Yuksel et al., 2010). Pored navedenog, istraživačima su posebno zanimljive interakcije između fenolnih jedinjenja semenki grožđa (procijanidini i tanini) i proteina pljuvačke bogatih prolinom, jer ove interakcije utiču na osećaj trpkosti u ustima (Jakobek, 2015; Ozdal et al., 2018). Pored toga, interakcije fenolnih jedinjenja i proteina mogu uticati na: (1) izmene u strukturi proteina; (2) neto naelektrisanje molekula proteina; (3) biodostupnost određenih aminokiselinskih ostataka (smanjuju); (4) digestibilnost proteina; (5) funkcionalna i tehno-funkcionalna svojstva proteina (modifikuju); (6) aktivnost digestivnih enzima (smanjuju); (7) biodostupnost fenolnih jedinjenja (smanjuju/povećavaju); i (8) antioksidativna i biološka svojstva fenolnih jedinjenja (modifikuju, „maskiraju“) (Cirkovic Velickovic & Stanic-Vucinic, 2018; Jakobek, 2015; Ozdal et al., 2013; Ozdal et al., 2018; Zhang et al., 2021).

2.6.4.1. Uticaj mleka na biodostupnost fenolnih jedinjenja

Struktura mlečnog matriksa je važan faktor koji utiče na digestiju proteina i lipida, kao i na biodostupnost fenolnih jedinjenja. Pokazano je da se tečni i viskozni matriksi kao što su mleko i jogurt, lakše vare i tako doprinose boljoj biodostupnosti fenolnih jedinjenja i pokazuju veću antioksidativnu aktivnost, u poređenju sa sirom koji ima čvrsti matriks (Lamothe et al., 2014). Mleko je najčešće korišćen matriks u analizi *in vitro* biodostupnosti fenolnih jedinjenja iz različitih napitaka/ekstrakata. Pokazano je da punomasno ili obrano mleko utiču na povećanu biodostupnosti ukupnih i/ili dominantnih fenolnih jedinjenja (hlorogenske kiseline i njenih derivata) instant kafe (Qie et al., 2022; Tagliazucchi et al., 2012; Yu et al., 2021), smanjenu biodostupnosti ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida i pojedinačnih fenolnih jedinjenja voćnog soka (Rodríguez-Roque et al., 2015), ili nemaju uticaja na biodostupnist ukupnih i pojedinačnih fenolnih jedinjenja (osim siringinske kiseline) u kodigestiji napitka od cimeta (Helal et al., 2014). Model digestija koji uključuje Caco-2 ćelije je pokazala povećanu intestinalnu permeabilnost monomernih flavan-3-ola čaja kada su u kombinaciji sa mlekom (Xie et al., 2013). Pored navedenog, pokazano je da kazeini (α-CN i β-CN) doprinose stabilnosti antocijana u intestinalnoj fazi i povećavaju njihovu biodostupnost (Lang et al., 2021). Navedene razlike u biodostupnosti fenolnih jedinjenja su zbog proteinskog matriksa, interakcija fenolnih jedinjenja sa proteinima, specifičnih fenolnih jedinjenja u napitku/ekstraktu i stabilnosti oslobođenih fenolnih jedinjenja u intestinalnoj fazi. Prema pretraženim literaturnim podacima, efekat mlečnog matriksa na biodostupnost fenolnih jedinjenja iz ekstrakta komine, pokožice ili semenke grožđa nije do sada ispitivan. U literaturi se mogu naći samo par studija koje prate antioksidativni potencijal formulacija kravljeg mleka sa sokom od grožđa (He et al., 2016; Lamothe et al., 2019; Silva et al., 2022) ili kravljeg mleka sa voćnim napitkom koji uključuje koncentrat grožđa (Cilla et al., 2009; Cilla et al., 2011), nakon intestinalne *in vitro* digestije **(**Tabela 2.4). Međutim, prethodno navedene studije koriste kravlje mleko, dok je biodostupnost fenolnih jedinjenja u prisustvu termički tretiranog kozijeg mleka oskudno proučavana (Kostić et al., 2021). Efekat termički tretiranog kozijeg mleka na biodostupnost fenolnih jedinjenja semenki grožđa nije do sada analiziran.

3. Materijal i metode

3.1. Tehnološki parametri grožđa

Tehnološki parametri su utvrđeni na uzorku od 50 bobica svakog analiziranog grožđa. Ukupni šećeri (mono- i oligosaharidi) su određeni refraktometrom (ATC 0-32 Brix, Huixia Supply Co., Ltd, China). Ukupne kiseline su određene prema AOAC (1999), i izražene kao g ekvivalenti vinske kiseline (VK) po L šire (g VK/L), dok je pH šire (grožđanog soka) određen merenjem na pH-metru (Consort, Belgija).

3.2. Priprema brašna semenki i pokožica izdvojenih iz nefermentisane komine

U okviru prvog dela doktorske disertacije ukupno je ispitivano sedam uzoraka semenki i pokožica koje potiču od različitih internacionalnih i autohtonih sorti grožđa, i to četiri crne sorte: Muscat Hamburg, Prokupac, Merlot, Cabernet Sauvignon; i tri bele sorte: Smederevka, Italijanski Riesling i Tamjanika. Uzorci su dobijeni iz vinarije „Vinska kuća Milinčić“, koja se nalazi u Aleksandrovcu, centru Župskog vinogorija. Prethodno navedene sorte grožđa su brane u tehnološkoj fazi zrelosti, pogodnoj za proizvodnju vina. Eksperimentalni uzorci sveže komine od svih sorti grožđa su prikupljani odmah nakon presovanja i potom sušeni u laboratorijskoj sušnici (Thermo Scientific Haraeus, MA, USA), na 60°C, tokom 72h (konačni sadržaj vlage je bio oko 15%). Nakon sušenja, semenke i pokožice su ručno odvojane, mlevene u malom laboratorijskom mlinu za kafu (Bosch MKM 6003 UC, BSH Hausgeräte GmbH, Mihen, Nemačka) i prosejavane kroz pore sita (model Analysette 3 pro, Fritsch, Idar-Oberstein, Nemačka). Za dalju analizu je odabran propad čije su veličine čestica bile između 0,6mm i 1,12mm. Brašna semenki i pokožica grožđa su odvojeno pakovana u vakum plastične kese i čuvana na -20°C za dalje analize.

Mali deo brašna semenki i pokožica (~1g) je odmeravan u vegeglase i sušen na 105°C, do konstantne mase, kako bi se odredio sadržaj vlage i suva masa uzoraka (SM). Svi spektrofotometrijski i hromatografski rezultati su dalje izraženi na suvu masu uzorka.

3.2.1. Priprema uzoraka brašna semenki/pokožica za gasnu hromatografiju (GC) i jonoizmenjivačku hromatografiju visokih performansi (HPAEC)

Oko 0,5g prethodno pripremljenog brašna semenki je ekstrahovano sa 10mL heksana u ultrazvučnom kupatilu tokom 30min, na 40°C. Nakon toga, ekstrakcija je nastavljena mešanjem uzoraka na magnetnoj mešalici na istoj temperaturi, dodatnih sat vremena. Lipidni ekstrakt je potom filtrirani kroz Whatman No.1 filter papir i supernatant je sakupljan. Ekstrakciona procedura je ponovljena, a oba sakupljena supernatanta su spojena i uparena do suva na rotacionom vakum uparivaču na 40°C (Heidolph, Laborota 4000, Schwabach, Nemačka). Ostatak nakon uparavanja je rekonstituisan u 6mL heksana i korišćen dalje za GC analizu masnih kiselina.

Oko 0,1g odmašćenog brašna semenki i pokožica je ekstrahovano sa 10mL 80% metanola koji sadrži 0,1% HCl. Uzorci su mešani tokom 1h na mehaničkoj mešalici (Thys 2, MLW Labortechnik GmbH, Seelbach, Nemačka), na sobnoj temperaturi i dodatnih sat vremena ekstrahovani na vodenom kupatilu, na 38°C. Nakon toga, uzorci su centrifugirani (4000 obrtaja/min, 10min), i supernatant je sakupljan. Ekstrakciona procedura je ponovljena, a oba supernatanta su spojena i uparena do suva. Ostatak nakon uparavanja je rekonstituisan u 10mL milliQ vode i korišćen za dalju HPAEC analizu mono- i oligosaharida.

3.2.1.1. GC analiza masnih kiselina

Masno-kiselinski profil lipidnih ekstrakata iz semenki grožđa je određen korišćenjem kapilarne gasne hromatografije (GC instrument Agilent Technologies 6890, USA), opremljene plameno-jonizujućim detektorom (GC-FID). Pre analize, lipidni ekstrakti su konverotovani do metil estara masnih kiselina, korišćenjem 14% BF_3/MeOH reagensa, kako su prethodno opisali Kostić et al. (2017). Ukratko,

smeša lipidnog ekstrakta i reagensa je zagrevana na 100°C, 1h; potom, ohlađena na sobnu temperaturu, a metil estri masnih kiselina su ekstrahovani u heksanskoj fazi dodavanjem vode. Nakon centrifugiranja, uklonjen je gornji heksanski sloj, koji je koncentrovan u struji azota i dalje korišćen za detekciju masnih kiselina.

Metil estri masnih kiselina su određeni pomoću kapilarne gasne kolone SP-2560, sledećih parametara: dužina 100m, i.d. 0,25 mm, i debljina filma 0,20µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Za analizu su primenjeni sledeći uslovi: temperatura injektora, 250°C; temperatura detektora, 260°C; brzina protoka helijuma, 5mL/min; zapremina ubrizgavanja uzorka, 1µL; injektor split odnos je podešen na 20:1; temperatura kolone, 50°C (5min) do 240°C (20min), sa porastom temperature od 4°C/min. Analiza je trajala 72,5 min. Identifikacija i kvantifikacija masnih kiselina je izvršena korišćenjem Supelco 37 komponentnog miks standarda metil estara masnih kiselina (FAME) (Supelco, Bellefonte, USA). Sadržaj masnih kiselina je izražen u relativnim količinama kao maseni procenat (%) ukupno detektovanih masnih kiselina.

Iz dobijenih podataka su utvrđenu nutritivni parametri kvaliteta, sadržaj ukupnih zasićenih masnih kiselina (ZMK), nezasićenih masnih kiselina (NMK), mononezasićenih masnih kiselina (MNMK), polinezasićenih masnih kiselina (PNMK) i odnos NMK/ZMK. Pored toga, izračunat je indeks aterogenosti (IA) i indeks trombogenosti (IT), primenom sledećih jednačina (1) i (2) (Vučić et al., 2015):

$$IA = \frac{A+4B+C+E}{\Sigma MNMK+\Sigma\omega6+\Sigma\omega3} \quad \textbf{(1)}$$

$$IT = \frac{B+C+D+E}{0{,}5\cdot\Sigma MNMK+0{,}5\cdot\Sigma\omega6+3\cdot\Sigma\omega3+\Sigma\omega3/\Sigma\omega6} \quad \textbf{(2)}$$

pri čemu su: *A*-sadržaj C12:0; *B*-sadržaj C14:0; *C*-sadržaj C16:0; *D*-sadržaj C18:0; *MNMK*-ukupan sadržaj mononezasićenih masnih kiselina; *ω6*-ukupan sadržaj ω6 masnih kiselina; *ω3*-ukupan sadržaj ω3 masnih kiselina; *E*-ukupan sadržaj *trans*-masnih kiselina.

3.2.1.2. HPAEC analiza mono- i oligosaharida

Profil mono- i oligosaharida odmašćenog brašna semenki i pokožica različitih sorti grožđa, određen je korišćenjem jonske hromatografije visokih performansi opremljene pulsno-amperometrijskim detektorom (HPAEC/PAD), prema metodologiji koju su prethodno opisali Gašić et al. (2015). Ukratko, za analizu šećera je korišćen DIONEX ICS 3000 DP uređaj (Dionex, Sunnyvale, CA, USA), opremljen sa kvaternom gradijent pumpom (Dionex), ICS AS-DV 50 autosemplerom (Dionex) i Carbo Pac®PA100 selektivnom anjon-izmenjivačkom kolonom (4×250 mm; veličina čestica 8,5 µm; veličina pora-mikropora, <10 angstrema; (Dionex)). Elektrohemijski detektor se sastoji od Au kao radne i Ag/AgCl kao referentne elektrode. Mobilna faza se sastojala od sledećih reagenasa: 600mM NaOH (A), 500mM $NaCH_3COO$ (B), ultraprečišćena voda (C). Brzina protoka mobilne faze je bila 0,7mL/min. Linearni gradijent je bio: 0–5,0 min, 15 % A, 85 % C; 5,0–5,1 min, 15 % A, 2 % B, 83 % C; 5,1–12,0 min, 15 % A, 2 % B, 83 % C; 12,0–12,1 min, 15 % A, 4 % B, 81 % C; 12,1–20,0 min 15 % A, 4 % B, 81 % C; 20,0–20,1 min 20 % A; 20 % B; 60 % C; 20,1–30,0 min 20 % A; 20 % B; 60 % C. Pre analize, sistem je kondicioniran mobilnom fazom sastava 15% A i 85% C, 15min. Zapremina ubrizganog uzorka je bila 25µL. Kvantifikacija mono- i oligosaharida detektovanih u uzorcima je sprovedena korišćenjem standardnih rastvora i formiranih kalibracionih prava, kao što su prethodno opisali Gašić et al. (2015). Standardi mono- i oligosaharida su nabavljeni od Tokyo Chemical Industry, TCI (Europe, Belgija).

3.2.2. Određivanje dijetnih vlakana

Sadržaj rastvornih (RDV) i nerastvornih (NDV) dijetnih vlakana u uzorcima pokožica i semenki je određen enzimsko-gravimetrijskim postupkom (AOAC, 1995). U metodi je korišćen enzimski Total Dietary Fiber Assay Kit (K-TDFR; Megazyme International, Wicklow, Ireland). Neposredno pre određivanja vlakana, uzorci su fino samleveni, a uzorci semenki su dodatno odmašćeni. Oko 1g

svakog prethodno pripremljenog uzorka se suspenduje u 50mL fosfatnog pufera i proverava se pH. Nakon toga, suspenzija se izlaže sekvencionoj enzimskoj digestiji, redom termostabilnom α-amilazom, proteazom i amiloglukozidazom. Potom se NDV odvajuju filtriranjem i ispiraju toplom destilovanom vodom. RDV se iz filtrata talože sa 95% etanolom, odvajaju filtriranjem, suše i mere. Nakon enzimskog tretmana vrši se korekcija za eventualno zaostale proteine i minerale. Sadržaj ukupnih dijetnih vlakana je suma RDV i NDV.

3.2.3. Priprema fenolnih ekstrakata semenki/pokožica za hromatografsku analizu

Vodeni ekstrakti pokožica i semenki grožđa su pripremani prema metodi koju su prethodno opisli Pantelić et al. (2016). Pokožica i semenka su prvo ekstrahovane sa dva različita ekstrakciona sredstva. Pokožice (oko 2g) su ekstrahovane sa 20mL metanola koji sadrži 0,1% HCl i 20mL 50% etanola (50/50 etanol/voda). Semenke (oko 1g) su ekstrahovane sa 10mL 80% metanolom koji sadrži 0,1% HCl (80/20 metanol/voda) i 10mL 50% etanola (50/50 etanol/voda). Zakišeljeni metanol je korišćen sa ciljem sprečavanja oksidacije (degradacije) fenolnih jedinjenja, prvenstveno antocijana (kod pokožice) i za povećanje efikasnosti njihove ekstrakcije, jer se fenol-fenolat ravnoteža pomera ka manje polarnoj fenol formi (Acosta-Estrada et al., 2014). Pored toga, zakišeljeni rastvarači delimično denaturišu membrane ćelijskog tkiva, i omogućavaju oslobađanje i stabilizaciju pigmenata poput antocijana (Rodriguez-Saona & Wrolstad, 2001). Poznato je da se fenolna jedinjenja prisutna u sporednim proizvodima iz grožđa mogu naći u rastvornom (slobodni i esterifikovani) i nerastvornom vezanom obliku. U zavisnosti od postupka ekstrakcije, analitičkih metoda, sorte grožđa i odabranih sporednih proizvoda, potvrđena je različita količina fenolnih jedinjenja u nerastvornom (vezanom) obliku: 19,88-56,75% (Lutterodt et al., 2011) i 63-79% računato u odnosu na ukupnu količinu fenolnih jedinjenja (de Camargo et al., 2014), koja doprinose antioksidativnim svojstvima ukupnih fenolnih jedinjenja u različitoj meri: od zanemarljive (Tang et al., 2018) do značajne (de Camargo et al., 2014).

Uzorci su ekstrahovani mešanjem na mehaničkoj mešalici (Thys 2, MLW Labortechnik GmbH, Seelbach, Nemačka), 1h, na sobnoj temperaturi. Posle ekstrakcije, ekstrakti su ostavljeni u frižideru na 5°C, 22h, a nakon toga su filtrirani kroz Whatman No.42 filter papir i supernatant je sakupljan. Ekstrakcioni postupak je ponovljen tri puta, sakupljeni supernatanti su spojeni i uparavani do suva na rotacionom vakum uparivaču na 40°C (Heidolph, Laborota 4000, Schwabach, Nemačka). Ostatak nakon uparavanja je rastvoren u 15mL milliQ vode i ovi rastvori su korišćeni za dalju spektrofotometrijsku (TPC, TFC, MAC, PAC) i hromatografsku analizu. Ekstrakti su filtrirani kroz 0,45µm filtere (Syringe Filter, PTFE, Supelco), pre dalje analize.

3.3. Priprema brašna/ekstrakta fermentisane komine Prokupca i njenih konstituenata

Presovana fermentisana komina autohtone sorte Prokupac koja je korišćena u ovom eksperimentalnom delu, dobijena je iz vinarije „Vinska kuća Milinčić“, Aleksandrovac, Župa 2018 godine. Odmah nakon dopremanja u laboratoriju, odvojena su tri jednaka dela komine: (1) prvi deo komine nije procesuiran, tako da su odmah izdvojene semenke, pokožica i šepurina/peteljčice. Izdvojeni konstituenti i ostatak komine su samleveni u mlinu za kafu, upakovani u vakum kese i čuvani na -20°C; (2) drugi deo komine je sušen u laboratorijskoj sušnici (sušenje u struji toplog vazduha, TV) (Thermo Scientific Haraeus, MA, USA), na 60°C, 48h (Slika P1, a-e); a (3) treći deo komine je liofilisan (sušenje zamrzavanjem), korišćenjem laboratorijskog liofilizatora (TelStar LyoAlfa 10, Filadelfija, SAD)(Slika P1, f-j). Nakon procesuiranja komine, takođe su odvojene semenke, pokožica i šepurina/peteljčice. Uzorci konstituenata, kao i ostatak sušene i liofilisane komine su samleveni u mlinu za kafu, upakovani u vakum kese i čuvani na -20°C.

Mali deo brašna komine i njenih konstituenata (~1g) je odmeravan u vegeglase i sušen na 105°C, do konstantne mase, kako bi se odredio sadržaj vlage i suva masa uzoraka (SM). Svi spektrofotometrijski i hromatografski rezultati su dalje izraženi na suvu masu uzorka.

Vodeni ekstrakti prethodno pripremljenih uzoraka komine, semenki, pokožice i šepurine/peteljčica, su dobijeni korišćenjem istog metodološkog pristupa koji je prethodno opisan u podpoglavlju 3.2.3., uz par malih izmena. Svi uzorci (oko 1g) su ekstrahovani sa 20ml 80% metanola (80/20 metanol/voda) koji sadrži 0,1% HCl. Ekstrakcija je rađena u triplikatu, a supernatanti su sakupljeni, upravani do suva i rekonstituisani u 15mL miliQvode za dalje spektrofotometrijske (TPC, TFC, MAC, PAC) i hromatografske analize. Antioksidativna svojstava (FRP, $ABTS^{\bullet+}$, $DPPH^{\bullet}$ i sposobnost uklanjanja H_2O_2) i citotoksična svojstva su određena samo na ekstraktima liofilisanih uzoraka komine, pokožice, semenke i šepurine. Za određivanje citotoksičnih svojstava, suspenzije ekstrakata su filtrirane kroz 0,22µm filtere.

3.4. Priprema funkcionalnih aditiva na bazi proteina kozijeg mleka

Uzorak kozijeg mleka je nabavljen od mlekare „Select-Milk“ 2020. godine, Inđija. Kozije mleko je odmašćeno i termički tertirano (90°C, 10min), prema metodi koju su prethodno detaljno opisali Pesic et al. (2012). Nakon odmašćivanja, deo odmašćenog mleka (M) je odvojen i korišćen kao kontrola za termički tretirano kozije mleko (TM), u daljoj elektroforetkoj karakterizaciji.

Vodeni ekstrakt semenke (E) koji je korišćen u formulaciji funkcionalnih aditiva, pripremljen je od fermentisane netretirane komine dobijene iz vinarije „Vinska kuća Milinčić“ 2020. godine, prema protokolu koji je opisan u podpoglavlju 3.2.3. Semenke su izdvojene iz fermentisane komine Prokupca, odmah nakon procesa vinifikacije. Kao primarno ekstrakciono sredstvo je korišćen 80% metanol koji sadrži 0,1% HCl. Dobijeni vodeni ekstrakt je okarakterisan korišćenjem UHPLC-Orbitrap MS^4.

Za pripremu praha inulin/ekstrakt korišćen je komercijalni inulin (E) (Inulin-Frutafit® IQ, Sensus, Roosendaal, Netherlands), proizveden iz korena cikorije (*Chicorium intybus*) sa sledećim karakteristikama: sadržaj inulina računato na suvu masu uzorka ≥ 90%, stepen polimerizacije (DP) varira od 2 do 60 fruktoznih jedinica sa srednjom vrednošću od 10 jedinica; rastvorljivost veća od 70%, slatkoća 10%, sadržaj suve materije 95–99% i sadržaj pepela ≤ 0.2%.

3.4.1. Priprema mešavina mleko/ekstrakt semenke

Prethodno pripremljeno termički tretirano mleko (TM) je pomešano sa tri različite zapremine vodenih ekstrakata semenke, kako bi se kozije mleko obogatilo različitim koncentracijama fenolnih jedinjenja. Na osnovu unapred određenog sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) u ekstraktu semenke (E), korišćenjem metode po Folin-Ciocalte-u (Singleton et al., 1999)(opisana u podpoglavlju 3.8.1.1.), pripremljene su TME mešavine, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja bio: 0,2 (TME1); 0,4 (TME2); i 0,6 (TME3) mgTPC/mL mešavine.

3.4.2. Priprema mešavina mleka sa prahom inulin/ekstrakt semenke

Prvo je pripremljen sprej osušen prah inulin/ekstrakt semenke (IE). Ukratko, u vodeni ekstrakt semenke je dodat inulin (5% rastvor), mešavina je 10min ostavljena na magnetnoj mešalici i potom sprej osušena korišćenjem Buchi Mini B-290 laboratorijskog sprej sušača (Buchi Labortechnik AG, Flawil, Švajcarska). Parametri sprej sušenja su: ulazna temperatura 130°C; izlazna temperatura 70°C; protok vazduha 600L/h; protok tečnosti 8mL/min; i pritisak atomizera 0,55bar. Takođe je pripremljena mešavina TM sa inulinom (5%) (TMI) (5g inulina u 100mL TM), koja je korišćena kao kontrola u karakterizaciji pripremljenih formulacija.

Termički tretirano mleko (TM) je pomešano sa tri različite količine prethodno pripremljenog praha inulin/ekstrakt semenke (IE). Na osnovu unapred određenog sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u IE prahu (prah je rekonstituisan u 80% metanolu), korišćenjem metode po Folin-Ciocalte-u (Singleton et al., 1999)(opisana u podpoglavlju 3.8.1.1.), pripremljene su mešavine TM sa IE prahom, tako da

je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja bio: 10 (0,42g IE u 100mL TM) (TMIE1); 20 (0,83g IE u 100mL TM)(TMIE2); i 30 (1,25g IE u 100mL TM)(TMIE3) mgTPC/100mL mešavine TMIE.

3.4.3. Dobijanje funkcionalnih aditiva sprej sušenjem obogaćenog mleka – neferementisani funkcionalni aditivi

Polazni uzorci mleka (M, TM) (Slika P2a,b), pripremljene mešavine (TME1, TME2, TME3, IE, TMI, TMIE1, TMIE2, TMIE3)(Slika P2,c-j) i deo ekstrakta semenke (SOES), su sprej osušeni korišćenjem Buchi Mini B-290 laboratorijskog sprej sušača (Buchi Labortechnik AG, Flawil, Švajcarska). Parametri sprej sušenja su: ulazna temperatura 130°C; izlazna temperatura 70°C; protok vazduha 600L/h; protok tečnosti 8mL/min; i pritisak atomizera 0,55bar. Dobijeni funkcionalni aditivi su pažljivo upakovani u kivete, zaštićeni paranepropusnim filmom i čuvani na -20°C za dalje analize. Funkcionalni aditivi su okarakterisani korišćenjem ATR-FTIR i Raman spektroskopije, kao i SEM mikroskopije (M, TM, TME3, IE, TMI, TMIE3, SOES).

3.4.3.1. Zeta (ζ) potencijal i veličina čestica nefermentisanih funkcionalnih aditiva

Zeta potencijal i veličina čestica dobijenih aditiva su određeni metodom dinamičkog rasejanja svetlosti (DLS), korišćenjem uređaja Horiba NanoPartica SZ-100 (Horiba, Japan). Pre merenja, prahovi su rekonstituisani (0,1% rastvori), a pH rastvora je proverena i po potrebi podešena tako da bude 6,7. Merenje je obavljeno na 25°C, u polidisperznom modu, pod uglom rasejanja svetlosti od 90°.

3.5. Priprema funkcionalnih kozijih jogurata i liofolisanih kozijih jogurta kao funkcionalnih aditiva

Za pripremu funkcionalnog fermantisanog napitka – jogurta i liofilisanih jogurta korišćeno je kozije mleko nabavljeno iz mlekare „Select-Milk“, Inđija. Korišćeno sirovo kozije mleko je imalo sledeća fizičko hemijska svojstva: pH 6,34±0,0; suva materija 12,06±0,08%; mlečna mast 3,2±0,0%; ukupni proteini 3,57±0,014%. Cela količina kozijeg mleka je termički tretirana (pasterisano), na 90°C, 5min. Nakon toga, mleko je hlađeno do 43°C, što je optimalna temperatura za dodavanje mlečnih bakterija, starter kulture (YF-L812, Yoflex (*Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*), Chr Hansen, Nieuwegein, Holandija) i odabranog soja *Lactobacillus plantarum*. Mleko je zasejano sa 0,2% (w/w) starter kulturom i/ili dodatkom ~$2\cdot10^8$ ćelija/500mL mleka *L. plantarum* soja. U formulaciji jogurta je korišćen isti vodeni ekstrakt koji je prethodno korišćen u pripremi nefermentisanih funkcionalnih aditiva (podpoglavlje 3.4.). Pre dodavanja u ohlađeno mleko, ekstrakt semenke je ostavljen 10min na ultrazvučnom kupatilu i filtriran kroz 0,45µm filtere (Syringe Filter, PTFE, Supelco). Ekstrakt je dodavan u pasterisano mleko u odnosu 1:10 v/v (50mL ekstrakta u 450mL mleka). Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktu koji je dodat u mleko je bio 48,45mgTPC/50mL ekstrakta (TPC je određen prema Folin-Ciocalte-ovoj metodi)(opisana u podpoglavlju 3.8.1.1.). Tok fermentacije je praćen merenjem pH-vrednosti na svakih sat vremena do završetka fermentacije (pH~4.6). Fermentacija je trajala od 5 do 8h, zavisno od sastava uzoraka i korišćenih bakterijskuh kultura (Slika 3.1).

<u>Funkcionalni jogurti analizirani u okviru ove doktorske disertacije</u>:

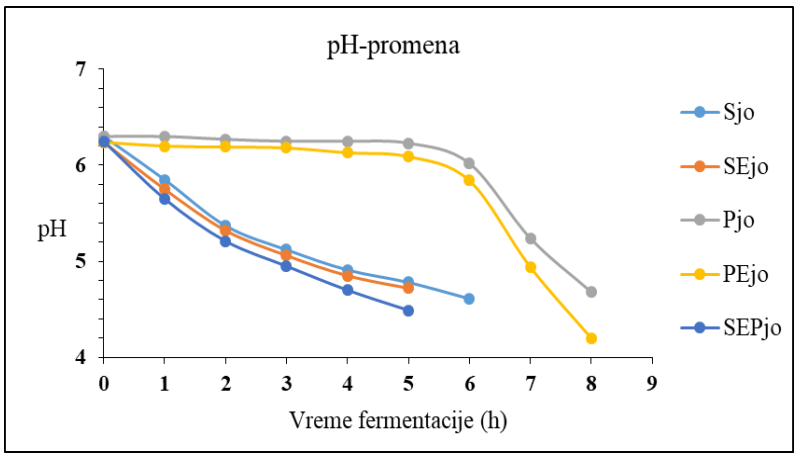
a) koziji jogurt fermentisan sa starter kulturom (Sjo);

b) koziji jogurt sa dodatkom ekstrakta semenke fermentisan sa starter kulturom (SEjo);

c) koziji jogurt fermentisan sa odabranim *Lactobacillus plantarum* sojem (Pjo);

d) koziji jogurt sa dodatkom ekstrakta semenke fermentisan sa odabranim *Lactobacillus plantarum* sojem (PEjo);

e) koziji jogurt sa dodatkom ekstrakta semenke fermentisan sa starter kulturom i odabranim *Lactobacillus plantarum* sojem (SEPjo).



Slika 3.1. Tok fermentacije jogurta bez/sa dodatkom ekstrakta semenke, korišćenjem starter kulture i odabranog *Lactobacillus plantarum* soja

3.5.1. Lactobacillus plantarum soj korišćen u proizvodnji jogurta

Jedan od ciljeva istraživanja je bio da se ispita efekat dodatka soja *Lactobacillus plantarum* sa izraženom sposobnošću za degradaciju fenolnih jedinjenja kao kostartera u proizvodnji fermentisanog napitka (jogurta) od kozijeg mleka koji sadrži i fenolni ekstrakt semenke komine grožđa. Smisao ovih ogleda je bilo ispitivanje efekta ovog soja u toku fermentacije na antioksidativne aktivnosti ovako dobijenog proizvoda.

U tu svrhu je pretražena kolekcija sojeva vrste *Lactobacillus plantarum* Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, i na osnovu biohemijskog testa su selektovani sojevi koji su pokazivali najjaču tanaznu aktivnost. Prisustvo enzima je takođe potvrđeno PCR reakcijom i od selektovanih sojeva jedan kandidat je izabran kao kostarter za fermentaciju mlečnog napitka koji sadrži fenolni ekstrakt semenke.

3.5.1.1. Bakterijski sojevi

U eksperimentima su korišćeni prethodno determinisani sojevi vrste *Lactobacillus plantarum* iz kolekcije Laboratorije za molekularnu mikrobiologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Svi sojevi su izolovani iz kukuruzne silaže i determinisani do nivoa vrste sekvenciranjem fragmenata 16S rRNK, a različiti sojevi su determinisani upotrebom gel elektroforeze u pulsirajućem električnom polju (PFGE). Lista sojeva korišćenih u eksperimentima je prikazana u Tabeli 3.1.

Tabela 3.1. *Lactobacillus plantarum* sojevi korišćeni u eksperimentu

Soj	*Vrsta*
SIL 5	*Lactobacillus plantarum*
SIL 8	*Lactobacillus plantarum*
SIL 26	*Lactobacillus plantarum*
SIL 29	*Lactobacillus plantarum*
SIL 37	*Lactobacillus plantarum*
SIL 38	*Lactobacillus plantarum*
SIL 69	*Lactobacillus plantarum*
SIL 71	*Lactobacillus plantarum*
SIL 73	*Lactobacillus plantarum*

3.5.1.2. Spektrofotometrijski test tanazne aktivnosti sojeva

Aktivnost tanaze je određivana prethodno ustanovljenom metodom (Nishitani & Osawa, 2003), koja se zasniva na sposobnosti bakterijskih tanaza da hidrolizuju estarsku vezu između metil grupe i galne kiseline u sintetskom supstratu (metil-galatu), pri čemu se oslobađa galna kiselina. U eseju se meri

količina otpuštene galne kiseline, odnosno njene oksidovane forme koja u baznoj sredini apsorbuje na 450nm. Bakterijske ćelije zasejane na MRS agar, inkubirane 48h, na 30°C su pokupljene sterilnom ezom i resuspendovane u 33mM NaH_2PO_4 sa 5mM metil-galatom, pH 5,0, nakon čega je optička gustina suspenzije na 600nm podešena na 0,4. Uzorci su nakon toga inkubirani 24h na 37°C. Posle 24h, 2mL suspenzije je centrifugirano na 13000*g*, 5 min. Dalje, 1mL svakog supernatanta posebno je pomešan sa 1mL zasićenog rastvora $NaHCO_3$ (8%), pH 8,6 i inkubiran 2 h, na 37°C, i naknadno centrifugiran (13000*g*, 1 min), kako bi se uklonila potencijalna zamućenja rastvora koja se sporadično javljaju u slučaju pojedinih sojeva. Nakon inkubacije apsorbanca smeše je merena na 450 nm, naspram slepe probe koja je sardžala 5mM rastvor metil galata u reakcionom puferu, i koji je bio tertian na isti način kao i uzorak. Visina izmerene apsorbance na 450 nm je upravo srazmerna nivou tanazne aktivnosti bakterijskog soja.

Tabela 3.2. Tanazna aktivnost testiranih *Lactobacillus plantarum* sojeva

Odabrani izolati	A_{450nm}
SIL 5	0,558±0,09
SIL 8	0,593±0,05
SIL 26	0,553±0,05
SIL 29	0,548±0,08
SIL 37	0,572±0,11
SIL 38	0,665±0,07
SIL 69	0,940±0,08
SIL 71	1,127±0,06
SIL 73	0,955±0,08

Na osnovu rezultata spektrofotometrijskog određivanja tanazne aktivnosti (tabela 3.2), izabran je soj sa najvećom tanaznom aktivnošću, *Lactobacillus plantarum* SIL71, za sve dalje eksperimente.

3.5.1.3. Izolacija i prečišćavanje hromozomalne DNK

Bakterijske kulture narasle do logaritamske faze (OD600nm= 0,6-0,8) u tečnom MRS bujonu na 30°C su oborene centrifugiranjem 5 min, na 13000*g* u tubi zapremine 10 mL. Dobijeni talog je ispran sa 500 µL TEN pufera. Talozi su nakon toga resuspendovani u 500 µL PP pufera sa lizozimom (2mg/mL) i inkubirani 30 min, na 37°C. Nakon toga je dodato 250 µL 2% rastvora SDS-a i 1 µL proteinaze K i inkubacija je obavljena 30 min, na 50°C. U uzorak je potom dodato 250 µL neutralne fenol-hloroformske smeše uz snažno mućenje. Nakon toga, uzorak je centrifugiran 15 min, na 13000*g*, a gornja vodena faza je prebačena u novu tubu. U vodenu fazu je dodata 1/10 zapremine 3M Na-acetata i 1 volumen izopropanola. Smeša je inkubirana 5 min, na sobnoj temperaturi, a DNK je precipitirana iz smeše, centrifugiranjem 10 min, na 13000*g*. Talog je ispran sa 700 µL hladnog (-20°C) 75% etanola. Nakon toga, supernatant je odliven, a talog je osušen na 42°C i resuspendovan u 30 µL demineralizovane vode sa dodatkom RN-aze. Izolovana hromozomalna DNK je čuvana na -20°C do analize.

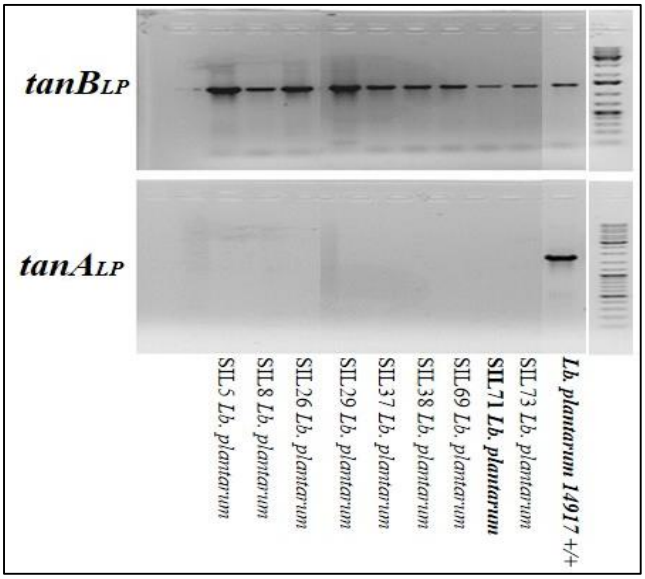
3.5.1.4. PCR reakcija za detekciju prisustva gena za tanaze tanALp i tanBLp

Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom je vršeno tako što je napravljena reakciona smeša koja se sastojala iz 0,1-1µg DNK; reakcionog pufera (50mM KCl, 10mM Tris-HCl i 0,1% Triton X-100, pH 9,0); 0,2mM Dntp; 1U DNK Taq polimeraze; i odgovarajućih prajmera („forward“ i „reverse“) koncentracije 2,5 µM. Kao negativna kontrola korišćena je reakciona smeša istog sastava ali bez prisustva DNK. PCR je izvođen po sledećem programu: (1) inicijalna denaturacija 5 min, na 94°C; (2) denaturacija 30s, na 94°C; (3) vezivanje prajmera 1 min, na 55°C; (4) polimerizacija 30s, na 72°C (koraci 2-4 su ponovljeni u 30 ciklusa); i (5) finalno hlađenje na 72°C u trajanu od 5 min. Kao pozitivna kontrola je korišćen soj *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 koji poseduje oba gena $tanA_{LP}$ i $tanB_{LP}$. Dobijeni fragmenti su razdvajani horizontalnom elektroforezom na agaroznom gelu

(Slika 3.1). Sekvence korišćenih prajmera su date u Tabeli 3.3. Svi ispitivani sojevi su posedovali gen *tanB*$_{LP}$, dok ni jedan od sojeva nije posedovao *tanA*$_{LP}$.

Tabela 3.3. Prajmeri korišćeni za PCR

Br.	*Oznaka prajmera*	*Sekvenca prajmera*	*Očekivana dužina produkta*
1	*951 tanB*$_{LP}$	5'-TGATGCTGACTGGCTGGTTGC-3'	1,4kb
2	*952 tanB*$_{LP}$	5'-GCACAAGCCATCAATCCAGG-3'	
3	*953 tan A*$_{LP}$	5'-CCTGATGAGTGGTTTGTTAG-3'	1,8kb
4	*954 tanA*$_{LP}$	5'-CTTGCGTTCTGCTTCGGTATG-3'	



Slika 3.2. PCR umnoženi fragmenti eksperimentalnih *Lactobacillus plantarum* sojeva, razdvojeni na agaroznom gelu

3.5.2. Teksturalna svojstva dobijenih jogurata

Teksturalna svojstva uzoraka jogurta (čvrstina, konzistencija, kohezivnost i indeks viskoziteta) su određena pomoću analizatora teksture (TA.XT Plus Texture Analyzer, Stable Micro Systems Ltd., Velika Britanija), koristeći isti metodološki pristup koji su prethodno detaljno opisali Hovjecki et al. (2020). Za izračunavanje vrednosti teksturalnih parametara sa dobijenih grafika je korišćen softver EXPONENT (Stable Micro Systems Ltd., Velika Britanija).

3.5.3. Senzorna analiza

Ukupni senzorni kvalitet dobijenih proizvoda je ocenjen korišćenjem metode bodovanja, a ocenjivani su sledeći parametri: opšti izgled, miris, ukus i teksturu. Korišćenjena je skale za bodovanje od 0 do 5 (sa mogućnošću davanja 0,5 bodova) na sledeći način: odličan kvalitet (ocena kvaliteta > 4,5), veoma dobar (4,5 ≤ ocena kvaliteta > 3,5), dobar kvalitet (3,5 ≤ ocena kvaliteta > 2,5), loš/ nezadovoljavajući kvalitet (2,5 ≤ ocena kvaliteta > 1,5) i veoma loš kvalitet (ocena kvaliteta ≤ 1,5). Koeficijenti važnosti za odabrana svojstva kvaliteta bila su jednaki za svako svojstvo. Šifrirane uzorke je ocenjivao senzorni panel od pet članova. Senzorna analiza uzoraka je obavljena jedan dan nakon proizvodnje jogurata.

3.5.4. Priprema liofilizovanih jogurata – fermentisani funkcionalni aditivi

Svi pripremljni jogurti (S, SE, P, PE, SEP) su liofilisani (TelStar LyoAlfa 10, Filadelfija, SAD). Takođe su liofilisane i polazne mešavine mleka i odgovarajućih bakterijskih sojeva sa i bez ekstrakta

koje nisu fermentisale (S_o, SE_o, P_o, PE_o, SEP_o), polazno punomasno kozije mleko (SPM) i pasterisano kozije mleko (PM) i korišćeni su kao kontrole u daljoj analizi. Dobijeni liofilizati su fino sprašeni, pažljivo upakovani u kivete, zaštićeni paranepropusnim filmom i čuvani na -20°C za dalje analize. Liofilisani jogurti su okarakterisani korišćenjem ATR-FTIR i Raman spektroskopije, kao i SEM mikroskopije.

3.5.4.1. Određivanje ukupnog broja vijabilnih bakterijskih ćelija

Određivanje ukupnog broja vijabilnih bakterijskih ćelija je izvršeno indirektnom metodom po Koch-u (1883). Materijal dobijen liofilizacijom je rastvoren u 0.1%(w/v) pepton-fiziološkom rastvoru (Oxoid, Basingstoke, Engleska) i pripremljena su serijska decimalna razblaženja suspenzije u istom rastvoru. Po 1mL suspenzije odgovarajućih razblaženja je u Petri posudama preliven i izmešan sa po 10mL otopljenog De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agara (Oxoid, Basingstoke, Engleska). Petri posude su inkubirane 48h, na 30°C do pojave uočljivih kolonija, nakon čega je obavljeno brojanje kolonija. Broj vijabilnih bakterija je izražen kao broj kolonija (eng. Colony forming units – CFU) po gramu suve mase liofilizata (CFU /g d.m.).

3.6. Priprema funkcionalnih aditiva za određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja, antioksidativnih i tehno-funkcionalnih svojstava

3.6.1. Priprema za UHPLC-DAD MS/MS analizu

Pripremljeni su metanolni ekstrakti sprej osušenih i liofilisanih uzoraka sa ciljem da se okarakterišu fenolna jedinjenja koja su doprinela funkcionalnosti nefermentisanih i fermentisanih funkcionalnih aditiva. Oko 1g uzorka ekstrahovano je sa 10mL 80% metanola koji sadrži 0,1% HCl (zakišeljeni metanol). Uzorci su ekstrahovani 1h, na sobnoj temperaturi, korišćenjem mehaničkog šejkera. Nakon toga, uzorci su centrifugirani 3000*g*, 10min, a sakupljeni supernatanti su filtrirano kroz 0,45µm filtere i analizirani korišćenjem UHPLC-DAD MS/MS uređaja (detaljno opisano u podpoglavlju 3.8.2.1.).

3.6.2. Priprema za analizu ukupnih fenolnih jedinjenja, antioksidativne aktivnosti i tehno-funkcionalnih svojstava

Sprej osušeni i liofilisani prahovi su rekonstituisani tako da se dobiju 0,1%; 0,5%; i 1% rastvori, a pH je proverena i po potrebi podešena na 6,7. Dobijeni rastvori sprej osušenih uzoraka su dalje korišćenji za analizu ukupnih fenolnih jedinjenja, procenu antioksidativne aktivnosti i tehno-funkcionalnih svojstava nefermentisanih funkcionalnih aditiva. Koloidni rastvori fermentisanih funkcionalnih aditiva su dodatno centrifugirani (17000*g*, 5min), a izdvojeni supernatanti su korišćeni za analizu ukupnih fenolnih jedinjenja i procenu antioksidativne aktivnosti. Za procenu tehno-funkcionalnih svojstava su korišćeni primarno rekonstituisani koloidni rastvori.

3.7. Simulirana in vitro gastrointestinalna digestija (GID)

U okviru ove doktorske disertacije je korišćen opšte prihvaćen standardizovan statički *in vitro* protokol digestije – INFOGEST protokol (Minekus et al., 2014), za procenu biodostupnosti fenolnih jedinjenja iz ekstrakata semenke i pokožice grožđa koje su izdvojene iz nefermentisane komine Prokupca bez prisustva i u prisustvu složenog matriksa hrane. Pored navedenog, analizirani su odabrani nefermentisani funkcionalni aditivi na biodostupnost i antioksidativnu aktivnost fenolnih jedinjenja semenke komine grožđa nakon *in vitro* digestije.

Uticaj kompleksnog matriksa hrane koji uključuju meso i žitarice na biodostupnost fenolnih jednjenja. Kao model matriks je korišćen infant pire (Juvitana, Swisslion Product d.o.o. Indjija, Srbija) koji se sastoji od kuvanog ćurećeg mesa (20%), kuvane krompir paste (10%), kuvane kukuruzne paste (25%), pirinčanog brašna (5%), 0,1% NaCl i vode (39,9%). Ova mešavina je sadržala 3% proteina, 10% ugljenih hidrata i 1% ukupne masti.

Mešavina koja sadrži 2 mL vodenog ekstrakta semenke/pokožice grožđa i 3g infant pirea je digerirana primenom navedenog protokola. Digerirani uzorci su obeleženi oznakama DPE/M (digeriran ekstrakt pokožice u prisustvu matriksa hrane) i DSE/M (digeriran ekstrakt semenke u prisustvu matriksa hrane). Da bi se ispitao uticaj matriksa pod istim uslovima, 3g infant formule je mešano sa 2mL destilovane vode i izloženo digestiji (DM-digeriran matriks hrane). Da bi se procenio efekat digestije na vodeni ektrakt semenke/pokožice bez matriksa hrane, pripremljene su i potom izložene digestiji dodatne kontrole koje sadrže 2mL ekstrakta semenke/pokožice pomešane sa 3mL destilovane vode i obeležene oznakama DPE (digeriran ekstrakt pokožice) i DSE (digeriran ekstrakt semenke).

Da bi se definisao doprinos digestivnih fluida, ekstrakta pokožice/semenke grožđa, sa i bez matriksa hrane i samog matriksa hrane, pripremane su kontrole svih uzoraka koji sadrže identične komponente u istom odnosu kao tokom simulirane digestije; međutim kod ovih kontrolnih uzoraka, sastavne komponente i enzimi su brzo pomešani; pH je podešena na 7,0; a mešavine su odmah zamrznute. Ovi uzorci su redom obeleženi oznakama PE/MK; SE/MK; PEK; SEK; i MKo. Kako bi se omogućilo poređenje digeriranih uzoraka sa polaznim ekstraktima i matriksom hrane, odgovarajuće zapremine ekstrakta pokožice/semenke i infant pirea su razblažene destilovanom vodom da bi se postigla ukupna zapremina od 40mL, koja je identična dobijenoj zapremini nakon kompletne digestije analiziranih uzoraka. Ovi uzorci su redom obeleženi oznakama PE, SE, i MA.

Uticaj proteinskog matriksa i dijetnih vlakana na biodostupnost fenolnih jedinjenja - nefermentisani funkcionalni aditivi, TME3, IE i TMIE3. Sprej osušeni prahovi (1g) sa/bez fenolnog ekstrakta semenke (TM, TME3, IE, TMI, TMIE3) (podpoglavlje 3.4.3.), su rehidratisani sa 4mL destilovane vode i potom *in vitro* digerirani prema protokolu. Kao kontrole digeriranih uzoraka su korišćeni TM, TME3, IE, TMI, TMIE3 prahovi samo rekonstituisani u destilovanoj vodi. Naime, 1g svakog praha posebno je pomešan sa destilovanom vodom do zapremine od 40mL, koja je identična dobijenoj zapremini nakon kompletne digestije analiziranih uzoraka, uzorci su intenzivno vorteksovani, i dalje analizirani zajedno sa digeriranim uzorcima. Da bi se definisao uticaj digestivnog koktela, pripremljena je kontrola digestivnog koktela mešanjem 5mL destilovane vode (umesto uzorka) sa svim digestivnim enzimima i rastvorima (DCC).

Tabela 3.4. Sastav osnovnih rastvora i simuliranih digestivnih fluida.

Komponente	Koncentracije osnovnih rastvora		SSF	SGF	SIF
			pH 7.0	pH 3.0	pH 7.0
			Koncentracija u SSF	Koncentracija u SGF	Koncentracija u SIF
	g/L	mol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L
KCl	37,3	0,5	15,1	6,9	6,8
KH_2PO_4	68	0,5	3,7	0,9	0,8
$NaHCO_3$	84	1	13,6	25	85
NaCl	117	2	/	47,2	38,4
$MgCl_2(H2O)_6$	30,5	0,15	0,15	0,1	0,33
$(NH_4)_2CO_3$	48	0,5	0,06	0,5	/
NaOH	/	1	/	/	8,4
HCl	/	6	1,1	15,6	/
*$CaCl_2(H_2O)_2$	44,1	0,3	0,75*	0,075*	0,3*

Skraćenice: **SSF**-simuliran saliva fluid (pljuvačni sok); **SGF**- simuliran gastrični fluid; **SIF**- simuliran intestinalni fluid. Svi simulirani fluidi su pripremljeni 1,25 puta koncentrovaniji, jer će naknadno dodavanje enzima, žučnih soli, rastvora Ca^{2+} i vode dovesti do tačne koncentracije svakog jedinjenja u finalnoj digestivnoj mešavini. *Koncentracije u kolonama se odnose na finalnu digestivnu smešu. $CaCl_2(H_2O)_2$ je dodat odvojeno.

Uzorci su izloženi oralnoj fazi digestije dodavanjem 3,5mL simuliranog saliva fluida (pljuvačnog soka) (SSF): 0,5mL rastvora pljuvačne α-amilaze (1500U/mL), 25µL 0,3M $CaCl_2$ i 975µL vode; a zatim intenzivno mućkani i inkubirani 2min, na 37°C (pH 7,0). Nakon ove faze, uzorci su izloženi gastričnoj fazi digestije, odnosno celokupna količina oralnog „bolusa“ (oko 10mL), je pomešana sa 7,5mL simuliranog gastričnog fluida (SGF): 1,6mL rastvora pepsina (25000U/mL) pripremljenog u SGF i 5µL 0,3M $CaCl_2$, dok je pH podešena na 3,0 korišćenjem 1M HCl. Zapremina smeše je zatim podešena na 20mL dodavanjem destilovane vode i inkubirana 2h, na 37°C, uz intenzivno mešanje na orbitalnom šejkeru (Lab-Shaker SMX 1300, Adolf Kühner, Bazel, Švajcarska), koji je podešen na 300o/min. U završnoj intestinalnoj fazi, 20mL dobijenog gastričnog „humusa“ je pomešano sa 11mL

simuliranog intestinalnog fluida (SIF): 5mL rastvora pankreatina (800U/mL, aktivnost tripsina) pripremljenog u SIF, 2,5mL 160mM rastvora žučnih soli i 40µL 0,3M $CaCl_2$; dok je pH podešena na 7,0 korišćenjem 1M NaOH. Smeša je dopunjena destilovanom vodom do 40mL, kako bi se postigla finalna zapremina, koja je potom inkubirana 2h, na 37°C, uz intenzivno mešanje na orbitalnom šejkeru koji je podešen na 300o/min. Nakon završene intestinalne digestije, supernatanti su odvojeni centrifugiranjem na 4500*g* (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka), 10min, na 4°C; odmah zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na -80°C za dalje analize.

3.7.1. Biodostupnost fenolnih jedinjenja nakon digestije

a) Da bi se analizirao efekat *in vitro* GID na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida, pro(anto)cijanidina i pojedinačnih fenolnih jedinjenja, biodostupnost fenolnih jedinjenja se izračunava kao količina ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida, pro(anto)cijanidina i pojedinačnih fenolnih jedinjenja, koji su dostupni na kraju GID, u poređenju sa njihovom količinom u polaznim ekstraktima i izražava se u % i obeležena je sa R (recovery).

$$Biodostupnost, R\ (\%) = \left(\frac{PCds}{PCis}\right) \times 100 \quad \textbf{(3)}$$

Gde je: *PCds*-sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida, pro(anto)cijanidina i pojedinačnih fenolnih jedinjenja u digeriranim uzorcima; *PCis*-sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida, pro(anto)cijanidina i pojedinačnih fenolnih jedinjenja u polaznim ekstraktima.

b) U slučaju kompleksnog matriksa na bazi mesa i ugljenih hidrata, izračunat je ukupna biodostupnost (TR, total recovery), za ukupna fenolna jedinjenja, fenolne kiseline i flavonole u digeriranim uzorcima sa matriksom hrane. Fenolna jedinjenja matriksa hrane takođe doprinose polaznoj količini fenolnih jedinjenja, koja su izložena digestiji zajedno sa ekstraktima pokožice i semenke. Ukupna biodostupnost ukupnih i specifičnih grupa fenolnih jedinjenja u digeriranim uzorcima je procenjena u odnosu na njihov zbirni sadržaj u polazom ekstraktu pokožice/semenke i polaznom matriksu hrane, prema sledećoj jednačini:

$$Ukupna\ biodostupnost, TR\ (\%) = \left(\frac{TPCds}{TPCis+TPCfm}\right) \times 100 \quad \textbf{(4)}$$

Gde: *TPCds*-predstavlja ukupna sadržaj fenolnih kiselina, flavonola i ukupnih fenolnih jedinjenja u digeriranim uzorcima; *TPCis*-predstavlja ukupna sadržaj fenolnih kiselina, flavonola i ukupnih fenolnih jedinjenja u polaznim uzorcima (PE i SE); *TPCfm*-predstavlja ukupna sadržaj fenolnih kiselina, flavonola i ukupni fenolnih jedinjenja u polaznom matriksu hrane (MA). Biodostupnost i ukupna biodostupnost flavan-3-ola određenih UHPLC-Orbitrap MS^4, predstavljena je na isti način kao i biodostupnost prethodnih klasa fenolnih jedinjenja.

c) Procenat ukupnih, pojedinačnih klasa i pojedinačnih fenolnih jedinjenja vezanih za proteine mleka (*MVP*), inulin (*IVP*), ili matriks mleko/inulin (*MIVP*), je određen prema sledećoj jednačini:

$$MVP\ (IVP)(MIVP)\ (\%) = \left(\frac{(PCpe-PCkm)}{PCpe}\right) \times 100 \quad (5)$$

Procenat (%) ukupnih, pojedinačnih klasa i pojedinačnih fenolnih jedinjenja u digeriranim uzorcima (*Ri*), je određen u odnosu na njihove sadržaj u polaznim rekonstituisanim uzorcima, prema sledećoj jedinačini:

$$Ri\ (\%) = \left(\frac{PCnd}{PCkm}\right) \times 100 \quad (6)$$

Gde: *PCpe*-predstavlja sadržaj ukupnih, pojedinačnih klasa i pojedinačnih fenolnih jedinjenja u polaznom ekstraktu semenke; *PCkm*-predstavlja sadržaj ukupnih, pojedinačnih klasa i pojedinačnih fenolnih jedinjenja u kontrolnom rekonstituisanom uzorku matriks/ekstrakt semenke; *PCnd*-predstavlja sadržaj ukupnih, pojedinačnih klasa i pojedinačnih fenolnih jedinjenja nakon digestije.

3.7.2. Priprema uzoraka pre i nakon digestije za elektroforetsku analizu

Kontrolni uzorci i uzorci nakon digestije su rastvoreni u puferu za uzorke (SDS-R-PAGE i SDS-NR-PAGE), u odnosu 1:1, intenzivno vorteksovani i korišćeni za elektroforetsku analizu.

3.8. Metode i instrumentalne tehnike korišćene u doktorskoj disertaciji

3.8.1. UV-VIS spektrofotometrija

3.8.1.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, sadržaj ukupnih flavonoida, sadržaj ukupnih monomernih antocijana, sadržaj ukupnih proantocijanidina

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) je određen korišćenjem Folin-Ciocalteu-ovog reagensa, prema metodi koju su opisali Singleton et al. (1999). Alikvot uzorka (70µL) je pomešan sa 300µL Folin-Cocalteu-ovog reagensa i nakon 5min, sa 230µL, 7,5% Na_2CO_3. Smeša je potom intenzivno vorteksovana i inkubirana 1h30min, na sobnoj temperaturi, u mraku. Nakon toga, uzorci su centrifugirani na 17000*g*, 10min i absorbanca supernatanta je merena na 765nm, korišćenjem Shimadzu spektrofotometra (UV-1800, Shimadzu USA Manufacturing Inc, UR, USA). Zavisno od prirode analiziranih uzoraka, ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja je izražen kao mg ekvivalenti galne kiseline na 100mL uzorka (mg(GAE)/100mL) ili 100g suve mase uzorka (mg(GAE)/100g SM).

Sadržaj ukupnih flavonoida (TFC) je određen korišćenjem kolorimetrijskog testa sa aluminjum hloridom, kako su prethodno opisali Ribeiro et al. (2015). Alikvot uzorka (125µL) je mešan sa 625µL milliQ vode i 37,5µL 5% $NaNO_2$. Posle 6min, dodato je 75µL 10% $AlCl_3$, kako bi se formirao flavonoid-aluminijum kompleks, dok je alikvot 1M NaOH (250µL) dodat 5min kasnije. Nakon toga, smeša je intenzivno vorteksovana i absorbanca je merena na 510nm, korišćenjem Shimadzu spektrofotometra. Zavisno od prirode analiziranih uzoraka, ukupan sadržaj flavonoida je izražen kao mg ekvivalenti katehina (CE) i/ili kvercetina (QE) na 100mL uzorka (mg/100mL) ili 100g suve mase uzorka (mg/100g SM).

Sadržaj ukupnih proantocijanidina **(**PAC) u uzorcima je određen korišćenjem butanol-HCl testa, prema metodi koju su opisali Deng et al. (2011). Alikvot uzorka (0,5mL) je pomešan sa 3mL butanol-HCl (95:5 v/v) i 0,1mL reagensa (2% $FeNH_4(SO_4)_2$ u 2M HCl). Nakon toga, smeša je intenzivno vorteksovana i inkubirana na 95°C, 40min. Nakon inkubacije, mešavina je ohlađena i absorbanca je merena na 540nm, korišćenjem Shimadzu spektrofotometra. Ukupan sadržaj ekstraktibilnih proantocijanidina je izračunat korišćenjem konverzionog faktora (0,1736) (Lavelli et al., 2014) i izražen kao mg PA na 100mL uzorka (mg(PA)/100mL) ili 100g suve mase uzorka (mg(PA)/100g SM), prema sledećoj jednačini:

$$PAC = (As - Ac) \cdot 0{,}1736 \cdot DF \quad \textbf{(7)}$$

Gde: *Ac*-predstavlja absorbancu slepe probe; *As*-predstavlja absorbancu uzorka; i *DF*- predstavlja faktor razblaženja.

Sadržaj monomernih antocijana (MAC) je određen pH diferencijalnom metodom (Rockenbach et al., 2012). Uzorci su adekvatno razblaženi sa pripremljenim pufernim rastvorima kalijum-hlorida (0,025 mol/L; pH=1,0), i natrijum acetata (0,4 mol/L; pH=4,5). Nakon toga, absorbance pripremljenih uzoraka su merene na dve različite talasne dužine, 520nm i 700nm. Sadržaj ukupnih monomernih antocijana je izražen u mg ekvivalentima malvidin-3-*O*-glukozida na 100g suve mase uzorka komine grožđa (mg (M3G)/100g SM) i izračunat prema sledećim jednačinama:

$$A = (A520 - A700)pH1{,}0 - (A520 - A700)pH4{,}5 \quad \textbf{(8)}$$

$$MAC\ \left(\frac{mg}{L}\right) = (A \times MW \times DF \times 1000)/(\varepsilon \times l) \quad \textbf{(9)}$$

$$MAC\ \left(\frac{mg}{100g}\right) = \frac{\left[\frac{MAC\left(\frac{mg}{L}\right)}{1000}\right]}{m} \times 100 \quad \textbf{(10)}$$

Gde: *A*-predstavlja izmerenu absorbancu na definisanim talasnim dužinama; *DF*-predstavlja faktor razblaženja uzorka; *MW*-molekulska masa malvidin-3-*O*-glukozida (493,5); i $\mathcal{E}$ je molarna absorptivnost malvidin-3-*O*-glukozida (28000).

3.8.1.2. Sadržaj proteina

Liofilisani fermentisani funkcionalni aditivi su prvo odmašćeni Folch-ovom metodom. Ukratko, liofilisani prahovi (1g) su mešani sa 20mL rastvarača metanol:hloroform (1:2 v/v) i ostavljeni na mehaničkom šejkeru 2h. Nakon toga, uzorci su centrifugirani 3000*g*, 10min. Supernatant je odliven, dok je čvrsti deo ostavljen u kapeli kako bi se uklonio višak rastvarača. Odmašćeni uzorci su zatim fino sprašeni i korišćeni za određivanje sadržaja proteina i elektroforetsku karakterizaciju.

Odmašćeni liofilisani fermentisani aditivi i sprej osušeni nefermentisani aditivi (20mg) su rekonstituisani u 10mL kalijum-fosfatnog pufera pH 7,0, intenzivno promešani na vorteksu i korišćeni za određivanje sadržaja proteina u uzorcima, prema metodi koju je razvio Bradford (1976). Razblaženi supernatant (100µL) je pomešan sa 5mL Bradford-ovog reagensa, mešavina intenzivno promešana na vorteksu i ostavljena 20min na sobnoj temperaturi. Nakon toga, uzorci su ponovo intenzivno promešani na vorteksu i absorbanca je merena na 595nm. Sadržaj proteina u uzorcima je određen korišćenjem BSA standardne prave i izražen kao g ekvivalenti BSA u 100g polaznog praškastog uzorka.

3.8.1.3. Antioksidativna svojstva

3.8.1.3.1. Sposobnost redukcije Fe^{3+} jona (redukujuća moć) - FRP

Redukujuća moć uzoraka je određena prema metodi koju su opisali Medouni-Adrar et al. (2015). Alikvot razblaženih uzoraka (250µL) je pomešan sa 250µL 0,2M fosfatnog pufera pH=6,6 i 250µL 1% rastvora kalijum-fericijanida. Smeša je potom inkubirana 20min, na temperaturi od 50°C. Posle inkubacije, smeši je dodato 250µL 10% trihlorsirćetne kiseline, uzorci su vorteksovani i potom centrifugirani na 17000*g*, 5min (Sigma 201M Centrifuge, Osterode am Harz, Nemačka). Nakon toga, 500µL supernatanta je mešano sa 500µL milliQ vode i 100µL 0,1% $FeCl_3$. Nakon 10min izmerena je absorbanca na 700nm, korišćenjem Shimadzu spektrofotometra. Veća absorbanca reakcione smeše ukazuje na jaču redukujuću moć (Gülçin et al., 2004). Za neke uzorke ukupna redukujuća moć je izražena kao µg ekvivalenti askorbinske kiseline (AA) po mL uzorka (µg (AA)/mL).

3.8.1.3.2. Sposobnost sakupljanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala - $ABTS^{\bullet+}$ test

Procena sposobnosti sakupljanja/uklanjanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala je analizirana prema metodi koju su prethodno opisali Arnao et al. (2001). Osnovni $ABTS^{\bullet+}$ rastvor (7mM vodeni rastvor ABTS-a (2,2-azino-bis/3-etil-benotiazolin-6-sulfonska kiselina) pomešan sa 2,45mM kalijum-persulfatom), je ostavljen da stoji na tamnom mestu 16h. Nakon toga, pripreman je radni rastvor $ABTS^{\bullet+}$, razblaživanjem osnovnog rastvora metanolom, tako da se dobije absorbanca rastvora između 0,7 i 0,8. Pripremljen radni rastvor (1mL) je potom mešan sa 10µL uzorka i nakon 7min merena je absorbanca na 734nm. Procenat sakupljenih radikala za standard i uzorke su izračunati prema jednačini:

$$ABTS \bullet +scavenging\ activity(\%) = \frac{Ac-As}{Ac} \times 100 \quad \textbf{(11)}$$

Gde: *Ac*-predstavlja absorbancu $ABTS^{\bullet+}$ radnog rastvora; *As*-predstavlja absorbancu uzorka ili rastvora standarda pomešanog sa $ABTS^{\bullet+}$ radnim rastvorom.

Za konstrukciju standardne krive korišćeni su pripremljeni rastvori askorbinske kiseline u rasponu od 10 do 100µg/mL. Aktivnost sakupljanja slobodnih radikala je izražena kao ekvivalenti askorbinske kiseline (AA), odnosno µg AA po mL uzorka (µg (AA)/mL).

3.8.1.3.3. Sposobnost heliranja jona Fe^{2+} - FCC

Sposobnost heliranja jona gvožđa je određena prema metodi koju su opisali Stanisavljević et al. (2015). Alikvot uzorka (200µL) je pomešan sa 740µL milliQ vode i 20µL 2mM $FeSO_4$. Uzorci su vorteksovani i ostavljeni 30min, na sobnoj temperaturi. Nakon toga, smeši je dodato 200µL 5mM ferozina i 10min kasnije očitana je absorbanca uzorka na 562nm, korišćenjem Shimadzu spektrofotometra. Slepa proba je uporedo pripremana i sadržala je milliQ vodu umesto alikvota uzorka. Sposobnost heliranja je izračunata prema sledećoj formuli:

$$Fe^{2+} chelating\ capacity\ (\%) = \left(\frac{(Ac-As)}{Ac}\right) \times 100 \quad \textbf{(12)}$$

Gde: ***Ac***-predstavlja absorbancu slepe probe; ***As***-predstavlja absorbancu uzorka.

Za neke uzorke sposobnost heliranja je izražena kao µg ekvivalenti etilendiaminotetrasirćetne kiseline (EDTA) po mL uzorka (µg (EDTA)/mL).

3.8.1.3.4. Ukupni antioksidativni kapacitet - TAC

Ukupni antioksidativni kapacitet ili *in vitro* fosfomolibden redukujuća moć uzoraka je određena prema metodi koju su predložili Prieto et al. (1999). Alikvot razblaženih uzoraka (0,3mL) je pomešan sa 3mL fosfomolibden reagensa (pripremljen mešanjem 0,6M sumporne kiseline, 28mM natrijum-fosfata i 4mM amonijum-molibdata). Epruvete sa reakcionom smešom su fiksirane i inkubirane na 95°C, 90min. Nakon toga, uzorci su ohlađeni i merena je absorbanca na 695nm. U isto vreme je pripremana slepa proba, koja sadrži milliQ vodu umesto uzorka. Za konstrukciju kalibracione krive su korišćeni rastvori askorbinske kiseline (AA) i ukupni antioksidativni kapacitet je izražen u µg ekvivalentima AA po mL uzorka (µg (AA)/mL).

3.8.1.3.5. Sposobnost sakupljanja $DPPH^{\bullet}$ radikala – $DPPH^{\bullet}$ test

Sposobnost uklanjanja $DPPH^{\bullet}$ radikala je određena po metodi koju su opisali Oliveira et al. (2010), sa malim modifikacijama. Zapremina uzorka od 105µL je pomešana sa 840µL prethodno pripremljenog $DPPH^{\bullet}$ radnog rastvora. Nakon 30min inkubacije u mraku, merena je absorbanca na 515nm. Uporedo je pripremana i kontrolna proba, koja se sastoji od mešavine $DPPH^{\bullet}$ radnog rastvora sa milliQ vodom umesto uzorka. Procenat sakupljenih radikala za standard i uzorke je izračunati prema jednačini:

$$DPPH \bullet\ scavenging\ activity(\%) = \frac{Ac-As}{Ac} \times 100 \quad \textbf{(13)}$$

Gde: ***Ac***-predstavlja absorbancu $DPPH^{\bullet}$ radnog rastvora pomešanog sa milliQ vodom; ***As***-predstavlja absorbancu uzorka ili rastvora standarda pomešanog sa $DPPH^{\bullet}$ radnim rastvorom.

Aktivnost sakupljanja slobodnih radikala je izražena kao ekvivalenti askorbinske kiseline (AA), odnosno µg AA po mL uzorka (µg (AA)/mL).

3.8.1.3.6. Merenje relativne sposobnosti sakupljanja $DPPH^{\bullet}$ radikala - $DPPH^{\bullet}$ RDSC

Merenje relativne sposobnosti sakupljanja $DPPH^{\bullet}$ radikala je sprovedeno prema metodi koju su opisali Cheng et al. (2006). Reakciona smeša uzoraka (100µL) se sastojala od supernatanta razblaženog metanolom. Korišćeno je pet različitih koncentracija ekstrakata i Troloksa (10, 20, 40, 60 i 80µL). Zatim je u svaki bunarić mikrotitarske ploče dodato po 100µL 200µmol/L $DPPH^{\bullet}$ radikala pripremljenih u metanolu. Slepa proba je sadržala 200µL metanola, dok je kontrolni uzorak pripremljen mešanjem 100µL metanola i 100µL rastvora $DPPH^{\bullet}$ radikala. Absorbance uzoraka su neprekidno očitavane svakog minuta tokom vremenskog interval od 90min, na talasnoj dužini od 515nm. Procenat sakupljenih $DPPH^{\bullet}$ radikala za svaku vremenski zavisnu tačku je računat prema jednačini:

$$DPPH^{\bullet}\ radical\ quenched\ (\%) = \left[1 - \frac{(As-Ab)}{(Ac-Ab)}\right] \times 100 \quad \textbf{(14)}$$

Vrednosti procenta sakupljenih DPPH• radikala u različitim vremenskim tačkama za svaki ekstrakt i standard su ucrtane u odnosu na vreme reakcije. Površina ispod krive (AUC) je određena prema sledećoj jednačini:

$$AUC = 0{,}5 \times f0 + (f1 + f2 + f3 + \cdots + fi - 1) + 0{,}5 \times fi \quad \textbf{(15)}$$

Gde: f_0 predstavlja procenat DPPH• radikala sakupljenih na početku merenja; a *fi* predstavlja procenat DPPH• radikala sakupljenih u reakcionom vremenu *i*. Relativna sposobnost sakupljanja DPPH• radikala je izražena kao mmol ekvivalenti Troloksa (TE) po g SM uzorka (mmol TE/g SM) i izračunata prema jednačini:

$$DPPH \bullet RDSC = \frac{AUCs}{AUCtroloks} \times \frac{Mtroloks}{Vuzorka} \quad \textbf{(16)}$$

3.8.1.3.7. Sposobnost uklanjanja vodonik peroksida - HPS aktivnost

Sposobnost vodenih ekstrakata komine i njenih konstituenata da uklanjanja vodonik peroksida je određena prema metodi koju su opisali Hu et al. (1992). U ovoj metodi je primenjen luminol-H_2O_2 sistem. Luminiscentna reakcija je započeta mešanjem razblaženih ekstrakata sa 1mL rastvora koji sadrži 100mmol/L luminola, rastvorenog u 50mmol/L karbonatnom puferu, pH=9,4. Emisija svetlosti je zabeležena neposredno nakon mešanja komponenti i trajala je 200s sa 15s kintetičkog intervala između merenja. U kontrolnom uzorku, rastvori su zamenjeni karbonatnim puferom i zabeležena je interferentna luminiscencija bez vodonik-peroksida. Površina ispod dobijenih krivih (za različite koncentracije ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC)), predstavlja relativni intenzitet luminiscencije (CL). Sposobnost uklanjanja vodonik peroksida je izračunata prema sledećoj jednačini:

$$HPS\ aktivnost\ (\%) = \left[\frac{(CLc - CLo) - (CLs - CLo)}{CLc - CLo}\right] \cdot 100 \quad \textbf{(17)}$$

Gde: *CLc*-predstavlja relativnu luminiscenciju kontrole; *CLs*-predstavlja relativnu luminiscenciju uzoraka; a CL_0 predstavlja interferentnu luminiscenciju. Sposobnost uklanjanja vodonik-peroksida je izražena kao EC_{50} vrednost (polovina od maksimalno efektivne koncentracije ukupnih fenolnih jedinjenja).

3.8.1.4. Citotoksična svojstva

3.8.1.4.1. MTT test

Citotoksična svojstva ekstrakata komine grožđa na Caco-2 ćelijama su određena kroz primenu mikro-tetrazolijum [MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid] testa (Mosmann, 1983), koji prati perživljavanje ćelija na osnovu količine redukovanog MTT reagensa (žuta tetrazolijum so) u metabolički aktivnim ćelijama (MTT se redukuje do formazana ljubičaste boje). Posle 24h od inokulacije (konfluentnost, 40-60%), ćelije su tretirane sa različitim koncentracijama ukupnih fenolnih jedinjenja iz ekstrakata komine. Kontrolnim ćelijama je dodat samo hranljivi medijum. Sve tretirane ćelije su zatim inkubirane dodatnih 24h i 48h. Posle inkubacije, dodat je MTT reagens u finalnoj koncentraciji od 0,5mg/mL. Uzorci su dodatno inkubirani 4h u atmosferi vazduha obogaćenim 5% CO_2, na 37°C u mraku. Formazan kristali nastali aktivnošću živih ćelija (redukuju MTT reagens), su rastvoreni dodavanjem 10g/100mL natrijum-dodecil sulfata (SDS) u 0,01% HCl. Količina rastvorenog formazana je proporcinalna broju živih ćelija. Bunarići su zatim inkubirani na 37°C preko noći. Adsorbcija rastvorenih kristala formazana je izmerena korišćenjem Plate Reader Infinite 200 pro, na 570nm (maksimum apsorbcije). Absorbanca dobijena očitavanjem na 570nm, predstavlja meru metaboličke aktivnosti ćelija, koja je izračunata prema jednačini:

$$Metabolička\ aktivnost\ (\%) = \left(\frac{Atć}{Antć}\right) \times 100 \quad \textbf{(18)}$$

Gde: *Atć*-predstavlja absorbnacu uzorka kod kojih su ćelije tretirane ekstraktima; a *Antć*- predstavlja absorbnacu uzorka kod kojih su ćelije nisu tretirane ekstraktima. Prema tome, rezultati su izraženi kao % promena u metabolički aktivnim tretiranim ćelijama u poređenju sa kontrolnom grupom netretiranih ćelija.

3.8.1.4.2. Test sposobnosti sakupljanja unutarćelijskih reaktivnih vrsta - CAA

Unutarćelijska antioksidativna aktivnost je određena prema metodi koju su predložili Wolfe and Liu (2007) sa određenim modifikacijama (Kellett et al., 2018). U testu su korišćene ćelije humanog epitelnog kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2 ćelije, European Collection of Cell Cultures-ECACC No. 86010202), kao najpogodnije za merenje efektivnosti dijetetskih antioksidanata (Kellett et al., 2018). Kultivacija i održavanje ćelija je sprovedena u Dulbecco's Modified Eagle Medium-u prema Sánchez et al. (2010). Ćelije su kultivisane u inkubatoru u atmosferi vazduha obogaćenom 5% CO_2, na 37°C. Caco-2 ćelije su uzgajane u plejtovima sa 24 bunarića, sve dok se ne formiraju monoslojevi bez vidljive diferencijacije. Posle toga, monoslojevi su odvojeni od površine korišćenjem 0,05% tripsin-EDTA (Sigma). Ćelije su potom prebačene ($6x10^4$ ćelija po bunariću) u plejtove ravnog dna sa 96 bunarića (Corring, VWR, Suwanee, USA) i gajene do konfluenata. Nakon toga je uklonjen medijum za kultivaciju, a ćeliju su isprane sa PBS puferom pH=7,0, inkubirane sa 50µL 25µmol/L DCFH-DA (2,7-dihlorofluorescin diacetat) i 50µL medijuma za rast koji je sadržao vodene ekstrakte komine grožđa. Kontrolni uzorak se sastojao od 50µL rastvora DCFH-DA i 50µL medijuma. Sadržaj u plejtovima je potom inkubiran 1h u inkubatoru u atmosferi vazduha obogaćenom 5% CO_2, na 37°C. Posle inkubacije, ćelije su brzo isprane dva puta sa PBS puferom i nakon toga je iniciran oksidativni stres, dodavanjem 100µL 600µmol/L ABAP-a (2,2-azobis(2-amidinopropan)dihidrohlorid), koji generiše stvaranje slobodnih radikala. Odmah nakon iniciranja oksidativnog stresa je započeto kinetičko merenje koje je trajalo 1h, korišćenjem ekscitacione talasne dužine od 485nm i merenje emisije na 520nm (Infinite® 200, Tecan, Austrija), na svakih 90s. Kontrole su sadržale ćelije kojima je dodat DCFH-DA i ABAP, ali nisu bile prethodno tretirane ekstraktima komine grožđa. Prikupljeni podaci su obrađeni i određena je površina ispod krive (AUC) za svaki uzorak i kontrolu prema sledećoj formuli:

$$AUC = \left[\frac{F1}{2} + sum(F2{:}Fn-1) + \frac{Fn}{2}\right] \times CT \tag{19}$$

Gde: F_1-predstavlja polaznu fluorecentnu crvenu boju u prvom merenju; *Fn*-predstavlja fluorescenciju zabeleženu u poslednjem merenju; *CT*-vreme kinetičkog ciklusa u minutima. Neto *AUC* vrednosti su dobijene oduzimanjem blank *AUC* vrednosti od *AUC* vrednosti uzoraka i kontrole. Sposobnost sakupljanja unutarćelijskih reaktivnih vrsta (*CAA*) se dobija prema formuli:

$$CAA = 100 - \left(\frac{netoAUCs}{netoAUCc}\right) \times 100 \tag{20}$$

Vrednost *CAA* je izražena kao koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja (mgTPC/mL ekstrakta) potrebna da bi se izazvalo 50% inhibicije fluorescencije, tj. vrednost EC_{50}, koja je izračunata pomoću Quest Graph™ EC50 Calculator softvera.

3.8.2. Hromatografska analiza fenolnih jedinjenja

3.8.2.1. UHPLC-DAD MS/MS analiza fenolnih jedinjenja

Razdvajanje i kvantifikacija fenolnih jedinjenja od interesa je izvedena pomoću Dionex Ultimate 3000 UHPLC uređaja koji je opremljen sa DAD (diode array detector) detektorom i TSQ Quantum Access Max masenim spektrometrom sa trostrukim kvadrupol analizatorom (ThermoFisher Scientific, Bazel, Švajcarska), prema metodi koju su prijavili Gašić et al. (2015). Eluiranje je izvedeno na Syncronis C18 koloni (100×2.1 mm, 1.7 µm veličina pora), na 40°C. Mobilna faza se sastojala od sledećih reagenasa: voda+0,1% mravlja kiselina (A) i 100% acetonitril (MS čistoće) (B), koji su primenjeni u sledećoj gradijent koncentraciji: 5% B, 2.0 min; 5–95% B, 2.0–14.0 min; 95-5% B, 14.0–14.2 min; i 5% B do 20 min. Brzina protoka mobilne faze je bila podešena na 0,3 mL/min, a detekcione talasne dužine su bile 254nm i 280nm. Injektovana zapremina uzorka je bila 5µL.

TSQ Quantum Access Max tripl-kvadrupol maseni spektrometar je opremljen sa elektrosprej jonskim izvorom (HESI) i ima podešene sledeće parametre: temperatura isparivača 200°C, napon spreja 5 kV, pritisak N_2 40 AU, pritisak jonskog gasa 1 AU, pritisak pomoćnog gasa 8 AU, i kapilarna temperatura

300°C. Maseni spektrometar je snimao mase u negativnom modu, u *m/z* opsegu od 100 do 1000. Za kvalitativnu analizu ciljanih fenolnih jedinjenja su korišćeni višestruki maseno spektroskopski modusi skeniranja, kao što su poptuno skeniranje (FS) i skeniranje produkt jona (PIS). Kolizionoindukovana fragmentacija je izvedena korišćenjem argona kao kolizionog gasa, dok je energija sudara varirala u zavisnosti od jedinjenja. Kvantitativna analiza je izvedena tako što je za svaki standard snimljen molekulski jon i dva karakteristična MS^2 fragmenta, koji su prethodno definisani kao dominantni u PIS eksperimentima. Za kontrolu instrumenta je korišćen Xcalibur softver (verzija 2.2.). Fenolna jedinjenja su identifikovana direktnim poređenjem sa komercijalnim standardima. Sadržaj svakog fenolnog jedinjenja je izračunat integracijom površine pikova i izražen kao µg/L. U slučaju poznatih masa uzoraka koje su korišćene za ekstrakciju, sadržaj fenolnih jedinjenja je izražen u mg/kg.

Tabele P2 i P5 pokazuje listu kvantifikovanih fenolnih jedinjenja zajedno sa njihovim pratećim parametrima: limitom detekcije (LOD), limitom kvantifikacije (LOQ), koeficijentom korelacije (r^2) i opsegom linearnosti.

3.8.2.2. UHPLC Orbitrap MS^4 analiza fenolnih jedinjenja

Razdvajanje, identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja je takođe izvedena primenom UHPLC uređaja koji je opremljen kvaternarnom Accela 600 pumpom i Accela autosemplerom (ThermoFisher Scientific, Bremen, Nemačka). UHPLC uređaj je povezan sa lineranim jon trap-Orbitrap masenim spektrometrom (LTQ OrbiTrap MS) koji sadrži elektrosprej jonski izvor (HESI-II, ThermoFisher Scientific, Bremen, Nemačka). Sva fenolna jedinjenja su analizirana u negativnom jonizacionom modu, osim antocijana koji su analizirani u pozitivnom jonizacionom modu. Protokol za analizu antocijana su prethodno opisali Pantelić et al. (2016). Syncronis C18 kolona (100x2,1 mm; 1,7µm veličina pora; 40°C), je korišćena za razdvajanje svih fenolnih jedinjenja. Mobilna faza se sastojala od sledećih reagenasa: voda+0,1% mravlja kiselina (A) i 100% acetonitril (B); dok je linaerni gradijent eluiranja bio: 5% B, 0.0–1.0 min; 5-95% B, 1.0–14.0 min; 95-5%, 95-5% B, 14.0–14.1 min; i 5% B, još 6 min. Podešena brzina protoka je bila 0,250 mL/min, dok je injekciona zapremina uzorka bila 5µL.

Parametri jonskog izvora su prethodno opisani u literaturi (Božunović et al., 2018). MS spektri su dobijeni akvizicijom *m/z* opsega od 100-1000. Rezolucija skeniranja je podešena na 30.000. Joni od interesa su izolovani u jon trap-u sa izolacionom širinom od 5ppm i aktivirani su na nivou od 35% kolizione energije. Xcalibur softver (verzija 2.1) je korišćen za kontrolu instrumenta, prikupljanje i analizu podataka. Fenolna jedinjenja su identifikovana na osnovu njihove monoizotopne mase i MS^4 fragmentacije, a potvrđena su korišćenjem prethodno prijavljenih podataka MS fragmentacije pronađenih u literaturi (Rockenbach et al., 2012). Detektovana fenolna jedinjenja su kvantifikovana korišćenjem komercijalno dostupnih standarda, a njihov sadržaj je izražen u µg/L ili mg/kg (uzorci poznatih masa). Svi standardi fenolnih jedinjenja su bili analitičke čistoće (od 95% do 99% čistoće) (Fluka AG, Buchs, Švajcarska). Za fenolna jedinjenja za koje nisu bili dostupni odgovarajući standardi, sprovedena je identifikacija na osnovu njihove tačne molekulske mase, specifične MS fragmentacije i literaturnih podataka (Oliveira et al., 2015; Pantelić et al., 2016; Peixoto et al., 2018; Zhang et al., 2020). Zbog nedostatka specifičnih standarda, sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja je izražen kao µg ekvivalenti dominantnog jedinjenja u odgovarajućoj klasi fenolnih jedinjenja, po kg SM. Tačne mase komponenata su izračunate korišćenjem ChemDraw softvera (verzija 12.0, CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

3.8.3. Elektroforetske tehnike

U ovoj doktorskoj disertaciji su korišćene tri elektroforetske tehnike: (1) SDS poliakrilamidna gel elektroforeza u redukujućim uslovima (SDS-R-PAGE); (2) SDS poliakrilamidna gel elektroforeza u neredukujućim uslovima (SDS-NR-PAGE); i (3) Nativna poliakrilamidna gel elektroforeza (Native-PAGE), za karakterizaciju proteinskog profila pripremljenih sprej osušenih i liofilisanih prahova,

prema metodologiji koju su prethodno detaljno opisali Pesic et al. (2012). SDS-PAGE u redukujućim (R) i neredukujućim (NR) uslovima su izvedene korišćenjem gela za razdvajanje (12,5%w/v; pH = 8,85), gela za koncentrisanje (5% w/v; pH = 6,8) i radnog Tris-glicinskog pufera (0,05M Tris (pH = 8,5); 0,19M glicin; i 0.1% w/v SDS). Native-PAGE je sprovedena korišćenjem 7% (w/v) gela za razdvajanje; 5% (w/v) gela za koncentrisanje; i radnog Tris-glicinskog pufera (0,025 M Tris (pH = 8,3); i 0,19 M glicin). Za formiranje gelova su korišćene ploče dimenzija 14,5x16,5x1,5mm. Uređaj za elektroforezu (LKB, Švedska), predstavljali su: vertikalna elektroforetska jedinica (LKB 2001-001), rashladna jedinica (Multitemp II) sa konstantnom temperaturom 10°C i izvor napona (Makro Drive).

Puferi za uzorke:

a) ***SDS-R-PAGE***: 0,055M Tris-HCl (pH = 6,8); 2% (w/v) SDS; 7% (v/v) glicerol; 0,0025% (w/v) bromfenol plavo; i 5% β-mercaptoetanol;

b) ***SDS-NR-PAGE***: 0,055M Tris-HCl (pH = 6,8); 2% (w/v) SDS; 7% (v/v) glicerol; i 0,0025% (w/v) bromfenol plavo;

c) ***Native-PAGE***: 0,03M Tris-HCl (pH = 8,0); 10% (v/v) glicerol; i 0,0025% (w/v) bromfenol plavo.

Po 25µL (100µL za digestivni koktel) prethodno pripremljenih uzoraka u puferu za uzorke su nanošena u bunariće gela. Struja je bila konstantna, i to 30mA po gelu sve dok polipeptidi nisu ušli u gel za razdvajanje kada je struja podignuta na 45mA po gelu i zadržana do kraja analize. Nakon što je analiza završena, gelovi su bojeni 45min, korišćenjem Coomassie blue R250 boje (3,90% (w/v) trihlorsirćetna kiselina (TCA); 17% (v/v) metanol; i 6% (v/v) sirćetna kiselina). Nakon toga, gelovi su odbojeni korišćenjem rastvora za odbojavanje (18% (v/v) etanol; i 8% (v/v) sirćetna kiselina), skenirani i analizirani korišćenjem SigmaGel softvera (SigmaGel software version 1.1, Jandal Scientific, San Rafael, CA, USA) i GelAnalyzer 19.1. softvera. Standard molekulskih masa (Marker Kit Standard; Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) uključuje: fosforilaza B (94,0 kDa), bovin serum albumin (67,0 kDa), karbonska anhidraza (30,0 kDa), sojin tripsin inhibitor (20,1 kDa) i α-LA (14,4 kDa). Standard kazeina je dobijen rekonstitucijom mešavine liofilisanih standarda: αs-CN, β-CN, κ-CN, α-LA i β-CN (Sigma Aldrich), u odgovarajućem puferu za uzorke.

3.8.4. ATR-FTIR spektroskopija

ATR-FTIR spektri liofilisanih i sprej osušenih prahovi su snimani na Nicolet™ iS™ 10 FT-IR spektrometru (Thermo Fisher SCIENTIFIC) koji je opremljen sa Smart iTR™ Attenuated Total Reflectance (ATR) modulom. Dobijeni spektralni podaci su rezultat 32 skena po spektru, u apsorbcionom modu od 400-4000cm^{-1}.

3.8.5. Raman spektroskopija

Raman spektri liofilisanih i sprej osušenih prahova su snimani na XploRA Raman spektrometru (Horiba JobinYvon, Japan), sa pratećim LabSpec6 softverom (Horiba JobinYvon, Japan). Talasna dužina laserske ekscitacije je bila 532nm, a rešetka spektrometra je bila 1800gr/mm. Laser je fokusiran na uzorak pomoću udaljenog objektiva mikroskopa (uvećanja 50 puta), dok je vreme prikupljanja podataka bilo 20s sa 5 akumulacija.

3.8.6. SEM mikroskopija

Morfologija odabranih liofilisanih i sprej osušenih prahova je ispitana korišćenjem skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM)(JEOL JSM-6390LV, Tokyo, Japan). Neposredno pre snimanja, uzorci su postavljeni na metalne stubiće i napareni zlatom u komori za raspršavanje (BALTEC SCD 005), 100s, na 30mA.

3.9. Tehno-funkcionalna svojstva

3.9.1. Određivanje emulgujućih svojstava

Emulgujuća svojstava pripremljenih rastvora su određena prema metodi koju su prethodno razvili Pearce and Kinsella (1978). Ukratko, 45mL rastvora (rekonstituisani prahovi) je pomešano sa 15mL suncokretovog ulja i mešavina je intenzivno mešana tokom 1min u homogenizatoru (MSE-Homogeniser, Measuring & Scientific Equipment ltd., Spenser st., London, S.W1, England), pri najvećoj brzini. Nakon toga, sa dna kivete je odpipetirano 50µL emulzije i dodato u 5mL 0,1% rastvora SDS-a. Mešavina je intenzivno vorteksovana, a potom je izmerena absorbanca na 500nm (A_o). Postupak je ponovljen i nakon 10min od momenta formiranja emulzije (A_{10}).

Indeks stabilnosti emulzije (ESI) je računat prema sledećoj jednačini:

$$ESI\ (min) = Ao \cdot \left(\frac{\Delta t}{\Delta A}\right) \quad \textbf{(21)}$$

Indeks aktivnosti emulzije (EAI) je računat prema sledećoj jednačini:

$$EAI\ (m^2/g) = 2T \cdot \left(\frac{Ao \cdot F}{c \cdot \phi \cdot 10000}\right) \quad \textbf{(22)}$$

Gde je: Δt-vremenski interval (10min); ΔA=(A_o-A_{10}); T=2,203; F-faktor razblaženja (100); c-koncentracija proteina mleka (g/mL); ϕ=0,25.

3.9.2. Određivanje penivih svojstava

Peniva svojstva su određena prema metodi koju su prethodno opisali Kostić et al. (2015). Ukratko, 30mL rastvora (rekonstituisani prahovi) (V_0), je sipano u graduisanu kolonu. Nakon toga, u rastvor je uvođen vazduh (6dm^3/min) kroz degazer (Waters, Milford, MA, USA), postavljen na dnu kolone (1min). Nakon toga je očitan nivo do kog se podigla pena u koloni (V_1), kao i nivo pene nakon 3min (V_3).

Kapacitet pene (KP) je računat prema sledećoj jednačini:

$$KP\ (\%) = \left(\frac{V1 - V0}{V0}\right) \cdot 100 \quad \textbf{(23)}$$

Stabilnost pene (SP) je računata prema sledećoj jednačini:

$$SP(\%) = \left(\frac{V3 - V0}{V0}\right) \cdot 100 \quad \textbf{(24)}$$

Gde je: V_0-polazna zapremina rastvora u graduisanoj koloni (30); V_1-zapremina pene u graduisanoj koloni nakon uvođenja vazduha; i V_3-zapremina pene u graduisanoj koloni 3min nakon uvođenja vazduha.

3.10. Statistička obrada podataka

Analize u okviru ove doktorske disertacije su vršene u dva ili tri ponavljanja, zavisno od primenjene metodologije. Svi podaci su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija. Za utvrđivanje statistički značajnih razlika između srednjih vrednosti korišćeni su *t*-test, $p<0,05$ (StatSoft Co., Tulsa, OK, USA) i analiza varijanse (*One-way* ANOVA i *Two-way* ANOVA) sa *post hoc* Tukey's testom, $p<0,05$ (GraphPad Prism 6, San Diego, CA, USA). Za utvrđivanje korelacija korišćen je Pearson's korelacioni koeficijent (*r*), na nivou značajnosti $p<0,05$ i $p<0,1$ (StatSoft Co., Tulsa, OK, USA). Grafici su sređeni u GaphPad Prism 6 softveru (San Diego, CA, USA).

Za PCA (Analiza glavnih komponenti) i HCA (Hijerarhijska klaster analiza) analizu masnih kiselina i šećera je korišćen PLS ToolBox, v. 6.2.1, Matlab 7.12.0 (R2011a) softver. Svi podaci su automatski skalirani pre multivarijantne analize.

ATR-FTIR i Raman spektri svih uzoraka su eksportovani u Unscrambler X softver (version 10.4; CAMO AS, Trondheim, Norway). Nakon vizuelne kontrole, rađen je „pre-processing“ spektara, što

uključuje Standard Normal Variate (SNV)(uklanjanje rasejanja), Savitzky-Golay smoothing, normalizaciju i second Savitzky-Golay derivatizaciju. Nakon predhodne obrade, izvedena je analiza glavnih komponeneti (PCA analiza) za nekoliko karakterističnih regiona (amid I, II, III, fingrprint i lipidni region). Cilj PCA je da ispita da li postoji tendencija grupisanja ili diskriminacije objekata (uzoraka) (grafik skorova (objekata)) i koje varijable (talasni brojevi) tome doprinose (grafik varijabli).

4. Rezultati i diskusija

4.1. Karakterizacija brašna semenki i pokožica izdvojenih iz nefermentisane komine

4.1.1. Tehnološki parametri analiziranog grožđa

Parametri kao što su sadržaj šećera, sadržaj ukupnih kiselina i pH pulpe se najčešće koriste za procenu tehnološke zrelosti grožđa. Navedeni parametri su jako važni jer određuju kvalitet vina i utiču na sastav i kvalitet ekstrakta semenke (Bombai et al., 2017; Lachman et al., 2015). Tehnološki parametri zavise od sorte, regiona u kom se grožđe uzgaja i vinogradarske prakse (W. Han et al., 2019; Maante-Kuljus et al., 2019; Maante-Kuljus et al., 2015). Kao što se može videti u Tabeli 4.1, sadržaj ukupnih šećera, sadržaj ukupnih kiselina i pH analiziranih bobica sedam sorti grožđa, su bili redom u opsegu od: 19,3-25,5 °Bx; 6,56-10,78 gVK/L; i 3,36-3,85. Ovi rezultati su bili uporedivi sa rezultatima drugih studija dobijenih za grožđe ubrano u tehnološkoj zrelosti (Bombai et al., 2017; W. Han et al., 2019; Maante-Kuljus et al., 2019; Maante-Kuljus et al., 2015).

Tabela 4.1. Tehnološki parametri uzoraka grožđa koji su dalje analizirani u okviru doktorske disertacije

Parametri Uzorak	Sadržaj šećera °Bx (g saharoze/100g)	Sadržaj ukupnih kiselina (g VK/L)	pH
Smederevka	19,5±0,3[a]	10,78±0,94[a]	3,36±0,02[a]
Italijanski Riesling	23,6±0,2[b]	6,56±0,1[b]	3,81±0,01[b]
Tamjanika	22,3±0,5[c]	7,03±0,94[b]	3,83±0,01[b]
Muscat Hamburg	20,2±0,2[ae]	7,50±0,1[bc]	3,76±0,02[c]
Prokupac	19,3±0,1[a]	8,43±0,1[cd]	3,85±0,01[b]
Merlot	25,5±0,1[d]	9,37±0,2[de]	3,56±0,01[d]
Cabernet Sauvignon	21,1±0,9[e]	10,31±1,88[ae]	3,40±0,005[a]

Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja (n=3) i prikazane kao srednje vrednosti ±standardna devijacija. Vrednosti koje su označene sa istim slovom u istoj koloni nisu statistički značajno različite prema *Tukey's* testu, (p<0,05). Skraćenice: VK-vinska kiselina; °Bx-jedinica za izražavanje sadržaja šećera, stepen Briksa.

4.1.2. Profil masnih kiselina u brašna nefermentisane semenke

Profil masnih kiselina i relativan sadržaj pojedinačnih masnih kiselina (%) u uljima dobijenih iz brašna semenki sedam različitih sorti grožđa, prikazani su u Tabeli 4.2. Na osnovu dobijenih rezultata ukupno je identifikovano dvanaest masnih kiselina u uzorcima semenki autohtonih i internacionalnih sorti grožđa. U svim ispitivanim uzorcima pronađene su sledeće masne kiseline: linolna, oleinska, stearinska i palmitinska. Linolna kiselina (nezasićena masna kiselina) je bila dominantna i njen relativni sadržaj je varirao od 61,15±0,36 do 83,47±1,15%, zavisno od sorte. Najveća koncentracija linolne kiseline je otkrivena u ulju semenki internacionalnih sorti grožđa, kao što su Muscat Hamburg i Italijanski Riesling. Među autohtonim sortama, semenka Tamjanike je bila najbolji izvor nezasićenih masnih kiselina. Slične rezultate su potvrdili i drugi autori, koji su saglasni da je linolna kiselina najzastupljenija masna kiselina u ulju semenki različitih sorti grožđa uzgajanih u Srbiji (Dabetic et al., 2020; Malićanin et al., 2014; Zdunić et al., 2019), ili drugim zemljama (Beveridge et al., 2005; Fernandes et al., 2013; Göktürk Baydar et al., 2007; Lachman et al., 2015; Lucarini et al., 2020; Lutterodt et al., 2011; Pardo et al., 2009; Szabó et al., 2021). Malićanin et al. (2014) su dobili da je sadržaj linolne kiseline u semenkama internacionalne sorte Cabernet Sauvignon uzgajane u Srbiji bio u rasponu od 73,10-75,30%. Kod različitih klonova autohtone sorte Prokupac, ovaj sadržaj se kretao u rasponu od 69 do 81% (Zdunić et al., 2019), dok je u semenkama belih autohtonih sorti grožđa Smederevka i Tamjanika udeo linolne kiseline bio redom 67,3% i 62,8% (Dabetic et al., 2020). Dalje, Lachman et al. (2015) su dobili rezultate za sadržaj linolne kiseline u opsegu od 68,10 do 78,18%, zavisno od godine berbe i sorte grožđa, dok su Beveridge et al. (2005) dobili najveći sadržaj pomenute masne kiseline u ulju semenki sorte Merlot.

Oleinska kiselina je najviše doprinela sadržaju mononezasićenih masnih kiselina, i njen sadržaj je varirao od 6,14±0,17 do 9,72±0,24%, dok je stearinska kiselina bila najzastupljenija zasićena masna kiselina u svim analiziranim uzorcima sa sadržajem od 4,1±0,07 do 8,27±0,13%. Obe masne kiseline

su registrovane u najvećoj količini kod autohtone sorte Prokupac. Međutim, u literaturi se mogu naći značajne razlike među rezultatima za sadržaj oleinske masne kiseline u ulju semenki različitih sorti grožđa. Na primer, rezultati ove studije su u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Lachman et al. (2015), dok su Pardo et al. (2009) dobili znatno veću količinu oleinske kiseline u ulju semenki crnih sorti grožđa gajenih u Španiji (16,07-24,88%), Malićanin et al. (2014) za semenke sorte Cabernet Sauvignon gajene u Srbiji (12,60-13,80%) i Dabetic et al. (2020) za semenke belih autohtonih (Smederevka i Tamjanika) i internacionalnih sorti grožđa (15,3-18,9%).

Rezultati za sadržaj palmitinske i stearinske kiseline dobijene u ovoj studiji nalaze se unutar graničnih vrednosti koje su prethodno dobili Beveridge et al. (2005), odnosno 6,35-8,62% za palmitinsku i 3,60-5,26% za stearinsku masnu kiselinu, zavisno od primenjenog ekstrakcionog sredstva i uslova ekstrakcije. Slične rezultate su takođe dobili Fernandes et al. (2013), analizirajući profil masnih kiselina ulja semenki deset autohtonih Portugalskih sorti grožđa (6,17-8,50% za palmitinsku i 4,09-5,91% za stearinsku kiselinu) i Zdunić et al. (2019) analizirajući semenke različitih klonova sorte Prokupac (3-8% za stearinsku kiselinu, i 2-4% za palmitinsku kiselinu). Međutim, u drugim studijama je pokazano da je palmitinska kiselina dominantna zasićena masna kiselina u većini ulja iz semenki grožđa (Fernandes et al., 2013; Göktürk Baydar et al., 2007; Lachman et al., 2015; Lutterodt et al., 2011; Pardo et al., 2009), što nije u saglasnosti sa ovom studijom. Pored navedenog, ulje iz semenki sorte Prokupac je sadržalo značajnu količinu linoleaidinske, eruka, behenske i *cis*-8,11,14-eikosatrienske masne kiseline u poređenju sa masnim kiselinama drugih analiziranih sorti. Ostale identifikovane masne kiseline, poznate kao „specifične-retke masne kiseline“, bile su prisutne u tragovima i njihov sadržaj često može poslužiti kao marker za karakterizaciju različitih sorti grožđa. Na primer, palmitoleinska i heptadekanska masna kiselina su identifikovane samo u ulju semenke sorte Tamjanika. Pored toga, u ulju semenki sorte Smederevka potvrđeno je prisustvo *cis*-11,14-eikosadienske masne kiseline.

4.1.2.1. Nutritivni parametri kvaliteta brašna nefermentisane semenke

Nutritivni parametri kvaliteta, kao što su ukupne zasićene MK, mononezasićene MK, polinezasićene MK i odnos NMK/ZMK, su određeni i prikazani u Tabeli 4.2. Sadržaj zasićenih MK je bio u opsegu od 8,27 (Muscat Hamburg) do 21,61% (Prokupac). Sadržaj MNMK u semenkama svih analiziranih uzoraka bio je u opsegu od 7,01 (Muscat Hamburg) do 12,97% (Prokupac), dok se sadržaj PNMK kretao u opsegu od 65,39 (Prokupac) do 84,71% (Muscat Hamburg). Prema dobijenim rezultatima, semenke različitih sorti grožđa su važan izvor masnih kiselina, pre svega polinezasićenih MK sa velikim udelom ω-6 MK. Ova studija je takođe potvrdila da su semenke grožđa deficitarne u sadržaju ω-3 MK. Poznato je da zasićene MK povećavaju LDL-holesterol i time povećavaju rizik od kardiovaskularnih bolesti (Beveridge et al., 2005). Sa druge strane, uključivanje proizvoda sa visokim sadržajem MNMK i pre svega PNMK u svakodnevnu ishranu, pokazuje pozitivan uticaj na smanjenje koronarnih bolesti srca i arterija (Kouřimská et al., 2018; Wijendran & Hayes, 2004). Dostupnost i iskorišćenje esencijalnih ω-3 i ω-6 MK u ishrani, povezana je sa normalnim fiziološkim funkcijama membrana i regulatornih ćelijskih signala (Wijendran & Hayes, 2004). Prema Göktürk Baydar et al. (2007), semenke grožđa bogate u sadržaju linolne kiseline mogu biti izuzetno važan izvor visoko vrednih MK u ishrani. Upoređivanjem sadržaja zasićenih MK i nezasićenih MK, potvrđeno je da njihov odnos ima znatno veće vrednosti od 1,6 za sve ispitivane uzorke (od 3,63 do 11,09), što ukazuje da se semenka grožđa može okarakterisati kao potencijalno dobar dodatak ishrani (WHO/FAO, 2003).

Tabela 4.2. Profil masnih kiselina (%) i nutritivni parametri kvaliteta brašna semenki izdvojenih iz neferementisane komine različitih sorti grožđa

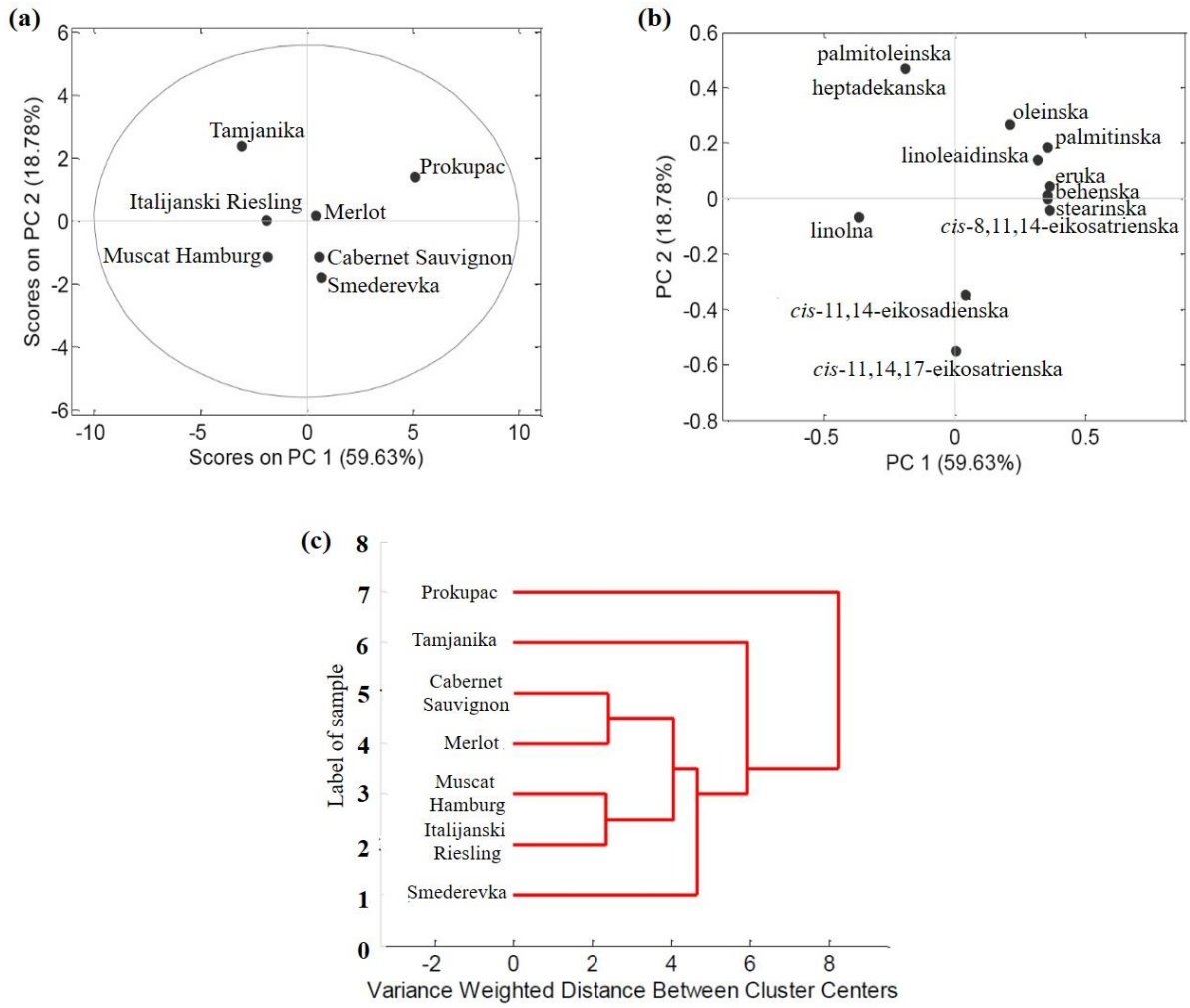
Uzorak Masne kiseline (MK)(%) skraćenice	naziv	***Smederevka***	***Italijanski Riesling***	***Tamjanika***	***Muscat Hamburg***	***Prokupac***	***Merlot***	***Cabernet Sauvignon***
C16:0	Palmitinska	4,38±0,1[ad]	3,57±0,09[b]	3,36±0,07[b]	3,41±0,08[b]	7,94±0,18[c]	4,69±0,27[a]	4,14±0,07[d]
C16:1	Palmitoleinska	n.d.	n.d.	0,4±0,001[1]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C17:0	Heptadekanska	n.d.	n.d.	0,86±0,04[1]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C18:0	Stearinska	6,53±0,11[a]	4,8±0,09[b]	4,58±0,25b[c]	4,1±0,07[c]	8,27±0,13[d]	5,83±0,21[e]	6,59±0,32[a]
C18:1ω9c	Oleinska	8,57±0,17[a]	8,24±0,18[ab]	7,74±0,4b[e]	6,14±0,17[cf]	9,72±0,24[d]	7,1±0,1[e]	6,4±0,26[f]
C18:2ω6c	Linolna	73,61±1,05[a]	83,39±1,26[b]	83,07±1,09[b]	83,47±1,15[b]	61,15±0,36[c]	76,98±1,17[a]	75,61±2,62[a]
C18:2ω6t	Linoleaidinska	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,15±0,06[a]	1,24±0,05[b]	1,4±0,07[c]
C20:2	Cis-11,14-eikosadienska	0,9±0,03[1]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C20:3ω6	Cis-8,11,14-eikosatrienska	1±0,01[a]	n.d.	n.d.	0,35±0,01[b]	2,09±0,1[c]	0,8±0,02[d]	1,19±0,02[e]
C20:3ω3	Cis-11,14,17-eikosatrienska	1,47±0,04[a]	n.d.	n.d.	0,89±0,04[b]	n.d.	n.d.	1,44±0,03[a]
C22:0	Behenska	2,06±0,05[a]	n.d.	n.d.	0,76±0,02[b]	5,4±0,25[c]	1,36±0,03[d]	1,97±0,01[a]
C22:1ω9	Eruka	1,43±0,03[a]	n.d.	n.d.	0,87±0,05[b]	3,25±0,12[c]	2,01±0,09[d]	1,25±0,01[a]
				Parametri nutritivnog kvaliteta				
ZMK	zasićene MK	12,97	8,37	8,80	8,27	21,61	11,88	12,7
NMK	nezasićene MK	86,98	91,63	91,21	91,72	78,36	88,13	87,29
MNMK	mono-nezasićene MK	10	8,27	8,14	7,01	12,97	9,11	7,65
PNMK	poli-nezasićene MK	76,98	83,39	83,07	84,71	65,39	79,02	79,64
NMK/ZMK	/	6,706	10,947	10,365	11,090	3,626	7,418	6,873
IA	Indeks atherogenosti	0,05	0,039	0,037	0,037	0,1	0,053	0,047
IT	Indeks trombogenost	0,23	0,183	0,174	0,156	0,41	0,238	0,227

Vrednosti su dobijeni iz tri nezavisna merenja (n=3) i prikazane kao srednje vrednosti±standardna devijacija. Vrednosti koje su označene sa istim slovom u istom redu nisu statistički značajno različite prema *Tukey's* testu, (p<0,05). Skraćenice: „n.d."-nije detektovano.

Pored navednih parametara, definisane su vrednosti za indekse aterogenosti i trombogenosti, koji omogućavaju bolju klasifikaciju različitih namirnica (Kouřimská et al., 2018). Indeks aterogenosti pokazuje stepen inhibicije/smanjenja agregacije plaka (taloženja masnih naslaga po zidu arterija), kao i redukciju esterifikovanih MK, holesterola i fosfolipida, što sprečava pojavu koronarnih bolesti. Indeks trombogenosti pokazuje tendenciju stvaranja ugrušaka u krvnim sudovima (Olubi et al., 2019). Analizirane semenke različitih sorti grožđa su imale nizak IA (0,04-0,13) i IT (0,16-0,47). Najviši indeksi su dobijeni za ulje semenki sorte Prokupac, a najniže za ulje semenki Muscat Hamburga i Tamjanike. Dobijene vrednosti za IA su bile slične vrednostima suncokretovog ulja (0,07), ali niže od vrednosti maslinovog (0,19) i ovsenog (0,17-0,19), dok su vrednosti za IT bile u opsegu vrednosti dobijenih za ista ulja (maslinovo 0,4; suncokretovo 0,20; i ovseno 0,30-0,34) (Beveridge et al., 2005). Predhodni rezultati ukazuju da analizirano brašno semenki autohtonih i internacionalnih sorti grožđa može biti dobar izvor nutritivno vrednih MK-a, koje imaju ključnu ulogu u prevenciji od kardiovaskularnih bolesti.

4.1.2.2. PCA i HCA analiza masno-kiselinskog sastava brašna neferementisane semenke

PCA analiza zasnovana na sadržaju zasićenih i nezasićenih MK u različitim uzorcima brašna semenki grožđa rezultira trokomponentnim modelom koji objašnjava 90,70% ukupne varijanse između podataka. Rezultati dobijeni analizom prve dve glavne komponente (Tabela 4.2), su prikazani na Slici 4.1a,b. Kao što se može videti, grafik skorova (Slika 4.1a) pokazuje tri grupe razdvajanja.



Slika 4.1. Grupisanje analiziranih brašna semenki izdvojenih iz komine odabranih sorti grožđa na osnovu profila masnih kiselina: (a) Grafik skorova (objekata); (b) grafik varijabli; i (c) HCA dendrogram**.**

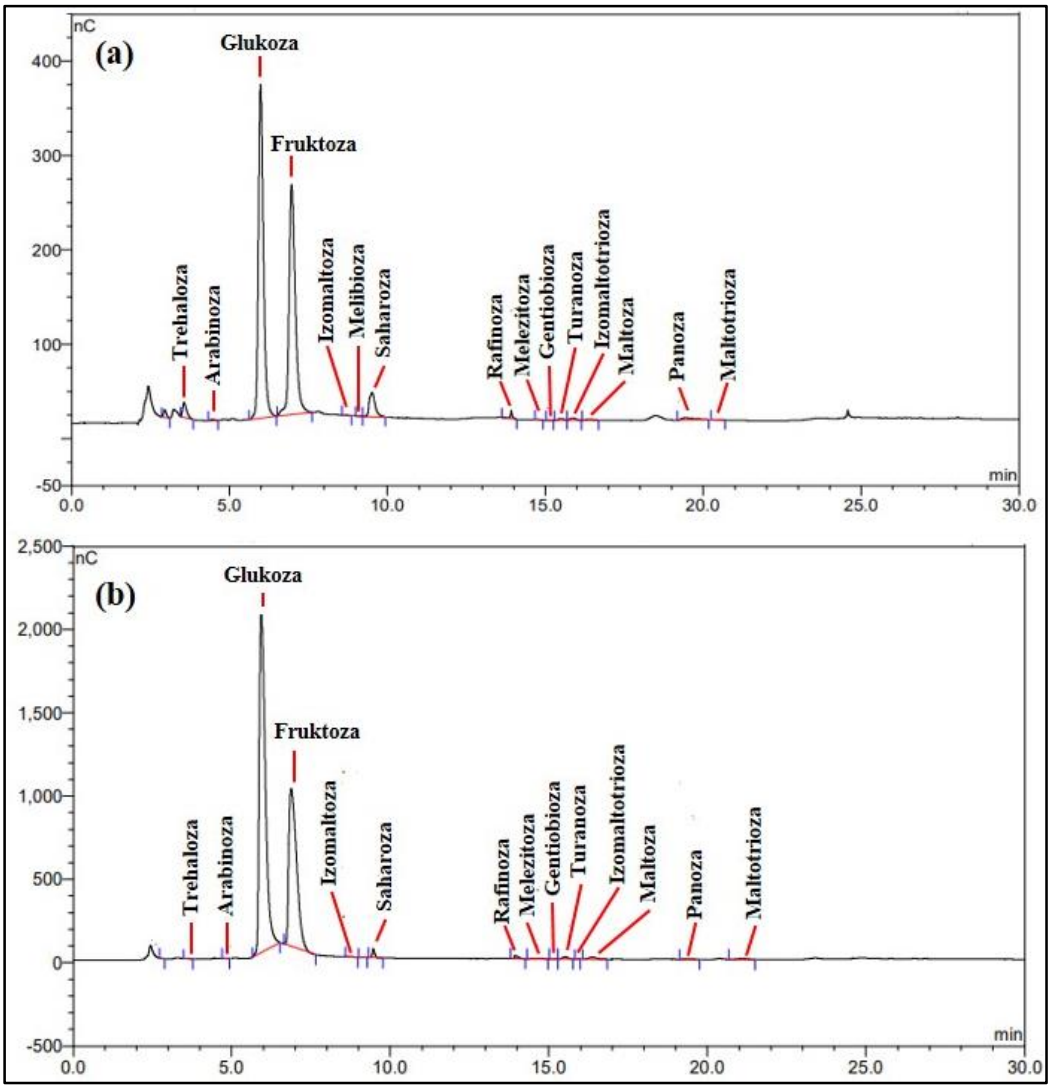
Brašna semenki Tamjanike i Prokupca su odvojena od brašna semenki ostalih uzoraka i formiraju grupe I i II. Treću grupu čine ostali analizirani uzorci (Slika 4.1a, Tabela 4.2). Palmitoleinska i heptadekanska kiselina imaju najači pozitivan uticaj duž ose druge glavne komponenete (PC2 ose) na odvajanje uzorka brašna semenki Tamjanike, što je u saglasnosti sa činjenicom da je upravo sadržaj ove dve masne kiseline najveći u ovom uzorku (Slika 4.1b, Tabela 4.2), dok masne kiseline kao što su eruka, *cis*-11,14-eikosadienska, *cis*-8,11,14-eikosatrienska i *cis*-11,14,17-eikosatrienska, koje nisu identifikovane u ovom uzorku, imaju negativan uticaj na razdvajanje uzorka Tamjanike duž iste ose. Visok sadržaj oleinske, palmitinske, linolaidinske, behenske, stearinske, eruka i *cis*-8,11,14-eikosatrienske MK u brašnu semenki sorte Prokupac, imaju najači pozitivan uticaj na odvajanje ove sorte duž ose prve glavne komponenete (PC1 ose). Sa druge strane, linolna MK ima negativan uticaj na odvajanje ove sorte duž PC1 ose, jer je njena koncentracija najniža u brašnu semenki ove sorte u poređenju sa ostalim analiziranim sortama, dok masne kiseline poput *cis*-11,14-eikosadienska i *cis*-11,14,17-eikosatrienska nisu identifikovane u ovom uzorku. Što se tiče treće grupe koja se odvaja, poređenjem rezultata PCA i HCA analize (Slika 4.1), odnosno analizom sadržaja linolne i palmitinske MK, može se zaključiti da postoji sličnost između brašna semenki Merlot-a i Cabernet Sauvignon-a (Tabela 4.2), odnosno između brašna semenki Muscat Hamburg-a i Italijanskog Riesling-a (Tabela 4.2), što ih odvaja u dve različite podskupine (podklastera) (Slika 4.1c). Dalje, HCA na distanci 5 rezultira odvajanjem uzoraka u tri klastera. Prvi klaster čine svi analizirani uzorci, osim Prokupca i Tamjanike.

4.1.3. Profil mono- i oligosaharida brašna nefermentisane semenke i pokožice

Sastav mono- i oligosaharida ekstrahovanih iz odmašćenog brašna semenki je prikazan u Tabeli 4.3; dok je sastav mono- i oligosaharida ekstrahovanih iz brašna pokožica prikazan u Tabeli 4.4. Prema rezultatima HPAEC/PAD analize, u svim analiziranim uzorcima brašna semenki i pokožica je potvrđena koncentracija petnaest različitih mono- i oligosaharida. Njihov ukupni sadržaj u brašnu semenki je varirao zavisno od sorte, od 40588 do 91319 mg/kg SM semenki, dok je njihov sadržaj u brašnu pokožica bio značajno viši, u opsegu od 196847 do 413603 mg/kg SM pokožica. Monosaharidi su bili dominantno potvrđeni. Njihov sadržaj u uzorcima semenki je bio u opsegu od 39090 do 89659 mg/kg SM semenki (>91%), dok je u uzorcima pokožica bio u opsegu od 194068 do 405382 mg/kg SM pokožica (>97%). Disaharidi i trisaharidi su bili prisutni u tragovima (Slika 4.2). Pored dominantno potvrđenih monosaharida, kao što su glukoza i fruktoza, treba napomenuti da je sadržaj saharoze bio veći u poređenju sa ostalim otkrivenim di- i trisaharidima.

Ugljeni hidrati koji zaostaju u komini posle dezintegracije i presovanja grožđa su uglavnom u vodi rastvorni (prvenstveno monosaharidi i oligosaharidi), i u vodi nerastvorni strukturni polisaharidi iz ćelijskog zida (Corbin et al., 2015). U većini studija je analiziran monosaharidni sastav komine grožđa, nakon intenzivne hidrolize složenih lignoceluloznih polisaharida. Prema literaturno dostupnim podacima, sadržaj mono- i oligosaharida u brašnu semenki i pokožica grožđa, dobijenih iz nefermentisanih sušenih komina do sada je oskudno istraživan. Imperio et al. (2021) su uspeli da identifikuju neke monosaharide i oligosaharide u višestruko koncentrisanom i prečišćenom ekstraktu semenki, koje su izdvojene iz komine Nebbiolo grožđa. Sa druge strane, Varandas et al. (2004) su kvantifikovali sadržaj glukoze i fruktoze u pokožici pet vinskih sorti grožđa u različitim fazama sazrevanja. U literaturi se češće mogu naći različiti rezultati za ukupni sadržaj rastvornih ugljenih hidrata u celoj komini koja je izdvojena nakon presovanja grožđa. Prema Beres et al. (2016), sadržaj ugljenih hidrata u samlevenom brašnu nefermentisane komine Red Pinot sorte grožđa je bio 196800 mg/kg, dok su Sousa et al. (2014), pokazali da fino samlevena komina Benitaka sorte grožđa sadrži 292000 mg ugljenih hidrata/kg, sa respektabilnom količinom glukoze (79500 mg/kg) i fruktoze (89100 mg/kg). U studiji koju su sproveli Corbin et al. (2015), pokazano je da komina Cabernet Sauvignon-a i Sauvignon blanc-a ima sadržaj u vodi rastvornih ugljenih hidrata redom 4,6 i 37,6 mas%, sa dominantnim prisustvom glukoze i fruktoze. Dalje, Wang et al. (2019), su potvrdili ukupan sadržaj ugljenih hidrata od 368000 mg/kg u komini Concord sorte grožđa. González-Centeno et al. (2010), su pokazali da sveže komine deset različitih sorti grožđa nakon presovanja i maceracije imaju

sadržaj rastvornih ugljenih hidrata od 20000 do 62000 mg/kg, dok je sadržaj ugljenih hidrata Cabernet Sauvignon-a bio 23000, a Merlot-a 24000 mg/kg. Ovi podaci ukazuju da značajna količina rastvornih ugljenih hidrata (prvenstveno mono- i oligosaharida) zaostaje u komini, nakon presovanja grožđa, što je verovatno rezultiralo njihovim značajnim količinama na površini semenki i pokožica izdvojenih iz nefermentisane komine, a samim tim i u fino samlevenom brašnu semenki i pokožica grožđa. Dakle, osim profila masnih kiselina, poželjno je odrediti i sadržaj rastvornih ugljenih hidrata (prvenstveno mono- i oligosaharida) u brašnu semenki i pokožica grožđa, koje su namenjene za obogaćivanje prehrambenih proizvoda. Dominantno otkriveni monosaharidi poput glukoze ili fruktoze su tipične energetske komponente i njihova količina nije zanemarljiva.



Slika 4.2. Hromatogrami kvantifikovanih mono- i oligosaharida: (a) brašno semenki; i (b) brašno pokožica, izdvojenih iz nefermentisane komine Prokupca.

4.1.3.1. PCA i HCA analiza mono- i oligosaharida brašna nefermentisane semenke

PCA analiza zasnovana na sadržaju mono- i oligosaharida u različitim uzorcima brašna semenki izdvojenih iz nefermentisanih komina različitih sorti grožđa, rezultira trokomponentnim modelom koji objašnjava 77,63% ukupne varijanse između analiziranih podataka. Rezultati dobijeni analizom prve dve glavne komponente (Tabela 4.3), su prikazani na Slici 4.3a,b. Kao što se može videti, grafik skorova (Slika 4.3a), pokazuje tri grupe razdvajanja. Brašna semenki Merlot-a i Prokupac-a su odvojena od brašna semenki ostalih sorti grožđa (grupa III) i čine grupu I i II (Slika 4.3a; Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Profil mono- i oligosaharida (mg/kg SM semenke) odmašćenih i fino samlevenih semenki izdvojenih iz nefermentisane komine

Uzorak Jedinjenja (mg/kg)	***Smederevka***	***Italijanski Riesling***	***Tamjanika***	***Muscat Hamburg***	***Prokupac***	***Merlot***	***Cabernet Sauvignon***
Monosaharidi							
arabinoza (Ara)	23±1^{a}	18±1,3^{b}	11±0,6^{c}	22±1,4^{a}	35±2^{d}	3±0,3^{e*}	17±0,7^{b}
glukoza (Glc)	46777±896^{a}	37827±829^{b}	41415±636^{c}	38351±682^{b}	31456±342^{d}	19350±348^{e}	33316±427^{f}
fruktoza (Fru)	42859±1526^{a}	37731±618^{b}	42911±915^{a}	41259±263^{a}	35562±339^{b}	19737±516^{c}	32818±694^{d}
Σ	**89659 (98,2)**	**75576 (94,5)**	**84337 (95,8)**	**79632 (94,3)**	**67053 (91,9)**	**39090 (96,3)**	**66151 (96,3)**
Disaharidi							
trehaloza (Tre)	11±0,7^{ae}	9±0,7^{a}	155±8^{b}	32±2^{cf}	387±10^{d}	45±3^{c}	24±1,1^{ef}
izomaltoza (Ism)	24±1,2^{a}	10±0,9^{b}	36±0,8^{c}	36±2.2^{c}	26±2,3^{a}	42±0,9^{d}	39±1,9^{cd}
melibioza (Mel)	13±0,8^{a}	4±0,3^{be*}	9±0,3^{c*}	3±0,2^{b*}	4±0,3^{be*}	7±0,3^{d*}	5±0,4^{e*}
saharoza (Sac)	955±11^{a}	3737±140^{b}	2445±34^{c}	4146±59^{d}	4413±26^{e}	1009±18^{a}	1763±64^{f}
gentiobioza (Gent)	1±0,1^{a*}	2±0,2^{b*}	1±0,2^{a*}	n.d.	2±0,3^{b*}	3±0,3^{c*}	n.d.
turanoza (Tur)	116±5^{ad}	122±9^{a}	241±12^{b}	178±11^{c}	106±8^{ad}	94±3^{d}	200±13^{c}
maltoza (Mal)	59±4^{a}	74±8^{b}	91±7^{c}	68±6^{ab}	65±2,9^{ab}	41±3^{d}	70±3^{ab}
Σ	**1179 (1,29)**	**3958 (4,95)**	**2978 (3,38)**	**4463 (5,29)**	**5003 (6,86)**	**1241 (3,06)**	**2101 (3,06)**
Trisaharidi							
rafinoza (Raf)	339±8^{a}	249±20^{b}	340±9^{a}	249±11^{b}	335±14^{a}	181±6^{c}	277±9^{b}
melezitoza (Mele)	15±0,6^{a}	16±0,8^{a}	19±0,8^{b}	14±0,9^{a}	19±1,2^{b}	6±0,3^{c}	22±1,9^{d}
izomaltotrioza (Ismt)	20±1,1^{a}	93±6^{b}	10±0,7^{ce*}	5±1^{c*}	83±7^{d}	11±0,4^{ac}	19±1,2^{ae}
panoza (Pan)	84±5^{ae}	55±4^{ac}	309±13^{b}	28±2^{c}	448±24^{d}	47±2^{d}	100±7^{e}
maltotrioza (Malt)	23±1,1^{a}	26±2^{ac}	16±0,9^{b}	30±2,2^{ce}	7±0,4^{d}	12±0,4^{b}	32±2,3^{e}
Σ	**481 (0,53)**	**439 (0,55)**	**694 (0,79)**	**326 (0,39)**	**892 (1,22)**	**257 (0,63)**	**450 (0,66)**
Σ Σ	**91319**	**79973**	**88009**	**84421**	**72948**	**40588**	**68702**

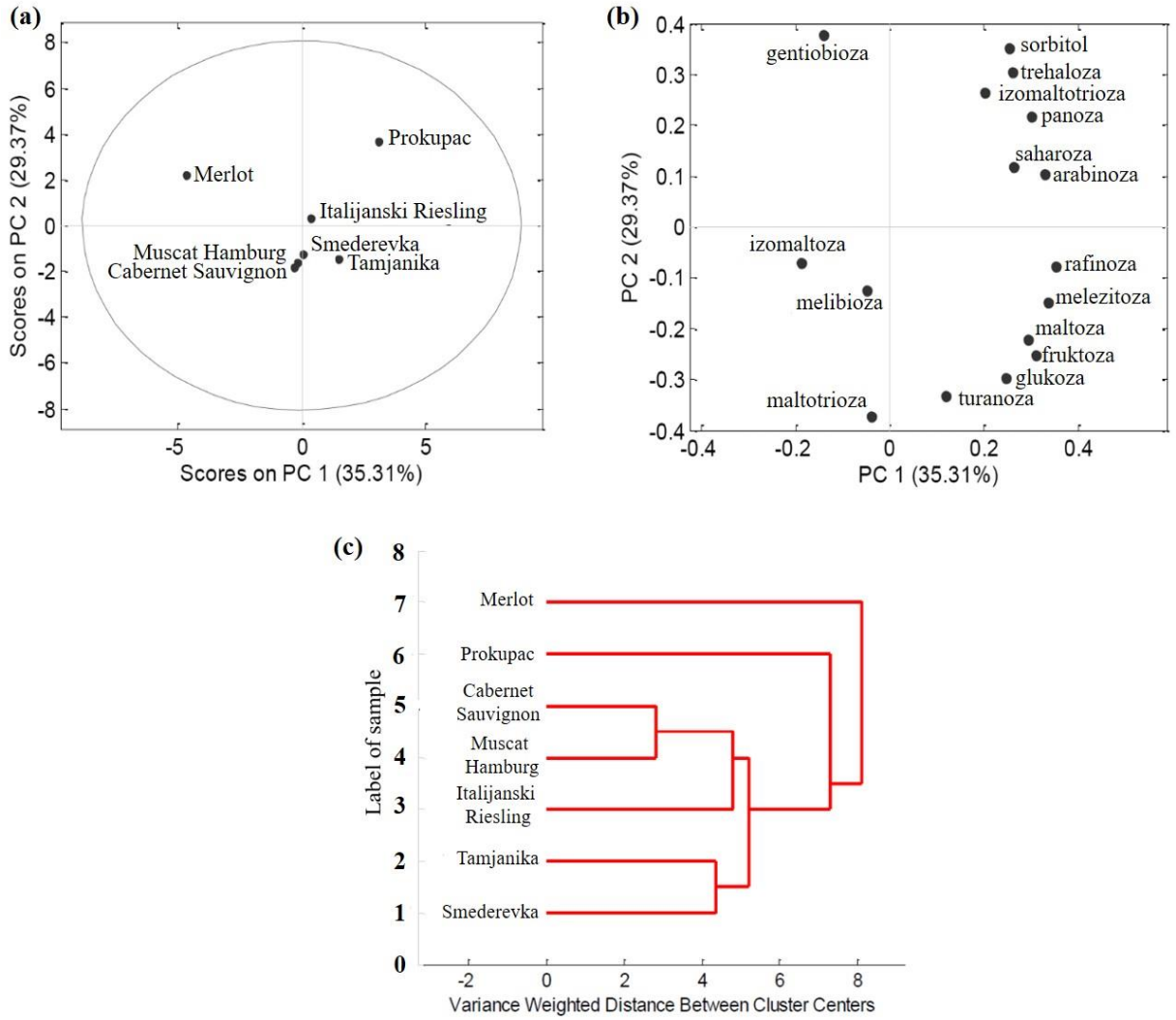
Vrednosti su dobijeni iz tri nezavisna merenja (n=3) i prikazane kao srednje vrednosti ±standardna devijacija. Vrednosti koje su označene sa istim slovom u istom redu nisu statistički značajno različite prema *Tukey's* testu, (p<0,05). Vrednosti u zagradama definišu procenat zastupljenost karakterističnih grupa mono- i oligosaharida u uzorcima (%). Skraćenice: „n.d."-nije detektovan;*jedinjenja detektovana u tragovima (≤10mg/kg uzorka).

Tabela 4.4. Profil mono- i oligosaharida (mono- i oligosaharida) (mg/kg SM pokožice) fino samlevenih pokožica izdvojenih iz nefermentisane komine

Uzorak Jedinjenja (mg/kg)	***Smederevka***	***Italijanski Riesling***	***Tamjanika***	***Muscat Hamburg***	***Prokupac***	***Merlot***	***Cabernet Sauvignon***
Monosaharidi							
arabinoza (Ara)	84±3,2^{a}	61±5^{b}	22±2^{c}	44±2^{d}	56±4^{b}	59±5^{b}	57±4^{b}
glukoza (Glc)	224202±1403^{ae}	198894±2007^{b}	102896±2544^{c}	215263±2805^{d}	230298±2456^{a}	224992±4128^{ae}	219640±3960^{de}
fruktoza (Fru)	161957±2760^{ace}	158153±1381^{ae}	91150±2713^{b}	169382±3583^{cd}	175028±4581^{d}	164317±3339^{ac}	154355±4485^{e}
Σ	**386243 (98,1)**	**357108 (98,0)**	**194068 (98,6)**	**384689 (97,5)**	**405382 (98,0)**	**389368 (98,2)**	**374052 (98,1)**
Disaharidi							
trehaloza (Tre)	57±3,4^{a}	86±4^{b}	40±4^{c}	88±4^{b}	53±5^{a}	21±2^{d}	25±3^{d}
izomaltoza (Ism)	320±5^{a}	335±7^{a}	49±4^{b}	524±22^{c}	271±9^{d}	322±13^{a}	394±15^{e}
melibioza (Mel)	2±0,2^{ac*}	6±0,6^{b*}	3±0,4^{a*}	1±0,1^{c*}	n.d.	5±0,6^{b*}	6±0,6^{b*}
saharoza (Sac)	3897±92^{a}	3907±31^{a}	1561±72^{b}	5533±288^{c}	4017±41^{a}	2665±63^{d}	2595±94^{d}
gentiobioza (Gent)	6±0,4^{a*}	6±0,8^{a*}	n.d.	6±1^{a*}	10±1^{b*}	10±0,8^{b*}	8±0,6^{ab*}
turanoza (Tur)	1004±15^{a}	746±40^{b}	278±9^{c}	888±24^{d}	779±12^{b}	1228±26^{e}	1152±29^{f}
maltoza (Mal)	675±14^{a}	694±18^{a}	236±11^{b}	810±21^{c}	757±9^{d}	949±15^{e}	888±10^{f}
Σ	**5691 (1,51)**	**5780 (1,59)**	**2167 (1,10)**	**7850 (1,99)**	**5887 (1,42)**	**5200 (1,31)**	**5068 (1,33)**
Trisaharidi							
rafinoza (Raf)	772±14^{a}	851±23^{b}	429±21^{c}	991±13^{d}	1280±46^{e}	834±9^{ab}	809±13^{ab}
melezitoza (Mele)	41±4^{a}	83±5^{b}	n.d.	132±8^{c}	355±9^{d}	67±5^{b}	25±2^{a}
izomaltotrioza (Ismt)	8±1^{a*}	19±2^{b}	13±1^{c}	2±0,3^{d*}	4±0,3^{de*}	2±0,2^{d*}	6±0,5^{ae*}
panoza (Pan)	347±16^{a}	297±5^{b}	53±3^{c}	381±13^{d}	297±16^{b}	469±12^{e}	562±6^{f}
maltotrioza (Malt)	277±18^{a}	248±13^{a}	117±5^{b}	390±15^{c}	398±13^{c}	582±14^{d}	767±9^{e}
Σ	**1445 (0,37)**	**1498 (0,41)**	**612 (0,31)**	**1896 (0,48)**	**2334 (0,56)**	**1954 (0,49)**	**2169 (0,57)**
Σ Σ	**393649**	**364386**	**196847**	**394435**	**413603**	**396522**	**381289**

Vrednosti su dobijeni iz tri nezavisna merenja (n=3) i prikazane kao srednje vrednosti ±standardna devijacija. Vrednosti koje su označene sa istim slovom u istom redu nisu statistički značajno različite prema *Tukey's* testu, (p<0,05). Vrednosti u zagradama definišu procenat zastupljenosti karakterističnih grupa mono- i oligosaharida u uzorcima (%). Skraćenice: „n.d."-nije detektovan; *jedinjenja detektovana u tragovima (≤10mg/kg uzorka).

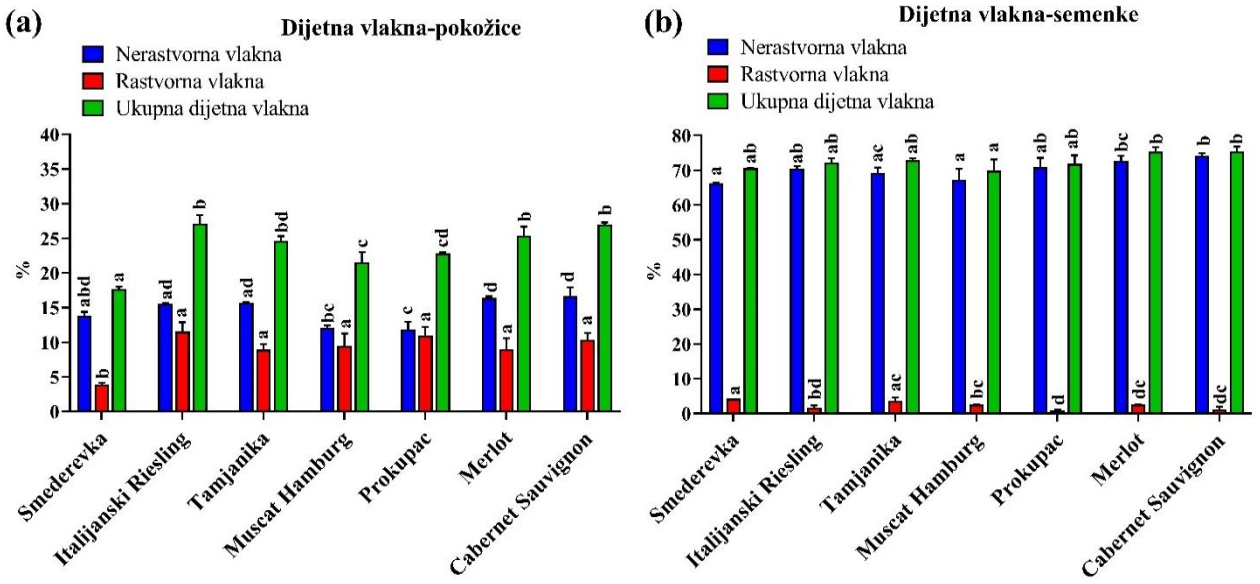
Rafinoza, melezitoza, maltoza, fruktoza, glukoza i turanoza imaju najjači uticaj na odvajanje brašna semenki sorte Merlot, duž PC1 ose, što je u saglasnosti sa činjenicom da je sadržaj navedenih mono-oligosaharida najniži u ovom uzorku (Slika 4.3b; Tabela 4.3), dok je relativno visok sadržaj melibioze i izomaltoze imao negativan uticaj na odvajanje ovog uzorka duž iste ose. Gentiobioza, čiji je sadržaj bio najveći u brašnu semenki sorte Merlot (u odnosu na brašna semenki drugih sorti), ima pozitivan efekat na odvajanje ovog uzorka duž PC2 ose. Na odvajanje brašna semenki Prokupca, duž PC2 ose najveći uticaj imaju oligosaharidi poput, trehaloze, izomeltotrioze, panoze, saharoze i arabinoze, čiji je sadržaj najveći u ovom uzorku u poređenju sa ostalim analiziranim uzorcima. Maltotrioza, čiji je sadržaj najmanji u brašnu semenki Prokupca, ima najjači negativni efekat na odvajanje duž PC2 ose. Na odvajanje treće grupe (slika 4.3b), koju čine ostali analizirani uzorci brašna semenki, najviše doprinose mono- oligosaharidi kao što su rafinoza, melezitoza, maltoza, fruktoza, glukoza i turanoza. Rezultati dobijeni hijerarhijskom klaster analizom (HCA analiza) prikazani su na dendrogramu (Slika 4.3c). HCA na distanci 6 rezultira odvajanjem uzoraka u tri klastera. Prvi klaster obuhvata uzorak Merlota, drugi klaster obuhvata uzorak Prokupca, a treći klaster obuhvata ostale analizirane uzorke, što je u skladu sa rezultatima PCA analize. Dendrogram takođe pokazuje da se unutar trećeg klastera, na distanci 5, mogu odvojiti dva podklastera. Prvi podklaster uključuje brašna semenki Smederevke i Tamjanike, dok drugi podklaster uključuje brašna semenki Cabernet Sauvignon-a, Muscat Hamburg-a i Italijanskog Riesling-a.



Slika 4.3. Grupisanje analiziranih brašna semenki izdvojenih iz komine odabranih sorti grožđa na osnovu profila mono- i oligosaharida: (a) Grafik skorova; (b) grafik varijabli; i (c) HCA dendrogram.

4.1.4. Dijetna vlakna brašna neferementisane semenke i pokožice

Rezultati za sadržaj nerastvornih, rastvornih i ukupnih dijetnih vlakana određeni u semenkama i pokožicama sedam različitih sorti grožđa, su prikazani na slici 4.4 (grafici, a i b). Brašno semenki je imalo više nerastvornih (66,30-74,18%) i ukupnih (69,89-75,42%), a manje rastvornih (0,89-4,27%) dijetnih vlakna, u poređenju sa brašnom pokožica. Dobijeni rezultati su varirali zavisno od sorte grožđa, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima. Najviši sadržaj nerastvornih vlakana je potvrđen u brašnu pokožica i semenki Cabernet Sauvignon-a, dok je sadržaj rastvornih vlakana bio najviši u pokožici Italijanskog Riesling-a i semenki Smederevke. Sadržaj ukupnih dijetnih vlakana je bio značajno viši u brašnu semenki, oko tri puta viši nego u brašnu pokožica. Iako postoje razlike u sadržaju, brašna semenki i pokožica svih analiziranih internacionalnih i autohtonih sorti predstavljaju dobar izvor dijetnih vlakana i mogu se uspešno primeniti u formulaciji funkcionalnih i nutritivno vrednih prehrambenih proizvoda (Beres et al., 2017; García-Lomillo & González-SanJosé, 2017). U literaturi se najčešće mogu naći rezultati za sadržaj nerastvornih (36,40-65,7%), rastvornih (0,72-9,76%) i ukupnih (46,17-74,5%) dijetnih vlakana za komine internacionalnih sorti grožđa (Corbin et al., 2015; Deng et al., 2011; González-Centeno et al., 2010; Llobera & Cañellas, 2007; Saura-Calixto et al., 1991; Sousa et al., 2014). Nekoliko studija je publikovalo rezultate za sadržaj nerastvornih (16,44-54,59%), rastvornih (0,72-3,79%) i ukupnih (17,28-56,31%) dijetnih vlakana u pokožicama grožđa (Deng et al., 2011; Karnopp, Oliveira, et al., 2017), dok su samo Gül et al. (2013) odredili sadržaj ukupnih vlakana u brašnu semenki koje su izdvojene iz komine crne (Öküzgözü) i bele (Narince) sorte grožđa (72,78 i 72,45%). Dobijeni rezultati za sadržaj ukupnih, rastvornih i nerastvornih vlakana su u opsegu literaturno prijavljenih vrednosti. Male varijacije se mogu pripisati sortnim karakteristikama, tehnološkom postupku i primenjenoj metodologiji za određivanje dijetnih vlakana (enzimsko gravimetrijska metoda ili kisela hidroliza). Prema saznanju, ovo je prvi izveštaj o dijetnim vlaknima u brašnu pokožica i semenki autohtonih sorti Prokupac i Tamjanika.



Slika 4.4. Sadržaj nerastvornih, rastvornih i ukupnih dijetnih vlakana u: (a) brašnu pokožica; i (b) brašnu semenki, sedam različitih internacionalnih i autohtonih sorti grožđa. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti+standardna devijacija (n=3). Ista mala slova iznad stubića, posebno za: nerastvorna vlakna (plavi stubići), rastvorna vlakna (crveni stubići) i ukupna vlakna (zeleni stubići), pokazuju da vrednosti nisu statistički značajno različite prema *Tukey's*-testu, (p<0,05).

4.1.5. Fenolni profil ekstrakata brašna neferementisane semenke i pokožice

4.1.5.1. UHPLC-DAD MS/MS kvantifikacija fenolnih jedinjenja

Fenolna jedinjenja (izuzev antocijana) nađena u ekstraktima semenki i pokožica, su kvantifikovana na osnovu dostupnih standarda i prikazana u Tabelama 4.5 i 4.6. Sadržaj ukupno kvantifikovanih fenolnih jedinjenja u ekstraktima semenki i pokožica analiziranih sorti, je bio značajno viši kada je

za primarnu ekstrakciju korišćen 50% etanol. Najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (neantocijanski polifenoli i fenolne kiseline), je potvrđen u etanolnom ekstraktu semenki Prokupca (2255,5 mg/kg SM) i ekstraktu pokožica Tamjanike (201,2 mg/kg SM). Međutim, efekat ekstrakcionog sredstva je bio varijabilan kada se posmatraju dominantno izdvojene klase fenolnih jedinjenja (fenolne kiseline, flavan-3-oli i flavonoli) u ekstraktima semenki i pokožica. Ovo razlike mogu biti zbog razlika u fenolnim profilima svakog uzorka, dominantnih fenolnih jedinjenja i njihove polarnosti, jer su nakon uparavanja uzorci rekonstituisani u vodi. U literaturi su za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz semenki i pokožica grožđa najčešće korišćeni i preporučeni polarni vodeno-alkoholni rastvori, kao što su vodeni rastvori metanola, etanola ili acetona (Kallithraka et al., 1995; Pintać et al., 2018; Spigno et al., 2007), zbog polarne prirode većina fenolnih jedinjenja. Metanolni rastvori korišćeni u ovoj studiji (80% metanol ili čist metanol), su manje polarni od 50% etanola, pa je vrlo moguće da se nakon uparavanja i rekonstitucije u vodi, deo manje polarnih fenolnih jedinjenja koji su primarno ekstrahovani metanolnim rastvorima nije rastvorio, pri čemu su ova jedinjenja uklonjena filtracijom kroz 0,45µm filtere pre hromatografske analize. Na osnovu rezultata ove kvantifikacije se vidi da ekstrakti semenki sadrže značajno više fenolnih jedinjenja u poređenju sa ekstraktima pokožica, i to od 2,5 do 18 puta više, zavisno od sorte grožđa i primenjenog ekstrakcionog sredstva. U ekstraktima semenki su domanatno kvantifikovani flavan-3-oli i fenolne kiseline (>90%), dok su u ekstraktima pokožica bili dominantni flavonoli i fenolne kiseline, što je u saglasnosti sa prethodno publikovanim podacima (Di Lecce et al., 2014; Gođevac et al., 2010; Luo et al., 2017; Mandić et al., 2008; Pantelić et al., 2016; Pérez Navarro et al., 2019; Rodríguez Montealegre et al., 2006).

Galna i elaginska kiselina su dominantno kvantifikovane fenolne kiseline u ekstraktima semenki svih analiziranih sorti, dok su ostale fenolne kiseline pronađene u tragovima (Tabela 4.5). Međutim, sadržaj galne kiseline je bio značajno viši u ekstraktima koji su primarno ekstrahovani sa 50% etanolom, osim kod Merlot-a i Cabernet Sauvignon-a, gde nije bilo statistički značajne razlike. Sa druge strane, ~2 puta viši sadržaj elaginske kiseline je pronađen u ekstraktima koji su primarno ekstrahovani sa 80% metanolom. Zanimljivo, koniferil alkohol je kvantifikovan samo u ekstraktima koji su primarno ekstrahovani sa 50% etanolom. Ove specifičnosti su posledica razlike u polarnosti fenolnih jedinjenja. Na primer, poznata je dobra rastvorljivost galne kiseline u visoko polarnim rastvorima i dobra rastvorljivost elaginske kiseline u manje polarnim rastvorima. Među ispitivanim sortama, najveći sadržaj galne i elaginske kiseline je bio u ektraktima semenki Prokupca za oba ekstrakciona sredstva: 240,5 (80% Me) i 267,8 (50% Et) mg/kg SM za galnu kiselinu; i 640,1 (80% Me) i 329,0 (50% Et) mg/kg SM za elaginsku kiselinu. Druge studije su takođe potvrdile da su galna kiselina i njeni heksozidi najčešće pronađeni derivati hidroksibenzoeve kiseline u ekstraktima semenki različitih sorti grožđa (Di Lecce et al., 2014; Gođevac et al., 2010; Natić et al., 2021; Pantelić et al., 2016), dok su elaginska kiselina i njen pentozid dominantno pronađeni u ekstraktu semenke autohtone sorte Prokupac (Ćirković et al., 2019; Gođevac et al., 2010; Pantelić et al., 2016; Zdunić et al., 2019). U ekstraktima pokožica je pronađen značajno niži sadržaj fenolnih kiselina u poređenju sa ekstraktima semenki. Pored galne i elaginske kiseline, u svim analiziranim ekstraktima pokožica su detektovane još protokatehinska i kofeinska kiselina. Ostale fenolne kiseline su detektovane u tragovima samo u nekim sortama, što može predstavljati jedinstven marker u karakterizaciji tih sorti (Tabela 4.6).

Među flavan-3-olima, katehin je dominantno pronađen u ekstraktima semenki svih analiziranih sorti grožđa (Tabela 4.5), što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Dabetić et al., 2020; Di Lecce et al., 2014; Gođevac et al., 2010; Luo et al., 2017; Mandić et al., 2008; Pantelić et al., 2016; Pérez Navarro et al., 2019; Tahmaz et al., 2021). Međutim, značajno viši sadržaj katehina je pronađen u ekstraktima koji su primarno ekstrahovani sa 50% etanolom, za sve sorte. Najviši sadržaj katehina je potvrđen u ekstraktu semenki crnih sorti grožđa Muscat Hamburg (1736,8 mg/kg SM) i Prokupac (1626,9 mg/kg SM), kao i ekstraktu bele sorte grožđa Tamjanika (1081,1 mg/kg SM). Drugi autori su takođe odredili visok sadržaj katehina u ekstraktu semenki raznih klonova autohtone sorte Prokupac (535,1-3940,6 mg/kg SM) (Pantelić et al., 2016; Zdunić et al., 2019), ekstraktu semenki

Muscat Hamburg-a (1078,1 mg/kg SM)(Gođevac et al., 2010), Crne Tamjanike (4937 mg/kg SM) i Župljanke (15587 mg/kg SM) (Dabetić et al., 2020). Ostali flavan-3-oli u ekstraktima semenki su detektovani u tragovima samo kod nekih sorti. Pojedinačni flavan-3-oli su takođe detektovani i u ekstraktima pokožica (Tabela 4.6). Međutim, pored katehina koji je potvrđen kod svih analiziranih sorti, galokatehin-galat i epigalokatehin-galat su kvantifikovani samo u ekstraktima pokožica crnih sorti, sa najvećim sadržajem u oba ekstrakta Cabernet Sauvignon-a.

Flavonoli su dominantno kvantifikovani u ekstraktima pokožica, prvenstveno flavonol glikozidi (Tabela 4.6). Sadržaj kvercetin-3-*O*-galaktozida je nađen u opsegu od 16,50 (Italijanski Riesling) do 53,83 (Tamjanika) mg/kg SM, zavisno od sorte i korišćenog ekstrakcionog sredstva, zatim slede rutin i kampferol-3-*O*-glukozid. Drugi autori su takođe pokazali dominantno prisustvo kvercetin i kampferol glikozida (glukozid, rutinozid, galaktozid i glukuronid) u ekstraktima pokožica Albarino (Di Lecce et al., 2014), Vidal (Luo et al., 2017), Temparnillo (Pérez Navarro et al., 2019) i Merlot (Bindon et al., 2011) grožđa. Zanimljivo, visok sadržaj luteolin-7-*O*-glukozida je potvrđen u ekstraktima pokožica autohtonih sorti grožđa Tamjanika (80,59 i 107,1 mg/kg SM), Smederevka (68,99 i 90,81 mg/kg SM) i Prokupac (47,91 i 59,90 mg/kg SM). Ćirković et al. (2019), su takođe odredili visok sadržaj luteolin-7-*O*-glukozida u pokožici Prokupca. Male količine kvercetin-3-*O*-glukozida i luteolin-7-*O*-glukozida su takođe nađene u ekstraktima semenki svih analiziranih sorti. Ostala kvantifikovana fenolna jedinjenja (Tabela 4.5) su nađena u tragovima i bila su karakteristična samo za neke sorte.

Tabela 4.5. UHPLC-DAD MS/MS kvantifikacija fenolnih jedinjenja u ekstraktima semenki izdvojenih iz nefermentisane komine.

Uzorak (semenka)	***Smederevka***		***Italijanski Riesling***		***Tamjanika***		***Muscat Hamburg***		***Prokupac***		***Merlot***		***Cabernet Sauvignon***	
Ekstrakciono sredstvo Jedinjenje (mg/kg SM)	**80% Me**	**50% Et**	**80% Me**	**50% Et**	**80% Me**	**50% Et**	**80% Me**	**50% Et**	**80% Me**	**50% Et**	**80% Me**	**50% Et**	**80% Me**	**50% Et**
Fenolne kiseline (HB+HC) i njihovi derivati														
Galna kiselina	$62,82^{a,A}$	$106,6^{a,B}$	$30,26^{b,A}$	$65,68^{b,B}$	$94,22^{c,A}$	$144,1^{c,B}$	$150,04^{d,A}$	$196,9^{d,B}$	$240,05^{e,A}$	$267,8^{e,B}$	$64,89^{a,A}$	$59,60^{b,A}$	$76,57^{ac,A}$	$90,57^{a,A}$
Protokatehinska kiselina	$2,52^{a,A}$	$4,28^{ab,B}$	$1,5^{b,A}$	$4,46^{a,B}$	$2,21^{c,A}$	$4,09^{be,B}$	$1,27^{d,A}$	$2,12^{c,B}$	$1,54^{bd,A}$	$2,04^{c,B}$	$2,01^{c,A}$	$2,90^{d,B}$	$3,15^{e,A}$	$3,90^{e,B}$
Gentizinska kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,41	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
p-HFS kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,89	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Elaginska kiselina	$170,4^{a,A}$	$90,35^{a,B}$	$13,62^{b,A}$	$9,32^{b,B}$	$178,03^{a,A}$	$88,02^{a,B}$	$169,31^{a,A}$	$127,4^{c,B}$	$640,1^{c,A}$	$329,0^{d,B}$	$18,59^{b,A}$	$11,79^{b,A}$	$27,77^{b,A}$	$11,23^{b,B}$
Kofeinska kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$0,14^{A}$	$0,18^{B}$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
p-Kumarinska kiselina	n.d.	n.d.	$0,33^{A}$	$0,45^{B}$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sinapinska kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	$4,52^{a}$	2,59	n.d.	n.d.	$5,61^{b}$	n.d.	$2,83^{c}$	n.d.	$12,55^{d}$	n.d.	n.d.
Koniferil aldehid	n.d.	$5,77^{a}$	n.d.	$6,19^{be}$	n.d.	$2,31^{c}$	n.d.	$2,37^{c}$	n.d.	$6,33^{b}$	n.d.	$4,91^{d}$	n.d.	$6,00^{ae}$
Σ	**235,7**	**207,0**	**45,8**	**90,6**	**277,0**	**238,5**	**320,6**	**334,4**	**882,3**	**614,1**	**85,5**	**91,7**	**107,5**	**111,7**
Flavan-3-oli i procijanidini														
Katehin	$107,5^{a,A}$	$235,3^{a,B}$	$196,3^{b,A}$	$543,5^{b,B}$	$619,5^{c,A}$	$1081,1^{c,B}$	$1009,5^{d,A}$	$1736,8^{d,B}$	$983,7^{d,A}$	$1626,9^{e,B}$	$346,0^{e,A}$	$877,0^{f,B}$	$359,1^{e,A}$	$914,7^{f,B}$
Galokatehin galat	n.d.	$1,08^{a}$	$1,37^{a}$	n.d.	n.d.	$2,81^{b}$	n.d.	n.d.	$4,94^{b,A}$	$1,28^{a,B}$	$2,19^{c}$	n.d.	n.d.	n.d.
Epigalokatehin galat	n.d.	n.d.	n.d.	$1,93^{a}$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$1,33^{b}$
Σ	**107,5**	**236,4**	**197,7**	**545,4**	**619,5**	**1083,9**	**1009,5**	**1736,8**	**988,7**	**1628,2**	**348,2**	**877,0**	**359,1**	**916,0**
Ostala kvantifikovana fenolna jedinjenja														
Kvercetin-3-*O*-galaktozid	$4,14^{a,A}$	$4,55^{a,A}$	$1,51^{b,A}$	$1,61^{b,B}$	$2,76^{c,A}$	$3,18^{c,B}$	$2,25^{d,A}$	$2,05^{d,B}$	$1,27^{e,A}$	$1,08^{e,A}$	$5,47^{b,A}$	$5,71^{f,B}$	$2,83^{c,A}$	$3,93^{g,B}$
Rutin	$0,25^{a,A}$	$0,17^{a,A}$	$1,19^{b,A}$	$1,28^{b,A}$	$0,97^{c,A}$	$1,00^{c,A}$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$0,74^{d,A}$	$0,73^{d,A}$	$0,55^{e,A}$	$0,69^{d,A}$
Kampferol-3-*O*-glukozid	$0,36^{a,A}$	$0,31^{a,A}$	n.d.	n.d.	$0,34^{a,A}$	$0,35^{a,A}$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Luteolin-7-*O*-glukozid	$7,05^{a,A}$	$7,30^{a,A}$	$1,22^{b,A}$	$1,18^{b,B}$	$5,96^{c,A}$	$5,49^{c,B}$	$1,27^{b,A}$	$1,00^{b,A}$	$2,97^{d,A}$	$2,28^{d,B}$	$1,19^{b,A}$	$1,22^{b,A}$	n.d.	$0,66^{e}$
Hesperetin	$0,31^{a}$	n.d.	$0,21^{b}$	n.d.	$0,18^{b}$	n.d.	$0,44^{c}$	n.d.	$0,40^{c}$	n.d.	$0,28^{a}$	n.d.	$0,23^{b}$	n.d.
Naringenin	n.d.	$0,20^{a}$	$0,22^{a,A}$	$0,22^{ab,B}$	n.d.	n.d.	$0,59^{b,A}$	$0,25^{b,B}$	$0,35^{c,A}$	$0,24^{ab,B}$	n.d.	n.d.	$0,18^{a}$	n.d.
Polidatin (Piceid)	n.d.	$1,92^{a}$	$0,13^{a}$	n.d.	n.d.	n.d.	$1,50^{b,A}$	$1,51^{b,A}$	n.d.	$1,87^{a}$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Heksesterol	n.d.	n.d.	$0,39^{A}$	$4,21^{B}$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Eskuletin	$31,03^{a}$	n.d.	n.d.	9,91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d	$20,83^{b}$	n.d.
Florizin	$2,71^{a,A}$	$4,00^{a,B}$	$4,66^{b,A}$	$5,19^{b,A}$	$4,85^{b,A}$	$4,33^{a,A}$	n.d.	n.d.	$9,78^{c,A}$	$7,75^{c,B}$	$1,82^{d,A}$	$4,65^{ab,B}$	$2,10^{ad,A}$	$2,52^{d,A}$
Σ	**45,8**	**18,5**	**9,54**	**23,6**	**15,1**	**14,4**	**6,05**	**4,81**	**14,8**	**13,2**	**9,50**	**12,3**	**26,7**	**7,80**
Σ Σ	**$389,1^{a}$**	**$461,8^{b}$**	**$253,0^{c}$**	**$659,6^{d}$**	**$911,6^{e}$**	**$1336,8^{f}$**	**$1336,2^{f}$**	**$2076,0^{g}$**	**$1885,7^{h}$**	**$2255,5^{i}$**	**$443,2^{b}$**	**$981,0^{j}$**	**$493,4^{k}$**	**$1035,5^{l}$**

Prikazane vrednosti u tabeli su srednje vrednosti dobijeni iz tri nezavisna merenja (n=3). Mala slova označavaju poređenje između sorti za svako ekstrakciono sredstvo posebno, a velika slova označavaju poređenja u okviru iste sorte. Različita slova označavaju statistički značajne razlike prema *Tukey's* testu ($p<0,05$). Skraćenice: „n.d."-nije detektovan; HB-hidroksibenzoeva kiselina; HC-hidroksicimetna kiselina; *p*-HFS kiselina- *p*-hidroksifenilsirćetna kiselina; 80% Me-metanol (80% metanol+0,1%HCl); 50% Et-etanol (50:50 etanol/H_2O). **Napomena:** nakon ekstrakcije navedenim ekstrakcionim sredstvima, svi uzorci su uparavani do suva i rekonstituisani u milliQ vodi.

Tabela 4.6. UHPLC-DAD MS/MS kvantifikacija fenolnih jedinjenja (izuzev antocijana) u ekstraktima pokožica izdvojenih iz nefermentisane komine

Uzorak (pokožica)	***Smederevka***		***Italijanski Riesling***		***Tamjanika***		***Muscat Hamburg***		***Prokupac***		***Merlot***		***Cabernet Sauvignon***	
Ekstrakciono sredstvo Jedinjenja (mg/kg SM)	**100% Me**	**50% Et**	**100% Me**	**50% Et**	**100% Me**	**50% Et**	**100% Me**	**50% Et**	**100% Me**	**50% Et**	**100% Me**	**50% Et**	**100% Me**	**50% Et**
Fenolne kiseline (HB+HC) i njihovi derivati														
Galna kiselina	$10,74^{a,A}$	$11,13^{a,A}$	$5,20^{b,A}$	$6,66^{b,B}$	$4,32^{b,A}$	$6,25^{b,B}$	$9,06^{c,A}$	$21,60^{c,B}$	$9,57^{c,A}$	$17,07^{d,B}$	$10,80^{a,A}$	$13,81^{e,B}$	$11,93^{d,A}$	$16,30^{d,B}$
Protokatehinska kiselina	$4,90^{a,A}$	$4,88^{ab,A}$	$3,39^{b,A}$	$4,22^{ad,B}$	$4,15^{c,A}$	$5,07^{bc,B}$	$2,99^{b,A}$	$5,71^{c,B}$	$2,88^{b,A}$	$4,07^{d,B}$	$3,34^{b,A}$	$2,79^{e,A}$	$2,88^{b,A}$	$3,93^{d,B}$
Gentizinska kiselina	n.d.	0,14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Vanilinska kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$8,31^{a}$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$3,16^{b}$
Elaginska kiselina	$3,72^{a,A}$	$6,55^{a,B}$	$1,27^{b,A}$	$2,01^{be,B}$	$1,38^{b,A}$	$2,41^{b,B}$	$2,92^{c,A}$	$3,78^{c,B}$	$7,31^{d,A}$	$9,74^{d,B}$	$3,02^{c,A}$	$1,82^{e,B}$	$3,09^{c,A}$	$2,56^{b,A}$
Kofeinska kiselina	$1,04^{a,A}$	$1,81^{a,B}$	$0,23^{b,A}$	$0,39^{be,B}$	$0,32^{bc,A}$	$0,51^{b,B}$	$0,43^{c,A}$	$0,54^{b,A}$	$1,01^{a,A}$	$1,27^{c,B}$	$0,20^{b,A}$	$0,20^{d,A}$	$0,20^{b,A}$	$0,29^{de,A}$
Sinapinska kiselina	$1,75^{a}$	n.d.	$5,49^{b}$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,29	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Σ	**22,2**	**24,5**	**15,6**	**13,3**	**10,2**	**14,2**	**15,4**	**42,2**	**20,8**	**32,2**	**17,4**	**18,6**	**18,1**	**26,2**
Flavan-3-oli i procijanidini														
Katehin	$0,57^{a,A}$	$4,74^{a,B}$	n.d.	$1,54^{b}$	$1,15^{c,A}$	$2,36^{c,B}$	$0,89^{ac,A}$	$36,24^{d,B}$	$1,12^{c,A}$	$44,30^{e,B}$	$1,41^{cd,A}$	$14,35^{f,B}$	$1,85^{d,A}$	$12,45^{g,B}$
Galokatehin	n.d.	n.d.	0,51	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Galokatehin galat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$1,54^{a}$	n.d.	$5,35^{b,A}$	$3,38^{a,B}$	$3,38^{c,A}$	$2,01^{b,B}$	$6,86^{d,A}$	$9,61^{c.B}$
Epigalokatehin galat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$1,16^{a,A}$	$2,21^{a,B}$	$7,88^{b,A}$	$5,15^{b,B}$	$5,55^{c,A}$	$8,22^{c,B}$	$9,79^{d,A}$	$9,62^{d,A}$
Σ	**0,57**	**4,74**	**0,51**	**1,54**	**1,15**	**2,36**	**3,59**	**39,6**	**14,4**	**52,8**	**10,3**	**24,6**	**18,5**	**31,7**
Flavonol aglikoni i glikozidi														
Kvercetin-3-*O*-galaktozid	$47,93^{a,A}$	$47,82^{a,A}$	$16,50^{b,A}$	$23,47^{b,B}$	$39,61^{c,A}$	$53,83^{c,B}$	$32,29^{d,A}$	$39,06^{d,B}$	$30,11^{d,A}$	$38,48^{d,B}$	$39,37^{c,A}$	$39,93^{d,A}$	$34,05^{d,A}$	$38,96^{d,B}$
Rutin	$2,07^{a,A}$	$2,47^{a,A}$	$5,93^{b,A}$	$6,32^{b,A}$	$11,00^{c,A}$	$13,15^{c,B}$	$1,35^{a,A}$	$1,30^{d,A}$	$1,96^{a,A}$	$2,19^{ad,A}$	$13,92^{d,A}$	$15,13^{e,B}$	$11,18^{c,A}$	$14,22^{e,B}$
Kampferol-3-*O*-glukozid	$4,84^{a,A}$	$5,76^{a,B}$	$1,75^{bf,A}$	$2,40^{b,B}$	$5,85^{c,A}$	$7,84^{c,B}$	$1,02^{d,A}$	$1,15^{d,A}$	$2,99^{e,A}$	$3,93^{e,B}$	$2,17^{b,A}$	$2,45^{b,A}$	$1,38^{df,A}$	$1,57^{d,A}$
Kampferol	$0,62^{a,A}$	$3,37^{a,B}$	n.d.	$0,41^{b}$	$1,15^{c,A}$	$1,72^{c,B}$	$0,08^{b,A}$	$0,56^{d,B}$	$0,58^{a,A}$	$0,87^{e,B}$	$0,89^{d,A}$	$1,00^{f,A}$	$0,35^{e,A}$	$0,71^{g,B}$
Σ	**55,5**	**59,4**	**24,2**	**32,6**	**57,6**	**76,5**	**34,7**	**42,1**	**35,6**	**45,5**	**56,4**	**58,5**	**47,0**	**55,5**
Ostala kvantifikovana fenolna jedinjenja														
Luteolin-7-*O*-glukozid	$68,99^{a,A}$	$90,81^{a,B}$	$26,80^{b,A}$	$41,04^{b,B}$	$80,59^{c,A}$	$107,1^{c,B}$	$17,32^{d,A}$	$21,49^{d,A}$	$47,91^{e,A}$	$59,90^{e,B}$	$36,95^{f,A}$	$39,06^{b,A}$	$24,33^{b,A}$	$25,20^{d,A}$
Hesperetin	$1,00^{a,A}$	$2,62^{a,B}$	$0,23^{b,A}$	$0,32^{b,A}$	$0,83^{a,A}$	$0,70^{c,A}$	$1,49^{c,A}$	$1,60^{d,A}$	$0,93^{a,A}$	$0,97^{e,A}$	$4,33^{d,A}$	$3,41^{f,B}$	$4,38^{e,A}$	$4,27^{g,A}$
Naringenin	n.d.	$0,22^{a}$	n.d.	$0,09^{b}$	n.d.	n.d.	n.d.	$0,70^{c}$	n.d.	$0,27^{a}$	n.d.	$0,24^{a}$	n.d.	$0,26^{a}$
Heksesterol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,02
Eskulin	$0,23^{a,A}$	$0,25^{a,A}$	$0,15^{b,A}$	$0,13^{bc,A}$	$0,12^{bc,A}$	$0,09^{b,A}$	n.d.	n.d.	$0,09^{c,A}$	$0,12^{bc,A}$	$0,13^{bcd,A}$	$0,11^{bc,A}$	$0,10^{d,A}$	$0,14^{c,A}$
Florizin	$0,60^{a,A}$	$0,91^{a,B}$	$0,29^{b,A}$	$0,31^{b,A}$	$0,19^{c,A}$	$0,22^{c,A}$	$0,40^{d,A}$	$0,66^{d,B}$	$0,35^{bd,A}$	$0,59^{e,B}$	$0,32^{b,A}$	$0,52^{f,B}$	$0,10^{e,A}$	$0,36^{b,B}$
Σ	**70,8**	**94,8**	**27,5**	**41,9**	**81,7**	**108,1**	**19,2**	**24,4**	**49,3**	**61,9**	**41,7**	**43,3**	**28,9**	**32,2**
Σ Σ	**$149,0^{a}$**	**$183,5^{b}$**	**$67,7^{c}$**	**$89,3^{d}$**	**$150,7^{a}$**	**$201,2^{e}$**	**$72,9^{c}$**	**$148,3^{a}$**	**$120,0^{f}$**	**$192,3^{b}$**	**$125,8^{f}$**	**$145,0^{a}$**	**$112,5^{f}$**	**$145,6^{a}$**

Prikazane vrednosti u tabeli su srednje vrednosti dobijeni iz tri nezavisna merenja (n=3). Mala slova označavaju poređenje između sorti za svako ekstrakciono sredstvo posebno, a velika slova označavaju poređenja u okviru iste sorte. Različita slova označavaju statistički značajne razlike prema *Tukey's* testu ($p<0,05$). Skraćenice: „n.d.“-nije detektovan; HB-hidroksibenzoeva kiselina; HC-hidroksicimetna kiselina; 100% Me-metanol (100% metanol+0,1%HCl); 50% Et-etanol (50:50 v/v etanol/H_2O). **Napomena:** nakon ekstrakcije navedenim ekstrakcionim sredstvima, svi uzorci su uparavani do suva i rekonstituisani u milliQ vodi.

4.1.5.2. UHPLC Orbitrap MS identifikacija i karakterizacija fenolnih jedinjenja (izuzev antocijana) u ekstraktima nefermentisane semenke i pokožice

Metanolni ekstrakti pokožice i semenke su takođe analizirani korišćenjem UHPLC Orbitrap MS, sa ciljem da se identifikuju specifični derivati fenolnih jedinjenja koji nisu prethodno UHPLC-DAD MS/MS identifikovani i kvantifikovani (Tabela 4.5 i 4.6). U ekstraktima semenki su identifikovani derivati hidroksibenzoeve kiseline (8 jedinjenja), derivati hidroksicimetne kiseline (4 jedinjenja), flavan-3-oli i procijanidini (11 jedinjenja), i flavonoli (5 jedinjenja) (Tabela 4.7). Sa druge strane, u ekstraktima pokožica su identifikovani derivati hidroksibenzoeve kiseline (8 jedinjenja), derivati hidroksicimetne kiseline (6 jedinjenja) i flavonoli (13 jedinjenja), dok flavan-3-oli i procijanidini nisu uopšte detektovani (Tabela 4.8). Hidroksibezoeve kiseline, (galna, protokatehinska, *p*-hidroksibenzoeva, gentizinska i vanilinska kiselina) su identifikovane korišćenjem dostupnih standarda. Izuzev gentizinske kiseline, koja nije identifikovana u ekstraktima semenki Smederevke i Merlota, ostale hidroksibenzoeve kiseline su nađene u svim analiziranim ekstraktima semenki i pokožica. Elaginska kiselina (300 *m/z*), heksozid galne kiseline (331 *m/z*) i heksozid dihidroksibenzoeve kiseline (315 *m/z*) su identifikovane na osnovu tačne mase, MS^2 fragmentacije i literaturnih podataka, u svim analiziranim ekstraktima pokožica i semenki.

Prisustvo kofeinske, *p*-kumarinske i ferulinske kiseline u ekstraktima semenki i pokožica analiziranih sorti grožđa (ne kod svih), je potvrđeno korišćenjem dostupnih standarda. Derivati hidroksicimetnih kiselina, kofeoilvinska (311 *m/z*), *p*-kumaroilvinska (295 *m/z*) i feruoilvinska (325 *m/z*) kiselina su identifikovane na osnovu tačne mase, MS fragmentacije i literaturnih podataka (Ji et al., 2015). Kofeoilvinska i *p*-kumaroilvinska kiselina su nađene u ekstraktima semenki i pokožica svih analiziranih sorti. Oba jedinjenja su imala isti osnovni (bazni) pik MS^2 fragmentacije (149 m/z), što odgovara masi deprotonovane vinske kiseline. Feruoilvinska kiselina je nađena samo u ekstraktima pokožica, a njen osnovni pik MS^2 fragmentacije je 193 *m/z* (što odgovara deprotonovanoj ferulinskoj kiselini). Na osnovu dobijenih podataka, može se zaključiti da hidroksicimetne kiseline najčešće egzistiraju spojene sa vinskom kiselinom, što su potvrdili i drugi autori analizirajući ekstrakte semenki, pokožica, komine i grožđa (Di Lecce et al., 2014; Ivanova et al., 2011; José Jara-Palacios et al., 2014; Lingua et al., 2016; Luo et al., 2017; Mitic et al., 2012; Pérez Navarro et al., 2019; Šuković et al., 2020).

Flavan-3-oli i procijanidini su identifikovani na osnovu tačne mase i MS fragmentacije, izuzev katehina koji je potvrđen na osnovu dostupnog standarda. Sva identifikovana jedinjenja (Tabela 4.7), su potvrđena samo u ekstraktima semenki, kod svih analiziranih sorti grožđa. Pored katehina, identifikovani flavan-3-ola su bili epikatehin i katehin galat. Katehin i epikatehin su izomeri sa identičnim tačnim masama i MS fragmentima, ali sa različitim retencionim vremenima, što doprinosi njihovoj identifikaciji. Fragmentacija procijanidina uključuje tri mehanizma fragmentacije: (1) heterocikličnu fisiju prstena, kojom se čuva interflavanska veza između dva prstena, a gubi se floroglucinolna jedinica (-126 Da); (2) retro Diels-Alder-ovu fisiju, koja se bazira na eliminaciji hidroksivinil benzendiol jedinice (-152 Da); i (3) kinon metid cepanje, koje predstavlja fragmentaciju interflavanske veze između dva monomera (Schiano et al., 2022). Tip fragmentacije procijanidina može doprineti njihovoj identifikaciji i klasifikaciji. Nekoliko podgrupa procijanidina je identifikovano: B tip procijanidin dimeri (3 izomera), B tip procijanidin trimeri (2 izomera), B tip procijanidin dimer galati (2 izomera) i B tip procijanidin dimer digalati. Sve izomerne forme procijanidina u okviru svake podgrupe su imale identične mase i MS^2 fragmentacije, ali različita retenciona vremena, što je doprinelo njihovoj identifikaciji. Drugi autori su takođe identifikovali B tip procijanidin dimere i trimere u ekstraktu semenki Italijanskog Rieslinga, Smederevke, Muscat Hamburga, Prokupca, Merlota i Cabernet Sauvignona (Gođevac et al., 2010; Ivanova et al., 2011; Mandić et al., 2008; Rockenbach et al., 2012; Rodríguez Montealegre et al., 2006). Uzimajući u obzir dostupne literaturne podatke, prvi put je publikovana detaljna karakterizacija procijanidin derivata nađenih u ekstraktu semenki autohtone sorte Tamjanika.

Tabela 4.7. UHPLC Orbitrap MS identifikacija i karakterizacija fenolnih jedinjenja nađenih u metanolnim ekstraktima semenki. Za svako detektovano jedinjenje je dato retenciono vreme (t_R), izračunata masa, nađena masa, srednje odstupanje masa (ppm) i njegovi MS^2 fragmenti.

Jedinjenja	*tr, min*	*Izračunata masa, [M–H]⁻*	*Nađena masa, [M–H]⁻*	*ppm*	*MS^2 fragmenti*	*Ispitivane sorte grožđa*						
						S	***IR***	***T***	***MH***	***P***	***MR***	***CS***
Hidroksibenzoeve kiseline i njihovi derivati												
Galna kiselina*	2,30	169,01425	169,01411	0,14	**125**(100)	+	+	+	+	+	+	+
Galna kiselina heksozid	3,77	331,06707	331,06647	0,60	**169**(100), 125(5)	+	+	+	+	+	+	+
Dihidroksibenzoeva kiselina heksozid	3,83	315,07216	315,07150	0,66	**153**(100), 152(50), 109(15), 108(10)	+	+	+	+	+	+	+
Protokatehinska kiselina*	4,33	153,01933	153,01915	0,18	**109**(100), 95(75), 79(20), 59(10)	+	+	+	+	+	+	+
p-Hidroksibenzoeva kiselina*	5,08	137,02442	137,02448	-0,06	109(10), **93**(100)	+	+	+	+	+	+	+
Gentizinska kiselina*	5,44	153,01933	153,01912	0,21	125(50), 123(50), **109**(100), 107(30)	-	+	+	+	+	-	+
Elaginska kiselina	6,81	300,99899	300,99869	0,30	284(40), 271(60), **257**(100), 229(85), 185(40)	+	+	+	+	+	+	+
Vanilinska kiselina*	6,84	167,03498	167,03479	0,19	153(10), **1**52(80), 124(10), **123**(100), 108(20)	+	+	+	+	+	+	+
Hidroksicimetne kiseline i njihovi derivati												
Kofeoilvinska kiselina	4,73	311,04031	311,04065	-0,34	179(40), 177(15), **149**(100)	+	+	+	+	+	+	+
p-Kumaroilvinska kiselina	5,43	295,04594	295,04550	0,44	163(30), **149**(100), 119(5)	+	+	+	+	+	+	+
Kofeinska kiselina*	5,84	179,03498	179,03448	0,50	**135**(100), 117(10), 91(20), 59(15)	+	+	+	-	-	+	-
p-Kumarinska kiselina*	6,67	163,04007	163,04001	0,06	**119**(100)	+	+	-	-	-	-	+
Flavan-3-oli i procijanidini												
B tip procijanidin dimer izomer 1	4,65	577,13515	577,13562	-0,47	559(10), 451(30), **425**(100), 407(40), 289(20)	+	+	+	+	+	+	+
B tip procijanidin dimer izomer 2	4,90	577,13515	577,13560	-0,45	559(5), 451(20), **425**(100), 407(35), 289(20)	+	+	+	+	+	+	+
B tip procijanidin trimer izomer 1	5,29	865,19854	865,19904	-0,50	**695**(100), 577(60), 425(30), 407(30), 287(30)	+	+	+	+	+	+	+
Katehin	5,35	289,07176	289,07190	-0,14	271(5), **245**(100), 205(40), 179(15), 125(5)	+	+	+	+	+	+	+
Epikatehin	5,85	289,07176	289,07175	0,01	271(5), **245**(100), 205(40), 179(15), 125(5)	+	+	+	+	+	+	+
B tip procijanidin dimer izomer 3	5,57	577,13515	577,13556	-0,41	559(10), 451(20), **425**(100), 407(40), 289(20)	+	+	+	+	+	+	+
B tip procijanidin dimer galat izomer 1	5,83	729,14611	729,14685	-0,74	577(90), 559(80), 425(20), **407**(100), 289(20)	+	+	+	+	+	+	+
B tip procijanidin trimer izomer 2	5,89	865,19854	865,19794	0,60	**695**(100), 577(80), 425(30), 407(40), 287(35)	+	+	+	+	+	+	+
B tip procijanidin dimer galat izomer 2	6,10	729,14611	729,14594	0,17	577(50), 559(60), 425(10), **407**(100), 289(20)	+	+	+	+	+	+	+
B tip procijanidin dimer digalat	6,45	881,15707	881,15814	-1,07	**729**(100), 711(30), 577(10), 559(20), 407(30)	+	+	+	+	+	+	+
Katehin galat	6,75	441,08272	441,08328	-0,56	331(10), **289**(100), 271(10), 169(25)	+	+	+	+	+	+	+
Flavonol aglikoni i glikozidi												
Kvercetin 3-*O*-rutinozid*	6,44	609,14611	609,14496	1,15	343(5), **301**(100), 300(30), 271(10), 255(5)	-	+	+	-	-	+	+
Kvercetin 3-*O*-glukozid*	6,70	463,08820	463,08844	-0,24	**301**(100), 300(30)	+	+	+	+	+	+	+
Taksifolin*	7,09	303,05103	303,05084	0,19	**285**(100), 179(50), 177(10), 151(30), 125(10)	+	+	+	+	+	+	+
Kampferol 3-*O*-glukozid*	7,14	447,09329	447,09358	-0,29	327(20), 285(80), **284**(100), 255(10)	+	-	+	-	-	+	+
Izoramnetin 3-*O*-glukozid*	7,26	477,10385	477,10437	-0,52	357(20), 315(50), **314**(100), 300(5), 299(5)	-	-	+	+	+	+	-
Kvercetin*	8,81	301,03537	301,03494	0,43	283(15), 271(60), 257(25), **179**(100), 151(80)	+	+	+	+	-	+	-

Napomena: Navedena jedinjenja su identifikovana u ekstraktima semenki, koje su prvobitno ekstrahovane 80% metanolom+0,1%HCl; a zatim su ekstrakti nakon uparavanja do suva finalno rekonstituisani u milliQ vodi. Skraćenice: S-Smederevka; IR-Italijanski Riesling;T-Tamjanika; MH-Muscat Hamburg; P-Prokupac; MR-Merlot; CS-Cabernet Sauvignon. *Jedinjenja identifikovana korišćenjem dostupnih standarda. „+“-identifikovana jedinjenja; „-“-jedinjenja nisu identifikovana.

Tabela 4.8. UHPLC Orbitrap MS identifikacija i karakterizacija fenolnih jedinjenja (izuzev antocijana) nađenih u metanolnim ekstraktima pokožica. Za svako detektovano jedinjenje je dato retenciono vreme (t_R), izračunata masa, nađena masa, srednje odstupanje masa (ppm) i njegovi MS^2 fragmenti.

Jedinjenja	tr, min	Izračunata masa, $[M–H]^–$	Nađena masa, $[M–H]^–$	ppm	MS^2 fragmenti	Ispitivane sorte grožđa						
						S	IR	T	MH	P	MR	CS
Hidroksibenzoeve kiseline i njihovi derivati												
Galna kiselina*	2,30	169,01425	169,01411	0,14	**125**(100)	+	+	+	+	+	+	+
Galna kiselina-heksozid	3,77	331,06707	331,06647	0,60	**169**(100), 125(5)	+	+	+	+	+	+	+
Dihidroksibenzoeva kiselina-heksozid	3,83	315,07216	315,07150	0,66	**153**(100), 152(50), 109(15), 108(10)	+	+	+	+	+	+	+
Protokatehinska kiselina*	4,33	153,01933	153,01915	0,18	**109**(100), 95(75), 79(20), 59(10)	+	+	+	+	+	+	+
p-Hidroksibenzoeva kiselina*	5,08	137,02442	137,02448	-0,06	109(10), **93**(100)	+	+	+	+	+	+	+
Gentizinska kiselina*	5,44	153,01933	153,01912	0,21	125(50), 123(50), **109**(100), 107(30)	+	+	+	+	+	+	+
Elaginska kiselina	6,81	300,99899	300,99869	0,30	284(40), 271(60), **257**(100), 229(85), 185(40)	+	+	+	+	+	+	+
Vanilinska kiselina*	6,84	167,03498	167,03479	0,19	153(10), **1**52(80), 124(10), **123**(100), 108(20)	+	+	+	+	+	+	+
Hidroksicimetne kiseline i njihovi derivati												
Kofeoilvinska kiselina	4,73	311,04031	311,04065	-0,34	179(40), 177(15), **149**(100)	+	+	+	+	+	+	+
p-Kumaroilvinska kiselina	5,43	295,04594	295,04550	0,44	163(30), **149**(100), 119(5)	+	+	+	+	+	+	+
Feruloilvinska kiselina	5,78	325,05651	325,05643	0,08	289(10), 265(15), 235(10), **193**(100), 149(15)	+	+	+	+	+	+	+
Kofeinska kiselina*	5,84	179,03498	179,03448	0,50	**135**(100), 117(10), 91(20), 59(15)	+	+	+	+	+	+	+
p-Kumarinska kiselina*	6,67	163,04007	163,04001	0,06	**119**(100)	+	-	-	-	+	+	+
Ferulinska kiselina*	7,02	193,05063	193,05043	0,20	178(70), **149**(100), 134(50)	+	+	+	+	+	+	+
Flavan-3-oli i procijanidini						nije identifikovano						
Flavonol aglikoni i glikozidi												
Miricetin 3-*O*-heksozid	6,23	479,08311	479,08356	-0,45	463(30), 455(10), 317(80), **316**(100)	-	-	-	+	+	+	+
Kvercetin 3-*O*-rutinozid*	6,44	609,14611	609,14496	1,15	343(5), **301**(100), 300(30), 271(10), 255(5)	+	+	+	+	+	+	+
Kvercetin 3-*O*-glukozid*	6,70	463,08820	463,08844	-0,24	**301**(100), 300(30)	+	+	+	+	+	+	+
Kvercetin 3-*O*-heksuronid	6,72	477,06692	477,06741	-0,49	**301**(100)	+	+	+	+	+	+	+
Laricitrin 3-*O*-heksozid	6,73	493,09876	493,09836	0,40	**331**(100), 330(30), 317(40)	-	-	-	+	+	+	+
Taksifolin*	7,09	303,05103	303,05084	0,19	**285**(100), 179(50), 177(10), 151(30), 125(10)	-	-	-	+	-	-	+
Kampferol 3-*O*-glukozid*	7,14	447,09329	447,09358	-0,29	327(20), 285(80), **284**(100), 255(10)	+	+	+	+	+	+	+
Siringetin 3-*O*-heksozid	7,23	507,11441	507,11444	-0,03	479(10), 387(20), 345(80), **344**(100), 299(15)	-	-	-	-	+	+	+
Izoramnetin 3-*O*-glukozid*	7,26	477,10385	477,10437	-0,52	357(20), 315(50), **314**(100), 300(5), 299(5)	+	+	+	+	+	+	+
Izoramnetin 3-*O*-heksuronid	7,32	491,08311	491,08316	-0,05	473(10), 315(70), **301**(100), 300(60)	+	+	+	+	+	+	+
Kvercetin*	8,81	301,03537	301,03494	0,43	283(15), 271(60), 257(25), **179**(100), 151(80)	+	+	+	+	+	+	+
Kampferol*	9,74	285,04046	285,04025	0,21	**255**(100), 227(10)	+	+	+	+	+	+	+
Izoramnetin*	9,93	315,05103	315,05054	0,49	301(20), **300**(100)	+	+	+	+	+	+	+

Napomena: Navedena jedinjenja su identifikovana u ekstraktima pokožica, koje su prvobitno ekstrahovane sa 100% metanolom+0,1%HCl; a zatim nakon uparavanja do suva finalno rekonstituisani u milliQ vodi. Skraćenice: S-Smederevka; IR-Italijanski Riesling;T-Tamjanika; MH-Muscat Hamburg; P-Prokupac; MR-Merlot; KS-Cabernet Sauvignon. *Jedinjenja identifikovana korišćenjem dostupnih standarda. „+“-identifikovana jedinjenja; „-“-jedinjenja nisu identifikovana.

Flavonol aglikoni i glikozidi su najčešće identifikovani u ekstraktima pokožica (Tabela 4.8), dok su u ekstraktima semenki identifikovani samo par karakterističnih flavonola (Tabela 4.7). Flavonol aglikoni (kvercetin, izoramnetin i kampferol) i njihovi glikozidi (kvercetin-3-*O*-rutinozid, kvercetin-3-*O*-glukozid, kvercetin-3-*O*-heksuronid, izoramnetin-3-*O*-glukozid, izoramnetin-3-*O*-heksuronid i kampferol-3-*O*-glukozid) su identifikovani u ekstraktima pokožica svih sedam analiziranih sorti. Miricetin-3-*O*-heksozid (479 *m/z*), laricitrin-3-*O*-heksozid (493 *m/z*) i siringetin-3-*O*-heksozid (507 *m/z*), su identifikovani na osnovu tačne mase i specifične MS^2 fragmentacije. Ova jedinjenja su potvrđena samo u ekstraktima pokožica crnih sorti grožđa, izuzev ekstrakta Muscat Hamburga u kom nije nađen siringetin-3-*O*-heksozid. Identifikovani flavonol aglikoni i glikozidi su prethodno nađeni u ekstraktima pokožica brojnih sorti grožđa iz roda *Vitis vinifera* (Di Lecce et al., 2014; Ivanova et al., 2011; Ji et al., 2015; Perestrelo et al., 2012; Pérez Navarro et al., 2019; Šuković et al., 2020). Uzimajući u obzir pretraženu literaturu, prvi put je data detaljna karakterizacija flavonola nađenih u ekstraktu pokožica autohtonih sorti grožđa Tamjanika i Prokupac.

4.1.5.3. UHPLC Orbitrap MS identifikacija, karakterizacija i kvantifikacija antocijana u ekstraktima nefermentisane pokožice

Ukupno 15 antocijan derivata je identifikovano i kvantifikovano u ekstraktima pokožica koje su izdvojene iz nefermentisane komine crnih sorti grožđa, korišćenjem UHPLC-Orbitrap MS^4. Derivati antocijana su identifikovani na osnovu molekulske mase, pojedinačne fragmentacije (MS^4; MS^3; MS^2) i postojećih literaturnih podataka (Drosou et al., 2015; Fraige et al., 2014; Guerrero et al., 2009; Pantelić et al., 2016) (Tabela 4.9), dok je kvantifikacija odrađena pomoću dostupnih standarda ili su u odsustvu pojedinih standarda identifikovani derivati izraženi kao ekvivalenti malvidin-3-*O*-glukozida (Tabela 4.10). Sadržaj ukupnih i pojedinačno potvrđenih antocijana je bio značajno viši u ekstraktima koji su primarno ekstrahovani sa zakišeljenim metanolom, što je verovatno zbog povećane stabilnosti antocijana u kiseloj sredini (Vatai et al., 2009). Malvidin derivati su bili dominantni u ekstraktima pokožica svih analiziranih sorti (>70%), osim u ekstraktima sorte Muscat Hamburg u kojima je dominantan bio peonidin-3-*O*-glukozid i malvidin-3,5-di-*O*-glukozid. Drugi autori su takođe pokazali dominantno prisustvo malvidin derivata u etanolnim i/ili metanolnim ekstraktima pokožice Merlota (Bindon et al., 2011), Cabernet Sauvignon-a (Guerrero et al., 2009), Prokupca (Mitic et al., 2012), kao i u ekstraktu pokožice Muscat Hamburga, što nije u saglasnosti sa rezultatima ove studije (Mitic et al., 2012). Malvidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid i petunidin-3-*O*-heksozid su dominantno kvantifikovani u metanolnim ekstraktima Merlot-a (142,79; 53,30; i 43,28 mg/kg SM) i Cabernet Sauvignon-a (255,22; 102,37 i 97,84 mg/kg SM), dok su ostali glukozidi detektovani u tragovima. Drugi autori su dobili značajno viši sadržaj navedenih glikozida u etanolnim i/ili metanolnim ekstraktima pokožica istih sorti (Bindon et al., 2011; Guerrero et al., 2009; Mitic et al., 2012). Ove razlike mogu biti zbog načina pripreme uzoraka za analizu i činjenice da su uzorci primarno ekstrahovani metanolom ili etanolom a zatim uparavani, rekonstituisani u vodi, filtrirani kroz 0,45µL i tek potom analizirani. Kao što se može primetiti, u ekstraktima pokožica internacionalnih vinskih sorti grožđa Merlot i Cabernet Sauvignon je pronađen značajno viši sadržaj (od 7-21 puta više) antocijana i raznovrsniji profil njihovih derivata, nego u ekstraktima autohtone sorte Prokupac. U ekstraktima Merlot-a i Cabernet Sauvignon-a su u značajnim količinama nađeni različiti acetil, kofeoil i kumaroil derivati antocijana, prvenstveno malvidin-3-*O*-(6"-acetil)heksozid (100,82-269,11 mg/kg SM) i malvidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil)heksozid (9,47-145,96 mg/kg SM). Prisustvo ovih derivata su potvrdili i drugi autori analizirajući pokožice različitih sorti grožđa gajenih u Španiji (Guerrero et al., 2009; Pérez Navarro et al., 2019), Portugalu (Perestrelo et al., 2012), Makedoniji (Ivanova et al., 2011), Srbiji (Mitic et al., 2012; Natić et al., 2021; Pantelić et al., 2016), Crnoj Gori (Šuković et al., 2020) i Južnoafričkoj republici (Bindon et al., 2011). Na slici 4.5 prikazane su strukture dominantnih antocijanidin-3-*O*-glukozida u ekstraktima pokožica njihova retenciona vremena i tačne mase u pozitivnom jonizacionom modu (*m/z*).

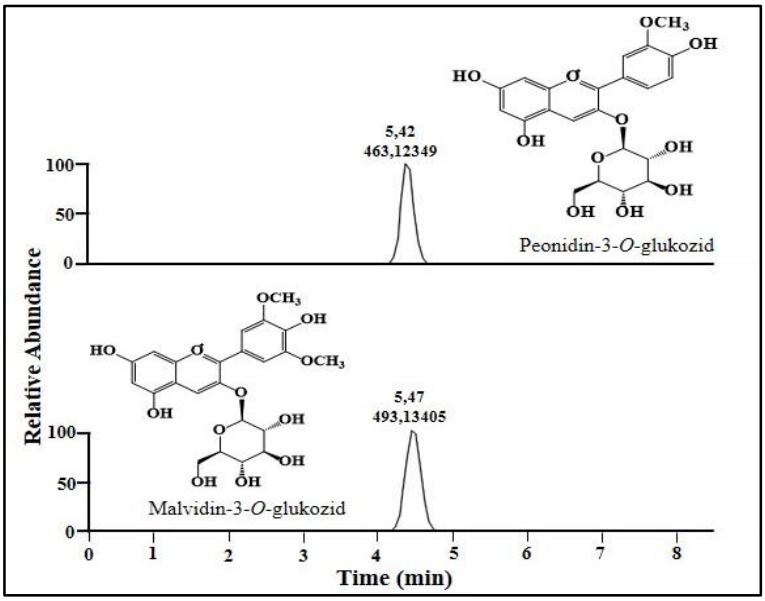
Tabela 4.9. UHPLC-MS/MS Orbitrap identifikacija antocijana nađenih u ekstraktima pokožica. Za svako detektovano jedinjenje je dato retenciono vreme (t_R), izračunata masa, nađena masa, srednje odstupanje masa (ppm) i njegovi MS^2, MS^3 i MS^4 fragmenti.

Jedinjenja	*t_R, min*	*Molekulska formula, $[M–H]^+$*	*Izračunata masa, $[M–H]^+$*	*Nađena masa, $[M–H]^+$*	*ppm*	*MS^2 fragmenti*	*MS^3 fragmenti*	*MS^4 fragmenti*
Malvidin derivati								
Malvidin-3-*O*-glukozid	5,47	$C_{23}H_{25}O_{12}^+$	493,13405	493,13107	2,98	332(10), **331**(100)	316(80), **315**(100), 299(90), 298(30), 287(70), 270(50)	313(90), 299(25), 287(100), 285(70), 257(60)
Malvidin-3,5-di-*O*-glukozid	5,18	$C_{29}H_{35}O_{17}^+$	655,18688	655,18335	3,53	494(15), **493**(100), 332(10), 331(70)	**331**(100)	316(80), 315(100), 299(90), 298(30), 287(70), 270(50)
Malvidin-3-*O*-heksozid-acetaldehid	5,97	$C_{25}H_{25}O_{12}^+$	517,13405	517,13007	3,98	356(15), **355**(100)	**339**(100), 322(40), 311(15), 294(45), 266(20), 202(10)	337(50), 321(35), 311(100), 309(95), 293(10), 281(20)
Malvidin-3-*O*-(6"-acetil)heksozid	6,32	$C_{25}H_{27}O_{13}^+$	535,14462	535,14136	3,26	332(10), **331**(100)	316(80), **315**(100), 299(90), 298(30), 287(70), 270(50)	313(100), 299(30), 287(90), 285(80), 257(60)
Malvidin-3-*O*-(6"-kofeoil)heksozid	6,67	$C_{32}H_{31}O_{15}^+$	655,16575	655,16095	4,80	332(10), **331**(100)	316(80), **315**(100), 299(90), 298(30), 287(70), 270(50)	313(90), 299(25), 287(100), 285(70), 257(60)
Malvidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil)heksozid	7,10	$C_{32}H_{31}O_{14}^+$	639,17083	639,16595	4,88	332(10), **331**(100)	316(80), **315**(100), 299(90), 298(30), 287(70), 270(50)	313(90), 299(25), 287(100), 285(70), 257(60)
Peonidin derivati								
Peonidin-3-*O*-glukozid	5,42	$C_{22}H_{23}O_{11}^+$	463,12349	463,12054	2,95	302(10), **301**(100)	287(10), **286**(100)	268(20), 258(100), 230(25), 202(5)
Peonidin-3-*O*-(6"-acetil)heksozid	6,31	$C_{24}H_{25}O_{12}^+$	505,13405	505,13010	3,95	302(10), **301**(100)	287(10), **286**(100)	268(20), 258(100), 230(25), 202(5)
Peonidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil)heksozid	7,03	$C_{31}H_{29}O_{13}^+$	609,16027	609,15723	3,04	302(10), **301**(100)	287(10), **286**(100)	268(20), 258(100), 230(25), 202(5)
Delfinidin derivati								
Delfinidin-3-*O*-glukozid	4,66	$C_{21}H_{21}O_{12}^+$	465,10275	465,09921	3,54	304(15), **303**(100)	303(15), 285(10), 275(10), **257**(100), 247(15), 229(30)	239(5), 229(100), 213(25), 201(25), 173(20)
Delfinidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil)heksozid	6,44	$C_{30}H_{27}O_{14}^+$	611,13953	611,13483	4,70	304(10), **303**(100)	303(20), 285(10), **257**(100), 247(10), 229(30)	229(100), 213(25), 201(30), 173(15)
Petunidin derivati								
Petunidin-3-*O*-heksozid	5,07	$C_{22}H_{23}O_{12}^+$	479,11840	479,11465	3,75	318(10), **317**(100)	**302**(100), 274(5)	274(100), 246(10), 228(10), 218(10)
Petunidin-3-*O*-(6“-acetil)heksozid	6,03	$C_{24}H_{25}O_{13}^+$	521,12897	521,12476	4,21	318(10), **317**(100)	**302**(100), 285(30), 274(10)	285(10), 274(100), 260(5), 246(15), 218(5), 153(20)
Petunidin-3-*O*-(6"-p-kumaroil)heksozid	6,73	$C_{31}H_{29}O_{14}^+$	625,15518	625,15045	4,73	318(10), **317**(100)	**302**(100), 285(30), 274(10)	285(10), 274(100), 260(5), 246(15), 218(5), 153(20)
Cijanidin derivati								
Cijanidin-3-*O*-glukozid	4,89	$C_{21}H_{21}O_{11}^+$	449,10784	449,10425	3,59	288(10), **287**(100)	287(60), 269(25), 259(40), 241(50), 231(70), **213**(100)	195(10), 185(100), 167(10), 157(20), 141(20)

Tabela 4.10. UHPLC-MS/MS Orbitrap kvantifikacija antocijana (mg/kg SM) u ekstraktima pokožica izdvojenih iz nefermentisane komine.

Uzorak (pokožica)	***Muscat Hamburg***		***Prokupac***		***Merlot***		***Cabernet Sauvignon***	
Ekstrakciono sredstvo	**100% Me**	**50% Et**	**100% Me**	**50% Et**	**100% Me**	**50% Et**	**100% Me**	**50% Et**
Jedinjenje (mg/kg SM)								
Malvidin derivati								
Malvidin-3-*O*-glukozid[a]	13,75[a,A]	3,88[a,B]	18,90[a,A]	5,89[a,B]	142,79[b,A]	30,27[b,B]	255,22[c,A]	108,31[c,B]
Malvidin-3,5-di-*O*-glukozid[a]	22,37[a,A]	12,71[a,B]	0,39[b,A]	0,21[b,A]	1,84[c,A]	0,62[b,B]	2,30[c,A]	0,94[b,B]
Malvidin-3-*O*-heksozid-acetaldehid[b]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,88[a,A]	1,58[a,B]	4,03[b,A]	4,43[b,A]
Malvidin-3-*O*-(6"-acetil)heksozid[b]	n.d.	n.d.	4,50[a,A]	6,18[a,A]	112,98[b,A]	100,82[b,B]	191,13[c,A]	269,11[c,B]
Malvidin-3-*O*-(6"-kofeoil)heksozid[b]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18,81[a,A]	3,12[a,B]	35,41[b,A]	9,91[b,B]
Malvidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil)heksozid[b]	n.d.	1,69[a]	12,81[a,A]	8,15[b,A]	48,89[b,A]	9,47[b,B]	145,96[c,A]	41,51[c,B]
Σ	**36,1 (38,5)**	**18,3 (59,7)**	**36,6 (78,8)**	**20,4 (79,2)**	**328,2 (70,8)**	**145,9 (81,4)**	**634,0 (67,5)**	**434,2 (77,5)**
Peonidin derivati								
Peonidin-3-*O*-glukozid[a]	53,14[a,A]	11,09[a,B]	9,55[b,A]	2,77[b,B]	53,30[a,A]	10,19[a,B]	102,37[c,A]	37,56[c,B]
Peonidin-3-*O*-(6"-acetil)heksozid[b]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9,55[a,A]	6,88[a,B]	18,84[b,A]	24,91[b,B]
Peonidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil)heksozid[b]	n.d.	n.d.	n.d.	2,15[a]	9,98[a,A]	1,54[a,B]	25,31[b,A]	6,44[b,B]
Σ	**53,1 (56,7)**	**11,1 (36,3)**	**9,5 (20,6)**	**4,9 (19,1)**	**72,8 (15,7)**	**18,6 (10,4)**	**146,5 (15,6)**	**68,9 (12,3)**
Delfinidin derivati								
Delfinidin-3-*O*-glukozid[a]	0,52[a,A]	0,67[a,A]	n.d.	0,46[a]	9,91[b,A]	1,75[b,B]	21,69[c,A]	7,79[c,B]
Delfinidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil)heksozid[b]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,30	n.d.
Petunidin derivati								
Petunidin-3-*O*-heksozid[b]	2,06[a]	n.d.	n.d.	n.d.	43,28[b,A]	6,86[a,B]	97,84[c,A]	30,98[a,B]
Petunidin-3-*O*-(6"-acetil)heksozid[b]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,38[a,A]	5,61[a,A]	11,56[b,A]	16,24[b,B]
Petunidin-3-*O*-(6"-p-kumaroil)heksozid[b]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	17,89	n.d.
Cijanidin derivati								
Cijanidin-3-*O*-glukozid[a]	1,86[a,A]	0,56[a,B]	0,29[b]	n.d.	3,72[c,A]	0,61[a,B]	7,17[d,A]	2,01[b,B]
Σ	**4,4 (4,7)**	**1,2 (4,0)**	**0,29 (0,6)**	**0,46 (1,8)**	**62,3 (13,4)**	**14,8 (8,3)**	**159,5 (17,0)**	**57,0 (10,2)**
Σ Σ	**93,70[a]**	**30,59[b]**	**46,44[c]**	**25,80[d]**	**463,31[e]**	**179,31[f]**	**940,01[g]**	**560,14[h]**

Prikazane vrednosti u tabeli su srednje vrednosti dobijeni iz tri nezavisna merenja (n=3). Mala slova označavaju poređenje između sorti za svako ekstrakciono sredstvo posebno, a velika slova označavaju poređenja u okviru iste sorte. Različita slova označavaju statistički značajne razlike prema *Tukey's* testu ($p<0,05$).Vrednosti u zagradama definišu procenat zastupljenosti karakterističnih grupa antocijanidin derivata u uzorcima (%). [a]Jedinjenja kvantifikovana korišćenjem dostupnih standarda; [b]Jedinjenja kvantifikovana i izražena kao mg ekvivalenti malvidin-3-*O*-glukozida po kg SM uzorka. Skraćenice: „n.d."-nije detektovan; 100% Me-metanol (100% metanol+0,1%HCl); 50% Et-etanol (50:50 v/v etanol/H_2O). **Napomena:** nakon ekstrakcije navedenim ekstrakcionim sredstvima, svi uzorci su uparavani do suva i rekonstituisani u milliQ vodi.



Slika 4.5. Retenciona vremena, tačne mase u pozitivnom jonizacionom modu (*m/z*) i strukture dominantnih antocijanidin-3-*O*-glukozida u ekstraktima pokožica.

4.1.5.4. Spektrofotometrijska analiza ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida, proantocijanidina i monomernih antocijana u ekstraktima semenki i pokožica

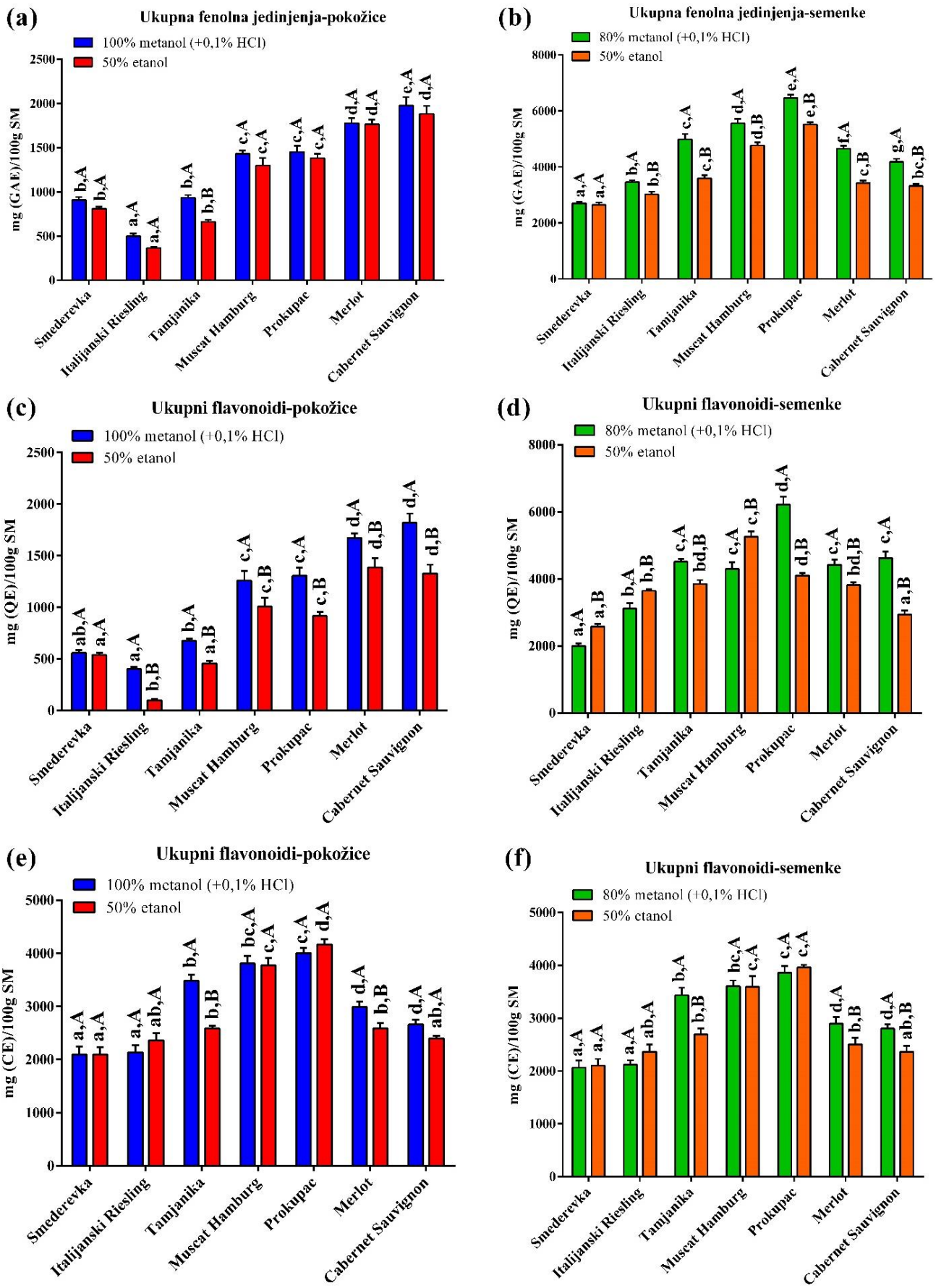
Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida, proantocijanidina i monomernih antocijana u ekstraktima semenki i pokožica sedam različitih sorti grožđa, su prikazani na slici 4.6 (grafici, a-i).

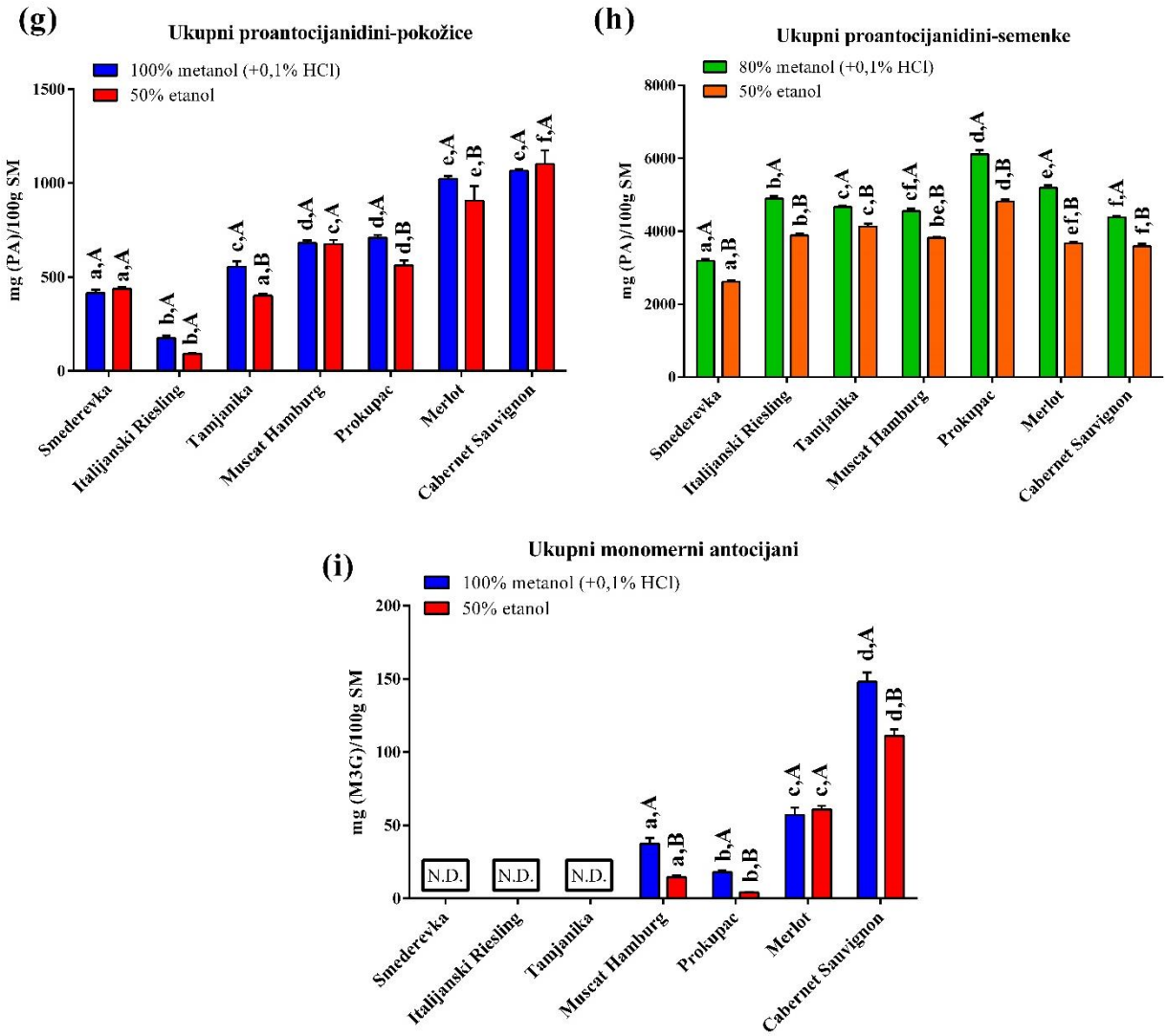
Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) u ekstraktima semenki analiziranih sorti je bio značajno viši u poređenju sa ekstraktima pokožica, što je u saglasnosti sa rezultatima hromatografske analize. TPC u ekstraktima semenki je bio u opsegu od 2699,08±26,99 (Smederevka) do 6467,9±64,68 mgGAE/100g SM (Prokupac) za metanolne ekstrakte; odnosno od 2644,82±26,45 (Smederevka) do 5518,68±55,19 mgGAE/100g SM (Prokupac) za etanolne ekstrakte (slika 4.6b). TPC vrednosti za etanolne ekstrakte semenki su bili značajno manji, u poređenju sa TPC vrednostima za metanolne ekstrakte semenki, što je u suprotnosti sa rezultatima dobijenim UHPLC-DAD MS/MS kvantifikacijom. Ove razlike se mogu opravdati činjenicom da su hromatografskom analizom kvantifikovana samo fenolna jedinjenja za koja su bili dostupni standardi. Dobijeni rezultati su bili u opsegu rezultata koje su dobili Medouni-Adrar et al. (2015), za vodeni, metanolni, etanolni i acetonski ekstrakt semenki Ahmar Bou-Amar autohtone Alžirske sorte grožđa (3892-8651 mgGAE/100g SM), Tahmaz et al. (2021) za vodene ekstrakte (primarno ekstrahovani metanolom) semenki šest vinskih sorti grožđa gajenih u Turskoj (2740-6025 mgGAE/100g SM) i Pantelić et al. (2016) za vodene ekstrakte (primarno ekstrahovane 80% metanolom) 13 autohtonih i internacionalnih sorti grožđa gajenih u Srbiji (3802-10298 mhGAE/100g SM). Visok TPC potvrđen za ekstrakt semenki autohtone sorte Prokupac prethodno su dobili i drugi autori, analizirajući vodeni (10125 mgGAE/100g SM) (Pantelić et al., 2016) i etanolni (14669 mgGAE/100g SM) (Dabetić et al., 2020) ekstrakt. Sa druge strane, najviši TPC za oba ekstrakciona sredstva je potvrđen u ekstraktima pokožica Cabernet Sauvignon-a (1976,26±19,76 i 1884,32±18,84 mgGAE/100g SM), bez statistički značajnih razlika među njima. Ekstrakti pokožica belih sorti grožđa su imale značajno niži TPC, u poređenju sa ekstraktima pokožica crnih sorti grožđa (slika 4.6a), prvenstveno zbog sadržaja antocijana, koji su detektovani samo u pokožicama crnih sorti. Dalje, TPC u ekstraktima pokožica Muscat Hamburg-a i Prokupca se nije međusobno značajno razlikovao; međutim, njihov TPC bio je značajno niži u poređenju sa TPC vrednostima potvrđenim u ekstraktima pokožica internacionalnih sorti Merlot i Caberne Sauvignon. Dobijeni rezultati u ovoj studiji su bili niži u poređenju sa rezultatima koje su dobili Tahmaz et al. (2021), analizirajući pokožice vinskih sorti grožđa (2117,5-3787,5 mgGAE/100g SM), bili su u opsegu rezultata koje su dobili Pantelić et al. (2016) i Natić et al. (2021), za ekstrakte

pokožica autohtonih i interancionalnih sorti grožđa gajenih u Srbiji (39-2560 mgGAE/100g SM), dok su bili značajno viši u poređenju sa rezultatima koje su dobili Du et al. (2012), za pokožicu Merlota (179,1 mgGAE/100g) i Cabernet Sauvignona (219,5 mgGAE/100g). Ove varijacije u rezultatima mogu biti posledica primenjenog ekstrakcionog sredstva u pripremi ekstrakata, ekoloških i agronomskih uslova kojima je grožđe bilo izloženo tokom sazrevanja ili zbog efekata kao što su godina berbe i stepena zrelosti grožđa (Bindon et al., 2011; Obreque et al., 2013).

Ukupan sadržaj flavonoida (TFC) u ekstraktima semenki i pokožica je određen i izražen korišćenjem dva različita standarda (kvercetina i katehina), a rezultati su prikazani na slici 4.6 (grafici, c-f). Uzimajući u obzir činjenicu da su dominantni flavonoidi u pokožici grožđa kvercetin derivati (Tabela 4.7), a u semenkama katehin i procijanidini (Tabela 4.8), preporučuje se korišćenje kvercetina i katehina kao standarda za kvantifikaciju ukupnih flavonoida. TFC u metanolnim ekstraktima semenki je varirao od 1995,2 do 6211,66 mg(QE)/100g SM; odnosno od 2064,6 do 3860,27 mg(CE)/100g SM. Sa druge strane, TFC u etanolnim ekstraktima semenki je varirao od 2576,42 do 5259,24 mg(QE)/100g SM; odnosno od 2103,11 do 3959,51 mg(CE)/100g SM. Za oba standarda, najmanja količina ukupnih flavonoida je potvrđena u ekstraktima semenki Smederevke i Italijanskog Riesling-a, a najviša u ekstraktima semenki autohtone sorte grožđa Prokupac, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim UHPLC-DAD MS/MS kvantifikacijom. Ivanova et al. (2011) su dobili značajno viši TFC za ekstrakte semenki Smederevke (4940mg(CE)/100g SM) i Merlota (4860 mg(CE)/100g SM), gajenih u Makedoniji. Dalje, rezultati u ovoj studiji su bili viši ili slični rezultatima koje su dobili Guaita et al. (2021), analizirajući ekstrakte semenki Barbera grožđa (520-3230 mg/100g SM), koji su procesuirana na različitim temperaturama sušenja, prikupljani i čuvani u različitim periodima. TFC za metanolne ekstrakte pokožica je varirao od 400,38 (Italijanski Riesling) do 1819,43 (Cabernet Sauvignon) mg(QE)/100g SM; odnosno od 2092,83 (Smederevka) do 4000,69 (Prokupac) mg(CE)/100g SM. Sa druge strane, TFC za etanolne ekstrakte se nije razlikovao ili je bio značajno manji, u poređenju sa metanolnim ekstraktima istih sorti, a njihove vrednosti su varirale od 97,53 (Italijanski Riesling) do 1386,78 (Merlot) mg(QE)/100g SM; odnosno od 2093,01 (Smedervka) do 4169,02 (Prokupac) mg(CE)/100g. Dobijeni rezultati u ovoj studije su viši ili u opsegu TFC vrednosti koje su dobili Ivanova et al. (2011), analizirajući pokožice crvenih i belih sorti grožđa gajenih u Makedoniji (312 do 1020 mg(CE)/100g SM), Putnik et al. (2016), analizirajući ekstrakte pokožice Merlota (1803-5403 mg(QE)/100g SM, u zavisnosti od uslova ekstrakcije), i Braga et al. (2016), analizirajući ekstrakt pokožice Pinot Noir-a (2243 mg(QE)/100g SM). Varijacije u rezultatima su zbog sortne karakteristike, uslova ekstrakcije ili čak zbog izbora standarda koji je korišćen za kvantifikaciju. Uzimajući u obzir dobijene rezultate i fenolne profile analizirane u okviru ove disertacije, može se zaključiti da su u analizi ukupnih flavonoida dobijeni verodostojniji rezultati kada se katehin koristi kao standard za ekstrakte semenki, a kada se kvercetin koristi kao standard za ekstrakte pokožica.

Sadržaj ukupnih proantocijanidina (PAC) je bio značajno viši u ekstraktima semenki, što je i očekivano ako se uzme u obzir činjenica da su semenke bogat izvor procijanidina. Sadržaj ukupnih proantocijanidina u ekstraktima semenki je varirao od 3189,44 do 6109,24 mg(PA)/100g SM, za metanolne ekstrakte; odnosno od 2612,1 do 4811,32 mg(PA)/100g SM za etanolne ekstrakte (Slika 4.6h). Među analiziranim ekstraktima, najniži PAC je potvrđen u semenki Smederevke, a najviši u semenki Prokupca. Sa druge strane, PAC u ekstraktima pokožica je bio u opsegu od 91,76±2,91 do 1101,54±72,17 mg(PA)/100g, zavisno od analizirane sorte i korišćenog ekstrakcionog sredstva (slika 4.5g). Slične rezultate su dobili Putnik et al. (2016), ispitujući uticaj različitih ekstrakcionih parametara na sadržaj procijanidina u pokožici Merlota (684-1610 mg(CE)/100g SM). Guaita et al. (2021), su dobili značajno viši PAC za ekstrakte različito tretiranih pokožica (750-4200 mg/100g) Barbera sorte grožđa, i značajno niži PAC za ekstrakte semenki (290-1870 mg/100g) iste sorte grožđa. Ove razlike u rezultatima su verovatno zbog različitih metodologija korišćenih u ispitivanju ukupnih proantocijanidina.


(a)
Ukupna fenolna jedinjenja-pokožice
100% metanol (+0,1% HCl)
50% etanol
mg (GAE)/100g SM
(b)
Ukupna fenolna jedinjenja-semenke
80% metanol (+0,1% HCl)
50% etanol
mg (GAE)/100g SM
(c)
Ukupni flavonoidi-pokožice
100% metanol (+0,1% HCl)
50% etanol
mg (QE)/100g SM
(d)
Ukupni flavonoidi-semenke
80% metanol (+0,1% HCl)
50% etanol
mg (QE)/100g SM
(e)
Ukupni flavonoidi-pokožice
100% metanol (+0,1% HCl)
50% etanol
mg (CE)/100g SM
(f)
Ukupni flavonoidi-semenke
80% metanol (+0,1% HCl)
50% etanol
mg (CE)/100g SM
Smederevka
Italijanski Riesling
Tamjanika
Muscat Hamburg
Prokupac
Merlot
Cabernet Sauvignon



Slika 4.6. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u pokožicama **(a)** i semenkama **(b)**; Sadržaj ukupnih flavonoida u pokožicama **(c,e)** i semenkama **(d,f)**; Sadržaj ukupnih proantocijanidina u pokožicama **(g)** i semenkama **(h)**; Sadržaj ukupnih monomernih antocijana u pokožicama **(i)**; izdvojenih iz komina navedenih sorti grožđa i ekstrahovani različitim ekstrakcionim sredstvima. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti±standardna devijacija (n=3). Mala slova označavaju poređenje između sorti za svako ekstrakciono sredstvo posebno, a velika slova označavaju poređenja u okviru iste sorte. Različita slova označavaju statistički značajne razlike prema *Tukey's* testu (*p<0,05*). Skraćenice: „N.D."-nije detektovan; GAE-galna kiselina; QE-kvercetin; CE-katehin; PA-proantocijanidin; M3G-malvidin-3-glukozid. **Napomena:** nakon ekstrakcije navedenim ekstrakcionim sredstvima, svi uzorci su uparavani do suva i rekonstituisani u milliQ vodi.

Sadržaj ukupnih monomernih antocijana (MAC) je procenjen samo za ekstrakte pokožica crnih sorti grožđa (slika 4.6i). U ekstraktima belih sorti sadržaj MAC nije detektovan, što je i očekivano ako se uzme u obzir činjenica da su bele sorte deficitarne u sadržaju antocijana. Sadržaj MAC u crnim sortma je bio značajno viši u zakišeljenim metanolnim ekstraktima (17,96-147,91 mg(M3G)/100g SM), u poređenju sa etanolnim ekstraktima (3,98-111,06 mg(M3G)/100g) istih sorti. Najviši sadržaj MAC je potvrđen u ekstraktima pokožice Cabernet Sauvignon-a, što je u saglasnosti sa rezultatima hromatografske analize. Međutim, dobijeni rezultati u ovoj studiji su bili značajno niži u poređenju sa rezultatima koje su dobili Tahmaz et al. (2021), analizirajući pokožice vinskih sorti grožđa (381,5-969,2 mg(M3G)/100g), uključujući sorte Merlot i Cabernet Sauvignon. Druge studije su takođe dobile značajno viši sadržaj MAC u ekstraktima pokožica Merlot-a (Ivanova et al., 2011; Putnik et al., 2016) i Cabernet Sauvignon-a (Du et al., 2012).

U tabeli 4.11. prikazan je test analize varijanse za utvrđivanje značajanosti faktorskih efekata koji utiču na sadržaj karakterističnih grupa (klasa) fenolnih jedinjenja u ekstraktima pokožica/semenki izdvojenih iz komine sedam autohtonih i internacionalnih sorti grožđa. Analiza je pokazala da

ispitivani faktori (ekstrakciono sredstvo i sorta grožđa), pojedinačno i u interakciji značajno utiču na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida, proantocijanidin i monomernih antocijana.

Na osnovu dobijenih podataka, semenka autohtone sorte Prokupca se pokazala kao najbolji izvor ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida i proantocijanidina, što je ovu sortu kvalifikovalo za buduća istraživanja fokusirana na karaterizaciji fermentisane komine i njenih konstituenata.

Tabela 4.11. Test analize varijanse za utvrđivanje značajanosti faktorskih efekata koji utiču na sadržaj karakterističnih grupa fenolnih jedinjenja u ekstraktima pokožica/semenki izdvojenih iz komine sedam autohtonih i internacionalnih sorti grožđa.

parametri		**Faktori**	***DF***	***SS***	***MS***	***F***	***p***	***% varijanse***
TPC (mgGAE/100g)	pokožica	Ekstrakciono sredstvo (ES)	1	141156	141156	45,23	<0,0001****	1,276
		Sorta grožđa (SG)	6	10770000	1795000	575,3	<0,0001****	97,41
		ESxSG	6	57943	9657	3095	0,0188*	0,524
	semenka	Ekstrakciono sredstvo (ES)	1	6995000	6995000	588,6	<0,0001****	12,72
		Sorta grožđa (SG)	6	45790000	7632000	642,1	<0,0001****	83,27
		ESxSG	6	1870000	311633	26,22	<0,0001****	3,400
TFC (mgQE/100g)	pokožica	Ekstrakciono sredstvo (ES)	1	821375	821375	222,4	<0,0001****	7,731
		Sorta grožđa (SG)	6	9504000	1584000	429,0	<0,0001****	89,45
		ESxSG	6	196326	32721	8,862	<0,0001****	1,848
	semenka	Ekstrakciono sredstvo (ES)	1	1904000	1904000	100	<0,0001****	4,045
		Sorta grožđa (SG)	6	32100000	5350000	281,1	<0,0001****	68,20
		ESxSG	6	12530000	2088000	109,7	<0,0001****	26,62
TFC (mgCE/100g)	pokožica	Ekstrakciono sredstvo (ES)	1	308333	308333	23,72	<0,0001****	1,366
		Sorta grožđa (SG)	6	20540000	3423000	263,3	<0,0001****	90,98
		ESxSG	6	1365000	227443	17,50	<0,0001****	6,046
	semenka	Ekstrakciono sredstvo (ES)	1	310942	310942	20,40	0,0001***	1,682
		Sorta grožđa (SG)	6	16620000	2770000	181,7	<0,0001****	89,87
		ESxSG	6	1135000	189133	12,41	<0,0001****	6,137
PAC (mgPA/100g)	pokožica	Ekstrakciono sredstvo (ES)	1	42540	42540	40,11	<0,0001****	1,084
		Sorta grožđa (SG)	6	3793000	632154	596,1	<0,0001****	96,68
		ESxSG	6	58208	9701	9,148	<0,0001****	1,484
	semenka	Ekstrakciono sredstvo (ES)	1	8978000	8978000	2310	<0,0001****	29,03
		Sorta grožđa (SG)	6	20610000	3434000	883,5	<0,0001****	66,62
		ESxSG	6	1235000	205843	52,95	<0,0001****	3,993
MAC (mgM3G/100g)	pokožica	Ekstrakciono sredstvo (ES)	1	1829	1829	125,6	<0,0001****	3,423
		Sorta grožđa (SG)	3	50054	16685	1146	<0,0001****	93,69
		ESxSG	3	1310	436,7	30,00	<0,0001****	2,452

Svi tabelarno prikazani rezultati su statistički značajni. Nivoi značajnosti: *0,01<*p*<0,05; **0,001<*p*<0,01; ***0,001<*p*<0,0001; ****p<0,0001. Skraćenice: TPC-Sadržaj ukupnih polifenola; TFC-Sadržaj ukupnih flavonoida; PAC-Sadržaj ukupnih proantocijanidina; MAC-Sadržaj ukupnih monomernih antocijana; DF-stepeni slobode; SS-suma kvadrata; MS-sredine kvadrata.

4.2. Karakterizacija ekstrakata fermentisane komine Prokupca i njenih konstituenata

4.2.1. Hromatografska analiza

4.2.1.1. UHPLC-DAD MS/MS kvantifikacija fenolnih jedinjenja (osim flavan-3-ola i antocijana) netretirane i sušene komine Prokupca

Sadržaj fenolnih jedinjenja (izuzev flavan-3-ola i antocijana koji su odvojeno analizirani), u ekstraktima fermentisane komine Prokupca i njenim konstituentima (semenka, pokožica i šepurina/peteljčice), prikazani su u Tabeli 4.11. Među fenolnim kiselinama, dominantno je pronađena galna kiselina, a zatim ferulinska, hlorogenska, protokatehinska i kofeinska kiselina. Kvercetin i izoramnetin derivati su bili dominantno kvantifikovani flavonoli u svim analiziranim uzorcima. Nekoliko predhodnih studija je takođe potvrdilo visok sadržaj galne kiseline u semenki (Dabetić et al., 2020; Gođevac et al., 2010; Zdunić et al., 2019), kao i visok sadržaj kvercetin aglikona i kvercetin-3-*O*-galaktozida u pokožici Prokupca (Ćirković et al., 2019; Pantelić et al., 2016).

Kao što se može videti na osnovu rezultata (Tabela 4.12), obrada (sušenje toplim vazduhom (TV) i liofilizacija) komine nakon odvajanja od vina, značajno utiče na sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja. Značajno viši sadržaj ukupnih i pojedinačno kvantifikovanih fenolnih kiselina i flavonol glikozida je potvrđen u ekstraktima komine, semenke i pokožice Prokupca, koje prethodno nisu procesuirane. Izuzetak je šepurina, kod kojih je posle sušenja TV i liofilizacije potvrđeno ~2-3 puta više ukupnih fenolnih kiselina i flavonola. Sadržaj galne kiseline je bio najviši u ekstraktima netretiranih uzoraka semenki (133,12 mg/kg SM), pokožica (60,48 mg/kg SM) i cele komine (56,98 mg/kg SM). Međutim, njen sadržaj se značajno smanjio u ekstraktima sušenih semenki, pokožica i komine u struji toplog vazduha, za 42,9; 51,6; i 10,9%, kao i u ekstraktima liofilisane semenke, pokožice i komine, za 30,2; 62,9; i 3,9%. Najveće koncentracije flavonol aglikona (kvercetin i izoramnetin) i njihovih glukozida (kvercetin-3-*O*-galaktozida i izoramnetin-3-*O*-glukozid) su potvrđene u ekstraktima netretirane pokožice, međutim njihov sadržaj se takođe značajno smanjio u procesuiranim pokožicama.

Ako se posmatra sa aspekta primenjenih tretmana, ekstrakt sušene komine Prokupca toplim vazduhom je imao značajno viši sadržaj ukupnih fenolnih kiselina, dok se sadržaj ukupnih i pojedinačnih flavonola nije značajno promenio za oba tretmana. Ekstrakt liofilisane semenke je imao značajno viši sadržaj galne, ferulinske i kafeinske kiseline, u poređenju sa semenkama sušenim TV, dok se sadržaj svih kvantifikovanih flavonol aglikona i glikozida nije značajno razlikovao u ekstraktima sušenih TV i liofilisanih semenki. U ekstraktima sušene šepurine i pokožice TV je potvrđen značajno viši sadržaj dominantno detektovanih fenolnih kiselina (galna i protokatehinska kiselina), i značajno niži sadržaj dominantno potvrđenih flavonol aglikona kao što su kvercetin, izoramnetin i kampferol. Treba spomenuti da je u ekstraktu liofilisane pokožice pronađen viši sadržaj resveratrola, koji je očigledno osetljiv na uslove sušenja TV u sušnici. Ove razlike u profilima fenolnih kiselina i flavonola mogu biti zbog strukture matriksa koji je procesuiran ili uslova primenjenog tretmana kao što su temperatura sušenja, vreme sušenja i ambijentalni uslovi tokom sušenja. Degradacija fenolnih jedinjenja u liofilisanim uzorcima komine može biti zbog porozne strukture koja povećava kontakt sa vazduhom i oksidaciju pojedinačnih fenolnih jedinjenja (García-Lomillo & González-SanJosé, 2017). Sa druge strane, temperatura sušenja TV (60°C), duže trajanje sušenja i konstantni kontakt sa kiseonikom, utiču na degradaciju ili polimerizaciju fenolnih jedinjenja tokom sušenja u sušnici. Larrauri et al. (1997) nisu našli značajnu razliku u sadržaju ekstraktibilnih fenolnih jedinjenja u liofilisanoj i TV sušenoj pokožici, dok su Tseng and Zhao (2012) pokazali da liofilizacija ima bolji efekat na održivost ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonola u komini i pokožici grožđa. S obzirom da je najveći broj različitih fenolnih jedinjenja detektovan u liofilisanoj komini i njenim konstituentima primenom UHPLC-DAD MS/MS tehnike, ovi uzorci su odabrani za dodatnu kvalitativnu i kvantitativnu karakterizaciju fenolnih profila korišćenje UHPLC-Orbitrap MS^4 tehnike.

Tabela 4.12. UHPLC-DAD MS/MS kvantifikacija fenolnih jedinjenja u ekstraktima netretirane i procesuirane (liofilizacija i sušenje toplim vazduhom) komine Prokupca posle fermentacije i njenih sastavnih konstituenata (semenka, pokožice i šepurina)

Uzorci	***Bez-tretmana[1]***				***Sušenje toplim vazduhom[2]***				***Liofilizacija[3]***			
	semenka[1]	šepurina[1]	pokožica[1]	komina[1]	semenka[2]	šepurina[2]	pokožica[2]	komina[2]	semenka[3]	šepurina[3]	pokožica[3]	komina[3]
Jedinjenja (mg/kg SM)												
Fenolne kiseline (HB+HC) i njihovi derivati												
Galna kiselina	133,12^{a,A}	n.d.	60,48^{b,A}	56,98^{c,A}	75,88^{a,B}	30,33^{b,A}	29,25^{b,B}	50,74^{c,B}	92,92^{a,C}	22,93^{b,B}	22,44^{b,C}	54,72^{c,A}
Protokatehinska kiselina	2,64^{a,A}	3,30^{b,A}	13,30^{c,A}	8,21^{d,A}	2,01^{a,B}	8,43^{b,B}	6,46^{c,B}	7,89^{d,A}	1,88^{a,B}	3,71^{b,A}	3,55^{b,C}	3,79^{b,B}
Gentizinska kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,04^{A}	n.d.	n.d.	n.d.	0,37^{B}	n.d.	n.d.	n.d.
Hlorogenska kiselina	n.d.	3,59^{a,A}	15,28^{b,A}	6,52^{c,A}	0,85^{a,A}	2,45^{b,B}	4,38^{c,B}	2,34^{b,B}	1,15^{a,A}	3,06^{b,C}	5,87^{c,C}	2,88^{b,C}
Ferulinska kiselina	4,56^{a,A}	10,83^{b,A}	18,76^{c,A}	26,33^{d,A}	n.d.	6,36^{a,B}	10,70^{b,B}	15,32^{c,B}	2,81^{a,B}	15,28^{b,C}	7,06^{c,C}	4,02^{d,C}
Kofeinska kiselina	3,18^{a,A}	n.d.	7,44^{b,A}	5,38^{c,A}	1,64^{a,B}	5,57^{b,A}	2,62^{c,B}	4,55^{d,B}	2,13^{a,C}	6,44^{b,B}	2,91^{c,B}	2,97^{c,C}
p-Kumarinska kiselina	n.d.	3,19^{a,A}	5,14^{b,A}	n.d.	n.d.	4,25^{a,B}	3,54^{b,B}	3,69^{b,A}	n.d.	3,22^{a,A}	3,62^{b,B}	2,37^{c,B}
Σ	**143,49**	**20,92**	**120,40**	**103,42**	**81,42**	**57,39**	**56,95**	**84,63**	**101,26**	**54,64**	**45,45**	**70,75**
Flavonol aglikoni i glikozidi												
Kvercetin	24,26^{a,A}	48,49^{b,A}	75,28^{c,A}	44,84^{d,A}	13,91^{a,B}	42,70^{b,B}	62,06^{c,B}	39,74^{d,B}	13,68^{a,B}	54,60^{b,C}	66,71^{c,C}	36,08^{d,C}
Kvercetin-3-*O*-galaktozid	1,40^{a,A}	n.d.	62,61^{b,A}	34,19^{c,A}	1,14^{a,A}	20,96^{b,A}	28,73^{c,B}	13,04^{d,B}	1,09^{a,A}	21,79^{b,A}	30,88^{c,C}	13,08^{d,B}
Kvercetin-3-*O*-ramnozid	n.d.	n.d.	0,95	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rutin	0,71^{a,A}	1,33^{b,A}	10,84^{c,A}	5,97^{d,A}	0,41^{a,A}	4,55^{b,B}	5,04^{c,B}	2,06^{d,B}	0,41^{a,A}	3,40^{b,C}	6,12^{c,C}	2,22^{d,B}
Izoramnetin	15,01^{a,A}	n.d.	45,52^{b,A}	27,82^{c,A}	7,85^{a,B}	14,62^{b,A}	26,08^{c,B}	15,44^{b,B}	8,13^{a,B}	16,42^{b,B}	26,99^{c,B}	14,19^{d,B}
Izoramnetin-3-*O*-glukozid	0,93^{a,A}	n.d.	54,22^{b,A}	25,03^{c,A}	0,67^{a,A}	14,49^{b,A}	28,78^{c,B}	11,39^{d,B}	0,68^{a,A}	11,76^{b,B}	27,29^{c,B}	11,10^{b,B}
Izoramnetin-3-*O*-rutinozid	n.d.	n.d.	3,24^{a,A}	0,70^{b,A}	n.d.	n.d.	1,02^{B}	n.d.	n.d.	0,16^{a}	1,48^{b,C}	0,27^{c,B}
Kampferol	1,46^{a,A}	2,32^{b,A}	9,89^{c,A}	6,82^{d,A}	1,09^{a,A}	6,06^{b,B}	9,27^{c,A}	5,43^{b,B}	1,03^{a,A}	8,10^{b,C}	13,70^{c,B}	6,92^{d,A}
Σ	**43,78**	**52,14**	**262,56**	**145,37**	**25,06**	**103,37**	**160,98**	**87,11**	**25,03**	**116,22**	**173,19**	**83,86**
Ostali kvantifikovani polifenoli												
Apigenin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,49^{a}	0,29^{b}	0,24^{c}	n.d.	0,44^{a}	0,33^{b}	0,27^{c}
Apigenin-7-*O*-glukozid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,35	0,17	n.d.	n.d.	0,22	0,18	n.d.
Luteolin	1,46^{a,A}	n.d.	4,20^{b,A}	2,74^{c,A}	0,77^{a,B}	1,64^{b,A}	1,28^{c,B}	1,19^{c,B}	0,84^{a,B}	1,60^{b,A}	1,15^{c,B}	1,03^{c,C}
Naringenin	0,36^{A}	n.d.	n.d.	n.d.	0,31^{a,A}	1,23^{b,A}	0,72^{c,A}	0,57^{d,A}	0,27^{a,B}	1,14^{b,B}	0,79^{c,B}	0,70^{d,B}
Eriodiktiol	1,70^{a,A}	3,42^{b,A}	n.d.	n.d.	0,94^{a,B}	2,45^{b,B}	n.d.	n.d.	0,96^{a,B}	2,22^{b,C}	n.d.	n.d.
Resveratrol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,41^{a,A}	3,71^{b,A}	n.d.	n.d.	5,45^{a,B}	2,64^{b,B}	2,49^{c}
Aeskulin	0,52^{a,A}	2,43^{bc,A}	2,38^{b,A}	1,99^{c,A}	0,23^{a,A}	2,31^{b,A}	4,43^{c,B}	2,57^{b,B}	0,28^{a,A}	1,70^{b,B}	3,17^{c,A}	1,27^{b,C}
Floretin	n.d.	1,91^{a,A}	2,61^{b,A}	1,64^{c}	n.d.	0,50^{B}	n.d.	n.d.	n.d.	0,50^{a,B}	0,49^{a,B}	n.d.
Florizin	1,62^{A}	n.d.	n.d.	n.d.	0,98^{a,B}	0,47^{b,A}	0,18^{c,A}	0,79^{d,A}	1,32^{a,C}	0,75^{b,B}	0,16^{c,A}	0,92^{d,B}
Taksifolin	n.d.	n.d.	n.d.	5,82^{a,A}	n.d.	9,66^{a,A}	5,52^{b,A}	6,64^{c,B}	n.d.	8,01^{a,B}	4,41^{b,B}	3,90^{c,C}
Σ	**5,65**	**7,76**	**9,18**	**12,19**	**3,24**	**23,53**	**16,30**	**11,99**	**3,66**	**22,03**	**13,32**	**10,57**
Σ Σ	**192,93**	**80,82**	**392,14**	**260,98**	**109,72**	**184,29**	**234,24**	**183,63**	**129,95**	**192,89**	**231,97**	**165,17**

Prikazane vrednosti u tabeli su srednje vrednosti dobijeni iz tri nezavisna merenja (n=3). Mala slova označavaju poređenje za svaki konstituent komine posebno (semenka, šepurina, pokožica, cela komina), a velika slova označavaju poređenja u okviru svakog tretmana (bez tretmana, sušenje toplim vazduhom, liofilizacija). Različita slova označavaju statistički značajne razlike prema *Tukey's* testu ($p<0,05$). Skraćenice: „n.d."-nije detektovan; HB-hidroksibenzoeva kiselina; HC-hidroksicimetna kiselina. **Napomena:** nakon ekstrakcije 80% metanolom+0,1%HCl, svi uzorci su uparavani do suva i rekonstituisani u milliQ vodi. [1]Frakcije su odmah ekstrahovane (bez-tretmana); [2]Frakcije komine sušene u sušnici toplim vazduhom; [3]Frakcije komine su liofilisane.

4.2.1.2. UHPLC Orbitrap MS karakterizacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja u ekstrakatu liofilisanih uzoraka komine Prokupca

Detaljan fenolni profil vodenenog ekstrakta liofilisane cele komine, semenke, pokožice i šepurine autohtone sorte grožđa Prokupac, kao i njihova karakterizacija predstavljeni su u Tabeli P3 i Tabeli 4.13. Identifikacija fenolnih jedinjenja je odrađena korišćenjem UHPLC-Orbitrap MS^4 analizatora, uzimajući u obzir vreme zadržavanja (retenciono vreme), molekulske mase jona ($[M-H]^{-/+}$), pojedinačne MS^2, MS^3, MS^4 fragmente i postojeće literaturne podatke. Ukupno je identifikovano i kvantifikovano 75 fenolnih jedinjenja (neantocijani i antocijani)(podaci za kvantifikaciju, Tabela P4). Međutim, radi lakšeg tumačenja rezultata, izvršena je podela svih jedinjenja u šest različitih klasa: (1) hidroksibenzoeva kiselina i njeni derivati (13 jedinjenja); (2) hidroksicimetna kiselina i njeni derivati (6 jedinjenja); (3) flavan-3-oli i procijanidini (13 jedinjenja); (4) flavonol aglikoni i glikozidi (16 jedinjenja); (5) stilbenoidi (9 jedinjenja); (6) antocijani (18 jedinjenja). Većina identifikovanih fenolnih jedinjenja je u vezanom obliku i javljaju se kao estri ili glikozidni kompleksi.

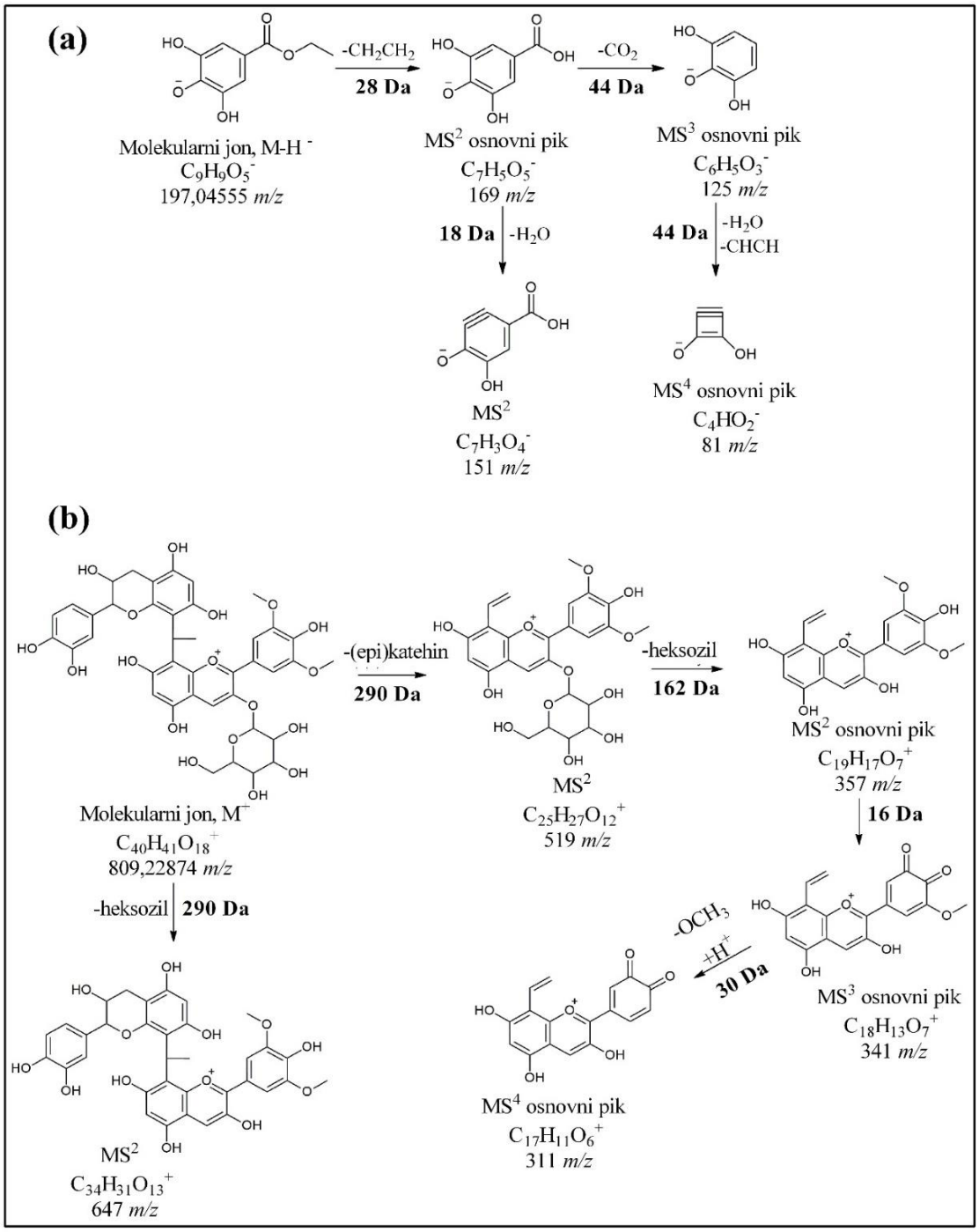
Hidroksibenzoeva kiselina i njeni derivati su otkriveni u značajnim količinama u svim ispitivanim vodenim ekstraktima, što čini 46,34% (cela komina), 51,63% (semenka), 14,30% (pokožica) i 25,02% (šepurina) od ukupno kvantifikovanih fenolnih jedinjenja. Međutim, uočene su značajne razlike u njihovom sadržaju među analiziranim uzorcima. Heksozid izomeri galne kiseline 1 i 2, dominiraju u ekstraktu semenke, dok su heksozidi di- i hidroksibenzoeve kiseline preovladavali u ekstraktima pokožice i šepurine. Pored toga, zabeležen je značajan sadržaj etil-galata u svim analiziranim uzorcima (22,2% semenka, 18,9% pokožica, 23,05% šepurina i 21,2% cela komina, od ukupno kvantifikovanih derivata hidroksibenzoeve kiseline), verovatno zbog alkoholne fermentacije kojoj su komina grožđa i njeni konstituenti bili izloženi pre analize (predloženi put fragmentacije etil-galata je predstavljen na slici 4.7a). Nedavno je objavljeno da etil-galat stimuliše *in vitro* i *in vivo* produkciju prostagladina E_2, što delom doprinosi proinflamatornim i zdravstvenom efektu *Longan* i *Litchi* voća (H. R. Wang et al., 2018). U vodenom ekstraktu cele komine, heksozidni izomeri galne kiseline, etil-galat i heksozidi di- i hidroksibenzoeve kiseline čine 89,9% od ukupno kvantifikovanih derivata hidroksibezoeve kiseline. Hidroksicimetna kiselina i njeni derivati su detektovani u malim količinama, oko 50mg/kg SM u ekstraktima cele komine, pokožice i šepurine, dok su u ekstraktu semenki nađeni u tragovima (<5mg/kg SM). Većina detektovanih derivata *p*-hidroksibenzoeve kiseline (heksozid i diheksozid izomeri galne kiseline, heksozid hidroksi- i dihidroksibezoeve kiseline, galoil-heksahidroksidifenil kiselina-heksozid, etil-galat, vanilinska kiselina), do sada nisu prijavljeni u vodenim ili nekim drugim fenolnim ekstraktima sorte Prokupac.

Flavan-3-oli i procijanidini su bili dominantno prisutni u ekstraktu semenke, u poređenju sa ekstraktima pokožice, šepurine i cele komine, i predstavljali su 47,5% od ukupno kvantifikovanih fenolnih jedinjenja semenke. Dominantno su nađeni procijanidin dimeri i trimeri (75,5% od ukupno kvantifikovanih flavan-3-ola i procijanidina), u poređenju sa monomernim flavan-3-olima (19,4% od ukupno kvantifikovanih flavan-3-ola i procijanidina), među kojima su samo katehin (159,7±5,63 mgCE/kg SM) i epikatehin (114,0±5,38 mgCE/kg SM) bili identifikovani. Najzastupljeniji procijanidin oligomeri u ekstraktu semenke su bili B tip procijanidin dimer izomeri, a zatim B tip procijanidin trimer izomeri i procijanidin galat izomeri sa udelima: 34,3%, 24,4% i 15,3% od ukupno kvantifikovanih flavan-3-ola i procijanidina. Značajno manji sadržaj flavan-3-ola i procijanidina je pronađen u vodenim ekstraktima cele komine i šepurine (manje od 8% i 5% ukupnih fenolnih jedinjenja), dok su u ekstraktu pokožice bili prisutni u tragovima (oko 8 mgCE/kg SM). Slične rezultate za metanolne ekstrakte semenki i pokožica su dobili Peixoto et al. (2018). Zdunić et al. (2019), su primetili dominantno prisustvo katehina, procijanidina i procijanidin galata među polifenolima koji su ekstrahovani 50% metanolom iz semenki grožđa različitih klonova Prokupca, dok prisustvo B tip procijanidin dimer digalat izomera nije identifikovano. Ovi izomeri su po prvi put otkriveni kod ove sorte u vodenim ekstraktima semenke, šepurine i cele komine, u opsegu od 0,38-19,51 mgCE/kg SM. Viši sadržaj procijanidin oligomera, u poređenju sa monomerima, su takođe dobili Peixoto et al. (2018) za metanolne ekstrakte semenki, koje su izdvojene iz fermentisane komine grožđa. Suprotno predhodnim rezultatima, Kammerer et al. (2004) su pokazali dominantno

prisustvo monomernih flavan-3-ola u metanolnom ekstraktu semenki, koje su izdvojene iz komine bele sorte grožđa Rajnski Riesling.

Za razliku od derivata hidroksibenzoeve kiseline i procijanidina koji su dominantna fenolna jedinjenja u vodenom ekstraktu semenke, ukupni flavonol aglikoni i glikozidi su prisutni u tragovima, sa udelom od oko 1% ukupnih fenolnih jedinjenja. Sa druge strane, ova jedinjenja su dominantno prisutna u ekstraktima pokožice i šepurine sa udelom: 41,1% i 35,2% od ukupno kvantifikovanih fenolnih jedinjenja. Većina identifikovanih flavonola u ekstraktima pokožice, šepurine i cele komine su bili u obliku glikozida kvercetina, izoramnetina, miricetina, kampferola, siringetina, aromodendrina i laricitrina. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje su prethodno dobili Drosou et al. (2015) za etanolne ekstrakte komine grožđa iz Grčke, i sa rezultatima za metanolne ekstrakte komine crne sorte grožđa iz Italije (Amico et al., 2004). Među otkrivenim flavonolima, laricitrin-3-*O*-heksozid je bio dominantno otkriven u ekstraktu pokožice, šepurine i cele komine, sa sadržajem od 649,5±7,94; 375,9±7,27; 289,0±5,9 mgQE/kg SM. Dalje, značajan sadržaj izoramnetin-3-*O*-glukozida (153,8±5,57 mgQE/kg SM) i kvercetin-3-*O*-ramnozid (98,6±2,85 mgQE/kg SM) je otkriven u ekstraktu šepurine, kao i ekstraktu pokožice. Peixoto et al. (2018) su pokazali dominantno prisustvo laricitrin, kvercetin i siringetin glikozida u metanolnim ekstraktima sušene pokožice, semenke i komine (mešavina pokožice i semenke). Treba napomenuti da je miricetin-3-*O*-heksozide pronađen u malim količinama (<2%) u ekstraktu šepurine i cele komine, dok u ekstraktima pokožice i semenke nije identifikovan. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Peixoto et al. (2018), za metanolne ekstrakte pokožice i semenke, izdvojene iz komine; dok su u suprotnosti sa rezultatima koje su prijavili Drosou et al. (2015), za etanolni ekstrakt komine grožđa Agiorgitiko. Većina flavonol glikozida (osim kvercetin-3-*O*-glukozida, kvercetin-3-*O*-heksuronida, kvercetin-3-*O*-ramnozida), i aglikon flavonoli poput aromodendrina i izoramnetina su po prvi put u ovoj studiji otkriveni u fenolnim ekstraktima sorte Prokupac.

Stilbenoidi su posebna klasa identifikovanih fenolnih jedinjenja sa potencijalnim antioksidativnim i nutritivnim svojstvima, među kojima je resveratrol otkriven u svojim aglikonskim, glikozidnim i oligomernim oblicima. Stilbenoidi su bili detektovani u malim količinama u ekstraktu semenke (2,8 mg RS/kg SM), dok su u ekstraktu pokožice i cele komine bili potvrđeni u značajno većim količinama, sa sadržajem od 57,7 mg/kg SM i 111,0 mg/kg SM. Međutim, njihovo dominantno prisustvo je bilo u ekstraktu šepurine (397,0 mgRS/kg SM), što čini 17,0% od ukupno kvantifikovanih fenolnih jedinjenja šepurine. Među otkrivenim stilbenoidima, dimeri, trimeri i tetrameri resveratrola su bili najzastupljeniji, i do sada nije zabeleženo njihovo prisustvo u prethodno analiziranim ekstraktima sorte Prokupac. Anastasiadi et al. (2012), su prijavili prisustvo visokog sadržaja *trans*-resveratrola i $\mathcal{E}$-viniferina u metanolnom ekstraktu šepurine crnih i belih grčkih autohtonih sorti grožđa, čiji je ukupan sadržaj varirao od 241 do 742 mg/kg SM u zavisnosti od sorte grožđa. Visok sadržaj $\mathcal{E}$-viniferina je takođe nađen u metanol/voda ekstraktima šepurine tri različite sorte grožđa proizvedene u Argentini (81,2-1373 mg/kg SM)(Ferreyra, Bottini, et al., 2021). Rezultati ove studije pokazuju da su vodeni ekstrakti šepurine grožđa Prokupac, izdvojeni iz komine, dobar izvor stilbenoida.



Slika 4.7. Pretpostavljeni putevi fragmentacije: **(a)** etil-galata; **(b)** malvidin-3-*O*-heksozid-(8,8)-metilmetin-(epi)katehina, detektovanih u ekstraktima liofilisanih uzoraka komine Prokupca korišćenjem UHPLC Orbitrap MS^4.

U ovoj studiji je identifikovano ukupno 18 derivata antocijana u ekstraktima liofilisane cele komine, pokožice i šepurine, dok u ekstraktu semenke ova jedinjenja nisu detektovana. Malvidin-3-*O*-glukozid je najdominantnije potvrđeno jedinjenje, sa sadržajem od 600,1±11,09 mg/kg SM, 250,4±6,71 mg/kg SM i 194,7±6,14 mg/kg SM; zatim peonidin-3-*O*-glukozid sa sadržejem od 301,0±6,49 mg/kg SM, 159,3±2,68 mg/kg SM i 111,4±3,51 mg/kg SM, redom u vodenim ekstraktima pokožice, cele komine i šepurine. Jedinjenja poput cijanidin-3-*O*-sambubiozida, cijanidin-3-*O*-arabinozida, pelargonidin-3-*O*-glukozida i malvidin-3-*O*-heksozid-acetaldehida su nađena u malim količinama u ekstraktima pokožice, šepurine i cele komine (<1,5% od ukupno kvantifikovanih derivata antocijana), a prisustvo ovih jedinjenja u ekstraktima Prokupca do sada nije zabeleženo. Značajno viši sadržaj derivata antocijana je pronađen u metanolnim i etanolnim ekstraktima komine crnih sorti grožđa (Malbeck, Agiorgitiko, Cabernet Sauvignon, Merlot), koje su analizirali drugi

autori (Antoniolli et al., 2015; Drosou et al., 2015; Pintać et al., 2018). Međutim, prethodno navedeni autori su rezultate izrazili na masu suvog ekstrakta što je značajno povećalo njihovu količinu. Sadržaj derivata antocijana preračunatih i izraženih na masu suve komine, bi bio značajno niži zbog malog prinosa ekstrakta (od 2,8% do 24,4%) (Drosou et al., 2015) ili 16,1% (Antoniolli et al., 2015). Pored toga, treba uzeti u obzir činjenicu da grožđe sorte Prokupac sadrži značajno manje antocijana, u poređenju sa ostalim crnim sortama grožđa (Mitic et al., 2012). Na nizak sadržaj antocijana takođe može uticati primenjeni postupka pripreme i analize uzoraka. Naime, u ovoj studiji, metanolni ekstrakti komine grožđa su uparavani do suva, rekonstituisani u milliQ vodi, filtrirani kroz 0,45µm filtere i tek potom analizirani korišćenjem UHPLC-Orbitrap MS^4 uređaja. Većina autora analizira metanol/voda ili etanol/voda ekstrakte komine (Antoniolli et al., 2015; Drosou et al., 2015; Pintać et al., 2018). Peixoto et al. (2018) i Amico et al. (2004) su odredili nizak sadržaj antocijana u ekstraktima pokožica grožđa (korišćen 80% zakišeljeng metanola), koje su prikupljene posle proizvodnje portugalskog i sicilijanskog crvenog vina. Štaviše, njihovi rezultati su bili niži u poređenju sa rezultatima ove studije. Prisustvo antocijana u ekstraktu šepurine je verovatno posledica njihove adsorbcije na šepurinom/peteljčicama, usled intenzivnog kontakta sa pokožicom grožđa i širom tokom presovanja, kao i kontakta sa vinom tokom procesa vinifikacije. Takođe, u ispitivanim ekstraktima komine su pronađeni kumaroil-, acetil- i kofeoil-derivati antocijana u malim količinama (<5% od ukupno kvantifikovanih antocijana), osim malvidin- i peonidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil)heksozid derivata, čiji je sadržaj redom bio 102,1±4,38 i 26,7±1,71 mgM3G/kg SM u ekstraktu pokožice; odnosno 44,6±1,89 i 14,97±0,73 mgM3G/kg SM u ekstraktu cele komine. Prisustvo ovih derivata su potvrdili i drugi autori, u etanolnim i metanolnim ekstraktima komine grožđa sorti Nerello mascalese, Cabernet Sauvignon, Terci, Mix i Agiorgitiko (Amico et al., 2004; Drosou et al., 2015; Ribeiro et al., 2015). Pored toga, pokazano je prisustvo specifičnog jedinjenja, malvidin-3-*O*-heksozid-(8,8)-metilmetine-(epi)katehina, u vodenim ekstraktima pokožice (4,05±0,19 mgM3O/kg SM) i cele komine (11,77±0,32 mgM3O/kg SM). Ovo jedinjenje je kompleks (epi)katehina i malvidin-3-*O*-heksozida, i nastaje tokom sazrevanja vina, reakcijom izazvanom prisustvom acetaldehida. U ovom slučaju, molekuli antocijana i flavan-3-oli su povezani preko etil (metil-metil) grupe. U nekim radovima ovo kompleksno jedinjenje je označeno kao malvidin glukozid-etil-katehin (Zhang et al., 2020). Prethodno je bilo identifikovano samo u komini crne sorte grožđa iz Portugala (Oliveira et al., 2015), ali nije kvantifikovano. Predloženi put fragmentacije ovog jedinjenja je predstavljen na Slici 4.7b. Visok sadržaj različitih derivata antocijana u ekstraktima pokožice i komine grožđa sorte Prokupac potvrđen u ovoj studiji, omogućava dalju valorizaciju i upotrebu ovih jedinjenja kao prirodnih bojila ili funkcionalnih aditiva u formulaciji brojnih prehrambenih proizvoda.

Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih profila liofilisane fermentisane komine i njenih sastavnih konstituenata primenom UHPLC-Orbitrap MS^4 tehnike, je pokazala da su semenke najbogatije flavan-3-olima i proantocijanidima, i da nesadrže antocijane i njihove derivate. Zbog toga je uticaj tehnike sušenja na profile flavan-3-ola i procijanidina dalje analiziran na ekstraktima tertiranih i netretiranih semenki, dok je uticaj sušenja na sadržaj pojedinačnih antocijana i njihovih derivata praćen na ekstraktima komine, pokožice i šepurine.

Tabela 4.13. Sadržaj svih detektovanih fenolnih jedinjenja (rezultati su izraženi u mg/kg SM), u ekstraktima liofilisane komine Prokupca i njenih konstituenta (semenka, pokožica i šepurina), korišćenjem UHPLC-Orbitrap MS[4]. Za svako detektovano i kvantifikovano jedinjenje u tabeli su dodatno prikazani: retencino vreme (t_R), molekulska formula, izračunata masa, nađena masa, srednje odstupanje masa (ppm).

t_R, min	***Jedinjenja***	***Molekulska formula, $[M–H]^-$***	***Izračunata masa, $[M–H]^-$***	***Nađena masa, $[M–H]^-$***	***ppm***	***Semenka (mg/kg)***	***Pokožica (mg/kg)***	***Šepurina (mg/kg)***	***Komina (mg/kg)***
Hidroksibenzoeva kiselina i njeni derivati									
1,90	Diheksozid galne kiseline[b]	$C_{19}H_{25}O_{15}^-$	493,11989	493,12015	-0,26	22,84±0,92[a]	3,73±0,05[d]	4,16±0,16[c]	9,70±0,25[b]
2,04	Heksozid galne kiseline izomer 1[b]	$C_{13}H_{15}O_{10}^-$	331,06707	331,06686	0,21	249,34±5,89[a]	25,58±0,45[c]	24,75±1,08[c]	120,1±4,22[b]
2,52	Galna kiselina[a]	$C_7H_5O_5^-$	169,01425	169,01421	0,04	39,9±1,12[a]	15,7±0,49[c]	12,18±0,42[d]	27,44±0,67[b]
3,81	Heksozid galne kiseline izomer 2[b]	$C_{13}H_{15}O_{10}^-$	331,06707	331,06674	0,33	819,5±29,5[a]	59,48±2,72[c]	36,11±2,01[d]	568,71±9,7[b]
3,86	Heksozid dihidroksibenzoeve kiseline[b]	$C_{13}H_{15}O_9^-$	315,07216	315,07208	0,08	22,96±0,98[d]	200,77±3,32[b]	261,46±4,68[a]	149,31±1.56[c]
4,33	Protokatehinska kiselina[a]	$C_7H_5O_4^-$	153,01933	153,01933	0,00	1,44±0,06[c]	2,46±0,15[b]	2,34±0,13[b]	2,88±0,21[a]
5,08	Heksozid hidroksibenzoeve kiseline[b]	$C_{13}H_{15}O_8^-$	299,07724	299,07739	-0,15	3,53±0,11[d]	38,11±1,41[b]	76,89±2,12[a]	29,32±0,75[c]
5,20	Galoil-HHDP-heksoza*[b]	$C_{27}H_{21}O_{18}^-$	633,07334	633,07391	-0,57	28,63±1,84[a]	4,32±0,33[b]	0,53±0,05[c]	27,28±0,41[a]
5,37	*p*-Hidroksibenzoeva kiselina[a]	$C_7H_5O_3^-$	137,02442	137,02429	0,13	1,98±0,13[b]	0,63±0,04[c]	0,73±0,06[c]	6,45±0,43[a]
5,44	Gentizinska kiselina[a]	$C_7H_5O_4^-$	153,01933	153,01912	0,21	1,42±0,1[b]	2,70±0,15[a]	0,93±0,07[c]	n.d.
6,81	Etil-galat[b]	$C_9H_9O_5^-$	197,04555	197,04565	-0,10	345,3±5,65[a]	86,26±1,60[d]	130,3±6,41[c]	259,15±2,37[b]
6,82	Vanilinska kiselina[a]	$C_8H_7O_4^-$	167,03498	167,03479	0,19	0,64±0,04[d]	5,16±0,27[a]	2,03±0,06[c]	3,98±0,22[b]
6,84	Elaginska kiselina[a]	$C_{14}H_5O_8^-$	300,99899	300,99884	0,15	14,02±0,54[b]	11,91±0,25[c]	14,34±0,62[b]	16,28±0,52[a]
	Σ					**1551.51**	**456,85**	**566,74**	**1220,6**
Hidroksicimetna kiselina i njeni derivati									
4,73	Kofeoilvinska kiselina[c]	$C_{13}H_{11}O_9^-$	311,04031	311,04065	-0,34	3,72±0,25[c]	27,08±1,08[b]	34,54±1,99[a]	34,41±2,3[a]
4,74	Kofeinska kiselina[a]	$C_9H_7O_4^-$	179,03498	179,03508	-0,10	0,83±0,05[c]	1,43±0,04[b]	2,34±0,13[a]	1,28±0,09[b]
5,26	Hlorogenska kiselina[a]	$C_{16}H_{17}O_9^-$	353,08781	353,08731	0,50	n.d.	n.d.	n.d.	0,62±0,03[1]
5,77	Feruloilvinska kiselina[c]	$C_{14}H_{13}O_9^-$	325,05651	325,05670	-0,19	n.d.	22,58±1,25[a]	13,88±0,54[b]	12,09±0,43[c]
6,37	*p*-Kumarinska kiselina[a]	$C_9H_7O_3^-$	163,04007	163,04001	0,06	n.d.	0,38±0,03[b]	0,50±0,04[a]	n.d.
7,02	Ferulinska kiselina[a]	$C_{10}H_9O_4^-$	193,05063	193,05043	0,20	n.d.	4,15±0,15[1]	n.d.	n.d.
	Σ					**4,54**	**55,62**	**51,26**	**48,39**
Flavan-3-oli i procijanidini									
3,10	B tip procijanidin trimer izomer 1[d]	$C_{45}H_{37}O_{18}^-$	865,19854	865,19922	-0,68	99,21±3,44[a]	n.d.	2,16±0,17[c]	4,51±0,39[b]
3,66	B tip procijanidin trimer izomer 2[d]	$C_{45}H_{37}O_{18}^-$	865,19854	865,20007	-1,53	114,43±5,88[a]	0,18±0,01[d]	5,38±0,29[c]	12,11±0,44[b]
4,90	B tip procijanidin dimer izomer 1[d]	$C_{30}H_{25}O_{12}^-$	577,13515	577,13562	-0,47	295,98±11,31[a]	2,80±0,20[c]	52,94±1,84[b]	49,28±1,59[b]
5,25	B tip procijanidin trimer izomer 3[d]	$C_{45}H_{37}O_{18}^-$	865,19854	865,20026	-1,72	90,14±3,1[a]	0,03±0,004[d]	4,92±0,19[c]	6,19±0,27[b]
5,35	Katehin[a]	$C_{15}H_{13}O_6^-$	289,07176	289,07208	-0,32	159,74±5,63[a]	1,71±0,10[c]	25,9±1,13[b]	27,85±1,52[b]
5,57	B tip procijanidin dimer izomer 2[d]	$C_{30}H_{25}O_{12}^-$	577,13515	577,13566	-0,51	188,98±7,43[a]	0,61±0,04[d]	1,65±0,11[c]	24,61±1,04[b]
5,82	B tip procijanidin dimer galat izomer 1[d]	$C_{37}H_{29}O_{16}^-$	729,14611	729,14685	-0,74	120,61±4,17[a]	0,59±0,03[d]	7,82±0,35[c]	24,54±1,41[b]
5,83	Epikatehin[d]	$C_{15}H_{13}O_6^-$	289,07176	289,07184	-0,08	114,02±5,38[a]	0,98±0,04[d]	1,75±0,08[c]	21,38±0,55[b]
5,85	B tip procijanidin trimer izomer 4[d]	$C_{45}H_{37}O_{18}^-$	865,19854	865,19989	-1,35	40,82±1,93[a]	0,20±0,02[d]	1,22±0,025[c]	3,46±0,25[b]
6,08	B tip procijanidin dimer galat izomer 2[d]	$C_{37}H_{29}O_{16}^-$	729,14611	729,14679	-0,68	95,82±3,6[a]	0,60±0,024[d]	4,49±0,38[c]	15,3±0,63[b]
6,47	B tip procijanidin dimer digalat izomer 1[d]	$C_{44}H_{33}O_{20}^-$	881,15707	881,15826	-1,19	19,51±0,71[a]	n.d.	0,71±0,05[c]	3,73±0,15[b]

nastavak

6,79	(epi)Katehin galat[d]	$C_{22}H_{17}O_{10}^-$	441,08272	441,08356	-0,84	72,46±2,22[a]	0,71±0,023[d]	2,36±0,1[c]	14,54±0,42[b]
7,40	B tip procijanidin dimer digalat izomer 2[d]	$C_{44}H_{33}O_{20}^-$	881,15707	881,15826	-1,19	2,25±0,15[a]	n.d.	n.d.	0,38±0,02[b]
	Σ					**1413,98**	**8,42**	**111,3**	**207,86**
Flavonol aglikoni i glikozidi									
5,89	Aromadendrin-7-*O*-heksozid[e]	$C_{21}H_{21}O_{11}^-$	449,10894	449,10947	-0,53	n.d.	19,47±0,46[a]	5,36±0,37[b]	4,07±0,27[c]
5,93	Kvercetin-3,7-di-*O*-heksozid[e]	$C_{27}H_{29}O_{17}^-$	625,14102	625,14172	-0,70	0,68±0,05[d]	66,91±1,92[a]	23,95±1,01[b]	13,58±0,25[c]
6,22	Miricetin-3-*O*- heksozid[e]	$C_{21}H_{19}O_{13}^-$	479,08311	479,08374	-0,63	n.d.	n.d.	1,54±0,08[a]	0,39±0,02[b]
6,42	Kvercetin-3-*O*-rutinozid[a]	$C_{27}H_{29}O_{16}^-$	609,14611	609,14575	0,36	n.d.	38,59±1,47[a]	14,61±0,72[b]	10,97±0,42[c]
6,70	Laricitrin-3-*O*- heksozid[e]	$C_{22}H_{21}O_{13}^-$	493,09876	493,09879	-0,03	0,74±0,04[d]	649,5±7,94[a]	375,94±7,27[b]	288,97±5,09[c]
6,72	Kvercetin-3-*O*-heksuronid[e]	$C_{21}H_{17}O_{13}^-$	477,06692	477,06793	-1,01	0,53±0,04[d]	41±1,88[a]	25,10±0,97[b]	13,97±0,41[c]
6,74	Kvercetin-3-*O*-glukozid[a]	$C_{21}H_{19}O_{12}^-$	463,08820	463,08920	-1,00	0,11±0,01[d]	14,68±0,98[a]	6,78±0,49[b]	3,90±0,23[c]
7,05	Kvercetin-3-*O*-ramnozid[a]	$C_{21}H_{19}O_{11}^-$	447,09329	447,09357	-0,28	3,36±0,14[d]	98,62±2,85[a]	37,62±1,09[b]	31,29±1,52[c]
7,12	Siringetin-3-*O*- heksozid[e]	$C_{23}H_{23}O_{13}^-$	507,11441	507,11493	-0,52	0,12±0,01[d]	15,48±0,93[a]	7,1±0,15[b]	4,15±0,15[c]
7,15	Kampferol-3-*O*-glukozid[a]	$C_{21}H_{19}O_{11}^-$	447,09329	447,09406	-0,77	0,30±0,02[d]	27,57±1,68[a]	9,29±0,35[b]	7,75±0,29[c]
7,26	Izoramnetin-3-*O*-glukozid[a]	$C_{22}H_{21}O_{12}^-$	477,10385	477,10461	-0,76	2,91±0,14[d]	58,75±3,2[b]	153,8±5,57[a]	11,76±0,20[c]
7,32	Izoramnetin-3-*O*-heksuronid[e]	$C_{22}H_{19}O_{13}^-$	491,08311	491,08371	-0,60	n.d.	5,38±0,23[b]	8,86±0,64[a]	3,29±0,18[c]
7,98	Aromadendrin[e]	$C_{15}O_{11}O_6^-$	287,05611	287,05606	0,05	5,35±0,17[d]	224,89±7[a]	101,5±4,61[b]	33,79±1,13[c]
8,79	Kvercetin[a]	$C_{15}H_9O_7^-$	301,03537	301,03500	0,37	0,14±0,014[d]	8,86±0,54[a]	2,81±0,16[b]	1,94±0,06[c]
9,73	Kampferol[a]	$C_{15}H_9O_6^-$	285,04046	285,04019	0,27	9,08±0,21[d]	20,82±0,83[a]	11,78±0,30[b]	10,73±0,39[c]
9,95	Izoramnetin[a]	$C_{16}H_{11}O_7^-$	315,05103	315,05078	0,25	9,08±0,25[c]	20,82±0,26[a]	11,78±0,89[b]	10,73±0,04[b]
	Σ					**32,39**	**1311,33**	**797,8**	**451,29**
Stilbenoidi									
6,62	Resveratrol[a]	$C_{14}H_{11}O_3^-$	227,07137	227,07121	0,16	n.d.	0,58±0,03[c]	3,08±0,11[a]	0,66±0,04[b]
7,35	Resveratrol-3-O-glukozid[f]	$C_{20}H_{21}O_8^-$	389,12419	389,12463	-0,44	n.d.	n.d.	2,36±0,14[a]	0,23±0,014[b]
8,97	Resveratrol dimer izomer 1[f]	$C_{28}H_{21}O_6^-$	453,13436	453,13486	-0,50	n.d.	4,82±0,16[c]	29,38±1,54[a]	6,27±0,17[b]
8,39	Resveratrol tetramer izomer 1[f]	$C_{56}H_{41}O_{12}^-$	905,26035	905,26105	-0,70	1,01±0,045[d]	13,57±0,33[c]	88,08±2,64[a]	32,24±1,42[b]
8,64	Resveratrol tetramer izomer 2[f]	$C_{56}H_{41}O_{12}^-$	905,26035	905,26080	-0,45	1,79±0,13[d]	26,66±1,79[c]	160,7±7,13[a]	53,04±1,57[b]
9,17	Resveratrol dimer izomer 2[f]	$C_{28}H_{21}O_6^-$	453,13436	453,13455	-0,19	n.d.	4,63±0,37[b]	33,66±1,99[a]	4,07±0,16[b]
9,24	Resveratrol trimer izomer 1[f]	$C_{42}H_{31}O_9^-$	679,19736	679,19653	0,83	n.d.	5,54±0,4[c]	49,15±1,58[a]	10,34±0,56[b]
9,55	Resveratrol trimer (kao α-viniferin)[f]	$C_{42}H_{29}O_9^-$	677,18171	677,18140	0,31	n.d.	0,69±0,04[c]	17,08±1,12[a]	2,18±0,14[b]
9,72	Resveratrol trimer izomer 2[f]	$C_{42}H_{31}O_9^-$	679,19736	679,19696	0,40	n.d.	1,21±0,06[c]	13,50±0,25[a]	1,96±0,08[b]
	Σ					**2,8**	**57,7**	**396,97**	**110,99**
Antocijani									
4,64	Delfinidin-3-*O*-glukozid[a]	$C_{21}H_{21}O_{12}^+$	465,10275	465,09958	3,17	n.d.	92,8±2,57[a]	16,71±0,56[c]	44,53±2,12[b]
4,65	Malvidin-3,5-di-*O*-glukozid[a]	$C_{29}H_{35}O_{17}^+$	655,18688	655,18213	4,75	n.d.	0,50±0,02[a]	n.d.	0,36±0,02[b]
4,78	Cijanidin-3-*O*-glukozid[a]	$C_{21}H_{21}O_{11}^+$	449,10784	449,10425	3,59	n.d.	17,29±0,83[a]	13,03±0,85[b]	9,04±0,26[c]
4,82	Cijanidin-3-*O*-sambubiozid[a]	$C_{26}H_{29}O_{15}^+$	581,15010	581,14541	4,69	n.d.	0,59±0,04[a]	0,46±0,03[b]	n.d.
5,04	Cijanidin-3-*O*-arabinozid[a]	$C_{20}H_{19}O_{10}^+$	419,09727	419,09308	4,19	n.d.	0,55±0,03[a]	4,80±0,17[b]	n.d.
5,07	Petunidin-3-*O*-heksozid[g]	$C_{22}H_{23}O_{12}^+$	479,11840	479,11465	3,75	n.d.	114,8±5,11[a]	n.d.	42,23±1,88[b]
5,15	Pelargonidin-3-*O*-glukozid[a]	$C_{21}H_{21}O_{10}^+$	433,11292	433,10864	4,28	n.d.	n.d.	n.d.	0,24±0,02
5,42	Peonidin-3-*O*-glukozid[a]	$C_{22}H_{23}O_{11}^+$	463,12349	463,12054	2,95	n.d.	300,96±6,49[a]	111,44±3,52[c]	159,3±2,68[b]

nastavak

nastavak									
5,47	Malvidin-3-*O*-glukozid[a]	$C_{23}H_{25}O_{12}^{+}$	493,13405	493,13107	2,98	n.d.	600,13±11,09[a]	194,68±6,14[c]	250,44±6,71[b]
5,97	Malvidin-3-*O*-heksozid-acetaldehid[g]	$C_{25}H_{25}O_{12}^{+}$	517,13405	517,13007	3,98	n.d.	12,78±0,81[a]	n.d.	4,03±0,04[b]
6,24	Malvidin-3-*O*-heksozid-(8,8)-metilmetine-(epi)katehin[g]	$C_{40}H_{41}O_{18}^{+}$	809,22874	809,22378	4,96	n.d.	4,05±0,19[b]	n.d.	11,77±0,32[a]
6,30	Peonidin-3-*O*-(6"-acetil)heksozid[g]	$C_{24}H_{25}O_{12}^{+}$	505,13405	505,13010	3,95	n.d.	0,96±0,04[a]	n.d.	0,20±0,01[b]
6,32	Malvidin-3-*O*-(6"-acetil)heksozid[g]	$C_{25}H_{27}O_{13}^{+}$	535,14462	535,14136	3,26	n.d.	4,35±0,23[a]	n.d.	1,16±0,07[b]
6,44	Delfinidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil) heksozid[g]	$C_{30}H_{27}O_{14}^{+}$	611,13953	611,13483	4,70	n.d.	5,41±0,21[a]	n.d.	3,22±0,16[b]
6,67	Malvidin-3-*O*-(6"-kofeoil)heksozid[g]	$C_{32}H_{31}O_{15}^{+}$	655,16575	655,16095	4,80	n.d.	8,24±0,35[a]	n.d.	2,89±0,16[b]
6,73	Petunidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil) heksozid[g]	$C_{31}H_{29}O_{14}^{+}$	625,15518	625,15045	4,73	n.d.	12,03±0,35[a]	n.d.	5,29±0,30[b]
7,03	Peonidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil) heksozid[g]	$C_{31}H_{29}O_{13}^{+}$	609,16027	609,15723	3,04	n.d.	26,69±1,71[a]	n.d.	14,97±0,73[b]
7,10	Malvidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil) heksozid[g]	$C_{32}H_{31}O_{14}^{+}$	639,17083	639,16595	4,88	n.d.	102,09±4,38[a]	n.d.	44,56±1,89[b]
	Σ					**n.d.**	**1303,6**	**341,3**	**594,7**
	Σ Σ					**3005,23**	**3193,5**	**2265,3**	**2633,8**

Vrednosti su dobijeni iz tri nezavisna merenja (n=3) i prikazane kao srednje vrednosti ±standardna devijacija. Vrednosti koje su označene sa istim slovom u istom redu nisu statistički značajno različite prema *t*-testu, ($p<0,05$). Skraćenice: „n.d.“-nije detektovan. [a]Jedinjenja kvantifikovana korišćenjem dostupnih standarda; Jedinjenja kvantifikovana i izražena kao mg ekvivalenti *p*-hidroksibenzoeve kiseline[b]; kofeinske kiseline[c]; katehina[d]; kvercetina[e]; resveratrola[f]; malvidin-3-*O*-glukozid[g] po kg SM uzorka. *Galoil-HHDP-heksoza – galoil-heksahidroksidifenil kiselina-heksozid.

4.2.1.3. UHPLC Orbitrap MS karakterizacija i kvantifikacija antocijana u netretiranoj i sušenoj komini Prokupca

Antocijani i njihovi derivati u ekstraktima netretirane i sušene komine, pokožice i šepurine Prokupca su identifikovani (Tabela P3) i kvantifikovani (podaci za kvantifikaciju, Tabela P4) korišćenjem UHPLC Orbitrap MS^4 i prikazani su u Tabeli 4.14. Podaci za profile antocijana i njihovih derivata liofilisanih semenki preuzeti su iz tabele 4.13 radi lakšeg poređenja. Sadržaj ukupno kvantifikovanih antocijana je bio najviši u ekstraktima liofilisane pokožice, komine i šepurina. Međutim, ovo nije bio slučaj kod svih pojedinačno kvantifikovanih antocijana. Na primer, malvidin-3-*O*-glukozid je bio najviši u netretiranoj (703,92 i 245,35 mg/kg SM), peonidin-3-*O*-glukozid u liofilisanoj (300,96 i 159,3 mg/kg SM), a delfinidin-3-*O*-glukozid (124,17 mg/kg SM) i petunidin-3-*O*-heksozid (137,37 mg/kg SM) u sušenoj pokožici i/ili komini. Acetil, kafeoil i *p*-kumaroil derivati antocijana su potvrđeni u značajnim količinama samo u ekstraktima sušenih komina i pokožica, jer su tokom dehidracije ova jedinjenja verovatno dodatno koncentrisana i omogućena je njihova kvantifikacija. Najzastupljeniji kvantifikovan derivat je bio malvidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil)heksozid sa sadržajem od 108,69 i 11,91 mg/kg SM u ekstraktu TV sušene pokožice i komine, odnosno 102,09 i 44,56 mg/kg SM u ekstraktu istih ali liofilisanih uzorka; zatim slede peonidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil)heksozid i malvidin-3-O-(6"-kofeoil)heksozid. Prethodno identifikovane derivate antocijana su otkrili Mitic et al. (2012), analizirajući ekstrakt grožđa upravo sorte Prokupac. Drugi autori su takođe registrovali dominantan sadržaj malvidin-3-*O*-glukozida, kao i njegovih acetil- i *p*-kumaroil- derivata u ekstraktima fermentisane komine Merlota, Syrah i Cabernet Sauvignona (Lingua et al., 2016). Značajne količine malvidin-3-*O*-heksozid-acetaldehida su kvantifikovane u ekstraktima svih analiziranih uzoraka, a najviše u ekstraktu netretirane pokožice. Piruvat i aceton derivati antocijana su nađeni samo u nekim ekstraktima u malim količinama. Navedeni derivati antocijana se najčešće formiraju tokom procesa vinifikacije, kroz reakcije slobodnih antocijana i sporednih proizvoda koji su nastali delovanjem kvasaca (acetaldehidi i pirogrožđana kiselina) (de Freitas & Mateus, 2011; Šuković et al., 2020), što dodatno potvrđuje činjenica da ovi derivati nisu identifikovani u ekstraktima nefermentisane komine Prokupca (Tabela 4.10). Pored toga, bitno je naglasiti da je značajno viši sadržaj ukupnih derivata antocijana pronađen u ekstraktu pokožice Prokupca koja je izdvojena nakon fermentacije (~20 puta), u poređenju sa ekstraktom pokožice izdvojene iz nefermentisane komine (Tabela 4.10). Ovo je verovatno zbog korišćenja različitog ekstrakcionog sredstva, transformacije pojedinačnih antocijana tokom procesa vinifikacije, njihove bolje stabilnosti u alkoholnom medijumu (vinu) i povećanog oslobađanja antocijana iz matriksa komine i pokožice.

Tabela 4.14. Sadržaj svih detektovanih antocijana (rezultati su izraženi u mg/kg SM), u netretiranim, sušenim toplim vazduhom i liofilisanim kominama Prokupca posle fermentacije, kao i u njihovim konstituentima pokožici i šepurini korišćenjem UHPLC-Orbitrap MS[4]. Za svako detektovano i kvantifikovano jedinjenje u tabeli su dodatno prikazani: retencino vreme (t_R), molekulska formula, izračunata masa, nađena masa, srednje odstupanje masa (ppm).

t_R, min	Jedinjenja	Bez-tretmana[1]			Sušenje toplim vazduhom[2]			Liofilizacija[3]		
		pokožica[1]	šepurina[1]	komina[1]	pokožica[2]	šepurina[2]	komina[2]	pokožica[3]	šepurina[3]	komina[3]
Malvidin derivati										
4,65	Malvidin-3,5-di-*O*-glukozid[a]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$0,50^{a}$	n.d.	$0,36^{b}$
5,47	Malvidin-3-*O*-glukozid[a]	$703,92^{a,A}$	$134,44^{b,A}$	$245,35^{c,A}$	$434,41^{a,B}$	$129,52^{b,A}$	$118,92^{b,B}$	$600,13^{a,C}$	$194,68^{b,B}$	$250,44^{c,A}$
5,97	Malvidin-3-*O*-heksozid-acetaldehid[b]	$38,64^{a,A}$	$6,25^{b,A}$	$11,82^{c,A}$	$23,74^{a,B}$	$6,08^{b,A}$	$3,20^{b,B}$	$12,78^{a,C}$	n.d.	$4,03^{b,B}$
6,03	Malvidin-3-*O*-heksozid-piruvat[b]	n.d.	n.d.	n.d.	$9,36^{a}$	$1,11^{b}$		n.d.	n.d.	n.d.
6,24	Malvidin-3-*O*-heksozid-(8,8)-metilmetine-(epi)katehin[b]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$4,05^{a}$	n.d.	$11,77^{b}$
6,32	Malvidin-3-*O*-(6"-acetil)heksozid[b]	n.d.	n.d.	n.d	$3,09^{A}$	n.d.	n.d.	$4,35^{a,B}$	n.d.	$1,16^{b}$
6,67	Malvidin-3-*O*-(6"-kofeoil) heksozid[b]	n.d.	n.d.	n.d.	$23,41^{a,A}$	$0,91^{b}$	$1,70^{c,A}$	$8,24^{a,B}$	n.d.	$2,89^{b,B}$
6,98	Malvidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil) heksozid-acetaldehid[b]	n.d.	n.d.	n.d.	4,19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7,10	Malvidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil) heksozid[b]	n.d.	n.d.	n.d.	$108,69^{a,A}$	$10,89^{b}$	$11,91^{b,A}$	$102,09^{a,A}$	n.d.	$44,56^{b,B}$
	Σ	**742,6 (78,9)**	**140,7(79,8)**	**257,2 (74,9)**	**606,9(60,5)**	**148,5(74,5)**	**135,7(62,0)**	**732,1(56,2)**	**194,7(57,0)**	**315,2(53,0)**
Peonidin derivati										
5,42	Peonidin-3-*O*-glukozid[a]	$106,42^{a,A}$	$27,11^{b,A}$	$52,23^{c,A}$	$66,95^{a,B}$	$20,79^{b,A}$	$20,92^{b,B}$	$300,96^{a,C}$	$111,44^{b,B}$	$159,3^{c,C}$
5,91	Peonidin-3-*O*-heksozid-aceton[b]	$6,63^{A}$	n.d.	n.d.	$6,08^{a,A}$	$1,18^{b}$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6,30	Peonidin-3-*O*-(6"-acetil)heksozid[b]	n.d.	n.d.	n.d.	$0,63^{A}$	n.d.	n.d.	$0,96^{a,B}$	n.d.	$0,20^{b}$
7,03	Peonidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil) heksozid[b]	n.d.	n.d.	n.d.	$31,27^{a,A}$	$3,71^{b}$	$3,94^{b,A}$	$26,69^{a,B}$	n.d.	$14,97^{b,B}$
	Σ	**113,1**	**27,1**	**52,2**	**104,9**	**25,7**	**24,9**	**328,6**	**111,4**	**174,5**
Delfinidin, petunidin, cijanidin i pelargonidin derivati										
4,64	Delfinidin-3-*O*-glukozid[a]	$22,49^{a,A}$	$3,78^{b,A}$	$9,43^{b,A}$	$124,17^{a,B}$	$9,58^{b,A}$	$25,69^{c,B}$	$92,8^{a,C}$	$16,71^{b,B}$	$44,53^{c,C}$
6,44	Delfinidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil) heksozid[b]	n.d.	n.d.	n.d.	$11,47^{a,A}$	$0,46^{b}$	$1,71^{c,A}$	$5,41^{a,B}$	n.d.	$3,22^{b,B}$
5,07	Petunidin-3-*O*-heksozid[b]	$63,54^{a,A}$	$4,78^{b,A}$	$24,33^{c,A}$	$137,35^{a,B}$	$14,43^{b,A}$	$29,66^{c,A}$	$114,8^{a,C}$	n.d.	$42,23^{b,B}$
6,73	Petunidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroilsvh m) heksozid[b]	n.d.	n.d.	n.d.	$17,56^{a,A}$	$0,79^{b}$	$1,26^{b,A}$	$12,03^{a,B}$	n.d.	$5,29^{b,B}$
4,78	Cijanidin-3-*O*-glukozid[a]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$17,29^{a}$	$13,03^{b}$	$9,04^{c}$
4,82	Cijanidin-3-*O*-sambubiozid[a]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$0,59^{a}$	$0,46^{b}$	n.d.
5,04	Cijanidin-3-*O*-arabinozid[a]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$0,55^{a}$	$4,80^{b}$	n.d.
5,15	Pelargonidin-3-*O*-glukozid[a]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,24
	Σ	**86,0**	**8,6**	**33,8**	**290,5**	**25,3**	**58,3**	**242,9**	**35,1**	**105,0**
	Σ Σ	**941,64**	**176,37**	**343,16**	**1002,4**	**199,45**	**218,9**	**1303,62**	**341,25**	**594,67**

Prikazane vrednosti u tabeli su srednje vrednosti dobijeni iz tri nezavisna merenja (n=3). Mala slova označavaju poređenje za svaki konstituent komine posebno (šepurina, pokožica, cela komina), a velika slova označavaju poređenja u okviru svakog tretmana (bez tretmana, sušenje toplim vazduhom i liofilizacija). Različita slova označavaju statistički značajne razlike prema *Tukey's* testu ($p<0,05$). Skraćenice: „n.d."-nije detektovan. **Napomena:** nakon ekstrakcije 80% metanolom+0,1%HCl, svi uzorci su uparavani do suva i rekonstituisani u milliQ vodi. [a]Jedinjenja kvantifikovana korišćenjem dostupnih standarda; Jedinjenja kvantifikovana i izražena kao mg ekvivalenti malvidin-3-*O*-glukozida[b] po kg SM uzorka. [1]Frakcije su odmah ekstrahovane (bez-tretmana); [2]Frakcije komine sušene u sušnici toplim vazduhom; [3]Frakcije komine koje su liofilisane.

4.2.1.4. UHPLC Orbitrap MS karakterizacija i kvantifikacija flavan-3-ola i procijanidina u netretiranoj i sušenoj semenki komine Prokupac

Sadržaj flavan-3-oli i procijanidini u ekstraktima netretirane, sušene i liofilisane semenke Prokupca prikazan je u tabela 4.15 (identifikacija, Tabela P3; podaci za kvantifikaciju, Tabela P4). Podaci za sadržaj flavan-3-ola i porcijanidina u liofilisanoj semenki preuzeti su iz tabele 4.13 radi lakšeg poređenja.

U ekstraktu liofilisane semenke je pronađen najviši sadržaj ukupnih i pojedinačnih monomernih flavan-3-ola (273,76 mg/kg SM), B tip procijanidin izomera (829,57 mg/kg SM) i procijanidin galat izomera (310,66 mg/kg SM), dok je njihov sadržaj bio manji u ekstraktima netretiranih semenki, a najmanje u ekstraktima semenki sušenih TV. Tokom sušenja u sušnici, procijanidini i flavan-3-oli najverovatnije polimerizuju u makromolekulske forme, koje su zadržane na filterima pre hromatografske analize. Predhodne studije su takođe potvrdile da je semenka Prokupca dobar izvor monomernih flavan-3-ola, kao i procijanidin dimer, trimer i galat izomera (Gođevac et al., 2010; Zdunić et al., 2019).

Tabela 4.15. Poređenje sadržaja flavan-3-ola i procijanidina (izraženi u mg/kg SM) u netretiranim, sušenim toplim vazduhom i liofilisanim semenkama, koje su izdvojene iz komine Prokupca posle fermentacije, korišćenjem UHPLC- Orbitrap MS[4].

Flavan-3-oli i procijanidini	Semenka		
	Bez-tretmana	***Sušenje TV***	***Liofilizacija***
Monomerni flavan-3-oli			
Katehin[a]	104,29±9,54[a]	39,38±3,09[b]	159,74±5,63[c]
Epikatehin[b]	89,70±4,65[a]	35,28±3,43[b]	114,02±5,38[c]
Σ	**194,00 (24,2%)**	**74,66 (26,6%)**	**273,76 (19,4%)**
B tip procijanidin izomeri			
B tip procijanidin dimer izomer 1[b]	132,85±8,45[a]	48,03±2,34[b]	295,98±11,31[c]
B tip procijanidin dimer izomer 2[b]	33,94±1,01[a]	11,81±0,56[b]	188,98±7,43[c]
B tip procijanidin dimer izomer 3[b]	110,25±0,45[a]	41,10±1,49[b]	n.d.
B tip procijanidin trimer izomer 1[b]	90,61±2,19[a]	23,79±2,34[b]	99,21±3,44[c]
B tip procijanidin trimer izomer 2[b]	44,05±4,74[a]	6,26±0,32[b]	114,43±5,88[c]
B tip procijanidin trimer izomer 3[b]	n.d.	n.d.	90,14±3,1
B tip procijanidin trimer izomer 4[b]	n.d.	n.d.	40,82±1,93
Σ	**411,71 (51,4%)**	**131,00 (46,7%)**	**829,57 (58,7%)**
Procijanidin galat izomeri			
(epi)Katehin galat[b]	37,30±4,70[a]	20,24±2,64[b]	72,46±2,22[c]
B tip procijanidin dimer galat izomer 1[b]	54,17±2,73[a]	18,11±2,00[b]	120,61±4,17[c]
B tip procijanidin dimer galat izomer 2[b]	102,26±4,76[a]	35,28±3,36[b]	95,82±3,6[a]
B tip procijanidin dimer digalat izomer 1[b]	2,15±0,13[a]	1,03±0,04[b]	19,51±0,71[c]
B tip procijanidin dimer digalat izomer 2[b]	n.d.	n.d.	2,25±0,15[a]
Σ	**195,88 (24,4%)**	**74,65 (26,6%)**	**310,66 (22,0%)**
Σ Σ	**801,58[a]**	**280,30[b]**	**1413,98[c]**

Vrednosti su dobijeni iz tri nezavisna merenja (n=3) i prikazane kao srednje vrednosti ±standardna devijacija. Vrednosti koje su označene sa istim slovom u istom redu nisu statistički značajno različite prema *t*-testu, ($p<0,05$). Skraćenice: „n.d.“-nije detektovan; sušenje TV-sušenje toplim vazduhom. [a]Jedinjenja kvantifikovana korišćenjem dostupnih standarda; Jedinjenja kvantifikovana i izražena kao mg ekvivalenti katehina[b] po kg SM uzorka.

4.2.2. Sadržaj ukupnih i specifičnih klasa fenolnih jedinjenja u netretiranoj i sušenoj komini Prokupca i njenim konstituentima

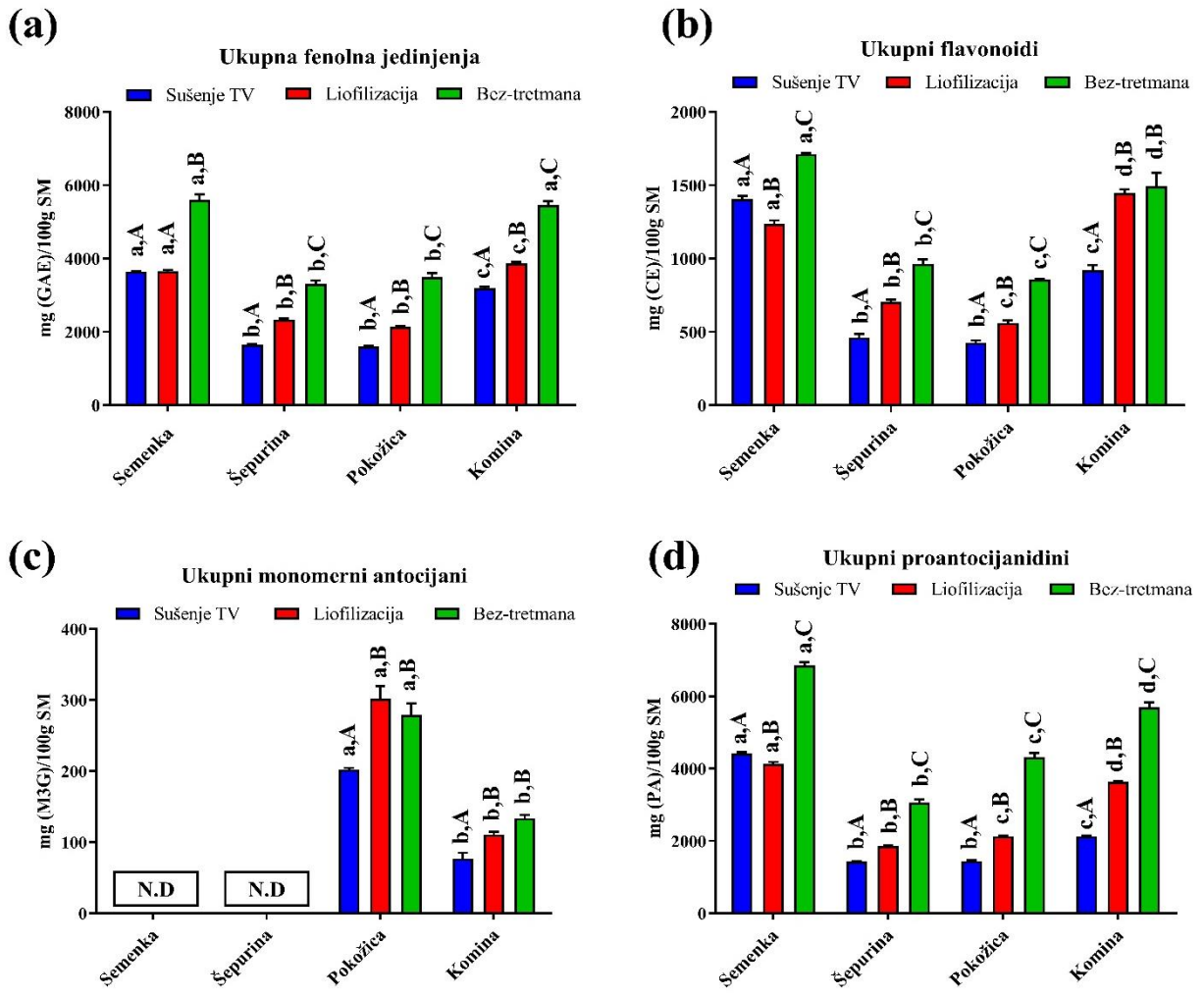
Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih i specifičnih klasa fenolnih jedinjenja su prikazani na Slici 4.8a,b,c,d. Najviši ***sadržaj ukupnih fenolnih jednjenja*** je potvrđen u ekstraktima netretiranih uzoraka, zatim u ekstraktima liofilisanih uzoraka, a najmanji u ekstraktima uzoraka sušenih TV, i to sledećim redom: semenka, komina, pokožica i šepurina (Slika 4.8a). Vodeni ekstrakti netretirane semenke i komine su imali najviši TPC, bez statistički značajne razlike među njima (5601,46±142,8 i 5453,60±104,4 mg(GAE)/100g SM), a zatim ekstrakti netretirane šepurine i pokožice (Slika 4.8a). Ako se posmatra sa aspekta primenjenog tretmana, ekstrakti liofilisane komine, pokožice i šepurine su imali viši TPC, u poređenju sa ekstraktima komplementarnih uzoraka sušenih

TV. Izuzetak su esktrakti semenke gde nije bilo statistički značajne razlike (*p<0,05*). Dobijeni TPC rezultati su uglavnom bili u opsegu rezultata koje su dobili drugi autori, ispitujući etanolne, metanolne i acetonske ekstrakte komine, semenke i pokožice grožđa (Ferri et al., 2020; Ky et al., 2014; Ribeiro et al., 2015; Rockenbach et al., 2012; Tseng & Zhao, 2012). Pantelić et al. (2016), su odredili značajno viši TPC u vodenom ekstraktu semenke Prokupca (10125 mg(GAE)/100g SM), ali značajno niži TPC u ekstraktu pokožice iste sorte (1232 mg(GAE)/100g SM). Leal et al. (2020) su dobili značajno viši TPC za ekstrakte šepurine belih sorti grožđa gajenih u Portugalu (9471-12309 mg(GAE)/100g SM).

Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima semenki je bio u opsegu od 1713,3±5,8 (netretirana semenka) do 1237,2±23,3 mg(CE)/100g SM (liofilisana semenka), što je značajno manje u poređenju sa TFC vrednostima koje su odredili Ivanova et al. (2011) za ekstrakte semenki (4860-6960 mg(CE)/100g SM) četiri sorte grožđa (Vranac, Merlot, Smederevka i Chardonnay). Dobijene TFC vrednosti za ekstrakte netretirane, liofilisane i TV sušene komine su bile redom: 1492,9±91,5; 1447,0±23,8 i 922,1±33,3 mg(CE)/100g SM. Ove vrednosti su bile u opsegu rezultata koje su dobili drugi autori, za metanolne ekstrakte komina četiri različite sorte grožđa (Cabernet Sauvignon, Merlot, Mix i Terci) (Ribeiro et al., 2015), za acetonske ekstrakte liofilisane i sušene komine grožđa Merlot i Pino Noir (Tseng & Zhao, 2012), kao i za metanolne i etanolne ekstrakte komine grožđa Cabernet Sauvignon i Merlot iz Srbije (Pintać et al., 2018). TFC za ekstrakte šepurine je varirao od 963,6±30,5 do 416,3±24,05 mg(CE)/100g SM, zavisno od tretmana. Ove vrednosti su značajno niže u poređenju sa rezultatima koje su dobili Leal et al. (2020). Dobijene TFC vrednosti za ekstrakte pokožica se nisu statistički značajno razlikovale od TFC vrednosti dobijenih za ekstrakte šepurine. TFC za ekstrakte netretirane, liofilisane i TV sušene pokožice su bile redom: 858,2±10; 561,6±15,7 i 425,8±16,2 mg(CE)/100g SM. Ove vrednosti su u opsegu vrednosti koje su prethodno dobili Ivanova et al. (2011).

Rezultati za ***sadržaj ukupnih proantocijanidina*** su sledili isti trend kao TFC rezultati (Slika 4.8d). Najviši sadržaj ukupnih proantocijanidina je otkriven u ekstraktima semenki (6851,9-4124,5 mg(PA)/100g SM) i cele komine (5694,4-2131,3 mg(PA)/100g SM). Sadržaj PAC u ekstrakima sušene TV i liofilisane semenke se nije statistički značajno razlikovao, što nije u saglasnosti sa rezultatima hromatografske kvantifikacije, gde je u ekstraku sušenih semenki TV nađen značajno manji sadržaj pojedinačnih i ukupnih flavan-3-ola i procijanidina. Ovo se može objasniti tendencijom procijanidina da intenzivnije polimerizuju u ekstraktima sušenih semenki, što ometa njihovu hromatografsku kvantifikaciju, ali ne sprečava njihovo spektrofotometrijsko određivanje. Sadržaj ukupnih proantocijanidina je bio najmanji u ekstraktima pokožica (4314,8-1447,1 mg(PA)/100g SM) i šepurine (3057,6-1426,6 mg(PA)/100g SM), bez statistički značajne razlike za ekstrakte sušene i liofilisane pokožice i šepurine. Ovi rezultati su slični ili viši u poređenju sa rezultatima koje su dobili Putnik et al. (2016) za optimizovane ekstrakte dobijene iz pokožice koja je izdvojena iz komine Merlota (684-1610 mg(CE)/100g SM).

Sadržaj ukupnih monomernih antocijana se nije značajno razlikovao za vodene ekstrakte netretirane i liofilisane pokožice (279,02±16,2 i 302,1±17,24 mg(M3G)/100g SM) i ekstrakte netretirane i liofilisane komine (133,76±4,63 i 110,4±4,11 mg(M3G)/100g SM). Sadržaj MAC u ekstraktima semenki i šepurine nije detektovan primenjenom metodom (Slika 4.8c). Ekstrakti TV sušenih pokožica i komine su imali značajno manji sadržaj MAC, što je verovatno posledica degradacije antocijana tokom sušenja (Tseng & Zhao, 2012). Rezultati ove studije su u skladu sa podacima dobijenim za metanolne ekstrakte komine, iz grožđa proizvedenog u Brazilu (Ribeiro et al., 2015; Rockenbach et al., 2012) i vrednostima za etanolne ekstrakte pokožica koje su izdvojene iz komine grožđa poreklom iz Francuske (Ky et al., 2014). MAC vrednosti dobijene u ovoj studiji su više u poređenju sa MAC vrednostima dobijenim za acetonske ekstrakte liofilisane i TV sušene komine i pokožice Merlota i Pino Noira (Tseng & Zhao, 2012).



Slika 4.8. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (a); Sadržaj ukupnih flavonoida (b); Sadržaj ukupnih monomernih antocijana (c); Sadržaj ukupnih proantocijanidina (d); u analiziranim ekstraktima komine Prokupca i ekstraktima njenih konstituenata: semenki, pokožici i šepurini. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti+standardna devijacija (n=3). Mala slova označavaju poređenje za svaki konstituent komine posebno (semenka, šepurina, pokožica, i cela komina), a velika slova označavaju poređenja u okviru svakog tretmana (bez tretmana, sušenje toplim vazduhom i liofilizacija). Različita slova označavaju statistički značajne razlike prema *Tukey's* testu ($p<0,05$). Skraćenice: „N.D."-nije detektovan; GAE-galna kiselina; CE-katehin; PA-procijanidin; M3G-malvidin-3-glukozid. **Napomena:** nakon ekstrakcije 80% metanolom+0,1%HCl, svi uzorci su uparavani do suva i rekonstituisani u milliQ vodi.

4.2.3. Antioksidativna svojstva vodenih ekstrakata liofilisanih uzoraka komine i njenih konstituenata

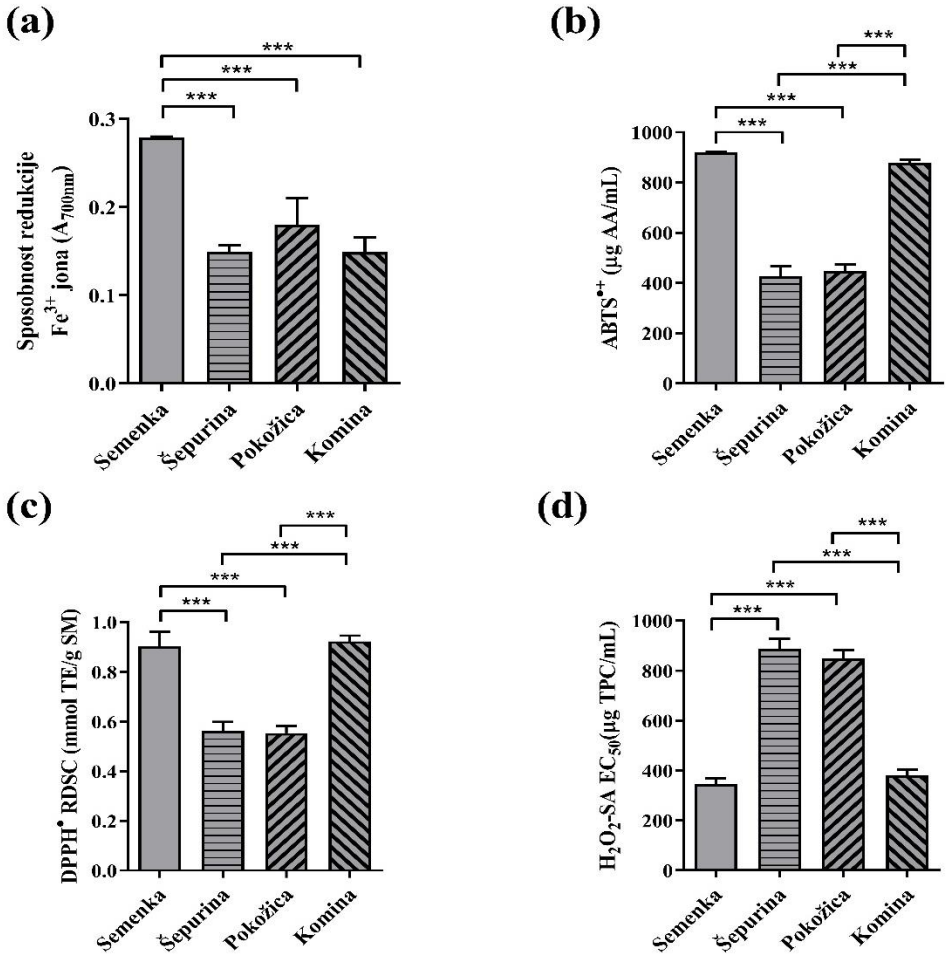
Kako su se uzorci liofilisane komine pokazali kao uzorci sa najvišim sadržajem flavan-3-ola, pro(anto)cijanidina i antocijana određenim LC/MS tehnikama, za određivanje antioksidativnih svojstva fermentisane komine Prokupca i njenih konstituenata odabrani su liofilisani uzorci. Rezultati antioksidativnih svojstava za ekstrakte liofilisanih uzorka komine i njenih konstituenata (semenka, pokožica i šepurina), su prikazani na Slici 4.9a,b,c,d. Dobijene vrednosti za redukujuću moć ekstrakata komine, semenke, pokožice i šepurine su bile u opsegu od 0,1 do 0,3 jedinice absorbancije merene na 700nm, kao što je prikazano na Slici 4.8a. Najviša vrednost i najveći potencijal da redukuje Fe^{3+} jone je imao ekstrakt semenke, 0,279±0,001; a zatim ekstrakti pokožice, šepurine i cele komine, čije se vrednosti nisu statistički značajno razlikovale *($p<0,05$)*. Korelaciona anliza je otkrila značajnu pozitivnu korelaciju između redukujuće moći i sadržaja ukupnih flavan-3-ola i procijanidina (*$r=0,94$*); kao i značajnu negativnu korelaciju između redukujuće moći i sadržaja ukupnih derivata hidroksicimetne kiseline (*$r=-0,94$*), određenih UHPLC-Orbitrap MS^4 analizom (Tabela 4.16). Gülçin (2012) je prethodno sugerisao da antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja zavisi od njihovog stepena hidroksilacije i konjugacije. Pored toga, Ky et al. (2014) su pokazali pozitivnu korelaciju

između sadržaja ukupnih procijanidina (monomera i dimera) iz etanolnih ekstrakata semenki koje su izdvojene iz komine grožđa i njihove sposobnosti da redukuju Fe^{3+} jone.

Kao što je predstavljeno na Slici 4.9b, ekstrakti semenke i cele komine su redom pokazali dobru aktivnost sakupljanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala, 918,7±2,67 i 878,6±13,37 µg AA/mL, bez statistički značajne razlike (*p<0,05*). Vrednosti dobijene za ekstrakte pokožice i šepurine bile za oko 50% manje. Glavni razlog ove razlike su bile varijacije u sadržaju i sastavu ekstrahovanih fenolnih jedinjenja, pa se može pretpostaviti da su upravo procijanidini i fenolne kiseline doprinele ovoj aktivnosti. Spektrofotometrijski određena ukupna fenolna jedinjenja (*r=0,98*), ukupni flavonoidi (*r=0,95*) i ukupni proantocijanidini (*r=0,99*), kao i UHPLC-Orbitrap MS^4 određene ukupne fenolne kiseline su bile u jakoj pozitivnoj korelaciji sa aktivnošću sakupljanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala za ekstrakte komine. Štaviše, jakoj pozitivnoj korelaciji ukupnih fenolnih kiselina sa ovom antioksidativnom aktivnošću, najviše su doprineli derivati *p*-hidroksibenzoeve kiseline (*r=0,97*), derivati galne kiseline (*r=0,97*) i etil-galat (*r=0,95*)(Tabela 4.16). Nekoliko predhodnih studija je pokazalo pozitivan uticaj ukupnih fenolnih jedinjenja i/ili specifičnih klasa fenolnih jedinjenja iz etanolnih i vodenih ekstrakata semenke i cele komine u sakupljanju $ABTS^{\bullet+}$ radikala (González-Paramás et al., 2004; Ky et al., 2014).

U ovoj studiji je korišćena unapređena $DPPH^{\bullet}$ metoda za određivanje sposobnosti uklanjanja $DPPH^{\bullet}$ radikala, koja je bazirana na praćenju vremenski zavisne aktivnosti ekstrakta liofilisane komine, semenke, pokožice i šepurine prema $DPPH^{\bullet}$ radikalima (Cheng et al., 2006). $DPPH^{\bullet}$ RDSC test koristi površinu ispod krive za određivanje kapaciteta uklanjanja radikala, uzimajući u obzir kinetički i termodinamički aspekt reakcije između radikala i antioksidanata. Pored toga, treba istaći da je ovaj test razvijen i potvrđen korišćenjem ekstrakata fino usitnjenih semenki Chardonnay i Pinot noir sorte grožđa. Rezultati $DPPH^{\bullet}$ RDSC testa su pokazali značajno veću aktivnost vodenih ekstrakata cele komine i semenke, u poređenju sa ekstraktima pokožice i šepurine (Slici 4.9c). Dobijene vrednosti su bile u opsegu od 0,55 do 0,92 mmol TE/g SM. Ove vrednosti su bile uporedive sa rezultatima $DPPH^{\bullet}$ testa koje su prethodno dobili Cheng et al. (2006) za acetonske ekstrakte semenki Chardonnay-a i Pinot noir-a, kao i Liu et al. (2016) za metanolne ekstrakte pokožice i semenke Meili sorte grožđa. Rezultati $DPPH^{\bullet}$ RDSC testa su bili u jakoj pozitivnoj korelaciji sa vrednostima $ABTS^{\bullet+}$ testa ispitivanih ekstrakata (r=0,99). Takođe su bili u jakoj pozitivnoj korelaciji sa spektrofotometrijski određenim vrednostima za sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih proantocijanidina (*r=1,00*; *r=0,98*; *r=0,97*), kao i UHPLC-Orbitrap MS^4 određenim ukupnim fenolnim kiselinama i njihovim derivatima (*r=0,95*), ukupnim derivatima galne kiseline (*r=0,93*) i etil-galatom (*r=0,93*) (Tabela 4.16). U ovoj disertaciji prvi put je urađen DPPH RDSC test za uzorke iz komine grožđa.

Sposobnost uklanjanja vodonik-peroksida (HPS) je određen visoko osetljivom hemiluminiscentnom metodom, merenjem vrednosti pika luminiscencije koji je generisan u reakciji luminola i vodonik-peroksida u prisustvu/odsustvu vodenih ekstrakata komine i njenih konstituenata. HPS aktivnost ekstrakata je izražena kao koncentracija ekstrakta koja uklanja 50% vodonik peroksida u reakcionoj smeši, odnosno kao EC_{50} vrednosti (Slika 4.9d). Svi ispitivani ekstrakti poseduju sposobnost uklanjanja H_2O_2. Ekstrakt semenke je posedovao minimalnu EC_{50} vrednost (345,5±23,4 µg TPC/mL), pokazujući najveći kapacitet uklanjanja H_2O_2. Sličan kapacitet (bez statistički značajne razlike), određen je za vodeni ekstrakt komine (EC_{50}=381,5±21,6 µg TPC/mL). Ekstrakti šepurine (EC_{50}=888,7±39,8 µg TPC/mL) i pokožice (EC_{50}=849,3±32,6 µg TPC/mL) su imali značajno manji kapacitet uklanjanja vodonik-peroksida (njihove vrednosti se nisu statistički značajno razlikovale), u poređenju sa ekstraktima semenke i komine. Jaka negativna korelacija HPS aktivnosti ekstrakta sa sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih proantocijanidina (*r=-0,98*; *r=-0,95*; *r=-0,99*), ukupnim fenolnim kiselinama i njihovim derivatima (*r=-0,97*), ukupnim derivatima hidroksibenzoeve kiseline (*r=-0,97*), ukupnim derivatima galne kiseline (*r=-0,96*) i etil-galatom (*r=-0,95*), je samo potvrdila već dokazanu visoku antioksidativnu aktivnost navedenih fenolnih jedinjenja/klasa fenolnih jedinjenja iz testiranih ekstrakata komine prema $DPPH^{\bullet}$ i $ABTS^{\bullet+}$ radikalima (Tabela 4.16).



Slika 4.9. Antioksidativna svojstva ekstrakata liofilisanih uzoraka komine i njenih konstituenata: semenki, pokožici i šepurini. Sposobnost redukcije Fe^{3+} jona (redukujuća moć) **(a)**; Sposobnost sakupljanja $ABTS^{\bullet+}$-radikala **(b)**; Relativna sposobnost sakupljanja $DPPH^{\bullet}$ radikala – $DPPH^{\bullet}$ RDSC **(c)**; Sposobnost uklanjanja vodonik peroksida -HPS aktivnost **(d)**. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti+standardna devijacija (n=3). *** simbol pokazuje statistički značajnu razliku izmedju uzoraka za svaki antioksidativni test posebno. Za *post hoc* ispitivanje statističke značajnosti korišćen je *Tukey's* testa ($p<0,05$). **Napomena:** nakon ekstrakcije 80% metanolom+0,1%HCl, svi uzorci su uparavani do suva i rekonstituisani u milliQ vodi i korišćeni za procenu antioksidativnih svojstava.

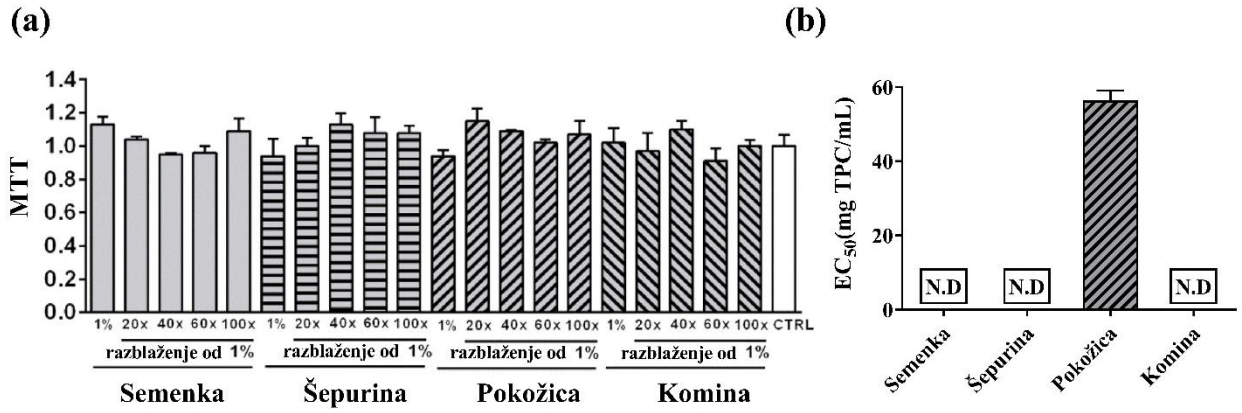
4.2.4. Citotoksična svojstva i ćelijska antioksidativna aktivnost ekstrakata liofilisanih uzoraka komine i njenih konstituenata

Pre ispitivanja ćelijske antioksidativne aktivnosti bilo je potrebno odrediti necitotoksične doze vodenih ekstrakata komine, semenke, pokožice i šepurine na Caco-2 ćelijama. U tu svrhu je primenjen MTT kolorimetrijski test (odredjivanje preživelih ćelija na osnovu količine redukovane tetrazolijum soli u metabolički aktivnim ćelijama), a rezultati su prikazani na Slici 4.10a. Iz dobijenih podataka se može uočiti da nijedno korišćeno razblaženje ekstrakata, u opsegu od 0,01 do 1% (~0,66-66 mg TPC/mL), nije imalo statistički značajan citotoksičan efekat na Caco-2 ćelijskoj liniji. Stoga, ista razblaženja su korišćena za dalje ispitivanje ćelijske antioksidativne aktivnosti.

Rezultati testa ćelijske antioksidativne aktivnosti (CAA) su prikazani na Slici 4.10b. U ovoj studiji, EC_{50} vrednost je uspešno potvrđena samo za ekstrakt pokožice (56,4 mg TPC/mL), što je u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Wolfe and Liu (2007), za acetonske ekstrakte grožđa. Za ostale ekstrakte nisu utvrđeni statistički značajni i od korišćene doze zavisni antioksidativni efekti. Ovi rezultati bi se mogli objasniti promenljivim sastavom fenolnih jedinjenja različitih ekstrakata komine i njenih konstituenata (semenka, pokožica i šepurina). Kao što se može videti iz Tabele 4.13., ekstrakt pokožice je bogat kvercetinom, kampferolom i njihovim glikozidima, u poređenju sa drugim ispitivanim ekstraktima u ovoj studiji. Stoga, može se reći da je dominantno prisustvo flavonola i antocijana u ekstraktima pokožice najviše doprinelo CAA aktivnosti, što je potvrđeno korelacionom

analizom. Štaviše, korelaciona analiza je otkrila značajnu pozitivnu korelaciju između CAA vrednosti i spektrofotometrijski određenih sadržaja ukupnih monomernih antocijana (*r=0,90*); kao i UHPLC-Orbitrap MS^4 određenih ukupnih derivata kvercetina (*r=0,92*), kampferola (*r=0,95*), siringetina (*r=0,90*), aromadendrina (*r=0,92*), malvidina (*r=0,91*) i petunidina (*r=0,93*) (Tabela 4.17). Wolfe and Liu (2007) su prethodno već pokazali da određena fenolna jedinjenja, poput kvercetina ili kampferola, mogu imati istaknutije CAA efekte od ostalih fenolnih jedinjenja.

Uopšteno govoreći, može se samo nagađati o mehanizmima antioksidativnog dejstva fenolnih jedinjenja iz grožđa na ćelijskom nivou. U slučaju CAA testa korišćenog u ovoj studiji, pretpostavlja se da fenolna jedinjenja iz komine grožđa prikupljaju/uklanjaju generisane radikale pre nego što oni interaguju sa DCFH i daju fluoroscentni signal; ili čak interaguju sa ABAP-om sprečavajući stvaranje radikala. Drugi mogući mehanizmi su inhibicija peroksidacije lipida, kroz reakcije sa peroksil radikalima koji propagiraju stvaranje drugih radikala ili inhibicija DCFH ćelijske oksidacije (Kellett et al., 2018). Ipak, efekti koje ispoljavaju ekstrakti komine i njeni konstituenti na unutarćelijsku ROS produkciju (reaktivne kiseonične klase) i antioksidativni odbrambeni sistem su nedovoljno ispitani i zahtevaju detaljnija ispitivanja koja bi pomogla u donošenju preciznijih zaključaka.



Slika 4.10. Citotoksična svojstva ekstrakata liofilisanih uzoraka semenke, šepurine, pokožice i cele komine. **(a)** MTT kolorimetrijski test (odredjivanje preživljavanja ćelija na osnovu količine redukovane tetrazolijum soli u metabolički aktivnim ćelijama); **(b)** Ćelijska antioksidativna aktivnost (CAA). Razlike između kontrole i eksperimentalnih grupa su određene korišćenjem *Tukey's* testa ($p<0,05$). Između kontrole i primenjenih tretmana nije utvrđena statistički značajna razlika na nivou značajnosti, $p<0,05$.

Tabela 4.16. Statistički značajne korelacije između antioksidativnih svojstava i sadržaja karakterističnih fenolnih jedinjenja/ klasa fenolnih jedinjenja u liofilisanoj komini i konstituentima komine.

	EG	TDGK	THBK	THCK	TFK	TF3O	TFL	TST	TAN	TPC_{OR}	TPC_S	TFC_S	MAC_S	PAC_S	FRP	$ABTS^{\bullet+}$	$DPPH^{\bullet}$ RDSC	HPS aktivnost
EG	-	0,99*	1,00*		1,00*		-0,97*				0,92			0,96*		0,95*	0,93	-0,94
TDGK		-	1,00*		0,99*		-0,92				0,91			0,99*		0,97*	0,94	-0,96*
THBK			-		1,00*		-0,95				0,94			0,98*		0,97*	0,95*	-0,97*
THCK				-		-1,00*									-0,94			
TFK					-		-0,95				0,94	0,90		0,98*		0,98*	0,96*	-0,97*
TF3O						-									0,94			
TFL							-											
TST								-										
TAN									-				0,97*					
TPC_{OR}										-								
TPC_S											-	0,99*		0,94		0,98*	1,00*	-0,98*
TFC_S												-				0,95*	0,98*	-0,95*
MAC_S													-					
PAC_S														-		0,99*	0,97*	-0,99*
FRP															-			
$ABTS^{\bullet+}$																-	0,99*	-1,00*
$DPPH^{\bullet}$ RDSC																	-	-0,99
HPS aktivnost																		-

Dobijeni korelacioni koeficijenti prikazani u Tabeli odnose se samo na značajne korelacije na nivou $p<0,1$; sem kod * korelacioni koeficijenti su značajni na nivou $p<0,05$. Skraćenice: EG-etil-galat; TDGK-ukupni derivati galne kiseline; THBK-hidroksibenzoeva kiselina i njeni derivati; THCK-hidroksicimetna kiselina i njeni derivani; TFK-ukupne fenolne kiseline; TF3O-ukupni flavan-3-oli; TFL-ukupni flavonol aglikoni i glikozidi; TST-ukupni stilbenoidi; TAN-ukupni antocijani; TPC_{OR}-ukupna fenolna jedinjenja određena UHPLC Orbitrap MS^4 kvantifikacijom; TPC_S-ukupna fenolna jedinjenja određena spektrofotometrijski; TFC_S-ukupni flavonoidi određeni spektrofotometrijski; PAC_S-ukupni proantocijanidini određeni spektrofotometrijski; MAC_S-ukupni monomerni antocijani određeni spektrofotometrijski; FRP-Redukujuća moć; $ABTS^{\bullet+}$-Sposobnost sakupljanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala; $DPPH^{\bullet}$ RDSC-Relativna sposobnost sakupljanja $DPPH^{\bullet}$ radikala; HPS aktivnost-Sposobnost uklanjanja vodonik peroksida.

Tabela 4.17. Statistički značajne korelacije između ćelijske antioksidativne aktivnosti i sadržaja ukupnih/pojedinačnih flavonol i antocijan derivata u liofilisanoj komini i konstituentima komine

	TAD	TQD	TSD	TMD	TID	TKD	TLD	TFL	TCiD	TDeD	TMaD	TPeoD	TPelD	TPetD	TAN	TPC_{OR}	TPC_S	TFC_S	PAC_S	MAC_S	CAA
TAD	-	0,99*	0,99*			0,98*	0,94	0,97*			0,91										0,92
TQD		-	1,00*			0,99*	0,97*	0,98*		0,91	0,96*	0,94			0,95						0,92
TSD			-			0,99*	0,98*	0,99*			0,94	0,93			0,93						0,90
TMD				-												-0,93					
TID					-															-0,91	
TKD						-	0,94	0,95		0,93	0,97*	0,94		0,92	0,96*				0,92		0,95*
TLD							-	0,99*			0,93	0,94			0,93						
TFL								-	0,90												
TCiD									-											-0,96*	
TDeD										-	0.99*	0,98*		0,99*	0,99*				0,98*		
TMaD											-	0,9*		0,97*	1,00*				0,97*		0,91
TPeoD												-		0,94	0,99*				0,94		
TPelD													-								
TPetD														-	0,97*				1,00*		0,93
TAN															-				0,97*		0,90
TPC_{OR}																-					
TPC_S																	-	0,99*		0,94	
TFC_S																		-			
PAC_S																			-		0,93
MAC_S																				-	
CAA																					-

Dobijeni korelacioni koeficijenti prikazani u Tabeli odnose se samo na značajne korelacije na nivou $p<0,1$; sem kod * korelacioni koeficijenti su značajni na nivou $p<0,05$. Skraćenice: TAD-ukupni aromodendrin derivati; TQD-ukupni kvercetin derivati; TSD-ukupni siringetin derivati; TMD-ukupni miricetin derivati; TID-ukupni izoramnetin derivati; TKD-ukupni kampferol derivati; TLD-ukupni laricitrin derivati; TFL-ukupni flavonol aglikoni i glikozidi; TCiD-ukupni cijanidin derivati; TDeD-ukupni delfinidin derivati; TMaD-ukupni malvidin derivati; TPeoD-ukupni peonidin derivati; TPelD-ukupni pelargonidin derivati; TPetD-ukupni petunidin derivati; TAN-ukupni antocijani; TPC_{OR}-ukupna fenolna jedinjenja, određena UHPLC Orbitrap MS^4 kvantifikacijom; TPC_S-ukupna fenolna jedinjenja određena spektrofotometrijski; TFC_S-ukupni flavonoidi određeni spektrofotometrijski; PAC_S-ukupni proantocijanidini određeni spektrofotometrijski; MAC_S-ukupni monomerni antocijani određeni spektrofotometrijski; CAA-ćelijska antioksidativna aktivnost.

4.3. Primena ekstrakta semenke fermentisane komine Prokupca u formulaciji prehrambenih proizvoda i aditiva

4.3.1. UHPLC Orbitrap MS karakterizacija fenolnih jedinjenja semenke iz fermentisane komine Prokupca

Za potrebe formulacije funkcionalnih prehrambenih proizvoda korišćena je semenka netretirane feremetisane komine Prokupca, preuzeta iz vinarije 2020. godine. Komina koja je korišćena za karakterizaciju fenolnih profila u prethodnom poglavlju, preuzeta je iz vinarije 2018. godine, a imajući u vidu da fenolni profil komine varira u zavisnosti od hemijskog sastava grožđa koji je uslovljen godinom berbe, urađena je ponovna karakterizacija fenolnih profila ekstrakta semenki iz fermentisane komine.

Detaljna identifikacija, karakterizacija i kvantifikacija (Tabela P4) fenolnih jedinjenja vodenog ekstrakta semenki je sprovedena korišćenjem UHPLC-Orbitrap MS^4 tehnike (Tabela 4.18). Ovaj ekstrakt semenke je dalje korišćen u formulaciji funkcionalnih aditiva i jogurata. Detektovano je ukupno 35 fenolnih jedinjenja koja su klasifikovana u nekoliko grupa, kao što je navedeno u predhodnim karakterizacijama u okviru ove disertacije. Hidroksibenzoeva kiselina i njeni derivati, flavan-3-oli i procijanidini, i hidroksicimetna kiselina i njeni derivati su bile dominantne klase fenolnih jedinjenja u ekstraktima semenke, čiji je udeo bio redom: 50,58%, 29,42%, i 17,31%. Dominantno prisustvo fenolnih kiselina, flavan-3-ola i procijanidina je pokazano u prethodnoj karakterizaciji fenolnih ekstrakata semenki izdvojenih iz komine u okviru ove disertacije, korišćenjem LC/MS tehnika. Galna kiselina i njeni heksozid izomeri, prvenstveno heksozid galne kiseline izomer 3 i etil-galat su bili dominantni među pojedinačno detektovanim fenolnim jedinjenjima, sa sadržajem višim od 400mg po kg SM semenke. Visok sadržaj etil-galata (417,16±17,31 mg/kg SM), se može pripisati intenzivnom kontaktu semenke i njenih dominantnih derivata galne kiseline sa alkoholnim medijumom. Derivati hidroksicimetne kiseline, kao što su kofeoilvinska i kumaroilvinska kiselina, pronađene su u značajnim količinama. U prethodno analiziranim ekstraktima liofilisanih semenki, navedeni derivati su bili prisutni u tragovima ili nisu bili detektovani. Ove razlike mogu biti posledica procesa vinifikacije, prisustva vinske kiseline koja lako stupa u interakcije sa fenolnim kiselinama, intenzivnog kontakta semenke grožđa sa vinom ili zbog ekstrakcije fenolnih jedinjenja neposredno nakon odvajanja komine od vina, bez dodatnog procesuiranja (sušenje TV ili liofilizacija).

Detektovani flavan-3-oli i procijanidini u ovom ekstraktu semenke su identični kao u prethodnoj karakterizaciji (Tabela 4.15), dok je sadržaj detektovanih jedinjenja bio varijabilan (sličan ili najčešće ~1,5-2 puta manji/viši, zavisno od jedinjenja (Tabela 4.15). Sadržaj ukupnih flavan-3-ola i procijanidina u ovom ekstraktu semenke je bio 941,49 mg/kg SM, što je značajno više u poređenju sa njihovim sadržajem u ekstraktu semenke prikupljane 2018.godine (801.58 mg/kg SM). Ove varijacije u sadržaju flavan-3-ola i procijanidina su pre svega posledica godine berbe, uslova vinifikacije, ekoloških i agronomskih faktora. Međutim, u oba ekstrakta, monomerni flavan-3-oli (katehin i epikatehin) i B tip procijanidin izomeri su bili dominantno kvantifikovani. Štaviše, predhodni eksperimenti u okviru ove disertacije su pokazali da upravo flavan-3-oli, procijanidini i derivati fenolnih kiselina imaju najveći uticaj na antioksidativnu aktivnost ekstrakta semenke.

Flavonol glikozidi su bili prisutni u tragovima (<1mg/kg FW), dok flavonol aglikoni nisu bili detektovani. Zanimljivo je da su detektovani neki derivati antocijana (2,63% od ukupnog sadržaja detektovanih fenolnih jedinjenja), iako je poznato njihovo potpuno odsustvo u ekstraktima semenki grožđa. Ovo je verovatno zbog intenzivnog kontakta semenke grožđa sa antocijanima oslobođenim iz pokožice tokom procesa vinifikacije i njihove adsorbcije na površini semenke, prvenstveno malvidin-3-*O*-glukozida koji je dominantan u pokožici sorte grožđa Prokupac (Pantelić et al., 2016). Ekstrakcija fenolnih jedinjenja iz semenke odmah nakon odvajanja od komine grožđa, takođe može uticati na prisustvo derivata antocijana u dobijenom ekstraktu. Osim malvidin-3-*O*-glukozida, ostali detektovani derivati antocijana su bili prisutni u tragovima.

Tabela 4.18. Sadržaj svih detektovanih fenolnih jedinjenja (rezultati su izraženi u mg/kg SM), u ekstraktu semenke sveže (netretirane) fermentisane komine Prokupca, određen UHPLC Orbitrap MS^4 tehnikom. Za svako detektovano i kvantifikovano jedinjenje u tabeli su dodatno prikazani: retencino vreme (t_R), izračunata masa, nađena masa, srednje odstupanje masa (ppm) i MS^2 fragmentacija.

Jedinjenja	*tr, min*	*Izračunata masa, $[M–H]^{-/+}$*	*Nađena masa, $[M–H]^{-/+}$*	*ppm*	*MS^2 fragmenti*	Vodeni ekstrakt semenke (mg/kg SM)
Hidroksibenzoeva kiselina i njeni derivati						
Galna kiselina[a]	3,04	169,01425	169,01436	-0,11	**125**(100)	530,23±15,33
Heksozid galne kiseline izomer 1[b]	4,11	331,06707	331,06723	-0,16	271(40), 241(15), 211(20), **169**(100), 125(10)	15,39±0,49
Heksozid dihidroksibenzoeve kiseline[b]	4,30	315,07216	315,07251	-0,35	**153**(100), 152(50), 109(15), 108(10)	23,77±1,83
Heksozid galne kiseline izomer 2[b]	4,31	331,06707	331,06726	-0,19	294(10), 271(20), **169**(100), 125(10)	123,40±8,86
Protokatehinska kiselina[b]	4,75	153,01933	153,01955	-0,22	**109**(100), 95(75), 79(20), 59(10)	51,68±6,28
Heksozid galne kiseline izomer 3[b]	4,76	331,06707	331,06592	1,15	**169**(100), 125(5)	411,86±25,61
Digaloil heksozid[b]	5,08	483,07803	483,07764	0,39	331(20), 313(20), **271**(100), 211(10), 169(10)	7,67±0,55
Metilgalat[b]	6,11	183,02990	183,03017	-0,27	**168**(100), 124(80)	1,18±0,07
Heksozid siringinske kiseline[b]	6,21	359,09837	359,09837	0,00	**197**(100)	34,29±0,64
Etil-galat[b]	7,16	197,04555	197,04530	0,25	**169**(100), 125(5)	417,16±17,31
Elaginska kiselina[b]	7,29	300,99899	300,99918	-0,19	284(40), 271(60), **257**(100), 229(85), 185(40)	2,14±0,17
Σ						**1618,76 (50,58)**
Hidroksicimetna kiselina i njeni derivati						
Kofeoilvinska kiselina[c]	4,87	311,04031	311,04141	-1,10	179(40), 177(15), **149**(100)	358,74±11,89
Kofeinska kiselina[a]	5,38	179,03498	179,03545	-0,47	**135**(100)	60,77±3,62
Kumaroilvinska kiselina[c]	5,60	295,04594	295,04623	-0,29	**163**(100), 149(10), 119(5)	134,47±4,55
Σ						**553,97 (17,31)**
Flavan-3-oli i procijanidini						
B tip procijanidin trimer izomer 1[d]	4,69	865,19854	865,20264	-4,10	**695**(100), 577(60), 425(30), 407(30), 287(30)	24,20±0,44
B tip procijanidin dimer izomer 1[d]	5,47	577,13515	577,13318	1,97	559(10), 451(30), **425**(100), 407(40), 289(20), 287(10)	113,66±6,13
B tip procijanidin dimer izomer 2[d]	5,72	577,13515	577,13531	-0,16	559(5), 451(20), **425**(100), 407(35), 289(20), 287(10)	85,48±5,07
B tip procijanidin trimer izomer 2[d]	5,73	865,19854	865,20087	-2,33	**695**(100), 577(80), **425**(30), 407(40), 287(35)	63,89±1,92
B tip procijanidin dimer izomer 3[d]	6,02	577,13515	577,13379	1,36	559(10), 451(20), **425**(100), 407(40), 289(20), 287(10)	169,46±5,83
Katehin[a]	6,17	289,07176	289,07089	0,87	271(5), **245**(100), 205(40), 179(15), 125(5)	154,50±6,44
B tip procijanidin dimer galat izomer 1[d]	6,23	729,14611	729,14734	-1,23	577(90), 559(80), 425(20), **407**(100), 289(20)	27,43±1,21
B tip procijanidin dimer galat izomer 2[d]	6,44	729,14611	729,14728	-1,17	577(50), 559(60), 425(10), **407**(100), 289(20)	114,76±3,05
Epikatehin[d]	6,54	289,07176	289,07068	1,08	271(5), **245**(100), 205(40), 179(15), 125(5)	167,69±4,65
B tip procijanidin dimer digalat[d]	6,80	881,15707	881,15723	-0,16	**729**(100), 711(30), 577(10), 559(20), 407(30)	1,72±0,13
Katehin galat[d]	7,09	441,08272	441,08218	0,54	331(10), **289**(100), 271(10), 169(25)	18,70±1,06
Σ						**941,49 (29,42)**
Flavonol glikozidi						
Dihidro-siringetin-3-*O*-heksozid[e]	5,54	509,13006	509,12967	0,39	491(10), 461(30), 355(40), 347(65), **329**(100)	1,00±0,12
Kvercetin-3-*O*-glukozid[a]	7,06	463,08820	463,08786	0,34	**301**(100), 300(30)	0,69±0,07
Σ						**1,69 (0,05)**

nastavak

nastvak						
Antocijani						
Delfinidin-3-*O*-glukozid[a]	4,85	465,10275	465,10294	-0,41	304(15), **303**(100)	2,39±0,17
Petunidin-3-*O*-heksozid[f]	5,27	479,11840	479,11884	-0,92	318(10), **317**(100)	2,75±0,18
Peonidin-3-*O*-glukozid[a]	5,53	463,12349	463,12366	-0,37	302(10), **301**(100)	4,74±0,40
Malvidin-3-*O*-glukozid[a]	5,59	493,13405	493,13394	0,22	332(10), **331**(100)	52,82±6,15
Peonidin-3-*O*-(6''-acetil)heksozid[f]	6,42	505,13405	505,13351	0,54	302(10), **301**(100)	2,45±0,22
Malvidin-3-*O*-(6''-acetil)heksozid[f]	6,48	535,14462	535,14398	0,64	332(10), **331**(100)	11,36±1,02
Peonidin -3-*O*-(6''-*p*-kumaroil)heksozid[f]	7,12	609,16027	609,16077	-0,50	302(10), **301**(100)	2,67±0,30
Malvidin-3-*O*-(6''-*p*-kumaroil)heksozid[f]	7,18	639,17083	639,17163	-0,80	332(10), **331**(100)	5,12±0,77
Σ						**84,31 (2,63)**
Σ Σ						**3200,22**

Vrednosti su dobijeni iz tri nezavisna merenja (n=3) i prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija. [a]Jedinjenja kvantifikovana korišćenjem dostupnih standarda; Jedinjenja kvantifikovana i izražena kao mg ekvivalenti galne kiseline[b]; kofeinske kiseline[c]; katehina[d]; kvercetina-3-*O*-glukozida[e]; malvidin-3-*O*-glukozida[f] po kg SM uzorka. **Napomena:** Antocijani su analizirani u pozitivnom jonizacionom modu (m/z); ostali kvantifikovani polifenoli i fenolne kiseline analizirani su u negativnom jonizacionom modu, korišćenjem UHPLC-Orbitrap MS^4. Nakon ekstrakcije 80% metanolom+0,1%HCl, ekstrakt semenke je uparavan do suva i rekonstituisan u milliQ vodi i korišćeni u formulaciji funkcionalnih aditiva i jogurata koji su dalje ispitivani u okviru ove disertacije.

4.3.2. Nefermentisani funkcionalni aditivi na bazi proteina kozijeg mleka obogaćeni ekstraktom semenke - TME funkcionalni aditivi

4.3.2.1. UHPLC-DAD MS/MS analiza fenolnih ekstrakata TME funkcionalnih aditiva i ekstrakta semenke

Rezultati UHPLC-DAD MS/MS kvantifikacije (podaci za kvantifikaciju, Tabela P5) fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima sprej osušenih TME prahova su prikazani u Tabeli 4.19. Kao što se može videti, u metanol (80% metanol+0,1%HCl) rekonstituisanom sprej osušenom prahu ekstrakta semenke (SOES) je detektovano i kvantifikovano 13 fenolnih jedinjenja. Ova kvantifikacija je potvrdila dominantno prisustvo flavan-3-ola i fenolnih kiselina (92,3% ukupno kvantifikovanih fenola), što je u saglasnosti sa rezultatima predhodnih istraživanja (Godjevac et al., 2010; Kammerer et al., 2004). Među pojedinačnim fenolnim jedinjenjima, galna kiselina (224,17±3,94 mg/kg SM) i katehin (518,28±14,73 mg/kg SM) su bili najzastupljeniji, zatim slede flavonol aglikoni, kvercetin i izoramnetin, koji nisu potvrđeni prethodnom UHPLC-Orbitrap analizom vodenog ekstrakta semenke (Tabela 4.18). Detekcija flavonol aglikona je verovatno posledica njihove hidrofobne prirode, što ih čini dobro rastvornim u manje polarnom metanol/voda ekstrakcionom sredstvu. Ostala detektovana fenolna jedinjenja su bila prisutna u tragovima u rekonstituisanom SOES.

U metanolnim ekstraktima M i TM prahova je potvrđeno odsustvo fenolnih jedinjenja, što se moglo i očekivati ako se uzme u obzir priroda ovih uzoraka. Stoga, fenolna jedinjenja detektovana u uzorcima TME prahova potiču isključivo od ekstrakta semenke grožđa. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u uzorcima TME prahova se povećavao sa povećanjem količine dodatog ekstrakta semenke u TME formulacijama, od 18,24 (TME1) do 71,35 (TME3) mg/kg SM praha. Isti trend povećanja sadržaja dominantnih fenolnih jedinjenja (katehin, galna kiselina, katehin galat i kampferol) je primećen sa povećanjem sadržaja ektrakta u ovim uzorcima, dok se sadržaj kofeinske kiseline nije menjao. Sadržaj katehina u TME prahovima se povećavao od 8,04±0,14 (TME1) do 37,15±1,60 (TME3) mg/kg SM, a sadržaj galne kiseline od 5,74±0,40 (TME1) do 25,89±1,12 (TME3) mg/kg SM. Osim katehina i katehin galata, drugi flavan-3-ol derivati prisutni u pripremljnom miksu standarda fenolih jedinjenja nisu detektovani u metanolnim ekstraktima analiziranih uzoraka. Zanimljivo je da flavonol aglikoni (kvercetin i izoramnetin), koji su detektovani u metanolnom ekstraktu semenke, nisu detektovani u metanolnim ekstraktima TME prahova. Ovo može biti zbog jakih hidrofobnih interakcija sa proteinima mleka (Jakobek, 2015), koje nisu narušene ekstrakcijom sa zakišeljenim metanolom.

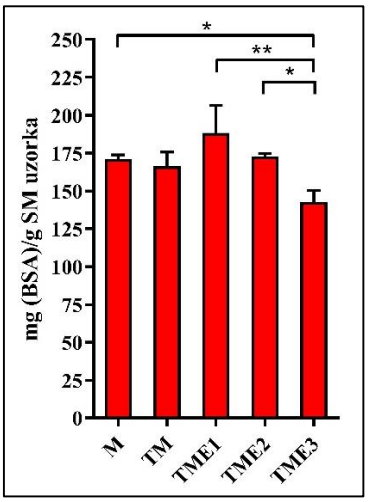
Tabela 4.19. Sadržaj polifenola i fenolnih kiselina (mg/kg SM uzorka), u sprej osušenim funkcionalnim aditivima na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog ekstraktom semenke.

Uzorci Jedinjenja (mg/kg SM uz.)	**M**	**TM**	**SOES**	**TME1**	**TME2**	**TME3**
Fenolne kiseline						
Galna kiselina	n.d.	n.d.	224,17±3,94[a]	5,74±0,40[b]	12,64±0,29[c]	25,89±1,12[d]
Protokatehinska kiselina	n.d.	n.d.	2,43±0,08	n.d.	n.d	n.d
Siringinska kiselina	n.d.	n.d.	1,84±0,07	n.d.	n.d	n.d
Kofeinska kiselina	n.d.	n.d.	2,24±0,19[a]	1,26±0,06[b]	1,31±0,09[b]	1,25±0,10[b]
Flavan-3-oli i njihovi derivati						
Katehin	n.d.	n.d.	518,28±14,73[a]	8,04±0,14[b]	18,90±0,92[c]	37,15±1,60[d]
Katehin galat	n.d.	n.d.	8,36±0,13[a]	0,83±0,02[b]	1,52±0,08[c]	2,72±0,14[d]
Galokatehin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Epigalokatehin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Epigalokatehin galat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Flavanol aglikoni i glikozidi						
Kvercetin	n.d.	n.d.	32,66±2,10	n.d.	n.d	n.d
Kvercetin-3-*O*-glukozid	n.d.	n.d.	1,51±0,07[a]	0,51±0,02[b]	0,89±0,05[c]	1,41±0,06[a]
Rutin	n.d.	n.d.	0,30±0,02[a]	0,36±0,02[b]	0,37±0,03[b]	0,46±0,04[c]
Izoramnetin	n.d.	n.d.	17,31±0,87	n.d.	n.d	n.d
Izoramnetin-3-*O*-glukozid	n.d.	n.d.	n.d.	0,15±0,01[a]	0,26±0,02[b]	0,60±0,03[c]
Kampferol	n.d.	n.d.	7,90±0,34[a]	1,20±0,02[b]	1,41±0,04[c]	1,67±0,01[d]
Ostali detektovani polifenoli						
Apigenin-7-glukozid	n.d.	n.d.	n.d.	0,16±0,01[a]	n.d	0,18±0,02[a]
Naringenin	n.d.	n.d.	0,81±0,04	n.d.	n.d	n.d
Eskuletin	n.d.	n.d.	2,79±0,20	n.d.	n.d	n.d
Σ Σ	**/**	**/**	**820,59**	**18,24**	**37,30**	**71,35**

Vrednosti su dobijeni iz tri nezavisna merenja (n=3) i prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Vrednosti koje su označene sa istim slovom u istom redu nisu statistički značajno različite prema *t*-testu, (p<0,05). Napomena: Sprej osušeni prahovi su ekstrahovani 80%metanol+0,1%HCl, iz kojih je dalje vršena kvantifkacija fenolnih jedinjenja (UHPLC-DAD MS/MS), čije su vrednosti prikazane u Tabeli. Skraćenice: „n.d.“-nije detektovano; SOES-sprej osušen ekstrakt semenke, koji je rekostituisan u 80%metanol+0,1%HCl; M-odmašćeno sirovo kozje mleko; TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); TME-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog različitim koncentracijama ekstrakta semenke, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,2mg/mL (TME1); 0,4mg/mL (TME2); 0,6mg/mL (TME3).

4.3.2.2. Sadržaj proteina u TME funkcionalnim aditivima

Sadržaj proteina je važan paramatar koji može značajno da pomogne u interpretaciji dobijenih rezultata za emulgujuća i peniva svojstva. Rezultati za sadržaj ukupnih proteina sprej osušenih prahova sa i bez dodatka ekstrakta su prikazani grafički (Slika 4.11). Kao što se može videti, sadržaj proteina se nije statistički značajno razlikovao, za uzorke M, TM, TME1 i TME2. Ovo znači da primenjen termički tretman (90°C, 10min) i dodatak fenolnih ekstrakata do 0,4mgTPC/mL polazne mešavine, nisu značajno uticali na sadržaj proteina u prethodno navedenim prahovima. Međutim, dalje povećanje udela fenolnih jedinjenja u prahovima je doprinelo smanjenju sadržaja proteina (TME3). Ovo se objašnjava povećanim prisustvom fenolnih jedinjenja u TME3 prahu, koji utiče na smanjenje sadržaja proteina, što je takođe pokazano elektroforetskom karakterizacijom (Slika 4.12). Ovi prahovi na bazi proteina kozijeg mleka sa/bez dodatka ekstrakta su imali značajno manji sadržaj proteina, u poređenju sa prethodno objavljenim rezultatima za odmašćeno i punomasno kravlje mleko (Kamizake et al., 2003), što može biti zbog razlika u proteinskom sastavu kravljeg i kozijeg mleka (Khan et al., 2019; Park, 2017).



Slika 4.11. Sadržaj proteina u funkcionalnim aditivima na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog ekstraktom semenke. Podaci su prikazani kao srednja vrednost+standardna devijacija (n=3). *0,01<*p*<0,05; **0,001<*p*<0,01; ***0,001<*p*<0,0001; ****p<0,0001; navedeni simboli pokazuju nivoe statistički značajne razlike između uzoraka. Za *post hoc* ispitivanje statističke značajnosti korišćen je *Tukey's* test (*p<0,05*). Skraćenice: M-odmašćeno sirovo kozije mleko; TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); TME-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog različitim koncentracijama ekstrakta semenke, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,2mg/mL (TME1); 0,4mg/mL (TME2); 0,6mg/mL (TME3).

4.3.2.3. Elektroforetska analiza proteina TME funkcionalnih aditiva

Proteinski profili M, TM i TME prahova su ispitivani korišćenjem tri različite elektroforetske tehnike, SDS-PAGE u redukujućim (Slika 4.12a) i neredukujućim (Slika 4.12b) uslovima, i Native-PAGE (Slika 4.12c). Detekcija proteina je izvršena korišćenjem standarda proteina kravljeg mleka i dostupnih podataka iz literature (Pesic et al., 2012). Kao što se može videti na SDS-R-PAGE gelu, elektroforetski putevi svih analiziranih uzoraka (Slika 4.12a, trake 1-5), su bili identični, sa šest dominantnih proteinskih traka kozijeg mleka, koje odgovaraju kazeinima i serum proteinima. Ovo znači da termički tretman kozijeg mleka (Slika 4.12a, traka 2) ili dodatak ekstrakta semenke u mleko (Slika 4.12a, trake 3-5), nisu uticali na promenu proteinskog sastava odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka (Slika 4.12a, traka 1). Međutim, intenzitet proteinskih traka αs-, β- i κ-kazeina je opadao sa povećanjem količine ekstrakta semenki komine u uzorcima (TME1, TME2, i TME3) (Slika 4.11a, trake 3-5), u poređenju sa istim trakama u TM uzorku (Slika 4.12a, traka 2), kao što je pokazano u Tabeli 4.20. To se može objasniti prisustvom fenolnih jedinjenja u TME uzorcima, što dovodi do smanjenja sadržaja proteina. Prosečan sastav αs-, β- i κ-kazeina (računato kao % ukupnih kazeina) u TM uzorku (Slika 4.12a, traka 2), određen dezintometrijskom analizom (SDS-R-PAGE gel), je bio redom: 32,83±0,55; 45,91±0,02 i 21,25±0,53(%). Ovi rezultati su u opsegu prethodno prijavljenih i literaturno dostupnih rezultata za kazeine kozijeg mleka (Verruck et al., 2019). Štaviše, rezultati za prosečan relativni sadržaj αs-kazeina su bili viši, dok su za β-kazein bili niži u poređenju sa rezultatima koje su prethodno dobili Pesic et al. (2014). Međutim obe studije su potvrdile da je β-kazein dominantan u kozijem mleku. Trake koje odgovaraju BSA i imunoglobulinima su bile niskog intenziteta.

Razlike između uzoraka su bile primećene na SDS-NR-PAGE gelovima (Slika 4.12b), jer veze između formiranih kompleksa nisu prekinute redukujućim agensima. Sirovo obezmašćeno mleko (Slika 4.12b, traka 1) je analizirano kao kontrola primenjenom termičkom tretmanu mleka (Slika 4.12, traka 2), koje je korišćeno u formulaciji aditiva (Slika 4.25b, trake 3-5). Na ulazu u gornji gel se mogu primetiti trake koje pripadaju visokomolekulskim kompleksima (HMW kompleksi), za sve termički tertirane uzorke mleka sa ili bez dodatka ekstrakta semenki grožđa (Slika 4.12b, trake 2-5). Intenzitet traka koje odgovaraju HMW kompleksima je smanjen redom u TME1, TME2 i TME3 uzorcima (Slika 4.12b, trake 3-5), za 4,9%; 16,1%, i 17,9%, u poređenju sa istom trakom u TM uzorku

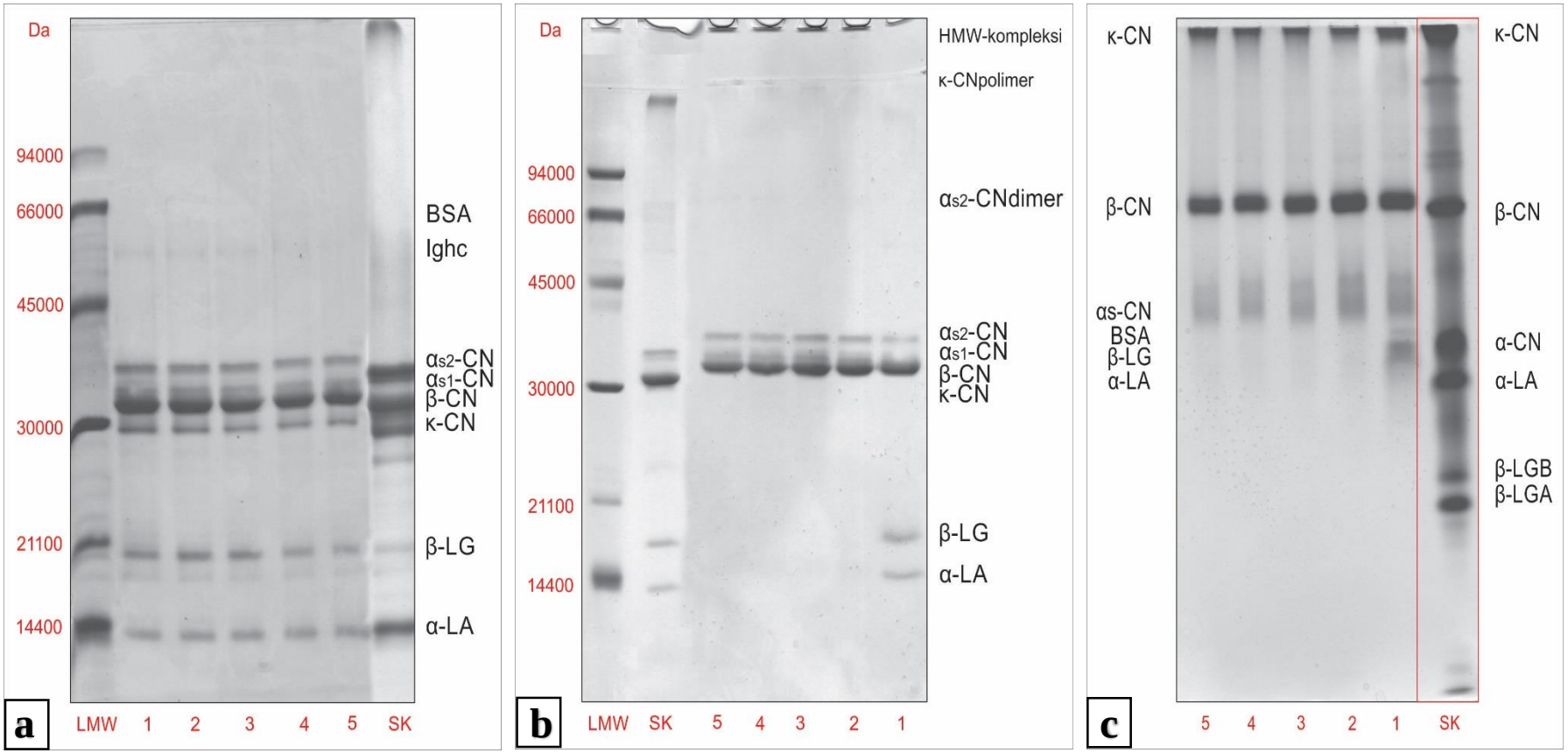
(Slika 4.12b, traka 2) (Tabela 4.20). U istim uzorcima (Slika 4.12b, trake 2-5), primećeno je potpuno odsustvo traka koje odgovaraju β-LG, α-LA, κ-kazeinu i αs2-CN dimerima, verovatno zbog njihovog učešća u stvaranju termički indukovanih HMW kompleksa (Dalgleish & Corredig, 2012; Pesic et al., 2012). Štaviše, Pesic et al. (2012) su pokazali da αs2- i β-kazein delimično učestvuju u stvaranju termički indukovanih WP/CN kompleksa kozijeg mleka, dok κ-kazein dominantno učestvuje u formiranju kompleksa sa udelom od preko 70%. Ista studija je potvrdila potpuno odsustvo rastvornih kompleksa u termički tretiranom kozijem mleku.

Tabela 4.20. Promene sadržaja kazeina i visoko proteinskih kompleksa (HMW) (u %) u TME uzorcima u odnosu na sadržaj u termički tretiranom mleku (TM).

Uzorci	**TM**	**TME1**	**TME2**	**TME3**
		SDS-R-PAGE		
αs2-kazein	100^{a}	$95{,}1\pm2{,}6^{b}$	$90{,}8\pm3{,}8^{bc}$	$88{,}3\pm2{,}2^{c}$
β-kazein	100^{a}	$87{,}1\pm0{,}9^{b}$	$85{,}8\pm1{,}2^{b}$	$82{,}9\pm0{,}6^{c}$
κ-kazein	100^{a}	$89{,}3\pm2{,}6^{b}$	$88{,}7\pm3{,}9^{b}$	$77{,}0\pm2{,}6^{c}$
		SDS-NR-PAGE		
HMW kompleksi	100^{a}	$93{,}7\pm3{,}6^{b}$	$82{,}5\pm3{,}2^{c}$	$80{,}8\pm4{,}2^{c}$
		Native-PAGE		
WPs/CN kompleksi	100^{c}	$103{,}9\pm3{,}0^{bc}$	$110{,}7\pm5{,}4^{b}$	$131{,}4\pm8{,}6^{a}$
β-CN	100^{a}	$89{,}8\pm1{,}2^{b}$	$84{,}6\pm1{,}6^{c}$	$80{,}6\pm1{,}4^{d}$

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija (n=3). Vrednosti koje su označene sa istim slovom u istom redu nisu statistički značajno različite prema *t*-testu, ($p<0{,}05$). Skraćenice: TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); TME-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog različitim koncentracijama ekstrakta semenke, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,2mg/mL (TME1); 0,4mg/mL (TME2); 0,6mg/mL (TME3), WPs/ CN kompleksi-serum protein/kazein kompleksi

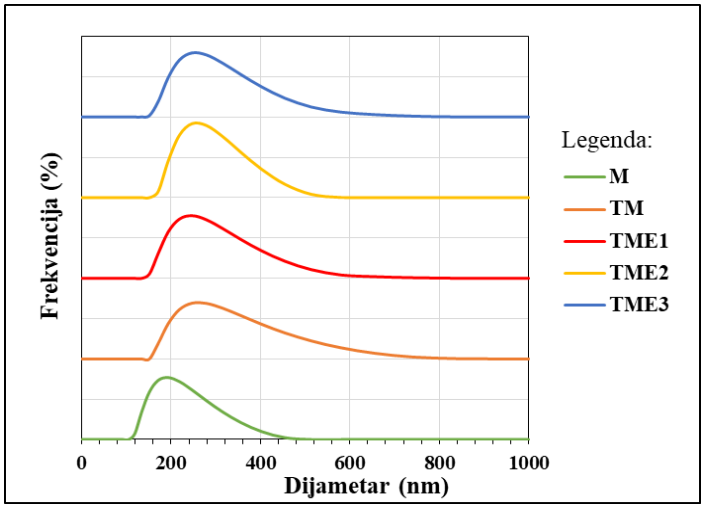
Gelovi dobijeni Native-PAGE su potvrdili intenzivnu denaturaciju i učešće serum proteina (β-LG i α-LA) i κ-kazeina u formiranju WP/CN kompleksa (Slika 4.12c, traka 2-5). Ovi termički indukovani agregati proteina imaju povećan afinitet za vezivanje fenolnih jedinjenja i ključnu ulogu u jačanju fenolna jedinjenja-kazein interakcija (Rahimi Yazdi & Corredig, 2012; Taterka & Castillo, 2015; Villalva et al., 2020). Kao što se može primetiti (Slika 4.12c), intenzitet traka koje odgovaraju WP/CN kompleksima se postepeno povećavao sa količinom ekstrakta semenki grožđa u TME uzorcima (TME1<TME2<TME3), u poređenju sa istom trakom u TM uzorku (Slika 4.12c, Tabela 3). Ovi rezultati ukazuju na prisustvo interakcija između fenolnih jedinjenja i termički indukovanih HMW kompleksa u TME uzorcima, koje nisu narušene u nedisocijativnim i neredukujućim uslovima. Glavna fenolna jedinjenja u ekstraktu semenki grožđa su derivati galne kiseline, flavan-3-oli i procijanidini. Posle pripreme TME prahova, procijanidini, kvercetin i izoramnetin nisu otkriveni u metanolnim ekstraktima, što ukazuje na njihovu jaku interakciju sa proteinima mleka. Nekoliko predhodnih studija je pokazalo da fenolna jedinjenja ovog tipa lako stupaju u interakcije sa proteinima mleka (Kanakis et al., 2011; Prigent et al., 2009; Ye et al., 2013). Promene u intenzitetu i pokretljivosti ovih kompleksa nisu uočene SDS-NR-PAGE analizom istih uzoraka (Slika 4.12b, trake 2-5), jer su verovatno sve hidrofobne i vodonične interakcije između fenolnih jedinjenja i proteina bile narušene pod uticajem SDS-a kao jakog disocijativnog agensa. Pored toga, može se primetiti da se intenzitet traka koje odgovaraju β-kazeinu i αs-kazeinu smanjio, sa povećanjem količine ekstrakta semenki grožđa u TME uzorcima (Slika 4.12c, trake 3-5; Tabela 4.20), što je u skladu sa rezultatima SDS-R-PAGE analize. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa predhodnim istraživanjem koje su sproveli Kusuda et al. (2006), koji su pokazali značajan efekat formiranih fenolna jedinjenja-protein kompleksa na pokretljivost i intenzitet proteinskih traka, koristeći Native-PAGE analizu. Štaviše, isti autori su pokazali promenu pokretljivosti difuznih traka procijanidnin-BSA kompleksa, dok su pentagaloil-glukoza (PPG)-BSA kompleksi imali malu pokretljivost i ostali su zadržani na ulazu u donji gel.



Slika 4.12. Elektroforegrami proteina za uzorke funkcionalnih aditiva na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog ekstraktom semenke, koji su analizirani: (a) SDS-R-PAGE-om; (b) SDS-NR-PAGE-om; (c) Native-PAGE-om. Oznake: M-odmašćeno sirovo kozje mleko (1); TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min) (2); TME-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog različitim koncentracijama ekstrakta semenke (3-5), tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,2mg/mL (TME1) (3); 0,4mg/mL (TME2) (4); 0,6mg/mL (TME3) (5). Skraćenice: LMW-standard molekulskih masa; SK-standard glavnih proteina kravljeg mleka; αs1-CN (αs1-kazein); αs2-CN (αs2-kazein); β-CN (β-kazein); κ-CN (κ-kazein); β-LG (β-laktoglobulini); α-LA (α-laktalbumin); BSA-serum albumin krvi; Ig-imunoglobulini; HMW-visokomolekulski kompleksi. Napomena: 2mg sprej osušenog uzorka je rekonstituisano u 1ml odgovarajućeg pufera za uzorke; Uokvirena elektroforetska traka (SK) i oznake sa desne strane (slika 4.11c) prikazuje standard glavnih proteina kravljeg mleka i karakterističnu pokretljivost kazeina i serum proteina kravljeg mleka analiziranih Native-PAGE-om, dok su uzorci od 1-5 (slika 20c) bazirani na kozjem mleku i sa leve strane su oznake koje pokazuju karakterističnu pokretljivost kozjih kazeina i serum proteina ispitivanih Native-PAGE-om.

4.3.2.4. Veličina čestice i ζ-potencijal TME funkcionalnih aditiva

Rezultati za veličinu čestica rekonstituisanih M, TM i TME prahova pokazuju da svi uzorci imaju unimodalnu distribuciju (Slika 4.13). Vrednosti za prečnik čestica analiziranih uzoraka su bili u rasponu od 206,23±2.16 do 298,3±9,55 nm. Veličina TM kazeinskih micela (298,30±9,55) je bila značajno viša u poređenju sa veličinom M kazeinskih micela (206,23±2,16), čemu najviše doprinose termički indukovani WP/CN kompleksi formirani na površini kazeinske micele (Dalgleish & Corredig, 2012; Hovjecki et al., 2020; Kılıç Bayraktar et al., 2019; Pesic et al., 2012). Veličina čestica za TME uzorke su bile niže u poređenju sa TM uzorkom, verovatno zbog uticaja prisutnih fenolnih jedinjenja u TME uzorcima. Veličine čestica TME prahova su bile redom: 267,93±8,33 (TME1), 268,27±7,35 (TME2) i 290,17±6,45 nm (TME3), dok se vrednosti za TME1 i TME2 uzorke nisu statistički značajno razlikovale. Tek kod TME3 uzorka (0,6 mg TPC/mL mleka) dolazi do značajnog povećanja veličine čestica. Ovi rezultati ukazuju da su interakcije između fenolnih jedinjenja i WP/CN kompleksa na površini kazeinskih micela verovatno uzrokovale sakupljanje kazeinskih micela u TME1 i TME2 uzorcima, čime su doprinele smanjenju veličina njihovih čestica u poređenju sa TM uzorkom. Dalje povećanje količine ekstrakta semenke, povećalo je veličinu TME3 micela, ukazujući da su fenolna jedinjenja ekstrakta pokrila površinu kazeinskih micele. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koji su dobijeni elektroforetskom analizom ovih uzoraka (Slika 4.12) i podacima koje su prijavili Rahimi Yazdi and Corredig (2012) za termički tretirano kravlje mleko obogaćeno kurkuminom. Ovi autori su pokazali da se kurkumin intenzivnije vezuje za kazeinske micele termički tretiranog kravljeg mleka, nego za kazeinske micele netretiranog mleka.



Slika 4.13. Distribucija veličine čestica rekonstituisanih sprej osušenih funkcionalnih aditiva na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog ekstraktom semenke grožđa. Skraćenice: M-odmašćeno sirovo kozije mleko; TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); TME-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog različitim koncentracijama ekstrakta semenke, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,2mg/mL (TME1); 0,4mg/mL (TME2); 0,6mg/mL (TME3).

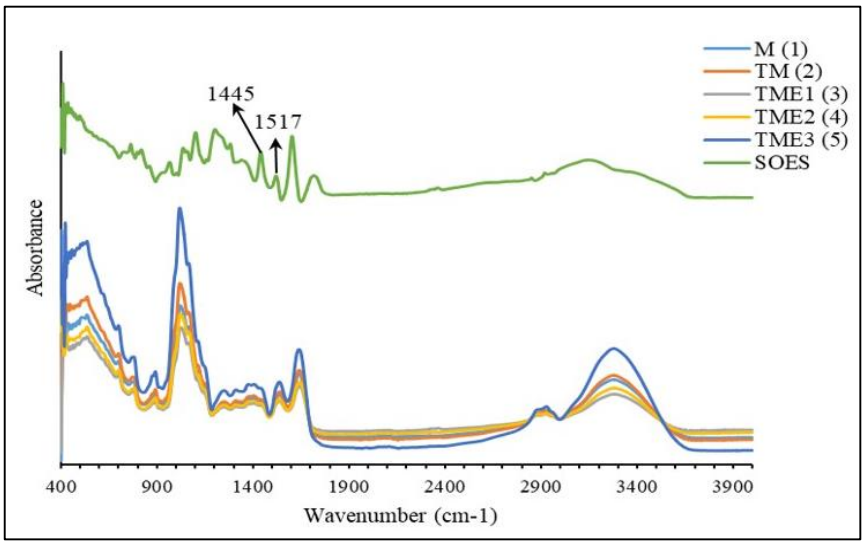
Vrednosti za ζ-potencijal su bile u rasponu od -40,77±0,46 do -36,53±3,07 mV, sa niskim koeficijentima varijacije koji ukazuje na dobru ponovljivost ovih rezultata. Svi uzorci su bili negativno naelektrisani, sa vrednostima za ζ-potencijal koje su prelazile -30 mV, što ukazuje na dobru fizičku stabilnost rastvora (Tolano-Villaverde et al., 2016). Negativna vrednost ζ-potencijala analiziranih uzoraka je verovatno zbog negativno naelektrisanih grupa na površini kazeinskih micela, kao što su fosfatne grupe, klasteri fosfoserina i ostaci nekih aminokiselina (Horne, 2020). ζ-potencijal vrednosti za M (-40.8 ± 0.5 mV) i TM (-36.9 ± 0.8 mV) uzorke su bile statistički značajno različite, što znači da su neke negativno naelektrisane grupe na površini micele nakon termičkog tretamana bile maskirane ili uključene u formiranju WP/CN kompleksa. Pored toga, pokazano je da joni natrijuma i kalcijuma neutrališu negativno naelektrisanje na površini serum proteina tokom termički

indukovane agregacije (Anema & Klostermeyer, 1996; O'Kennedy & Mounsey, 2009). Poznato je da se ovi agregati nalaze na površini kazeinske micele (Pesic et al., 2012).Vrednosti za ζ-potencijal TME čestica se nisu statistički značajno razlikovale (-36.53 ± 3.07 mV (TME1); -36.90 ± 4.14 mV (TME2); -38.37 ± 1.39 mV (TME3)). Štaviše, vrednosti za ζ-potencijal TME čestica su bile slične sa vrednostima TM čestica, što ukazuje da fenolna jedinjenja iz ekstrakta semenki nisu značajno uticala na promenu naelektrisanja TM kazeinske micele. Slično ponašanje su primetili Sharma et al. (2021), za pasterizovani napitak na bazi kozijeg mleka (giloy-kozije mleko) sa ili bez dodatog biljnog ekstrakta, čije se vrednosti za ζ-potencijal nisu značajno razlikovale.

4.3.2.5. ATR-FTIR karakterizacija TME funkcionalnih aditiva

ATR-FTIR analiza je sprovedene sa ciljem da se dobiju dodatne informacije o efektu termičkog tretmana i fenolnih jedinjenja iz ekstrakta semenki na proteine kozijeg mleka. ATR-FTIR spektri su dobijeni za ceo spektralni opseg (400-4000cm^{-1}) (Slika 4.14). Međutim uzimajući u obzir sastav uzoraka, u daljoj analizi je fokus bio na spektralnom regionu od 700 do 1800cm^{-1}, koji je dalje podeljen na četiri podregiona: 1600-1700cm^{-1} (Region I, amid I), 1600-1500cm^{-1} (Region II, amid II), 1500-1200cm^{-1} (Region III, amid III), i 1200-700 cm^{-1} (Region IV, tzv. „otisak prsta“ („fingerprint“) region ili ugljenohidratni region).

Amid I region prati ν(C=O) vibracije peptidne veze, dok amid II region prati δ(N-H) i ν(C-N) vibracije (Grewal et al., 2016; Grewal et al., 2017; Markoska et al., 2018; Markoska et al., 2019). Amid III region takođe prati izmene u sekundarnoj strukturi proteina, interakcije između različitih komponenti mleka, kao i vibracije traka poreklom od ugljenih hidrata, fenolnih jedinjenja i lipida (Grewal et al., 2016; Grewal et al., 2017). „Otisak prsta“ region prati različite ν(C-O) i ν(C-C) vibracije ugljenih hidrata, najverovatnije laktoze i vibracije -PO_3^{2-} grupa kazeinskih proteina (Grewal et al., 2016; Markoska et al., 2019)



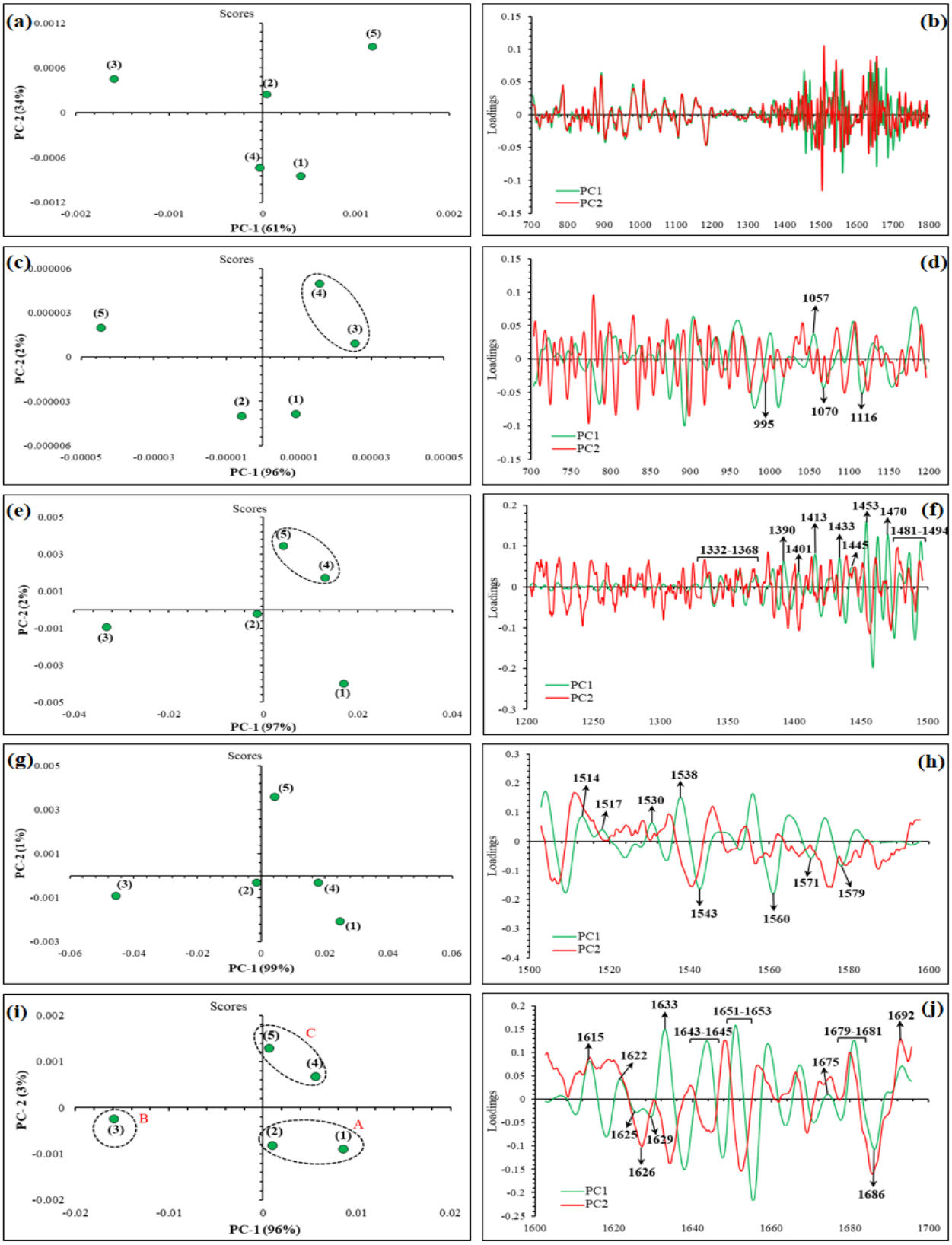
Slika 4.14. ATR-FTIR spektri sprej osušenih prahova kozijeg mleka, ekstrakta semenki i funkcionalnih aditiva na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog ekstraktom semenke grožđa. Oznake: M-odmašćeno sirovo kozje mleko (1); TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min)(2); TME-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog različitim koncentracijama ekstrakta semenke, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TTM/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,2mg/mL (TME1)(3); 0,4mg/mL (TME2)(4); 0,6mg/mL (TME3)(5); SOES-sprej osušen ekstrakt semenke.

Analiza glavnih komponeneti (PCA) je prvo primenjena na spektralnom regionu od 700-1800cm^{-1}, kako bi se odredila potencijalna odvajanja između analiziranih funkcionalnih aditiva (Slika 4.15a). Za ovaj region, PC1 i PC2 objašnjavaju redom 61% i 34% ukupne varijanse. Uzorci nisu grupisani, već su međusobno odvojeni, čemu verovatno doprinose strukturne izmene na kazeinskoj miceli izazvane termičkim tretmanom i prisustvom fenolnih jedinjenja u TME funkcionalnim aditivima

(uzorci 3-5). Međutim, kako grafik varijabli daje nepreglednu šumu traka (Slika 4.15b), teško je odrediti koje su trake najviše doprinele odvajanju uzoraka. Iz tog razloga, PCA je posebno primenjena na četiri podregiona, kako bi se detaljnije sagledale strukturne promene na proteinima i njihove interakcije sa fenolnim jedinjenjima.

Za amid I region, prve dve glavne komponente (PC1 i PC2) su klasifikovale uzorke u tri odvojene grupe, označene kao A grupa (uzorci 1 i 2), B grupa (uzorak 3) i C grupa (uzorci 4 i 5) (Slika 4.15i). Na osnovu ovog grupisanja, ne može se potvrditi efekat termičkog tretmana na odvajanje sirovog i termički tretiranog mleka. Stoga se može pretpostaviti da su potencijalne interakcije fenolna jedinjenja-protein i koncentracija fenolnih jedinjenja u TME funkcionalnim aditivima imali jači uticaj na odvajanje i grupisanje uzoraka u ovom regionu. Odvajanju uzoraka mleka (grupa A) od uzoraka mleka sa ekstraktom (grupa B i C), su najviše doprinele trake na 1633cm^{-1}, 1643-1645cm^{-1} i 1651-1653cm^{-1} (Slika 4.15j). Ovo se može redom povezati sa promenama u sadržaju elemenata sekundarne strukture proteina poput: intramolekularne β-nabrane strukture (β-listova), slučajnih strukturnih namotaja i α-heliksa/velikih petlji (Grewal et al., 2016; Grewal et al., 2017; Markoska et al., 2018), uzrokovanih dodatkom fenolnih ekstrakata semenki grožđa u TM. Poznato je da kazeini kozijeg mleka sadrže puno aminokselinskih ostatka prolina (Khan et al., 2019; Park, 2017), koji remete regularnu strukturu proteina (α-heliks i intermolekulsku β-nabranu strukturu), ali značajno utiče na formiranje zavoja i hidrofobnih regiona (Alaimo et al., 1999; Ye et al., 2013). Sa druge strane, fenolna jedinjenja verovatno prodiru u unutrašnje delove WP/CN kompleksa i smeštaju se blizu hidrofobnih regiona. Štaviše, Ye et al. (2013) su pokazali da su visokopolimerni polifenoli čaja jako skloni interakcijama sa hidrofobnim regionima proteina mleka. Predhodna UHPLC Orbitrap MS^4 analiza je pokazale da su flavan-3-oli i procijanidini dominantna fenolna jedinjenja semenke grožđa, slično kao kod čaja. Stoga, nakon dodatka ekstrakta semenki u mleko verovatno dolazi do interakcije fenolnih jedinjenja sa hidrofobnim aminokiselinskim ostacima triptofana, tirozina i prolina (Poncet-Legrand et al., 2006; Siebert et al., 1996; Zhang et al., 2021; Q. Zhao et al., 2020). Ove interakcije narušavaju nekarakteristične sekundarne strukture proteina (nasumična zavojnica, velika petlja i intramolekulska β-nabrana struktura) (Hasni et al., 2011; Ye et al., 2013) i doprinose promeni struktura hidrofobnih regiona proteina u TME uzorcima (Q. Zhao et al., 2020). Ova zapažanja su u saglasnosti sa rezultatima za veličinu čestica, koji su ukazali na smanjenu veličinu TME1 i TME2 micela u poređenju sa TM uzorkom. U amid I regionu je takođe primećeno odvajanje između TME funkcionalnih aditiva. Odvajanju između B grupe (uzorak 3) i C grupe (uzorci 4 i 5) najviše su doprinele trake na 1614, 1622 (intermolekularna β-nabrana struktura), 1625-1629 (intramolekularna β-nabrana struktura), 1675, 1679-1681 (β-okret struktura), 1686 (intermolekularna β-nabrana struktura) i 1692 cm^{-1} (β-antiparalelna struktura) (Grewal et al., 2016; Grewal et al., 2017) (Slika 4.15j). Očigledno je da različite koncentracije fenolnih jedinjenja različito utiču na ν(C=O) vibracije peptidne veze u TME uzorcima.

U amid II regionu se jasno odvaja TME1 i TME3 (Slika 4.15g). Odvajanju TME1 uzorka su doprinele traka na 1543cm^{-1} i trake u opsegu talasnih brojeva od 1560-1579cm^{-1}, što se može pripisati promenama u količini α-heliksa/petlji i β-okreta (Grewal et al., 2017) (Slika 4.15h). Štaviše, traka na 1571 cm^{-1} može biti zbog $\nu_{as}(-COO^-)$ vibracija asparaginskih i glutaminskih ostataka (Grewal et al., 2017), koji nisu uključeni u interakcije sa fenolnim jedinjenjima. Sa druge strane, na odvajanje TME3 uzorka, verovatno utiče povećana koncentracija fenolnih jedinjenja u uzorku i interakcije flavan-3-ola (katehina i epikatehina) sa WP/CN kompleksima, α-CN i β-CN (1514, 1530cm^{-1} i 1538cm^{-1}) (Hasni et al., 2011; Kanakis et al., 2011). Pored navedenog, traka na 1517cm^{-1} može biti zbog $\nu(C\text{-}C)_{armotična}$ vibracija (Nogales-Bueno et al., 2017), što se može povezati sa povećanom koncentracijom slobodnih fenolnih jedinjenja u TME3 uzorku. Ovo dodatno potvrđuje intezivna traka na 1517 cm^{-1} na ATR-FTIR spektru sprej osušenog vodenog fenolnog ekstrakta semenke (SOES) (Slika 4.14).



Slika 4.15. Grafici skorova (objekata) i varijabli izvedeni iz ATR-FTIR spektara kozijeg mleka (M i TM) i TME funkcionalnih aditiva, za sledeće spektralne regione: (a, b) 700-1800 cm^{-1}; (c, d) „fingerprint" region, 700-1200 cm^{-1}; (e, f) amid III region, 1200-1500 cm^{-1}; (g, h) amid II, 1500-1600 cm^{-1}; i (i, j) amid I region, 1600-1700 cm^{-1}. Oznake: M-odmašćeno sirovo kozije mleko (1); TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min)(2); TME-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog različitim koncentracijama ekstrakta semenke, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,2mg/mL (TME1)(3); 0,4mg/mL (TME2)(4); 0,6mg/mL (TME3)(5).

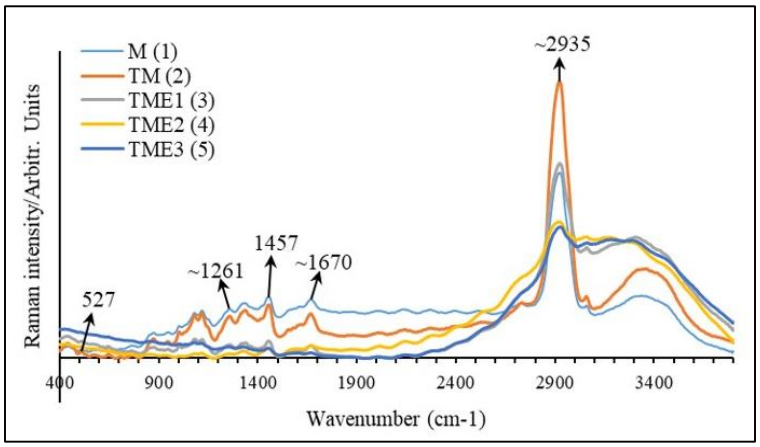
TME funkcionalni aditivi su u amid III regionu isto grupisani kao u amid I regionu (Slika 4.15e). Međutim, u ovom regionu se može primetiti odvajanje između sirovog i termički tretiranog mleka, čemu su najviše doprinele trake na 1390, 1401, 1413, 1433, 1453 i 1470cm^{-1} (Slika 4.15f). Obzirom da su lipidi uklonjeni, trake u regionu od 1390 do 1500cm^{-1} se mogu povezati sa prisustvom/odsustvom Millard-ovih produkata, koji se formiraju zbog primenjenog termičkog tretmana (Grewal et al., 2017; Ioannou, 2016). Odvajanju uzoraka 4 i 5 od ostalih uzoraka, najviše su doprinele trake u regionima 1332-1368 i 1481-1494cm^{-1}, što se može povezati sa promenama u strukturi proteina, koje su verovatno nastale zbog povećane koncentracije ekstrakta semenke. Pored navedenog, odvajanju ove grupe takođe je doprinela traka na 1445cm^{-1}, što može biti zbog ν(C-C)$_{\text{armotična}}$ vibracija slobodnih fenolnih jedinjenja.

Ako se uzme u obzir sastav analiziranih uzoraka, vidljive trake u regionu „otisak prsta“ (700-1200) se mogu povezati ne samo sa ν(C-O) i ν(C-C) vibracijama laktoze i vibracijama fosfatnih grupa (-PO_3^{2-}) koje su u sastavu proteina mleka, već i sa ν(C-O) i ν(C-C) vibracijama šećera koji su sastavni deo polifenolnih glikozida (Grewal et al., 2016; Kostić et al., 2021). Za ovaj region, PCA je odvojila sprej osušena mleka (uzorci 1 i 2) od funkcionalnih aditiva (uzorci 3-5), duž PC2 (Slika 4.15c), verovatno zbog izmenjenih vibracija specifičnih grupa koje su uključene u interakcije fenolnih jedinjenja sa proteinima mleka. Međutim, kod interpretacija ovih rezultata treba biti oprezan, jer PC2 objašnjava samo 2% ukupnog varijabiliteta. Trake na 1116, 1070, 1057 i 995 cm^{-1} doprinose odvajanju M (1) od ostalih uzoraka (2-5) (Slika 4.15d), što se može povezati sa izmenjenim ν(-PO_3^{2-}) vibracijama (Markoska et al., 2019). Termički indukovani WP/CN kompleksi verovatno uključuju ili „maskiraju“ -PO_3^{2-} grupe, čime se menja negativni naboj na površini micele, što je prethodno pokazao ζ-potencijal. Štaviše, joni kalcijuma i natrijuma tokom termičkog tretmana migriraju i neutrališu negativno naelektrisanje na površini serum proteina (O'Kennedy & Mounsey, 2009), što može da utiče na promenu vibracije -PO_3^{2-} grupe.

4.3.2.6. Raman karakterizacija TME funkcionalnih aditiva

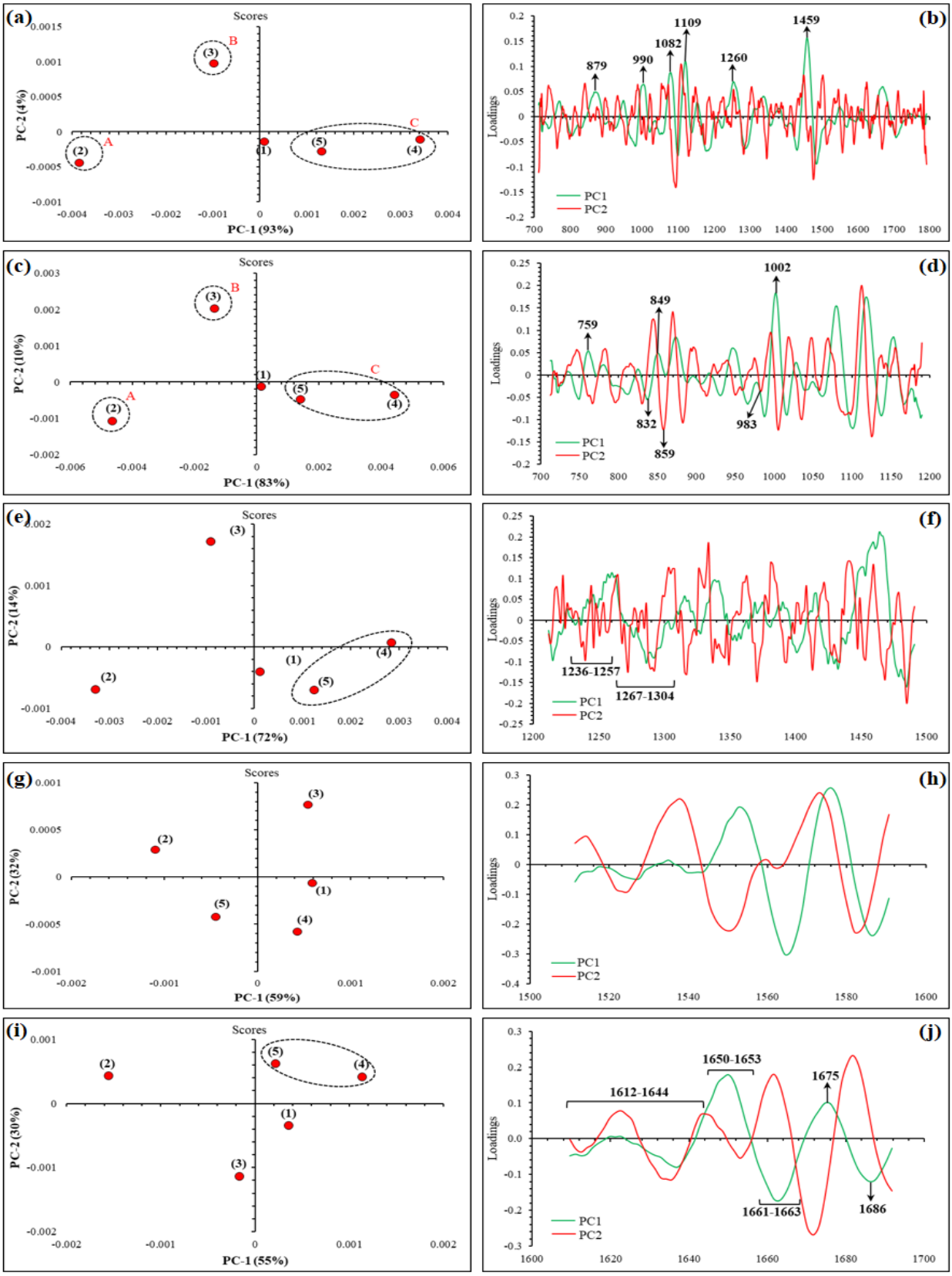
Infracrvena (FTIR) i Ramanova spektroskopija su komplementarne vibracione tehnike, koje prvenstveno prate vibracije povezane sa istezanjem ili savijanjem veza. Međutim, za razliku od IR spektroskopije, Ramanovo rasejanje zavisi od polarizabilnosti i daje intenzivnije signale za nepolarne grupe (Li-Chan, 2007). Iz navedenih razloga, kombinovana primena FTIR i Raman spektroskopije u analizi multikomponentnih uzoraka hrane doprinosi boljem razumevanju prirode uzoraka i praćenju potencijalnih interakcija između biomolekula. Raman spektri su dobijeni za spektralni opseg od 400-3800cm^{-1} (Slika 4.16). Dobijeni spektri su slični Raman spektrima koje su snimili drugi autori za uzorke komercijalnog odmašćenog mleka u prahu (McGoverin et al., 2010; Moros et al., 2007), sa nekoliko karakterističnih traka koje pripadaju amid III (~1261cm^{-1}) i amid I (~1670cm^{-1}) regionu (Almeida et al., 2011; Niaura, 2006; Rygula et al., 2013; Silva et al., 2021). Pored toga, dominantna traka na ~2935cm^{-1}, se može povezati sa ν(CH) i ν(CH_2) vibracijama šećera (uglavnom laktoze) (McGoverin et al., 2010; Silva et al., 2021; Wiercigroch et al., 2017), dok traka malog intenziteta na 527 cm^{-1} odgovara ν(S–S) vibracijama (Niaura, 2006).

Dalji fokus PCA analize je bio na istim spektralnim regionima kao u ATR-FTIR analizi. PCA analiza spektralnog regiona od 700 do 1800 cm^{-1}, otkriva da PCA (PC1 i PC2) klasifikuje uzorke u tri grupe, označene kao A grupa (uzorak 2), B grupa (uzorak 3) i C grupa (uzorci 4 i 5) (Slika 4.17a). Trake koje su najviše doprinele ovom odvajanju među grupama su 879, 990, 1082, 1109, 1260 i 1459 cm^{-1} (Slika 4.17b).



Slika 4.16. Raman spektri sprej osušenih prahova kozijeg mleka i funkcionalnih aditiva na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog ekstraktom semenke grožđa. Oznake: M-odmašćeno sirovo kozije mleko (1); TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min)(2); TME-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog različitim koncentracijama ekstrakta semenke, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,2mg/mL (TME1)(3); 0,4mg/mL (TME2)(4); 0,6mg/mL (TME3)(5).

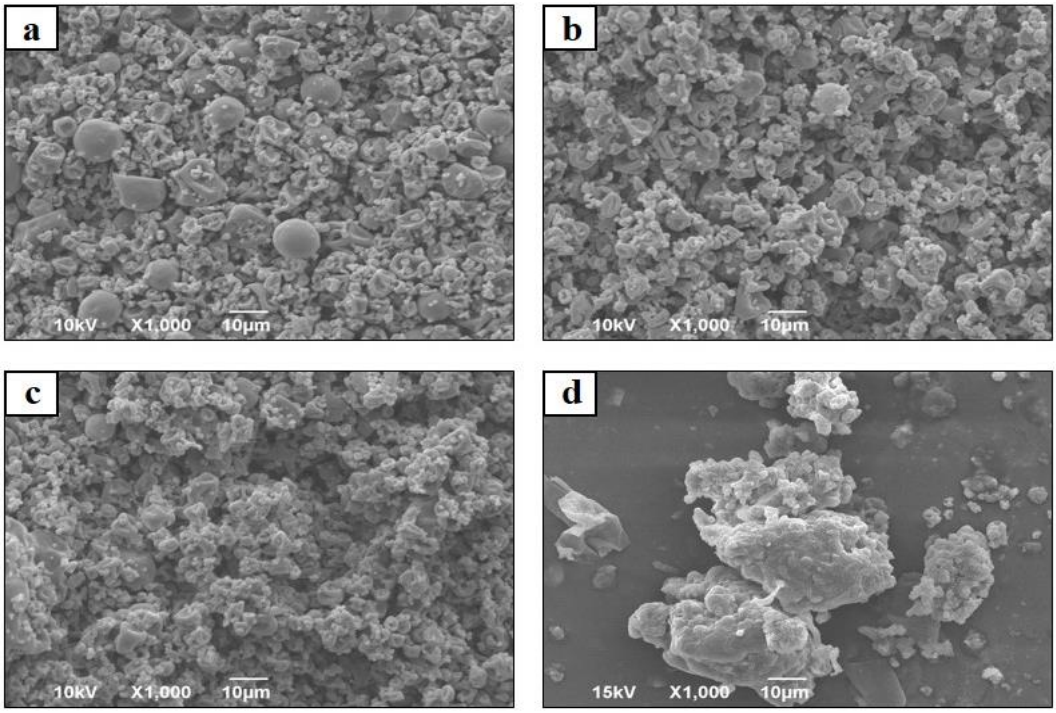
U analizi amid I i amid II regiona, može se primetiti odvajanje između termički tretiranog i sirovog mleka (Slika 4.17g,i), a ovom odvajanju su najviše doprinele trake na 1650-1653 (α-heliks), 1661-1663, 1675 i 1686 cm^{-1} (β-okret struktura) (Slika 4.17j). Sa druge strane, M i TM nisu pokazali PCA odvajanje nakon ATR-FTIR analize istog spektralnog regiona. Potom, za amid I region, TME2 i TME3 su grupisani i odvojeni od uzorka TME1. Ovom odvajanju su najviše doprinele trake u 1612-1644 cm^{-1} regionu (Slika 4.17j), što se može povezati sa promenama u strukturi paralelne i antiparalelne β-nabrane strukture, kao i sa izmenjenim vibracijama aminokiselinskih ostataka tirozina, triptofana i fenilalanina (Niaura, 2006; Rygula et al., 2013). Suzbijene vibracije aminokiselinskih ostataka su verovatno posledica intenzivnijih interakcija između fenolnih jedinjenja i WP/CN kompleksa na površini kazeinskih micela TME2 i TME3 uzoraka. Pored navedenog, trake u ovom opsegu (1612-1644 cm^{-1}) mogu takođe biti zbog vibracija C=C veza aromatičnih grupa slobodnih flavan-3-ola (katehin, epikatehin, epigalokatehin) (Pompeu et al., 2017). U amid II regionu, svi uzorci su međusobno odvojeni (Slika 4.17g), prema grafiku varijabli (Slika 4.17h). Međutim, vibracije u amid II regionu imaju mali uticaj na Raman rasejanje i daju manje intenzivne trake, pa se odvajanje uzoraka u ovom regionu mora oprezno tumačiti. U amid III regionu, uzorci su identično grupisani kao i u amid I regionu (Slika 4.17e), što se može objasniti činjenicom da amid III region daje komplementarne informacije o strukturi proteina kao i amid I. Trake u opsegu talasnih brojeva od 1236-1257 i 1267-1304 cm^{-1}, se mogu povezati sa izmenama u strukturi α-heliksa i slučajnih strukturnih namotaja („random coil“), verovatno zbog primenjenog termičkog tretmana i potencijalnih interakcija proteina sa fenolnim jedinjenjima (Slika 4.17f). Za region „otiska prsta“, prve dve PCA (PC1 i PC2) objašnjavaju 93% ukupne varijanse, a uzorci se mogu klasifikovati u tri grupe: A grupa (uzorak 2), B grupa (uzorak 3) i C grupa (uzorci 4 i 5) (Slika 4.17c). U ovom spektralnom opsegu (700-1200cm^{-1}), ν(C-O), δ(C-C), δ(C-OH) (1126-1055 cm^{-1}), i δ(C-O-C) vibracije (950-870 cm^{-1}) (Slika 4.17d), se mogu povezati sa ugljenim hidratima (Almeida et al., 2011; Wiercigroch et al., 2017). Štaviše, veliki broj traka u amid III i regionu „otiska prsta“, koje su doprinele odvajanju uzoraka, se mogu povezati sa vibracijama aminokiselinskih ostataka (Almeida et al., 2011; Benevides et al., 2004; Niaura, 2006; Rygula et al., 2013), produktima Maillard-ovih reakcija (Reiner et al., 2020; Silva et al., 2021), kao i sa δ(O-H), ν(C-O) i $\delta(=C\text{-}H)_{aromatčni}$ u ravni („*in-plane*“) i van ravni („*out-of plane*“) vibracijama fenolnih jedinjenja (Pompeu et al., 2017; Qu et al., 2020).



Slika 4.17. Grafici skorova (objekata) i varijabli izvedeni iz Raman spektara kozijeg mleka (M i TM) i TME funkcionalnih aditiva, za sledeće spektralne regione: (a, b) 700-1800 cm^{-1}; (c, d) „fingerprint“ region, 700-1200 cm^{-1}; (e, f) amide III region, 1200-1500 cm^{-1}; (g, h) amide II, 1500-1600 cm^{-1}; i (i, j) amide I region, 1600-1700 cm^{-1}. Oznake: M-odmašćeno sirovo kozije mleko (1); TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min)(2); TME-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog različitim koncentracijama ekstrakta semenke, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,2mg/mL (TME1)(3); 0,4mg/mL (TME2)(4); 0,6mg/mL (TME3)(5).

4.3.2.7. Morfološke karakteristike TME3 funkcionalnog aditiva

Skenirajuća elektronska mikroskopija daje uvid u morfološke karakteristike M, TM i TME3 sprej osušenih prahova. Među TME funkcionalnim aditivima, za SEM analizu je izabran TME3 uzorak zbog najvišeg sadržaja fenolnih jedinjenja. Kao što se može primetiti na slici 4.18a-c, većina čestica nema sferni oblik, već najčešće imaju smežurani („shrinking“) izgled, što je zajedničko za sve sprej osušene uzorke mleka (A. Kalušević et al., 2017). Kada je temperatura sprej sušenja niža kao u ovom slučaju (130°C), površina micele duže ostaje vlažna i fleksibilna, a čestice se najverovatnije skupljaju i smežuravaju dok se hlade (Nijdam & Langrish, 2006). Kod sirovog mleka se mogu uočiti više sferinih čestica (Slika 4.18a), nego što je to slučaj kod TM i TME3 uzorka Ovo može biti zbog dvostrukog termičkog tretmana TM i TME3 uzoraka, tokom pripreme termički tretiranog mleka i tokom sprej sušenja. Pored toga, većina micela sirovog mleka imaju glatku („smooth“) površinu (Slika 4.18a). Sa druge strane, termički tretirane kazeinske micele imaju hrapavu („ragged“) površinu sa uniformno raspoređenim sitnim česticama po njoj (Slika 4.18b), što je rezultat termičkog tretmana i formiranih WP/CN kompleksa na površini kazeinske micele (Kalab et al., 1983; Pesic et al., 2012). Na SEM slici TME3 uzorka se može primetiti kompaktnija i mrežasta struktura, sa izraženm grozdastim agregatima na površini kazeinske micele (Slika 4.18c), što ukazuje na prisustvo interakcija između WP/CN kompleksa i fenolnih jedinjenja (Ozdal et al., 2013; Sharma et al., 2021). Ove interakcije su omogućile formiranje kompaktne i uniformne strukture sa manjim šupljinama (H. Chen et al., 2020; Pan et al., 2019). Sličnu morfologiju su uočili i drugi autori za sprej osušene odmašćene prahove mleka obogaćene sa ekstraktom pokožice grožđa (A. M. Kalušević et al., 2017), antocijanima bogatim ekstraktom omotača crne soje (A. Kalušević et al., 2017) i ekstraktom ploda aronije (Ćujić-Nikolić et al., 2019). Na SEM slici sprej osušenog ekstrakta semenke, čestice imaju nepravilni i agregirani izgled (Sliki 4.18d). Slična morfologija je prethodno primećena na SEM slikama sirovog *Silybum marianum* ekstrakta (Sansone et al., 2018) i sprej osušenog ekstrakta komine grožđa (Moreno et al., 2016).



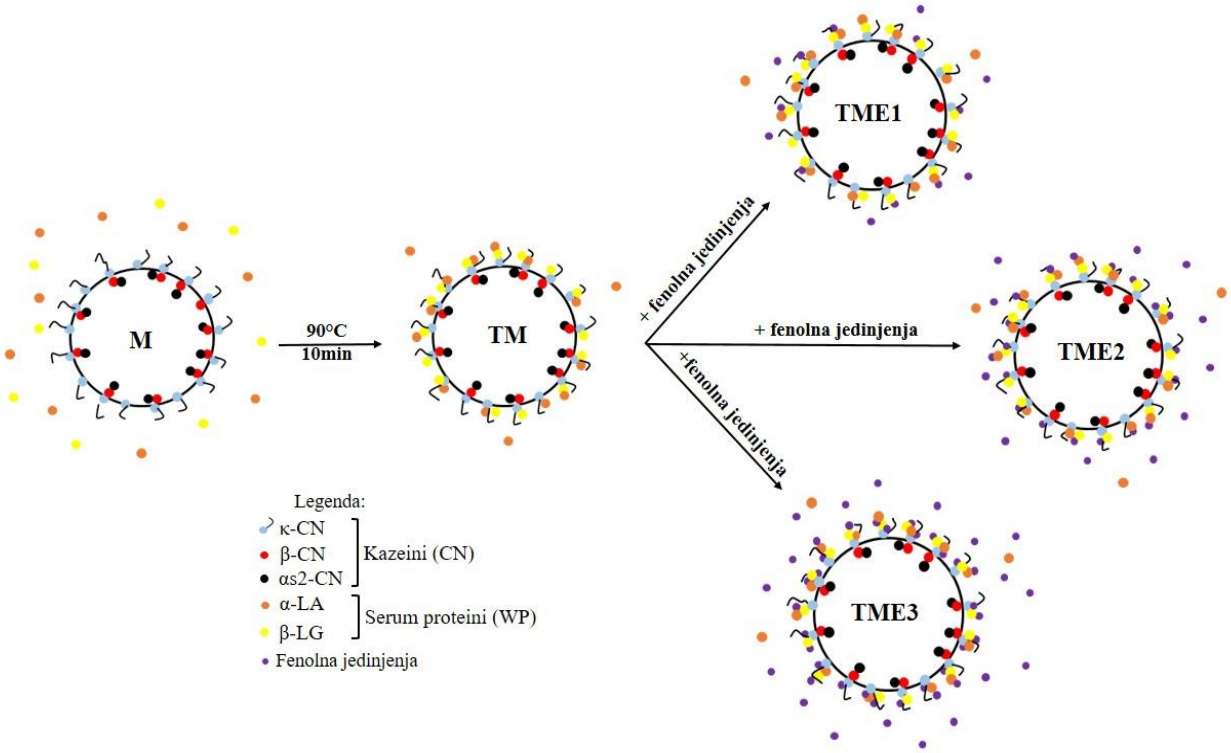
Slika 4.18. SEM slike sprej osušenih prahova: (a) odmašćeno sirovo kozije mleko (M); (b) termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min) (TM); (c) funkcionalni aditiv na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog ekstraktom semenke (TME3); (d) sprej osušen ekstrakt semenke.

4.3.2.8. Šematski prikaz distribucije fenolnih jednjenja u TME funkcionalnim aditivima

Na osnovu dobijenih rezultata detaljno okarakterisanih funkcionalnih aditiva i prethodno predstavljenog modela distribucije serum proteina (WP) u termički tretiranom kozijem mleku (Pesic et al., 2012), može se šematski prikazati distribucija fenolnih jedinjenja u termički tretiranom kozijem mleku na prirodnom pH mleka, pH=6,7 (Slika 4.19).

Prethodno je pokazano da termički tretman kozijeg mleka (90°C, 10min), indukuje visok procenat denaturacije serum proteina i njihovu agregaciju sa κ-kazeinom i delimično sa α- i β-kazeinom (Pesic et al., 2012). Učešće κ-, α-, i β-kazeina u formiranju WP/CN kompleksa podstiče bolje povezivanje i uniformnu distribuciju kompleksa vezanih za micelu, što doprinosi odsustvu slobodnih rastvornih kompleksa (Pesic et al., 2012). Neke predhodne studije su pokazale da ovi toplotom indukovani WP/CN kompleksi povećavaju afinitet vezivanja kazeinskih micela sa fenolnim jedinjenjima (Rahimi Yazdi & Corredig, 2012; Villalva et al., 2020).

Na osnovu rezultata elektroforetske i UHPLC DAD MS/MS analize, može se pretpostaviti da fenolna jedinjenja iz semenke grožđa, zbog niske koncentracije u TME1 uzorku reaguju sa WP/CN kompleksima na površini kazeinskih micela. Međutim, povećanje koncentracije fenolnih jedinjenja u TME2 i TME3 uzorcima dovodi do zasićenja većine aktivnih mesta na površini kazeinskih micela (TME2), i prodiranja fenolnih jedinjenja u unutrašnji deo WP/CN kompleksa sa većim pristupom hidrofobnim regionima kazeinskih micela (TME3). Afinitet vezivanja fenolnih jedinjenja za različite delove kompleksa povezanih sa micelom, zavisi od fenolnih jedinjenja prisutnih u ekstraktu semenki grožđa. Prema Ye et al. (2013) kazeinska micela intenzivnije vezuje visoko polimerizovana fenolna jedinjenja, dok serum proteini pretenduju u vezivanju fenolnih jedinjenja manjih molekulskih masa. Fenolna jedinjenja ekstrahovana metanolom iz TME funkcionalnih aditiva su verovatno slobodna fenolna jedinjenja ili fenolna jedinjenja vezana slabijim vezama za površinu kazeinskih micela. Sa druge strane, kvercetin i izoramnetin nisu otkriveni u TME metanolnim ekstraktima, pa se može pretpostaviti da su ova i druga manje polarna fenoilna jedinjenja u interakciji sa hidrofobnim regionima kazeinske micele. Pretpostavljeni modeli su dodatno potvrđeni ATR-FTIR i Raman analizom i njihovim PCA odvajanjima, prvenstveno u amid I i amid III regionima. U ovim regionima TTM+E1 uzorak se odvaja od uzoraka TME2 i TME3. Ovo odvajanje među uzorcima nastaje zbog izmenjenih vibracija specifičnih veza u strukturi molekula, koji se mogu povezati sa postojanjem potencijalnih interakcija fenolnih jedinjenja sa WP/CN kompleksima, α-CN i β-CN. Štaviše, specifične vibracije koje odvajaju TME2 i TME3 uzorke u ovim regionima se mogu povezati sa $\nu(C\text{-}C)_{\text{armotična}}$ vibracijama slobodnih fenolnih jedinjenja, što je u saglasnosti sa UHPLC DAD MS/MS rezultatima.

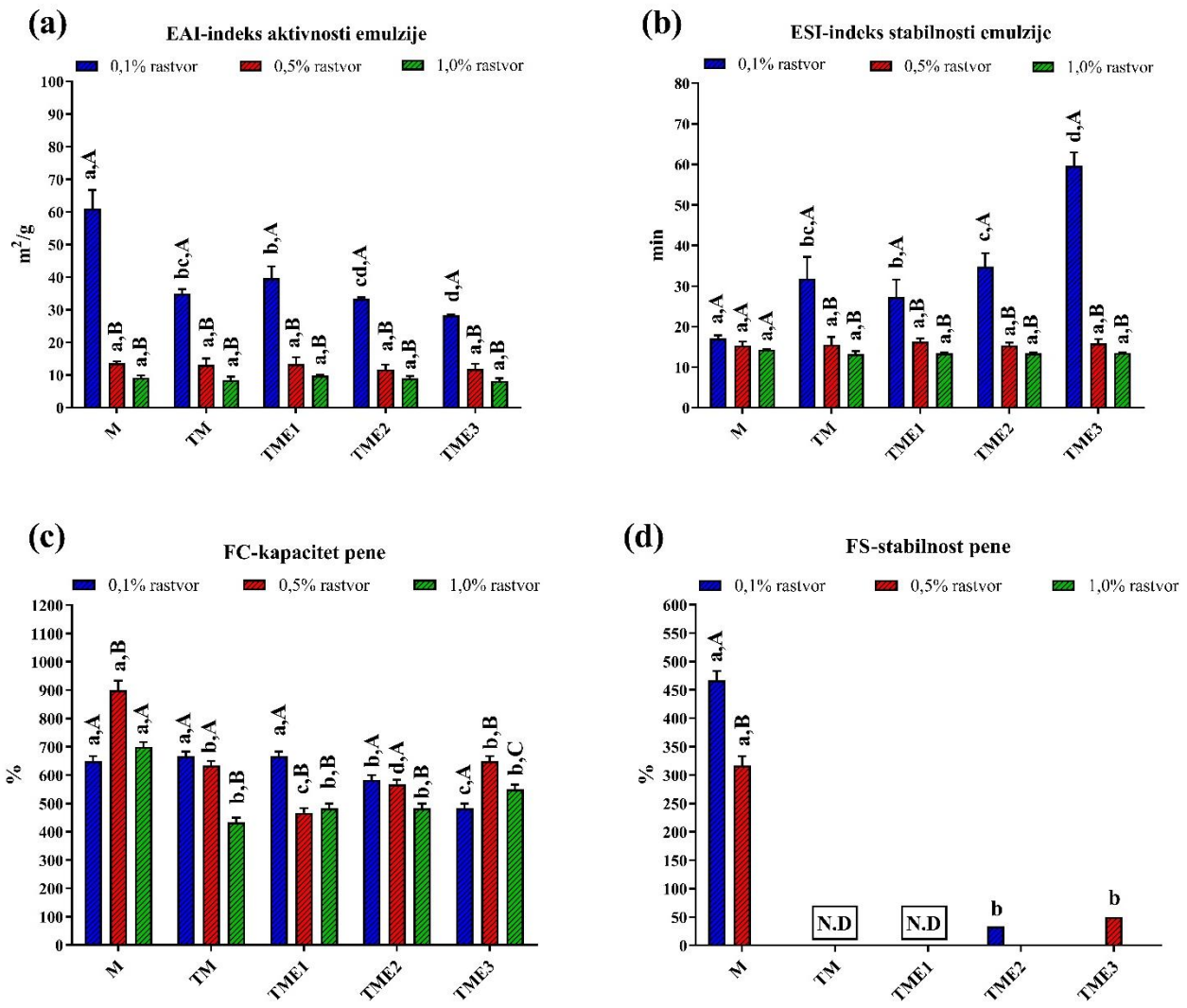


Slika 4.19. Šematski prikaz interakcija različitih koncentracija fenolnih jedinjenja semenki grožđa i kazeinskih micela termički tretiranog kozijeg mleka (90°C, 10min), na pH 6,7. Skraćenice: M-odmašćeno sirovo kozije mleko; TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); TME-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog različitim koncentracijama ekstrakta semenke, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TTM/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,2mg/mL (TME1); 0,4mg/mL (TME2); 0,6mg/mL (TME3).

4.3.2.9. Tehno-funkcionalna svojstva TME funkcionalnih aditiva

Emulgujuća svojstva M, TM i TME funkcionalnih aditiva su određena za 0,1%, 0,5%, i 1% (m/V) rastvore (Slika 4.20, grafik a,b). Prema dobijenim podacima, 0,1% rastvori su pokazali bolja emulgujuća svojstva (EAI i ESI) za sve analizirane uzorke, u poređenju sa 0,5 i 1% rastvorima. Pored toga, EAI i ESI vrednosti za 0,5% i 1% rastvore se nisu statistički značajno razlikovale, što znači da sadržaj M, TM i TME u rastvorima, više od 0,5% nisu imale uticaj na emulgujuća svojstva. Lošija emulgujuća svojstva 0,5 i 1% rastvora su najverovatnije dobijena zbog prisustva neabsorbovanih proteina na međufaznoj površini voda/ulje, koji destabilišu emulzije (Dickinson, 1999). Različita emulgujućim svojstvima za analizirane M, TM i TME rastvore se mogu primetiti samo u slučaju 0,1% rastvora, pa će se dalja diskusija odnositi na ove uzorke.

Najviša EAI vrednost je dobijena za 0,1% M rastvor (61,04±5,68 m^2/g), dok su EAI vrednosti 0,1% TM i TME rastvora bile skoro duplo manje (1,5-2,2 puta manje) (Slika 4.20a), što je u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Pešić et al. (2013). Ove razlike su bile očekivane jer je prečnik termički tretiranih kazeinskih micela bio značajno veći od onih u netretiranom mleku, o čemu je već diskutovano u odeljku 4.3.2.4. Iz navedenog razloga, značajno veće TM micele pokrivaju manju površinu kapljice ulja u odnosu na micele sirovog mleka, što je uticalo na smanjenje EAI vrednosti u poređenju sa M uzorkom (Pešić, 2011). EAI vrednosti opadaju sa povećanjem količine ekstrakta semenke grožđa u TME uzorcima (TME1>TME2>TME3), što je u skladu sa promenama prečnika veličine čestica ovih uzoraka (odeljak 4.3.2.4).



Slika 4.20. Tehno-funkcionalna svojstva funkcionalnih aditiva na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog ekstraktom semenke. (a) Indeks aktivnosti emulzije; (b) Indeks stabilnosti emulzije; (c) Kapacitet pene; (d) Stabilnost pene. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti+standardna devijacija (n=3). Mala slova označavaju poređenje između uzoraka koji imaju isti sadržaj praha u rastvoru, a velika slova označavaju poređenja u okviru svakog uzorka posebno. Različita slova označavaju statistički značajne razlike prema *Tukey's* testu ($p<0,05$). Skraćenice: „N.D."-nije detektovan; M-odmašćeno sirovo kozije mleko; TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); TME-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog različitim koncentracijama ekstrakta semenke, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,2mg/mL (TME1); 0,4mg/mL (TME2); 0,6mg/mL (TME3). Napomena: rastvori uzorka su dobijeni rekonstitucijom odgovarajuće mase praha u 100ml mili Q vode.

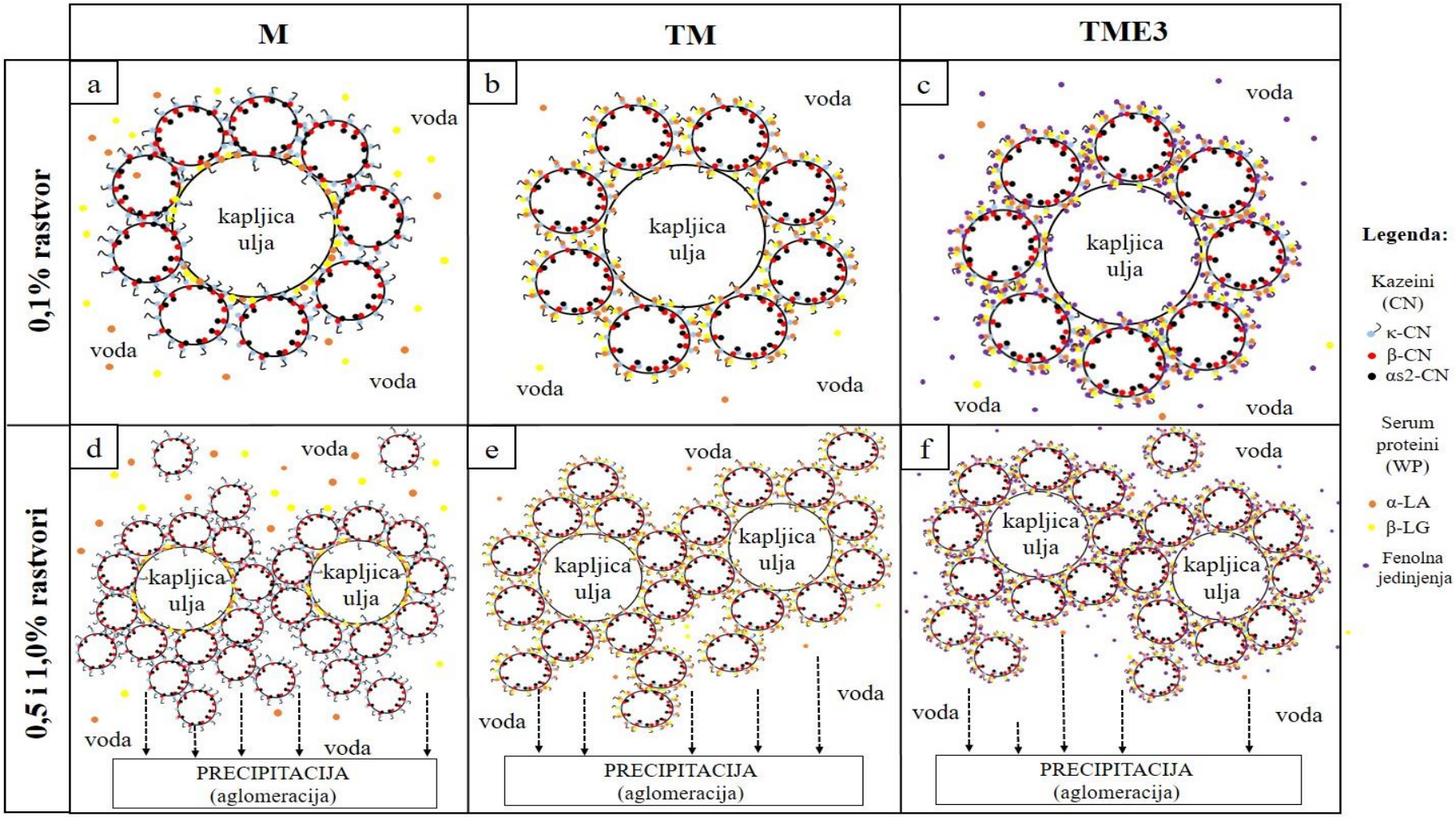
Dobijeni ESI rezultati za 0,1% M, TM i TME rastvore su prikazani na Slici 4.20b. Najbolja stabilnost emulzije je postignuta korišćenjem 0,1% TME3 rastvora (59,59±3,35 min). Dobra sposobnost TME3 uzorka u stabilizaciji emulzija je verovatno zbog sposobnosti TME3 kazeinskih micela da formiraju kompaktan, ujednačen i mrežasto struktuiran međufazni film koji okružuje kapljice ulja. Ove micele su bile pokrivene WP/CN kompleksima i fenolnim jedinjenjima koja su pokazala sposobnost da uspešno povežu kazeinske micele, što je prethodno pokazala SEM analiza. Osim toga, prisustvo slobodnih i micelarno vezanih fenolnih jedinjenja okrenutih prema vodenoj fazi je takođe doprinelo stabilizaciji emulzija zbog sternih odbijanja (Quan et al., 2019). Druge studije su takođe pokazale da polifenol-protein konjugati efikasnije stabilizuju ulje/voda emulzije nego sami proteini (Y. Chen et al., 2018; Yi et al., 2015). Takođe treba napomenuti da je 0,1% TM rastvor pokazao veću stabilnost emulzije, u poređenju sa 0,1% M rastvorom, što je istaklo značaj WP/CN kompleksa u stabilizaciji emulzija.

Na osnovu dobijenih rezultata za emulgujuća svojstva, literaturno dostupnih podataka i prethodno prijavljenih modela (Pešić, 2011), predloženi su različiti modeli distribucije kazeinskih micela M, TM i TME3 uzoraka, na površini uljane kapljice, u zavisnosti od koncentracije rastvora pri prirodnom pH mleka (pH 6,7) (Slika 4.21).

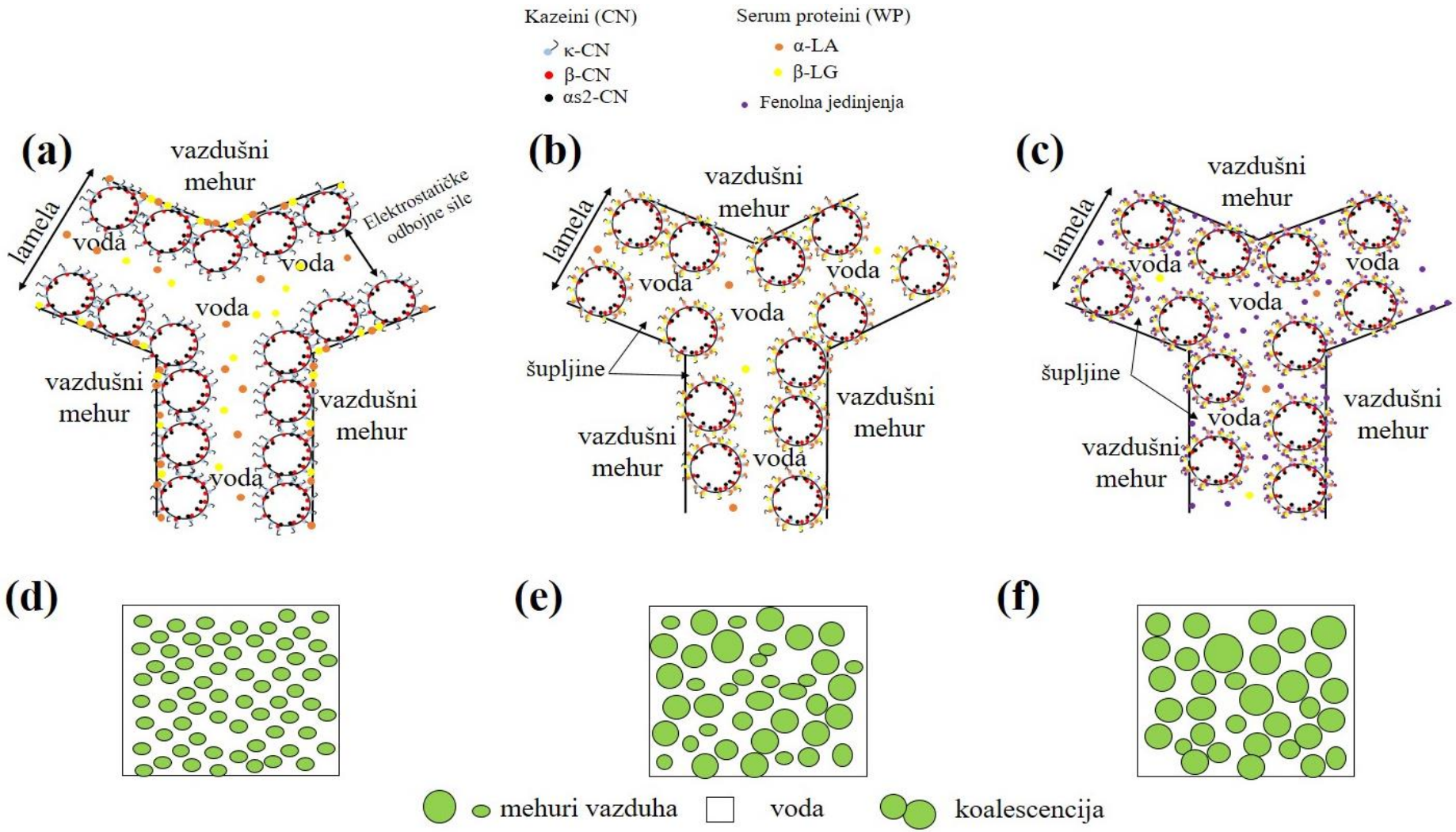
Peniva svojstva M, TM i TME rastvora su prikazana na Slici 4.20 (grafik c,d). Svi analizirani rastvori (0,1; 0,5; i 1%, m/V), su pokazali dobru sposobnost formiranja pene (Slika 4.20c). Vrednosti za kapacitet pene (KP), za 0,1% M i TM rastvore se nisu statistički značajno razlikovale. Međutim, dalje povećenje sadržaja uzorka u rastvoru (0,5 i 1%) je pokazalo da su M rastvori efikasniji u formiranju pene. Sa druge strane, M, TM i TME rastvori (osim 0,1 i 0,5% M rastvori) su pokazali odsustvo ili smanjenu sposobnost stabilizacije pene, što ukazuje da su analizirani uzorci pokazali loša peniva svojstva. Iako je mehanizam formiranja pene sličan formiranju emulzija, međufazni napon na međufaznoj površini vazduh/voda je veći od one na međufaznoj površini ulje/voda (Damodaran, 2005). Zbog toga je neophodana denaturacija proteina na međufaznoj površini vazduh/voda, što ukazuje na značaj molekularne fleksibilnosti proteina (Razumovsky & Damodaran, 1999). Kazeinske micele, termički tretirane ili ne, su slične globularnim proteinima, krute i nefleksibilne, i kao takve nisu u stanju da smanje međufazni napon na međufaznoj površini vazduh/voda. Određeno poboljšanje penivih svojstava za M uzorak se može objasniti prisustvom nativnih serum proteina, koji se mogu distribuirati na međufaznoj površini vazduh/voda između kazeinskih micela, dodatno stabilizujući međufazni proteinski film. Ovaj film pri sadržaju M od 0,1% i 0,5%, je pokazao dobar kapacitet formiranja i stabilnosti pene. Čini se da je kompleksna struktura kazeinske micele, kao što je u TM uzorcima, rezultirala lošijim penivim svojstvima, ali je zavisila od koncentracije fenolnih jedinjenja u uzorku. Iako su vrednosti za kapacitet pene bile visoke u analiziranim uzorcima, ove pene su bile rastresite sa velikim mehurima vazduha koji zauzimaju velike zapremine. Disproporcija vazdušnih mehura (Ostwald-ovo sazrevanje) se javlja u većini uzoraka veoma brzo, što dovodi do odsustva pene.

Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da kapacitet formiranja i stabilnosti pene M, TM i TME uzoraka zavisi od sadržaja uzorka u rastvoru, strukture proteina i prisustva fenolnih jedinjenja; što je u saglasnosti sa prijavljenim rezultatima drugih studija (Li et al., 2021; Prigent et al., 2009; Wu et al., 2007; Zhan et al., 2018). Slično ovim rezultatima, drugi istraživači su pokazali da povećanje koncentracije taninske kiseline (TA) u TA/natrijum kazeinat nanokompleksu (Zhan et al., 2018), ili povećanje sadržaja instant zelenog čaja u mešavini sa albuminom (iznad 0,5 w/v) (Wu et al., 2007), utiču na smanjenje sposobnosti formiranja i/ili stabilnosti pene. Prema ovim autorima, povećani sadržaj fenolnih jedinjenja intenzivnije blokiraju aktivna mesta na proteinima i smanjuju površinsku hidrofobnost, što rezultira smanjenjem penivih svojstava.

Na osnovu dobijenih rezultata za peniva svojstva, literaturno dostupnih podataka i prethodno prijavljenih modela (Pešić, 2011), predloženi su različiti modeli distribucije kazeinskih micela M, TM i TME3, na međufaznoj površini voda/vazduh (Plateau granici, međi)(Slika 4.22).



Slika 4.21. Šematski prikaz distribucije kazeinskih micela na površini uljane kapljice: (a) 0,1% M rastvor; (b) 0,1% TM rastvor; (c) 0,1% TME3 rastvor; (d) 0,5 i 1% M rastvori; (e) 0,5 i 1% TM rastvori; (f) 0,5 i 1% TME3 rastvori; pri pH 6,7. Skraćenice: M-odmašćeno sirovo kozije mleko; TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); TME-funkcionalni aditiv na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog ekstraktom semenke, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/ekstrakt pre sprej sušenja 0,6mg/mL (TME3).

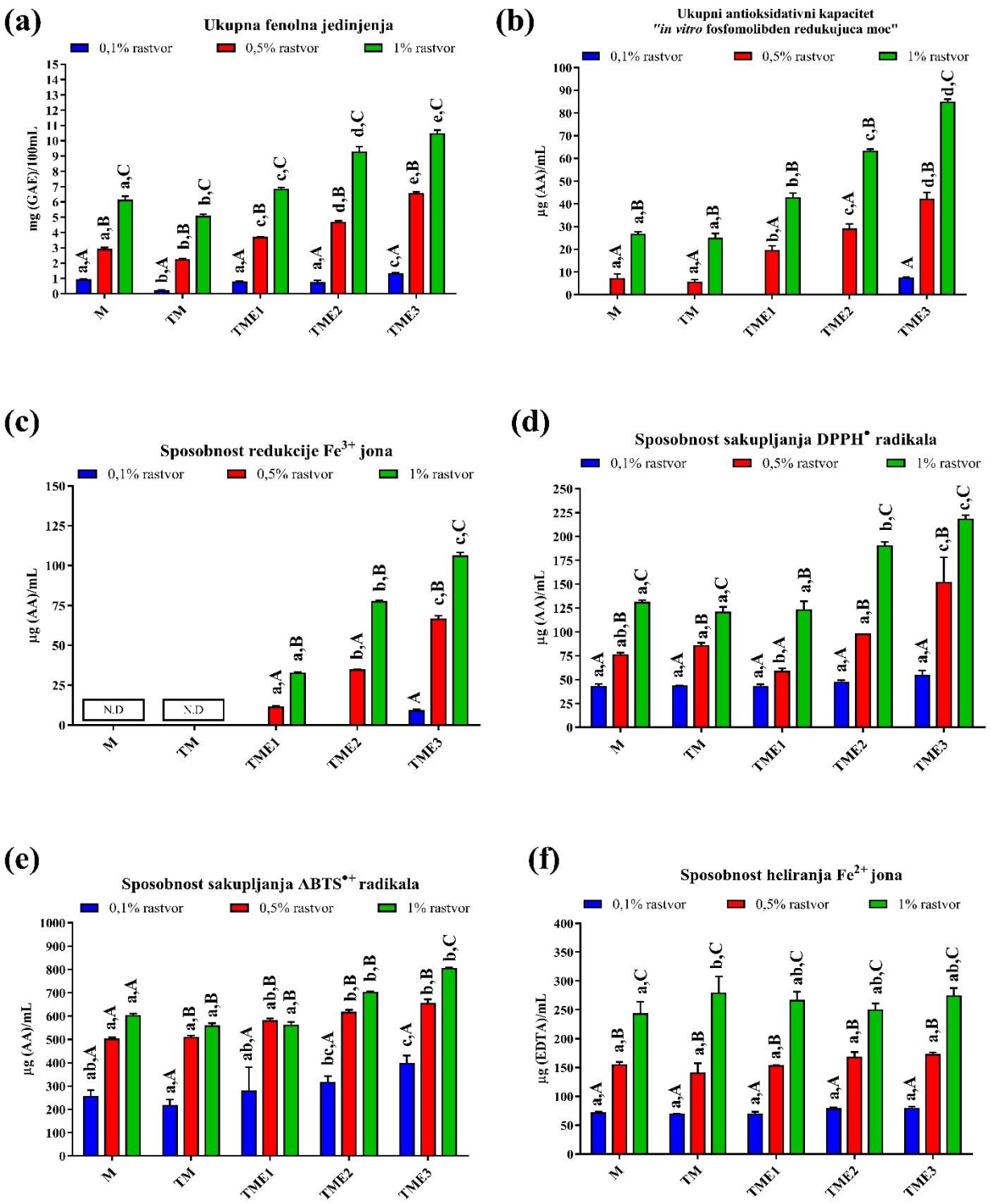


Slika 4.22. Šematski prikaz distribucije kazeinskih micela na međufaznoj površini vazduh/voda: (a) M; (b) TM; i (c) TME3; pri pH 6,7. Skraćenice: M-odmašćeno sirovo kozije mleko; TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); TME-funkcionalni aditiv na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog ekstraktom semenke, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/ekstrakt pre sprej sušenja 0,6mg/mL (TME3).

4.3.2.10. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativna svojstva TME funkcionalnih aditiva

U slučaju kompleksnih matriksa hrane, koji sadrže više potencijalnih antioksidanata, poželjno je koristiti kombinaciju nekoliko *in vitro* skrining testova, radi bolje interpretacije i razumevanja antioksidativnog potencijala ispitivanih uzorka hrane (Granato et al., 2018; Power et al., 2013). Stoga, u ovoj sekciji je korišćeno pet *in vitro* antioksidativnih testova (TAC, $ABTS^{\bullet+}$, $DPPH^{\bullet}$, FRP, i FCC), a određen je i sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja kako bi se procenio antioksidativni potencijal M, TM i TME pripremljenih 0,1%, 0,5% i 1% rastvora (Slika 4.23a-f).

Rezultati određivanja TPC su pokazali da uzorci mleka, iako nemaju fenolna jedinjenja, prema UHPLC-DAD MS/MS analizi, pokazuju vrednosti za ovaj parametar. U slučaju višekomponentnih uzoraka, Folin-Ciocalte-ov reagens, koji se koristi za određivanje TPC, se može redukovati brojnim nefenolnim jedinjenjima, koja doprinose vrednostima za ovaj parametar (Gülçin, 2012). Stoga se može reći da ova metoda meri ukupni redukcioni kapacitet uzoraka (Huang et al., 2005). Dakle, iako kozije mleko nije imalo fenolna jedinjenja, dobijene TPC vrednosti za ove uzorke (M i TM) mogu se opravdati prisustvom brojnih interferirajućih jedinjenja, kao što su proteini, aminokiseline i laktoza, koje reaguju sa Folin-Ciocalteu-vim reagensom (Prior et al., 2005). Sa povećanjem koncentracije M i TM rastvora, redukcioni kapacitet se značajno povećao: 0,95; 2,94; i 6,15 mg(GAE)/100mL M uzorka ili 0,23; 2,26; i 5,09 mg(GAE)/100mL TM uzorka, redom za 0,1%, 0,5% i 1% rastvor (Slika 4.23a). Značajno niže TPC vrednosti za TM uzorke, u poređenju sa M uzorcima mogu biti posledica strukturne modifikacije proteina posle termičkog tretmana, što je očigledno uticalo na smanjenje broja redukujućih grupa, koje su verovatno bile uključene u formiranje HMW kompleksa, koji su prethodno primećeni SDS-NR-PAGE i Native-PAGE analizom. Uticaj odmašćenog i termički tretiranog kozijeg mleka na TPC vrednosti je pokazan i u drugim studijama (Komes et al., 2017; Kostić et al., 2021). Uzorci TM obogaćeni sa ekstraktom semenki grožđa (TME) su imali značajno veši ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja u poređenju sa TM uzorcima. Ovome su očigledno najviše doprinela fenolna jedinjenja, uglavnom fenolne kiseline, flavan-3-oli i procijanidini iz ekstrakta semenki grožđa, koja su prethodno određena UHPLC MS/MS analizom. TPC vrednosti za TME uzorke su pokazale značajan trend porasta sa porastom TME koncentracije rastvora (0,1; 0,5; i 1%) i sa povećanjem količine ekstrakta semenki grožđa u TME formulacijama. Vrednosti za sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja TME uzoraka (TME1, TME2, i TME3), su u poređenju sa TM uzorkom bile veće 3,53; 3,32; i 5,85 puta za 0,1% rastvore; 1,64; 2,07; i 2,90 puta za 0,5% rastvore; i 1,35; 1,82; i 2,06 puta za 1% rastvore. Kao što se može videti (Slika 4.23a), najmanji porast TPC vrednosti je bio za 1% TME uzorke, što je možda zbog intenzivnijih polifenol-protein interakcija koje su ometale njihov redukujući kapacitet (Jakobek, 2015). TPC vrednosti dobijene u ovoj sekciji su bile niže od nekih prethodno prijavljenih TPC vrednosti za napitke od kozijeg mleka obogaćene ekstraktima lekovitih biljaka (Komes et al., 2017), sprej osušeno kozije mleko obogaćeno polenom (Kostić et al., 2021), mleko obogaćeno polifenolnim ekstraktima grožđa (Kılıç Bayraktar et al., 2019), fermentisana odmašćena mleka obogaćena sa ekstraktima komine grožđa (de Souza de Azevedo et al., 2018), ili za model napitak mleko/grožđani sok (He et al., 2016). Ove razlike mogu biti posledica primenjene metodologije (većina ovih studija je određivala TPC nakon metanolne ekstrakcije fenolnih jedinjenja, dok se u ovom radu koriste vodeni rastvori), i koncentracije fenolnih jedinjenja dodatih u analizirane proizvode.



Slika 4.23. Ukupna fenolna jedinjenja (a) i antioksidativna svojstva funkcionalnih aditiva na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog ekstraktom semenke (b-f): Ukupni antioksidativni kapacitet "*in vitro* fosfomolibden redukujuća moć" (b); Sposobnost redukcije Fe^{3+} jona (redukujuća moć) (c); Sposobnost sakupljanja $DPPH^{\bullet}$ radikala (d); Sposobnost sakupljanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala (e); Sposobnost heliranja Fe^{2+} jona (f). Podaci su prikazani kao srednje vrednosti+standardna devijacija (n=3). Mala slova označavaju poređenje između uzoraka koji imaju isti sadržaj praha u rastvoru, a velika slova označavaju poređenja u okviru svakog uzorka posebno. Različita slova označavaju statistički značajne razlike prema *Tukey's* testu ($p<0,05$). Skraćenice: ,,N.D."-nije detektovan; M-odmašćeno sirovo kozije mleko; TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); TME-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog različitim koncentracijama ekstrakta semenke, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,2mg/mL (TME1); 0,4mg/mL (TME2); 0,6mg/mL (TME3). Napomena: rastvori uzorka su pripremljeni rekonstitucijom odgovarajuće mase praha u 100ml mili Q vode.

Ukupni antioksidativni kapacitet (TAC) je određen na osnovu sposobnosti M, TM i TME rastvora (0,1; 0,5; i 1%) da redukuju molibden jone od Mo (IV) do Mo (II), u kiseloj sredini (Slika 4.23b). TAC 0,1% rastvora je zabeležen samo za TME3 uzorak, verovatno zbog dovoljne količine fenolnih jedinjenja koja su sposobna da redukuju jone metala. Daljim povećanjem M, TM i TME sadržaja u rastvorima (0,5 i 1%), pokazana je Mo(VI) redukujuća sposobnost. Međutim, TAC vrednosti su bile značajno više za TME uzorke u poređenju sa M i TM uzorcima. TAC vrednostima M i TM uzoraka su najviše doprineli hidrolizom oslobođeni peptidi i aminokiseline, bez statistički značajne razlike (p<0,05) za 0,5% i 1% rastvore. Nehir El et al. (2015), su prethodno odredili TAC za uzorke kozijeg mleka i kefira, i potvrdili njihovu sposobnost u redukciji molibden jona. TAC vrednosti za 0,5% i 1% TME rastvore su se značajno povećavale sa povećanjem sadržaja fenolnih jedinjenja u TME1, TME2 i TME3 uzorcima: 19,71; 29,16; 42,26 µg (AA)/mL (0,5% rastvor) i 42,98; 63,44; 85,07 µg (AA)/mL (1% rastvor). TAC vrednostima TME uzoraka su verovatno najviše doprinela slobodna fenolna jedinjenja, kao i fenolna jedinjenja, peptidi i aminokiseline oslobođeni nakon hidrolize uzoraka.

Svi M i TM rastvori (0,1; 0,5; i 1%) nisu imali redukujuću moć, što ukazuje na lošu sposobnost proteina da redukuju jone gvožđa (Slika 4.23c). Niske vrednosti za redukujuću moć sirovog, odmašćenog i termički tretiranog kozijeg mleka prethodno su sugerisali drugi autori (Abd El-Fattah et al., 2020; Kılıç Bayraktar et al., 2019). Dodatak ekstrakta semenki grožđa u termički tretirano mleko je doprineo povećanju redukujuće moći TME uzoraka. Međutim, vrednosti za redukujuću moć 0,1% rastvora je određena samo za TME3 uzorak, što je u saglasnosti sa TAC testom. Dalje povećanje TME sadržaja u rastvorima (0,5% i 1%), kao i povećanje sadržaja fenolnih jedinjenja u TME uzorcima, značajno je uticalo na povećanje dobijenih vrednosti za redukujuću moć. Sposobnosti TME uzoraka da redukuju jone gvožđa su verovatno najviše doprinela slobodna fenolna jedinjenja, poput galne kiseline i katehina. Slično ovim rezultatima, Kılıç Bayraktar et al. (2019) su pokazali značajan uticaj ekstrakta čaja i grožđa na redukujuću moć napitaka na bazi mleka, prvenstveno zbog prisustva njihovih fenolnih jedinjenja.

Određivanje sposobnosti sakupljanja $DPPH^{\bullet}$ i $ABTS^{\bullet+}$ radikala je zasnovana na sposobnosti M, TM i TME uzoraka da doniraju jone vodonika i neutrališu slobodne radikale. Svi uzorci za sve pripremljene rastvore (0,1%, 0,5%, i 1%) su posedovali sposobnost da neutrališu $DPPH^{\bullet}$ i $ABTS^{\bullet+}$ radikale (Slika 4.23d,e). Međutim, primećena je manja sposobnost sakupljanja $DPPH^{\bullet}$ radikala nego $ABTS^{\bullet+}$ radikala. Ovo je verovatno zbog hidrofobne prirode $DPPH^{\bullet}$ radikala i njegove sposobnosti da reaguje sa lipofilnim molekulima (Komes et al., 2017; Serpen et al., 2012). Sposobnost neutralisanja $DPPH^{\bullet}$ radikala 0,1% rastvora se nije značajno razlikovala među uzorcima (M, TM i TME), dok se sposobnost neutralisanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala povećala sa povećanjem sadržaja fenolnih jedinjenja u TME uzorcima. Dalje povećanje koncentracije uzoraka u rastvorima je pokazalo zanimljive rezultate, odnosno sposobnost neutralisanja $DPPH^{\bullet}$ radikala se povećavala sa porastom sadržaja uzorka u rastvoru (0,5% i 1%), dok se sposobnost neutralisanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala nije značajno menjala za oba rastvora, osim u slučaju TME3 rastvora. Dobra soposobnost neutralisanja $DPPH^{\bullet}$ i $ABTS^{\bullet+}$ radikala u slučaju M i TM uzoraka je verovatno zbog prisustva proteina i aminokiselinskih ostataka koji su u stanju da doniraju jone vodonika (Power et al., 2013). Prethodno je pokazano da među pojedinačnim proteinima mleka, najveću sposobnost neutralisanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala ima α-kazein, a zatim β-kazein i β-LG (Kim et al., 2019). Štaviše, termički tretman mleka nije uticao na aktivnost neutralisanja $DPPH^{\bullet}$ i $ABTS^{\bullet+}$ radikala, u poređenju sa sirovim mlekom, što je u saglasnosti sa $DPPH^{\bullet}$ rezultatima koje su dobili Abd El-Fattah et al. (2020). Zanimljivo da je sposobnost neutralisanja $DPPH^{\bullet}$ radukala 0,5% TME1 uzorka niža u poređenju sa M i TM uzorcima, što je verovatno posledica fenolna jedinjenja-protein interakcija, koje smanjuju potencijal fenolnih jedinjenja i proteinskih ostataka da doniraju jone vodonika. Prethodno je pokazano da kazeini i proteini surutke imaju sposobnost da redukuju antioksidativnu aktivnost fenolnih jedinjenja, upravo zbog interakcija njihovih međusobnih interakcija (Gallo et al., 2013; T. Li et al., 2020). Međutim, TME2 i TME3 uzorci su pokazali povećanje sposobnosti sakupljanja $DPPH^{\bullet}$ i $ABTS^{\bullet+}$ radikala, čemu je doprineo povećani sadržaj fenolnih jedinjenja u ovim uzorcima. Zbog metodoloških razlika i načina na koji su $DPPH^{\bullet}$ i $ABTS^{\bullet+}$ rezultati izraženi, poređenje sa drugim studijama je teško izvodljivo.

Međutim, predhodne studije su takođe pokazale da se sposobnost sakupljanja $ABTS^{\bullet+}$ i $DPPH^{\bullet}$ radikala napitaka na bazi kozijeg mleka značajno povećava sa dodatkom polifenolima bogatog ekstrakta iz različitih biljaka (Komes et al., 2017) ili polena (Kostić et al., 2021).

Svi uzorci su pokazali dobra helirajuća svojstva, kao što se može videti na Slici 4.23f, a što se može povezati sa visokim sadržajem proteina (Kostić et al., 2021). Sposobnost heliranja 0,1% i 0,5% rastvora se nije značajno razlikovala ($p<0,05$) između M, TM i TME uzoraka. Međutim, vrednosti za helirajuća svojstva 1% TM rastvora su bila značajno viša nego vrednosti za helirajuća svojstva 1% M rastvora, što može biti zbog formiranja toplotom indukovanih WP/CN kompleksa, koji su verovatno poboljšali sposobnost heliranja TM uzorka. Dodatak različitih količina ekstrakta semenki grožđa u kozije mleko nije statistički značajno promenio helirajuća svojstva TME uzoraka za sva tri različita sadržaja uzoraka u rastvoru (0,1%, 0,5%, i 1%).

4.3.3. Nefermentisani funkcionalni aditivi na bazi proteina kozijeg mleka obogaćeni prahom inulin/ekstrakt semenke-TMIE funkcionalni aditivi

4.3.3.1. UHPLC-DAD MS/MS analiza fenolnih ekstrakata TMIE i IE funkcionalnih aditiva

UHPLC-DAD MS/MS fenolni profili metanolnih ekstrakata sprej osušenih uzorka mleka, semenke, IE i TMIE funkcionalnih aditiva su prikazani u Tabeli 4.22 (podaci za kvantifikaciju, Tabela P5). Dobijen fenolni profil za SOES uzorak se nije statistički značajno razlikovao od SOES profila prikazanog u tabeli 4.19. U polaznom rekonstituisanom sprej osušenom ekstraktu semenke Prokupca dominantno su detektovane fenolne kiseline (28,1%), flavan-3-oli (64,2%) i flavonoli (7,3%), dok su ostala fenolna jedinjenja detektovana u tragovima. Među pojedinačnim fenolnim jedinjenjima, najzastupljeniji je bio katehin, zatim galna kiselina i flavonol aglikoni (kvercetin, izoramnetin i kampferol), što je u saglasnosti sa prethodnom karakterizacijom ekstrakta semenke (poglavlje 4.3.2.1; Tabela 4.19). U metanolnim ekstraktima M, TM i TMI prahova nisu detektovana fenolna jedinjenja, što je i očekivano jer su ovo proteinski i protein/dijetno vlakno matriksi. U metanolnom ekstraktu sprej osušenog IE praha su kvantifikovana ista fenolna jedinjenja (osim protokatehinske i siringinske kiseline), kao i u rekonstituisanom SOES, samo u značajno manjim količinama, što potvrđuje potencijalno dobra svojstva inulina kao nosača fenolnih jedinjenja. Fenolna jedinjenja se nakon kontakta sa inulinom zadržavaju na površini ovog vlakna (slika 4.31e), i najčešće formiraju vodonične veze sa njihovim hidroksilnim grupama (Flores-Mancha et al., 2020; Jakobek & Matić, 2019). Sadržaj ukupnih kvantifikovanih fenolnih jedinjenja u TMIE prahovima se povećavao sa povećanjem količine dodatog IE praha u TMIE formulacijama, od 9,78 (TMIE1) do 26,97 (TMIE3) mg/kg SM . Isti trend rasta su pokazala i dominantno detektovana pojedinačna fenolna jedinjenja, galna kiselina (2,86; 5,36; i 9,44 mg/kg SM) i katehin (4,64; 9,78; i 12,97 mg/kg SM). Osim galne kiseline, kofeinska kiselina je potvrđena u metanolnim ekstraktima IE i TMIE prahova, međutim njen sadržaj se nije značajno razlikovao u svim uzorcima. Katehin galat je takođe kvantifikovan u svim metanolnim ekstraktima funkcionalnih aditiva sa izraženim trendom rasta sa povećanjem sadržaja IE praha u TMIE formulacijama. Ostali flavan-3-oli nisu detektovani. Glikozidi kvercetina (kvercetin-3-glukozid i rutin) su detektovani u svim TMIE uzorcima, dok su izoramnetin-3-*O*-glukozid i kampferol potvrđeni u TMIE2 i TMIE3 uzorcima, ali se njihov sadržaj nije statistički značajno razlikovao u ovim formulacijama. Flavonol aglikoni (kvercetin i izoramnetin) su detektovani u metanolnom ekstraktu semenke i IE uzorka, ali nisu detektovani u metanolnim ekstraktima TMIE prahova. Vodonične veze i Van der Walsove interakcije uspostavljene između ovih flavonol aglikona i inulina, su verovatno narušene tokom ekstrakcije sa zakišeljenim metanolom, što je doprinelo njihovoj kvantifikaciji u metanolnim ekstraktima IE praha. Sa druge strane, odsustvo ovih flavonol aglikona u metanolnim ekstraktima TMIE prahova, može biti zbog njihove interakcija sa hidrofobnim regionima kazeinske micele (Rahimi Yazdi & Corredig, 2012), koje nisu narušene ekstrakcijom sa zakišeljenim metanolom. Nakon mešanja IE praha i TM mleka, deo fenolnih jedinjenja se oslobađa sa površine inulina i reaguje sa proteinima mleka, koji se nakon sprej sušenja takođe distribuiraju po površini inulina (Slika 4.31c,d).

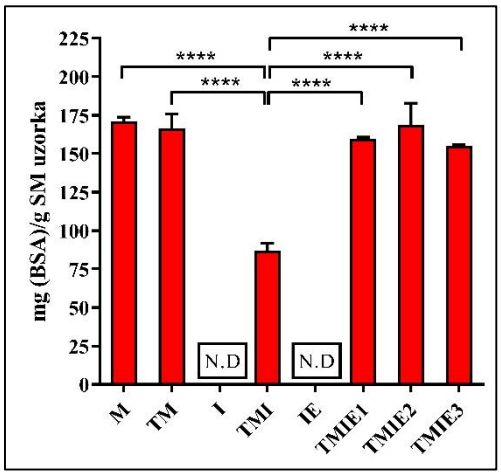
Tabela 4.22. Sadržaj polifenola i fenolnih kiselina (mg/kg SM), u sprej osušenim funkcionalnim aditivima na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog sprej osušenim inulin/ekstrakt prahom

Uzorci Jedinjenja (mg/kg SM uz.)	**M**	**TM**	**TMI**	**SOES**	**IE**	**TMIE1**	**TMIE2**	**TMIE3**
Fenolne kiseline								
Galna kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	222,74±2,52^{a}	61,50±2,17^{b}	2,86±0,09^{c}	5,36±0,32^{d}	9,44±0,29^{e}
Protokatehinska kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	2,44±0,10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Siringinska kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	1,70±0,05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kofeinska kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	2,23±0,18^{a}	0,99±0,06^{b}	1,19±0,15^{bc}	1,17±0,12^{bc}	1,19±0,10^{c}
Flavan-3-oli i njihovi derivati								
Katehin	n.d.	n.d.	n.d.	515,43±11,87^{a}	78,06±2,18^{b}	4,64±0,49^{c}	9,78±0,44^{d}	12,97±0,62^{e}
Katehin galat	n.d.	n.d.	n.d.	8,30±0,07^{a}	5,32±0,29^{b}	0,44±0,03^{c}	0,63±0,04^{d}	0,83±0,03^{e}
Galokatehin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Epigalokatehin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Epigalokatehin galat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Flavanol aglikoni i glikozidi								
Kvercetin	n.d.	n.d.	n.d.	32,70±2,15^{a}	8,06±0,73^{b}	n.d.	n.d.	n.d.
Kvercetin-3-glukozid	n.d.	n.d.	n.d.	1,48±0,04^{a}	1,59±0,15^{a}	0,29±0,04^{b}	0,43±0,03^{c}	0,57±0,06^{d}
Rutin	n.d.	n.d.	n.d.	0,28±0,01^{a}	0,48±0,02^{b}	0,35±0,03^{c}	0,36±0,02^{c}	0,36±0,04^{c}
Izoramnetin	n.d.	n.d.	n.d.	17,29±0,84^{a}	4,37±0,24^{b}	n.d.	n.d.	n.d.
Izoramnetin-3-*O*-glukozid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,02±0,08a	n.d.	0,18±0,02^{b}	0,14±0,02^{b}
Kampferol	n.d.	n.d.	n.d.	7,95±0,39^{a}	3,30±0,08^{b}	n.d.	1,20±0,09^{c}	1,33±0,09^{c}
Ostali detektovani polifenoli								
Apigenin-7-glukozid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,18±0,03	n.d.	n.d.	n.d.
Naringenin	n.d.	n.d.	n.d.	0,76±0,02^{a}	0,55±0,03^{b}	n.d.	n.d.	0,14±0,02^{c}
Eskuletin	n.d.	n.d.	n.d.	2,86±0,27^{a}	1,02±0,03^{b}	n.d.	n.d.	n.d.
Σ Σ	**/**	**/**	**/**	**816,16**	**166,45**	**9,78**	**19,11**	**26,97**

Vrednosti su dobijeni iz tri nezavisna merenja (n=3) i prikazane kao srednje vrednosti ±standardna devijacija. Vrednosti koje su označene sa istim slovom u istom redu nisu statistički značajno različite prema *t*-testu, (p<0,05). **Napomena:** Sprej osušeni prahovi su ekstrahovani 80%metanolo+0,1%HCl, iz kojih je dalje vršena kvantifkacija fenolnih jedinjenja (UHPLC-DAD MS/MS), čije su vrednosti prikazane u Tabeli. Skraćenice: „n.d.“-nije detektovano; SOES-sprej osušen ekstrakt semenke, koji je rekostituisan u 80%metanol+0,1%HCl; M-odmašćeno sirovo kozije mleko; TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); TMI- odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin; IE-sprej osušeni prah inulin/ekstrakt; TMIE-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom različitih količina sprej osušenog inulin/ekstrakt praha, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/inulin/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,1mg/mL (TMIE1); 0,2mg/mL (TMIE2); 0,3mg/mL (TMIE3).

4.3.3.2. Sadržaj proteina u TMIE funkcionalnim aditivima

Rezultati za sadržaj proteina u TMIE, M i TM uzorcima se statistički nisu značajno razlikovali (Slika 4.24). Ovo znači da dodatak različitih količina IE praha u termički tretirano mleko doprinosi funkcionalnosti dobijenih TMIE aditiva, a da pritom nema značajan uticaj na sadržaj proteina; za razliku od TME prahova kod kojih se sa povećanjem sadržaja fenolnih jedinjenja smanjuje sadržaj proteina. Međutim, ovi funkcionalni TMIE aditivi su imali značajno niži sadržaj proteina u poređenju sa vrednostima koje su prijavili Kamizake et al. (2003) za sprej osušene uzorke odmašćenog i celog kravljeg mleka. U uzorcima I i IE sadržaj proteina nije detektovan, što je očekivano jer ovo nisu proteinski matriksi. TMI uzorak je imao značajno niži sadržaj proteina, u poređenju sa TMIE uzorcima što se može pripisati većem sadržaju inulina u ovom uzorku nego što je to slučaj kod TMIE (podpoglavlje 3.4.2). Međutim, smanjenje sadržaja proteina u TMI uzorcima je oko 50% u odnosu na ostale uzorke što ukazuje da inulin ometa spektrofotometrijsko određivanje proteina Bradfordovom metodom. Naime, ova metode se zasniva na interakciji kiselog rastvora Comassie Brilliant Blue boje i proteina hidrofobnim i elektrostatičkim interakcijama (Georgiou et al., 2008). U TMI uzorcima dolazi najverovatnije do hidrofobnih interakcija između inulina i proteina mleka, pre svega kazeina i β-LG koji se nalaze na površini kazeinske micele u vidu WP/CN kompleksa i hidrofobnih regiona molekula inulina (Schaller-Povolny & Smith, 2002). Ove interakcije ometaju vezivanje boje, što rezultuje nižim vrednostima absorbance na 595nm. Pored navedenog, u TMIE uzorcima ne treba zanemariti sinergistički efekat inulina i polifenolnih jedinjanja koja se takođe hidrofobnim interkacijama vezuju za proteine mleka, i potencijalno mogu doprineti prividno višim ili nižim vrednostima za sadržaj ukupnih proteina. Prisutvo interakcija između proteina mleka i inulina može se uočiti na elekroforegramima i SEM slikama TMI i TMIE3 uzoraka (Slika 4.31c,d).



Slika 4.24. Sadržaj ukupnih proteina u funkcionalnim aditivima na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom različitih količina sprej osušenog inulin/ekstrakt praha. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti+standardna devijacija (n=3). *0,01<*p*<0,05; **0,001<*p*<0,01; ***0,001<*p*<0,0001; ****p<0,0001; navedeni simboli pokazuje nivoe statistički značajne razlike između uzoraka. Za *post hoc* ispitivanje statističke značajnosti korišćen je *Tukey's* test (*p<0,05*). Skraćenice: M-odmašćeno sirovo kozije mleko; TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); I-inulin; IE-sprej osušeni prah inulin/ekstrakt; TMI- odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin; TMIE-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom različitih količina sprej osušenog inulin/ekstrakt praha, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/inulin/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,1mg/mL (TMIE1); 0,2mg/mL(TMIE2); 0,3mg/mL (TMIE3).

4.3.3.3. Elektroforetska analiza TMIE funkcionalnih aditiva

Proteinski profili funkcionalnih aditiva na bazi kozijeg mleka sa dodatkom inulina/ekstrakt praha (TMIE) su analizirani korišćenjem različitih elektroforetskih tehnika: (1) SDS-PAGE (redukujući i neredukujući uslovi) i (2) Native-PAGE (Slika 4.25a-c). Na SDS-R-PAGE gelu su jasno uočljive trake koje odgovaraju kazeinima i serum proteinima kozijeg mleka, za sve analizirane funkcionalne aditive na bazi proteina kozijeg mleka (Slika 4.25a, trake 1-6). Dodatak inulina (I) i inulin/ekstrakt praha (IE) nisu uticali na izmenu proteinskog sastava i nisu doveli do pojave nekarakterističnih traka u TMI i TMIE uzorcima (Slika 4.25a, trake 3-6). Međutim, kod ovih uzoraka je denzintometrijom potvrđeno smanjenje intenziteta glavnih kazeinskih traka u poređenju sa istim trakama u TM uzorku (Tabela 4.23), što se objašnjava prisustvom inulina ili inulina/fenolnih jedinjenja u uzorcima. Smanjenje intenziteta traka je najviše primetno za uzorak TMI (Slika 4.25a, traka 3), što se može pripisati značajno većem sadržaju inulina u ovom uzorku, nego u TMIE uzorcima, pa samim tim i intenzivnijim interakcijama inulina sa proteinima mleka, odnosno WP/CN kompleksima. Ovo je u saglasnosti sa spektrofotometrijskim rezultatima za sadržaj ukupnih proteina ovih uzoraka.

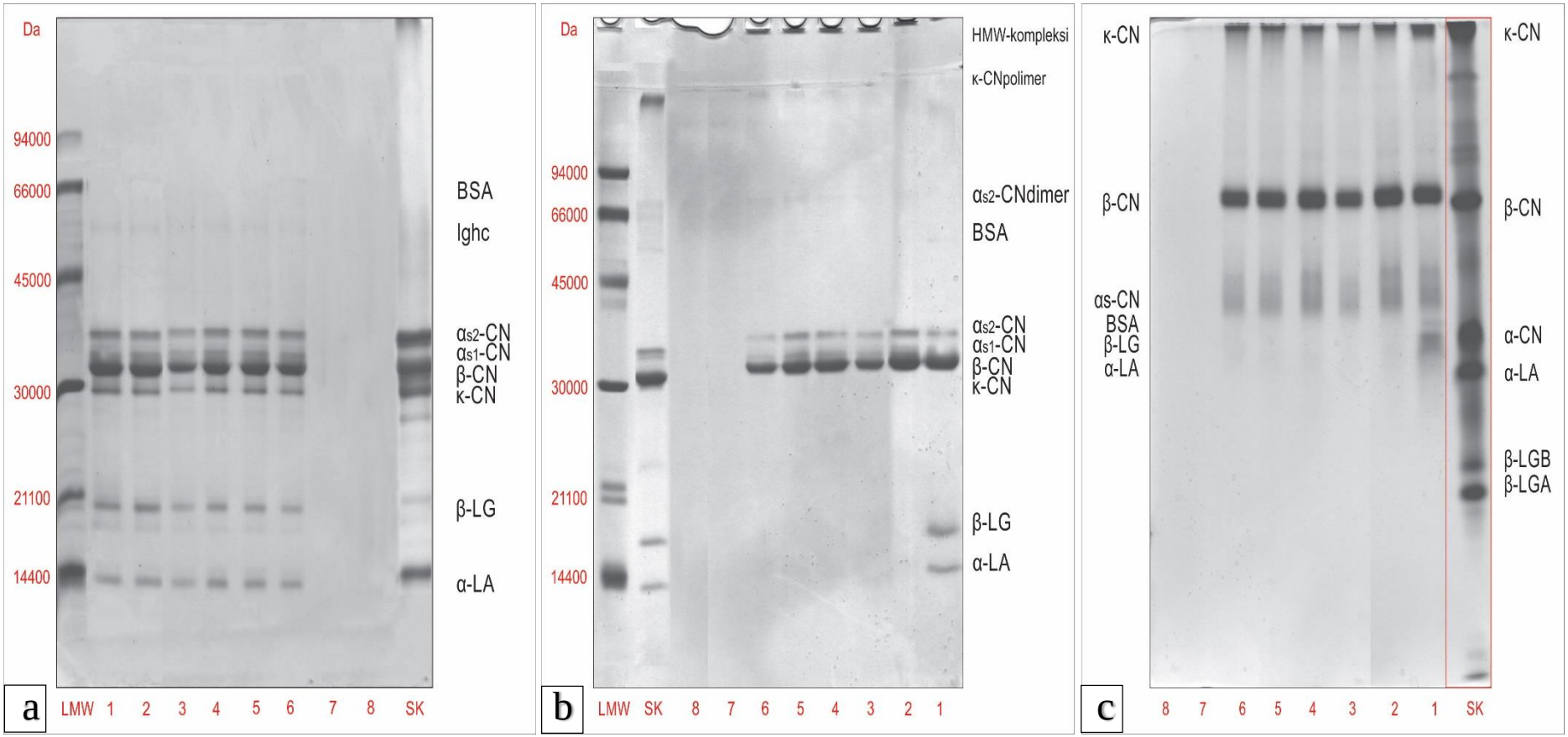
Na SDS-NR-PAGE (Slika 4.25b) i Native-PAGE (Slika 4.25c) gelovima nisu primećene promene u pokretljivosti karakterističnih proteinskih traka ili pojava nekarakterističnih traka. Međutim, primećuje se smanjenje intenziteta traka koje odgovaraju HMW (WP/CN) kompleksima, αs-CN i β-CN, u svim uzorcima sa inulinom i inuli/ekstrakt prahom (Slika 4.25b,c, trake 3-6). Intenzitet traka se smanjuje sa povećanjem količine IE praha u TMIE formulacijama (Tabela 4.23), dok je očekivano najveće smanjenje intenziteta traka kod TMI uzorka koji sadrži samo inulin kao dodatak, što prati isti trend kao kod SDS-R-PAGE analize. Smanjenje intenziteta traka u TMI uzorku (Slika 4.25b,c, traka 3) je preko 20% u odnosu na iste trake u TM uzorku (Slika 4.25b,c, traka 2), bez obzira o kojoj se elektroforetskoj tehnici radi (Tabela 4.23). Ovo ukazuje da prisutni inulin ometa vezivanje Commasie Brillliant Blue (CBB) boje prilikom detekcije proteina, kao i prilikom određivanja sadržaja ukupnih proteina mleka Bradfordovom metodom u istim funkcionalnim aditivima. Takođe, ne sme se zanemariti sinergističko delovanje fenolnih jedinjenja i inulina u ometanju vezivanja CBB boje, što može uticati na smanjenje intenziteta proteinskih traka kod TMIE uzoraka. Primenom elektroforetske analize, Schaller-Povolny and Smith (2002) su ukazali na postojanje hidrofobnih interakcija kazeina i β-LG sa inulinom, dok su u okviru ove disertacije na modelima TME funkcionalnih aditiva

potvrđene protein-fenolna jedinjenja interakcije. Kao kontrole su takođe u bunariće gelova nanošeni uzorci čistog inulina (Slika 4.25a-c, traka 8) i IE praha (Slika 4.25a-c, traka 7), ali proteinske trake nisu registrovane jer se radi o neproteinskim matriksima.

Tabela 4.23. Promene (%) sadržaja kazeina i HMW kompleksa u TMI i TMIE prahovima u odnosu na iste trake u TM uzorku, određene različitim elektroforetskim tehnikama.

Uzorci	**TM**	**TMI**	**TMIE1**	**TMIE2**	**TMIE3**
			SDS-R-PAGE		
αs2-CN	100^{a}	$77,1\pm2,2^{c}$	$97,3\pm1,8^{a}$	$86,5\pm2,6^{b}$	$79,9\pm2,6^{c}$
β-CN	100^{a}	$75,7\pm4,4^{d}$	$90,6\pm2,5^{b}$	$84,8\pm1,5^{c}$	$79,1\pm1,8^{d}$
κ-CN	100^{a}	$77,9\pm5,1^{c}$	$93,0\pm0,4^{b}$	$79,5\pm4,5^{c}$	$71,2\pm1,4^{c}$
			SDS-NR-PAGE		
HMW kompleksi	100^{a}	$75,4\pm4,7^{bcd}$	$81,6\pm0,2^{b}$	$75,7\pm0,5^{c}$	$72,0\pm1,5^{d}$
αs2-CN	100^{a}	$74,4\pm1,2^{d}$	$86,5\pm0,3^{b}$	$81,1\pm1,6^{c}$	$63,5\pm3,0^{e}$
β-CN	100^{a}	$81,1\pm0,03^{d}$	$93,1\pm1,2^{b}$	$86,2\pm0,01^{c}$	$60,2\pm0,02^{e}$
			Native-PAGE		
WPs/CN kompleksi	100^{a}	$72,4\pm6,2^{b}$	$91,7\pm7,0^{ac}$	$84,5\pm7,8^{bc}$	$82,7\pm6,7^{bc}$
β-CN	100^{a}	$78,1\pm1,5^{c}$	$92,2\pm5,2^{ab}$	$88,9\pm2,8^{b}$	$82,6\pm2,6^{c}$

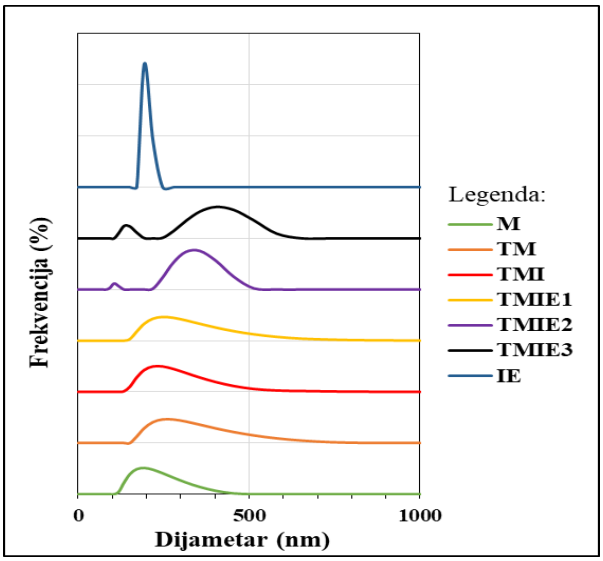
Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti ±standardna devijacija (n=3). Vrednosti koje su označene sa istim slovom u istom redu nisu statistički značajno različite prema *t*-testu, ($p<0,05$). Skraćenice: M-odmašćeno sirovo kozije mleko; TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); I-inulin; IE-sprej osušeni prah inulin/ekstrakt; TMI- odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin; TMIE-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom različitih količina sprej osušenog inulin/ekstrakt praha, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/inulin/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,1mg/mL (TMIE1); 0,2mg/mL (TMIE2); 0,3mg/mL (TMIE3).



Slika 4.25. Elektroforegrami proteina uzoraka funkcionalnih aditiva na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog sprej osušenim inulin/esktrakt prahom, analizirani: (a) SDS-R-PAGE-om; (b) SDS-NR-PAGE-om; (c) Native-PAGE-om. Oznake: M-odmašćeno sirovo kozije mleko (1); TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min) (2); TMI- odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin (3); TMIE-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom različitih količina sprej osušenog inulin/ekstrakt praha (4-6), tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/inulin/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,1mg/mL (TMIE1)(4); 0,2mg/mL (TMIE2) (5); 0,3mg/mL (TMIE3) (6); IE-sprej osušeni prah inulin/ekstrakt (7); I-inulin (8). Skraćenice: LMW-standard molekulskih masa; SK-standard glavnih proteina kravljeg mleka; αs1-CN (αs1-kazein); αs2-CN (αs2-kazein); β-CN (β-kazein); κ-CN (κ-kazein); β-LG (β-laktoglobulini); α-LA (α-laktalbumin); BSA-serum albumin krvi; Ig-imunoglobulini; HMW-visokomolekulski kompleksi. Napomena: 2mg sprej osušenog uzorka je rekonstituisano u 1ml odgovarajućeg pufera za uzorke; Uokvirena elektroforetska traka (SK) i oznake sa desne strane (slika 27c) prikazuju standard glavnih proteina kravljeg mleka i karakterističnu pokretljivost kazeina i serum proteina kravljeg mleka analiziranih Native-PAGE-om, dok su uzorci od 1-6 (slika 27c) bazirani na kozjem mleku i sa leve strane su oznake koje pokazuju karakterističnu pokretljivost kozijih kazeina i serum proteina ispitivanih Native-PAGE-om.

4.3.3.4. Veličina čestice i ζ-potencijal TMIE funkcionalnih aditiva

Merenja veličine čestica su pokazala varijacije kada su u pitanju funkcionalni aditivi na bazi kozijeg mleka sa dodatkom sprej osušenog inulin/ekstrakt praha (Tabela 4.24). Radi lakšeg poređenja, podaci za veličinu čestica M i TM uzoraka su preuzeti iz poglavlja 4.3.2.4. Uzorci kozijeg mleka (M i TM), mleka sa inulinom (TMI) i najmanjom količinom inulin/ekstrakt praha (TMIE1), su pokazali unimodalnu distribuciju (Slika 4.26). TMI prah je imao značajno manju veličinu čestica nego TM, što može biti zbog potencijalnih interakcija inulina sa proteinima mleka, što je uočeno primenom elektroforetskih tehnika, i kod drugih autora (Schaller-Povolny & Smith, 2002). Moguće je da se inulin vezuje za micelarne serum protein (WP) komplekse i povlači ih u serum fazu mleka (I/WP), čime se smanjuje veličina delimično ogoljene TM kazeinske micele, što pokazuje i SEM slika TMI uzorka (slika 4.31c). I/WP kompleksa se ne vide na diagramu distribucije veličine čestica, međutim razlika između najčešće veličine čestica (215,07nm) i srednje veličine čestica (257,97nm), može ukazati na njihovo prisustvo. Moguće da prisutan slobodan inulin i rastvoljivi I/WP kompleksi nisu dovoljno veliki da se uoče korišćenje primenjene metode. TMIE prahovima ovaj efekat inulina je manje izražen zbog manje količine inulina i prisustva fenolnih jedinjenja koja reaguju i sa inulinom i sa površinom kazeinske micele što može da ometa odvajanje micelarnih WP/CN kompleksa sa površine kazeinske micele (Slika 4.31d). Smanjenje veličine TM kazeinske micele, kao posledica interakcije sa fenolnim jedinjenja uočeno je i kod TME funkcionalnih aditiva (Slika 4.26). Veličina micele TM nije se značajno izmenila dodatkom najmanje količine IE praha (TMIE1) što znači da ova koncentracija IE praha omogućava interakciju inulina i fenolnih jedinjenja sa kazeinskom micelom tako da sa postojećim interakcijama veličina micele ostaje nepromenjenja, ali je površina micele izmenjena, na šta ukazuje promena ζ-potencijala kazeinske micele (tabela 4.24). Međutim, dalje povećanje količine IE praha u TMIE formulacijama (TMIE2 i TMIE3), daje vrednosti za veličinu čestica koje su slabo reproducibilne, sa izraženom bimodalnom distribucijom (Slika 4.26). Na slici se jasno uočava prisustvo manjeg pika oko 100nm (TMIE2) i 135nm (TMIE3), koji najverovatnije potiču od pojedinačnih IE čestica koje nisu reagovale sa prisutnim kazeinskim micelama i/ili prisustva IE/WP i IE/WP/CN rastvoljivih kompleksa koji su se odvojili od površine kazeinske micele i prešli u serum fazu mleka. Štaviše, za IE uzorak je potvrđen veliki indeks polidispernosti (>2,5), što potvrđuje njegov uticaj na polidisperznost TMIE2 i TMIE3 prahova.



Slika 4.26. Distribucija veličine čestica rekonstituisanih sprej osušenih funkcionalnih aditiva odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom sprej osušenog inulin/ekstrakt praha. Skraćenice: M-odmašćeno sirovo kozije mleko; TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); I-inulin; IE-sprej osušeni prah inulin/ekstrakt; TMI-odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin; TMIE-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom različitih količina sprej osušenog inulin/ekstrakt praha, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/inulin/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,1mg/mL (TMIE1); 0,2mg/mL(TMIE2); 0,3mg/mL (TMIE3).

Vrednosti za ζ-potencijal su bile u rasponu od -36,90±0,79 do -62,2±2,2, sa niskim koeficijentima varijacije za sve uzorke, što ukazuje na dobru ponovljivost rezultata (Tabela 4.24). Svi uzorci su bili negativno naelektrisani, a vrednosti ζ-potencijala su prelazile -30mV, što ukazuje na dobru fizičku stabilnost (Tolano-Villaverde et al., 2016). Međutim, važno je napomenuti da problemi uočeni pri merenju veličine čestica polidisperznih IE, TMIE2 i TMIE3 uzoraka, nisu imali uticaj na reproduktivnost rezultata pri merenju ζ-potencijala. Dakle, merenje samo ζ-potencijala za ove uzorke, dovelo bi do zaključka da je kod ovih uzoraka unimodalna distribucija i da su promene ζ-potencijala nastale samo zbog površinskih promena. Iz tog razloga, vrednosti za ζ-potencijal su verodostojne samo kada se interpretiraju zajedno sa vrednostima za veličinu čestica. Vrednosti za ζ-potencijal TMI i TM uzoraka se nisu značajno razlikovale, što znači da dodatak samog inulina nije imao uticaj na izmenu naelektrisanja TM kazeinske micele. Sa druge strane, vrednost za ζ-potencijal TMIE1 formulacije su se značajno razlikovala od vrednosti dobijene za TM, ali ne i za TMI uzorak, iako se može uočiti blago povećanje očitane vrednosti. Formiranje WP/CN kompleksa nakon termičkog tretmana je smanjilo ζ-potencijal kazeinske micele (-36,90 mV), dok je dodatak IE praha uticao na povećanje negativnog naelektrisanja kazeinske micele usled delimičnog odvajanja prethodno termički indukovanih micelarnih WP/CN komleksa (-43,13 mV). Do delimičnog odvajanja WP/CN kompleksa je došlo usled interakcije sa IE česticama, što je u saglasnosti sa merenjem veličine čestica za ove uzorke. Prethodno je pokazano da dodatak ekstrakta u termički tretirano mleko nije značajno uticao na promenu ζ-potencijala (TME) (podpoglavlje 4.3.2.4), pa se može pretpostaviti da samo sinergističko delovanje inulina sa fenolnim jedinjenjima doprinosi izmeni ζ-potencijala u ovim funkcionalnim aditivima.

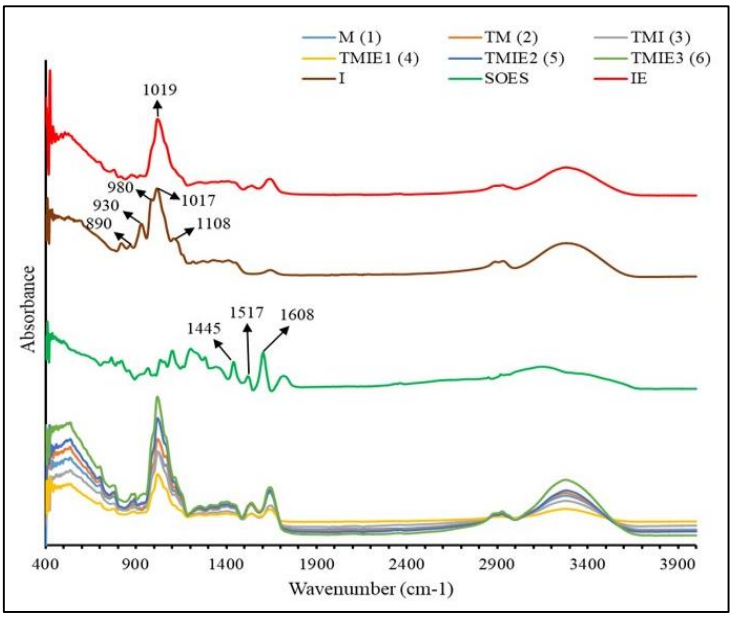
Tabela 4.24. Veličina čestice i ζ-potencijal sprej osušenih funkcionalnih aditiva na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom različitih količina sprej osušenog inulin/ekstrakt praha

Uzorci	**Veličina čestice (nm)**	**ζ-potencijal (-mV)**
M	206,23±2,16[a]	40,77±0,46[a]
TM	298,30±9,55[b]	36,90±0,79[b]
TMI	257,97±16,30[c]	41,77±4,15[abd]
IE*	/	62,2±2,2**
TMIE1	289,80±21,96[bc]	43,13±0,67[d]
TMIE2*	/	42,33±0,55**
TMIE3*	/	42,30±2,43**

Podaci su prikazani kao srednje vrednosti±standardna devijacija (n=3). Vrednosti koje su označene sa istim slovom u istoj koloni nisu statistički značajno različite prema *t*-testu, (p<0,05). Skraćenice: „*"-navedeni uzorci imaju polimodalnu raspodelu; „**"-ove vrednosti nisu relevantne ako se uzme u obzir polimodalna raspodela veličine čestica kod navedenih uzoraka. Skraćenice: M-odmašćeno sirovo kozije mleko; TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); IE-sprej osušeni prah inulin/ekstrakt; TMI- odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin; TMIE-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom različitih količina sprej osušenog inulin/ekstrakt praha, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/inulin/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,1mg/mL (TMIE1); 0,2mg/mL(TMIE2); 0,3mg/mL (TMIE3).

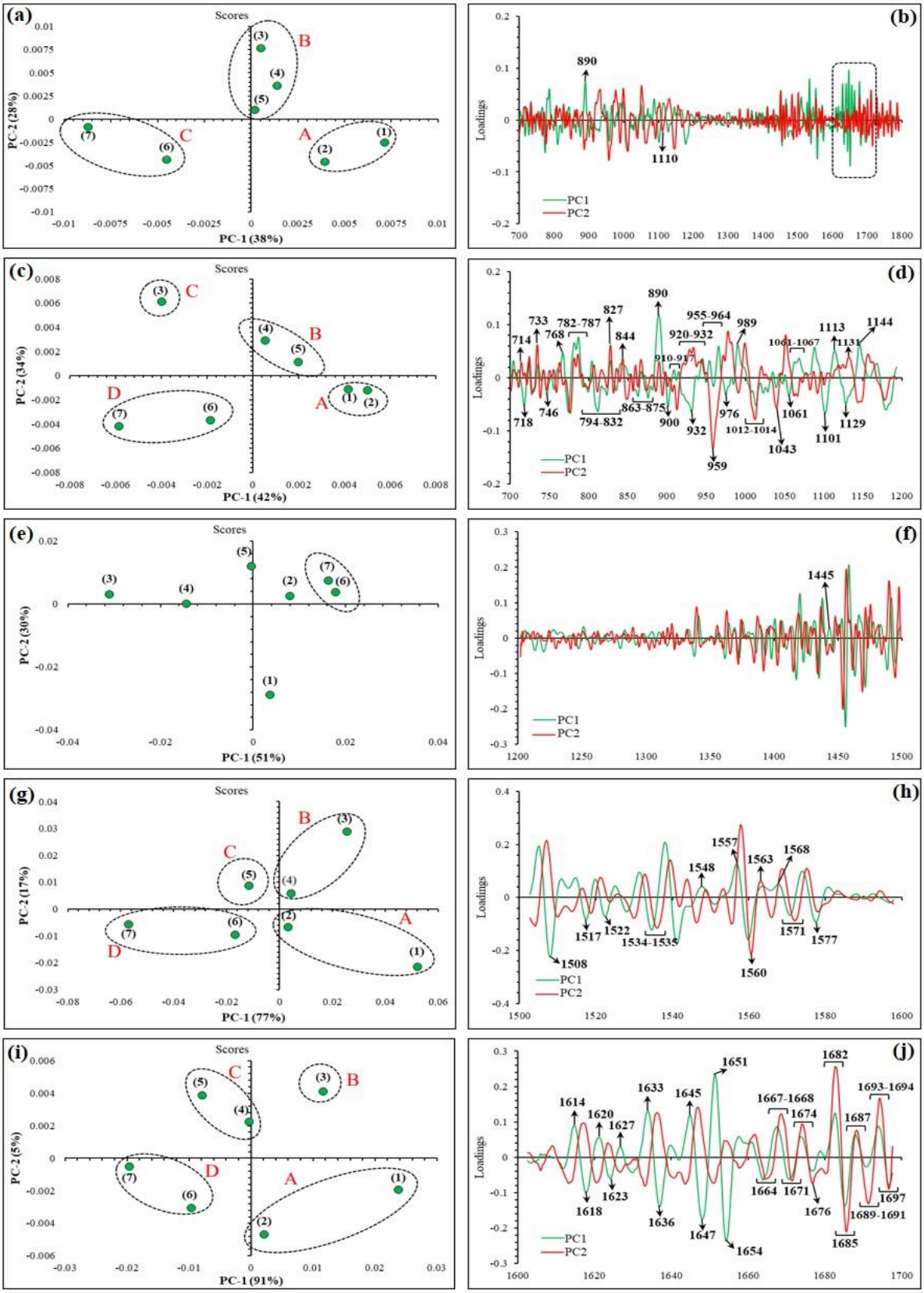
4.3.3.5. ATR-FTIR karakterizacija TMIE funkcionalnih aditiva

ATR-FTIR analiza M (uzorak 1), TM (uzorak 2), TMI (uzorak 3), TMIE (uzorci 4-6) i IE (uzorak 7) uzoraka je sprovedene sa ciljem da se dobiju dodatne informacije o multikomponentnim funkcionalnim aditivima, efektu termičkog tretmana i interakcijama između fenolnih jedinjenja, inulina i proteina. ATR-FTIR spektri svih uzoraka su snimljeni za spektralni opseg od 400 do 4000cm^{-1} (Slika 4.27), a dalja obrada i analiza podataka je bila fokusirana na četiri spektralna regiona: „Otisak prsta" region (700-1200cm^{-1}), koji prati vibracije inulina, šećera i fosfatnih (PO_4^{2-}) grupa proteina, i tri amidna regioni: 1200-1500cm^{-1} (amid III), 1500-1600cm^{-1} (amid II) i 1600-1700cm^{-1} (amid I), koji prvenstveno prate izmene u sekundarnoj strukturi proteina koje su nastale zbog termičkog tretmana ili interakcija sa inulinom i fenolnim jedinjenjima.



Slika 4.27. ATR-FTIR spektri sprej osušenih prahova kozijeg mleka, inulina, ekstrakta semenki i funkcionalnih aditiva odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom sprej osušenog inulin/ekstrakt praha. Oznake: M-odmašćeno sirovo kozije mleko (1); TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min)(2); IE-sprej osušeni prah inulin/ekstrakt (7); TMI-odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin (3); TMIE-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom različitih količina sprej osušenog inulin/ekstrakt praha, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/inulin/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,1mg/mL (TMIE1)(4); 0,2mg/mL(TMIE2)(5); 0,3mg/mL (TMIE3)(6); I-prah čistog inulina; SOES-sprej osušen ekstrakt semenke.

Za spektralni region od 700-1800cm^{-1}, na osnovu prve dve PCA (PC1 i PC2) (objašnjavaju 66% ukupnog varijabiliteta), uzorci se mogu klasifikovati u tri odvojene grupe, označene kao A grupa (uzorci 2 i 1), B grupa (uzorci 3, 4 i 5) i C grupa (uzorci 6 i 7)(Slika 4.28a). Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da na odvajanje među grupama najviše utiče prisustvo i sadržaj inulina i fenolnih jedinjenja u TMI i TMIE uzorcima. Na osnovu ovog grupisanja se ne može analizirati efekat termičkog tretmana, jer su uzorci M i TM grupisani, i odvojeni od ostalih uzoraka. Na odvajanje B grupe (Slika 4.28a), od ostalih grupa očigledno najveći uticaj ima sadržaj inulina i njegove interakcije sa proteinima mleka, jer su TMIE1 i TMIE2 uzorci grupisani sa kontrolnim TMI uzorkom. Dalje, TMIE3 uzorak je grupisan sa IE prahom (C grupa), pa se može pretpostaviti da na ovo odvajanje najveći uticaj ima povećan sadržaj IE praha u TMIE formulacijama, povećan sadržaj fenolnih jedinjenja, i njihove interakcije sa WP kompleksima, WP/CN kompleksima i inulinom. Ovakvom odvajanju/grupisanju uzoraka su najviše doprinele intenzivne trake u amid I regionu (1600-1700cm^{-1}) (Slika 4.28b), što se može povezati sa izmenama u sekundarnoj strukturi proteina mleka. Ove promene su verovatno posledica interakcije inulina sa proteinima, interakcije fenolnih jedinjenja, proteina i inulina, kao i nastanak IE/WP i IE/WP/CN rastvornih kompleksa koji su se odvojili od površine micele, koja ostaje delimično ogoljena sa izmenjenim naelektrisanjem. Pored navedenog, odvajanju grupa takođe doprinose trake na 890 cm^{-1} i 1110cm^{-1} (Slika 4.28b), koje se mogu povezati sa sadržajem inulina u uzorcima (Slika 4.27). Zbog nižeg varijabiliteta prve dve PCA (66%), u analizi traka koje najviše doprinose odvajanju u ovom spektralnom regionu (Slika 4.28b), trebala bi uključiti i druge PCA modele (npr. PC1 i PC3; PC2 i PC3), koji doprinose ukupnom varijabilitetu.



Slika 4.15. Grafici skorova (objekata) i varijabli izvedeni iz ATR-FTIR spektara kozijeg mleka (M i TM), inulin/ekstrakt praha (IE), TMI i TMIE funkcionalnih aditiva, za sledeće spektralne regione: (a, b) 700-1800 cm^{-1}; (c, d) „fingerprint" region, 700-1200 cm^{-1}; (e, f) amid III region, 1200-1500 cm^{-1}; (g, h) amid II, 1500-1600 cm^{-1}; i (i, j) amid I region, 1600-1700 cm^{-1}. Oznake: M-odmašćeno sirovo kozije mleko (1); TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min)(2); IE-sprej osušeni prah inulin/ekstrakt (7); TMI-odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin (3); TMIE-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom različitih količina sprej osušenog inulin/ekstrakt praha, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/inulin/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,1mg/mL (TMIE1)(4); 0,2mg/mL(TMIE2)(5); 0,3mg/mL (TMIE3)(6).

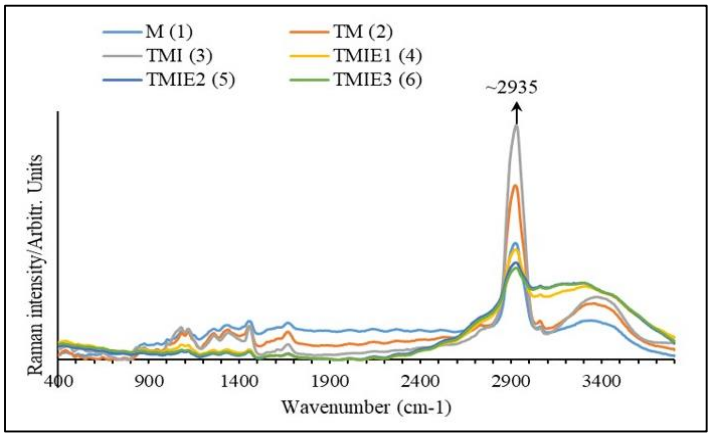
Za amid I i II regione, prve dve PCA (PC1 i PC2), objašnjavaju redom 96% i 94% ukupne varijanse. U oba regiona se uzorci 3, 4 i 5 jasno odvajaju od uzoraka 1, 2, 6 i 7, duž PC2. Međutim ovo odvajanje objašnjava samo 5% (amid I) i 17% (amid II) ukupne varijanse (Slika 4.28g,i). Ako se posmatraju PC1 i PC2 zajedno, u oba regiona se grupišu uzorci 1 i 2 (A grupa), i uzorci 6 i 7 (D grupa) (Slika 4.28g,i). Na grupisanje/odvajanje uzoraka u ova dva regiona najviše utiču kompleksne interakcije WP/CN kompleksa sa inulinom i fenolnim jedinjenjima (Jakobek, 2015; Schaller-Povolny & Smith, 2002), što uzrokuje značajne promene u strukturi proteina, što potvrđuju intenzivne trake na graficima varijabli (Slika 4.28j,h). Odvajanju u ova dva regiona najviše doprinose trake na 1691, 1682, 1676, 1651, 1654, 1645, 1647, 1633, 1636, 1627, 1623, 1618, 1560-1577, 1522, 1508 cm^{-1} (Slika 4.28h,j), koje se mogu povezati sa promenama u sadržaju α-heliksa/petlji, slučajnih strukturnih namotaja, β-okret struktura, β-antiparalelne strukture, i intramolekulske i intermolekulske β-nabrane strukture proteina kozijeg mleka (Grewal et al., 2016; Grewal et al., 2017; Markoska et al., 2018; Markoska et al., 2019). Pored toga, odvajanju D grupe (uzorci 6 i 7) u amid II regionu doprinosi i traka na 1517cm^{-1} ($\nu(C\text{-}C)_{armotična}$ vibracija)(Slika 4.28h), što se može povezati sa povećanim sadržajem slobodnih fenolnih jedinjenja u ovim uzorcima, što je potvrđeno UHPLC DAD MS/MS analizom. Ovo dodatno potvrđuje intezivna traka (1517 cm^{-1}) na ATR-FTIR spektru sprej osušenog vodenog fenolnog ekstrakta semenke (Slika 4.27). U amid III regionu, uzorak 1 se jasno odvaja od ostalih uzoraka, duž PC2, što objašnjava 30% ukupne varijanse. Ako se PC1 i PC2 posmatraju zajedno, u ovom regionu možemo grupisati uzorke 6 i 7, a njihovom grupisanju/odvajanju od drugih uzoraka između ostalog doprinosi manje intenzivna traka na 1445cm^{-1}, koja se može povezati sa povećanim sadržajem slobodnih fenolnih jedinjenja u ovim uzorcima, i koja je potvrđena na ATR-FTIR spektru sprej osušenog vodenog fenolnog ekstrakta semenke (Slika 4.27). U regionu „otiska prsta“, (Slika 4.28c), se može primetiti isto grupisanje uzoraka kao u amid I regionu. Kako se radi o multikomponentnim uzorcima, grupisanju uzoraka u ovom regionu doprinosi veliki broj manje intenzivnih traka, kao što se može videti na grafiku varijabli (Slika 4.28d). Najveći uticaj na grupisanje uzoraka u ovom regionu imaju trake na 890, 920-932, 959 i 1012-1014 (Slika 4.28d). Ove trake su takođe dominantno potvrđene u spektru čistog inulina (Slika 4.27), što znači da je na odvajanje uzoraka u ovom regionu, značajno doprineo sadržaj inulina u uzorcima i njegove interakcije sa proteinima i fenolnim jednjenjima.

4.3.3.6. Raman karakterizacija TMIE funkcionalnih aditiva

Raman spektri M, TM, TMIE i TMIE prahova su snimljeni u spektralnom opsegu od 400-3800cm^{-1} (Slika 4.29). Međutim dalja analiza je fokusirana na iste spektralne regione kao kod ATR-FTIR-a, sa ciljem da se potvrde rezultati dobijeni ATR-FTIR analizom i dobiju dodatne informacije o potencijalnim interakcijama između fenolnih jedinjenja, proteina i inulina. Kao što se može primetiti na dobijenim spektrima, dominantna traka kod svih analiziranih prahova je bila na ~2935cm^{-1}, što se može pripisati $\nu(CH)$ i $\nu(CH_2)$ vibracijama ugljenih hidrata (laktoze i inulina). Štaviše, trake na ~2935 i 1471cm^{-1} su dominantno potvrđene u spektru čistog inulina (Slika P3). Spektar IE praha nije uzet u razmatranje, jer je prilikom ekscitacije na 532nm došlo do fluorescencije ovog uzorka. Pojava fluorescencije je posledica prisustva određene komponente/i u uzorku koja/e fluorescira-ju. Ovo se dešava onda kada je verovatnoća da se desi ramanovo rasejanje mnogo manja od verovatnoće pojave fluorescencije.

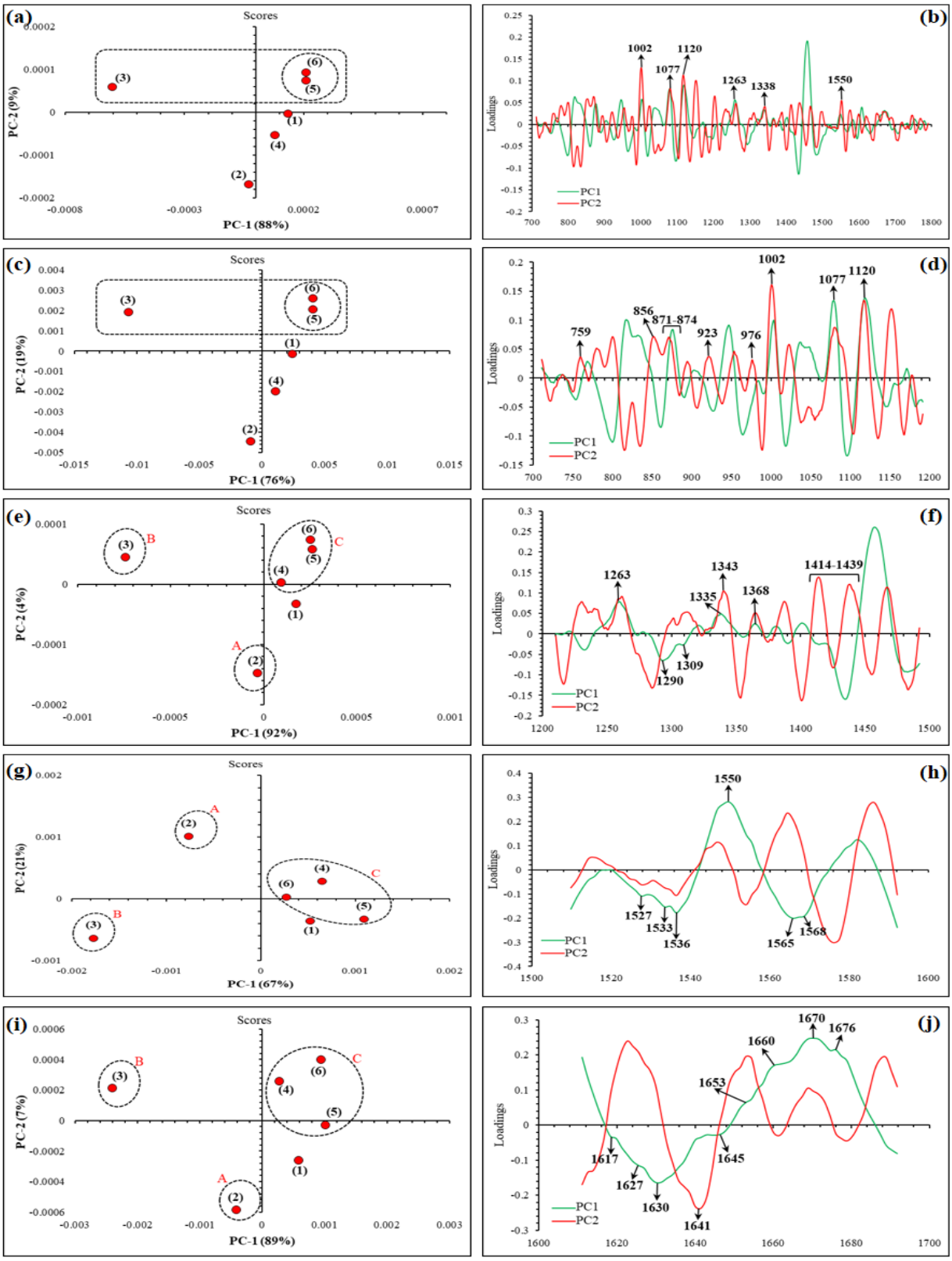
Za spektralni region od 700-1800cm^{-1}, uzorci 3, 5 i 6 se odvajaju od ostalih uzoraka, duž PC2, što objašnjava samo 9% ukupne varijanse (Slika 4.30a). Ovo odvajanje može biti zbog prisustva inulina i njegovim interakcijama sa micelarnim WP/CN kompleksima ili micelarnim WP/CN kompleksima i fenolnim jedinjenjima. Međutim, za isti spektralni region, prve dve PCA zajedno objašnjavaju 97% ukupne varijanse, a grupisani uzorci 5 i 6, kao i uzorak 3 se odvajaju od ostalih uzoraka (Slika 4.30a). Iako grafik varijabli daje šumu traka, trake koje su najviše doprinele odvajanju su na sledećim talasnim brojevima: 1002 (vibracija fenilalanin ostatka)(Almeida et al., 2011; Li-Chan, 2007; Niaura, 2006), 1077, 1120, 1263 i 1338 ($\nu(CC)$, $\nu(CO)$, $\rho(CH)$, $\rho(OH)$, $\beta(CH)$, $\beta(CH_2)$ i $\beta(OH)$ vibracije ugljenih hidrata)(Wiercigroch et al., 2017); i 1550cm^{-1} (δ (N–H); ν (C–N) vibracije)(Almeida et al.,

2011) (Slika 4.30b). Vibracije navedenih grupa su verovatno izmenjene zbog hidrofobnih interakcija inulina i proteina mleka (Jakobek & Matić, 2019; Schaller-Povolny & Smith, 2002). Identična odvajanja uzoraka su primećena i za „otisak prsta“ region (700-1200cm^{-1}) (Slika 4.30c), prema grafiku varijabli (Slika 4.30d). Pored traka koje se mogu povezati sa ugljenim hidratima (1077 i 1120cm^{-1}), druge trake koje doprinose odvajanju uzoraka 3, odnosno 5 i 6 od ostalih uzoraka mogu biti povezani sa vibracijama aminokiselinskih ostataka triptofana, tirozina, fenilalanina i valina (Rygula et al., 2013). U prisustvu inulina i veće količine IE u uzorcima, dolazi do intenzivnijih interakcija inulina sa pomenutim aminokiselinskim ostatacima proteina mleka samog ili u kombinaciji sa fenolnim jedinjenjima, kao i povećanog odvajanja IE/WP/CN kompleksa sa površine kazeinske micele, što se odražava na promenu naelektrisanja, konformacija i vibracija aminokiselinskih ostataka. Uzorak 4 iako sadrži inulin i ekstrakt semenke, odvaja se od uzorka 3, 5 i 6 po PC2, ali po PC1 se odvaja od uzoraka 2 i 3, što ukazuje da u ovom uzorku takođe postoje interakcije između proteina, fenolnih jedinjenja i inulina.



Slika 4.29. Raman spektri sprej osušenih prahova kozijeg mleka i funkcionalnih aditiva odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom sprej osušenog inulin/ekstrakt praha. Oznake: M-odmašćeno sirovo kozije mleko (1); TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min)(2); TMI-odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin (3); TMIE-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom različitih količina sprej osušenog inulin/ekstrakt praha, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/inulin/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,1mg/mL (TMIE1)(4); 0,2mg/mL(TMIE2)(5); 0,3mg/mL (TMIE3)(6).

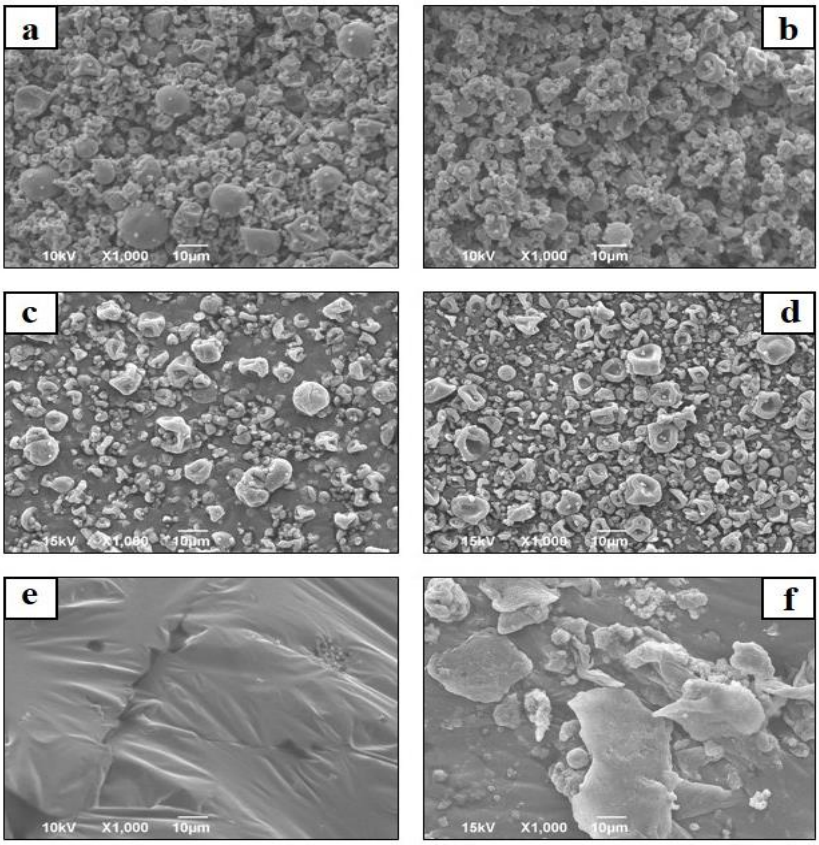
Za amid I, II i III regione, prve dve PCA objašnjavaju redom 96%, 88% i 96% ukupne varijanse, a uzorci se grupišu na identičan način i mogu se klasifikovati u tri grupe: A grupa (uzorak 2), B grupa (uzorak 3) i C grupa (uzorci 4, 5 i 6) (Slika 4.30e,g,i). Kao što se može primetiti, funkcionalni aditivi koji sadrže IE se grupišu i odvajaju od TMI uzorka i uzorka termički tretiranog mleka. Stoga, može se pretpostaviti da su odvajanju C grupe u ovim regionima najviše doprinela fenolna jedinjenja. Najverovatnije su združene hidrofobne interakcije inulina i fenolnih jedinjenja sa micelarno vezanim WP/CN kompleksima kazeinskih micela doprineli promeni u sekundarnoj strukturu proteina. Trake koje su najviše doprineli odvajanju TMIE uzoraka od ostalih uzoraka u amid I regionu su: 1617, 1627, 1630, (antiparalelna i paralelna β-nabrana struktura, vibracije aminokiselinski ostataka, C=C vibracije aromatičnog prstena fenolnih jedinjenja), 1645, 1653 (α-heliks), 1660, 1670, 1676 cm^{-1} (β-okret) (Slika 4.30j). U amid II regionu, odvajanju/grupisanju uzoraka su doprinele trake na 1527, 1533, 1536, 1550, 1565, 1568 cm^{-1} (Slika 4.30h), dok su trake na 1263 (α-heliks), 1335, 1343 (C-H deformacije aminokiselinskih ostataka, O-H deformacije i C-O istezanja fenolnih jedinjenja) i 1368 cm^{-1} doprinele odvajanju uzoraka u amid III regionu (Slika 4.30f) (Benevides et al., 2004; Niaura, 2006; Pompeu et al., 2017; Rygula et al., 2013). Trake koje su odgovorne za odvajanje TMI uzorka od ostalih uzoraka u amid III regionu su na talasnim brojevima: 1290, 1309, 1414-1439 (Slika 4.30f).



Slika 4.30. Grafici skorova (objekata) i varijabli izvedeni iz Raman spektara kozijeg mleka (M i TM), TMI i TMIE funkcionalnih aditiva, za sledeće spektralne regione: (a, b) 700-1800 cm^{-1}; (c, d) „fingerprint“ region, 700-1200 cm^{-1}; (e, f) amid III region, 1200-1500 cm^{-1}; (g, h) amid II, 1500-1600 cm^{-1}; i (i, j) amid I region, 1600-1700 cm^{-1}. Oznake: M-odmašćeno sirovo kozije mleko (1); TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min)(2); TMI-odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin (3); TMIE-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom različitih količina sprej osušenog inulin/ekstrakt praha, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/inulin/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,1mg/mL (TMIE1)(4); 0,2mg/mL(TMIE2)(5); 0,3mg/mL (TMIE3)(6).

4.3.3.7. Morfološke karakteristike IE, TMI i TMIE3 funkcionalnih aditiva

Na SEM slici M praha se mogu uočiti glatke, sferne i ređe skupljene (naborane) kazeinske micele (Slika 4.31a). Sa druge strane, na slici TM praha je jasno uočljiv efekat termičkog tretmana (Slika 4.31b), jer su po površini smežuranih micela raspoređene sitne čestice, koje se mogu pripisati termički indukovanim WP/CN kompleksima (Pesic et al., 2012). Kod TMI i TMIE3 prahova, skupljene (naborane) kazeinske micele su razdvojene i „nalepljene“ po površini inulina (Slika 4.31c,d). Pored toga, uočava se prisustvo manjih čestica koje mogu poticati od I/WP rastvornih kompleksa koji su se odvojili sa površine kazeinske micele kod TMI praha i/ili prisustva IE, IE/WP i IE/WP/CN rastvornih komplesa kod uzorka TMIE3. Kod TMIE3 praha je gušće pakovanje prisutnih čestica na površini inulina nego što je to slučaj kod TMI praha, što se objašnjava manjim sadržajem inulina, većom koncentracijom proteina mleka, prisutvom fenolnih jedinjenja i njihovih različitih kompleksa sa inulinom i micelarnim WP/CN kompleksima. Ovi rezultati su u saglasnost sa rezultatima dobijenim kod DLS merenja. Na slici IE praha se može primetiti dominantna glatka površina inulina sa blagim neravninama, kao i sitne čestice koje su selektivno raspoređene na dominantnoj inulin površini, a koje se mogu povezati sa fenolnim jedinjenjima (Slika 4.31e). U ovom slučaju inulin ima svojstva nosača fenolnih jedinjenja, koja u vodenom rastvoru mogu lako da migriraju sa površine inulina i ispoljavaju funkcionalna svojstva. Sličnu morfologiju prahova su uočili i drugi autori posmatrajući sprej osušene prahove inulin-*Hibiscus acetosella* ekstrakta (Mar et al., 2020), inulin-ekstrakt kore ananasa (Lourenço et al., 2020), i inulin-ekstrakt borovnice (Waterhouse et al., 2017). SEM slika sprej osušenog ekstrakta semenke pokazuju čestice nepravilnog oblike, i različitih veličina, koje su u formi agregata (Sliki 4.31f). Što se tiče interakcija između proteina mleka i inulina, Moayyedi et al. (2018) su pokazali sličnu distribuciju gusto upakovanih serum proteina po površini inulina.

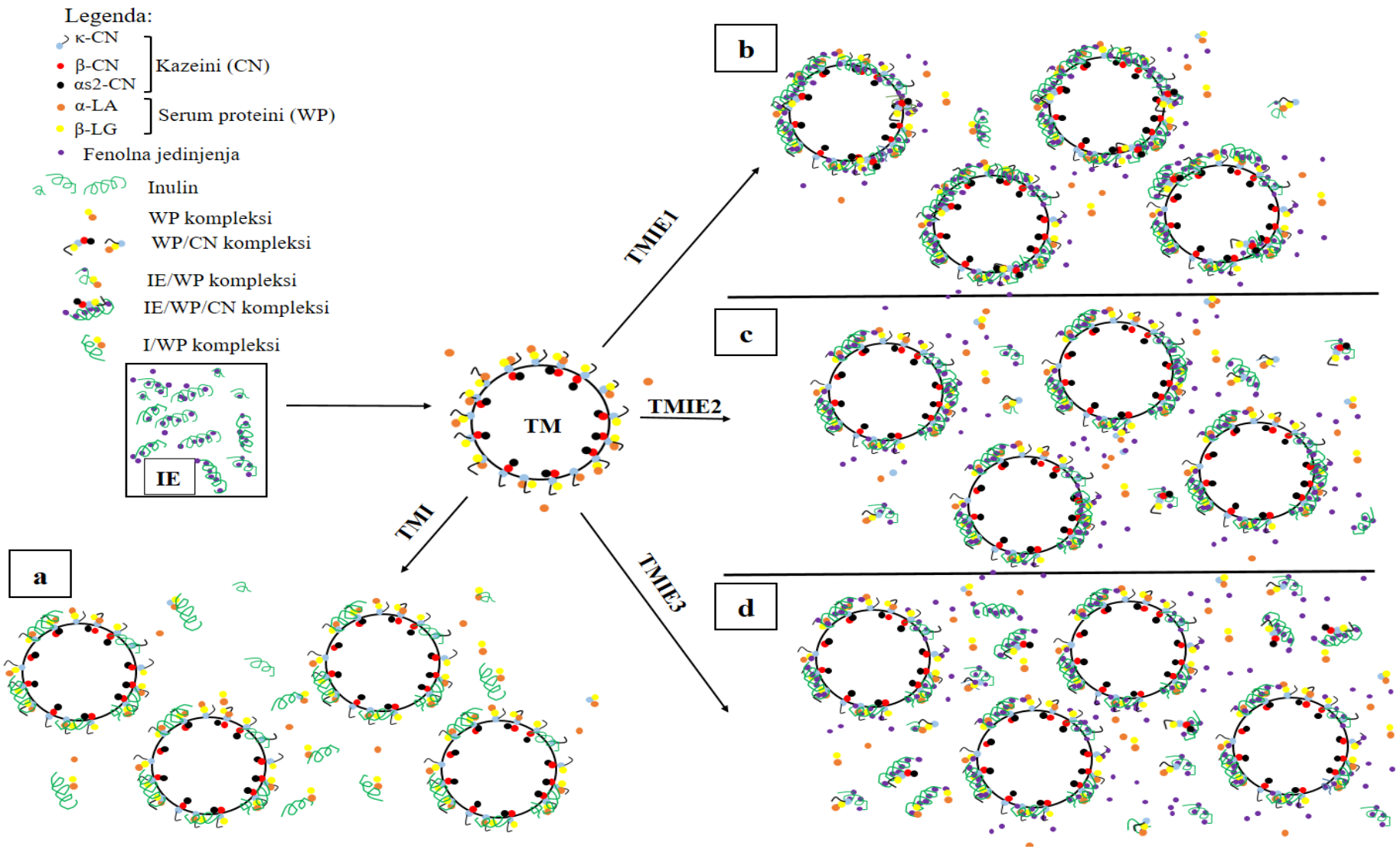


Slika 4.31. SEM slike sprej osušenih prahova: (a) sirovo kozije mleko (M); (b) termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min) (TM); (c) odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin (TMI); (d) funkcionalni aditiv na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom sprej osušenog inulin/ekstrakt praha (TMIE3); (e) sprej osušen prah inulin/ekstrakt (IE); (f) sprej osušen ekstrakt semenke (SOES).

4.3.3.8. Šematski prikaz TMIE funkcionalnih aditiva

Na osnovu detaljne karakterizacije TMIE funkcionalnih aditiva, prethodno pretpostavljenog modela distribucije fenolnih jedinjenja na kazeinskoj miceli (TME) u okviru ove disertacije i literaturno dostupnih podataka vezanih za interakcije dijetna vlakna/proteini (Schaller-Povolny & Smith, 2002), dijetna vlakna/fenolna jedinjenja (Jakobek & Matić, 2019), i proteini/fenolna jedinjenja (Jakobek, 2015), može se šematski prikazati distribucija inulina i fenolnih jedinjenja u multikomponentnim TMI i TMIE prahovima (Slika 4.32).

Na Slici 4.32a je prikazana distribucija inulina u TMI uzorku. Molekuli inulina reaguju sa micelarnim WP kompleksima (I/WP), koje povlače u serum fazu, dok kazeinske micele ostaju delimično ogoljene. Na slici 4.32b-d je prikazana distribucija IE/WP i IE/WP/CN rastvornih kompleksa, kao i slobodnih IE i fenolnih jedinjenja u TMIE uzorcima. Kod svih TMIE uzoraka dolazi do interakcije IE sa micelarnim WP/CN kompleksima, što je pokazano elektroforetskom analizom i određivanjem ukupnih proteina. Na osnovu rezultata za veličinu čestica se može zaključiti da IE/WP i IE/WP/CN rastvorni kompleksi još uvek nisu u dovoljnoj meri zastupljeni u serum fazi TMIE1 uzorka, kako bi uticali na njegovu distribuciju čestica (Slika 4.32b). Međutim, da i kod TMIE1 uzorka dolazi do odvajanja IE/WP i IE/WP/CN kompleksa sa površine micele, jasno ukazuju rezultati za ζ-potencijal. Dalje povećanje količine IE praha u TMIE formulacijama, utiču na povećano prisustvo IE/WP/CN rastvornih kompleksa i IE čestica u serum fazi TMIE2 (Slika 4.32c) i TMIE3 uzoraka (Slika 4.32d), što su pokazali rezultati DLS merenja i UHPLC DAD MS/MS analiza fenolnih jedinjenja kao i SEM slika 4.31d. Pretpostavljeni modeli su dodatno potvrđeni ATR-FTIR i Raman spektroskopijom i PCA analizom.

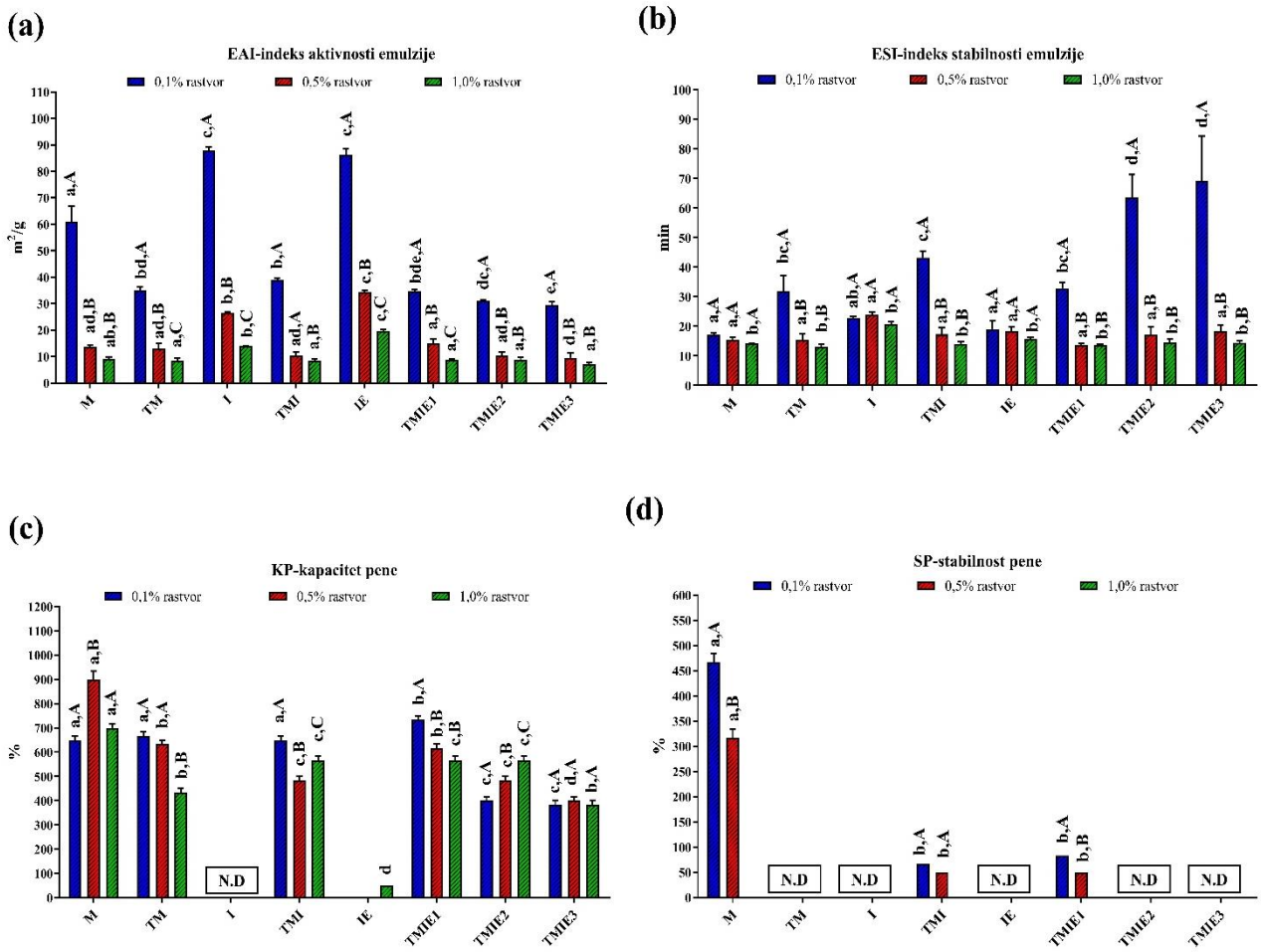


Slika 4.32. Šematski prikaz distribucije inulina i fenolnih jedinjenja u multikomponentnim TMI i TMIE prahovima (pH 6,7). Oznake: TM- termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); IE-sprej osušeni inulin/ekstrakt prah; TMI-odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin; TMIE-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom različitih količina sprej osušenog inulin/ekstrakt praha, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/inulin/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,1mg/mL (TMIE1); 0,2mg/mL(TMIE2); 0,3mg/mL (TMIE3).

4.3.3.9. Tehno-funkcionalna svojstva TMIE funkcionalnih aditiva

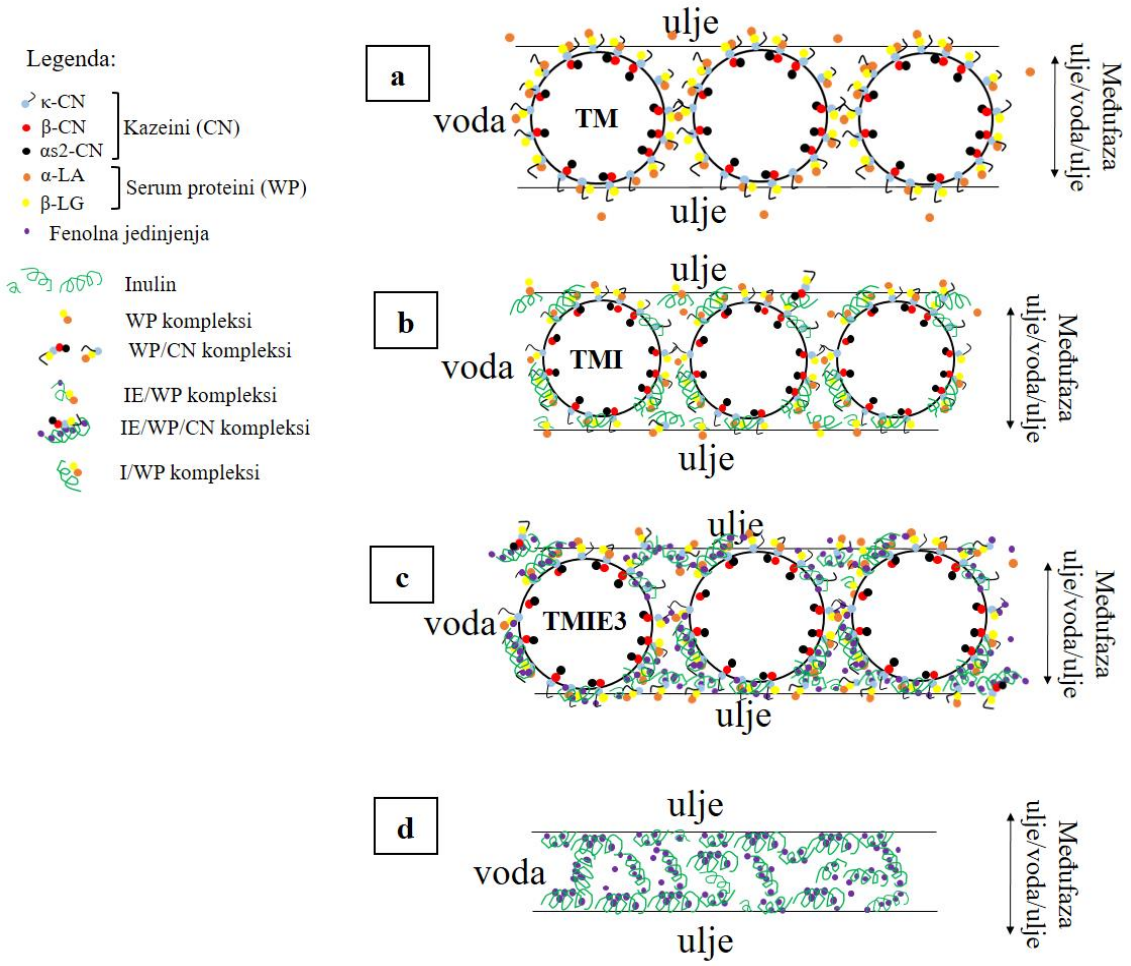
Rezultati za ***emulgujuća svojstva*** TMI, TMIE i IE rastvora, su određeni za 0,1%, 0,5%, i 1% (m/V) rastvore, i prikazani su na Slici 4.33 (grafik a i b). Rastvori M, TM i I su korišćeni kao kontrolni uzorci, sa ciljem da olakšaju interpretaciju dobijenih rezultata. EAI i ESI vrednosti za M i TM rastvore, za sve pripremljene (m/V) rastvore, imaju istu sledivost i u saglasnosti su sa rezultatima koji su prethodno diskutovani u poglavlju 4.3.2.9 za TME uzorke. Najviše EAI vrednosti su određene za 0,1% IE (86,29±2,24 m^2/g) i I (87,94±1,38 m^2/g) rastvore, koje se statistički značajno ne razlikuju. Inulin je makromolekulni polisaharid koji ostvaruje značajno veću i uniformniju kontaktnu površinu u poređenju sa M i TM kazeinskim micelama, i poput „trake“ prekriva veliku površinu kapljice ulja. Veći sadržaj IE i I u rastvorima (0,5 i 1%), pokazuje smanjenje EAI vrednosti, što se objašnjava povećanim sadržajem inulina i inulin/ekstrakta u rastvoru koji se gušće pakuju po kontaktnoj površini ulje/voda. Povećanje sadržaja inulina do 1% ne utiče na indeks stabilnosti emulzije I i IE rastvora, međutim pri sadržaju od 1% dolazi do smanjenja aktivnosti emulzije. Ovo može biti posledica prisutva neabsorbovanih molekula I i IE kompleksa na kontaktu površinu ulje/voda. Neadsorbovani inulin tj. inulin/ekstakt verovatno izazivaju grupisanje uljanih kapljica i njihovu agregirciju u jednom delu emulzije, dok se neadsorbovan inulin tj. IE grupišu u drugom delu emulzije („deplation flocculation“) (Bai et al., 2017; Dalgleish, 2006). Pored toga, smanjena stabilnost emulzije pri većem sadržaju inulina u rastvoru se može objasniti formiranjem nekompaktnog filma inulina oko kapljice ulja, što izaziva „curenje“ i flokulaciju ulja.

EAI vrednosti za 0,1% TMI i TMIE rastvore su bile značajno veće od EAI vrednosti 0,5 i 1% rastvora istih uzoraka. Kompleksi inulina sa WP i WP/CN kompleksima formiraju sterni sloj koji dodatno utiče na međufaznu stabilizaciju emulzija (Dalgleish, 2006; Dickinson, 2013). EAI i ESI vrednosti za 0,5 i 1% rastvore TMI i TMIE se nisu statistički značajno razlikovale, što ukazuje na odsustvo uticaja sadržaja fenolnih jedinjenja na emulgujuća svojstva TMI i TMIE rastvora sa sadržajem uzorka većim od 0,5%. U TMIE uzorcima sa većim sadržajem IE praha, ometa se formiranje kompaktnog filma na međufaznoj površini ulje/voda verovatno zbog prisustva neadsorbovanih čestica uzrokujući narušavanje stabilnog („steady-state“) međufaznog pritiska (López-Castejón et al., 2019). Različit uticaj sadržaja inulina i fenolnih jedinjenja u TMIE uzorcima na emulgujuća svojstva se može uočiti samo u slučaju 0,1% rastvora, pa će dalja diskusija odnositi upravo na ove rastvore. SEM slika TMIE3 praha je pokazala prisustvo različitih čestica u funkcionalnom aditivu. Pored TM kazeinske micele prisutne su IE i/ili IE/WP/CN čestice i inulin. Stoga, kada se TMIE rastvori homogenizuju sa uljem, oko kapljice ulja se verovatno formiraju filmovi sastavljeni od kazeinskih micela na čijoj površini se nalaze IE kompleksi vezani za micelarne WP/CN komplekse, između kojih se ubacuju rastvorni IE i/ili IE/WP/CN kompleksi nastali odvajanjem sa površine kazeinske micele popunjavajući prostor između njih, i dodatno stabilišući omotač oko uljane kapljice. Sa povećanjem sadržaja IE raste stablinost emulzije TMIE uzoraka, jer raste i sadržaj rastvornih IE, IE/WP i/ili IE/WP/CN kompleksa tako da omogućavaju formiranje kompaktnijeg filma koji sprečava brzo „curenje“ i flokulaciju uljanih kapljica. Zbog multikomponetnog sastava, TMIE uzorci pokazuju dobra emulgujuća svojstva.



Slika 4.33. Tehno-funkcionalna svojstva funkcionalnih aditiva na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog sprej osušenim inulin/ekstrakt prahom: (a) Indeks aktivnosti emulzije; (b) Indeks stabilnosti emulzije; (c) Kapacitet pene; (d) Stabilnost pene. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti+standardna devijacija (n=3). Mala slova označavaju poređenje između uzoraka koji imaju isti sadržaj praha u rastvoru, a velika slova označavaju poređenja u okviru svakog uzorka posebno. Različita slova označavaju statistički značajne razlike prema *Tukey's* testu ($p<0,05$). Skraćenice: „N.D."-nije detektovan; M-odmašćeno sirovo kozije mleko; TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); I-inulin; TMI-odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin; IE-sprej osušeni inulin/ekstrakt prah; TMIE-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom različitih količina sprej osušenog praha inulin/ekstrakt, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/inulin/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,1mg/mL (TMIE1); 0,2mg/mL (TMIE2); 0,3mg/mL (TMIE3). Napomena: rastvori uzorka su pripremljeni rekonstitucijom odgovarajuće mase praha u 100mL mili Q vode.

Na osnovu dobijenih rezultata za emulgujuća svojstva i rezultata predhodne karakterizacije TMIE funkcionalnih aditiva, literaturno dostupnih podataka i prethodno prijavljenih modela za TME uzorke, predloženi su različiti modeli distribucije 0,1% rastvora TM, TMI, TMIE3 i IE uzoraka, na površini uljane kapljice (pH 6,7) (Slika 4.34).

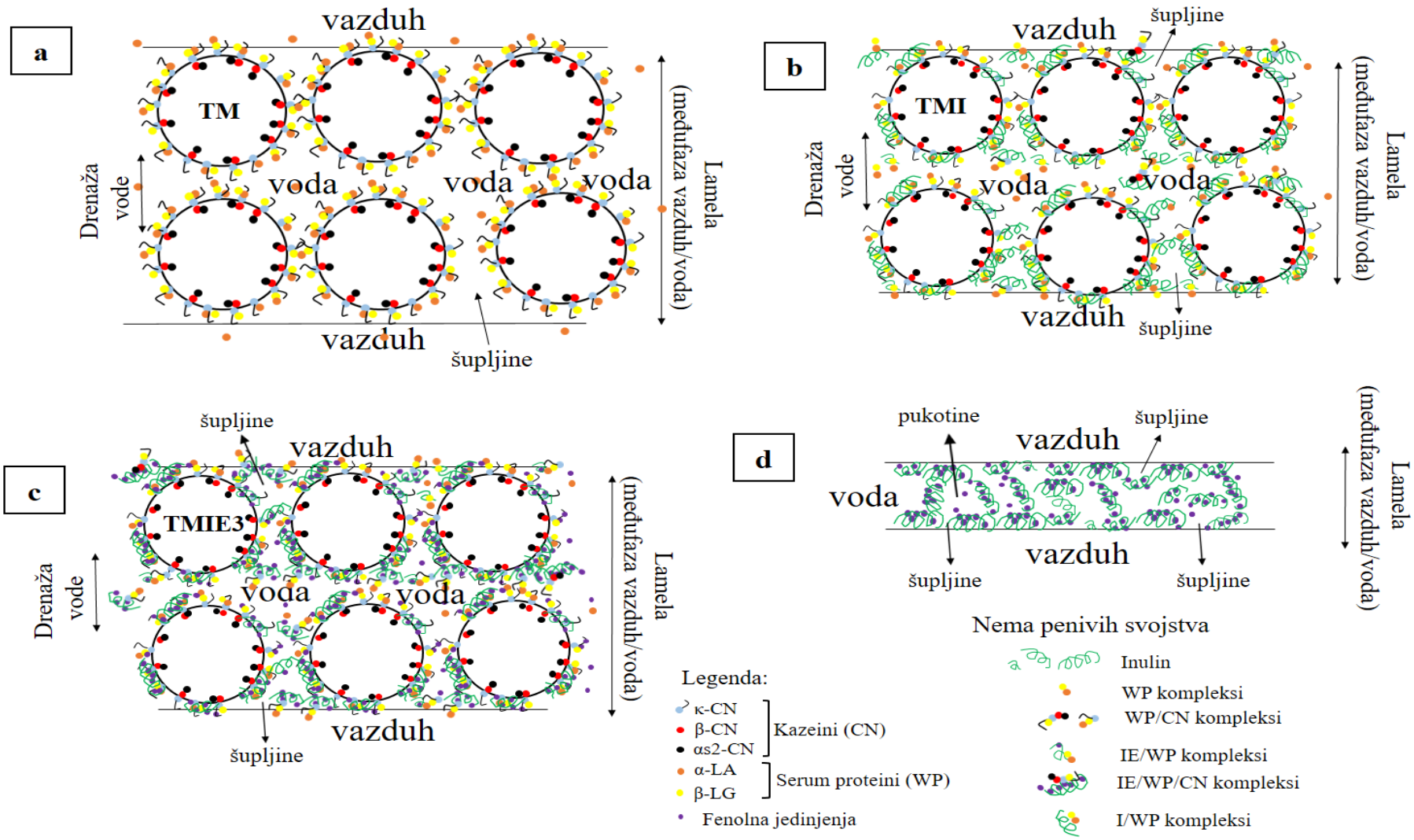


Slika 4.34. Šematski prikaz distribucije kazeinskih micela, rastvornih kompleksa, inulina i inulin/ekstrakta na međufazi ulje/voda/ulje: (a) 0,1% TM rastvor; (b) 0,1% TMI rastvor; (c) 0,1% TMIE3 rastvor; (d) 0,1% IE rastvor,pri pH 6,7. Skraćenice: TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); TMI-odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin; IE-sprej osušeni inulin/ekstrakt prah; TMIE-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom sprej osušenog praha inulin/ekstrakt, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/inulin/ekstrakt pre sprej sušenja 0,3mg/mL (TMIE3).

Peniva svojstva M, TM, I, TMI, TMIE i IE rastvora su određena za 0,1%, 0,5%, i 1% (m/V) rastvore, a dobijeni rezultati su prikazani na Slici 4.33 (grafik c i d). Dobijene KP i SP vrednosti za M i TM rastvore, bez obzira na sadržaj uzorka u rastvoru, imaju istu sledivost i u saglasnosti su sa rezultatima koji su prethodno diskutovani u poglavlju 4.3.2.9 za TME uzorke. Osim 1% IE rastvora, drugi IE i I rastvori nisu pokazali peniva svojstva. Inulin je veoma hidrofilan, čime je značajno smanjen njegov afinitet i sposobnost adsorpcije na voda/vazduh međufazi (Liu et al., 2017). Pored toga, TMI i TMIE rastvori su, pri svim sadržajima uzoraka u rastvoru (0,1%, 0,5% i 1%), pokazali dobru sposobnost formiranja pene (KP), čemu očigledno doprinose proteini. Treba naglasiti da se sposobnost formiranja pene TMIE rastvora (0,1% 0,5% i 1%) razlikovao u zavisnosti od sadržaja uzorka u rastvoru. Kod TMIE1, sposobnost formiranja pene se smanjuje sa povećanjem sadržaja IE u rastvoru, kod TMIE2 se povećava, a kod TMIE3 se ne menja. Ovako različito ponašanje potvrđuje složenost interakcija u pripremljenim penama i različitu distribuciju prisutnih kazeinskih micela i rastvornih kompleksa na međufaznu površinu vazduh/voda u zavisnosti od njihove strukture, sastava i sadržaja. Međutim, iako su vrednosti za kapacitet pene bile visoke u analiziranim TMI i TMIE uzorcima, ove pene su bile rastresite sa velikim mehurima vazduha koji zauzimaju velike zapremine. Pored navedenog, formirane pene TMI i TMIE uzoraka su bile jako nestabilne, a manji mehuri su lako koalescirali u mehure velikih zapremina praveći velike šupljine u formiranom sloju pene. U većini slučaja je pokazano da polisaharidi poboljšavaju stabilnost proteinske pene (Liu et al., 2017), međutim to nije slučaj sa inulinom, koji u ovim uzorcima pokazuje potencijalni antipenivi efekat verovatno zbog

hidrofobne prirode i interakcija sa kazeinskim micelama. Pored toga, prisustvo različih micelarno vezanih i rastvornih kompleksa u TMIE rastvorima onemogućavaju formiranje kompaktnog sloja oko mehura vazduha. Nakon formiranja pene, film koji razdvaja mehurove će se suziti i izliti u ivicu Plateau međe, jer je Laplace-ov pritisak unutar Plateau granica niži u poređenju sa pritiskom susednih filmova (Foegeding & Davis, 2011). Kazeinske micele, rastvorni I/WP ili IE/WP/CN kompleksi, slobodni IE, I i fenolna jedinjenja brzo difunduju iz lamela ka Plateau međi (granicama), gde formiraju filmove na voda/vazduh kontaknoj površini (Denkov, 2004). Kako se različite komponente raspoređuju na Plateau granicama, dolazi do dizbalansa pritisaka, povećane brzine oticanja vode i sužavanja prostora između mehurova, što izaziva pojavu pukotina na mehurovima.

Na osnovu dobijenih rezultata za peniva svojstva i rezultata predhodne karakterizacije TMIE funkcionalnih aditiva, literaturno dostupnih podataka i prethodno prijavljenih modela za TME uzorke, predloženi su različiti modeli distribucije 0,1% rastvora TM, TMI, TMIE3 i IE uzoraka, na međufaznoj površini voda/vazduh (Plateau granici, međi)(Slika 4.35).

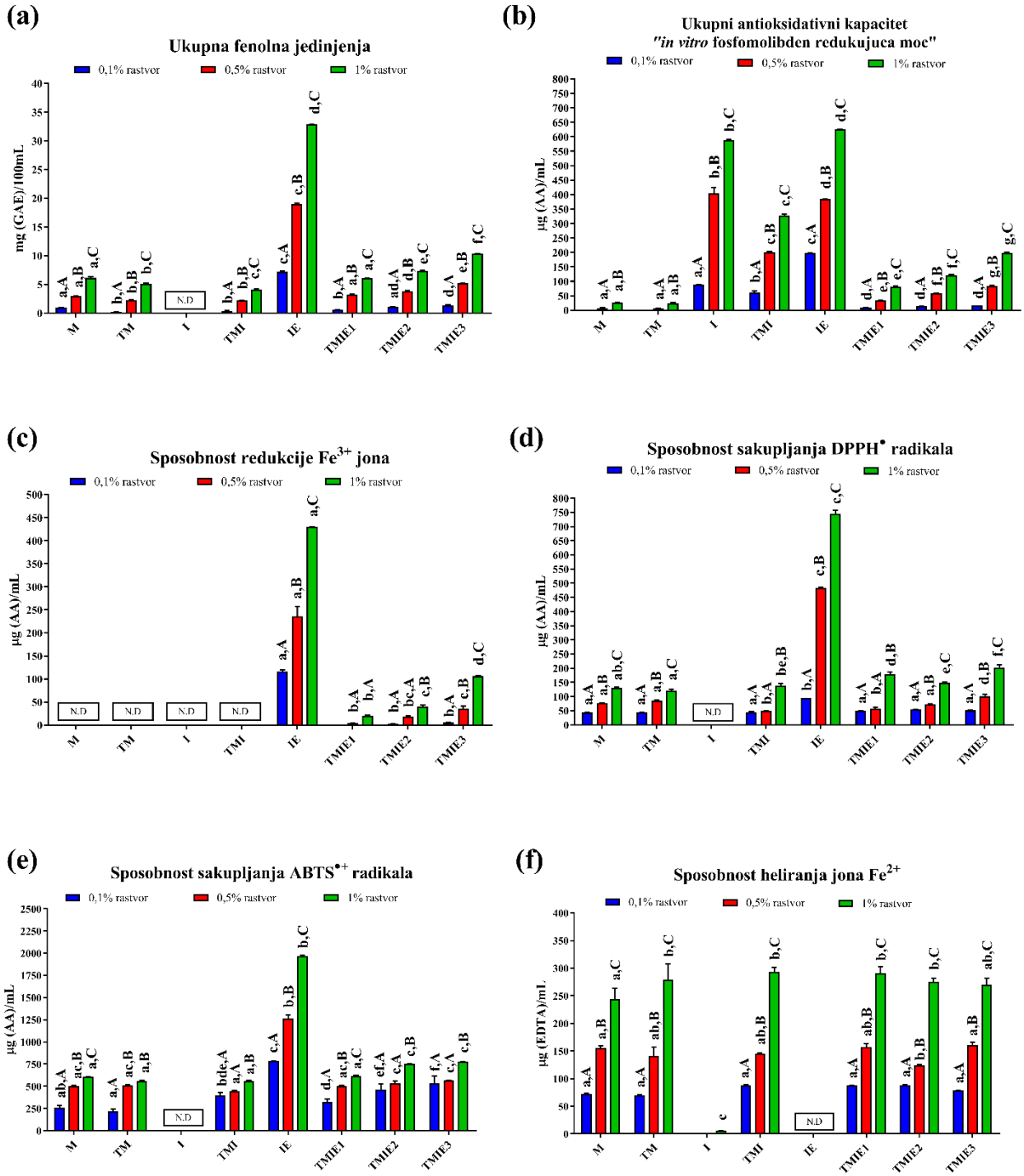


Slika 4.35. Šematski prikaz distribucije kazeinskih micela, rastvornih kompleksa, inulina i inulin/ekstrakta na međufazi vazduh/voda : (a) 0,1% TM rastvor; (b) 0,1% TMI rastvor; (c) 0,1% TMIE3 rastvor; (d) 0,1% IE rastvor,pri pH 6,7. Skraćenice: TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); TMI-odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin; IE-sprej osušeni inulin/ekstrakt prah; TMIE-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom sprej osušenog praha inulin/ekstrakt, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/inulin/ekstrakt pre sprej sušenja 0,3mg/mL (TMIE3).

4.3.3.10. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativna svojstva TMIE funkcionalnih aditiva

Kako su TMIE prahovi multikomponentni uzorci, nekoliko *in vitro* testova je korišćeno za analizu njihove antioksidativne aktivnosti, kako bi se što bolje interpretirali dobijeni rezultati i razumeo efekat sastavnih konstituenata na antioksidativni kapacitet uzoraka (Granato et al., 2018). Stoga, u ovoj studiji je korišćeno pet *in vitro* antioksidativnih testova (TAC; $ABTS^{\bullet+}$; $DPPH^{\bullet}$; FRP; i FCC), kako bi se odredio antioksidativni potencijal M, TM, TMI, I, IE i TMIE, za 0,1% 0,5% i 1% (m/V) rastvora (Slika 4.36b-f). Za iste rastvore je takođe određen sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja prema Folin-Ciocalteu (Slika 4.36a). Međutim, pošto se radi o multikomponentnim uzorcima, može se reći da ova metoda meri ukupni redukcioni kapacitet uzoraka (Gülçin, 2012; Huang et al., 2005).

Prema Folin Ciocalteu-ovoj metodi, za sve pripremljene rastvore čistog inulina (I) nije potvrđeno prisustvo fenolnih jedinjenja, dok je predhodna UHPLC-DAD MS/MS analiza pokazala odsustvo pojedinačnih fenolnih jedinjenja u uzorcima kozijeg mleka (M i TM). Ovo znači da su dobijene TPC vrednosti za M, TM i TMI uzorke poreklom od proteina, aminokiselina i laktoze koji interferiraju sa Folin Ciocalteu-ovim reagensom i daju prividne rezultate za TPC sadržaj (Gülçin, 2012; Prior et al., 2005). Sa povećanjem sadržaja M, TM i TMI u rastvoru, značajno se povećava i redukcioni kapacitet ovih uzoraka. Međutim, TM i TMI uzorci su imali značajno niže TPC vrednosti u poređenju sa M uzorkom, što je verovatno posledica termičkog tretmana, smanjenog broja redukcionih grupa koje učestvuju u formiranju WP/CN kompleksa i zbog interakcija inulina sa WP kompleksima. Štaviše, značajna razlika u dobijenim TPC vrednostima je takođe pronađena između TM i TMI uzoraka, ali samo za 1% rastvore, jer verovatno tek na ovoj koncentraciji dolazi do izražaja sadržaj inulina u TMI uzorku, što dovodi do smanjenja sadržaja proteina i vrednosti za TPC sadržaj. Najviše vrednosti za TPC su pronađene za sva tri pripremljena IE rastvora (7,17; 18,95; i 32,83 mg(GAE)/100mL), čemu doprinose fenolna jedinjenja. Uzorci TM obogaćeni različitim količinama IE praha su imali značajno veće TPC vrednosti, u poređenju sa TM i TMI uzorcima, čemu su očigledno najviše doprinela fenolna jedinjenja. Dobijene TPC vrednosti za TMIE uzorke su pokazale značajan trend porasta sa povećanjem sadržaja TMIE praha u rastvoru (0,1%, 0,5% i 1%) i sa povećanjem količine dodatog IE praha u TMIE formulacijama. Dobijene TPC vrednosti za TMIE1, TMIE2 i TMIE3, su bile redom: 0,53; 1,04; i 1,37 mg(GAE)/100mL za 0,1% rastvore; 3,19; 3,79; i 5,22 mg(GAE)/100mL, za 0,5% rastvore; i 6,07; 7,35; i 10,38 mg(GAE)/100mL, za 1% rastvore. Ove vrednosti su bile niže u poređenju sa literaturnim TPC vrednostima koje su dobili drugi autori za napitke na bazi kozijeg ili kravljeg mleka koji su obogaćeni ekstraktima lekovitog bilja (Komes et al., 2017), prahom monofloralnog polena (Kostić et al., 2021), ekstraktima grožđa (He et al., 2016; Kılıç Bayraktar et al., 2019) ili *Tinospora cordifolia* (giloy) sokom sa/bez prisustva biljnog ekstrakta (Sharma et al., 2021). Ovo razlike mogu biti zbog koncentracije aktivnih komponenti u formulacijama, jer kao što se može primetiti, dobijene TPC vrednosti za TMIE prahove su usko zavisne od koncentracije rastvora za koje se određuje sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja.



Slika 4.36. Ukupna fenolna jedinjenja (a) i antioksidativna svojstva funkcionalnih aditiva na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka obogaćenog sprej osušenim inulin/esktrakt prahom (b-f): Ukupni antioksidativni kapacitet "*in vitro* fosfomolibden redukujuća moć" (b); Sposobnost redukcije Fe^{3+} jona (redukujuća moć) (c); Sposobnost sakupljanja $DPPH^{\bullet}$ radikala (d); Sposobnost sakupljanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala (e); Sposobnost heliranja Fe^{2+} jona (f). Podaci su prikazani kao srednje vrednosti+standardna devijacija (n=3). Mala slova označavaju poređenje između uzoraka koji imaju isti sadržaj praha u rastvoru, a velika slova označavaju poređenja u okviru svakog uzorka posebno. Različita slova označavaju statistički značajne razlike prema *Tukey's* testu ($p<0,05$). Skraćenice: „N.D."-nije detektovan; M-odmašćeno sirovo kozije mleko; TM-termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); I-inulin; TMI-odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin; IE-sprej osušeni prah inulin/ekstrakt; TMIE-funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka sa dodatkom različitih količina sprej osušenog praha inulin/ekstrakt, tako da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu metoda) u finalnoj zapremini TM/inulin/ekstrakt pre sprej sušenja bio: 0,1mg/mL (TMIE1); 0,2mg/mL (TMIE2); 0,3mg/mL (TMIE3). Napomena: rastvori uzorka su pripremani rekonstitucijom odgovarajuće mase praha u 100ml mili Q vode.

Za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAC) je korišćena *in vitro* fosfomolibdenska metoda, koja se bazira na sposobnosti analiziranih uzoraka da redukuju jone molibdena u kiseloj sredini (Prieto et al., 1999) (Slika 4.36b). Zanimljivo, jako visoke TAC vrednosti su dobijene za čiste rastvore inulina (I). Ovo je verovatno zbog primenjenih uslova u metodlogiji i intenzivne hidrolize (95°C, 90min), čime se oslobađaju molekuli fruktoze koji poseduju dobra redukujuća svojstva. Sa druge strane, TAC vrednosti za 0,5% i 1% M i TM rastvore su bile niske, dok za njihove 0,1% rastvore TAC vrednosti nisu detektovane, što je takođe posledica primenjene metodologije i činjenice da u kiseloj sredini dolazi do izoelektrične precipitacije proteina, čime se smanjuje njihov redukcioni kapacitet. Drugi autori su takođe pokazali sposobnost proteina kozijeg mleka da redukuju molibden jone, ispitujući kozije mleko i kefir (Kostić et al., 2021; Nehir El et al., 2015). Imajući ovo u vidu, visokim TAC vrednostima za IE i TMI rastvore (0,1% 0,5% i 1%), verovatno najviše doprinosi inulin. TAC vrednosti za TMIE formulacije su se povećavale sa povećanjem količine IE praha redom u TMIE1 TMIE2 i TMIE3 uzorcima: 8,89, 14,34, i 16,34 µg(AA)/mL, za 0,1% rastvore; 33,98, 58,89, i 84,98 µg(AA)/mL, za 0,5% rastvore; i 81,07, 120,8, i 197,25 µg(AA)/mL, za 1% rastvore. Ovim TAC vrednostima TMIE uzoraka su najviše doprineli inulin i fenolna jedinjenja. Ove vrednosti su bile značajno niže od TAC vrednosti koje su odredili Kostić et al. (2021) za rastvor kozijeg mleka obogaćenog polenom (1046,9 µg(AA)/mL), a ove razlike se mogu pripisati koncentraciji rastvora za koju je TAC vrednost određivana.

Redukujuća moć je određena na osnovu sposobnosti analiziranih uzoraka da redukuju jone gvožđa (Gülçin, 2012). Kao što se može videti (Slika 4.36c), svi M, TM, I, TMI rastvori (0,1; 0,5; i 1%), nisu pokazivali redukujuću moć, što znači da proteini kozijeg mleka i inulin ne redukuju jone gvožđa. Drugi autori su takođe dobili niske vrednosti i slabu sposobnost proteina mleka da redukuju jone gvožđa (Abd El-Fattah et al., 2020; Kılıç Bayraktar et al., 2019). Sa druge strane, najviše vrednosti su dobijene za IE uzorak, sa izraženom tendencijom rasta u rastvorima sa povećanim IE sadržajem (115,95; 235,9; i 429,76 µg(AA)/mL), čemu doprinose fenolna jedinjenja. Redukujuća moć TMIE uzoraka se povećavala sa povećanjem TMIE sadržaja u rastvorima (0,1% 0,5% i 1%) i sa povećanjem količine IE praha u TMIE formulacijama. Treba naglasiti da su 0,1% TMIE2 i TMIE3 rastvori imali jako niske vrednosti za redukuću moć, koje se nisu statistički značajno razlikovale, dok 0,1% TMIE1 rastvor nije pokazao redukujuću sposobnost. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim za TME uzorke (poglavlje 4.3.2.10), što znači da su fenolna jedinjenja ključni redukujući agensi u TMIE formulacijama.

Svi analizirani uzorci, osim čistog inulina (I) su imali izraženu sposobnost da doniraju jone vodonika i neutrališu $ABTS^{\bullet+}$ i $DPPH^{\bullet}$ radikale, u svim pripremljenim rastvorima (Slika 4.36d,e). Ako se uzme u obzir činjenica da je sposobnost neutralisanja radikala za oba testa izražena u istim ekvivalentima, jasno se vidi da su $ABTS^{\bullet+}$ vrednosti značajno više u poređenju sa $DPPH^{\bullet}$ vrednostima. Ovo može biti zbog relativno hidrofobne prirode $DPPH^{\bullet}$ radikala, njihove selektivne reakcije sa donorima vodonika, slabijom interakcijom sa polarnim molekulima, smanjenom sposobnošću da napadaju makromolekule kao što su proteini u rastvoru (Serpen et al., 2012), kao i zbog tendencije da daju manju reakciju sa dominantnim fenolnim jedinjenjima semenke grožđa, katehinom i galnom kiselinom (Tabart et al., 2009). Najvišu aktivnost u neutralisanju oba radikala, su imali IE rastvori, čemu doprinose fenolna jedinjenja. Prethodno analizirani model matriksi inulina sa paradajz sosom (Tomas et al., 2017), pireom kupine (Tomas et al., 2020) i fenolnim ekstraktima *jussara* voća (Bernardes et al., 2019) su pokazali dobru sposobnost neutralisanja $ABTS^{\bullet+}$ i/ili $DPPH^{\bullet}$ radikala. Sa druge strane, M, TM i TMI uzorci su takođe pokazali sposobnost u neutralisanju $ABTS^{\bullet+}$ i $DPPH^{\bullet}$ radikala, ali je aktivnost ovih rastvora bila značajno manja u poređenju sa IE rastvorima. Sposobnost neutralisanja radikala ovih uzoraka (M, TM i TMI) je verovatno zbog proteina (Kim et al., 2019; Nehir El et al., 2015) i aminokiselinskih ostataka koji doniraju jone vodonika (Power et al., 2013). Štaviše, primenjen termički tretman (TM) i dodatak inulina (TMI) nije značajno uticao na sposobnost neutralisanja $ABTS^{\bullet+}$ i $DPPH^{\bullet}$ radikala, u poređenju sa sirovim mlekom (M), osim u slučaju 0,5% TMI rastvora ($DPPH^{\bullet}$ radikal). Na osnovu predhodne diskusije, može se zaključiti da proteini i fenolna jedinjenja zajedno doprinose aktivnosti TMIE uzoraka i njihovoj sposobnosti u neutralisanju

$ABTS^{\bullet+}$ i $DPPH^{\bullet}$ radikala. Vrednosti dobijene za sposobnost neutralisanja $DPPH^{\bullet}$ radikala za 0,1% TMIE rastvore se nisu značajno razlikovale od vrednosti 0,1% TM i TMI rastvora, što znači da na ovom koncentracionom nivou efekat fenolnih jedinjenja u neutralisanju $DPPH^{\bullet}$ radikala ne dolazi do izražaja. Međutim, dalje povećanje koncentracije rastvora (0,5% i 1%) i količine IE praha u TMIE uzorcima je uticalo na povećanu sposobnost uklanjanja $DPPH^{\bullet}$ radikala. Sa druge strane, vrednosti dobijene za sposobnost neutralisanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala za 0,5% TMIE rastvore se nisu statistički značajno razlikovale međusobno i u poređenju sa vrednostima za 0,5% TM rastvor. Međutim, vrednosti za 0,1% i 1% TMIE rastvore su pokazale povećanu aktivnost u neutralisanju $ABTS^{\bullet+}$ radikala, sa povećanjem koncentracije IE praha u TMIE uzorcima (TMIE1<TMIE2<TMIE3). Generalno, kod TMIE uzoraka nije primećen progresivni rast u neutralisanja $ABTS^{\bullet+}$ i $DPPH^{\bullet}$ radikala, sa povećanjem sadržaja TMIE praha u rastvorima, sem kod $ABTS^{\bullet+}$ što može biti zbog međusobnih protein-inulin-fenolna jedinjenja interakcija u ovim kompleksnim matriksima (Jakobek, 2015; Jakobek & Matić, 2019; Kusuda et al., 2006; Schaller-Povolny & Smith, 2002) kao i različite distribucije micelarno vezanih i rastvornih IE, IE/WP/CN kompleksa (slika 4.31c,d). Mali broj studija se bavi multikomponentnim uzorcima, što otežava poređenje dobijenih rezultata za TMIE uzorke sa literaturnim podacima. Međutim, nekoliko studije su pokazale da dodatak fenolnih ekstrakata u model napitke kozijeg mleka utiče na poboljšanje njihove antioksidativne aktivnosti i sposobnosti neutralisanja $ABTS^{\bullet+}$ i/ili $DPPH^{\bullet}$ radikala (He et al., 2016; Komes et al., 2017; Sharma et al., 2021).

Svi analizirani uzorci, osim čistog inulina i IE praha, su imali dobra helirajuća svojstva (Slika 4.36f). Kao što se može videti, helirajuća svojstva su progresivno rasla sa povećanjem sadržaja M, TM, TMI i TMIE u rastvorima, dok za isti sadržaj praha u rastvoru nije pronađena statistički značajna razlika među ovim uzorcima. Dobra helirajuća svojstva ovih uzoraka su zbog proteina mleka, jer je pokazano da inulin i fenolna jedinjenja nemaju ili imaju veoma malu sposobnost heliranja. Dobra helirajuća svojstva proteina kozijeg mleka su prethodno pokazali drugi autori ispitujući funkcionalne aditive na bazi proteina kozijeg mleka (De Gobba et al., 2014; Kostić et al., 2021; Li et al., 2013).

4.3.4. Funkcionalni jogurti obogaćeni ekstraktom semenke

4.3.4.1. Teksturalna svojstva jogurta

Najviše vrednosti za sve teksturalne parametare su imali jogurti fermentisani samo sa *L.plantarum*-om (P_{jo} i PE_{jo}), dok je najniže vrednosti imao jogurt sa ekstraktom koji je fermentisan starterom i *L.plantarum*-om (SEP_{jo})(Tabela 4.25). Razlike u teksturalnim svojstvima mogu biti zbog dodatog ekstrakta u jogurte i efekta različitih starter kultura korišćenih u fermentaciju. Efekat termičkog tretmana se u ovom slučaju može zanemariti jer su svi model jogurti pripremani od kozijeg mleka koje je na identičan način termički tretirano. Jogurti sa ekstraktom fermentisani starterom (SE_{jo}), su imali značajno niža sva teksturalna svojstva u poređenju sa jogurtom bez dodatog ekstrakta (S_{jo}), što može biti zbog inkorporacije fenolnih jedinjenja u strukturu gela, preuređenju kazeinske mreže i potencijalnih interakcija između fenolnih jedinjenja i proteina koje smanjuju čvrstinu matriksa. U fermentisanim mlečnim napitcima proteinska mreža (gel) se formira najčešće kao rezultat hidrofobnih i elektrostatičkih interakcija između proteina. Dodatak fenolnih ekstrakta u jogurte narušava ove interakcije, što doprinosi smanjenom kapacitetu zadržavanja vode, povećanju sinerezisa i smanjenoj čvrstoći gela (Kandylis et al., 2021). Sa druge strane, dobijene vrednosti za čvrstinu i konzistenciju jogurata fermentisanih *L.plantarum*-om bez i sa ekstrakom (P_{jo} i PE_{jo}), se nisu značajno razlikovale, što se može objasniti manjim prisustvom fenolnih jedinjenja u matriksu PE_{jo} (prema UHPLC DAD MS/MS analizi liofilisanih jogurta, tabela 4.27.) nego kod SE_{jo} najverovatnije kao posledica sposobnosti *L.plantarum* soja da razgrađuje fenolna jedinjenja (Rodríguez-Durán et al., 2011). Međutim, vrednosti za kohezivnost i indeks viskoznosti jogurta fermentisanog samo sa *L. plantarum* sojem bila je značajno viša za 1,6-1,9 puta, odnosno 2,4-3,6 puta od svih analiziranih formulacija jogurta, redom. Kohezivnost odražava tendeciju proizvoda da se njegovi strukturni elementi drže zajedno, odnosno snagu intermolekulskih sila, koje su očigledno značajno više kod P_{jo} jogurta u odnosu na druge ispitivane formulacije. Ovi rezultati ukazuju na potencijalnu produkciju egzopolisaharida ovog soja mlečnih bakterija tokom fermentacije kozijeg jogurta, koji dodatno povezuju proteinsku mrežu kiselog gela povećavajući viskozitet i kohezivnost u odnosu na druge ispitivane jogurte. Drugačija tekstura P_{jo} jogurta u odnosu na druge jogurte, uočena je i na SEM slikama liofolisanih jogurata (slika 4.44). Takođe, ovu tvrdnju dodatno podržavaju rezultati elektroforetske analize liofilisanih jogurata (podpoglavlje 4.3.5.3). Utvrđeno je da određeni sojevi *L. plantarum*-a sintetišu egzopolisaharide (Silva et al., 2019) koji daju veću kohezivnosti i viskoziteta jogurta u odnosu na jogute proizvedene *L. delbrukii* subs. *bulgaricus* sojem, koji je sastavni deo primenjene starter kulture u ovim eksperimetima (Nikitina et al., 2022). U prisustvu fenolnog ekstrakta, potencijalna produkcija egzopolisaharada je moguće delom bila inhibirana kod PE_{jo} jogurta i/ili je onemogućeno njihovo povezivanje sa proteinskim matriksom, na šta ukazuju dobijeni podaci za kohezivnost i indeks viskoznosti, a što potvrđuje SEM slika (Slika 4.44) i elektorforetska analiza (slika 4.39c) liofilisanog PE uzorka. Treba naglasti da je kod ovog uzorka, u odnosu na druge uzorke jogurta sa ekstraktom semenke, vrednost indeksa viskoznosti bila najveća, ali se nije razlikovala od vrednosti dobijene za jogurt fermentisan samo starter kulturom.

Najniže vrednosti za sva teksturalna svojstva je imao jogurt sa ekstraktom koji je fermentisan sa starterom i *L.plantarum*-om (SEP_{jo}), što se može objasniti prisustvom fenolnih jedinjenja u matriksu. U ovom slučaju, u prisustvu starter kulture očigledno nije došla do izražaja tanazna aktivnost *L.plantarum* soja, što bi smanjilo sadržaj fenolnih jedinjenja, i doprinelo poboljšanju teksturalnih svojstava ovog jogurta. Međutim, u ovom tipu jogurta najverovatnije nije došla do izražaja ni sposobnost sinteze egzopolisaharida od strane *L. plantarum*-a, pa se značajno smanjenje čvrstine i konzistencije u odnosu na druge uzorke može protumačiti interakcijama fenolnih jedinjanja sa proteinskim matriksom ometajući čvrstinu formirane proteinske mreže, na šta ukazuje SEM i elektroforetska analiza SEP uzorka (slika 4.44 i 4.39c, redom). Teksturalana svojstva SEP_{jo} jogurta najpribližnija su SE_{jo} što pokazuje da starter kultura ima najviše uticaja na njegovu teksturu. Rezultati za teksturalna svojstva svih model jogurata su u saglasnosti sa UHPLC MS/MS rezultatima za sadržaj fenolnih jedinjenja ekstrakata liofilisanih jogurata (Tabela 4.27). Rezultati za tekturalna svojstva jogurata u ovoj disertaciji su u saglasnosti sa rezultatima drugih studija, koje su takođe pokazale nisku

čvrstoću, slabu konzistenciju i kohezivnost jogurta napravljenog od kozijeg mleka (Hovjecki et al., 2021; Hovjecki et al., 2020; Miocinovic et al., 2015).

Tabela 4.25. Teksturalna svojstva jogurata od kozjeg mleka sa dodatkom ekstrakta, fermentisani starterom i *L. plantarum*-om.

Parametar	S_{jo}	SE_{jo}	P_{jo}	PE_{jo}	SEP_{jo}
Čvrstina (g)	22,11±0,05^{a}	21,08±0,04^{b}	22,22±0,51^{ac}	23,19±0,33^{c}	19,63±0,04^{d}
Konzistencija (gs)	586,55±0,73^{a}	554,63±0,09^{b}	586,91±15,07^{ac}	607,27±12,64^{c}	516,52±3,48^{d}
Kohezivnost (g)	18,96±0,15^{a}	17,11±0,03^{b}	32,45±2,60^{c}	18,52±0,25^{a}	17,14±0,22^{b}
Indeks viskoziteta (gs)	31,62±1,54^{a}	25,73±0,51^{b}	84,76±9,39^{c}	34,99±2,25^{a}	23,65±1,62^{b}

Podaci su prikazani kao srednje vrednosti±standardna devijacija (n=3). Vrednosti koje su označene sa istim slovom u istom redu nisu statistički značajno različite prema *t*-testu, (p<0,05). Skraćenice: jogurt bez ekstrakta, fermentisan starter kulturom (S_{jo}); jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom (SE_{jo}); jogurt bez ekstrakta, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem (P_{jo}); jogurt sa ekstraktom, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem (PE_{jo}); jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom i odabranim *L. plantarum* sojem zajedno (SEP_{jo}).

4.3.4.2. Senzorna analiza jogurta

Vrednosti za prosečne ocene senzornih svojstava, procenat maksimalno mogućeg kvaliteta i ponderisana srednja ocena za različite model jogurte od kozijeg mleka, su prikazane u Tabeli 4.26. Svi uzorci jogurta su imali karakterističnu belu boju, bez primetnog sinerezisa ili okom vidljivih atipičnih promena (Slika 4.37), što potvrđuju najviše ocene članova ocenjivačkog panela za opšti izgled jogurata. Međutim, razlike među uzorcima su primećena za druge ocenjivane parametre (miris, ukus, tekstura). Kozije mleko odlikuje prepoznatljiv, jak i intenzivan miris, odnosno specifičan ukus, čemu prvenstveno doprinose tipične slobodne masne kiseline (kaprilna, kapronska i kaprinska)(Park, 2017), koje imaju nizak prag percepcije. Iz navedenog razloga, u kozije mleko i proizvode na bazi kozijeg mleka se često dodaju različiti ekstrakti kako bi se poboljšala senzorna prihvatljivost (Dos Santos et al., 2017; Komes et al., 2017; Ranadheera et al., 2012). Jogurti fermentisani sa *L.plantarum*-om (Pjo, PEjo i SEPjo) su ocenjeni nižim ocenama za miris, što se može povezati sa drugačijom lipolitičkom aktivnošću primenjenog *L.plantarum* soja u odnosu na starter kulture. Štaviše, Lang et al. (2022) su pokazali izmene lipidnog i masnokiselinskog profila jogurata koji su fermentisani sa miks starter kulturama i *L.plantarum* A3 sojem. Sa druge strane, jogurti fermentisani samo sa starterom (Sjo i SEjo) su ocenjeni sa najvišim ocenama za miris od strane članova ocenjivačkog panela, i okarakterisani su kao jogurti sa tipičnim mirisom za kozije jogurte.

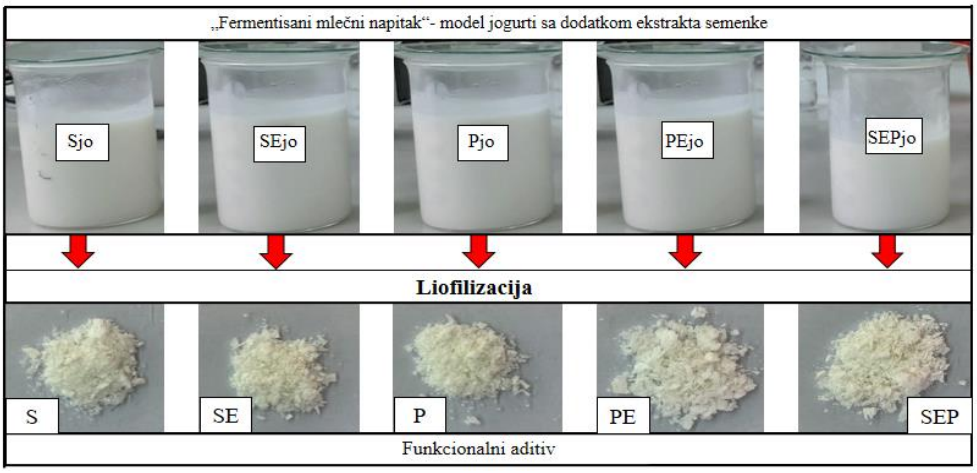
Tabela 4.26. Senzorna ocena jogurta od kozijeg mleka sa dodatkom ekstrakta, fermentisani starterom i *L.plantarum*-om

Parametri	**JOGURTI**				
	S_{jo}	SE_{jo}	P_{jo}	PE_{jo}	SEP_{jo}
Opšti izgled	5,00±0,00	5,00±0,00	5,00±0,00	5,00±0,00	5,00±0,00
Miris	5,00±0,00	5,00±0,00	4,70±0,27	4,40±0,42	4,70±0,67
Ukus	4,90±0,22	4,40±0,55	3,80±0,27	3,40±0,42	4,20±0,57
Tekstura	5,00±0,00	5,00±0,00	4,70±0,27	4,10±0,42	5,00±0,00
% max mogućeg kvaliteta	99,5	97	91	84,5	94,5
Ponderisana srednja ocena	4,98	4,85	4,55	4,22	4,73

Podaci su prikazani kao srednje vrednosti±standardna devijacija (n=5).

Jogurtima sa dodatkom ekstrakta su dodeljene niže ocene za ukus, a članovi panela su ove jogurte okarakterisali kao blago kiselkaste, umereno gorke, opore i adstringentne, što je verovatno zbog dodatog ekstrakta semenke koji je bogat procijanidinima i flavan-3-olima. Štaviše, pojedini članovi panela su primetili da su jogurti sa dodatkom ekstrakta pokazali delimično neutralisan ukus kozijeg mleka. Druge studije su takođe pokazale povećanu kiselost i atipičan ukus jogurata sa dodatkom voćnog soka (Ranadheera et al., 2012), ili izraženu gorčinu i trpkost za jogurte koji su obogaćeni ekstratima lekovitog bilja (Komes et al., 2017). Niže ocene za teksturu su dodeljene jogurtima koji su fermentisani samo sa *L. plantarum*-om (Pjo i PEjo), dok su ostali jogurti dobili najviše ocene za teksturu. Kod jogurata sa nižom ocenom za teksturu (Pjo i PEjo) je primećena viskoznija i sluzava struktura gela, što je verovatno zbog potencijalne produkcije egzopolisaharida poreklom od

primenjenog *L.plantarum* soja. Prethodno su Hovjecki et al. (2021), registrovali prisustvo tegljive i sluzave teksture za kozije jogurte, koji su predtretirani sa mikrobnim transglutaminazama.



Slika 4.37. Jogurti sa dodatokom ekstrakta semenke fermentisani sa starter kulturom (Yoflex-812) i *Lactobacillus plantarum*-om, i njihovi liofilisani prahovi kao potencijalni fermentisani funkcionalni aditivi. Oznake: jogurt bez ekstrakta, fermentisan starter kulturom (Sjo); jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom (SEjo); jogurt bez ekstrakta, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem (Pjo); jogurt sa ekstraktom, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem (PEjo); jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom i odabranim *L. plantarum* sojem zajedno (SEPjo); liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan starter kulturom (S); liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom (SE); liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem (P); liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem (PE); liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom i odabranim *L. plantarum* sojem zajedno (SEP).

4.3.5. Fermentisani funkcionalni jogurti obogaćeni ekstraktom semenke

4.3.5.1. UHPLC-DAD MS/MS analiza fenolnih jedinjenja iz metanolnih ekstrakata liofilisanih jogurta

Rezultati UHPLC-DAD MS/MS kvantifikacije fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima liofilisanih jogurta (S, SE, P, PE, SEP) i njihovih kontrolnih mleka (So, SEo, Po, PEo, SEPo) su prikazani u Tabeli 4.27 (podaci za kvantifikaciju, Tabela P5). Radi lakšeg poređenja i tumačenja rezultata, fenolni profil rekonstituisanog SOES uzorka je preuzet iz poglavlja 4.3.2.1. U metanolnim ekstraktima So, S, Po i P uzoraka nisu detektovana fenolna jedinjenja, što je očekivano ako se uzme u obzir da su u pitanju proteinski matriksi. Fenolna jedinjenja su detektovana samo u liofilisanim uzorcima sa dodatkom ekstrakta, dok je samo nekoliko karakterističnih i dominantnih fenolnih jedinjenja kvantifikovano. Sadržaj ukupnih (9,88 (PEo), 11,41 (SEo) i 15,02 (SEPo) mg/kg SM) i pojedinačno kvantifikovanih fenolnih jedinjenja (osim kampferola i izoramnetin-3-O-glukozida) u liofilisanim uzorcima mleka (~0,1mgTPC/mL punomasno mleko-ekstrakt mešavina), je bio sličan sa predhodnim rezultatima za TMIE1 (0,1mg/mL mleko-inulin-ekstrakt mešavina) i TME1 (0,2mg/mL mleko-ekstrakt mešavina) funkcionalne prahove. Male varijacije u sadržaju fenolnih jedinjenja među ovim uzorcima mogu biti zbog načina njihove pripreme (sprej sušenje ili liofilizacija) i sastava (punomasno ili odmašćeno mleko). Međutim, sadržaj ukupno kvantifikovanih fenolnih jedinjenja je bio značajno viši (skoro dva puta) u uzorcima liofilisanih jogurta (SEP, SE i PE), u poređenju sa njihovim liofilisanim uzorcima mleka, čemu doprinosi visok sadržaj kumarinske kiseline. Najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je potvrđen u SEP uzorku koji je primarno fermentisani starter kulturom i *L. plantarum*-om (28,90 mg/kg SM uzorka), verovatno zbog smanjene tanazne aktivnosti *L.plantaruma* u prisustvu startera i sinerigstičkog delovanja odabranih sojeva na održivost fenolnih jedinjenja u matriksu. Visok sadržaj kumarinske kiseline u liofilisanim jogurtima je verovatno zbog uticaja bakterijskih sojeva koji tokom fermentacije raskidaju estarke veze kumaroilvinske kiseline i oslobađaju kumarinsku kiselinu. Sadržaj kumarinske kiseline nije potvrđen u SOES uzorku. Međutim, visok sadržaj kumaroilvinske kiseline je prethodno potvrđen UHPLC-

Orbitrap MS^4 analizom vodenog ekstrakta semenke (Tabela 4.18), koji je korišćen u formulaciji ovih liofilisanih jogurta. Takođe treba spomenuti da je među liofilisanim jogurtima (SEP, SE i PE), najmanji sadržaj *p*-kumarinske kiseline potvrđen u liofilisanom jogurtu koji je primarno fermentisan *L. plantarum* sojem (PE), što može biti zbog potencijalne transformacije dela *p*-kumarinske kiseline pod uticajem dekarboksilaze *p*-kumarinske kiseline koja je karakteristična za *L. plantarum* sojeve (Cavin et al., 1997; Rodríguez et al., 2010). Zanimljivo, kofeinska kiselina je u malim količinama kvantifikovana samo u kontrolnim liofilisanim uzorcima mleka (SEPo, SEo i PEo), dok u liofilisanim jogurtima nije detektovana, iako je prethodnom UHPLC Orbitrap MS^4 analizom takođe potvrđena značajna količina derivata kofeoilvinske kiseline (Tabela 4.18). Sadržaj galne kiseline u SEo i SE, kao i u SEPo i SEP uzorcima se nije statistički značajno razlikovao, međutim sadržaj galne kiseline u liofilisanom jogurtu koji je primarno fermentisan sa *L.plantarum* sojem (PE) je bio značajno manji nego u njegovom kontrolnom uzorku mleka (PEo). Ovo može biti zbog aktivnosti *L. plantarum* soja koji poseduje tanaznu aktivnost, i uključuje delovanje enzima tanaze i galatdekarboksilaze, koji verovatno delimično katališu razgradnju galne kiseline do pirogalola (Rodríguez-Durán et al., 2011). Među analiziranim flavan-3-olima, samo katehin i katehin galat su detektovani u metanolnim ekstraktima uzoraka koji sadrže ekstrakt, a sadržaj oba jedinjenja se nije statistički značajno razlikovao između liofilisanih jogurata (SEP, SE i PE) i njihovih kontrolnih uzoraka mleka (SEPo, SEo i PEo). Glikozidi kvercetina (kvercetin-3-glukozid i rutin) su detektovani u malim količinama, a njihov sadržaj se nije značajno razlikovao među analiziranim liofilisanim uzorcima. Generalno nizak sadržaj detektovanih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima liofilisanih jogurata i mleka, kao i odsustvo nekih jedinjenja koja su detektovana u SOES uzorku (protokatehinska kiselina, siringinska kiselina, kvercetin, izoramnetin, kampferol, naringenin, eskuletin), takođe može biti zbog njihovog zadržavanja u matriksu, jer su analizirani liofilisani jogurti multikomponentni sistemi sa idealnom strukturom za inkorporaciju fenolnih jedinjenja.

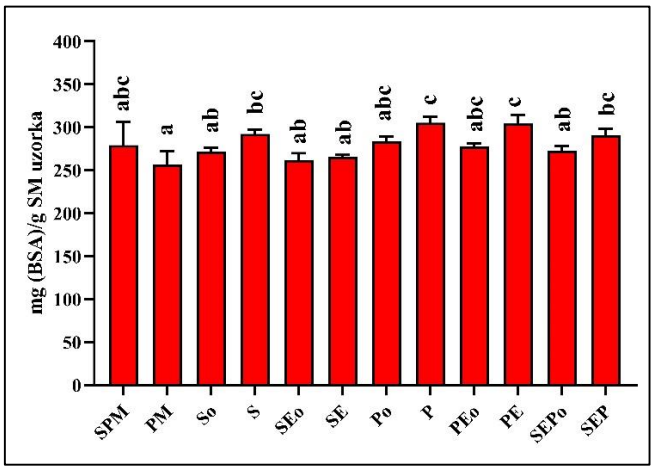
Tabela 4.27. Sadržaj polifenola i fenolnih kiselina (mg/kg SM uzorka), u liofilisanim uzorcima mleka i jogurata sa/bez dodatka ekstrakta.

Uzorci Jedinjenja (mg/kg SM uz.)	**SOES***	**So**	**S**	**SEo**	**SE**	**Po**	**P**	**PEo**	**PE**	**SEPo**	**SEP**
Fenolne kiseline (HB+HC)											
Galna kiselina	224,17±3,94	n.d.	n.d.	3,15±0,074^{a,A}	3,036±0,146^{a,A}	n.d.	n.d.	3,108±0,084^{a,A}	2,732±0,033^{a,B}	3,772±0,107^{b,A}	3,59±0,196^{b,A}
Protokatehinska kiselina	2,43±0,08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kofeinska kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	0,215±0,014^{a}	n.d.	n.d.	n.d.	1,025±0,037^{b}	n.d.	0,226±0,026^{a}	n.d.
Siringinska kiselina	1,84±0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
p-Kumarinska kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	2,878±0,114^{a,A}	16,416±0,951^{a,B}	n.d.	n.d.	1,353±0,116^{a,A}	11,616±0,958^{b,B}	4,961±0,199^{b,A}	19,896±1,252^{c,B}
Flavan-3-oli i njihovi derivati											
Katehin	518,28±14,73	n.d.	n.d.	4,03±0,154^{a,A}	4,01±0,111^{ab,A}	n.d.	n.d.	3,335±0,103^{b,A}	3,688±0,132^{a,A}	4,779±0,12^{c,A}	4,149±0,146^{b,B}
Katehin galat	8,36±0,13	n.d.	n.d.	0,544±0,031^{a,A}	0,499±0,023^{ab,A}	n.d.	n.d.	0,51±0,032^{a,A}	0,471±0,019^{a,A}	0,541±0,024^{a,A}	0,544±0,026^{b,A}
Galokatehin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Epigalokatehin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Epigalokatehin galat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ostali detektovani polifenoli											
Kvercetin	32,66±2,10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kvercetin-3-glukozid	1,51±0,07	n.d.	n.d.	0,225±0,022	0,252±0,022	n.d.	n.d.	0,201±0,013	0,246±0,031	0,236±0,016	0,213±0,011
Rutin	0,30±0,02	n.d.	n.d.	0,365±0,032	0,358±0,021	n.d.	n.d.	0,354±0,021	0,351±0,015	0,354±0,016	0,352±0,018
Izoramnetin	17,31±0,87	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kampferol	7,90±0,34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Apigenin-7-glukozid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,153±0,012	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,154±0,021	0,154±0,019
Naringenin	0,81±0,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Eskuletin	2,79±0,20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Σ Σ	**820,59**	**/**	**/**	**11,406**	**24,725**	**/**	**/**	**9,885**	**19,103**	**15,022**	**28,899**

Vrednosti su dobijeni iz tri nezavisna merenja (n=3) i prikazane kao srednje vrednosti ±standardna devijacija. Mala slova označavaju poređenje za svaki uzorak mleka i jogurta posebno, a velika slova označavaju poređenja između jogurta i njegovog kontrolnog mleka posebno. Različita slova označavaju statistički značajne razlike prema *Tukey's* testu ($p<0,05$). Skraćenice: „n.d."-nije detektovan; HB-hidroksibenzoeva kiselina; HC-hidroksicimetna kiselina; So-liofilisano mleko+starter kultura; S-liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan starter kulturom; SEo-liofilisano mleko/ekstrakt+starter kultura; SE- liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom; Po-liofilisano mleko+odabrani *L.plantarum* soj; P- liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem; PEo-liofilisano mleko/ekstrakt+odabrani *L. plantarum* sojem; PE-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem; SEPo-liofilisano mleko/ekstrakt+starter kultura+odabrani *L. plantarum* sojem; SEP- liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom i odabranim *L. plantarum* sojem zajedno. *SOES-sprej osušen ekstrakt semenke rekonstituisan u 80% metanolu+0,1%HCl, rezultat preuzet iz poglavlja 4.3.2.1. Oznake koje imaju sufiks „o" označavaju početne mešavine mleka ili mleka/ekstrakta kao kontrole fermentisanim napicima-jogurtima. Napomena: Liofilisani fermentisani funkcionalni aditivi su ekstrahovani 80%metanolom+0,1%HCl, iz kojih je dalje vršena kvantifkacija fenolnih jedinjenja (UHPLC-DAD MS/MS).

4.3.5.2. Sadržaj ukupnih ekstraktibilnih proteina liofilisanih jogurta

Rezultati za sadržaj ukupnih ekstraktibilnih proteina liofilisanih jogurta su bili u opsegu od 265,5±2,08 (SE) do 305,1±7,3 (S) mg(BSA)/g SM (Slika 4.38), a male varijacije među uzorcima mogu biti zbog prisustva fenolnih jedinjenja u uzorcima. Sadržaj ekstraktibilnih proteina u liofilisanim uzorcima polaznog punomasnog mleka (SPM), pasterizovanog mleka (90°C, 5min) (PM) i kontrolnih mešavina mleka ili mleko/ekstrakt (So, SEo, Po, PEo i SEPo), se nije statistički značajno razlikovao. Dobijeni rezultati za liofilisane uzorke u ovoj studiji su bili u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Kamizake et al. (2003) za prahove kravljeg mleka pre/posle uklanjanja lipida. Sadržaj ekstraktibilnih proteina u SPM i PM liofilisanim uzorcima je bio značajno viši nego što je prethodno određeno za uzorke odmašćenog mleka korišćenog za dobijanje TME i TMIE prahova, jer se ne radi o istom kozijem mleko korišćenom u eksperimentima. Ove varijacije se mogu pripisati nekim specifičnim faktorima od kojih zavisi sastav kozijeg mleka, kao što su ishrana koza, period laktacije, rasa koza ili spoljašnja temperatura (Park, 2017). Rezultati za sadržaj ekstraktibilnih proteina liofilisanih fermentisanih jogurta (S, SE, P, PE i SEP) i njihovih kontrolnih mleka (So, SEo, Po, PEo i SEPo), se nije statistički značajno razlikovao, posmatrano za svaki tip jogurta posebno. Ovo znači da tokom fermentacije nije došlo do proteolize i nastanka malih peptida koji ne pokazuju reakciju sa Bradfordovim reagensom (Kamizake et al., 2003), što bi doprinelo varijacijama u sadržaju ekstraktibilnih proteina među uzorcima. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa elektroforetskom karakterizacijom.

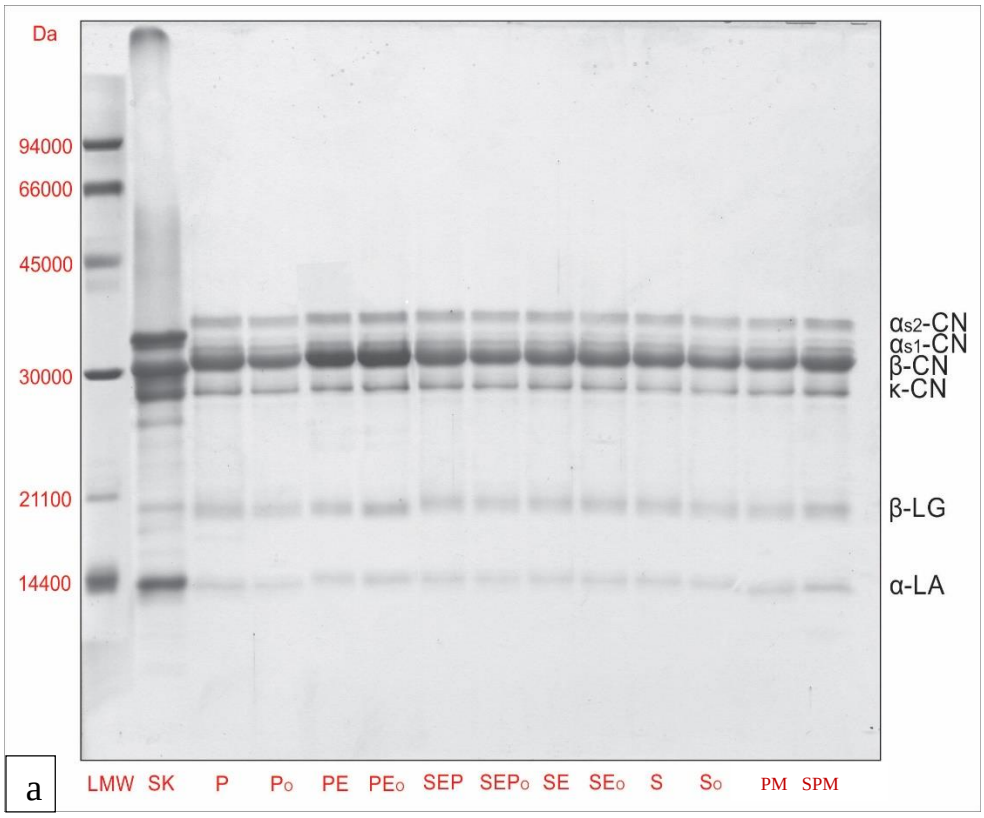


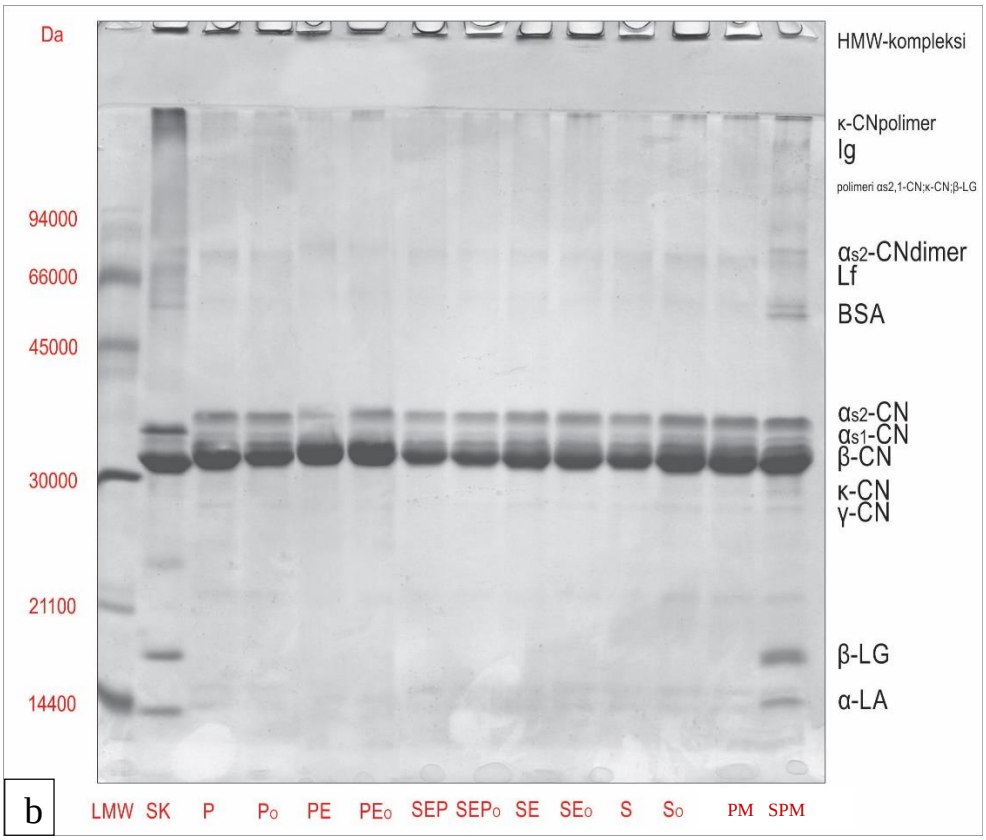
Slika 4.38. Sadržaj ekstraktibilnih proteini u liofilisanim uzorcima mleka i jogurta sa/bez dodatka ekstrakta semenke. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti+standardna devijacija (n=3). Ista mala slova pokazuju da vrednosti nisu statistički značajno različite prema *Tukey's* testu (*p<0,05*). Oznake: SPM-sirovo punomasno kozije mleko; PM-termički tretirano (pasterizovano) punomasno kozije mleko (90°C, 5min); So-liofilisano mleko+starter kultura; S-liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan starter kulturom; SEo-liofilisano mleko/ekstrakt+starter kultura; SE- liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom; Po-liofilisano mleko+odabrani *L.plantarum* soj; P- liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem; PEo-liofilisano mleko/ekstrakt+odabrani *L. plantarum* sojem; PE-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem; SEPo-liofilisano mleko/ekstrakt+starter kultura+odabrani *L. plantarum* sojem; SEP- liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom i odabranim *L. plantarum* sojem zajedno.

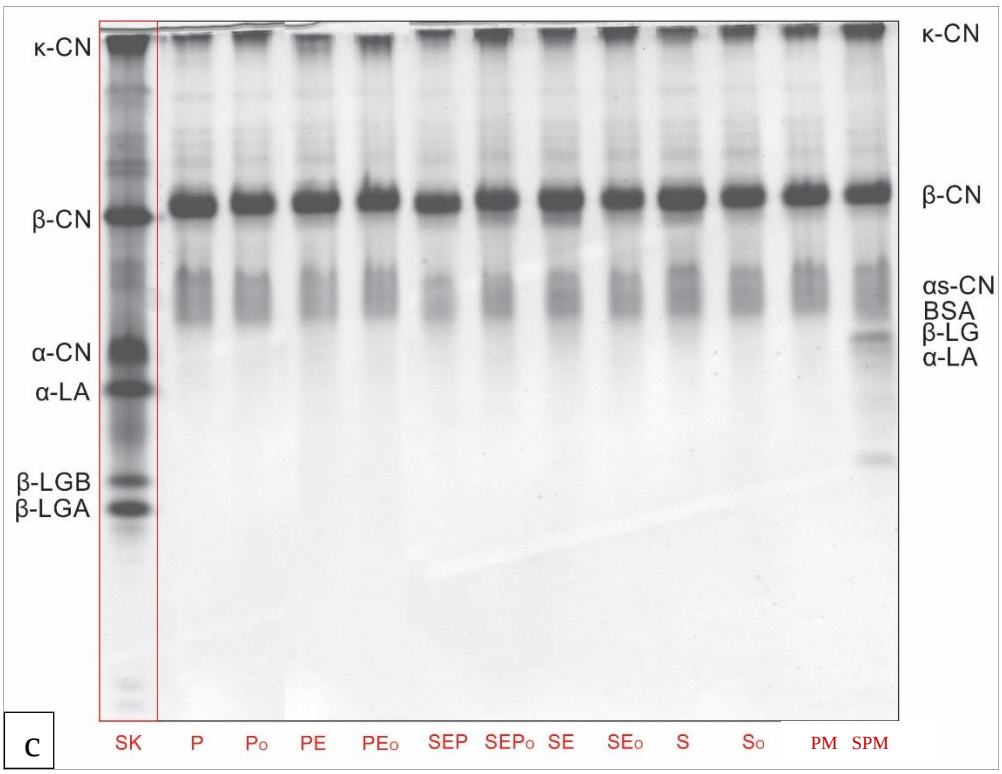
4.3.5.3. Elektroforetska analiza liofilisanih jogurta

Proteinski profili liofilisanih jogurta i njihovih kontrolnih mleka su analizirani korišćenjem tri različite elektroforetske tehnike: (1) SDS-R-PAGE (Slika 4.39a); (2) SDS-NR-PAGE (Slika 4.39b); i (3) Native-PAGE (Slika 4.39c). SDS-R-PAGE profili (Slika 4.39a) svih analiziranih uzoraka su bili identični, sa šest dominantnih traka koje imaju karakterističnu elektroforetsku pokretljivost. Ove trake redom odgovaraju kazeinima (αS1-; αs2-; β-; i κ-CN i) i serum proteinima (β-LG i α-LA) kozijeg mleka. Identične elektroforetske profile su prijavili i drugi autori ispitujući kozije mleko (sirovo i termički tretirano) (Barac et al., 2013; Kostić et al., 2021; Miloradovic et al., 2014; Pesic et al., 2012) i fermentisane napitke (jogurt i kefir) (Hovjecki et al., 2021; Hovjecki et al., 2020; Nehir

El et al., 2015; Simsek et al., 2017). Sličan proteinski profil kontrolnog mleka i fermentisanih uzoraka ukazuje da primenjena fermentacija nije izmenila proteinski sastav kozijeg mleka, iako je poznato da korišćeni soj *Lactobacillus plantarum* (P i PE) ima razvijenu proteolitičku aktivnost koja se u ovoj vrsti matriksa nije ispoljila.







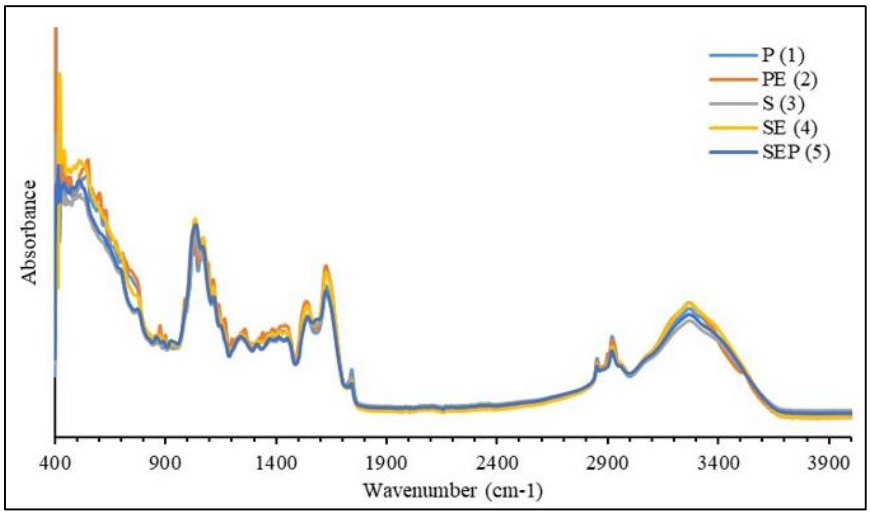
Slika 4.39. Elektroforegrami proteina liofilisanih mleka i jogurta sa/bez dodatka ekstrakta semenke. (a) SDS-R-PAGE (b) SDS-NR-PAGE (c) Native-PAGE-om. Oznake: SPM-sirovo punomasno kozije mleko; PM-termički tretirano (pasterizovano) punomasno kozije mleko (90°C, 5min); So-liofilisano mleko+starter; So-liofilisano mleko+starter kultura; S-liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan starter kulturom; SEo-liofilisano mleko/ekstrakt+starter kultura; SE-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom; Po-liofilisano mleko+odabrani *L.plantarum* soj; P- liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem; PEo-liofilisano mleko/ekstrakt+odabrani *L. plantarum* sojem; PE-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem; SEPo-liofilisano mleko/ekstrakt+starter kultura+odabrani *L. plantarum* sojem; SEP- liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom i odabranim *L. plantarum* sojem zajedno. Skraćenice: LMW-standard molekulskih masa; SK-standard glavnih proteina kravljeg mleka; αs1-CN (αs1-kazein); αs2-CN (αs2-kazein); β-CN (β-kazein); κ-CN (κ-kazein); γ-CN (γ-kazein); β-LG (β-laktoglobulini); α-LA (α-laktalbumin); BSA-serum albumin krvi; Ig-imunoglobulini; Lf-laktoferin; HMW-visokomolekularni kompleksi. Napomena: 2mg odmašćenog liofilisanog uzorka je rekonstituisano u 1mL odgovarajućeg pufera za uzorke; Uokvirena elektroforetska traka (SK) i oznake sa desne strane (slika 4.39c) prikazuje standard glavnih proteina kravljeg mleka i karakterističnu pokretljivost kazeina i serum proteina kravljeg mleka analiziranih Native-PAGEom, dok su ostali uzorci bazirani na kozjem mleku i sa leve strane (Slika 4.39c), su oznake koje pokazuju karakterističnu pokretljivost kozjih kazeina i serum proteina ispitivanih Native-PAGEom.

Svi analizirani uzorci su imali takođe identične SDS-NR-PAGE (Slika 3.39b) i Native-PAGE (Slika 4.39c) profile, osim za uzorak sirovog mleka (SPM) koji je korišćen kao kontrola termičkog tretmana. Ove dve tehnike jasno pokazuju efekat primenjenog termičkog tretmana (pasterizacije) neposredno pre procesa fermentacije. Na SDS-NR-PAGE profilima (Slike 4.39b) svih uzoraka (osim SPM) su jasno vidljive trake na ulazu u gornji gel, koje pripadaju HMW kompleksima, kao i značajno smanjen intenzitet ili odsustvo traka koje odgovaraju κ-CN, γ-CN, αS2-dimerima, β-LG i α-LA, koje učestvuju u formiranju pomenutih HMW kompleksa (Pesic et al., 2012; Pesic et al., 2014). Pored toga, na istom gelu smanjen intenzitet traka koje pripadaju αs2-CN i β-CN u uzorcima može biti zbog njihovog učešća u formiranju WP/CN kompleksa kozijeg mleka (Pesic et al., 2012), ili u uzorcima sa dodatkom ekstrakta (SEo, SE, SEPo, SEP, PEo, PE), može biti zbog prisustva fenolnih jedinjenja koji smanjuju sadržaj proteina u uzorcima. Na SDS-NR-PAGE (Slika 4.39b) i Native-PAGE (Slika 4.39c) gelovima nisu potvrđene nespecifične polipeptidne trake, što znači da tokom fermentacije nije došlo do proteolize i nisu se formirali nespecifični kompleksi, što je u skladu sa rezultatima dobijenim SDS-R-PAGE analizom. Međutim, na Native-PAGE gelu se mogu primetiti varijacije u intenzitetu traka koje odgovaraju WP/CN kompleksima (Slika 4.39c). Kontrolni uzorci (So, SEo, SEPo, PEo i Po) su imali značajno veći intenzitet WP/CN traka, u poređenju sa njihovim liofilisanim jogurtima (S, SE,

SEP, PE i P), što može biti zbog razlika u pH vrednosti kontrolnih i liofilisanih uzoraka. Ferementisani uzorci su imali nisku pH vrednost (<4,6), koja je bliska izoelektričnoj tački proteina kozijeg mleka i koja verovatno uzrokuje dodatnu agregaciju WP/CN kompleksa i smanjuje njihovu rastvorljivost u nedisocijativnim uslovima. Kod uzoraka fermentisanih sa *L. plantarum*-om (P i PE), intenzitet traka WP/CN kompleksa je bio značajno manji u poređenju sa uzorcima koji su fermentisani starter kulturama (S i SE), čemu verovatno doprinose egzopolisaharidi koje potencijalno luči *L.plantarum* (Silva et al., 2019), i koji verovatno dodatno zadržavaju komplekse u precipitatu. Uzorci sa dodatkom ekstrakta (SEo, SE, PEo, PE, SEPo, SEP) su imali povećan intenzitet i izmenjenu pokretljivost traka koje odgovaraju WP/CN kompleksima, u poređenju sa njihovim komplementarnim uzorcima bez dodatka ekstrakta (So, S, Po, P), što može biti zbog interakcija fenolnih jedinjenja i WP/CN kompleksa, koje nisu narušene u nedisocijativnim uslovima (Kusuda et al., 2006). Prisustvo interakcija između fenolna jedinjenja i WP/CN kompleks je primećeno u TME uzorcima ispitivanim u okviru ove disertacije.

4.3.5.4. ATR-FTIR karakterizacija liofilisanih jogurta

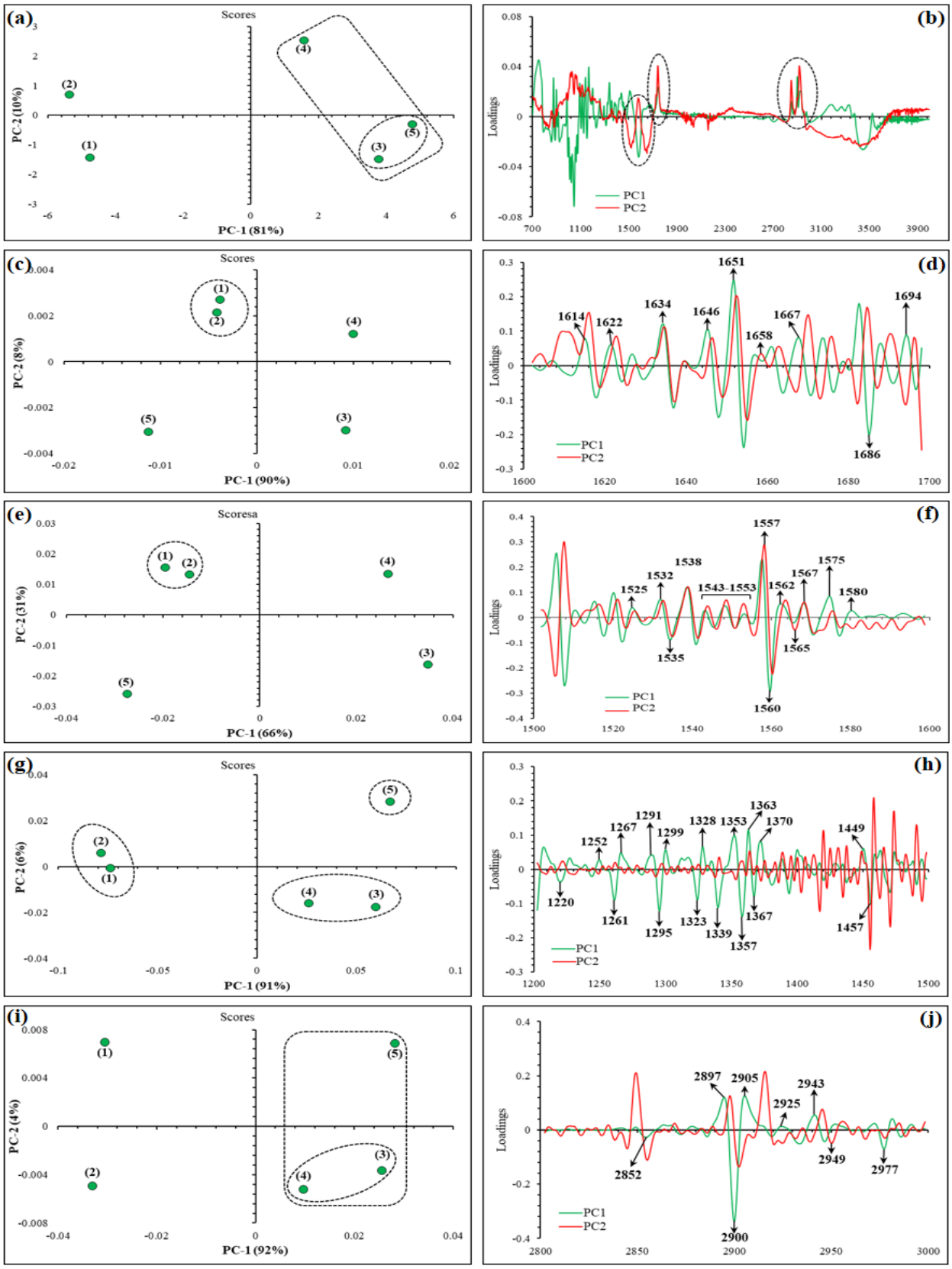
Uzimajući u obzir sastav uzoraka i činjenicu da je u pripremi funkcionalnih jogurta korišćeno punomasno mleko (Slika 4.40), PCA je prvo primenjena na spektru od 700-4000cm^{-1} (Slika 4.41a). Za ovaj region, uzorci sa/bez ekstrakta koji su fermentisani sa *L.plantarum*-om (uzorci 1 i 2), se odvojaju od uzoraka sa/bez ekstrakta koji su fementisani starterom (uzorci 3 i 4), duž PC1, što objašnjava čak 81% ukupne varijanse (Slika 4.41a). Grafik varijabli za ovaj region daje šumu traka, ali sa jasno izraženim trakama koje pripadaju lipidnim regionima (2800-3000cm^{-1} i 1600-1700cm^{-1}); koji očigledno najviše doprinose ovom odvajanju (Slika 4.41b). Štaviše, duž PC1, liofilisani jogurt koji je primarno fermentisan sa obe kulture (starterom i *L. plantarum*-om) (uzorak 5) se grupiše sa uzorcima 3 i 4 (Slika 4.39a), pa se može pretostaviti da u kombinaciji sa starterom, *L. plantarum* nema značajanijeg uticaj na lipidni profil. Duž PC2, fermentisani uzorci sa ekstraktom (2 i 4), su odvojeni od fermentisanih uzoraka bez ekstrkta (1 i 3), sa izraženim trakama u amid I i amid II regionu (Slika 4.41b). Ovom odvajanju verovatno doprinose fenolna jedinjenja i njihove interakcije sa proteinima. Međutim, kako bi se detaljnije procenio: (1) uticaj fermentacije; (2) efekat mikrobnih kultura i njihov afinitet prema pojedinačnim makrokonstituentima (lipidima i proteinima); (3) značaj dodatog ekstrakta; i (4) potencijalne interakcije između fenolnih jedinjenja i proteina; u daljoj analizi je fokus bio posebno na amid I (1600-1700cm^{-1}), amid II (1500-1600cm^{-1}), amid III (1200-1500cm^{-1}), i lipidnom regionu (2800-3000cm^{-1}).



Slika 4.40. ATR-FTIR spektri liofilisanih jogurta sa/bez dodatka ekstrakta semenke. Oznake: S-liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan starter kulturom (3); SE-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom (4); P-liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan odabranim *L.plantarum* sojem (1); PE-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem (2); SEP-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom i odabranim *L. plantarum* sojem zajedno (5).

Za amid I i II region, uzorci 1, 2 i 5 su jasno odvojeni od uzoraka 3 i 4, duž PC1; što objašnjava 90% (amid I) (Slika 4.41c), i 66% (amid II) ukupne varijanse (Slika 4.41e). Odvajanje uzoraka u ova dva regiona je verovatno zbog visokog broja (CFU/g) vijabilnih *L.plantarum* bakterija (Mohd Yusof et al., 2020; Vodnar et al., 2010), čiji sastavni proteini očigledno imaju različite vibracione karakteristike u poređenju sa proteinima mleka ili manje vijabilnih starter kultura. Ovo odvajanje potvrđuju jasno izražene trake za ova dva regiona (amid I i II) (Slika 4.41d,f). Neke trake koje doprinose odvajanju liofilisanih jogurta koji su primarno fermentisani starterom (uzorci 3 i 4), verovatno pripadaju specifičnim vibracijama proteina mleka koji u ovim uzorcima dolaze do izražaja, i mogu se povezati sa vibracijama intermolekularne β-nabrane strukture (1614, 1622, 1686 i 1694cm^{-1}), intramolekularne β-nabrane strukture (1634 cm^{-1}), slučajnih strukturnih namotaja (1646 cm^{-1}), α-heliksa/velikih petlji (1651 i 1543-1553 cm^{-1}), β-okreta (1667 i 1557-1580 cm^{-1}) i β-nabrane strukture (1525-1538 cm^{-1}) (Grewal et al., 2016; Grewal et al., 2017; Markoska et al., 2018; Markoska et al., 2019) (Slika 4.41d,f). Dodatnu potvrdu predhodnih zaključaka daje elektroforetska analiza, koja je pokazala da tokom fermentacije nije došlo do proteolize, što bi potencijalno moglo da utiče na odvajanje uzoraka. Liofilisani jogurti sa/bez dodatka ekstrakta koji su primarno fermentisani starterom, se međusobno razdvajaju duž PC2, za oba amid regiona (amid I i II) (Slika 4.41c,e), čemu verovatno doprinose interakcije između fenolnih jedinjenja i proteina mleka, koje se mogu javiti kod uzoraka sa ekstraktom semenke. Treba imati u vidu da i egzopolisaharidi filamentoznog tipa, koje luči *L. bulgaricus* kao jedna od starter kultura, mogu uticati na izmene u strukturi proteina u ovim uzorcima jer međusobno reaguju prilikom formiranja kiselog gela (De Vuyst & Degeest, 1999), a formiranje polisaharid-protein veza može ometati prisutvo fenolnih jedinjanja, kao što su pokazale prethodne analize. Sa druge strane, liofilisani jogurti sa/bez dodatka ekstrakta koji su primarno fermentisani sa *L. plantarum*-om (uzorci 1 i 2) se grupišu (Slika 4.41c,e). Ovo grupisanje uzoraka 1 i 2 se objašnjava sposobnošću primenjenog *L.plantarum* soja da razgrađuje fenolna jedinjenja, čime se smanjuje mogućnost interakcija između fenolnih jedinjenja i proteina kod uzorka sa ekstraktom (2), a samim tim se ne uočavaju značajnije promene u strukturnim vibracijama proteina između ova dva uzorka u amid I i amid II regionima. Ovako jasno odvajanje ova dva uzorka od ostalih može biti posledica prisustva drugačijih egzopolisaharida koje potencijalno luči *L. plantarum* u odnosu na starter kulture, pa je i priroda samih interakcija sa proteinima drugčija u odnosu na njih (Bachtarzi et al., 2020).

Za amid III regiona, prve dve PCA (PC1 i PC2) su klasifikovale uzorke u tri odvojene grupe, označene kao A grupa (uzorci 1 i 2), B grupa (uzorci 3 i 4) i C grupa (uzorak 5) (Slika 4.41g). Ovom odvajanju među grupama najviše doprinose trake u opsegu od 1200-1370 cm^{-1}, koje se mogu povezati sa sekundarnom strukturom proteina, kao i trake od 1400-1500 cm^{-1}, koje se mogu povezati sa izmenama u lipidnom profilu i lipid-protein interakcijama (Grewal et al., 2016) (Slika 4.41h). Kako su svi uzorci na isti način termički tretirani pre fermentacije i kako nije bilo vidljive proteolize, može se reći da je odvajanju uzoraka u ovom regionu najviše doprinele karakteristične vibracije visoko vijabilnog *L.plantarum* soja i njegov uticaj na lipide, kao i potencijalno prisustvo različitih egzopolisaharida u analiziranim uzorcima. Karakteristike egzopolisaharida koje potencijalno luče *L. plantarum* (uzorci 1 i 2), *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* i *S. thermophilus* (u uzorci 3 i 4), i onih koje luče sva tri soja u uzorku 5 su najverovatnije potpuno različite. Iako karakterizacija ovih polisaharida nije bila predmet ove studije, poznato je da egzopolisaharidi koje potencijalno sintetišu *L. plantarum* sojevi mogu biti filamentozni, pre svega izgrađeni od glukoze, galaktoze, ali mogu imati prisutnu i manozu, ramnozu, fruktozu, N-acetil-glukozamin, galaktozamin, glukozamin i glukuronski kiselinu (Bachtarzi et al., 2020). S druge strane, filamentozni egzopolisaharidi *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* sastavljeni su uglavnom od galaktoze, glukoze i ramnoze (De Vuyst & Degeest, 1999). *S. thermophilus* sojevi mogu i ne moraju da sintetišu filamentozne egzopolisaharide, tako da interakcije sa proteinima mogu i ne moraju biti prisutne u kiselom gelu (Surber et al., 2022). Njihova struktura može značajno varirati od primenjenjog soja i uslova fermentacije pa mogu imati u sastavu galaktozu, glukozu ili ramnozu, samo galaktozu i glukozu ili ramnozu i glukozu, kao i prisustvo fukoze i N-acetilamino šećera (De Vuyst & Degeest, 1999).



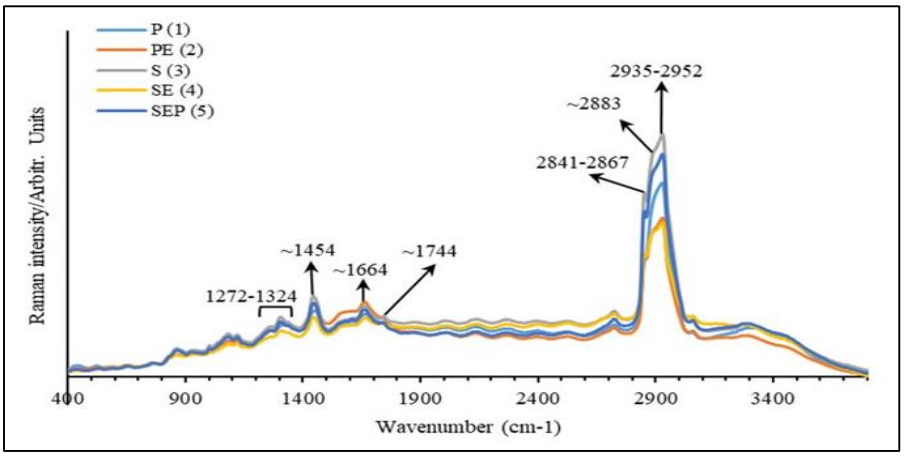
Slika 4.41. Grafici skorova (objekata) i varijabli izvedeni iz ATR-FTIR spektra liofilisanih jogurta sa/bez dodatka ekstrakta semenke, za sledeće spektralne regione: (a, b) 700-4000 cm^{-1}; (c, d) amid I region, 1600-1800 cm^{-1}; (e, f) amid II, 1500-1600 cm^{-1}; (g, h) amid III region, 1200-1500 cm^{-1}; i (i, j) lipidni region, 2800-3000 cm^{-1}. S-liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan starter kulturom (3); SE-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom (4); P-liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan odabranim *L.plantarum* sojem (1); PE-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem (2); SEP-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom i odabranim *L. plantarum* sojem zajedno (5).

Za lipidni region, uzorci primarno fermentisani samo sa *L. plantarum* sojem (uzorci 1 i 2) su odvojeni od ostalih prahova, duž PC1 (92% ukupne varijanse) (Slika 4.41i). Ovom odvajanju su najviše doprinele trake na 2852 (simetrično istezanje CH_2 grupa acilnih lanaca triglicerida i fosfolipida), 2897, 2900, 2905, 2925 (asimetrično istezanje CH_2 grupa acilnih lanaca), 2943, 2949 i 2977 cm^{-1} (Slika 4.41j), što je verovatno posledica izmenjenog lipidnog profila. Predhodne studije su pokazale da neki *L.plantarum* sojevi poseduju lipolitička svojstva jer imaju enzim tributirin esterazu (lipazu)(Esteban-Torres et al., 2014; Lang et al., 2022). Štaviše, ova odvajanja su u saglasnosti sa rezultatima senzorne analize jogurata fermentisanih sa *L.plantarum* sojem neposredno pre liofilizacije, koja pokazuje izražena i atipična mirisna svojstva uzoraka, što se može povezati sa izmenjenim lipidnim profilom. Pored toga, liofilisan jogurt koji je primarno fermentisan *L.plantarum*-om i starterom (uzorak 5), grupiše se duž PC1 sa uzorcima koji su primarno fermentisani sa starterom (3 i 4) (Slika 4.41i), pa se može reći da kod ovog uzorka nisu došla do izražaja lipolitička svojstva *L.plantarum* soja, jer su verovatno primenjene starter kulture bile dominantne tokom fermentacije. Međutim, starter kulture su svojom aktivnošću stvorile uslove za rast *L.plantarum* soja, ali su takođe suzbile njegovu intenzivniju lipolitičku aktivnost kao i potencijalno značajniju sintezu egzopolisaharida. Štaviše, prahovi koji su dobijeni nakon fermentacije kozijeg mleka samo sa *L.plantarum* sojem nastali su u procesu fermentacije koja je trajala znatno duže, što je verovatno doprinelo njihovoj pojačanoj lipolizi. Zanimljivo, prahovi 1 i 5 se odvajaju od ostalih prahova (2,3,4), duž PC2 (Slika 4.41i). Ovo je verovatno zbog vibracija lipida koji su sastavni deo *L.plantarum* bakterija, koje su u velikom broju (CFU/g) bile prisutne u ovim uzorcima, što takođe pokazuju rezultati za vijabilnost bakterija. Međutim, ovo odvajanje objašnjava samo 4% ukupnog varijabiliteta.

4.3.5.5. Raman karakterizacija liofilisanih jogurta

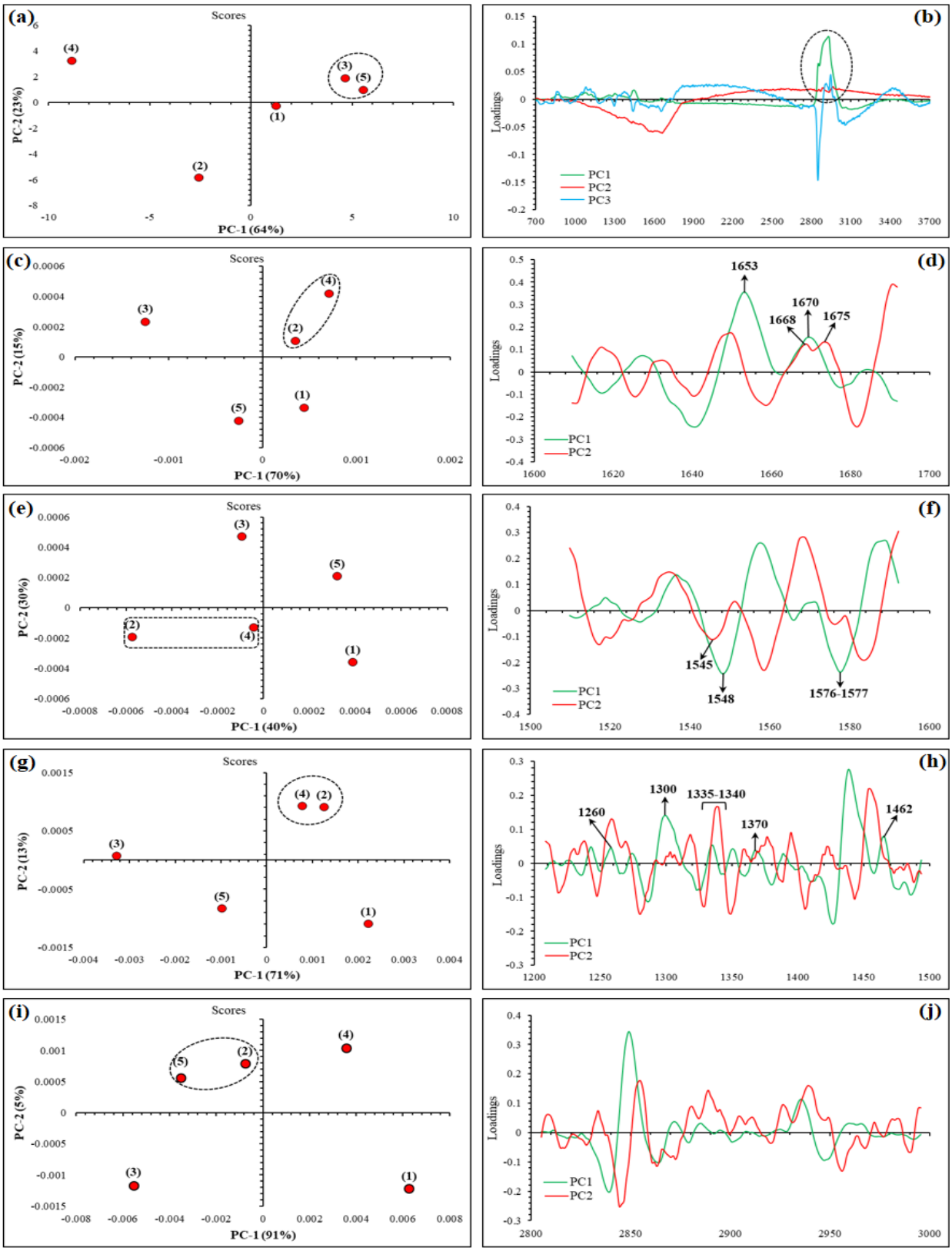
Raman spektri liofilisanih jogurata su snimani za spektralni opseg od 400 do 3800cm^{-1} (Slika 4.42); međutim dalja analiza je fokusirana na iste spektralne regione kao kod ATR-FTIR-a, kako bi se što bolje interpretirali dobijeni rezultati. Kako je primarno fermentisano punomasno kozije mleko, primena Raman spektroskopije dobija na značaju, jer daje visoku osetljivost i intenzitet signala za lipide i njihove duge nepolarne acil lance. Ako se posmatraju celi spektri analiziranih prahova, mogu se uočiti nekoliko dominantnih traka, koje se mogu povezati upravo sa $\nu_s(CH_3)$ (2935-2952cm^{-1}), $\nu_{as}(CH_2)$ (~2883cm^{-1}), $\nu_s(CH_2)$ (2841-2867cm^{-1}), $\nu(C{=}O)$ (~1744cm^{-1}) i $\beta(CH_2/CH_3)$ (~1454cm^{-1}) vibracijama acil lanaca masnih kiselina (lipida) kozijeg mleka (Czamara et al., 2015). Međutim, ne sme se zanemariti činjenica da se traka na ~2935cm^{-1} takođe može povezati sa ugljenim hidratima (zaostalom laktozom posle fermentacije i potencijalno prisutnim egzopolisaharidima) i njihovim $\nu(CH)$ i $\nu(CH_2)$ vibracijama. Pored navedenog, mogu se uočiti manje intenzivne trake u amid I i amid III regionu, koji karakterišu sekundarnu strukturu proteina (Slika 4.42).

Za spektar od 700-3800cm^{-1}, prve dve PCA (PC1 i PC2) objašnjavaju zajedno 87% ukupne varijanse i grupišu uzorke 3 i 5 (Slika 4.43a). Uzorci 1, 3 i 5 se razdvajaju od 2 i 4 što ukazuje na uticaj fenolnih jednjenja na njihovo odvajanje, duž PC1. Ovom grupisanju najviše doprinose trake u lipidnom regionu (2800-3000cm^{-1}). Pored toga, uzorci 3, 4 i 5 se takođe grupišu, duž PC2 i odvajaju od uzoraka 1 i 2 (jogurti koji su fermentisani samo sa *L.plantarum* sojem), pa se može pretpostaviti da u kombinaciji sa starterom, *L. plantarum* nema značajan uticaj na lipidni profil, što je u saglasnosti sa ATR-FTIR rezultatima. Pored navedenog, ovom grupisanju/odvajanju uzoraka verovatno doprinosi i potencijalno prisustvo različitih egzopolisaharida u analiziranim uzorcima koje luče različiti sojevi bakterija. Štaviše, trake ATR-FTIR spektra za ovaj spektralni opseg su izraženije i doprinose boljoj interpretaciji rezultata. Međutim, treba napomenuti da u ovom slučaju kod PCA odvajanja uzoraka na osnovu Raman spektara (700-4000cm^{-1}), ne treba zanemariti PC3 trake, koji daju više korisnih podataka nego PC2 trake (Slika 4.43b).



Slika 4.42. Raman spektri liofilisanih jogurta sa/bez dodatka ekstrakta semenke. S-liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan starter kulturom (3); SE-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom (4); P-liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan odabranim *L.plantarum* sojem (1); PE-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem (2); SEP-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom i odabranim *L. plantarum* sojem zajedno (5).

Za amid I, II i III regione, prve dve PCA (PC1 i PC2) objašnjavaju redom 85%, 70%, 84% ukupne varijanse (Slika 4.43c,e,g). U svim amid regionima se jasno grupišu jogurti sa ekstraktom koji su primarno fermentisani samo starterom (4), ili samo *L. plantarum*-om (2), pa se može pretpostaviti da ovom grupisanju najviše doprinosi prisustvo fenolnih jedinjenja (fenolnih kiselina i flavan-3-ola) u uzorcima i njihove interakcije sa proteinima mleka. Trake koje doprinose odvajanju uzoraka 2 i 4 (grupisani) od ostalih uzoraka su 1653 (α-heliks), 1668, 1670, 1675 (β-okretna struktura) (Slika 4.43d), 1545, 1548 (paralelna/antiparalelna β-nabrana struktura), 1576-1577 (vibracije aminokiselinskih ostataka) (Slika 4.43f), 1260, 1300, 1335-1340 (α-heliks), 1370 (O-H deformacije i C-O istezanja fenolnih jedinjenja), 1462 cm^{-1} (C-H deformacije) (Slika 4.43h) (Benevides et al., 2004; Niaura, 2006; Pompeu et al., 2017; Rygula et al., 2013). Sa druge strane, liofilisan jogurt sa ekstraktom koji je fermentisan starterom i *L. plantarum*-om (uzorak 5), se odvaja od ostalih uzoraka u svim amid regionima (Slika 4.43c,e,g), pa se može pretpostaviti da ovom odvajanju prvenstveno doprinose karakteristične interakcije između egzoplisaharida (različiti u odnosu na druge uzorke) i proteina, kao i prisutna slobodna fenolna jedinjenja i njihove interakcije sa proteinima. Najviši sadržaj fenolnih jedinjenja je potvrđen u uzorku 5 (UHPLC DAD MS/MS), što može biti zbog njihovih smanjenih interakcija sa proteinima koji su prvenstveno zauzeti u interakcijama sa polisaharidima, ili zbog njihove bolje ekstrakcije iz ovog matriksa, čiji se sastav i struktura značajno razlikuju od drugih uzoraka (Slika 4.44e). Teško je precizno utvrditi šta u ovom uzorku utiče na odvajanje zbog kompleksnosti samog uzorka, i međusobnih interakcija potencijalno prisutnih egzopolisaharida, proteina, fenolnih jedinjenja, ali i prisutnih lipida. Pored navedenog, vibracije strukturnih proteina visoko vijabilnog *L. plantarum* soja takođe mogu doprineti grupisanju/odvajanju uzorka 5. Štaviše, prisustvo i uticaj visoko vijabilnog *L. plantarum* soja u uzorcima 5 i 1, doprinosi njihovom grupisanju, duž PC2 za amid I i III region, odnosno duž PC1 za amid II region. Za amid III region, jogurt bez ekstrakta koji je primarno fermentisan samo *L.plantarum* sojem (1), se odvaja od ostalih uzoraka, a ovom odvajanju doprinosi intenzivna trala na 1438-1442, što se može pripisati $\delta(CH_2)$ vibracijama acil lanaca. Ovo se može povezati sa uticajem *L. plantarum* soja na lipidni profil kozijeg mleka, što je u saglasnosti sa ATR-FTIR rezultatom. Pored navedenog, odvajanju verovatno doprinosi i potencijalno prisustvo specifičnih egzopolisaharida i njihove interakcije sa proteinima. Zanimljvo, ATR-FTIR i Raman grupišu različite uzorke u amid regionima, što se objašnjava različitim vibracionim karakteristikama biomolekula. Međutim, ove dve vibracione tehnike se idealno dopunjuju u interpretaciji rezultata multikoponentnih uzoraka, i konkretno na ovim model uzorcima zbog specifičnih grupisanja/odvajanja u analiziranim regionima: (1) ukazuju na specifične interakcije između egzoplisaharida i proteina, kao i fenolnih jedinjenja i proteina; (2) prate uticaj mikrobnih kultura i njihov afinitet prema pojedinačnim makrokonstituentima (lipidima i proteinima).



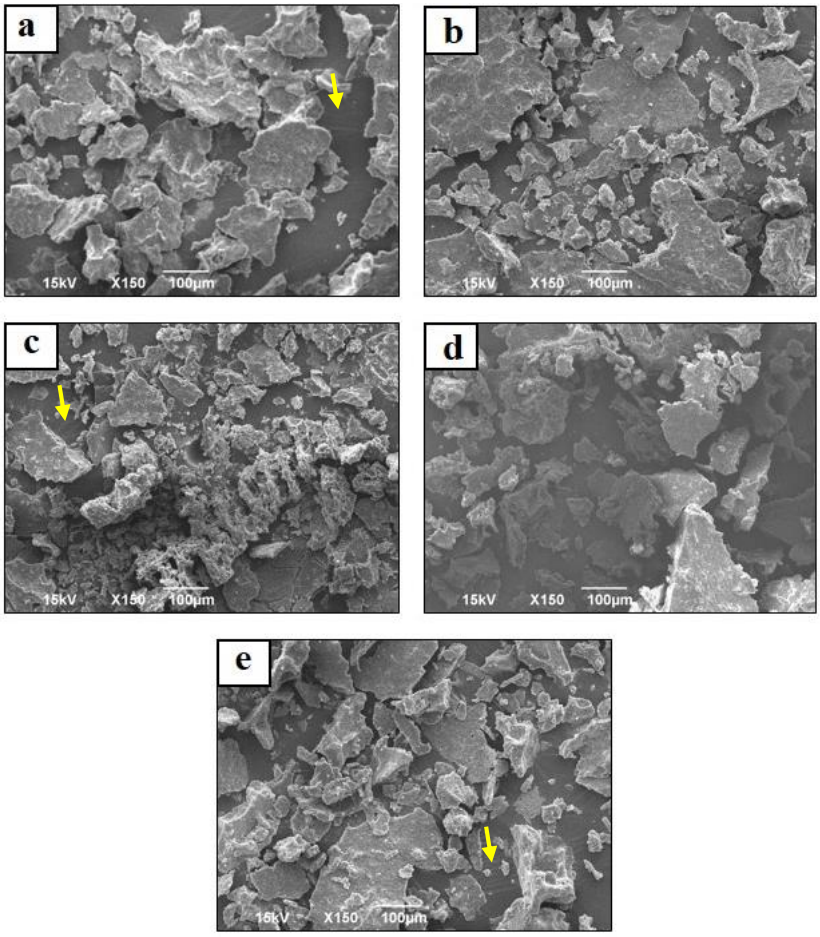
Slika 4.43. Grafici skorova (objekata) i varijabli izvedeni iz Raman spektra liofilisanih jogurta sa/bez dodatka ekstrakta semenke, za sledeće spektralne regione: (a, b) 700-4000 cm^{-1}; (c, d) amid I region, 1600-1800 cm^{-1}; (e, f) amid II, 1500-1600 cm^{-1}; (g, h) amid III region, 1200-1500 cm^{-1}; i (i, j) lipidni region, 2800-3000 cm^{-1}. S-liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan starter kulturom (3); SE-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom (4); P-liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan odabranim *L.plantarum* sojem (1); PE-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem (2); SEP-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom i odabranim *L. plantarum* sojem zajedno (5).

Za lipidni region (2800-3000cm^{-1}), PC1 i PC2; kao i PC1 i PC3, objašnjavaju redom 96% i 95% ukupne varijanse, međutim u oba slučaju na osnovu dobijenih odvajanja ne mogu se izvesti adekvatni zaključci. U ovom spektralnom opsegu, Raman daje osetljive ν(CH) i ν(CH_2) vibracije ugljenih hidrata (zaostala laktoza i egzoplisaharidi) i lipida, koji su dominantni u ovim multikomponentnim prahovima. Stoga, svaka promena na lipidima i ugljenim hidratima uzorkovana prisustvom starter i *L.plantarum* kulture, može doprineti izmeni vibracija ovih molekula što doprinosi odvajanjima/grupisanjima uzoraka i otežava njihovu interpretaciju. Za ovaj spektralni region, ATR-FTIR je pokazao bolja odvajanja kod ovih model uzoraka. Uticaj laktoze na grupisanje/odvajanje uzoraka je verovatno mali, jer je koriste mikroorganizmi da bi fermentisali mleko tj. preveli je u mlečnu kiselinu, zbog čega je pH jogurta ~4,6, pogotovo je nizak kod SEP uzorka (pH <4,6).

4.3.5.6. Morfološka karakterizacija liofilisanih jogurta

SEM slike liofilisanih fermentisanih jogurta su prikazane na slici 4.44a-e, na uvećanju od 150 puta (X150). Svi liofilisani jogurti su imali slične morfološke karakteristike. Na svim SEM slikama (Slika 4.44a-e), se mogu primetiti čestice nepravilne strukture, različite veličine i oblika. Štaviše, površina čestica imaju nepravilne strukture koje izgledaju kao naborane pocepane krpice sa primetnim sitnim porama (šupljinama) ili su u obliku slomljenog stakla, što je uobičajeno za SEM slike liofilisanog mleka (Deshwal et al., 2020; Mar et al., 2020). Ove uzorci imaju sličnu morfologiju kao i liofilizovani uzorci mleka u prahu (Deshwal et al., 2020; Zou et al., 2022), amorfne mešavine laktoze/mlečnih proteina (Haque & Roos, 2006) ili mešavine proteina i ugljenih hidrata (Millqvist-Fureby et al., 1999). Krpičasta morfologija je najčešće posledica akumulacije proteina preko ugljenih hidrata na površini praha, zbog njihove brže apsorpcije na led/tečnost međufazu u zamrznutim uzorcima (Millqvist-Fureby et al., 1999). Na SEM slici 4.44a, u slučaju liofilisanog jogurta S mogu se u prostoru povezanih pora uočiti filamenti potencijalnih egzopolisaharida (strelica), koje najverovatnije luči *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, a po površini proteinskog matriksa i u povezanim porama prisustvo streptokoka *S. thermofilus*-a. Dodatkom ekstrakta (slika 4.44b) uočava se glatkija površina krpičastih ploča, manji porozitet, prisustvo streptokoka *S. thermophilus*-a, ali i odsustvo filamenata egzopolisaharada bakterija u odnosu na S uzorak, što ukazuje na narušavanje interakcija između egzopolisaharida i proteina, na šta ukazuju i prethodne analize. Prisustvo polifenola se ne uočava posebno, ukazujući da su polifenoli integrisani u proteinsku mrežu. Izgled liofilisanog jogurta dobijen fermentacijom samo sa *L. plantarum* sojem pokazuje značajno drugačiju morfologiju od svih analiziranih uzoraka (slika 4.44c). Uočava se kompaktnija, reljefna i grebenasta struktura sa puno sitnih izolovanih pora koje su nastale najverovatnije od kristala leda koji je sublimirao tokom liofilizacije ukazajuću da je ovaj uzorak imao veliki kapacitet vezivanja vode i složenu matricu kiselog gela. Strukturu očigledno pored proteina čine i potencijalno prisutni egzopolisaharidi *L. plataruma*-a koji povezuje bakterije sa površinom kazeinskih micela. Na površini grebena uočavaju se bakterije i kapsule egzopolisaharida oko njih, ali može se i u zoni povezanih pora (strelica) uočiti prisustvo filamentoznih polisaharida. Čini se da u uslovima fermentacije *L. plantarum* potencijalno sintetiše i kapsularno vezane i filamentozne egzopolisaharida. Sposobnost sinteze različitih vrsta egzoposaharida (filamentoznih i kapsularnih) sojeva *L. plantarum*-a primetili su Bachtarzi et al., 2020. Prisustvo velike količine bakterija (podpoglavlje 4.3.5.9) i prisustvo potencijalno izlučenih egzopolisaharida su doprineli boljoj povezanosti kazeinskih micela što se odrazilo na kohezivnosti i viskozitet P jogurta (tabela 4.25). Značajno izmenjenu morfologiju jogurta fermentisanog sojem *L. plantarum*-a u odnosu na jogurt fermentisan *L. delbruckii* subs. *bulgaricus* sojem uočili su Nikitina et al., 2022. Autori ukazuju na prisutvo filma između proteinskih čestica koje su povezane u velike agregate na SEM slikama jogurta fermentisanog odabranim *L. plantarum* sojem. Dodatkom ektrakta, slika 4.44d, struktura kiselog gela jogurta fermetisanog *L. plantarum*-om se značajno menja i sličnija je strukturi SE uzorka. I dalje se mogu uočiti izolovane pore po površini krpičastih struktura ali u manjem broju nego kod P jogurta, struktura je manje kompaktna sa većim zonama povezanih pora, bez prisustva filamenata egzopolisaharada, potvrđujući da fenolni ekstrakt ometa formiranje veze egzopolisahaharida i proteina, kao i kod uzorka SE. Uočava se prisustvo laktobacila ali u daleko

manjem broju nego kod P jogurta. Morfologija SEP uzorka, slika 4.44e, sličnija je S uzorku, uočavaju se pločaste površine proteinske mreže, filamenti egzopolisaharida u zonama poveznih pora (strelica), prisustvo bacilusa bez kapsularnih egzopolisaharida i streptokoka po površini proteinskih ploča kao i porama.



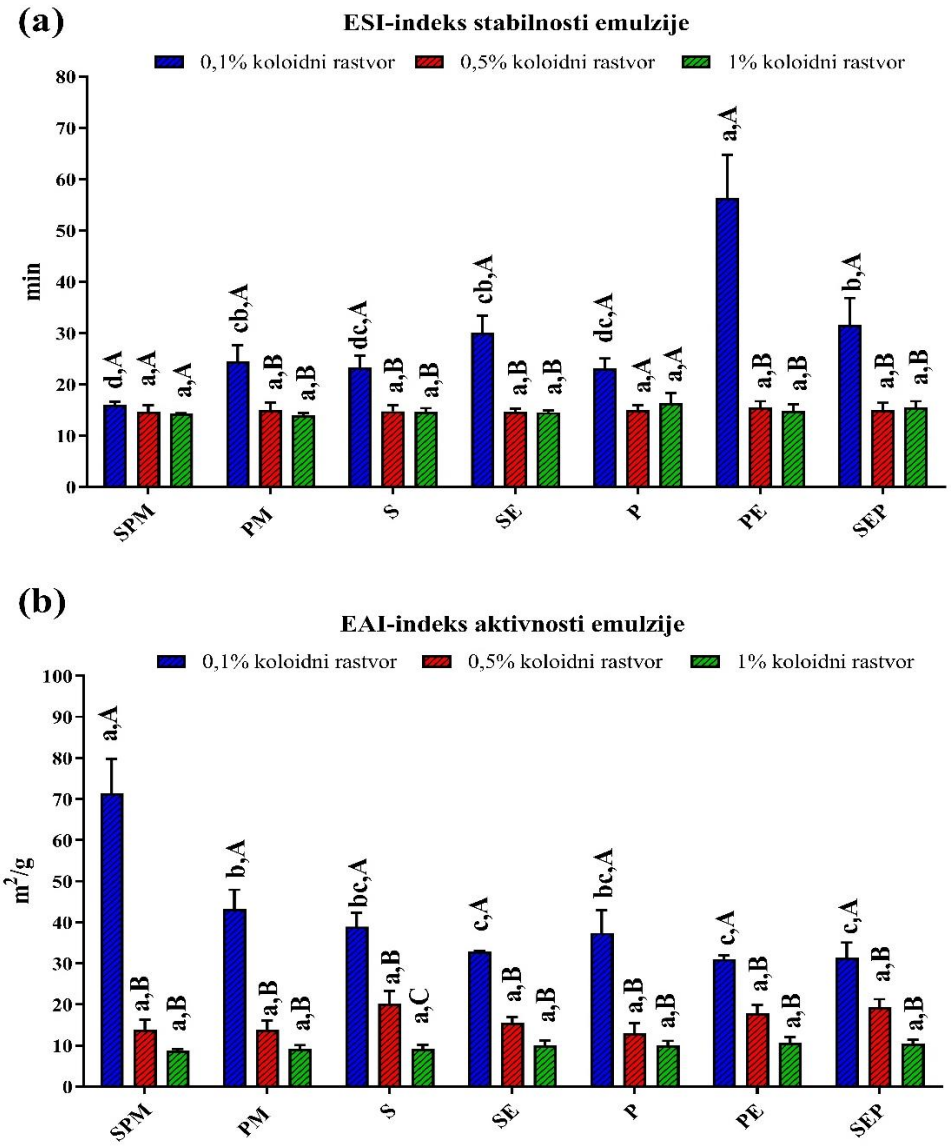
Slika 4.44. SEM slike liofilisanih jogurta sa/bez dodatka ekstrakta semenke. (a) liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan starter kulturom (S); (b) liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom (SE); (c) liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan odabranim *L.plantarum* sojem (P); (d) liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem (PE); (e) liofilisan jogurt sa ekstraktom fermentisan starter kulturom i odabranim *L. plantarum* sojem zajedno (SEP). Žute strelice na slikama pokazuju potencijalne filamentozne egzopolisaharide.

4.3.5.7. Tehno-funkcionalna svojstva liofilisanih jogurta

Emulgujuća svojstva liofilisanih jogurta su određena za 0,1%, 0,5% i 1% koloidne rastvore (m/V) (Slika 4.45a,b). Suspenzije SPM i PM su korišćeni kao kontrolni uzorci, u odnosu na koje su praćena emulgujuća svojstva liofilisanih fermentisanih uzoraka. EAI i ESI vrednosti za sve pripremljene SPM i PM suspenzije, imaju istu sledivost i u saglasnosti su sa rezultatima koji su prethodno diskutovani u poglavlju 4.3.2.9. Međutim, treba naglasiti da su ovo punomasni uzorci, a lipidi mleka mogu značajno doprineti emulgujućim svojstvima ovih uzoraka. Prema prikazanim podacima, 0,1% koloidni rastvori su pokazale bolja emulgujuća svojstva (EAI i ESI) za sve analizirane uzorke, u poređenju sa 0,5% i 1% koloidnim rastvorima čija se emulgujuća svojstva nisu statistički značajno razlikovala. Različit efekat analiziranih S, SE, P, PE i SEP uzoraka na emulgujuća svojstva se može primetiti samo kod 0,1% koloidnih rastvora, pa će se dalja diskusija odnositi na ove koloidne rastvore. EAI vrednosti 0,1% suspenzija liofilisanih uzoraka (S, SE, P, PE i SEP) se nisu statistički značajno razlikovale (Slika 4.45b). Međutim, svi uzorci koji sadrže ekstrakt semenke (SE, PE i SEP) imali su značajno manju EAI, u poređenju sa pasterisanim mlekom (PM), što se objašnjava smanjenim sadržajem proteina u uzorcima, potencijalnim prisustvom egzoplisaharida i postojanjem interakcija proteina sa egzopolisaharidima i fenolnim jedinjenjima, što je u saglasnosti sa predhodnim

karakterizacijama Dobijeni ESI rezultati za 0,1% suspenzije su prikazani na Slici 4.45a. Najviša ESI vrednost je određena za 0,1% PE (56,39±8,26 min) i SEP (31,57±5,24 min) koloidne rastvore. Dobra sposobnost ovih uzoraka u stabilizaciji emulzije se potencijalno može pripisati prisustvu egzopolisaharida koje luči *L.plantarum* kultura tokom fermentacije, njihove interakcije sa proteinima, kao i interakcije polifenola sa proteinima. ESI vrednosti za 0,1% koloidne rastvore drugih uzoraka (S, SE i P), se nisu statistički značajno razlikovale.

Svi analizirani koloidni rastvori (0,1%, 0,5%, i 1% (m/V)), nisu pokazale peniva svojstva. Odsustvo penivih svojstava se objašnjava prisustvom lipida u ovim uzorcima. Poznato je da lipidi suzbijaju penivost, zbog veće površinske aktivnosti u odnosu na proteine, što rezultira izmeštanjem (pomeranjem) proteina sa vazduh/voda međusloja.



Slika 4.45. Tehno-funkcionalna svojstva liofilisanih jogurta sa/bez dodatka ekstrakta semenke. (a) Indeks stabilnosti emulzije; (b) Indeks aktivnosti emulzije. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti+standardna devijacija (n=3). Mala slova označavaju poređenje između uzoraka koji imaju isti sadržaj praha u koloidnom rastvoru, a velika slova označavaju poređenja u okviru svakog uzorka posebno. Različita slova označavaju statistički značajne razlike prema *Tukey's* testu (*p<0,05*). Skraćenice: SPM-sirovo punomasno kozije mleko; PM-termički tretirano (pasterizovano) punomasno kozije mleko (90°C, 5min); S-liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan starter kulturom; SE-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom; P-liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan odabranim *L.plantarum* sojem; PE-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem; SEP-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom i odabranim *L. plantarum* sojem zajedno. Napomena: koloidni rastvori uzoraka su dobijene rekonstitucijom odgovarajuće mase praha u 100mLmili Q vode.

4.3.5.8. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativna svojstva liofilisanih jogurta

Rezultati za TPC liofilisanih jogurta i njihovih kontrolnih mleka su prikazani na Slici 4.46a. Visoke TPC vrednosti svih analiziranih uzoraka se mogu pripisati tendenciji proteina, masnih kiselina, šećera da interferiraju sa Folin Ciocalteu-ovim reagensom i daju prividno visoke rezultate. TPC za 0,1% rastvore daje varijabilne rezultate i ne može se jasno razdvojiti uticaj dodatog ekstrakta semenke i uticaj fermentacije na TPC vrednosti, što se može pripisati niskom sadržaju uzorka u rastvoru. Međutim, povećanje sadržaja uzoraka u rastvoru (0,5% i 1%), doprinosi boljoj interpretaciji rezultata. U ovim rastvorima, jasno se primećuje da su uzorci SEo, SE, SEPo i SEP imali značajno više vrednosti TPC, u poređenju sa ostalim analiziranim uzorcima, čemu verovatno dodatno doprinose fenolna jedinjenja iz ekstrakta semenki. Male TPC varijacije kod fermentisanih uzoraka sa dodatkom ekstrakta i njihovih nefermentisanih kontrola se mogu pripisati interakcijama između fenolnih jedinjenja i proteina (Jakobek, 2015; Ozdal et al., 2018; Zhang et al., 2021). Druge studije su takođe pokazale da dodatak fenolnih ekstrakta komine (Demirkol & Tarakci, 2018; Dos Santos et al., 2017; Tseng & Zhao, 2013), semenke (Chouchouli et al., 2013) i kalusa vinove loze (Karaaslan et al., 2011) značajno povećavaju TPC fermentisanog kozijeg ili kravljeg jogurta. Međutim, uzorci fermentisani *L.plantarum*-om sa i bez dodatka ekstrakta (PE i P) i njihove kontrole (PEo i Po), se nisu značajno razlikovali, što znači da kod ovih uzoraka dodatak fenolnih ekstrakata semenki nema efekta na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja. Ovo može biti zbog uticaja korišćenog *L. plantarum* soja koji ima razvijen enzimski sistem za razgradnju fenolnih jedinjenja (Cavin et al., 1997), a što je pokazano LC/MS karakterizacijom (podpoglavlje 4.3.5.1). Štaviše, može se pretpostaviti da korišćeni soj *L.plantarum* potencijalno luči egzopolisaharide koji utiču na promene u teksturi ovih uzoraka i potencijalno mogu smanjiti redukcionu aktivnost fenolnih jedinjenja i proteina, što je u saglasnosti sa prethodnom karakterizacijom ovih uzoraka.

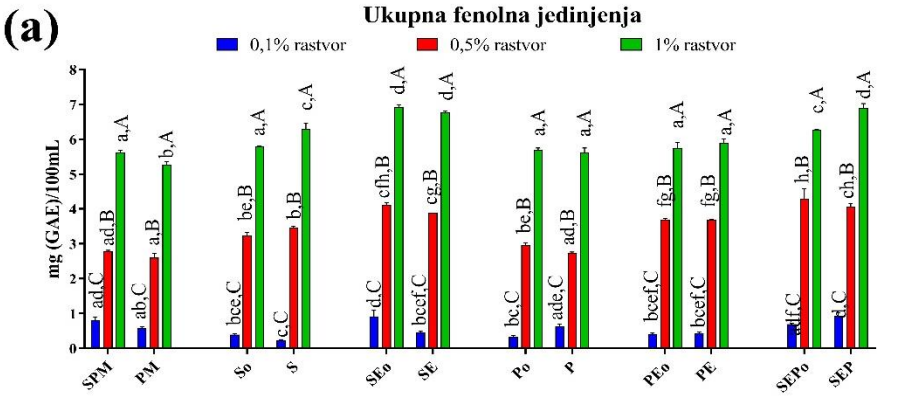
Antioksidativna aktivnost rastvora liofilisanih jogurta i njihovih kontrolnih mleka je određena korišćenjem pet *in vitro* screening testova (TAC, $ABTS^{\bullet+}$, $DPPH^{\bullet}$, FRP, i FCC), za 0,1% 0,5% i 1% rastvore (Slika 4.46b-f). Ukupni antioksidativni kapacitet za 0,1% rastvore nije registrovan, pa će dalja diskusija biti usmerena na TAC rezultate 0,5% i 1% rastvora (Slika 4.46b). Jogurti obogaćeni sa fenolnim ekstraktima semenki (SE, PE i SEP) i njihova kontrolna mleka (SEo, PEo i SEPo) su imali značajno više TAC vrednosti, u poređenju sa njima komplementarnim uzorcima bez dodatka ekstrakta (S, So, P i Po), kod 0,5% i 1% rastvora, čemu su doprinela fenolna jedinjenja koja imaju izražena redukujuća svojstva (Kostić et al., 2021). Međutim, kako su visoke TAC vrednosti takođe dobijene za SPM, PM, So, S, Po i P uzorke, u kojima prethodnom UHPLC-DAD MS/MS analizom nisu detektovana fenolna jedinjenja, može se zaključiti da su TAC vrednostima ovih uzoraka najviše doprineli proteini i hidrolizom oslobođeni peptidi i aminokiseline, dok su kod jogurta dodatno doprineli i prisutni ugljeni hidrati (mono- i oligosaharidi) potencijalno oslobođeni hidrolizom egzopolisaharida, kao i drugi metaboliti koji su nastalim metabolizmom prisutnih bakterija, a mogu pokazati redukujuća svojstva. Dobar antioksidativni kapacitet kozijeg mleka i kefira su prethodno dobili Nehir El et al. (2015). Uzorci jogurta fermentisani sa *L.plantarum*-om sa/bez dodatka ekstrakta su pokazali najmanji antioksidativni kapacitet.

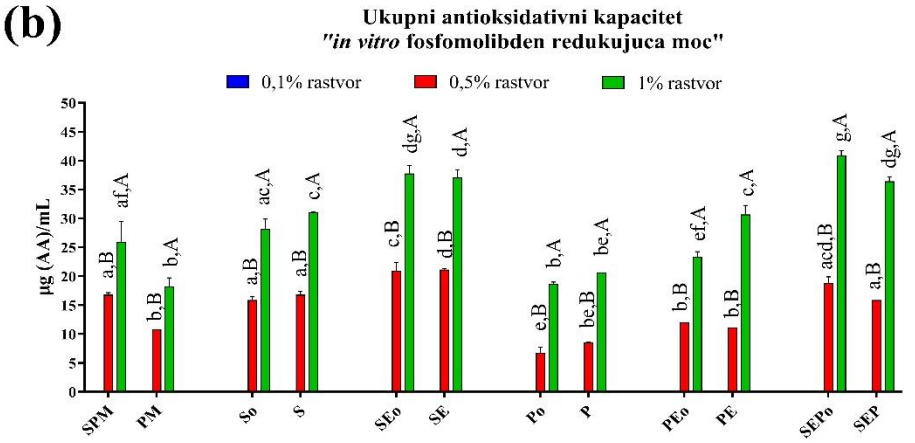
Ni jedan od 0,1% rastvora analiziranih uzoraka nije imao sposobnost redukcije jona gvožđa (Slika 4.46c), što se može pripisati niskom sadržaju potencijalnih redukujućih molekula u ovim rastvorima. Štaviše, uzorci SPM, PM, Po i P takođe nisu pokazali redukujuća svojstva i na drugim ispitivanim rastvorima (0,5% i 1%) (Slika 4.46c). Za 0,5% rastvore redukujuća svojstva su pokazali samo SE i SEP uzorci jogurta i njihova kontrolna mleka (SEo i SEPo), dok su za 1% rastvore redukujuća svojstva očekivano potvrđena kod svih liofilisanih jogurta sa dodatkom ekstrakta semenke (SE, PE i SEP) i njihovim kontrolnima uzorcima mleka (SEo, PEo i SEPo) (Slika 4.46c). Redukujuća svojstva ovih uzoraka verovatno su zbog prisutnih fenolnih jedinjenja. Drugi autori su takođe pokazali značajno povećanje redukujućih svojstava jogurata koji su obogaćeni sa dekoktom kamilice (Caleja et al., 2016) i ekstraktom semenki grožđa (Chouchouli et al., 2013). Zanimljivo, niska redukujuća moć je potvrđena i za uzorak S i njegovu kontrolu So (1% rastvor) koji ne sadrže ekstrakte semenke, što je verovatno zbog redukujućih svojstava nekih aminokiselinskih ostataka koji nisu „maskirani“

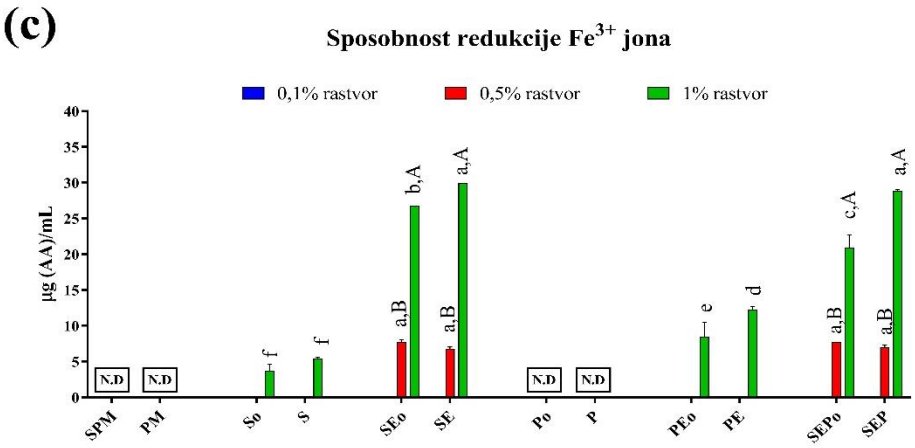
ili zauzeti u interakciji sa potencijalno prisutnim egzopolisaharidima (Power et al., 2013). Ovo je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji su takođe dobili nisku redukujuću moć uzoraka kozijeg mleka (Abd El-Fattah et al., 2020) i fermentisanog kamiljeg mleka (El-Sayed et al., 2021).

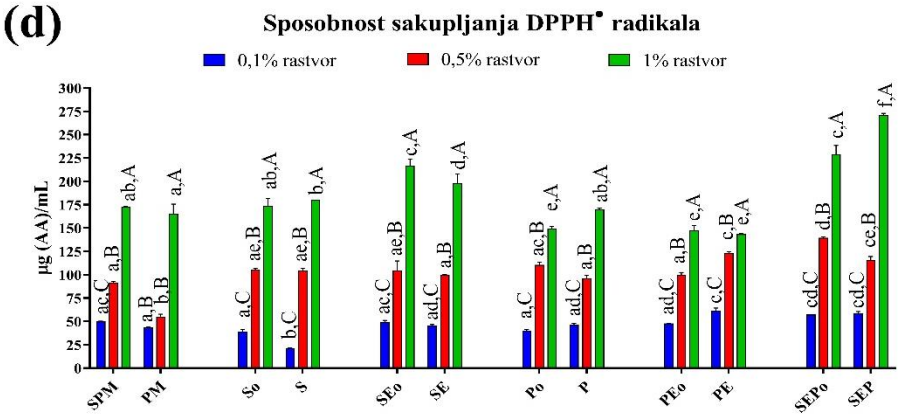
Svi analizirani uzorci, u svim pripremljnim rastvorima (0,1%, 0,5% i 1%) su imali isti trend u neutralisanju $ABTS^{\bullet+}$ i $DPPH^{\bullet}$ radikala. Međutim, $ABTS^{\bullet+}$ vrednosti su bile značajno više u poređenju sa $DPPH^{\bullet}$ vrednostima (Slika 4.46d,e). Slično ovim rezultatima, Yilmaz-Ersan et al. (2016) su pokazali bolju sposobnost kozijeg kefira u neutralisanju $ABTS^{\bullet+}$ radikala, sa vrednostima koje su bile skoro tri puta veće od $DPPH^{\bullet}$ vrednosti. Ovo može biti zbog prirode $DPPH^{\bullet}$ radikala i njihove selektivne interakcije sa proteinima i fenolnim jedinjenjima (Serpen et al., 2012; Tabart et al., 2009). Jogurti sa dodatkom ekstrakta semenke (SE, PE i SEP) i njihove kontrole mleka (SEo, PEo i SEPo) su imali značajno više $ABTS^{\bullet+}$ vrednosti, u poređenju sa njihovim komplementarnim uzorcima u koje nije dodat ekstrakt (S, So, P i Po) i PM rastvorom u svim analiziranim rastvorima. Ovom povećanju antioksidativne aktivnosti uzoraka obogaćenih ekstraktom semenki su očigledno doprinela fenolna jedinjenja, pre svih katehin, galna i kumarinska kiselina koji su domanatno detektovani u ovim uzorcima (Tabela 4.27). Ovo je u saglasnosti sa drugim studijama koje su pokazale poboljšanu sposobnost neutralisanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala za koziji jogurt obogaćen Isabel grožđem i brašnom komine (Silva et al., 2022), ili za kravlji jogurt i kefir koji su obogaćeni ekstraktom komine, semenke i pokožice (Carullo et al., 2020; Iriondo-DeHond et al., 2020). Sa druge strane, doprinos ekstrakta semenke u neutralisanju $DPPH^{\bullet}$ radikala je primetan samo za 1% SE, SEo, SEP i SEPo rastvore, dok se dobijene $DPPH^{\bullet}$ vrednosti za 0,5% i 0,1% rastvore nisu značajno razlikovale za analizirane uzorke. Ovo znači da je uticaj fenolnih jedinjenja u neutralisanju $DPPH^{\bullet}$ radikala jako zavistan od njihovog sadržaja u uzorku i njihove tendencije da reaguju sa proteinima. Štaviše, 1% SEP rastvor je imao najbolju aktivnost u neutralisanju $DPPH^{\bullet}$ radikala (271,06±1,85 μg(AA)/mL). Poređenje naših rezultata sa drugim studijama je otežano zbog razlika u metodologiji i izražavanju dobijenih rezultata. Međutim, nekoliko predhodnih studija je pokazalo da dodatak ekstrakta semenki (Akdeniz & Kavak, 2019; Chouchouli et al., 2013; Yadav et al., 2017), komine (Aliakbarian et al., 2015) i kalusa vinove loze (Karaaslan et al., 2011) u jogurt značajno povećava njegovu antioksidativnu aktivnost i sposobnost sakupljanja $DPPH^{\bullet}$ radikala.

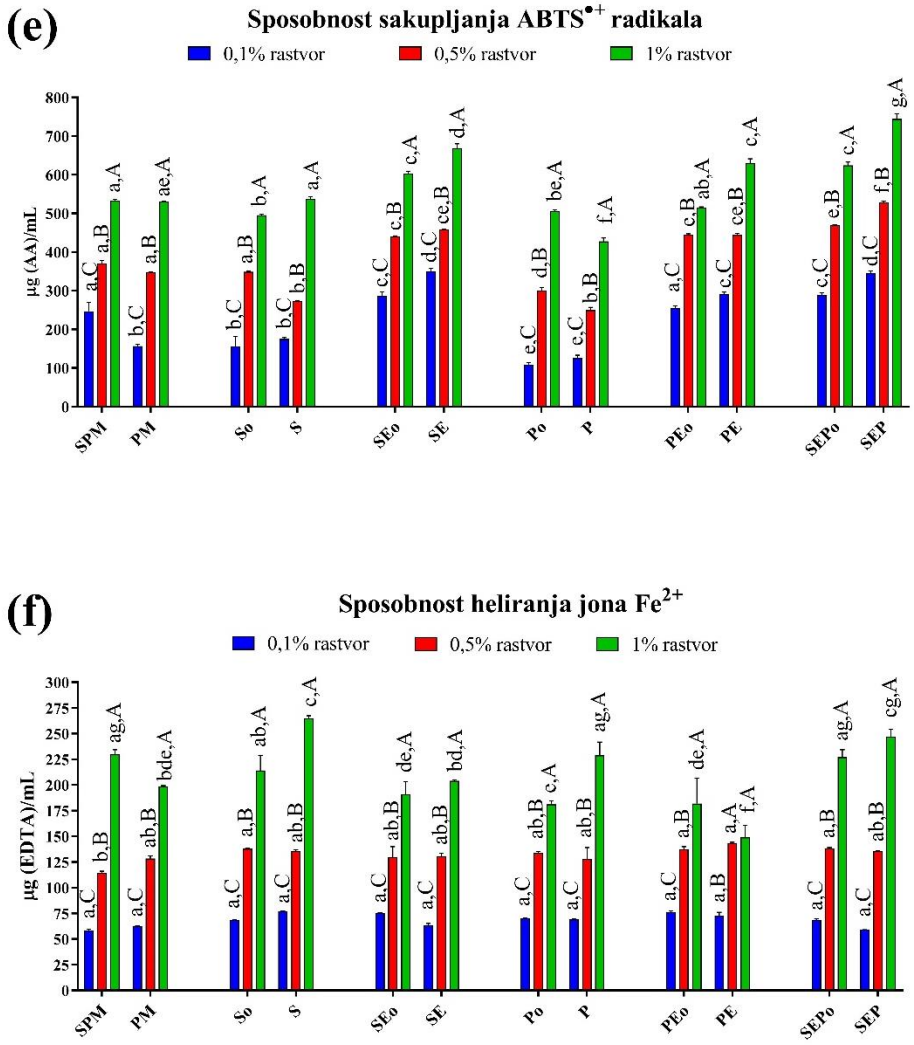
Helirajuća svojstva 0,1% i 0,5% rastvora svih analiziranih uzoraka se nisu značajno razlikovala. Međutim, 1% rastvori S i P uzorka jogurta su pokazali bolja helirajuća svojstva u poređenju sa njima komplementarnim jogurtima u koje je dodat ekstrakt semenke (SE i PE). Pri ovom sadržaju uzorka u rastvoru očigledno dolazi do izražaja prisustvo fenolnih jedinjenja u uzorcima, koji smanjuju sadržaj proteina, što utiče na smanjenje helirajućih svojstava ovih uzoraka. Dobra helirajuća svojstva su dobili i drugi autori za punomasno i odmašćeno kozije mleko (Abd El-Fattah et al., 2020), kao i za kamilje mleko fermentisano različitim bakterijskim sojevima iz roda *Lactobacillus* (El-Sayed et al., 2021).


(a)
Ukupna fenolna jedinjenja
0,1% rastvor
0,5% rastvor
1% rastvor
mg (GAE)/100mL
SPM
PM
So
S
SEo
SE
Po
P
PEo
PE
SEPo
SEP


(b)
Ukupni antioksidativni kapacitet
"in vitro fosfomolibden redukujuca moc"
0,1% rastvor
0,5% rastvor
1% rastvor
µg (AA)/mL
SPM
PM
So
S
SEo
SE
Po
P
PEo
PE
SEPo
SEP


(c)
Sposobnost redukcije Fe3+ jona
0,1% rastvor
0,5% rastvor
1% rastvor
µg (AA)/mL
N.D
SPM
PM
So
S
SEo
SE
Po
P
PEo
PE
SEPo
SEP


(d)
Sposobnost sakupljanja DPPH• radikala
0,1% rastvor
0,5% rastvor
1% rastvor
µg (AA)/mL
SPM
PM
So
S
SEo
SE
Po
P
PEo
PE
SEPo
SEP

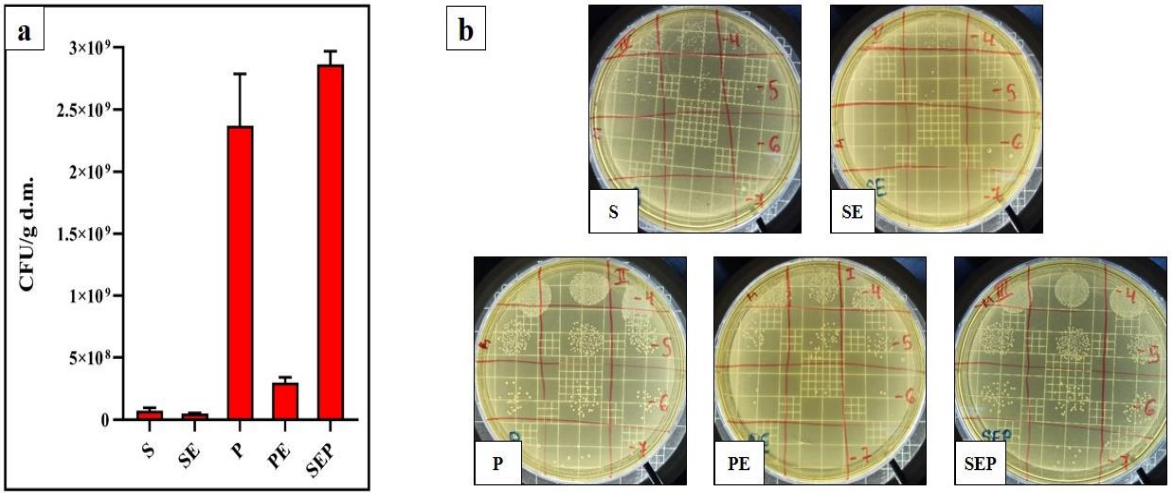


Slika 4.46. Ukupna fenolna jedinjenja (a) i antioksidativna svojstva liofilisanih jogurata i mleka sa/bez dodatka ekstrakta semenke (b-f): Ukupni antioksidativni kapacitet "*in vitro* fosfomolibden redukujuća moć" (b); Sposobnost redukcije Fe^{3+} jona (redukujuća moć) (c); Sposobnost sakupljanja $DPPH^{\bullet}$ radikala (d); Sposobnost sakupljanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala (e); Sposobnost heliranja Fe^{2+} jona (f). Podaci su prikazani kao srednje vrednosti+standardna devijacija (n=3). Mala slova označavaju poređenje između uzoraka koji imaju isti sadržaj uzorka u rastvoru, a velika slova označavaju poređenja u okviru svakog uzorka posebno. Različita slova označavaju statistički značajne razlike prema *Tukey's* testu ($p<0,05$). Skraćenice: „N.D."-nije detektovan; SPM-sirovo punomasno kozije mleko; PM-termički tretirano (pasterizovano) punomasno kozije mleko (90°C, 5min); So-liofilisano mleko+starter; So-liofilisano mleko+starter kultura; S-liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan starter kulturom; SEo-liofilisano mleko/ekstrakt+starter kultura; SE- liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom; Po-liofilisano mleko+odabrani *L. plantarum* soj; P- liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem; PEo-liofilisano mleko/ekstrakt+odabrani *L. plantarum* sojem; PE-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem; SEPo-liofilisano mleko/ekstrakt+starter kultura+odabrani *L. plantarum* sojem; SEP- liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom i odabranim *L. plantarum* sojem zajedno. Napomena: Rastvori uzorka su dobijeni rekonstitucijom odgovarajuće mase liofilisanog praha u 100mL mili Q vode.

4.3.5.9. Određivanje vijabilnosti bakterijskih starter kultura nakon liofilizacije fermentisanih proizvoda - protektivna svojstva liofilisanih jogurata

Vijabilnost starter bakterija (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*) u liofilisanim S i SE prahovima je bila značajno niža u poređenju sa vijabilnošću *L.plantarum* soja u P i PE prahovima (Slika 4.47a,b). Štaviše, vijabilnost *L.plantarum* soja je bila $2,37\cdot10^9$ (P) i $2,99\cdot10^8$ (PE) CFU/g SM, čime je ispunjen zahtev za potencijalno probiotički proizvod, koji treba da sadrži najmanje 8-9log CFU probiotičkih mikroorganizama (Dos Santos et al., 2017). Dalje treba naglasiti da je vijabilnost startera i *L.plantarum* soja bila značajno niža u liofilisanim jogurtima sa dodatim ekstraktom semenke (SE i PE), u poređenju sa njima kompatibilnim jogurtima

bez ekstrakta (S i P). Ovo znači da su dodatkom ekstrakta semenke verovatno stvoreni uslovi koji usporavaju rast startera i *L.plantarum*-a ili su čak fenolna jedinjenja ekstrakta semenke inhibirala pomenute sojeve. Suprotno našim zapažanjima, druge studije su pokazale da dodatak voćnog soka ili ekstrakta nefermentisane komine u kozije jogurte podržava ili nema uticaja na vijabilnost *Lactobacillus* sojeva (Dos Santos et al., 2017; Ranadheera et al., 2012). Ovo može biti zbog povećanog sadržaja šećera u voćnom soku ili nefermentisanoj komini, čime je podržan rast bakterija, pa inhibitorni efekat fenolnih jedinjenja nije došao do izražaja. Međutim, smanjenje broja vijabilnih bakterija nije primećeno kod liofilisanog jogurta sa dodatkom ekstrakta koji je primarno fermentisan starterom i *L.plantarum*-om (SEP). Štaviše u ovom uzorku je utvrđeno najviše vijabilnih bakterija, čak $2{,}86 \cdot 10^9$ CFU/g SM (Slika 4.47a). Ovo se može pripisati simbiotičkom delovanju bakterijskih sojeva, koji u ovom medijumu međusobno stvaraju povoljne uslove za rast i neutrališu potencijalno inhibitorni efekat fenolnih jedinjenja. Liofilisani jogurti fermentisani sa *L.plantarum*-om (P, PE i SEP) se mogu smatrati potencijalno probiotičkim proizvodima.



Slika 4.47. (a) Broj bakterijskih ćelija u liofilisanim jogurtima i mleku sa/bez dodatka ekstrakta. (b) Orijentaciono određivanje brojnosti bakterija u liofilisanim jogurtima na MRS agaru (metoda serijske dilucije i ukapavanja). Podaci su prikazani kao srednje vrednosti+standardna devijacija (n=3). Oznake: S-liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan starter kulturom; SE-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom; P-liofilisan jogurt bez ekstrakta, fermentisan odabranim *L.plantarum* sojem; PE-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan odabranim *L. plantarum* sojem; SEP-liofilisan jogurt sa ekstraktom, fermentisan starter kulturom i odabranim *L. plantarum* sojem zajedno.

4.4. Uticaj matriksa hrane na antioksidativna svojstva i biodostupnost fenolnih jedinjenja

4.4.1. Uticaj kompleksnog matriksa hrane na bazi mesa i žitarica na biodostupnost i antioksidativna svojstva fenolnih jedinjenja pokožice i semenke komine grožđa

4.4.1.1. Fenolna jedinjenja u polaznim ekstraktima pokožice i semenke

U analizi uticaja kompleksnog matriksa hrane na bazi mesa i žitarica na biodostupnost fenolnih jedinjenja, kao izvor fenolnih jedinjenja su korišćeni ekstrakti pokožice i semenke nefermentisane komine Prokupca, koji su izabrani nakon predhodne detaljne karakterizacije (podpoglavlje 4.1). Zbog varijacija fenolnih profila koji su zavisni od hemijskog sastava grožđa i godine berbe, kao i zbog verodostojnog poređenja dobijenih rezultata pre/posle digestije, urađena je ponovna karakterizacija fenolnih profila ekstrakta pokožica i semenki, koji su korišćeni za određivanje biodostupnosti fenolnih jedinjenja.

Dominantna fenolna jedinjenja u polaznom ekstraktu pokožice grožđa su bile fenolne kiseline (24,4%) i flavonoli (65,9%); čineći zajedno čak 90,3% od ukupnog sadržaja kvantifikovanih polifenola (Tabela 4.28) (podaci za kvantifikaciju, Tabela P2). Mala količina antocijana (oko 6%) u pokožici nije iznenađujuća, ako se uzme u obzir da je Prokupac sorta grožđa koja sadrži niske količine antocijana u poređenju sa drugim crnim sortama grožđa (Mitic et al., 2012), koje se dalje smanjuju zbog degradacije tokom procesa sušenja (Karasu et al., 2016). Najdominantniji antocijan u ekstraktu pokožice je bio malvidin-3-*O*-glukozid, a zatim peonidin-3-*O*-glukozid, što je u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima (Pantelić et al., 2016). U ekstraktu semenke, ako se izostave flavan-3-oli, dominantna grupa fenolnih jedinjenja su bile fenolne kiseline (93%), među kojima je elaginska kiselina bila najzastupljenija, a zatim galna kiselina (Tabela 4.29). Viši sadržaj elaginske i galne kiseline u ekstraktu semenke grožđa sorte Prokupac, u poređenju sa ekstraktima semenki drugih sorti grožđa je prethodno uočen u studiji koju su sproveli Pantelić et al. (2016). Elaginska kiselina je takođe bila dominantna fenolna kiselina i u ekstraktu pokožice, dok galna kiselina nije detektovana. Među flavonolima, kvercetin i izoramnetin su bili najdominantniji u oba ekstrakta (pokožica i semenka). Između ostalog, u ekstraktu pokožice su takođe detektovani kvercetin i izoramnetin glikozidi u značajnim količinama. Ove činjenice su u saglasnosti sa prethodno publikovanim podacima za nekoliko drugih ekstrakata grožđa (Pantelić et al., 2016), ili ekstrakta komine grožđa (Wang et al., 2017).

UHPLC-Orbitrap MS karakterizacija flavan-3-ola, mase molekularnih jona ($[M-H]^-$) i MS^2, MS^3, MS^4 fragmentacije za svako detektovano jedinjenje, prikazani su u Tabeli 4.30, zajedno sa njihovim retencionim vremenima. Identifikovana jedinjenja se mogu klasifikovati u četiri strukturno različite grupe: (1) monomerni flavan-3-oli (3 jedinjenja); (2) A tip procijanidin izomeri (2 jedinjenja); (3) B tip procijanidin izomeri (17 jedinjenja); (4) procijanidin galat izomeri (11 jedinjenja). Sadržaji svih detektovanih flavan-3-ola su izraženi kao µg ekvivalenti katehina po L ekstrakta (µg CE/L), i prikazani su u Tabeli 4.31. Sadžaj procijanidin oligomera, koji uključuju dimere, trimere i tetramere je bio značajno viši (oko 70%) u poređenju sa flavan-3-ol monomerima. Najdominantniji oligomeri su bili B tip procijanidin izomeri (oko 50%). Dominantno prisustvo procijanidin oligomera i B tip procijanidin izomera u ekstraktima semenke grožđa je prethodno potvrđeno u nekoliko različitih studija (Ivanova et al., 2011; Pineda-Vadillo et al., 2016; Serra et al., 2010). Iako je prisustvo flavan-3-ola potvrđeno u ekstraktima pokožica različitih sorti grožđa analiziranih od strane Pantelić et al. (2016), oni nisu detektovani u ekstraktu pokožice Prokupca analiziranoj u ovoj studiji. Veoma je važno napomenuti da je matriks hrane sadržao značajne količine fenolnih kiselina i flavonola, koji su poreklom od sastavnih konstituenata analiziranog pirea za odojčad, koji sadrži: krompir, kukuruz i pirinač (Blessington et al., 2010; Thakur et al., 2017; Zaupa et al., 2015). Među detektovanim fenolnim kiselinama, najdominantnije su bile elaginska, hlorogenska i kofeinska kiselina, dok su kvercetin i izoramnetin bili dominantni flavonoli (Tabela 4.28 i 4.29). Ukupan relativni sadržaj fenolnih kiselina i flavonola je bio približno 76%, odnosno 9%, u poređenju sa sadržajem istih,

detektovanih u ekstraktima pokožice i semenke Prokupca. Treba spomenuti da je registrovano i prisustvo procijanidin galat izomera; međutim, njihov relativan sadržaj u poređenju sa ukupnim sadržajem flavan-3-ola u polaznom ekstraktu semenke bio je zanemarljiv, samo 0,04% (Tabela 4.31).

4.4.1.2. Profil fenolnih jedinjenja digeriranog ekstrakta pokožice i semenke grožđa bez prisustva matriksa hrane

Mešanje ekstrakata sa digestivnim fluidom i njihova digestija različito su uticali na koncentraciju glavnih fenolnih jedinjenja. Njihov sadržaj se u ekstraktu pokožice povećava (protokatehinska kiselina), smanjuje (kvercetin, kvercetin-3-*O*-galaktozid, izoramnetin, malvidin-3-*O*-glukozid i taksifolin) ili ostaje nepromenjen (hlorogenska kiselina, elaginska kiselina, ferulinska kiselina, rutin, izoramnetin-3-*O*-glukozid). Slične promene su primećene i u sadržaju fenolnih jedinjenja ekstrahovanih iz semenke grožđa. Međutim, biodostupnost dominantnih polifenolnih grupa ekstrakta semenke se značajno razlikovala u poređenju sa ekstraktom pokožice, što se posebno primećuje kod fenolnih kiselina gde je biodostupnost od 133,5% u slučaju ekstrakta pokožice, i 43,5% u slučaju semenke. Ovo je rezultiralo skoro dva puta manjom ukupnom biodostupnošću svih detektovanih polifenola (osim flavan-3-ola) ekstrahovanih iz semenke grožđa (44,7%), u poređenju sa pokožicom (84,6%). Ovo može biti zbog oslobađanja značajnih količina *p*-kumarinske i kofeinske kiseline nakon mešanja i digestije polifenolnog ekstrakta pokožice grožđa sa digestivnim fluidom. Poznato je da su ovo dve dominantne fenolne kiseline, koje učestvuju u formiranju antocijan derivata u grožđu (Ivanova et al., 2011; Mitic et al., 2012; Pantelić et al., 2016), iz kojih potom najverovatnije dolazi do njihovog oslobođanja. Pronađeno je da su peonidin-3-*p*-kumaroilmonoglukozid i malvidin-3-*p*-kumaroilmonoglukozid bili među najzastupljenijim *p*-kumaroilmonoglukozid derivatima u vinskoj sorti grožđa Prokupac (Mitic et al., 2012), a što je potvrđeno i u ovoj disertaciji (Tabela 4.10). Malvidin-3-*O*-kofeoilheksozid je takođe pronađen u Prokupcu (Pantelić et al., 2016), dok su peonidin-3-*O*-kofeoilglukozid i malvidin-3-*O*-kumaroilglukozid-5-*O*-glukozid registrovani u drugim sortama grožđa (He et al., 2010). Ovi acilovani antocijan derivati nisu otkriveni u polaznom polifenolnom ekstraktu pokožice, verovatno zbog njihove smanjene polarnosti u poređenju sa monoglukozidima (Ivanova et al., 2011). Naime, zbog slabe rastvorljibosti u miliQ vodi, ova jedinjenja su uklonjena iz polaznog polifenolnog ekstrakta pokožice filtracijom kroz 0,45µm filtere neposredno pre UHPLC-MS/MS Orbitrap analize. Sa druge strane, u ovom modelu digestije je korišćen kompletan nefiltriran ekstrakt, pa su acilovani antocijan derivati bili prisutni u digestivnoj smeši. Nakon dodavanja i mešanja digestivnog koktela koji je sastavljen od različitih supstanci (digestivni enzimi, soli, HCl), sa polifenolnim ekstraktom pokožice dolazi do deacilacije antocijanidin mono- i diglukozida što je rezultiralo pojavom *p*-kumarinske kiseline, kofeinske kiseline i malvidin-3,5-di-*O*-glukozida u kontrolnom (PEK) i digeriranom (DPE) uzorku ekstrakta pokožice. Pokazano je da su acilovani antocijan derivati skloniji ka razgradnji u poređenju sa antocijanidin glikozidima (Howard et al., 2016). Međutim, koncentracija antocijanidin monoglukozida se nije povećala u PEK i DPE uzorcima, zbog njihove nestabilnosti u takvom okruženju (Sharma et al., 2016). Cijanidin-3-*O*-glukozid, delfinidin-3-*O*-glukozid i cijanidin-3,5-di-*O*-glukozid nisu detektovani u polaznom ekstraktu pokožice. Digestija ekstrakta pokožice je značajno smanjila sadržaj ukupnih antocijana, dok je njihova biodostupnost bila približno 29%. Mala stabilnost antocijana nakon *in vitro* digestije, primećena je i u drugim studijama (Pineda-Vadillo et al., 2016; Wang et al., 2017). Nakon mešanja sa digestivnim koktelom i digestije ekstrakta pokožice primećeno je takođe oslobađanje nekih manje zastupljenih fenolnih jedinjenja, poput luteolina, genisteina i pterostilbena. Digestija matriksa hrane je rezultirala biodostupnošću fenolnih kiselina od čak 73,2%, prateći slično ponašanje kao i fenolne kiseline iz ekstrakta pokožice grožđa tokom digestije.

Nakon *in vitro* digestije ekstrakta pokožice, flavonoli poput rutina i kvercetina su ostali stabilni, dok izoramnetin nije uopšte detektovan. Digestivna stabilnost izoramnetin-3-*O*-glukozida i kvercetin-3-*O*-galaktozida je zavisila od porekla, a njihova biodostupnost nakon digestije ekstrakta pokožice je bilo 100,1% i 79,9%; dok prisustvo spomenutih polifenola nakon digestije ekstrakta semenke nije primećeno (Tabela 4.29). Antunes-Ricardo et al. (2017), su primetili da je nakon oralne i gastrične

digestije ekstrakta *Opuntia ficus-indica*, biodostupnost izoramnetina bila niža u poređenju sa njegovim glikozidima. Štaviše, može se reći da biodostupnost flavonoid glikozida zavisi od drugih polifenola prisutnih u analiziranim ekstraktima, koji bi mogli imati po njih zaštitne efekte. Ukupna biodostupnost flavonola posle *in vitro* digestije ekstrakta pokožice je bila 69%, što je u skladu sa rezultatima koje su publikovali Wang et al. (2017). Oni su utvrdili da je biodostupnost flavonola nakon digestije komine crne sorte grožđa bilo 65%.

Dodatak i mešanje digestivnog fluida je pokazalo najznačajniji efekat na biodostupnost flavan-3-ola poreklom iz ekstrakta semenke. Samo 0,31% od ukupno detektovanih flavan-3-ola u polaznom ekstraktu je potvrđeno nakon dodatka digestivnog fluida, dok je digestijom biodostupnost smanjena na 0,23% (Tabela 4.31). Očigledno je da postoji jaka tendencija vezivanja flavan-3-ola za enzime digestivnog trakta. Značajan gubitak flavan-3-ola su primetili i drugi autori, pre svega zbog njihove interakcije sa proteinima/enzimima (Pineda-Vadillo et al., 2016; Serra et al., 2010).

4.4.1.3. Profil fenolnih jedinjenja digeriranog ekstrakta pokožice i semenke grožđa u prisustva matriksa hrane

Dodavanje matriksa hrane i njegovo mešanje sa ekstraktom pokožice grožđa nije značajno uticalo na biodostupnost glavnih fenolnih jedinjenja pokožice, u poređenju sa digestijom ekstrakta bez prisustva matriksa hrane (Tabela 4.28). Međutim, biodostupnost fenolnih jedinjenja je izračunata kao odnos njihovog sadržaja u digeriranoj smeši ekstrakta i matriksa (DPE/M) i njihovog sadržaja u polaznom ekstraktu pokožice (PE), ne uzimajući u obzir količinu fenolnih jedinjenja poreklom iz matriksa hrane. U suprotnom, ukupna biodostupnost karakterističnih fenolnih grupa bi bila značajno manja, i to 68,1% umesto 125,2% za fenolne kiseline, odnosno 36,7% umesto 62,9% za flavonole. Značajni uticaj matriksa hrane je primećen i u slučaju biodostupnosti antocijana. Matriks hrane dodatno smanjuje stabilnost antocijana, što je rezultiralo potpunim odsustvom malvidin-3-*O*-glukozida i oslobađanjem malvidin-3,5-di-*O*-glukozida, ali značajno manje nego u slučaju digestije ekstrakta bez matriksa (DPE), sa biodostupnošću ukupnih antocijana od samo 10,2%. Slični rezultati, zasnovani na smanjenom sadržaju antocijana, i to čak do 91%, bili su primećeni nakon mešanja i digestije kompleksnog matriksa hrane sastavljenog od mesnih proteina, ugljenih hidrata i lipida sa sokom aronije (Stanisavljević et al., 2015). Štaviše, studije koje su sproveli Pineda-Vadillo et al. (2016) i Karakaya et al. (2016), su pokazale da je biodostupnost antocijana veoma zavisna od tipa matriksa hrane (39%-60%). Međutim, u svim formulacijama (koje ne sadrže meso) prisustvo matriksa je imalo zaštitni efekat na razgradnju antocijana, posebno u proizvodima na bazi jaja. Na osnovu rezultata prethodnih istraživanja, primećeno smanjenje sadržaja antocijana u ovoj studiji, nakon dodavanja matriksa hrane može se pripisati interakcijama antocijana sa proteinima ili drugim konstituentima mesa. Prethodno je opisano da fenolnih jedinjenja lako stupaju u interakcije sa proteinima mleka i mesa, što značajno utiče na njihov sadržaj, biodostupnost i funkcionalna svojstva (Jakobek, 2015; Ozdal et al., 2013). Ukupna biodostupnost fenolnih jedinjenja iz ekstrakta pokožice grožđa je 44,1% umesto 74,8%, kako je izračunato u modelu bez fenolnih jedinjenja poreklom iz matriksa hrane. Ovi podaci ističu važnost određivanja polifenolnog sastava matriksa hrane koji nisu prirodno bogati fenolnim jedinjenjima, što može značajno uticati na izračunavanje biodostupnosti fenolnih jedinjenja koja su prisutna u uzorcima pre digestije.

Uticaj matriksa hrane na biodostupnost fenolnih kiselina prisutnih u ekstraktu semenke grožđa je bio manje izražen, nego što je to bio slučaj kod ekstrakta pokožice, prvenstveno zbog značajno manjeg sadržaja fenolnih kiselina u matriksu hrane (MA), u poređenju sa njihovim sadržajem u polaznom ekstraktu semenke (SE). Posmatrajući pojedinačno detektovane fenolne kiseline, matriks hrane je povećao biodostupnost galne kiseline. Primećeno je skoro potpuno odsustvo flavonola nakon dodavanja matriksa hrane, a njihova biodostupnost je smanjena na manje od 1% posle digestije smeše ekstrakta semenke i matriksa (DSE/MR). Niskom iskorišćenju najviše doprinosi ukupno smanjenje kvercetina u smeši nakon digestije, što se potpuno razlikuje od iskorišćenja nakon digestije smeše ekstrakta pokožice i matriksa (DPE/MR)(ukupna biodostupnost kvercetina je bila 49,5%), i digestije ekstrakta semenke bez matriksa (DSE) (ukupna biodostupnost kvercetina je bila 99,7%). Zanimljivo

je da se nestanak kvercetina dogodio i pre digestije, odmah nakon dodavanja matriksa hrane i digestivnog fluida. Ovo ukazuje da razlika u stabilnosti kvercetina u prisustvu složenog matriksa hrane jako zavisi od ostalih fenolnih jedinjenja prisutnih u ekstraktima. Glavna razlika između ekstrakta semenke i pokožice grožđa je bila u sadržaju flavan-3-ola i elaginske kiseline.

Smanjenje sadržaja elaginske kiseline u prisustvu matriksa hrane bilo je približno deset puta, u odnosu na njen sadržaj u polaznom ekstraktu semenke (SE); dok je njeno smanjenje u modelu bez matriksa hrane bilo 1,4 puta. Mogući razlog ovakvih rezultata za elaginsku kiselinu, mogao bi verovatno biti zbog njenih interakcija sa konstituentima matriksa hrane pod ovim uslovima, što je ujedno rezultiralo u smanjenju sposobnosti elaginske kiseline i/ili konstituenata matriksa hrane da zaštite kvercetin tokom digestije. Predhodne studije su pokazale da je kvercetin manje stabilan pri višim pH i da njegova biodostupnost zavisi od matriksa: luk, 52,5% (Boyer et al., 2005), brašno od kakija, 0% (R. Lucas-González et al., 2018), komina crnog grožđa, 54,5% (Wang et al., 2017). Ukupna biodostupnost fenolnih jedinjenja ekstrakta semenke (izuzev flavan-3-ola) je bilo 50,9% (proračun obuhvata polifenole poreklom iz matriksa hrane) ili 55,5% (proračun ne obuhvata polifenole poreklom iz matriksa hrane).

Sadržaj flavan-3-ola se značajno smanjio nakon dodavanja digestivnog fluida u oba slučaja, sa ili bez matriksa hrane. Međutim, matriks hrane je zaštitio flavan-3-ole tokom digestije i njihova biodostupnost se povećala približno dvadeset puta, u poređenju sa njihovom biodostupnošću nakon digestije ekstrakta semenke (DSE), odnosno biodostupnost flavan-3-ola se povećala sa 0,23% na 4,71% (Tabela 4.31). Mala biodostupnost flavan-3-ola je očekivana, jer je poznato da procijanidini veoma intenzivno reaguju sa digestivnim enzimima i konstintuentima hrane (proteini, ugljeni hidrati i lipidi), što je podstaklo povećan stepen njihove polimerizacije (Jakobek, 2015; Sugiyama et al., 2007). Prema Pineda-Vadillo et al. (2016), povećanje biodostupnosti procijanidina nakon digestije zavisi od matriksa hrane. Međutim, u većini slučajeva, najveći deo procijanidina na kraju digestije ostaje nerastvoran. Slične rezultate su dobili Serra et al. (2010), koji su otkrili da je manje od 1% rastvornih procijanidina bilo prisutno nakon digestije ekstrakta procijanidina iz semenke grožđa sa i bez matriksa bogatog ugljenim hidratima.

Tabela 4.28. Sadržaj fenolnih jedinjenja u nedigeriranim i digeriranim uzorcima ekstrakta pokožice grožđa (rezultati su izraženi kao µg/L). *In vitro* model digestije bez/sa prisustvom matriksa hrane.

Fenolna jedinjenja (µg/L)	PE	PEK	DPE	DPER, %	MA	MKo	DM	DMR, %	PE/MK	DPE/M	DPE/MR,% (DPE/MTR,%)
Fenolne kiseline i njihovi derivati[1]											
Protokatehinska kiselina	45,85±0,44^{a}	43,46±4,06^{a}	56,40±0,69^{b}	123,0	n.d.	22,28±0,22^{c}	n.d.	-	47,66±4,40^{ab}	n.d.	0
Elaginska kiselina	532±5^{a}	491±76^{abcd}	442±5^{b}	83,1	408±48^{abc}	284±70^{bc}	354±1^{c}	86,9	617±17^{d}	401±42^{bc}	75,4
Hlorogenska kiselina	48,23±1,12^{a}	n.d.	56,34±8,74^{abc}	116,8	79,82±14,67^{abc}	50,05±1,92^{ab}	52,53±0,32^{b}	65,8	59,18±0,50^{c}	49,30±0,25^{a}	102,2
Ferulinska kiselina	91,44±0,46^{a}	70,23±0,29^{b}	91,54±22,75^{abc}	100,1	n.d.	n.d.	n.d.	-	138,26±21,58^{ac}	129,13±6,89^{c}	141,2
Kofeinska kiselina	n.d.	107,07±10,97^{abd}	120,75±0,8^{a}	-	82,47±0,35^{b}	n.d.	n.d.	0	148,60±7,10^{c}	129,8±0,22^{cd}	-
p-Kumarinska kiselina	n.d.	141,04±23,1^{ae}	191,15±25,8^{ae}	-	30,87±4,49^{bc}	42,24±0,04^{c}	33,58±0,07^{d}	108,8	165,30±0,22^{a}	189,10±0,95^{e}	-
Σ	**717,5 (24,4)**	**852,3 (38,6)**	**958,2 (38,5)**	**133,5**	**600,7 (29,3)**	**398,3 (28,9)**	**440,1 (31,5)**	**73,3**	**1176,0**	**898,3 (40,7)**	**125,2 (68,2)**
Flavonol aglikoni i glikozidi[1]											
Kvercetin	851,97±0,24^{a}	833,63±0,68^{bc}	834,90±0,20^{b}	97,9	833,58±0,43^{bc}	833,58±0,19^{c}	833,60±0,38^{c}	100,0	834,20±1,15^{bc}	834,70±0,53^{bc}	98,0
Kvercetin-3-*O*-galaktozid	246,6±15,08^{a}	141,68±26,7^{bc}	196,50±6,59^{b}	79,7	n.d.	n.d.	n.d.	-	117,67±4,70^{c}	130,30±4,36^{c}	52,8
Rutin	31,14±0,19^{a}	28,01±0,76^{b}	32,40±2,01^{ab}	104,0	22,06±0,75^{c}	n.d.	22,92±0,05^{c}	103,9	29,60±0,60^{ab}	28,90±0,04^{b}	92,8
Izoramnetin	535,98±1,58^{a}	n.d.	n.d.	0	533,75±0,19^{a}	n.d.	n.d.	0	533,40±0,23^{a}	n.d.	0
Izoramnetin-3-*O*-glukozid	275,20±18,97^{a}	192,90±34,2^{ab}	275,45±20,5^{a}	100,1	n.d.	n.d.	n.d.	-	189,50±0,03^{b}	228,00±8,28^{a}	82,8
Σ	**1940,9 (65,9)**	**1196,2 (54,2)**	**1339,3(53,8)**	**69,0**	**1389,4(67,8)**	**833,6 (60,3)**	**856,5 (61,3)**	**61,6**	**1704,4**	**1222 (55,4)**	**62,9 (36,7)**
Antocijani[2]											
Malvidin-3-*O*-glukozid	100,8±15,01^{a}	19,50±0,36^{b}	22,68±0,27^{c}	22,3	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	0
Malvidin-3,5-di-*O*-glukozid	n.d.	23,47±0,31^{a}	25,40±0,53^{c}	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	16,77±0,14^{b}	-
Peonidin-3-*O*-glukozid	64,70±0,41^{a}	35,83±0,08^{b}	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	-	26,25±0,26^{c}	n.d.	0
Σ	**165,5 (5,6)**	**78,8 (3,6)**	**48,0 (1,92)**	**29,1**	**-**	**-**	**-**	**-**	**26,2**	**16,8**	**10,2**
Ostali kvantifikovani polifenoli[1]											
Luteolin	n.d.	n.d.	51,65±0,32	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-
Genistein	n.d.	n.d.	13,36±1,88^{abc}	-	n.d.	11,30±0,32^{a}	9,44±0,38^{b}	-	n.d.	13,85±0,11^{c}	-
Aeskulin	34,12±2,95^{1}	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	0
Floretin	32,64±0,14^{1}	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	0
Taksifolin	55,46±0,21^{a}	52,71±0,21^{b}	53,96±0,1^{c}	97,3	n.d.	52,51±0,32^{b}	n.d.	-	56,26±0,22^{a}	n.d.	0
Pterostilbeni	n.d.	28,03±6,57^{ab}	25,70±0,11^{a}	-	n.d.	25,42±0,78^{a}	32,89±0,08^{b}	-	52,00±2,93^{c}	52,55±0,83^{c}	-
Eriodiktiol	n.d.	n.d.	n.d.	-	58,83±0,07^{a}	58,86±0,05^{a}	58,73±0,25^{a}	99,8	n.d.	n.d.	-
Σ Σ	**2946,1**	**2208,0**	**2490,2**	**84,6**	**2048,8**	**1380,0**	**1397,7**	**68,2**	**3014,9**	**2203,5**	**74,8 (44,1)****

Vrednosti su dobijeni iz dva nezavisna merenja (n=2) i prikazane kao srednje vrednosti ±standardna devijacija. Vrednosti koje su označene sa istim slovom u istom redu nisu statistički značajno različite prema *t*-testu, ($p<0,05$). Vrednosti u zagradama definišu procenat zastupljenosti karakterističnih polifenolnih grupa u uzorku (%). Skraćenice: „n.d.“-nije detektovan; PE-razblažen ekstrakt pokožice; PEK- digestija ekstrakta pokožice kontrola(t_0); DPE-digeriran ekstrak pokožice; DPER-biodostupnost („recovery“) fenolnih jedinjenja nakon *in vitro* digestije ekstrakta pokožice; MA-razblažen matriks hrane; MKo-digestija matriksa hrane kontrola (t_0); DM-digeriran matriks hrane; DMR-biodostupnost („recovery“) fenolnih jedinjenja nakon *in vitro* digestije matriksa hrane; PE/MK-digestija ekstrakta pokožice u prisustvu matriksa hrane (t_0); DPE/M-digeriran ekstrakt pokožice u prisustvu matriksa hrane; DPE/MR-biodostupnost („recovery“) fenolnih jedinjenja iz ekstrakta pokožice nakon *in vitro* digestije u prisustvu matriksa hrane; DPE/MTR- ukupna biodostupnost („recovery“) fenolnih jedinjenja nakon *in vitro* digestije ekstrakta pokožice u prisustvu matriksa hrane. Napomena: [1] UHPLC-DAD MS/MS kvatifikovana fenolna jedinjenja; [2] UHPLC-MS/MS Orbitrap kvantifikovani polifenoli (antocijani).

Tabela 4.29. Sadržaj fenolnih jedinjenja (osim flavan-3-ola) u nedigeriranim i digeriranim uzorcima ekstrakta semenke grožđa (rezultati su izraženi kao µg/L). *In vitro* model digestije bez/sa prisustvom matriksa hrane.

Fenolna jedinjenja (µg/L)	SE	SEK	DSE	DSER%	MA	MKo	DM	DMR, %	SE/MK	DSE/M	DSE/MR,% (DSE/MTR,%)
Fenolne kiseline i njihovi derivati[1]											
Galna kiselina	1224,70±31,70^{a}	n.d.	772,30±1,01^{b}	63,1	n.d.	n.d.	n.d.	-	852,40±34,50^{bc}	958,80±55,4^{c}	78,3
Protokatehinska kiselina	35,59±0,23^{a}	30,78±1,41^{bd}	32,20±0,46^{b}	90,5	n.d.	22,30±0,29^{c}	n.d.	-	27,60±0,11^{d}	29,40±1,79^{bd}	82,6
Elaginska kiselina	19457±882^{a}	13800±2135^{abe}	8093±313^{b}	41,6	408±48^{c}	284±70^{c}	354±1^{c}	86,9	1793±124^{d}	11114±181^{e}	57,1
Hlorogenska kiselina	48,55±1,45^{a}	n.d.	58,30±13,97^{abc}	120,1	79,82±14,67^{abc}	50,05±1,90^{a}	52,58±0,25^{a}	65,8	61,82±0,60^{b}	57,99±0,10^{c}	119,4
Kofeinska kiselina	n.d.	84,09±1,12^{a}	83,93±0,70^{a}	-	82,47±0,34^{a}	n.d.	n.d.	0	93,94±0,17^{b}	93,30±1,04^{b}	-
p-Kumarinska kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	-	30,87±4,49^{ab}	42,30±0,11^{a}	33,67±0,20^{b}	109,1	37,69±2,01^{ab}	37,30±2,03^{ab}	-
Σ	**20766,5 (93,0)**	**13915,4(93,3)**	**9039,7 (90,5)**	**43,5**	**600,7 (29,3)**	**398,5 (28,9)**	**440,3 (31,5)**	**73,3**	**2867,3**	**12290,8(99,1)**	**59,2 (57,5)**
Flavonol aglikoni i glikozidi[1]											
Kvercetin	836,73±0,71^{a}	833,74±0,19^{b}	834,50±0,27^{ab}	99,7	833,57±0,42^{b}	833,7±0,38^{b}	833,55±0,31^{b}	100,0	n.d.	n.d.	0
Kvercetin-3-*O*-galaktozid	12,83±0,02^{1}	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	0
Rutin	23,32±0,11^{a}	23,30±0,21^{ab}	27,73±4,09^{abc}	118,9	22,06±0,75^{abc}	n.d.	22,90±0,05^{b}	103,8	21,85±0,12^{c}	22,47±0,42^{abc}	96,3
Izoramnetin	533,65±0,31^{a}	n.d.	n.d.	0	533,70±0,12^{a}	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
Izoramnetin-3-*O*-glukozid	10,88±1,41^{1}	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	0
Kampferol	38,79±0,13^{1}	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	0
Σ	**1456,2 (6,5)**	**857,0 (5,7)**	**862,2 (8,6)**	**59,2**	**1389,3 (67,8)**	**833,7 (60,4)**	**856,4 (61,3)**	**61,6**	**21,9**	**22,47 (0,18)**	**1,5 (0,8)**
Ostali kvantifikovani polifenoli[1]											
Luteolin	n.d.	51,48±0,58^{1}	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-
Genistein	n.d.	n.d.	14,53±2,04^{ab}	-	n.d.	11,43±0,50^{a}	9,76±0,07^{b}	-	11,05±0,34^{a}	15,30±2,14^{ab}	-
Floretin	33,29±0,03^{1}	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	0
Taksifolin	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	52,30±0,09^{a}	n.d.	-	57,65±3,14^{a}	n.d.	-
Pterostilbeni	8,87±0,08^{a}	22,64±3,37^{bcd}	14,42±0,45^{b}	162,6	n.d.	25,40±0,71^{c}	32,80±0,14^{d}	-	116,30±0,19^{e}	13,79±0,13^{b}	155,5
Eriodiktiol	60,02±0,2^{a}	58,94±0,09^{bc}	59,01±0,25^{bc}	98,3	58,83±0,07^{b}	58,86±0,05^{bc}	58,54±0,51^{ab}	99,4	59,19±0,17^{bc}	59,40±0,17^{ac}	99,0
Σ Σ	**22324,9**	**14905,5**	**9990,3**	**44,7**	**2048,8**	**1380,2**	**1397,9**	**68,2**	**3133,3**	**12401,8**	**55,5 (50,9)****

Vrednosti su dobijeni iz dva nezavisna merenja (n=2) i prikazane kao srednje vrednosti ±standardna devijacija. Vrednosti koje su označene sa istim slovom u istom redu nisu statistički značajno različite prema *t*-testu, (p<0,05). Vrednosti u zagradama definišu procenat zastupljenosti karakterističnih polifenolnih grupa u uzorku (%). Skraćenice: „n.d.“-nije detektovan; SE-razblažen ekstrakt semenke; SEK- digestija ekstrakta semenke kontrola(t_0); DSE-digeriran ekstrakt semenke; DSER-biodostupnost („recovery“) fenolnih jedinjenja nakon *in vitro* digestije ekstrakta semenke; MA-razblažen matriks hrane; MKo-digestija matriksa hrane kontrola (t_0); DM-digeriran matriks hrane; DMR-biodostupnost („recovery“) fenolnih jedinjenja nakon *in vitro* digestije matriksa hrane;SE/MK-digestija ekstrakta semenke u prisustvu matriksa hrane (t_0); DSE/M-digeriran ekstrakt semenke u prisustvu matriksa hrane; DSE/MR- biodostupnost („recovery“) fenolnih jedinjenja iz ekstrakta semenke nakon *in vitro* digestije u prisustvu matriksa hrane; DSE/MTR- ukupna biodostupnost („recovery“) fenolnih jedinjenja nakon *in vitro* digestije ekstrakta semenke u prisustvu matriksa hrane. Napomena: UHPLC-DAD MS/MS kvatifikovana fenolna jedinjenja.

Tabela 4.30. UHPLC Orbitrap MS karakterizacija flavan-3-ola identifikovanih u početnom ekstraktu semenke. U tabeli su prikazani: retencino vreme (t_R), molekulska formula, izračunata masa, nađena masa, srednje odstupanje masa (ppm) i glavni MS^2, MS^3, i MS^4 fragmenti detektovanih jedinjenja

Jedinjenja	t_R, min	Molekulska formula, $[M–H]^-$	Izračunata masa, $[M–H]^-$	Nađena masa, $[M–H]^-$	ppm	MS^2 fragmenti	MS^3 fragmenti	MS^4 fragmenti
Monomerni flavan-3-oli								
Katehin	5,34	$C_{15}H_{13}O_6^-$	289,07176	289,07156	0,69	271(5), **245***(100), 205(40), 179(15), 125(5)	227(30), **203**(100), 187(25), 175(10), 161(20)	188(70), 185(20), 175(100), 161(40), 157(10)
Epikatehin	5,83	$C_{15}H_{13}O_6^-$	289,07176	289,07188	-0,42	271(5), **245**(100), 205(40), 179(15), 125(5)	227(35), **203**(100), 187(30), 175(15), 161(25)	188(60), 185(20), 175(100), 161(35), 157(15)
(*epi*)Katehin heksozid	4,93	$C_{21}H_{23}O_{11}^-$	451,12404	451,12463	-1,31	361(30), **331**(100), 289(70), 247(10)	**313**(100), 287(40), 269(30)	–
A tip procijanidin izomeri								
A tip procijanidin dimer izomer 1	4,90	$C_{30}H_{23}O_{12}^-$	575,11950	575,11993	-0,75	559(20), 421(50), **425**(100), 407(90), 289(50), 287(10)	**407**(100)	289(50), 297(40), 285(90), 281(100), 269(10)
A tip procijanidin dimer izomer 2	5,53	$C_{30}H_{23}O_{12}^-$	575,11950	575,11938	0,21	559(20), 421(60), **425**(100), 407(90), 289(60), 287(10)	**407**(100)	289(50), 297(40), 285(90), 281(100), 269(10)
B tip procijanidin izomeri								
B tip procijanidin dimer izomer 1	4,85	$C_{30}H_{25}O_{12}^-$	577,13515	577,13513	0,03	559(10), 451(30), **425**(100), 407(50), 289(25), 287(10)	**407**(100), 381(5), 273(10)	389(30), 297(30), 285(100), 243(70)
B tip procijanidin dimer izomer 2	5,10	$C_{30}H_{25}O_{12}^-$	577,13515	577,13525	-0,17	425(25), 407(10), 329(10), **289**(100), 287(80)	**245**(100), 205(30), 179(15)	227(30), 203(100), 187(30), 175(10), 161(20)
B tip procijanidin dimer izomer 3	5,50	$C_{30}H_{25}O_{12}^-$	577,13515	577,13531	-0,28	559(10), 451(30), **425**(100), 407(50), 289(25), 287(10)	**407**(100), 381(5), 273(10)	389(30), 297(30), 285(100), 243(70)
B tip procijanidin dimer izomer 4	6,01	$C_{30}H_{25}O_{12}^-$	577,13515	577,13519	-0,07	559(10), 451(30), **425**(100), 407(50), 289(25), 287(10)	**407**(100), 381(5), 273(10)	389(30), 297(30), 285(100), 243(70)
B tip procijanidin dimer izomer 5	6,53	$C_{30}H_{25}O_{12}^-$	577,13515	577,13489	0,45	559(10), 451(30), **425**(100), 407(50), 289(25), 287(10)	**407**(100), 381(5), 273(10)	389(30), 297(30), 285(100), 243(70)
B tip procijanidin dimer heksozid izomer 1	4,66	$C_{36}H_{35}O_{17}^-$	739,18797	739,18768	0,39	649(90), **619**(100), 587(80), 449(60), 407(15), 289(10)	601(30), 577(40), 467(90), 449(70), **289**(100)	–
B tip procijanidin dimer heksozid izomer 2	5,24	$C_{36}H_{35}O_{17}^-$	739,18797	739,18805	-0,11	649(20), 619(40), **587**(100), 449(60), 407(30), 289(20)	**569**(100), 509(10), 467(60), 407(90), 289(15)	–
B tip procijanidin trimer izomer 1	3,58	$C_{45}H_{37}O_{18}^-$	865,19854	865,19849	0,06	**695**(100), 577(60), 425(30), 407(30), 287(30)	**543**(100), 451(45), 243(60)	525(100), 391(40)
B tip procijanidin trimer izomer 2	4,21	$C_{45}H_{37}O_{18}^-$	865,19854	865,19739	1,33	**695**(100), 577(80), 425(30), 407(40), 287(35)	**543**(100), 451(45), 243(60)	525(100), 391(40)
B tip procijanidin trimer izomer 3	5,26	$C_{45}H_{37}O_{18}^-$	865,19854	865,19910	-0,65	**695**(100), 577(70), 425(30), 407(40), 287(30)	**543**(100), 451(45), 243(60)	525(100), 391(40)
B tip procijanidin trimer izomer 4	5,85	$C_{45}H_{37}O_{18}^-$	865,19854	865,19958	-1,20	**695**(100), 577(80), 425(35), 407(35), 287(30)	**543**(100), 451(45), 243(60)	525(100), 391(40)
B tip procijanidin tetramer izomer 1	4,75	$C_{60}H_{49}O_{24}^-$	1153,26193	1153,26062	1,14	1027(70), **983**(100), 865(80), 739(50), 575(90), 407(50)	**947**(100), 445(70)	–
B tip procijanidin tetramer izomer 2	5,02	$C_{60}H_{49}O_{24}^-$	1153,26193	1153,26001	1,66	1027(50), 983(80), **863**(100), 739(40), 575(50), 407(20)	827(30), 737(60), **701**(100), 575(90), 405(70)	–
B tip procijanidin tetramer izomer 3	5,35	$C_{60}H_{49}O_{24}^-$	1153,26193	1153,26086	0,93	1027(70), **983**(100), 865(80), 739(50), 575(90), 407(50)	932(40), 819(80), **667**(100), 573(90), 423(40)	–

nastavak

B tip procijanidin tetramer izomer 4	5,60	$C_{60}H_{49}O_{24}^-$	1153,26193	1153,26123	0,61	1027(40), 983(80), 863(70), 739(40), **575**(100), 407(30)	577(20), 449(40), 413(30), **287**(100)	–
B tip procijanidin tetramer izomer 5	5,97	$C_{60}H_{49}O_{24}^-$	1153,26193	1153,26160	0,29	1027(50), 983(80), **863**(100), 739(40), 575(50), 407(30)	737(40), 693(80), **575**(100), 413(40)	–
B tip procijanidin tetramer izomer 6	6,30	$C_{60}H_{49}O_{24}^-$	1153,26193	1153,26062	1,14	1027(40), 983(60), 863(80), 739(30), **575**(100), 407(30)	533(30), 449(60), 423(50), 413(40), **287**(100)	–
Procijanidin galat izomeri								
(*epi*)Katehin galat	6,69	$C_{22}H_{17}O_{10}^-$	441,08272	441,08282	-0,23	331(10), **289**(100), 271(10), 169(25)	271(5), **245**(100), 205(40), 179(20)	227(20), 203(100), 187(20), 175(10), 161(20)
B tip procijanidin dimer galat izomer 1	5,78	$C_{37}H_{29}O_{16}^-$	729,14611	729,14685	-1,01	**577**(100), 559(50), 425(30), 407(50), 289(5), 287(5)	559(50), 421(70), 425(50), **407**(100), 289(40)	389(25), 297(30), 285(100), 255(20), 243(20)
B tip procijanidin dimer galat izomer 2	6,04	$C_{37}H_{29}O_{16}^-$	729,14611	729,14679	-0,93	711(10), 603(30), 577(90), 559(90), **407**(100), 289(25)	389(25), 297(30), **285**(100), 255(20), 243(20)	257(100), 241(10), 213(5)
B tip procijanidin dimer digalat	6,41	$C_{44}H_{33}O_{20}^-$	881,15707	881,15698	0,10	**729**(100), 711(30), 577(10), 559(20), 541(10), 407(30)	711(20), 603(60), 577(50), 559(30), **407**(100)	–
B tip procijanidin trimer galat izomer 1	5,08	$C_{52}H_{41}O_{22}^-$	1017,20950	1017,20850	0,98	**965**(100), 847(10), 727(50), 695(40), 575(30), 557(30)	**847**(100), 695(80)	–
B tip procijanidin trimer galat izomer 2	5,51	$C_{52}H_{41}O_{22}^-$	1017,20950	1017,20892	0,57	999(25), 865(30), **729**(100), 595(25), 575(30), 407(20)	603(20), **577**(100), 559(60), 425(25), 407(70)	559(20), 451(60), 425(30), 407(100), 289(60)
B tip procijanidin trimer galat izomer 3	5,75	$C_{52}H_{41}O_{22}^-$	1017,20950	1017,20911	0,38	999(50), 865(60), **847**(100), 729(80), 575(30), 407(30)	829(40), 803(30), 695(40), **677**(100), 363(90)	–
B tip procijanidin trimer galat izomer 4	6,06	$C_{52}H_{41}O_{22}^-$	1017,20950	1017,20905	0,44	999(30), **865**(100), 847(60), 729(70), 575(30), 407(20)	847(80), **739**(100), 695(60), 407(30), 287(20)	–
B tip procijanidin trimer galat izomer 5	6,34	$C_{52}H_{41}O_{22}^-$	1017,20950	1017,20850	0,98	999(60), 865(80), **847**(100), 729(80), 577(40), 407(40)	847(90), 739(80), **695**(100), 407(20), 289(70)	–
B tip procijanidin trimer galat izomer 6	6,54	$C_{52}H_{41}O_{22}^-$	1017,20950	1017,20984	-0,33	999(30), 865(30), 847(60), **729**(100), 577(20), 407(30)	711(40), 603(50), **577**(100), 407(90), 289(20)	559(80), 451(40), 425(10), 407(100), 289(10)
B tip procijanidin trimer galat izomer 7	6,89	$C_{52}H_{41}O_{22}^-$	1017,20950	1017,20837	1,11	999(30), 891(70), 847(60), **729**(100), 577(40)	603(50), 577(90), 559(70), **407**(100), 287(50)	–

Skraćenice: „–“-odsustvo fragmenata; * Pikovi koji dalje fragmentiraju u MS^3 i MS^4 su podebljani

Tabela 4.31. UHPLC Orbitrap MS kvantifikacija i biodostupnost („recovery“) flavan-3-ola u nedigeriranim i digeriranim uzorcima ekstrakta semenke (rezultati su izraženi kao ekvivalenti katehina, µg CE/L). *In vitro* model bez/sa prisustvom matriksa hrane.

Jedinjenja	SE*	SEK	DSE	DSER%	MA	MKo	DM	DMR,%	SE/MK	DSE/M	DSE/MR,%
Monomerni flavan-3-oli											
Katehin	3830,50±0,39[a]	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	207,23±21,38[b]	5,4
Epikatehin	2634,00±198,0[a]	10,54±0,79[b]	7,38±0,55[c]	0,3	n.d.	n.d.	n.d.	0	126,17±9,48[d]	159,09±11,96[d]	6,0
(*epi*)Katehin heksozid	246,00±15,60[a]	12,18±0,77[b]	9,40±0,59[b]	3,8	n.d.	n.d.	n.d.	0	11,71±0,74[b]	18,35±1,16[c]	7,5
Σ	**6710,5 (27,3)**	**22,7**	**16,8**	**0,3**	**0**	**0**	**0**	**0**	**137,9**	**384,7**	**5,7**
A tip procijanidin izomeri											
A tip procijanidin dimer izomer 1	81,50±6,40[a]	10,44±0,82[b]	4,32±0,34[c]	5,3	n.d.	n.d.	n.d.	0	67,91±5,30[a]	6,50±0,51[d]	8,0
A tip procijanidin dimer izomer 2	64,50±6,40	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
Σ	**146,0 (0,6)**	**10,4**	**4,3**	**3,0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**67,9**	**6,5**	**4,5**
B tip procijanidin izomeri											
B tip procijanidin dimer izomer 1	3295±208[a]	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	169,03±10,66[b]	5,1
B tip procijanidin dimer izomer 2	644±8,50[a]	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	14,00±1,41[b]	2,2
B tip procijanidin dimer izomer 3	2626±248[a]	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	51,50±0,71[b]	2,0
B tip procijanidin dimer izomer 4	146,00±7,10	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
B tip procijanidin dimer izomer 5	97,50±6,40	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
B tip procijanidin dimer heksozid izomer 1	327,50±19,10[a]	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	3,11±0,18[b]	11,17±0,65[c]	3,4
B tip procijanidin dimer heksozid izomer 2	245,50±14,80[a]	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	4,04±0,06[b]	1,6
B tip procijanidin trimer izomer 1	1543,50±163,3[a]	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	55,41±5,86[b]	3,6
B tip procijanidin trimer izomer 2	69,50±3,50	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
B tip procijanidin trimer izomer 3	1042,00±8,50[a]	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	22,00±2,83[b]	2,1
B tip procijanidin trimer izomer 4	1061,00±52,30	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
B tip procijanidin tetramer izomer 1	37,50±2,10	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
B tip procijanidin tetramer izomer 2	292,50±29,00[a]	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	4,98±0,04[b]	1,7
B tip procijanidin tetramer izomer 3	180,50±7,80[a]	14,57±0,63[b]	9,60±0,41[c]	5,3	n.d.	n.d.	n.d.	0	198,04±8,53[a]	n.d.	0
B tip procijanidin tetramer izomer 4	144,00±1,40	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
B tip procijanidin tetramer izomer 5	419,50±3,50	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
B tip procijanidin tetramer izomer 6	196,00±12,70	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
Σ	**12367,0 (50,3)**	**14,6**	**9,6**	**0,1**	**0**	**0**	**0**	**0**	**201,2**	**332,1**	**2,7**
Procijanidin galat izomeri											
(*epi*)Katehin galat	1071,50±119,5[a]	12,75±1,42[b]	21,86±2,44[c]	2,0	2,20±0,14[d]	1,02±0,07[e]	n.d.	0	15,43±1,72[bc]	188,48±21,02[f]	17,6
B tip procijanidin dimer galat izomer 1	940,50±87,00[a]	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	17,21±1,59[b]	98,66±9,12[c]	10,5
B tip procijanidin dimer galat izomer 2	1804,00±87,70[a]	n.d.	n.d.	0	4,45±0,07[b]	n.d.	n.d.	0	33,37±1,62[c]	145,94±7,09[d]	8,1
B tip procijanidin dimer digalat	205,50±17,70[a]	15,25±1,31[b]	2,90±0,25[c]	1,4	1,65±0,07[d]	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
B tip procijanidin trimer galat izomer 1	151,00±2,80	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
B tip procijanidin trimer galat izomer 2	213,00±15,60	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
B tip procijanidin trimer galat izomer 3	196,00±12,70	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
B tip procijanidin trimer galat izomer 4	382,00±24,00	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
B tip procijanidin trimer galat izomer 5	106,50±3,50	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0

nastavak

B tip procijanidin trimer galat izomer 6	205,00±26,90[a]	0,78±0,10[b]	n.d.	0	1,25±0,07[c]	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
B tip procijanidin trimer galat izomer 7	78,50±3,50	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
Σ	**5353,5 (21,8)**	**28,8**	**24,8**	**0,5**	**9,6 (100)**	**1,0**	**0**	**0**	**66,0**	**433,1**	**8,1**
Σ Σ	**24577,0**	**76,5**	**55,5**	**0,2****	**9,6**	**1,0**	**0**	**0**	**473,00**	**1156,4**	**4,7****

*Vrednosti u zagradama definišu procenat zastupljenosti izdvojenih podgrupa (specifičnih) flavan-3-ol grupa u uzorku (%).

**Biodostupnost flavan-3-ola, definiše odnos kvantifikovanih flavan-3-ola posle *in vitro* digestije i kvantifikovanih flavan-3-ola u odnosu na polazni ekstrakt semenki.

Vrednosti su dobijeni iz dva nezavisna merenja (n=2) i prikazane kao srednje vrednosti ±standardna devijacija. Vrednosti koje su označene sa istim slovom u istom redu nisu statistički značajno različite prema *t*-testu, (p<0,05). Skraćenice: „n.d.“-nije detektovan; SE-razblažen ekstrakt semenke; SEK- digestija ekstrakta semenke kontrola (t_0); DSE-digeriran ekstrakt semenke; DSER-biodostupnost („recovery“) flavan-3-ola nakon *in vitro* digestije ekstrakta semenke; MA-razblažen matriks hrane; MKo-digestija matriksa hrane kontrola (t_0) ; DM-digeriran matriks hrane; DMR-biodostupnost („recovery“) flavan-3-ola nakon *in vitro* digestije matriksa hrane; SE/MK-digestija ekstrakta semenke u prisustvu matriksa hrane (t_0); DSE/M-digeriran ekstrakt semenke u prisustvu matriksa hrane; DSE/MR-ukupna biodostupnost („recovery“) flavan-3-ola nakon *in vitro* digestije ekstrakta semenke u prisustvu matriksa hrane.

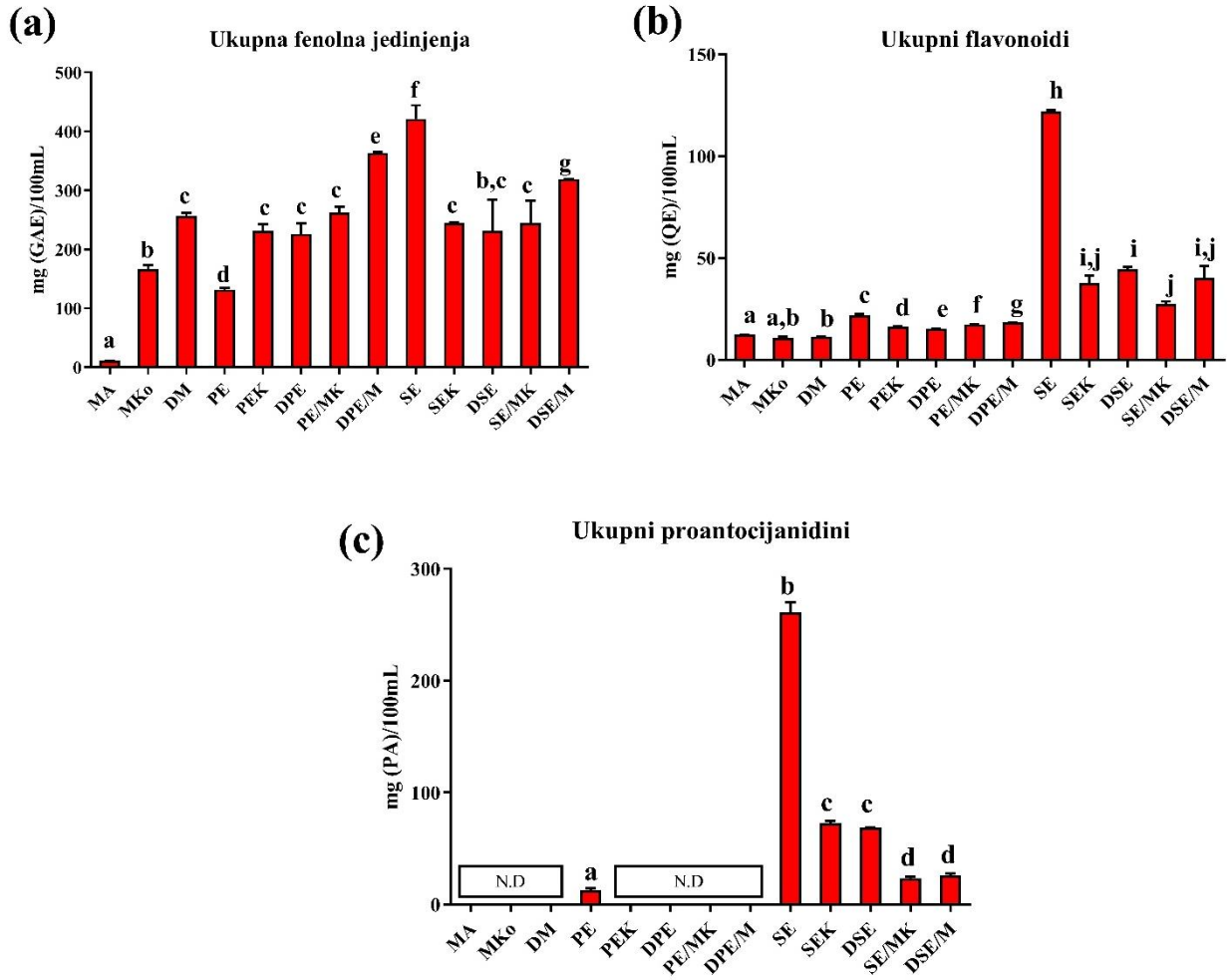
4.4.1.4. Spektrofotometrijska analiza

4.4.1.4.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja

Neke od predhodnih *in vitro* studija su istraživale ukupnu biodostupnost fenolnih jedinjenja nakon *in vitro* digestije grožđa i ekstrakta grožđa, koristeći opšte poznatu Folin-Ciocalteu-ovu metodu (Wang et al., 2017). Međutim, imajući u vidu ograničenja Folin-Ciocalteu-ove metode, dobijene rezultate treba uvek tumačiti sa velikim oprezom, posebno u situacijama kada pored proučavanog ekstrakta ili jedinjenja, sistem sadrži složen matriks hrane. Prethodno je utvrđeno da se Folin-Ciocalteu-ov reagens može nespecifično redukovati askorbatom, redukujućim ugljenim hidratima, aromatičnim aminima, organskim kiselinama, masnim kiselinama i jonima gvožđa Fe^{2+}, kao i proteinima i malim peptidima koji nastaju tokom digestije proteina iz hrane (Prior et al., 2005). Upoređujući rezultate ukupnih fenolnih jedinjenja ekstrakta pokožice (PE) dobijene u ovoj studiji, 131,7mg(GAE)/100mL (Slika 4.48a), sa ukupnim fenolnim jedinjenjima smeše ekstrakta pokožice i digestivnog koktela u nultom trenutku digestije (PEK), 230,8mg (GAE)/100mL, može se zaključiti da digestivni enzimi i digestivni fluid doprinose ukupnom sadržaju fenolnih jedinjenja sa približno 100mg(GAE)/mL. Slična situacija je primećena u slučaju matriksa hrane (MA/MKo), gde je zajednički doprinos digestivnog koktela bio još izraženiji (približno 150mg(GAE)/100mL). Očigledno da je sam digestivni koktel sadržao znatnu količinu supstanci reaktivnih prema Folin-Ciocalteu reagensu, što je rezultiralo povišenjem ukupnih fenolnih jedinjenja. Sa druge strane, potpuno suprotno ponašanje je zabeleženo mešanjem ekstrakta semenke grožđa sa digestivnim fluidom, gde je primećeno smanjenje ukupnih fenolnih jedinjenja za 40%, dostižući sličnu vrednost ukupnih fenolnih jedinjenja koja je dobijena za kontrolni uzorak ekstrakta pokožice sa digestivnim koktelom (PEK). Ovo bi se moglo objasniti razlikom u sastavu ekstrakta semenke grožđa, koji je sadržao značajnu količinu flavan-3-ola, koji su u isto vreme veoma reaktivni sa komponentama digestivnog koktela. Prema tome, flavan-3-oli i Folin-Ciocalteu reaktivne supstance iz digestivnog koktela nisu mogle da se oksiduju smešom volframa i molibdata, što je rezultiralo u smanjenju sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja. Vrednosti dobijene za sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja ekstrakta semenke i pokožice nakon digestije su ostale nepromenjene. Sa druge strane, digestija matriksa hrane rezultirala je porastom ukupnih fenolnih jedinjenja za skoro 35% (MKo u poređenju sa DM); međutim fenolni sastav se nije značajno promenio. Ovo je pokazatelj da su se potencijalne Folin-Ciocalteu reaktivne supstance, poput peptida, aminokiselina, redukujućih šećera i masnih kiselina, oslobodile tokom digestije matriksa hrane.

Dodatak matriksa hrane u digestivni koktel u nultom trenutku zajedno sa ekstraktom grožđa nije promenio vrednosti ukupnih fenolnih jedinjenja, što ukazuje na daleko niži doprinos matriksa hrane ukupnom sadržaju fenolnih jedinjenja, u poređenju sa digestivnim koktelom. Ovaj efekat bi mogao biti od velike važnosti, jer se doprinos digestivnog fluida na ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja, kod ovog tipa studija obično previdi. Kombinovana digestija matriksa i ekstrakta dovela je do porasta u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja za 39% (DPE/M), odnosno za 30% (DSE/M), u poređenju sa istim kontrolnim uzorcima; odnosno digeriranim uzorcima pokožice, semenke i matriksa hrane. Glavna posledica interakcije fenolnih jedinjenja i digestivnih enzima je inhibicija njihove aktivnosti (Cirkovic Velickovic & Stanic-Vucinic, 2018). Uzimajući u obzir ovu činjenicu, moglo bi se očekivati da digerirani uzorci ekstrakta pokožice/semenke grožđa sa matriksom hrane, pored aminokiselina, redukujućih ugljenih hidrata i masnih kiselina, sadrže i proizvode delimične hidrolize makromolekula, kao što su peptidi i oligosaharidi, koji mogu da deluju kao redukcioni agensi. Pored toga, oslobađanje fenolnih jedinjenja koji su bili prirodno prisutni u uzorcima matriksa hrane i grožđa posle digestije, kao i oslobađanje fenolnih jedinjenja iz semenke grožđa koji su u početku bili zarobljeni u interakciji sa makromolekulima matriksa i digestivnih enzima, dodatno je doprinelo povećanju ukupnih fenolnih jedinjenja. Ovi fenomeni su doprineli iskorišćenju ukupnih fenolnih jedinjenja ekstrakta pokožice od 275% i fenolnih jedinjenja ekstrakta semeneke od 75%. Brojne studije koje ispituju uticaj interakcija između proteina i fenolnih jedinjenja na ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja u hrani, ističu smanjenu biodostupnost fenolnih jedinjenja (Ozdal et al., 2013), posebno kada su glavni polifenoli flavan-3-oli, za koje je primećena biodostupnost ukupnih polifenola 25% u rastvorljivoj fazi ili čak još manje (Pineda-Vadillo et al., 2016). Veća biodostupnost ukupnih fenolnih

jedinjenja iz ekstrakta pokožice i semenke nakon digestije sa matriksom hrane dobijena u ovoj studiji, u poređenju sa drugim literaturnim podacima, moglo bi se pripisati sastavnim konstituentima matriksa hrane, kao što su proteini mesa i njihovi hidrolizati, za koje je prethodno utvrđeno da poseduju značajna redukciona svojstva (Elias et al., 2008; Serpen et al., 2012). Ovi podaci sugerišu da sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja određen Folin-Ciocalteu-ovom metodom odražava ukupnu redukcionu aktivnost analiziranih uzoraka, koja se često posmatra kao antioksidativna aktivnost i daje reprezentativnije tumačenje, nego kao ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja.



Slika 4.48. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (a); Sadržaj ukupnih flavonoida (b); Sadržaj ukupnih proantocijanidina (c), u analiziranim uzorcima. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti+standardna devijacija (n=2). Ista mala slova iznad stubića pokazuju da vrednosti nisu statistički značajno različite prema *t*-testu, (p<0,05). Skraćenice: „N.D.“-nije detektovan; MA-razblažen matriks hrane; MKo-digestija matriksa hrane kontrola (t_0) ; DM-digeriran matriks hrane; PE-razblažen ekstrakt pokožice; PEK-digestija ekstrakta pokožice kontrola(t_0); DPE-digeriran ekstrak pokožice; PE/MK-digestija ekstrakta pokožice u prisustvu matriksa hrane (t_0); DPE/M-digeriran ekstrakt pokožice u prisustvu matriksa hrane; SE-razblažen ekstrakt semenke; SEK- digestija ekstrakta semenke kontrola (t_0); DSE-digeriran ekstrakt semenke; SE/MK-digestija ekstrakta semenke u prisustvu matriksa hrane (t_0); DSE/M-digeriran ekstrakt semenke u prisustvu matriksa hrane.

4.4.1.4.2. Sadržaj ukupnih flavonoida

Spektrofotometrijski test zasnovan na formiranju aluminiju-hlorid kompleksa, jedan je od najčešće primenjivanih analitičkih postupaka za određivanje ukupnog sadržaja flavonoida u uzorcima hrane i medicinskih biljaka. Detaljan metodološki pristup i specifičnosti ovog testa za određivanje flavonoida su najbolje opisali Pękal and Pyrzynska (2014). Postoje dve najčešće primenjivane procedure (sa ili bez $NaNO_2$), međutim, oba postupka zavise od klase flavonoida koja je prisutna u uzorku i specifična je samo za ograničen broj flavonoidnih jedinjenja (Pękal & Pyrzynska, 2014). Procedura koja

uključuje prisustvo $NaNO_2$ u alkalnoj sredini je široko korišćena za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u grožđu i komini grožđa (Ivanova et al., 2011; Ribeiro et al., 2015), koristeći katehin kao standard. Kako je ovaj metodološki pristup specifičan za katehin, rutin i luteolin među flavonoidima, odnosno fenolne kiseline koje takođe pokazuju značajnu absorbancu na 510nm (Pękal & Pyrzynska, 2014), dobijeni rezultate treba komentarisati imajući ovo u vidu. Za matriks hrane i ekstrakt pokožice grožđa, sadržaj ukupnih flavonoida je detektovan u malim količinama u svim analiziranim uzorcima (Slika 4.48b). Glavni razlog je bio taj što najzastupljeniji flavonoid kvercetin nije doprineo ukupnoj absorbanciji na 510nm. Rutin i fenolne kiseline su verovatno najviše učestvovali u određivanju sadržaja ukupnih flavonoida, koji su pokazali dobru stabilnost tokom eksperimenata sa digestijom, ali među njima nisu pronađene značajne korelacije pri $p<0,05$.

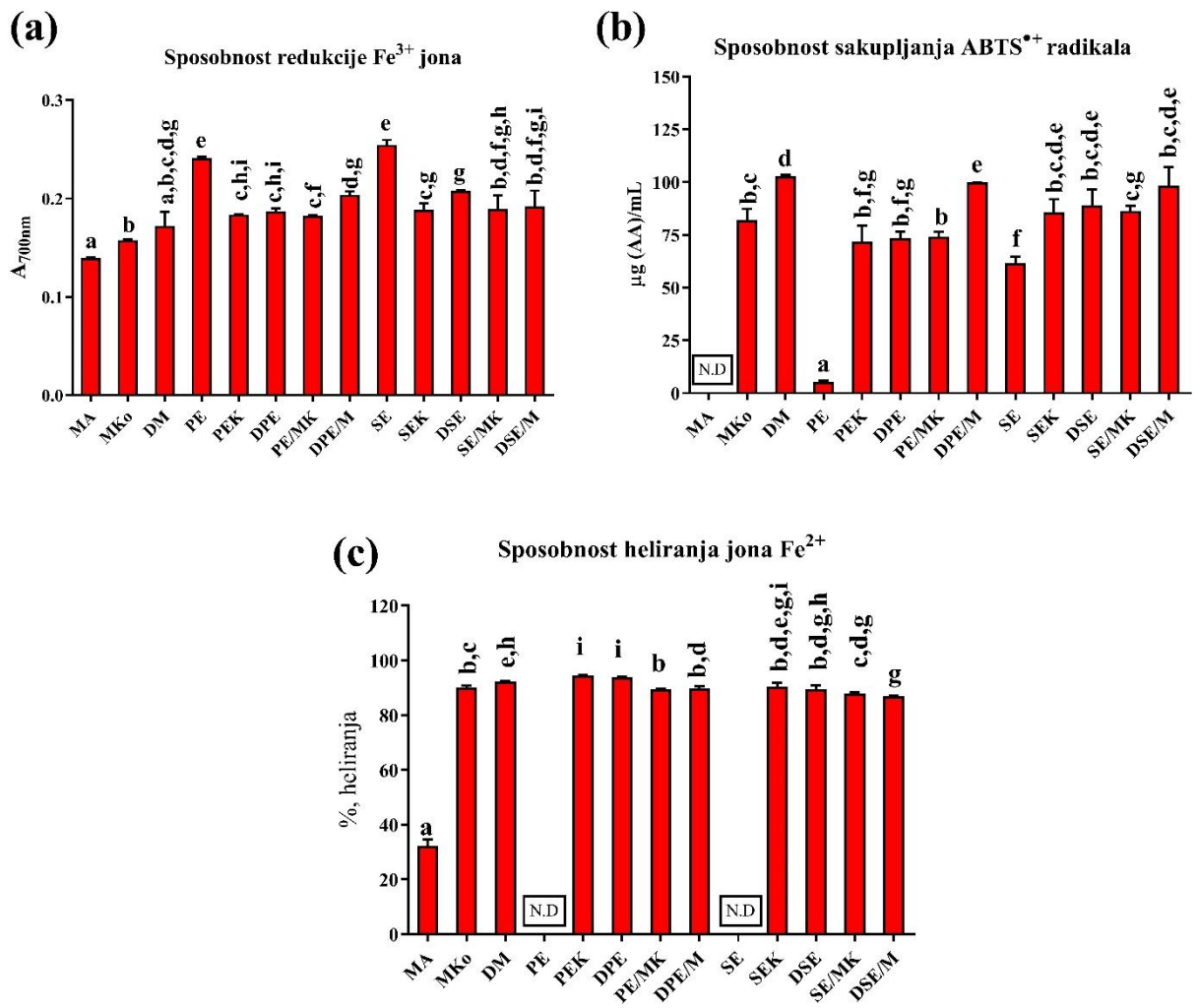
Sa druge strane, sadržaj ukupnih flavonoida ekstrakta semenke grožđa je bio značajno veći (121,8±0,71 mg(QE)/100mL), što ukazuje na prisustvo katehina u značajnoj količini. Posle dodavanja digestivnog koktela, odnosno digestije sa i bez matriksa hrane, ovaj sadržaj ukupnih flavonoida se smanjio što prati promenu u sastavu flavan-3-ola i biodostupnost pre i nakon digestije *(r=0,98* za ukupne flavan-3-ole, monomerne flavan-3-ole, B tip procijanidin izomere i procijanidin galat izomere). Biodostupnost ukupnih flavonoida iz ekstrakta semenke grožđa nakon digestije sa matriksom hrane je bilo 33,1%, što je više od očekivanog, odražavajući uticaj fenolnih kiselina na celokupno određivanje ukupnih flavonoida primenjenom metodom.

4.4.1.4.3. Sadržaj ukupnih proantocijanidina

Kao što je prikazano na slici 4.48c, u ekstraktu pokožice grožđa je detektovana mala količina proantocijanidina. Međutim, mešanjem sa digestivnim koktelom, njihov sadržaj nije detektovan, ni pre, ni nakon digestije sa ili bez matriksa hrane. Njihovo prisustvo nije registrivano ni u uzorcima kada je analiziran sam matriks hrane. Međutim, UHPLC-Orbitrap MS^4 analiza je potvrdila prisustvo nekoliko procijanidin galat izomera. Moguće da je njihov sadržaj bio ispod granice detekcije za primenjenu spektrofotometrijsku metodu. Sadržaj ukupnih proantocijanidina u polaznom ekstraktu semenke grožđa je bio 261,27±8,59 mg/100mL. Međutim, njihov sadržaj je značajno redukovan nakon digestije ekstrakta (DSE), sa biodostupnošću od 26%. Posle mešanja i digestije ekstrakta semenke sa matriksom hrane (DSE/M), smanjenje sadržaja proantocijanidina je bilo još izraženije, dok je biodostupnost bila samo 10%. Dobijeni rezultati su bili u saglasnosti sa UHPLC-Orbitrap MS^4 analizom flavan-3-ola (*p=0,96* za ukupne flavan-3-ole, monomerne flavan-3-ole, B tip procijanidin izomere i procijanidin galat izomere). Ovi rezultati su potvrdili sposobnost flavan-3-ola da intenzivno reaguju sa enzimima i jedinjenjima poreklom iz matriksa hrane. Drugi istraživači su takođe primetili da su procijanidini skloniji ka interakcijama i vezivanju sa komponentama hrane, u poređenju sa ostalim klasama polifenola, što rezultira stvaranjem nerastvornih agregata tokom digestije (Pineda-Vadillo et al., 2016).

4.4.1.5. Antioksidativna svojstva

Drugi deo ove studije je bio fokusiran na analizu uticaja matriksa hrane na antioksidativni kapacitet ekstrakta pokožice i semenke grožđa tokom *in vitro* digestije. Antioksidativna svojstva prirodnih antioksidanata ne mogu se analizirati samo jednom metodom zbog njihove multifunkcionalnosti (Gülçin et al., 2008). Nekoliko antioksidativnih testova je potrebno da bi se procenili različiti aspekti njihove funkcionalnosti, jer svaki test uključuje različite hemijske mehanizme delovanja (Serpen et al., 2012). Zbog toga su za određivanje antioksidativnih svojstva odabrane sledeće metode: redukujuća moć (metoda zasnovana na mehanizmu prenosu elektrona), sposobnost sakupljanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala (bazirana na SET i HAT mehanizmu) i sposobnost heliranja jona Fe^{2+}(bazirana na heliranju prookisadanta) (Slika 4.49).



Slika 4.49. Antioksidativna svojstva polaznih, nedigeriranih i digeriranih uzoraka ekstrakta pokožice i semenke sa/bez prisustva matriksa hrane: (a) Sposobnost redukcije Fe^{3+} jona (redukujuća moć); (b) Sposobnost sakupljanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala; (c); Sposobnost heliranja Fe^{2+} jona. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti+standardna devijacija (n=2). Ista mala slova iznad stubića pokazuju da vrednosti nisu statistički značajno različite prema *t*-testu, (p<0,05). Skraćenice: „N.D.“-nije detektovan; MA-razblažen matriks hrane; MKo-digestija matriksa hrane kontrola (t_0) ; DM-digeriran matriks hrane; PE-razblažen ekstrakt pokožice; PEK- digestija ekstrakta pokožice kontrola (t_0); DPE-digeriran ekstrak pokožice; PE/MK-digestija ekstrakta pokožice u prisustvu matriksa hrane (t_0); DPE/M-digeriran ekstrakt pokožice u prisustvu matriksa hrane; SE-razblažen ekstrakt semenke; SEK-digestija ekstrakta semenke kontrola (t_0); DSE-digeriran ekstrakt semenke; SE/MK-digestija ekstrakta semenke u prisustvu matriksa hrane (t_0); DSE/M-digeriran ekstrakt semenke u prisustvu matriksa hrane.

4.4.1.5.1. Redukujuća moć

Najviše vrednosti redukujuće moći i bez statistički značajne razlike (*p<0,05*), zabeležene su za polazne ekstrakte pokožice i semenke, dok je matriks hrane pokazivao približno 50% nižu vrednost (Slika 4.49a). Dodavanje i mešanje digestivnog koktela sa ekstraktima pokožice i semenke, sa ili bez matriksa hrane (PEK, SEK, PE/MK, SE/MK), pokazalo je sličan ishod, uz smanjenje redukujuće moći za približno 25%. Digestija oba ekstrakta (DPE/DSE) nije pokazala značajne promene u redukujućoj moći. Međutim, digestija u prisustvu matriksa hrane, pokazala je drugačiji uticaj na redukujuću sposobnost. Rezultat redukujuće moći za DPE/M je bio blago povišen u poređenju sa DSE/M, ali bez statistički značajne razlike (p<0,05). Vrednost redukujuće moći na kraju digestije za DPE/M uzorak je dostigao 85% od polazne vrednosti ekstrakta pokožice, odnosno DSE/M uzorak je dostigao 75% od polazne vrednosti ekstrakta semenke. Slične rezultate su primetili Stanisavljević et al. (2015), koji sugerišu značajno smanjenje redukujuće moći soka od aronije nakon mešanja sa digestivnim fluidom i matriksom hrane; kao i, neznatno povećanje posle digestije pri čemu je dostignuto 61% od početne redukujuće moći uzorka soka aronije.

Korelacija između ukupnog sadržaja flavonoida i redukujuće moći ekstrakta pokožice i semenke je bila veoma jaka (*r=0,94* za pokožicu; *r=0,98* za semenku) (Tabela 4.32 i 4.33). Korelaciona analiza je takođe otkrila značajnu pozitivnu korelaciju između redukujuće moći ekstrakta semenke grožđa i sadržaja procijanidina (*r=0,96*), ukupnih flavan-3-ola (*r=0,95*), monomernih flavan-3-ola (*r=0,95*), B tip procijanidin izomera (*r=0,96*) i procijanidin galat izomera (*r=0,95*) (Tabela 4.33). Uzimajući u obzir činjenicu da je ukupan sadržaj flavonoida u ekstraktu pokožice zapravo odražavao sadržaj rutina i fenolnih kiselina, dobijeni podaci ukazuju da su upravo ova jedinjenja glavni antioksidanti sa sposobnošću redukcije jona gvožđa u ekstraktu pokožice. U ekstraktu semenki grožđa, flavan-3-oli su ispoljili ovu sposobnost, pokazujući sličnu zakonitost u delovanju. Iako sadržaj fenolnih kiselina iz ekstrakta semenke i redukujuća moć nisu u značajnoj korelaciji, njihov doprinos redukujućim svojstvima takođe treba uzeti u obzir zbog njihovog značajnog sadržaja u polaznom ekstraktu i digeriranim uzorcima. Smanjenu redukujuću sposobnost grožđa/komine grožđa, pre i nakon *in vitro* gastrointestinalne digestije, primetili su i drugi autori, ali direktno poređenje nije moguće zbog različito izraženih rezultata i metoda koje se koriste (Pineda-Vadillo et al., 2016; Wang et al., 2017). Ove studije se baziraju na određivanju redukujuće antioksidativne moći koja meri redukujuću sposobnost uzoraka. Međutim, i ovde su očekivano nakon digestije dobijene smanjene ili slične vrednosti u poređenju sa njihovim polaznim uzorcima.

Tabela 4.32. Statistički značajne korelacije između ispitivanih spektrofotometrijskih parametara, dobijenih praćenjem ekstrakta pokožice u simuliranim *in vitro* digestivnim uslovima sa i bez prisustva matriksa hrane.

Parametri	**TPC**	**TFC**	**PAC**	**FRP**	**ABTS$^{\bullet+}$**	**FCC**
TPC	/				0,92	
TFC		/	0,90	0,94		-0,91
PAC			/	0,89	-0,94	-0,98
FRP				/		-0,94
ABTS$^{\bullet+}$					/	0,93
FCC						/

Dobijeni korelacioni koeficijenti prikazani u Tabeli odnose se samo na značajne korelacije na nivou $p<0,05$. Skraćenice: TPC-Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; TFC-Sadržaj ukupnih flavonoida; PAC-Sadržaj ukupnih proantocijanidina; FRP-Redukujuća moć; ABTS$^{\bullet+}$-Sposobnost sakupljanja ABTS$^{\bullet+}$ radikala; FCC-Sposobnost heliranja jona Fe^{2+}.

Tabela 4.33. Statistički značajne korelacije između ispitivanih parametara, dobijenih praćenjem ekstrakta semenke u simuliranim *in vitro* digestivnim uslovima sa i bez prisustva matriksa hrane.

Parametri	**TPC**	**TFC**	**PAC**	**FRP**	**ABTS$^{\bullet+}$**	**FCC**	**TMF3O**	**TPAtip**	**TPBtip**	**TPGI**	**TF3O**
TPC	/	0,90				-0,91	0,92		0,91	0,93	0,92
TFC		/	0,98	0,98	-0,89	-0,98	0,98		0,98	0,98	0,98
PAC			/	0,96	-0,94	-0,96	0,96		0,96	0,96	0,96
FRP				/	-0,89	-0,96	0,95		0,96	0,95	0,95
ABTS$^{\bullet+}$					/	0,92	-0,91	-0,91	-0,92	-0,90	-0,91
FCC						/	-0,99	-0,91	-1,00	-0,99	-1,00
TMF3O							/	0,90	1,00	1,00	1,00
TPAtip								/	0,90	0,89	0,90
TPBtip									/	1,00	1,00
TPGI										/	1,00
TF3O											/

Dobijeni korelacioni koeficijenti prikazani u Tabeli odnose se samo na značajne korelacije na nivou $p<0,05$. Skraćenice: TPC-Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; TFC-Sadržaj ukupnih flavonoida; PAC-Sadržaj ukupnih proantocijanidina; *FRP-Redukujuća moć; *ABTS$^{\bullet+}$-Sposobnost sakupljanja ABTS$^{\bullet+}$ radikala; *FCC-Sposobnost heliranja jona Fe^{2+}; TMF3O-Ukupni monomerni flavan-3-oli; TPAtip-Ukupni procijanidin izomeri Atip; TPBtip-Ukupni procijanidin izomeri Btip; TPGI-Ukupni procijanidin galat izomeri;TF3O-Ukupni flavan-3-oli. *Antioksidativna svojstva.

4.4.1.5.2. Sposobnost sakupljanja/uklanjanja ABTS$^{\bullet+}$ radikala

Kao što je prikazano na slici 4.49b, ekstrakt pokožice grožđa je imao malu, a matriks hrane neznatnu aktivnost uklanjanja ABTS$^{\bullet+}$ radikala, koja je bila ispod granice kvantifikacije, dok je ekstrakt semenke pokazao značajnu aktivnost, odnosno 61,56µg (AA)/mL. Dodatak i mešanje digestivnog koktela sa ekstraktom pokožice i semenke (PEK/SEK), je značajno uticao na porast aktivnosti uklanjanja ABTS$^{\bullet+}$ radikala (približno pet puta za ekstrakt pokožice i 1,3 puta za ekstrakt semeneke), ali bez statistički značajne razlike među kontrolnim uzorcima. Nakon digestije oba ekstrakta bez

prisustva matriksa hrane (DPE/DSE), aktivnost uklanjanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala je ostala nepromenjena. To bi moglo ukazivati na to da: (1) posle digestije su se oslobodila jedinjenja iz ekstrakta sa sposobnošću sakupljanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala; ili (2) digestivni koktel je sadržao supstance koje poseduju sposobnost uklanjanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala. Oslobođene fenolne kiseline, poput *p*-kumarinske, kofeinske i protokatehinske kiseline iz ekstrakta pokožice, kao i kofeinska kiselina iz ekstrakta semenke grožđa, verovatno su najviše doprinele njihovoj antioksidativnoj aktivnosti. Što se tiče matriksa hrane, poznato je da proteini mesa, kukuruza i krompira imaju sposobnost uklanjanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala, što se može povećati njihovom parcijalnom denaturacijom posle dodatka digestivnog koktela (Elias et al., 2008; Serpen et al., 2012). Enzimi iz digestivnog koktele su verovatno najviše doprineli njegovoj sposobnosti uklanjanju $ABTS^{\bullet+}$ radikala. Sa druge strane, digestija matriksa hrane (DM) i oba ekstrakta u prisustvu matriksa hrane (DPE/M; DSE/M), su značajno povećala aktivnost uklanjanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala. Sva tri digerirana uzorka su pokazala visoku sposobnost sakupljanja/uklanjanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala (102,85±0,55 µg (AA)/mL za DM; 98,29±8,91 µg (AA)/mL za DPE/M; 99,84±0,14 µg (AA)/mL za DSE/M). Dobijeni rezultati su jasno pokazali da se tokom digestije, samo u prisustvu matriksa hrane može povećati aktivnost uklanjanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala. Međutim, povećanje aktivnosti usmereno ka uklanjanju $ABTS^{\bullet+}$ radikala nije bilo isto među uzorcima. Najveći porast aktivnosti je bio zabeležen za ekstrakt pokožice grožđa (34%), zatim za matriks hrane (25%), a najmanji porast je utvrđen za ekstrakt semeneke, samo 13%. Može se reći da je oslobađanje komponenata iz matriksa hrane imalo glavni uticaj na uklanjanje $ABTS^{\bullet+}$ radikala, što je poboljšano fenolnim jedinjenjima iz ekstrakta pokožice grožđa (flavonoli i fenolne kiseline) ili smanjeno fenolnim jedinjenjima iz ekstrakta semenke grožđa (flavan-3-oli). Ovo zapažanje je potvrđeno korelacionom analizom. Utvrđena je visoka pozitivna korelacija između ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja i sposobnosti uklanjanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala (*r=0,92*), za ekstrakt pokožice (Tabela 4.32), dok je aktivnost uklanjanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala ekstrakta semenke pokazala visoku negativnu korelaciju sa ukupnim proantocijanidinima (*r=-0,94*), ukupnim flavan-3-olima (*r=-0,91*), monomernim flavan-3-olima (*r=-0,91*), B tip procijanidin izomerima (*r=-0,92*) i procijanidin galat izomerima (*r=-0,90*) (Tabela 4.33).

Različite komponente matriksa hrane mogu biti odgovorne za povećanu aktivnost uklanjanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala u uzorcima: (1) oslobođeni peptidi digeriranih proteina mesa, zeina i krompira, za koje je dokazano da imaju povećan antioksidativni kapacitet u poređenju sa polaznim makromolekularnim proteinima (Elias et al., 2008); (2) oslobođeni dipeptidi koji sadrže histidin, poput karnozina, koji imaju visoku antioksidativnu aktivnost, kao i rastvorni tokoferoli koji su snažni antioksidanti prisutni u mesu (Chan et al., 1994). Sinergistički efekti ekstrakta pokožice sa konstituentima matriksa hrane mogli bi se verovatno pripisati oslobađanju hidroksicinaminskih kiselina (kofeinska i *p*-kumarnska kiselina) iz ekstrakta pokožice tokom digestije, za koje je ustanovljena visoka antioksidativna aktivnost (Rice-Evans et al., 1996). Visok kapacitet vezivanja flavan-3-ola sa konstituentima matriksa hrane posle digestije, evidentno smanjuje njihovu aktivnost sakupljanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala. Međutim, aktivnost uklanjanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala digeriranih ekstrakata pokožice i semenke se povećala za 36% i 10% u prisustvu matriksa hrane. Druge studije, koristeći različite metode i merne jedinice, su takođe pružile informacije koje podržavaju aktivnost fenolnih jedinjenja u sakupljanju slobodnih radikala. Međutim, primećeno je njihovo značajno smanjenje aktivnosti u sakupljanju radikala nakon *in vitro* gastrointestinalne digestije (R. Lucas-González et al., 2018; Stanisavljević et al., 2015; Wang et al., 2017).

4.4.1.5.3. Sposobnost heliranja jona Fe^{2+}

Fe^{2+} joni indukuju lipidnu peroksidaciju, uglavnom putem Fentonove reakcije ili ubrzavanjem transformacije lipidnih hidroperoksida u odgovarajuće radikale (Gülçin, 2012). U mesu se gvožđe može osloboditi tokom kuvanja i digestije (Vieira et al., 2017). Stoga, prisustvo helirajućih agenasa u ekstraktu pokožice i semenke je veoma značajno za smanjenje slobodnih prelaznih metala i njihov zaštitni efekat protiv oksidativnog stresa biomolekula. Kapacitet uzoraka da heliraju jone gvožđa prikazan je na slici 4.49c. Uzimajući u obzir dobijene rezultate, može se zaključiti da ni ekstrakt pokožici, ni ekstrakt semenke grožđa, nisu moćni Fe^{2+} helatori. Sa druge strane samo matriks hrane

je posedovao značajan kapacitet heliranja (32,4%). Očigledno je da kapacitet heliranja potiče od digestivnog koktela i matriksa hrane. Međutim, iznenađujuće je da su mešavina digestivnog koktela sa ekstraktom pokožice grožđa (PEK), ekstraktom semenke (SEK) i matriksom hrane (MKo), pokazale vrlo slične vrednosti heliranja (redom 94,6%; 90,1% i 90,6%). Digestija nije pokazala značajniji efekat na sposobnost heliranja. Međutim, digerirani uzorci ekstrakta pokožice sa ili bez matriksa (DPE, DPE/M) su pokazali veću sposobnost heliranja jona gvožđa, u odnosu na ekstrakt semenke u istim model uzorcima (DSE, DSE/M). Nizak kapacitet heliranja polaznog uzorka soka od aronije i značajno povećanje nakon njegovog mešanja sa digestivnim koktelom i matriksom hrane primetili su Stanisavljević et al. (2015). Međutim u ovom slučaju, nakon digestije primećen je blagi porast ove vrednosti.

Korelaciona analiza je otkrila da kapaciteta heliranja ekstrakta pokožice pokazuje jaku pozitivnu korelaciju sa aktivnošću uklanjanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala (*r=0,93*); odnosno jaku negativnu korelaciju sa ukupnim sadržajem flavonoida (*r=-0,91*) i redukujućom moći (*r=-0,94*) (Tabela 4.32) Sa druge strane, na kapacitet heliranja ekstrakta semenke grožđa snažno je uticalo prisustvo ukupnih flava-3-ola i njihov sastav. Povećanje sadržaja proantocijanidina (*r=-0,96*), ukupnih flavan-3-ola (*r=-1,00*), monomernih flavan-3-ola (*r=-0,99*), B tip procijanidin izomera (*r=-1,00*) i procijanidin galat izomera (*r=-0,99*), rezultiralo je u smanjenju kapaciteta heliranja (Tabela 4.33). Negativna korelacija je takođe primećena između kapaciteta heliranja i redukujuće moći (*r=-0,96*); ukupnih fenolnih jedinjenja (*r=-0,91*), ukupnih flavonoida (*r=-0,98*), dok su kapaciteta heliranja i aktivnosti uklanjanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala pokazali jaku pozitivnu korelaciju (*r=0,92*) (Tabela 4.33).

Može se zaključiti da su dobijene vrednosti za heliranja znatno veće od zbira vrednosti za heliranja matriksa hrane i digestivnog koktela. Međutim, na vrednosti znatno utiče prisustvo ekstrakta grožđa, koje teži njegovom smanjenju. Procijanidini iz ekstrakta semenke grožđa pokazuju veći inhibitorni efekat na kapacitet heliranja digestivnog koktela i matriksa hrane, u poređenju sa fenolnim kiselinama i flavonoidima iz ekstrakta pokožice. Efekti inhibicije verovatno su bili rezultat složenih protein-polifenol interakcija, koje su bile izraženije sa katehinom i procijanidinima, nego sa fenolnim kiselinama i flavonolima. Uzimajući u obzir da su fenolna jedinjenja sposobna da redukuju Fe^{3+} jone do Fe^{2+} jona, oni mogu povećati količinu Fe^{2+} u reakcionoj smeši nakon digestije, što je rezultiralo dodatnim smanjenjem kapaciteta heliranja uzoraka (DPE/M, DSE/M) nakon digestije. Jaki metal helatori poreklom iz matriksa hrane, poput peptida i karnozina (Chan et al., 1994; Elias et al., 2008), verovatno su najviše doprineli sposobnosti heliranja digeriranih uzoraka.

Smanjena, povećana ili nepromenjena antioksidativna aktivnost digeriranih fenolnih jedinjenja sa ili bez matriksa hrane utvrđena je različitim metodama koje su zabeležene u literaturi (Ozdal et al., 2013; Pineda-Vadillo et al., 2016; Wang et al., 2017). Međutim, rezultati digestija su pokazali da su klasa/tip fenolnih jedinjenja i matriks hrane snažno uticali na konačnu antioksidativnu aktivnost uzoraka.

4.4.2. Uticaj proteinskog matriksa na biodostupnost i antioksidativna svojstva fenolnih jednjenja semenke komine grožđa – nefermentisan funkcionalni aditiv TME3

4.4.2.1. Profil fenolnih jedinjenja digeriranog ekstrakta semenke u prisustva proteinskog matriksa

Profili fenolnih jedinjenja i iskorišćenje pojedinačnih fenolnih jedinjenja TM i TME3 uzoraka nakon *in vitro* digestije su prikazani u Tabeli 4.34. UV hromatogram polaznog TME3 uzorka, na 254 i 280nm je prikazan na Slici 4P. Glavne klase fenolnih jedinjenja u vodenom ekstraktu (E) su bile fenolne kiseline (27,63%) i flavan-3-oli (69,23%), koji čine 96,86% ukupno kvantifikovanih fenolnih jedinjenja. Među kvantifkovanim fenolnim kiselinama, najzastupljenija je bila galna kiselina (3444,81±117,4 µg/L), dok su dominantni i jedini potvrđeni flavan-3-oli bili katehin (8282,64±246,89 µg/L) i katehin galat (688,84±36,32 µg/L) (podaci za kvantifikaciju, Tabela P5). Ostala detektovana fenolna jedinjenja su registrovana u značajno manjim količinama. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima polifenolnih karakterizacija semenke Prokupca koje su analizirane u okviru ove disertacije ili objavljene od strane drugih autora (Gođevac et al., 2010; Pantelić et al., 2016; Zdunić et al., 2019). Treba naglasiti da su u miksu standarda bili i drugi flavan-3-oli, poput galokatehina, epigalokatehina i epigalokatehin-galata, ali nisu detektovani u svim analiziranim uzorcima pre i nakon *in vitro* digestije. Pored toga, fenolna jedinjenja nisu detektovana u polaznom TM rastvoru, digeriranom TM uzorku i kontroli digestivnog koktela.

U poređenju sa fenolnim jedinjenjima koja su detektovana u vodenom ekstraktu semenke (12959,12 µg/L), dodatak ekstrakta u kozije mleko (TME3) je uticao na značajno smanjenje sadržaja pojedinačnih i ukupnih fenolnih jedinjenja (12959,12 µg/L do 2367,76 µg/L)($p<0,05$) (Tabela 4.34). Pošto je korišćeno odmašćeno kozije mleko, može se pretpostaviti da proteini mleka odmah vezuju 79,18% fenolnih kiselina, 83,39% flavan-3-ola, odnosno čak 81,73% svih detektovanih fenolnih jedinjenja. Smanjen sadržaj ukupnih kvantifikovanih fenolnih jedinjenja je potvrđen i u drugim studijama, nakon mešanja polena sa kozijim mlekom (76,19%)(Kostić et al., 2021), ekstrakta cimeta sa jogurtom (64,8%)(Helal & Tagliazucchi, 2018), voćnog soka sa kravljim mlekom (55%) (Cilla et al., 2009) ili napitka na bazi cimeta sa mlekom (45,8%)(Helal et al., 2014). Poznato je da fenolna jedinjenja imaju visok afinitet vezivanja za proteine mleka (Ozdal et al., 2013; Ozdal et al., 2018), a posebno prema termički tretiranim proteinima mleka (Rahimi Yazdi & Corredig, 2012; Villalva et al., 2020), kod kojih je nakon denaturacije serum proteina i formiranja WP/CN kompleksa povećan broj hidrofobnih centara i mogućnost interakcija sa fenolnim jedinjenjima (Kılıç Bayraktar et al., 2019). Međutim, interakcije fenolnih jedinjenja sa proteinima mleka su varijabilne i veoma zavise od strukture, molekulske mase i polarnosti pojedinačnih fenolnih molekula (Jakobek, 2015; Ozdal et al., 2018; Zhang et al., 2021), što potvrđuju podaci dobijeni za MVP (% ukupnih, pojedinačnih klasa i pojedinačnih fenolnih jedinjenja vezanih za proteine mleka) (Tabeli 4.34).

Nakon *in vitro* gastrointestinalne digestije, sadržaj kofeinske kiseline u digeriranom TME3 uzorku se nije značajno promenio u poređenju sa njenim sadržajem u nedigeriranom TME3 uzorku, a njena biodostupnost (računato u odnosu na sadržaj u polaznom ekstraktu semenke) je bilo čak 57,17%. U literaturi se mogu naći različite vrednosti *in vitro* biodostupnosti kofeinske kiseline (računato u odnosu na polazni ekstrakt): 75,2% u model napitku voćni sok-mleko (Rodríguez-Roque et al., 2014), ~55-62% za različito termički tretirane model napitke kafa-odmašćeno kravlje mleko (Qie et al., 2022), ili ~25-100% za različito procesuirane model napitke kafa-celo mleko (Quan et al., 2020). Sa druge strane, galna i protokatehinska kiselina nisu detektovane u digeriranom TME3 uzorku, što može biti zbog smanjene stabilnosti u simuliranim intestinalnim uslovima ili formiranja kompleksnih fenolnih derivata kroz reakcije polimerizacije, epimerizacije i autooksidacije (Rodríguez-Roque et al., 2014). Prema tome, biodostupnost kvantifikovanih fenolnih kiselina zavisi samo od kofeinske kiseline i iznosi 1,17%.

Od osam kvantifikovanih flavonoida u ekstraktu semenke (E), na kraju *in vitro* digestije TME3 uzorka su detektovani samo katehin, katehin-galat, kvercetin-3-glukozid, apigenin-7-glukozid i eskuletin. Odsustvo i smanjena biodostupnost nekih polifenola na kraju *in vitro* digestije može biti zbog njihove smanjene stabilnosti u intestinalnim uslovima, degradacije ili interakcija sa enzimima (Cirkovic

Velickovic & Stanic-Vucinic, 2018; Helal et al., 2014; Podsędek et al., 2014). Prethodno je pokazano da proteini mleka tokom digestije hidrolizuju i gube visok afinitet za vezivanje polifenola koji se delimično oslobađaju u digestivni koktel. Sa druge strane, najveći deo polifenola je verovatno zadržan u nerastvornom delu (talogu), koji je uklonjen nakon *in vitro* digestije. Štaviše, Pineda-Vadillo et al. (2016) su pokazali da se većina fenolnih jedinjenja (76,9%) zadržava u nerastvornoj frakciji nakon digestije mlečnog napitka obogaćenog sa ekstraktom grožđa (Eminol®). Među ispitivanim fenolnim jedinjenjima, jedino je sadržaj katehina u digeriranom TME3 uzorku bio značajno viši u poređenju sa nedigeriranom TME3 uzorkom. Ovi rezultati ukazuju da je katehin bio jako vezan za proteine mleka i da je oslobođen nakon hidrolize proteina u simuliranim gastrointestinalnim uslovima. Biodostupnost katehina na kraju *in vitro* gastrointestinalne digestije je bilo 26,19%, a katehin galata samo 4,66%. Prethodno je pokazano da proteini mleka (posebno kazeini) lako vezuju i formiraju komplekse sa flavan-3-olima, čime ograničavaju njihovu biodostupnost, absorpciju i potencijalnu biološku funkciju (Ferruzzi et al., 2012; Moser et al., 2014). U literaturi se mogu naći varijabilne vrednosti za iskorišćenje katehina i epikatehina, zavisno od matriksa hrane. Na primer, Rodríguez-Roque et al. (2014) su dobili značajno nižu biodostupnost katehina (14,8%) u dijalizabilnoj frakciji, nakon *in vitro* digestije napitka voćni sok-mleko, dok su He et al. (2016) pokazali značajno višu biodostupnost epi-katehina nakon *in vitro* digestije mešavine soka od grožđa sa odmašćenim (~40%) ili punomasnim mlekom (~60%).

Kvercetin-3-glukozid je jedini detektovani flavonol na kraju *in vitro* digestije, a njegova biodostupnost je bilo samo 20,38%, verovatno zbog degradacije i slabe rastvorljivosti u intestinalnom koktelu. Izoramnetin-3-*O*-glukozid i kampferol nisu detektovani u nedigeriranom i digeriranom TME3 uzorku, već su nađeni samo u ekstraktu semenke. Njihovo odsustvo u digeriranom uzorku je verovatno zbog njihove jake interakcije i zadržavanju u nerastvornoj frakciji uklonjenoj nakon digestije. Iako u malim količinama, apigenin-7-glukozid je detektovan u vodenom ekstraktu semenke i digeriranom TME3 uzorku, pa se može zaključiti da je apigenin-7-glukozid bio vezan sa proteinima mleka, i da se oslobodio nakon njihove hidrolize proteinazama. Sadržaj eskuletina je zanimljivo jedini bio viši u digeriranom TME3 uzorku nego u ekstraktu semenke, a biodostupnost je bilo čak 133,42%. Ovo se može objasniti potencijalnom ciklizacijom oslobođenih hidroksicimetnih derivata u intestinalnim uslovima (Tabela 4.18), koji nisu UHPLC-DAD MS/MS kvantifikovani usled nedostatka standarda. Ukupna biodostupnost kvantifikovanih fenolnih jedinjenja ekstrakta semenki grožđa u prisustvu matriksa odmašćenog termički tretiranog kozijeg mleka (proteinski matriks) je bilo 18,11%. Sličnu biodostupnost fenolnih jedinjenja su dobili Pineda-Vadillo et al. (2016) za ekstrakte grožđa u prisustvu milkšejk matriksa. Kako je nakon *in vitro* gastrointestinalne digestije pokazano nisko iskorišćenje fenolnih jedinjenja, može se pretpostaviti da su većina fenolnih jedinjenja ostala u nerastvornoj frakciji. Ovo ih čini potencijalno dostupnim za oslobađanje tokom digestije u debelom crevu („colon“ fazi), gde mogu da ispolje preventivnu funkciju protiv kolorektalnog karcinoma kako su sugerisali Pérez-Ortiz et al. (2019). Drugi autori su dobili značajno višu biodostupnost ukupnih HPLC kvantifikovanih fenolnih jedinjenja polena u prisustvu kozijeg mleka (30,71%) (Kostić et al., 2021), voćnog soka u prisustvu odmašćenog mleka (29,84%) (Cilla et al., 2009) ili napitka na bazi cimeta u prisustvu kravljeg mleka (62,9%) (Helal et al., 2014). Različite vrednosti za biodostupnost fenolnih jedinjenja u prisustvu mleka su posledica primenjenog *in vitro* digestionog modela, vrste mleka kao proteinskog matriksa, kao i strukturnih karakteristika, stabilnosti i polarnosti fenolnih molekula (Wojtunik-Kulesza et al., 2020).

Tabela 4.34. Biodostupnost fenolnih jedinjenja ekstrakta semenki grožđa u prisustvu odmašćenog termički tretiranog kozjeg mleka pre i nakon *in vitro* gastrointestinalne digestije (rezultati su izraženi kao µg/L).

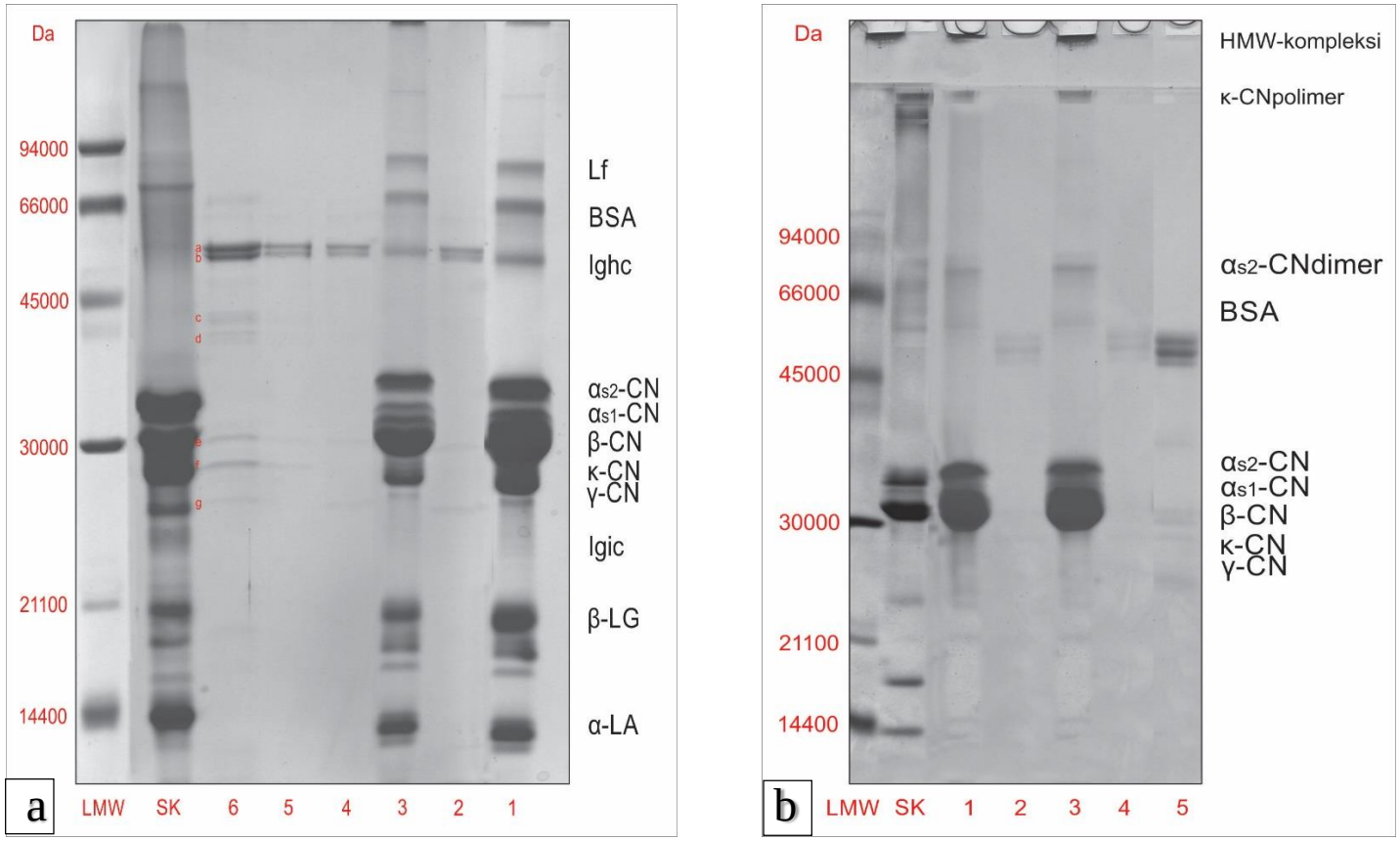
Jedinjenja (µg/L)	E*	TM	DTM	TME3	MVP,%	DTME3	KP,%	DTME3R,%
Fenolne kiseline								
Galna kiselina	3444,81±117,4[a]	n.d.	n.d.	645,68±20,12[b]	81,26	n.d.	0	0
Protokatehinska kiselina	62,50±1,99[a]	n.d.	n.d.	57,02±2,46[b]	8,77	n.d.	0	0
Kofeinska kiselina	73,28±4,30[a]	n.d.	n.d.	42,82±2,38[b]	41,56	41,89±3,55[b]	97,83	57,17
Σ	**3580,6 (27,63)**	**/**	**/**	**745,52 (31,49)**	**79,18**	**41,89 (1,78)**	**5,62**	**1,17**
Flavan-3-oli i njihovi derivati								
Katehin	8282,64±246,89[a]	n.d.	n.d.	1444,85±67,4[b]	82,56	2169,46±81,50[c]	150,15	26,19
Katehin galat	688,84±36,32[a]	n.d.	n.d.	45,11±0,113[b]	93,45	32,08±1,43[c]	71,12	4,66
Galokatehin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	-	-
Epigalokatehin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	-	-
Epigalokatehin-galat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	-	-
Σ	**8971,5 (69,23)**	**/**	**/**	**1490 (62,93)**	**83,39**	**2201,5 (93,50)**	**147,76**	**24,54**
Ostali detektovani polifenoli								
Kvercetin-3-glukozid	131,25±6,66[a]	n.d.	n.d.	64,48±3,94[b]	50,87	26,75±1,88[c]	41,48	20,38
Izoramnetin-3-*O*-glukozid	49,82±4,40	n.d.	n.d.	n.d.	100	n.d.	-	0
Kampferol	123,93±7,49	n.d.	n.d.	n.d.	100	n.d.	-	0
Apigenin-7-glukozid	16,08±0,94[a]	n.d.	n.d.	n.d.	100	15,66±2,02[a]	-	97,43
Naringenin	40,08±4,55	n.d.	n.d.	n.d.	100	n.d.	-	0
Eskuletin	45,89±3,34[a]	n.d.	n.d.	67,79±3,45[b]	-	61,23±1,47[c]	90,32	133,42
Σ	**407,06 (3,14)**	**/**	**/**	**132,28 (5,59)**	**67,50**	**103,64 (4,42)**	**78,35**	**25,46**
Σ Σ	**12959,12**	**/**	**/**	**2367,76**	**81,73**	**2347,1**	**99,13**	**18,11**

Vrednosti su dobijeni iz tri nezavisna merenja (n=3) i prikazane kao srednje vrednosti ±standardna devijacija. Vrednosti koje su označene sa istim slovom u istom redu nisu statistički značajno različite prema *t*-testu, ($p<0,05$). Vrednosti u zagradama definišu procenat zastupljenosti karakterističnih polifenolnih grupa u uzorku (%). Skraćenice: „n.d.“-nije detektovan; E-vodeni ekstrakt semenke; TM-nedigerirano termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); DTM-digerirano odmašćeno termički tretirano kozije mleko; TME3-nedigerirano odmašćenog termički tretirano kozije mleko obogaćeno ekstraktom semenke (0,6mg/mL); MVP,%- % ukupnih, pojedinačnih klasa i pojedinačnih fenolnih jedinjenja vezanih za proteine mleka; DTME3-digerirano termički tretirano kozije mleko obogaćeno ekstraktom semenke; KP,%- biodostupnost ukupnih, pojedinačnih klasa i pojedinačnih fenolnih jedinjenja u digeriranim uzorcima, određen u odnosu na njihov sadržaj u polaznom rekonstituisanom uzorku; DTME3R,%-biodostupnost fenolnih jedinjenja nakon *in vitro* digestije TME3 uzorka. Napomena: [1] UHPLC-DAD MS/MS.

4.4.2.2. Elektroforetska analiza nefermentisanog funkcionalnog aditiva TME3 nakon in vitro digestije

Proteinski profili TM i TME3 uzoraka pre i nako *in vitro* digestije (Slika 4.50, traka 1-4) su ispitivani korišćenjem SDS-PAGE u redukujućim (Slika 4.50a) i neredukujućim (Slika 4.50b) uslovima u rastvornoj frakciji uzoraka. Na SDS-R-PAGE gelu se mogu uočiti identični proteinski profili za nedigerirane TM i TME3 uzorke (Slika 4.50a, trake 1 i 3), sa karakterističnim trakama koje pripadaju kazeinima i serum proteinima kozijeg mleka. Ova dva uzorka se jedino razlikuju u intenzitetu traka, što je već diskutovano u podpoglavlju 4.3.2.3. Detekcija i karakterizacija proteina je izvršena korišćenjem standarda proteina kravljeg mleka, standarda molekulskih masa i dostupnih literaturnih podataka (Pesic et al., 2012). Osim nekoliko traka koje pripadaju enzimima iz digestivnog koktela (Slika 4.50a, trake 5 i 6), na kraju *in vitro* digestije nije bilo vidljivih traka koje su poreklom od digeriranih TM i TME3 uzoraka (Slika 4.50, trake 2 i 4). Ovo znači da rastvorljive frakcije nakon *in vitro* digestije imaju peptide malih molekulskih masa i aminokiseline, koji su se oslobodili tokom *in vitro* digestije, a koje nije moguće detektovati na 12,5% (m/V) poliakrilamidnom gelu. Slične rezultate su prijavili drugi autori, za *in vitro* digerirano odmašćeno kravlje mleko (Egger et al., 2019; Helal et al., 2014); cimet-mleko napitak (Helal et al., 2014) ili kozije mleko bez/sa polenom (Kostić et al., 2021), koristeći kao u ovoj studiji opšte prihvaćeni statički COST INFOGEST digestivni model. Registrovane proteinske trake u kontroli digestivnog koktela su jačeg ili slabijeg intenziteta sledećih molekulskih masa, 56, 54, 43, 41, 28, 26 i 23 kDa (Slika 4.50a; traka 6, mala slova pored traka), koje odgovaraju pepsinu, kao i lipazama, amilazama i proteinazama iz intestinalnog pankreatina (Nehir El et al., 2015).

Nedigerirani TM i TME3 uzorci takođe imaju karakteristične SDS-NR-PAGE proteinske profile (Slika 4.50b, trake 1 i 3), koji su opšte poznati za termički tretirano kozije mleko (Pesic et al., 2012). Detaljna SDS-NR-PAGE karakterizacija ova dva uzorka je diskutovana u podpoglavlju 4.3.2.3. Na kraju *in vitro* digestije, kod oba digerirana TM i TME3 uzorka (Slika 4.50b, trake 2 i 4) su vidljive samo trake koje potiču od enzima, što je u saglasnosti sa rezultatima SDS-R-PAGE analize. Ovo znači da tokom digestije oslobođeni peptidi nisu naknadno formirali komplekse u rastvornim frakcijama digeriranog uzorka, što bi potencijalno uzrokovalo pojavu neke nekarakteristične trake ili HMW kompleksa na SDS-NR-PAGE gelu (Slika 4.50b, trake 2 i 4).



Slika 4.50. Elektrofortski profili TM i TME3 uzoraka pre i posle *in vitro* gastrointestinalne digestije, analizirani: (a) SDS-R-PAGE-om; i (b) SDS-NR-PAGE-om. Oznake: TM-nedigerirano termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min) (1); DTM- digerirano odmašćeno termički tretirano kozije mleko (2); TME3- nedigerirano odmašćeno termički tretirano kozije mleko obogaćeno ekstraktom semenke (0,6mg/mL)(3); DTME3- digerirano termički tretirano kozije mleko obogaćeno ekstraktom semenke (4); DCC-digestivni koktel sa enzimima (nanesena zapremina 25µl) (5); DCC-digestivni koktel sa enzimima (nanesena zapremina 100µl)(6); trake koje potiču od enzima (a,b,c,d,e,f,g). Skraćenice: LMW-standard molekulskih masa; SK-standard glavnih proteina kravljeg mleka; αs1-CN (αs1-kazein); αs2-CN (αs2-kazein); β-CN (β-kazein); κ-CN (κ-kazein); γ-CN (γ-kazein); β-LG (β-laktoglobulini); α-LA (α-laktalbumin); BSA-serum albumin krvi; Ig-imunoglobulini; Lf-laktoferin; HMW-visokomolekularni kompleksi. Napomena: svi uzorci su mešani sa odgovarajućeg puferom za uzorke u odnosu 1:1.

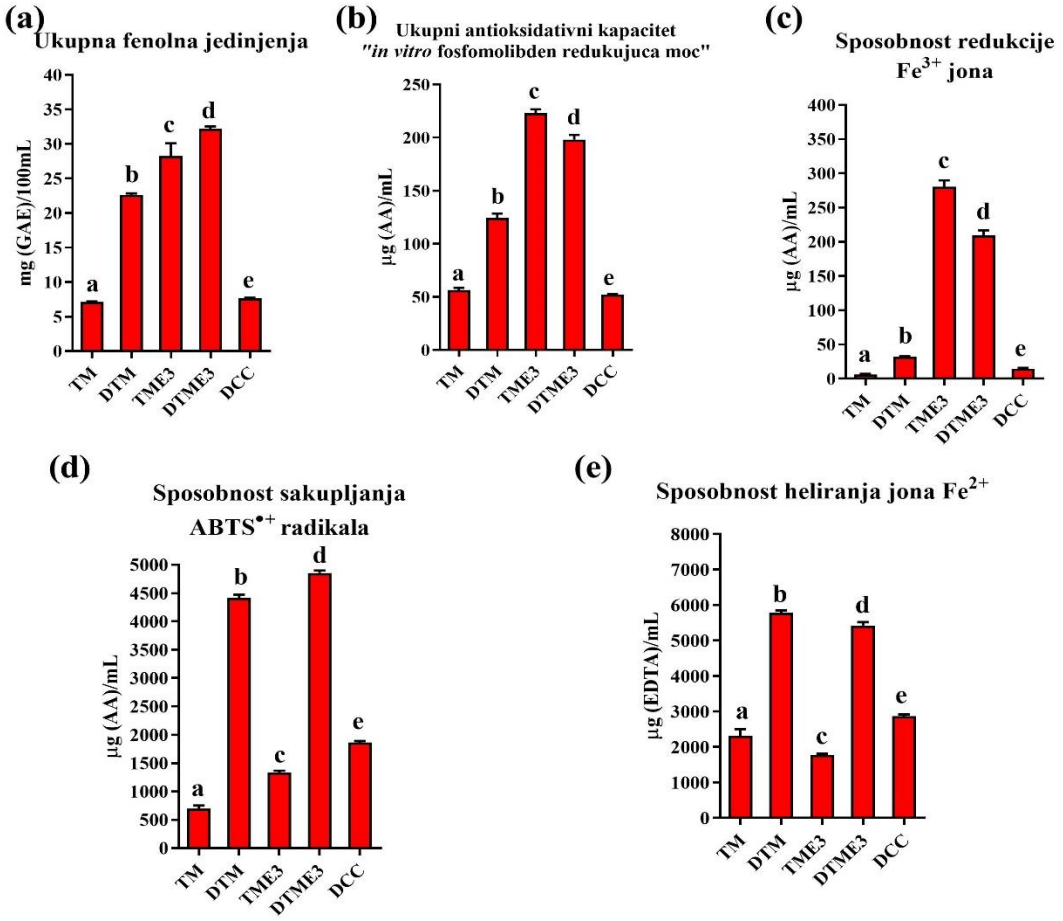
4.4.2.3. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativna svojstva

Rezultati za sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativnu aktivnost polaznih (nedigeriranih) uzoraka (TM i TME3), *in vitro* digeriranih uzoraka (DTM i DTME3) i kontrole digestivnog koktela (DCC), su prikazani na Slici 4.51a-e. TPC vrednosti TM, DTM i DCC uzorka su bile u rasponu od 7.64 do 22.61 mg (GAE)/100mL (Slika 4.51a), što je u suprotnosti sa rezultatima HPLC kvantifikacije fenolnih jedinjenja. Međutim, ako se uzmu u obzir ograničenja Folin-Ciocalteu-ove metode i njena prvobitna namena u analizi proteina, dobijeni rezultati su posledica interferancije Folinovog reagensa sa proteinima, enzimima, peptidima i aminokiselinama koji nastaju tokom *in vitro* digestije (Helal et al., 2014; Kostić et al., 2021). TME3 uzorak je imao značajno viši TPC, u poređenju sa TM uzorkom, što je očekivano zbog prisustva fenolnih jedinjenja iz ekstrakta semenke koji su sadržani u TME3 uzorku. Poređenje među ovim uzorcima je prethodno detaljno razmatrano u podpoglavlju 4.3.2.10. Slična zapažanja su prethodno sugerisale druge studije za mlečne proizvode obogaćene fenolnim jedinjenjima iz različitih biljaka (Gad & Abdelazim, 2010; Park et al., 2018). Na kraju *in vitro* digestije, fenolna jedinjenja su oslobođena, doprinoseći značajno višim TPC vrednostima (32.18 ± 0.35 mg (GAE)/100 mL) digeriranog TME3 uzorka, u poređenju sa digeriranim TM uzorkom (22,61±0,22 mg(GAE)/100mL). Slične rezultate su prijavili Helal et al. (2014) za digeriran cimet-mleko napitak, i Cilla et al. (2011) za digeriran napitak voćnog soka i mleka. Pored toga, digerirani TM i TME3 uzorci su imali značajno veći TPC, u poređenju sa njihovim nedigeriranim TM i TME3 uzorcima. Međutim, u ovom slučaju ne treba zanemariti uticaj digestivnog koktela koji zajedno sa oslobođenim peptidima, aminokiselinama i fenolnim jedinjenjima doprinose višim TPC vrednostima na kraju digestije (Power et al., 2013). Ako se ova činjenica uzme u obzir, digeriran TM uzorak je imao veći, a digeriran TME3 uzorak niži TPC u poređenju sa sumom TPC vrednosti za njihove nedigerirane uzorke (TM ili TME3) i DCC. Smanjena TPC za digeriran TME3 uzorak u odnosu na sumu TME3/DCC, je verovatno zbog zadržavanja fenolnih jedinjenja u nerastvornoj frakciji digeriranog uzorka, kao i smanjene stabilnosti oslobođenih fenolnih jedinjenja u simuliranim intestinalnim uslovima i njihove sposobnosti da se lako polimerizuju i autooksiduju (Rodríguez-Roque et al., 2014). Ovi rezultati su u saglasnosti sa HPLC rezultatima, koji takođe pokazuju smanjenu biodostupnost ili potpuno odsustvo većine fenolnih jedinjenja na kraju *in vitro* digestije (Tabela 4.34). Slično našim rezultatima, Qie et al. (2022) su dobili smanjene TPC vrednosti za različite mleko-kafa model napitke nakon *in vitro* gastrointestinalne digestije.

Rezultati za *in vitro* fosfomolibden i Fe^{3+} redukujuću moć analiziranih uzoraka su prikazani na Slici 4.51b,c. Obe metode mere redukcioni kapacitet jona metala, a dobijeni rezultati su najčešće u saglasnosti. Razlike u potvrđenim vrednostima za analizirane uzorke među metodama su posledica različitih metodologija. U TAC metodi bioaktivna jedinjenja redukuju Mo^{6+} jone u kiseloj sredini, dok kod FRP metode redukuju slobodne Fe^{3+} jone. TME3 uzorak je pokazao značajno više TAC i FRP vrednosti, u poređenju sa TM uzorkom, zbog prisustva fenolnih jedinjenja. Kontrola digestivnog koktela je takođe pokazala TAC (52,26±0,54 µg (AA)/mL) i FRP aktivnost (14,61±1,46 µg (AA)/mL), i mora se uzeti u razmatranje prilikom tumačenja dobijenih rezultata na kraju *in vitro* digestije, jer je u ovoj model studiji digestivni koktel sastavni deo digeriranih TM i TME3 uzoraka. Digeriran TM uzorak pokazuje višu, a digeriran TME3 nižu TAC aktivnost u poređenju sa njihovim nedigeriranim uzorcima ili sumom nedigeriranih uzoraka i DCC. Međutim, digeriran TME3 uzorak pokazuje značajno višu TAC i FRP vrednost u poređenju sa digeriranim TM uzorkom, zbog prisustva biodostupnih fenolnih jedinjenja. Ovi rezultati su u saglasnosti sa TPC rezultatima. Nehir El et al. (2015) su registrovali značajno višu TAC aktivnost digeriranog kozijeg kefira i mleka u poređenju sa nedigeriranim uzorcima. Sa druge strane, Kostić et al. (2021) su pokazali značajno nižu TAC vrednost za *in vitro* digeriran uzorak kozijeg mleka obogaćenog polenom, u poređenju sa njegovim polaznim uzorkom ili digestivnom kontrolom.

Sposobnost sakupljanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala digeriranih TM i TME3 uzoraka je značajno povećana u poređenju sa nedigeriranim uzorcima ili sumom $ABTS^{\bullet+}$ vrednosti za digestivni koktel i odgovarajuće nedigerirane uzorke (Slika 4.51d). Digerirani uzorci su imali bolju sposobnost uklanjanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala verovatno zbog peptida male molekulske mase (nisu detektovani pomoću SDS-R-PAGE) i

aminokiselina, koji su oslobođeni enzimskom hidrolizom proteina kozijeg mleka (Power et al., 2013). Tokom *in vitro* digestije kazeina, serum proteina i njihovih WP/CN kompleksa, verovatno nastaju peptidi sa visokim koncentracijama triptofana, cisteina, metionina i histidina, koji imaju jak antioksidativni kapacitet (Lamothe et al., 2019). Digerirani TME3 uzorak je imao značajno višu $ABTS^{\bullet+}$ aktivnost u poređenju sa digeriranim TM uzorkom, čemu dodatno doprinose oslobođena i biodostupna fenolna jedinjenja. Niska $ABTS^{\bullet+}$ vrednost za TME3 uzorak se objašnjava postojanjem fenolna jedinjenja-WP/CN interakcija, koje smanjuju antioksidativnu aktivnost fenolnih jedinjenja. Nekoliko autora je prethodno uočilo poboljšanu $ABTS^{\bullet+}$ aktivnost *in vitro* digeriranih model napitaka sok grožđa-mleko (He et al., 2016), cimet-mleko (Helal et al., 2014), voćni sok-mleko (Cilla et al., 2011) ili jogurta obogaćenog cimetom (Helal & Tagliazucchi, 2018).



Slika 4.51. Ukupna fenolna jedinjenja (a) i antioksidativna svojstva (b-e), TM i TME3 uzoraka pre i nakon *in vitro* gastrointestinalne digestije. Ukupni antioksidativni kapacitet "*in vitro* fosfomolibden redukujuća moć" (b); Sposobnost redukcije Fe^{3+} jona (redukujuća moć) (c); Sposobnost sakupljanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala (d); Sposobnost heliranja Fe^{2+} jona (e). Podaci su prikazani kao srednje vrednosti+standardna devijacija (n=3). Različita mala slova pokazuju da su vrednosti statistički značajno različite prema *t*-testu, (p<0,05). Skraćenice: TM-nedigerirano termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); DTM-digerirano odmašćeno termički tretirano kozije mleko; TME3-nedigerirano odmašćenog termički tretirano kozije mleko obogaćeno ekstraktom semenke (0,6mg/mL); DTME3-digerirano termički tretirano kozije mleko obogaćeno ekstraktom semenke; DCC-digestivni koktel sa enzimima.

Nedigerirani TM i TME3 uzorci su pokazali dobra helirajuća svojstva, jer su prvenstveno u pitanju proteinski matriksi (Slika 4.51e), za koje je opšte poznato da su dobri helatni agensi. Poređenje helirajućih svojstava među ovim uzorcima je prethodno detaljno razmatrano u podpoglavlju 4.3.2.10. Slično našim rezultatima, Shori (2022) su ukazali na dobra helirajuća svojstva mlečnih proizvoda koji su obogaćeni fenolnim ekstraktima muskatnog oraščića i bibera. Vredi napomenuti da je kontrola digestivnog koktela pokazala bolja helirajuća svojstva, u poređenju sa TM i TME3 uzorcima, čemu verovatno doprinose enzimi i soli iz digestivnog koktela koji mogu da vežu ili reaguju sa jonima

gvožđa. Digerirani TM (5783,27±67,24 µg (EDTA)/mL) i TME3 (5424,64±97,13 µg (EDTA)/mL) uzorci su pokazali značajno više vrednosti, u poređenju sa njima kompatibilnim nedigeriranim uzorcima (TM i TME3) ili sumom FCC vrednosti digestivnog koktela i odgovarajućih nedigeriranih uzoraka. Ovo znači da su se tokom *in vitro* digestije oslobodili peptidi koji poseduju dobra helirajuća svojstva (Power et al., 2013). Neka oslobođena fenolna jedinjenja toko *in vitro* digestije takođe mogu da stupe u interakcije sa enzimima i da uspore hidrolizu proteina mleka do aminokiselina, pri čemu se formiraju peptidi sa izraženom helirajućom aktivnošću (Stanisavljević et al., 2015).

4.4.3. Uticaj dijetnih vlakana i kompleksnog matriksa koji uključuje proteine i vlakna

4.4.3.1. Profil fenolnih jedinjenja digeriranih ekstrakta semenke u prisustva vlakana i kompleksnog protein/vlakna matriksa – nefermentisani funkcionalni aditivi, IE i TMIE3

Profili fenolnih jedinjenja i iskorišćenje pojedinačnih fenolnih jedinjenja IE i TMIE3 uzoraka pre i nakon *in vitro* digestije su prikazani u Tabeli 4.35 (podaci za kvantifikaciju, Tabela P5). Fenolna jedinjenja nisu detektovana u polaznim i *in vitro* digeriranim TM i TMI uzorcima, što je i očekivano jer su u pitanju visoko proteinski matriksi bez/sa inulinom. Vodeni ekstrakt semenki grožđa ima identičan profil fenolnih jedinjenja kao i ekstrakt koji je prethodno diskutovan u podpoglavlju 4.4.2.1., što je i očekivano ako se uzme u obzir da su ekstrakti dobijeni iz semenki Prokupca koje su izdvojene iz iste šarže komine. Male varijacije u sadržaju pojedinačnih fenolnih jedinjenja se mogu primetiti (pogledati E uzorak Tabela 4.34 i Tabela 4.35), međutim dobijene vrednosti nisu statistički značajno različite za sva detektovana jedinjenja. Dominantna fenolna jedinjenja su bila katehin i galna kiselina, koji zajedno čine čak 90,45% ukupno kvantifikovanih fenolnih jedinjenja, dok su ostala detektovana fenolna jedinjenja u ekstraktu potvrđena u značajno manjim količinama.

Sadržaj pojedinačnih i ukupnih fenolnih jedinjenja detektovanih u IE (3860,34 µg/L) i TMIE3 (733,77 µg/L) uzorcima su bili značajno niži u poređenju sa sadržajem fenolnih jedinjenja nađenih u ekstraktu semenki (12879,77 µg/L). Ovo sniženje u sadržaju fenolnih jedinjenja je zbog interkacija fenolnih jedinjenja sa inulinom i proteinima mleka u TMIN3 uzorku ili zbog njihovog "zarobljavanja" u strukturi inulina, što je predhono pokazano prilikom karakterizacije ovog izorka (podpoglavlje 4.3.3). Međutim, interakcije fenolnih jedinjenja sa inulinom ili protein-inulin matriksom su različite i očigledno zavise od strukturnih karakteristika pojedinačnih fenolnih molekula, što se može videti u Tabeli 4.35 (kolone IVP(% ukupnih, pojedinačnih klasa i pojedinačnih fenolnih jedinjenja vezanih za inulin) i MIVP (% ukupnih, pojedinačnih klasa i pojedinačnih fenolnih jedinjenja vezanih za proteine mleka-inulin matriks). Na osnovu rezultata se može pretpostaviti da kompleksan mleko/inulin matriks veže 90,64% fenolnih kiselina i 96,27% flavan-3-ola, odnosno 94,3% svih detektovanih fenolnih jedinjenja. Međutim, imajući u vidu predhodnu karakterizaciju TMIE3 uzorka, fenolna jedinjenja su zajedno sa inulinom micelarno vezana, ili su vezana u rastvornim IE/WP/CN kompleksima fenolna jedinjenja, ili su inkapsulisani u strukturi inulina i egzistiraju kao IE. Sa druge strane, na primeru IE uzorka je pokazano da inulin vezuje samo 22,81% fenolnih kiselina i čak 88,68% flavan-3-ola, odnosno 70,03% svih detektovanih fenolnih jedinjenja ekstrakta semenki. Predhodne studije su pokazale interakcije između fenolnih jedinjenja i inulina, koje uključuju vodonične veze i Van der Wals-ove interakcije (Jakobek & Matić, 2019). Interakcije inulina ili inulin-protein matriksa sa pojedinačnim fenolnim jedinjenjima, su do sada oskudno ispitivane, pa je poređenje sa drugim studijama teško izvodljivo.

Sadržaj fenolnih kiselina nakon *in vitro* gastrointestinalne digestije je bio različit zavisno od matriksa. U digeriranom TMIE3 uzorku je potvrđena samo kofeinska kiselina, koja jedina doprinosi biodostupnosti fenolnih kiselina u prisustvu mleko/inulin matriksa (1,19%). Sa druge strane, u digeriranom IE uzorku su detektovane protokatehinska, kofeinska i ferulinska kiselina, koje doprinose biodostupnosti fenolnih kiselina u prisustvu inulina (6,12%). Protokatehinske kiseline nije nađena u nedigeriranom IE uzorku, a njeno prisustvo u digeriranom IE uzorku je verovatno posledica migracije sa površine inulina, zbog izmenjenih pH uslova u simuliranim gastrointestinalnim uslovima. Ferulinska kiselina nije nađena u ekstraktu semenke i IE uzorku, već je detektovana samo u digeriranom IE uzorku. Međutim, ferulinska kiselina u ekstraktu najčešće egzistira estarski povezana sa vinskom kiselinom (Tabela 4.13), a njeno prisustvo na kraju digestije je verovatno posledica raskinutih veza tokom *in vitro* gastrointestinalne digestije.

Tabela 4.35. Biodostupnost fenolnih jedinjenja ekstrakta semenki grožđa u prisustvu inulina i inulin-mleko matriksa, pre i posle *in vitro* gastrointestinalne digestije (rezultati su izraženi kao µg/L).

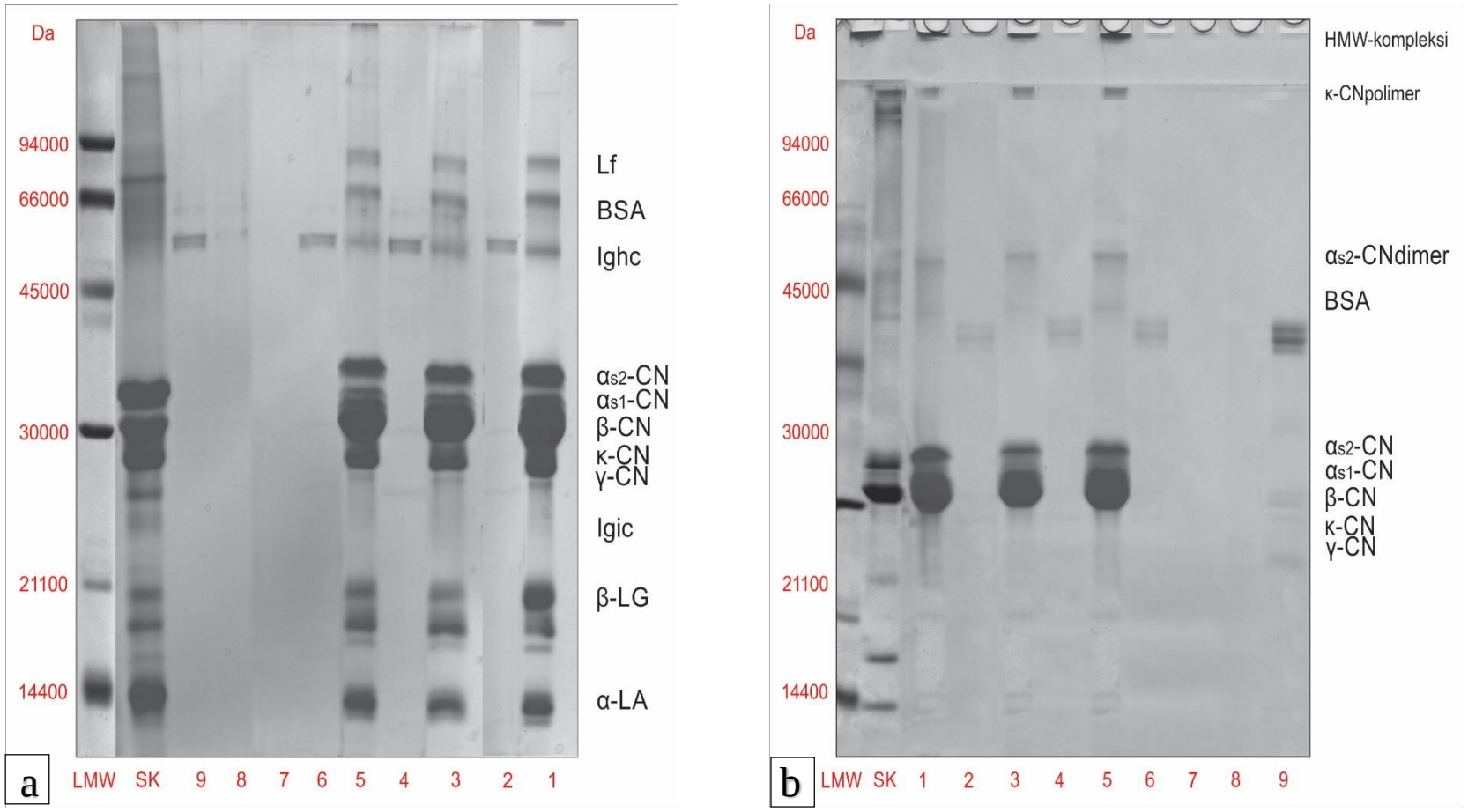
Jedinjenja (µg/L)	E	TM	DTM	TMI	DTMI	IE	IVP,%	DIE	DIER,%	TMIE3	MIVP, %	DTMIE3	DTMIE3, R,%
Fenolne kiseline													
Galna kiselina	3400,12±72,71[a]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2742,56±175,12[b]	19,34	n.d.	0	139,85±5,98[c]	95,89	n.d.	0
Protokatehinska kiselina	63,21±2,70[a]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	100	67,81±3,15[a]	107.27	87,33±1,88[b]	-	n.d.	0
Siringinska kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	-	72,02±1,69	-	n.d.	-
Kofeinska kiselina	74,41±5,43[a]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	23,43±2,92[b]	68,51	27,90±2,14[bc]	37,49	31,86±3,96[c]	57,19	42,09±2,00[d]	56,57
Ferulinska kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	120,66±7,11	100	n.d.	-	n.d.	-
Σ	3537,75 (27,47)	/	/	/	/	2765,99 (71,65)	22,81	216,37 (3,88)	6,12	331,06(45,12)	90,64	42,09 (5,42)	1,19
Flavan-3-oli i njihovi derivati													
Katehin	8250,56±214,8[a]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	980,58±13,7[b]	88,12	5290,72±290,2[c]	64,13	300,24±9,48[d]	96,36	511,78±11,56[e]	6,203
Katehin galat	690,54±38,02[a]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	31,69±3,17[b]	95,41	31,52±2,85[b]	4,57	32,92±2,60[b]	95,23	30,99±2,03[b]	4,487
Galokatehin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Epigalokatehin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Epigalokatehin galat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Σ	8941,11 (69,42)	/	/	/	/	1012,27 (26,22)	88,68	5322,25 (95,52)	59,53	333,16(45,40)	96,27	542,76 (69,84)	6,07
Ostali detektovani polifenoli													
Kvercetin-3-glukozid	129,23±4,64[a]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	54,54±3,12[b]	57,80	17,42±1,52[cd]	13,48	20,39±1,52[c]	84,22	15,24±1,40[d]	11,80
Izoramnetin-3-*O*-glukozid	48,44±3,02[a]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11,98±1,96[b]	75,28	n.d.	0	n.d.	100	n.d.	0
Kampferol	125,44±9,01[a]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	100	n.d.	0	n.d.	100	121,89±4,21[a]	97,17
Apigenin-7-glukozid	16,16±1,02[a]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	15,57±0,81[a]	3,70	15,97±0,86[a]	98,77	n.d.	100	n.d.	0
Naringenin	38,06±2,53	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	100	n.d.	0	n.d.	100	n.d.	0
Eskuletin	43,57±1,015a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	100	n.d.	0	49,16±1,48[b]	-	55,16±0,82[c]	126,61
Σ	400,92 (3,11)	/	/	/	/	82,08 (2,13)	79,53	33,38 (0,60)	8,33	69,55 (9,48)	82,65	192,29 (24,74)	47,96
Σ Σ	**12879,77**	**/**	**/**	**/**	**/**	**3860,34**	**70,03**	**5572,00**	**43,26**	**733,77**	**94,30**	**777,15**	**6,03**

Vrednosti su dobijeni iz tri nezavisna merenja (n=3) i prikazane kao srednje vrednosti ±standardna devijacija. Vrednosti koje su označene sa istim slovom u istom redu nisu statistički značajno različite prema *t*-testu, ($p<0,05$). Vrednosti u zagradama definišu procenat zastupljenosti karakterističnih polifenolnih grupa u uzorku (%). Skraćenice: „n.d.“-nije detektovan; E-vodeni ekstrakt semenke (ekstrakti dobijeni iz semenki Prokupca koje su izdvojene iz iste šarže komine kao i ekstrakt iz Tabele 4.34); TM-nedigerirano termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min); DTM-digerirano odmašćeno termički tretirano kozije mleko; TMI- nedigerirano odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin; DTMI-digerirano odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin; IE- nedigeriran sprej osušeni prah inulin/ekstrakt; DIE-digeriran sprej osušen prah inulin/ekstrakt; IVP%-(% ukupnih, pojedinačnih klasa i pojedinačnih fenolnih jedinjenja vezanih za inulin; DIER%- biodostupnost („recovery“) fenolnih jedinjenja nakon *in vitro* digestije inulin/ekstrakt sprej osušenog praha; TMIE3-nedigerirano termički tretirano kozije mleka obogaćeno prahom inulin/ekstrakt semenke; DTMIE3- digerirano termički tretirano kozije mleko obogaćeno prahom inulin/ekstrakt semenke; MIVP,%- % ukupnih, pojedinačnih klasa i pojedinačnih fenolnih jedinjenja vezanih za proteine mleka-inulin matriks; DTMIE3R%-ukupna biodostupnost („recovery“) fenolnih jedinjenja nakon *in vitro* digestije TTM+INE3 funkcionalnog aditiva. Napomena: [1] UHPLC-DAD MS/MS kvatifikovana fenolna jedinjenja.

Među flavonoidima posebnu pažnju treba obratiti na iskorišćenje katehina, koji je dominatno potvrđen u ekstraktu semenke. Njegova biodostupnost na kraju *in vitro* digestije je bilo 64,13% u prisustvu inulina i samo 6,20% u prisustvu proteini mleka/inulin matriksa. Ovo znači da se korišćenjem inulina kao nosača katehin uglavnom oslobađa u intestinalnoj fazi i lako prelazi sa površine inulina u rastvornu frakciju. Sa druge strane, malo iskorišćenje katehina u prisustvu mleko/inulin matriksa je verovatno posledica njegovog zadržavanja u nerastvornoj fazi digeriranog uzorka (Pineda-Vadillo et al., 2016). Nakon gastrointestinalne digestije veći deo katehina se verovatno oslobodi iz IE/WP/CN rastvornih kompleksa nego iz micelarnih kompleksa proteina mleka i inulina, jer su WP i WP/CN kompleksi u IE/WP/CN obliku dostupniji enzimima. Katehin galat je pokazao malo iskorišćenje u prisustvu oba matriksa (~4,5%). Među flavonolima, kvercetin-3-glukozid je potvrđen u oba digerirana IE i TMIE3 uzorka. Međutim, njegovo iskorišćenje je bilo malo, redom 13,48 i 11,80%. Sa druge strane, apigenin-7-glukozid je pokazao visoko iskorišćenje u prisustvu inulin matriksa, kao i kampferol i eskuletin u prisustvu proteini mleka/inulin matriksa. Izoramnetin-3-*O*-glukozid nije detektovan u digeriranim uzorcima. Konačno iskorišćenje kvantifikovanih fenolnih jedinjenja ekstrakta semenki grožđa u prisustvu inulina je bilo 43,26%, dok je u prisustvu mleko/inulin matriksa bilo samo 6,03% (računato u odnosu na ekstrakt semenke (E)). Slično iskorišćenje ukupnih fenolnih jedinjenja su prijavili Bernardes et al. (2019) za ekstrakte jussara (*Euterpe edulis* Martius) voća u prisustvu inulina (33,8%), dok su Tomas et al. (2020) dobili 29,9% iskorišćenje ukupnih antocijana nakon *in vitro* digestije mešavine pirea kupine i inulina. Na osnovu detaljne pretrage literaturnih podataka, ovo je prva studija koja analizira uticaj multikomponentnog proteini mleka/inulin matriksa na iskorišćenje fenolnih jedinjenja. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da se u prisustvu inulina većina fenolnih jedinjenja oslobodi tokom gastrointestinalne digestije, dok se u prisustvu kompleksnog proteini mleka/inulin matriksa (TMIE uzorka) većina fenolnih jedinjenja zadržava u nerastvornoj frakciji i može biti potencijalno dostupna u „colon“ fazi.

4.4.3.2. Elektroforetska analiza kompleksnog protein/vlakna matriksa nakon in vitro digestije

Proteinski profili TM, TMI i TMIE3 uzoraka i njihovih rastvornih frakcija pre i nakon *in vitro* digestije (Slika 4.52a,b, traka 1-6), su elektroforetski analizirani, korišćenjem SDS-PAGE u redukujućim (Slika 4.52a) i neredukujućim (Slika 4.52b) uslovima. Kao što se može videti na SDS-R-PAGE gelu, nedigerirani TM, TMI i TMIE3 uzorci su imali identične proteinske profile, sa karakterističnim trakama koje pripadaju kazeinima i serum proteinima (Slika 4.5a, trake 1, 3, i 5). Detaljna analiza i karakterizacija ovih uzoraka je opisana i diskutovana u podpoglavlju 4.3.3.3. Nedigerirani IE uzorak je takođe nanet u bunarić (Slika 4.52a, traka 7), međutim trake nisu detektovane, što je očekivano jer se radi o neproteinskom matriksu. Na kraju *in vitro* digestije, kod svih rastvornih frakcija uzoraka su potvrđene samo trake koje pripadaju enzimima iz digestivnog koktela (Slika 4.52a, traka 9). Trake poreklom od digeriranih TM, TMI i TMIE3 uzoraka nisu bile vidljive (Slika 4.52a, trake 2, 4 i 6), što znači da su se tokom digestije oslobodili peptidi koji nisu vidljivi na SDS-R-PAGE gelu i aminokiseline. Identične elektroforetske rezultate su prijavili drugi autori, za *in vitro* digeriran koziji kefir obogaćen dugolančanim, nativnim i kratkolančanim inulinom (Simsek et al., 2017) i odmašćeno termički tretirano kozije mleko bez/sa polenom (Kostić et al., 2021).



Slika 4.52. Elektroforetski profili TM, TMI, TMIE3 i IE uzoraka, pre i posle *in vitro* gastrointestinalne digestije, analizirani: (a) SDS-R-PAGE-om; (b) SDS-NR-PAGE-om. Oznake: TM-nedigerirano termički tretirano kozije mleko (90°C, 10min) (1); DTM-digerirano odmašćeno termički tretirano kozije mleko (2); TMI- nedigerirano odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin (3); DTMI-digerirano odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin (4);TMIE3-nedigerirano termički tretirano kozije mleka obogaćenog prahom inulin/ekstrakt semenke (5); DTMIE3- digerirano termički tretirano kozije mleko obogaćeno prahom inulin/ekstrakt semenke (6); IE- nedigeriran sprej osušeni prah inulin/ekstrakt (7); DIE-digeriran sprej osušen prah inulin/ekstrakt (8); DCC-digestivni koktel sa enzimima (9). Skraćenice: LMW-standard molekulskih masa; SK-standard glavnih proteina kravljeg mleka; αs1-CN (αs1-kazein); αs2-CN (αs2-kazein); β-CN (β-kazein); κ-CN (κ-kazein); γ-CN (γ-kazein); β-LG (β-laktoglobulini); α-LA (α-laktalbumin); BSA-serum albumin krvi; Ig-imunoglobulini; Lf-laktoferin; HMW-visokomolekularni kompleksi. Napomena: svi uzorci su mešani sa odgovarajućim puferom za uzorke u odnosu 1:1.

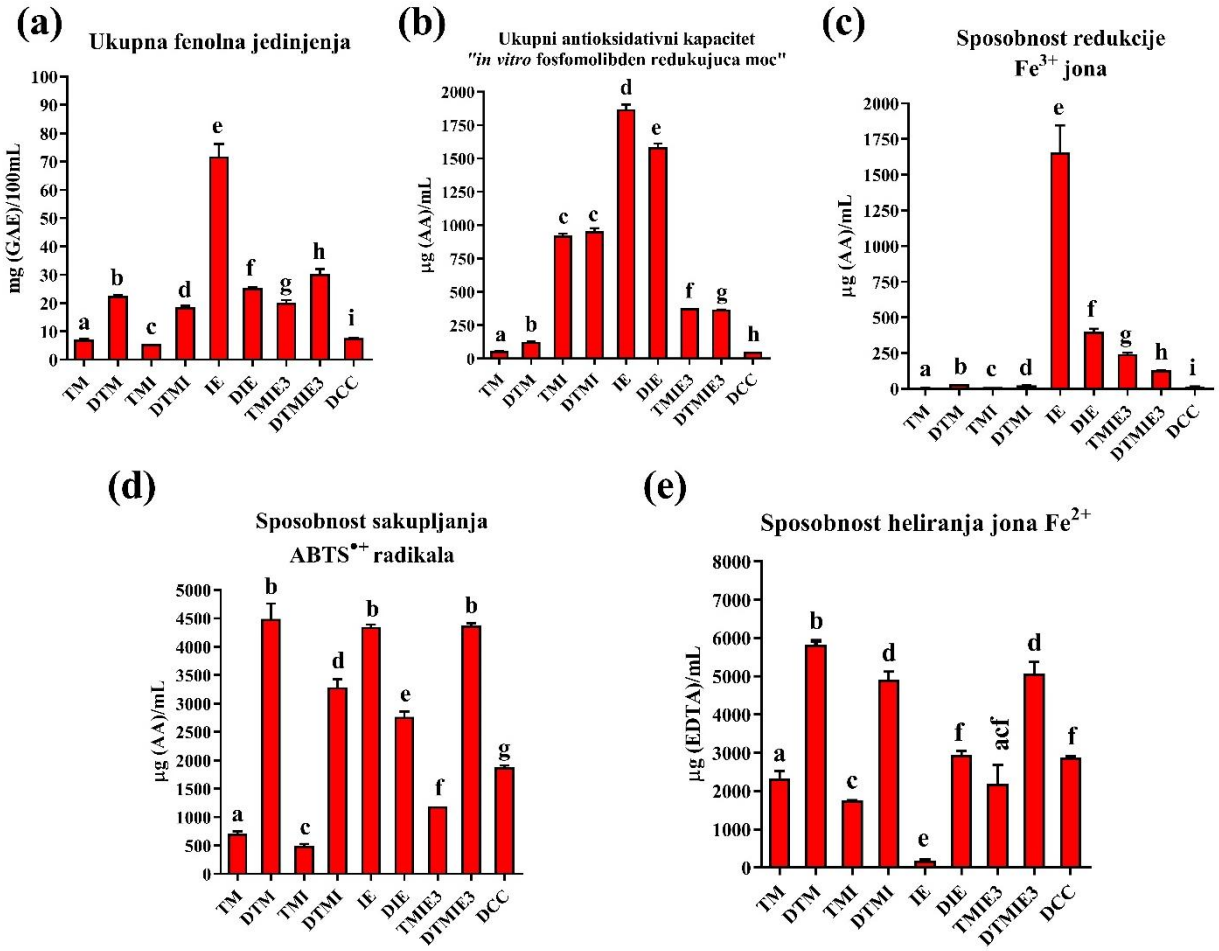
SDS-NR-PAGE profili nedigeriranih TM, TMI i TMIE3 uzoraka su prethodno analizirani i diskutovani u podpoglavlju 4.3.3.3. Na kraju *in vitro* digestije u rastvornim frakcijama digeriranih TM, TMI i TMIE3 uzoraka (Slika 4.52b, trake 2, 4 i 6), su vidljive samo trake koje potiču od enzima (Slika 4.52b, traka 9), što je u saglasnosti sa SDS-R-PAGE rezultatima. Nekarakteristične trake potencijalno formiranih peptidnih agregata nisu potvrđeni na SDS-NR-PAGE gelu. Kod digeriranog IE uzorka (Slika 4.52b, traka 8), trake poreklom od enzima nisu primećene kao što je to bio slučaj u drugim analiziranim digeriranim uzorcima, što znači da su najverovatnije ostali u nerastvornoj frakciji zajedno sa inulinom ili nisu vezali Commasie briliant blue boju zbog velikog prisustva inulina u IE uzorku. Međutim, na ulazu u gornji gel se može primetiti manje intenzivna traka koja verovatno pripada enzimima koji su kompleksirali sa fenolnim jedinjenjima, prvenstveno pro(anto)cijanidinima (Ramos-Pineda et al., 2020). Na SDS-R-PAGE profilu rastvorne frakcije digeriranog IE uzorka se takođe može uočiti smanjen intenzitet i odsustvo traka koje potiču od enzima (Slika 4.52b, traka 8), u poređenju sa istim trakama kod drugih digeriranih uzoraka. Ovo se može pripisati istim faktorima kao kod SDS-NR-PAGE analize, deo enzima ostao je u nerastvornoj frakciji digeriranog uzorka zbog vezivanja za inulin ili je došlo do smanjenog vezivanja Commasie briliant blue boje za enzime zbog smanjenja hidrofobnih regiona za koji se može vezati boja usled interakcije sa inulinom.

4.4.3.3. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativna svojstva

Rezultati za sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativnu aktivnost nedigeriranih uzoraka (TM, TMI, IE i TMIE3), njima komplementarnih *in vitro* digeriranih uzoraka (DTM, DTMI, DINE i DTMIE3) i kontrole digestivnog koktela (DCC), su prikazani na Slici 4.53a-e. Nedigerirani i digerirani TM i TMIE uzorci, u ovoj studiji imaju ulogu kontrolnih uzoraka. Kako su kontrolni uzorci visoko proteinski, Folin-Ciocalteu-ova metoda u ovom slučaju prati redukujući kapacitet uzoraka, koji je prividno izražen kao TPC. Rezultati za TPC dobijeni za nedigeriran i digeriran TM uzorak su u saglasnosti sa prethodno diskutovanim rezultatima u podpoglavlju 4.4.2.3. Niže TPC vrednosti za TMI uzorak, u poređenju sa TM uzorkom je zbog udela inulina u ovom uzorku i smanjenog sadržaja proteina. Ovo takođe utiče na sniženje TPC vrednosti digeriranog TMI uzorka, jer ova TPC vrednost zavisi samo od oslobođenih peptida i aminokiselina, dok inulin ostaje nehidrolizovan nakon digestije. Nedigeriran IE uzorak je imao visok TPC, zbog visokog sadržaja fenolnih jedinjenja. Međutim, nakon *in vitro* digestije ovog uzorka (DIE), TPC se smanjio skoro tri puta, što nije u saglasnosti sa HPLC rezultatima kod kojih je registrovan značajno veći sadržaj fenolnih jednjenja nakon digestije (tabela 4.35). Ovo ukazuje da je prisutni inulin u kombinaciji sa digestivnim koktelom ometao redukujuća svojstva prisutnih fenolnih jedinjenja zbog interakcija, zbog čega su se dobili značajno niži rezultati. Druge studije su takođe prijavile nizak sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja nakon digestije mikroinkapsulata inulin-fenolna jedinjenja jussara voće (Bernardes et al., 2019), ili mešavine inulina sa kupina pireom (Tomas et al., 2020). Sa druge strane, digeriran TMIE3 uzorak je imao viši TPC (30,32±1,74 mg(GAE)/100mL), u poređenju sa njemu kompatibilnim nedigeriranim uzorkom ili sumom TPC vrednosti digestivnog koktela i nedigeriranog TMIE3 uzorka. Konačno, digerirani TMIE3 uzorak je imao viši TPC u poređenju sa digeriranim TM i TMI uzorcim, čemu su doprinela upravo fenolna jedinjenja oslobođena nakon *in vitro* digestije.

Rezultati za TAC (Slika 4.53b) i redukujuću moć (FRP)(Slika 4.53c) nedigeriranog i digeriranog TM uzorka su uz male varijacije saglasni sa prethodno diskutovanim rezultatima za iste uzorke u podpoglavlju 4.4.2.3. Međutim, ostali uzorci koji su analizirani (TMI, IE i TMIE3) sadrže inulin, koji hidrolizuje u kiseloj sredini i doprinosi visokim TAC vrednostima. Sa druge strane, inulin ne utiče na FRP vrednosti istih uzoraka, već samo fenolna jedinjenja i neznatno proteini mleka. Iz navedenih razloga, nedigerirani i digerirani TMI uzorci imaju visok TAC, ali nisku FRP redukujuću aktivnost. Dalje, za IE uzorak su dobijene visoke TAC i FRP vrednosti, koje su se značajno smanjile nakon digestije ovog uzorka (DIE), zbog smanjene biodostupnosti fenolnih jedinjenja u rastvornoj frakciji. Poređenje ovih rezultata sa drugim studijama je teško izvodljivo, zbog specifičnosti matriksa koji se ispituje i nedostatka literaturnih podataka. Međutim, Tomas et al. (2020) su pokazali smanjenu sposobnost *in vitro* digerirane mešavine inulin-kupina pire da redukuju jone bakra. Treba naglasiti da

su TAC vrednosti za digeriran IE uzorak bile značajno više u poređenju sa FRP vrednostima, što se objašnjava činjenicom da je nedigestibilni inulin hidrolizovao tokom određivanja TAC vrednosti na fruktozu i zajedno sa fenolnim jedinjenjima doprinosi TAC vrednosti digeriranog IE uzorka. Kompleksni TMIE3 uzorak je nakon *in vitro* digestije pokazao smanjenu TAC i FRP redukujuću aktivnost, u poređenju sa nedigeriranim TMIE3 uzorkom. Konačno, digeriran TMIE3 uzorak je pokazao više TAC vrednosti u odnosu na digeriran TM uzorak, ali niže TAC vrednosti u poređenju sa digeriranim TMI uzorkom, a za ove razlike među uzorcima je odgovoran sadržaj i udeo inulina. Sa druge strane, digeriran TMIE3 uzorak je imao značajno višu FRP aktivnost u poređenju sa digeriranim TM i TMI uzorcima, čemu doprinose fenolna jedinjenja.



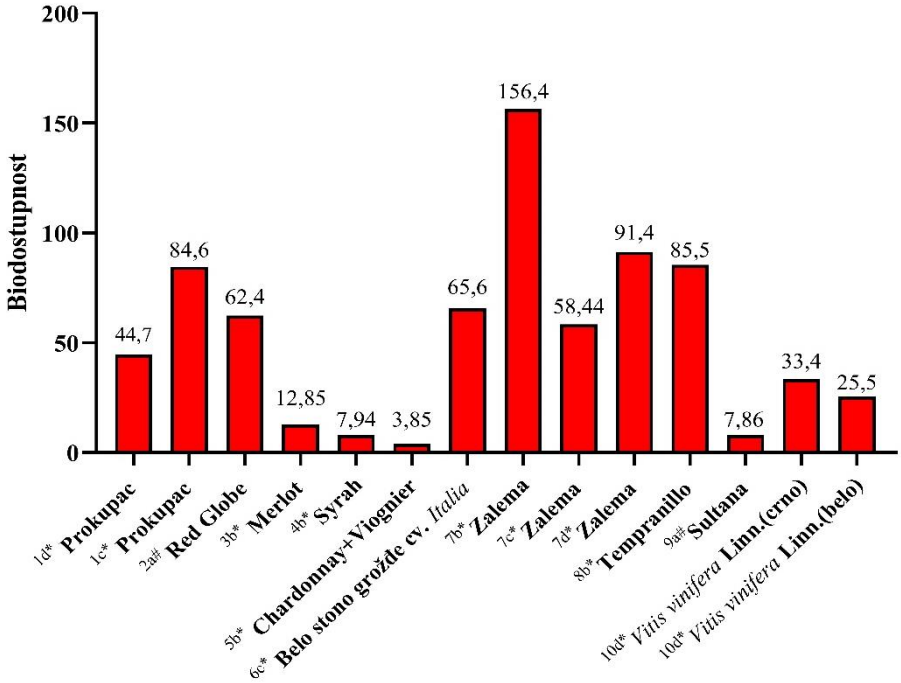
Slika 4.53. Ukupna fenolna jedinjenja (a) i antioksidativna svojstva (b-e), TM, TMI, TMIE3 i IE uzoraka, pre i posle *in vitro* gastrointestinalne digestije: Ukupni antioksidativni kapacitet "*in vitro* fosfomolibden redukujuća moć" (b); Sposobnost redukcije Fe^{3+} jona (redukujuća moć) (c); Sposobnost sakupljanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala (d); Sposobnost heliranja Fe^{2+} jona (e). Podaci su prikazani kao srednje vrednosti+standardna devijacija (n=3). Različita mala slova pokazuju da su vrednosti statistički značajno različite prema *t*-testu, (p<0,05). Skraćenice: TM-nedigerirano termički tretirano kozje mleko (90°C, 10min); DTM-digerirano odmašćeno termički tretirano kozje mleko; TMI- nedigerirano odmašćeno termički tretirano kozje mleko/inulin; DTMI-digerirano odmašćeno termički tretirano kozije mleko/inulin; IE-nedigeriran sprej osušeni prah inulin/ekstrakt; DIE-digeriran sprej osušen prah inulin/ekstrakt; TMIE3-nedigerirano termički tretirano kozije mleka obogaćeno prahom inulin/ekstrakt semenke; DTMIE3- digerirano termički tretirano kozije mleko obogaćeno prahom inulin/ekstrakt semenke; DCC-digestivni koktel sa enzimima.

Sposobnost sakupljanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala TM, TMI i TMIE3 uzoraka nakon digestije je značajno viša u poređenju sa njima komplementarnim nedigeriranim uzorcima ili sumom $ABTS^{\bullet+}$ vrednosti nedigeriranih uzoraka i digestivnog koktela (Slika 4.53d). Povećanoj sposobnost sakupljanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala nakon *in vitro* digestije doprinose enzimskom hidrolizom oslobođeni peptidi i aminokiseline (Power et al., 2013), kao i fenolna jedinjenja u slučaju digeriranog TMIE3 uzorka. Na kraju digestije, sposobnost sakupljanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala digeriranih TMIE3 i TM uzoraka se nije značajno

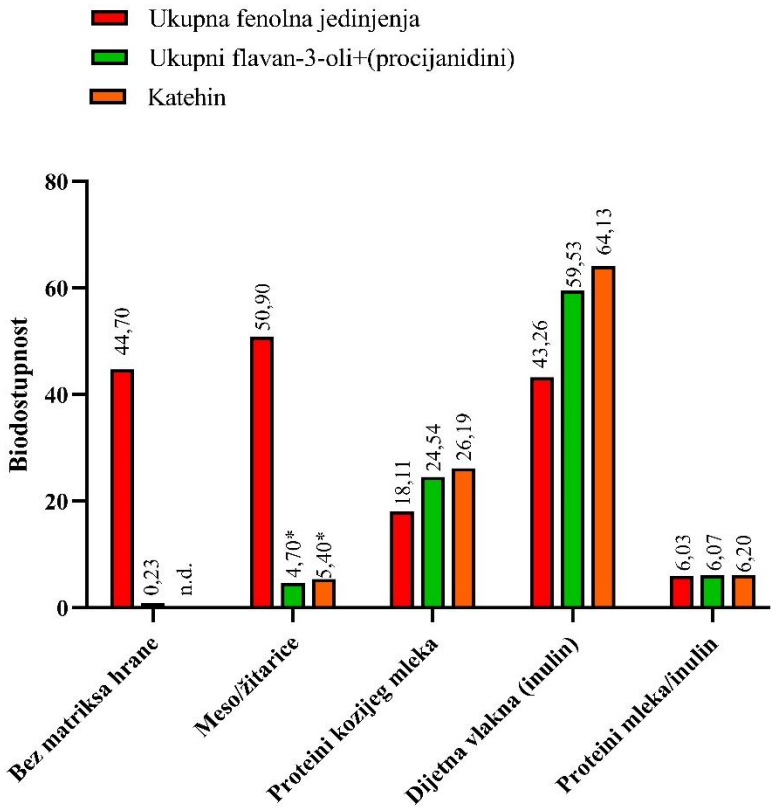
razlikovala, dok je digeriran TMI uzorak pokazao značajno manju $ABTS^{\bullet+}$ aktivnost. Sa druge strane, IE uzorak je nakon digestije (DINE), pokazao značajno manju $ABTS^{\bullet+}$ aktivnost u poređenju sa njemu komplementarnim nedigeriranim uzorkom. Inulin je dobar nosač fenolnih jedinjenja zbog hidrofobne prirode i heliks strukture, zbog čega su fenolna jednjenja zarobljena u njegovoj strukturi najverovatnije reagovala sa komponentama digestivnog koktela što je umanjilo njihovu spospobnost hvatanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala. Smanjenu $ABTS^{\bullet+}$ aktivnost nakon *in vitro* digestije su prethodno pokazali Bernardes et al. (2019), za mikroinkapsulate inulina i polifenola jusara voća.

Nedigerirani TM (2327,03 µg(EDTA)/mL), TMI (1750,66 µg(EDTA)/mL) i TMIE3 (2194,68 µg(EDTA)/mL) uzorci pokazuju dobra helirajuća svojstva (Slika 4.53e). Dobra helirajuća svojstva ovih uzoraka su povezana sa visokim sadržajem proteina, a male varijacije u dobijenim rezultatima se objašnjavaju prisustvom I i IE u uzorcima, kao i njihovim interakcijama sa proteinima, što doprinosi smanjenju sadržaja i helirajuće spsosbnosti proteina TMI i TMIE3 uzoraka. Za digestivni koktel su dobijene visoke vrednosti za helirajuća svojstva, što je u saglasnosti sa predhodnim ogledima u kojima je testiran digestivni koktel (Kostić et al., 2021). Na kraju digestije, digerirani TM i TMI uzorci su imali poboljšana helirajuća svojstva, dok se dobijena FCC vrednost za digerirani TMIE3 uzorak nije značajno razlikovala u poređenju sa sumom FFC vrednosti komplementarnih nedigeriranih uzoraka i digestivnog koktela. Konačno, digerirani TM uzorak je pokazao bolja helirajuća svojstva od digeriranih TMI i TMIE3 uzoraka, čije se FCC vrednosti nisu značajno razlikovale. Sa druge strane, nedigerirani IE uzorak je pokazao slaba helirajuća svojstva. Helirajuća svojstva digeriranog IE uzorka nisu ni potvrđena, jer se dobijena FCC vrednost za digeriran IE uzorak nije razlikovala od FCC vrednosti za digestivni koktel, što znači da helirajuća svojstva digeriranog DIE uzorka potiču od digestivnog koktela.

4.4.4. Poređenje biodostupnosti ukupnih i pojedinačnih fenolnih jedinjenja



Slika 4.54. Biodostupnost ukupnih fenolnih jedinjenja nakon *in vitro* gastrointestinalne digestije ekstrakata ili brašna grožđa, komine, pokožice i semenke. Reference: [1]rezultati dobijeni u doktorskoj disertaciji; [2]Tagliazucchi et al. (2010); [3]Corrêa et al. (2017); [4]Lingua et al. (2018); [5]Lingua et al. (2019); [6]Garbetta et al. (2018); [7]José Jara-Palacios et al. (2018); [8]Wang et al. (2017); [9]Kamiloglu et al. (2014); [10]Chen et al. (2016). [a]grožđe, [b]komina, [c]pokožica, [d]semenka. [#]Spektrofotometrijski određeni, [*]HPLC kvantifikacija.



Slika 4.55. Uporedni prikaz biodostupnosti ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnih flavan-3-ola i katehina iz ekstrakta semenki grožđa, bez i u prisustvu različitih matriksa hrane. **Napomena:** Biodostupnost fenolnih jedinjenja je određeno na osnovu dobijenih rezultata UHPLC-DAD MS/MS i *UHPLC-Orbitrap MS^4 kvantifikovanih fenolnih jedinjenja.

5. Zaključak

Na osnovu svih izloženih i diskutovanih rezultata u okviru ove doktorske disertacije, mogu se formulisati sledeći zaključci:

1. **Fino samleveno brašno semenki i pokožica** je dobijeno od grožđa ubranog u tehnološkoj fazi zrelosti. Sva testirana brašna semenki su imala dobar sastav masnih kiselina, odnosno nizak sadržaj zasićenih i visok sadržaj nezasićenih MK, prvenstveno linolne masne kiseline (61,15%-83,47%). Najveći sadržaj linolne kiseline je otkriven u semenki sorte grožđa Muskat Hamburg, Italijanski Rizling i Tamjanika. Oleinska kiselina je bila najzastupljenija mono-nezasićena MK, dok je stearinska kiselina bila najzastupljenija zasićena MK. Najveći registrovan sadržaj obe masne kiseline je bio u semenki autohtone sorte Prokupac. Pored toga, ulje semenke sorte Prokupac je sadržalo značajnu količinu linolaidinske, eruka, behenske i cis-8,11,14-eikosatrienske MK. Značajna količina rastvornih ugljenih hidrata je registrovana u svim analiziranim uzorcima brašna semenki i pokožica grožđa. U uzorcima je pronađeno petnaest različitih ugljenih hidrata, među kojima su bili glavni glukoza i fruktoza. PCA analiza bazirana na sadržaju masnih kiselina u brašnu semenki je otkrila odvajanje dve autohtone sorte grožđa, Prokupac i Tamjaniku, jednu od druge i od ostalih analiziranih uzoraka; dok je PCA analiza bazirana na rastvornim ugljenim hidratima brašna semenke razlikovala Prokupac i Merlot kao odvojene grupe od ostalih sorti grožđa. Pored toga, semenke svih analiziranih sorti grožđa su imale visok sadržaj nerastvornih i ukupnih dijetnih vlakana, dok su kod pokožica zavisno od sorte pokazane male varijacije u sadržaju rastvornih i nerastvornih dijetnih vlakana. UHPLC-DAD MS/MS kvantifikacija fenolnih jedinjenja u ekstraktima semenki je pokazala dominantno prisustvo katehina, galne i elaginske kiseline, a najviši sadržaj fenolnih jedinjenja je potvrđen u semenki autohtone sorte Prokupac. Sa druge strane, u ekstraktima pokožica od neantocijanskih fenolnih jedinjenja su dominantno potvrđeni kvercetin-3-*O*-galaktozid i luteolin-7-*O*-glukozid, a najviši sadržaj fenolnih jedinjenja je nađen u autohtonim sortama Tamjanika i Prokupac. UHPLC-Orbitrap MS^4 karakterizacija je potvrdila prisustvo procijanidin dimer i trimer izomera u ekstraktima semenki, odnosno malvidin, peonidin, delfinidin, petunidin i cijanidin derivate u ekstraktima pokožica crvenih sorti grožđa. Najviši sadržaj antocijana je potvrđen u pokožici internacionalne sorte Cabernet Sauvignon, prvenstveno malvidin derivata kao što su malvidin-3-*O*-glukozid i malvidin-3-*O*-(6"-acetil)heksozid. Jedinsteveni profil masnih kiselina, mono- i oligosaharida, odnosno visok sadržaj dijetnih vlakana i ukupnih fenolnih jedinjenja koji su potvrđeni na uzorku fino samlevenih semenki autohtone sorte Prokupac, zajedno sa dobrim nutritivnim parametrima kvaliteta, ukazuju na njegovu potencijalnu upotrebu kao novog funkcionalnog sastojka hrane.

2. Najviši sadržaj fenolnih jedinjenja (izuzev flavan-3-ola i antocijana) je potvrđen UHPLC-DAD MS/MS metodom u ekstraktima komine, pokožice i semenke koji nisu sušene, nakon odvajanja od vina. Izuzetak je šepurina sa višim sadržajem fenolnih jedinjenja u osušenim uzorcima. Sa druge strane, UHPLC-Orbitrap MS^4 analizom je pokazano da je sadržaj antocijana bio najviši u ekstraktima liofilisane komine i pokožice, odnosno sadržaj procijanidina i monomernih flavan-3-ola je takođe bio najviši u ekstraktima liofilisane semenke. UHPLC-Orbitrap MS^4 karakterizacijom i kvantifikacija fenolnih jedinjenja utvrđeno je prisustvo 75 jedinjenja (18 antocijana i 57 ostalih fenolnih jedinjenja). Do sada nisu, prema literuturnim podacima, pronađena 34 fenolna jedinjenja koja su identifikovana i kvantifikovana u ovoj studiji u polifenolnim ekstraktima komine Prokupca. Prvi put je registrovan sadržaj specifičnog malvidin-3-*O*-heksozid-(8,8)-metilmetine-(epi)katehina u vodenim ekstraktima pokožice i cele komine, i predložen je put njegove fragmentacije. Pored toga, primećen je značajan sadržaj etil-galata u svim analiziranim uzorcima, Takođe, novi podaci za ove ekstrakte dobijeni su za citotoksična svojstava i antioksidativnu aktivnost. Procijanidini (uglavnom pronađeni procijanidin B tip dimeri) i fenolne kiseline (pretežno hidroksibenzoeve kiseline i njihovi derivati) bili su najzastupljeniji u ekstraktu semenke i pokazano je da su jako doprineli sakupljanju $ABTS^{\bullet+}$, $DPPH^{\bullet}$ RDSC radikala i vodonik-peroksida. Sa druge strane, ekstrakt pokožice je pokazao dozno zavisnu antioksidativnu aktivnost

na modelu humanih ćelija kolorektalnog adenikarcinoma, što se može pripisati prisustvu flavonola i antocijana, uglavnom laricitrin-3-*O*-heksozida i glukozida malvidina i peonidina, koji su bili dominantni u ekstraktu pokožice. Ekstrakt šepurine sorte Prokupac se pokazao kao dobar izvor stilbenoida. Iz navedenih razloga, upotreba komine Prokupca, odnosno cele komine, semenke, šepurine ili pokožice, može biti jeftin izvor fenolnih jedinjenja pogodnih za razvoj novih funkcionalnih prehrambenih i farmaceutskih proizvoda, i ujedno mogu doprineti smanjenju zagađenja životne sredine.

3. Ekstrakt semenki su uspešno inkorporirani u nekoliko funkcionalnih aditiva na bazi kozijeg mleka i jogurata fermentisanih starterom i selekcionisanim *L. plantarum* sojem, što predstavlja jednu inovativnu strategiju u iskorišćenju otpada u formulaciji funkcionalnih proizvoda na bazi kozijeg mleka.

Detaljnom karakterizacijom ***funkcionalnih aditiva na bazi proteina kozijeg mleka obogaćenih ekstraktom semenke (TME)*** je pokazano prisustvo interakcija između fenolnih jedinjenja i proteina kozijeg mleka, odnosno WP/CN kompleksa. Na osnovu dobijenih rezultata je pretpostavljen model distribucije fenolnih jedinjenja na kazeinskoj miceli termički tretiranog kozijeg mleka, što može doprineti razumevanju interakcija fenolnih jedinjenja i proteina, odnosno budućim istraživanjima fokusiranih na biodostupnost fenolnih jedinjenja tokom digestije. Povećanje količine ekstrakta u pripremljenim TME prahovima je uticalo na povećanje antioksidativnih svojstava, kao što su TAC, FRP, $ABTS^{\bullet+}$, $DPPH^{\bullet}$ aktivnost, čemu su najviše doprinela fenolna jedinjenja (galna kiselina, katehin i procijanidini). Takođe, ne treba zanemariti doprinos proteina kozijeg mleka na antioksidativna svojstva, prvenstveno na sposobnost heliranja Fe^{2+} jona i sposobnost proteina u zaštiti fenolnih jedinjenja kao glavnih antioksidanasa. Svi prahovi (M, TM i TME) su pokazali unimodalnu raspodelu veličine čestica i ζ-potencijal veći od -36mV. TME prahovi sa različitim sadržajem ekstrakta semenke su imali različitu distribuciju veličine čestica, međutim vrednosti za ζ-potencijal TME uzoraka se nisu značajno razlikovale u poređenju sa vrednošću za TM uzorak, što znači da interakcije između fenolnih jedinjenja i WP/CN kompleksa nisu uticale na neto naelektrisanje na površini kazeinske micele. ATR-FTIR i Raman spektroskopije u kombinaciji sa PCA analizom su pokazale promene u sekundarnoj strukturi proteina mleka (β-nabrana struktura, nasumični strukturni namotaji i α-heliks/velikih petlji), izmenjene vibracije nekih aminokiselinskih ostataka $–PO_3^{2-}$ grupe i ν(C-C) istezanja aromatičnog prstena. Ove promene su uzrokovane primenjenim termičkim tretmanom, prisustvom slobodnih fenolnih jedinjenja, interakcijama WP/CN kompleksa i fenolnih jedinjenja i prisustvom proizvoda Maillard-ovih reakcija. Za obe spektroskopije (ATR-FTIR i Raman), uzorci TME2 i TME3 su grupisani i odvojeni od drugih uzoraka, u regionima amid I i III. SEM analiza je pokazala različitu morfologiju i oblik čestica M, TM i TME prahova, kao posledicu primenjenog sprej sušenja, termičkog tretmana i fenolna jedinjenja-WP/CN interakcija. Povećanje sadržaja ekstrakta semenke u TME prahovima dovodi do smanjenja sadržaja proteina. 0,1% rastvori M, TM i TME prahova su pokazali dobra emulgujuća svojstva i lošu sposobnost stabilizacije pene (SP) (osim SM uzorka). Sa druge strane, 0,5% i 1,0% rastvori su pokazali slabija tehno-funkcionalna svojstva, što se može povezati sa povećanim sadržajem proteina u rastvorima koji ostaju neapsorbovani na površini ulje/voda ili vazduh/voda. Sumirajući dobijene rezultate, predložen je šematski prikaz rasporeda kazeinskih micela na površinama ulje/voda i vazduh/voda, u emulzijama pripremljenim od različitih M, TM i TME rastvora, pri pH 6,7. Konačano, funkcionalni TME prahovi su pokazali dobra emulgujuća svojstva, što ih potencijalno kvalifikuje za primenu u formulacijama novih prehrambenih proizvoda koji zahtevaju dobru sposobnost formiranja i stabilnosti emulzija.

Funkcionalni aditivi na bazi proteina kozijeg mleka obogaćeni prahom inulin/ekstrakt semenke (TMIE), su pokazali dobra antioksidativna i emulgujuća svojstva. UHPC DAD MS/MS analiza je pokazala povećan sadržaj fenolnih jedinjenja u TMIE prahovima sa povećanjem količine inulin/ekstrakt praha u formulaciji. Međutim, TMIE prahovi sa većim sadržajem IE praha u formulaciji (TMIE2 i TMIE3), kao i sam IE prah su pokazali polimodalnu (bimodalnu) distribuciju. Na osnovu rezultata za veličinu čestica i SEM slika, može se pretpostaviti/uočiti

prisustvo manjih čestica koje mogu poticati od I/WP/CN i IE/WP/CN rastvornih kompleksa koji su se odvojili sa površine kazeinske micele TMI i TMIE uzoraka. TMI je imao značajno manju veličinu čestica nego TM, zbog reakcija inulina sa micelarnim WP kompleksima, koje povlači u serum fazu, dok kazeinske micele ostaju delimično ogoljene. Interakcije fenolnih jedinjenja i/ili inulina sa proteinima su takođe pretpostavljene na osnovu rezultata elektroforetskih analiza i sadržaja ukupnih proteina, jer ometaju vezivanje CBB boje prilikom detekcije proteina. Ove interakcije inulina sa WP/CN kompleksima su manje izražene kod TMIE prahova, prvenstveno zbog manje količine inulina i prisustva fenolnih jedinjenja koji ometaju odvajanje micelarnih WP/CN kompleksa sa površine kazeinske micele. Veličina micele TM nije se značajno izmenila dodatkom najmanje količine IE praha (TMIE1), što znači da interakcije inulina i fenolnih jedinjenja sa kazeinskom micelom, nisu promenile veličinu micele, dok prisutni IE/WP/CN komplesi nisu još uvek u dovoljnoj meri zastupljeni u serum fazi da utiču na izmenu distribucije čestica TMIE1 uzorka. Da su se i kod TMIE1 uzorka odvojili IE/WP/CN komplesi jasno ukazuje povećano negativno naelektrisanje kazeinske micele, u poređenju sa naelektrisanjem TM micele. Međutim, povećane količine IE praha u TMIE formulacijama (TMIE2 i TMIE3), utiču na povećano prisustvo IE/WP/CN rastvornih kompleksa koji su se odvojili od površine kazeinske micele u serum fazu mleka, kao i na povećano prisustvo slobodnih fenolnih jedinjenja (određeni UHPLC DAD MS/MS analizom) i IE čestica koje nisu reagovale sa prisutnim kazeinskim micelama, što se objašnjava bimodalnom distribucijom veličine čestica TMIE2 i TMIE3 uzoraka. Pretpostavljeni modeli su dodatno potvrđeni ATR-FTIR i Raman spektroskopijama i PCA analizom. Kod Raman spektroskopije, u regionima „otisak prsta“ i amid III se grupišu uzorci TMIE2 i TMIE3, i odvajaju se od ostalih uzoraka što se može prvenstveno pripisati promenama u sekundarnoj strukturi proteina i izmenjenim vibracijama aminokiselinskih ostataka, koje se javljaju zbog interakcija inulina i fenolnih jedinjenja sa WP/CN kompleksima. Pored toga, izmenjene vibracije nekih aminokiselinskih ostataka se mogu javiti kao odgovor na izmenjenu površinu micele nakon odvajanja IE/WP/CN kompleksa. Kod ATR-FTIR-a, u amid I, II i „otisak prsta“ regionima grupišu se: (a) TMIE3 i IE uzorci; (b) M i TM uzorci; (c) TMIE1 i TMIE2 uzorci (i TMI uzorak, ako posmatramo odvajanje duž PC2 ose). Na grupisanje TMIE3 i IE uzoraka, i njihovo odvajanje od ostalih uzoraka najviše utiču promene u sekundarnoj strukturi proteina mleka, zbog interakcija inulina i fenolnih jedinjenja sa proteinima, kao i odvajanje IE/WP/CN rastvornih kompleksa sa površine micela. Štaviše, u amid II i III regionu, grupisanju uzoraka TMIE i IE takođe doprinose specifične vibracije koje se mogu povezati sa ν(C-C) aromatičnim vibracijama slobodnih fenolnih jedinjenja, što je u saglasnosti sa UHPLC DAD MS/MS rezultatima. Sa druge strane, na grupisanje TMIE1, TMIE2 i TMI uzoraka najveći uticaj ima sadržaj inulina i njegove interakcije sa proteinima mleka. Zbog multikomponentnog sastava, 0,1% rastvori IE i TMIE uzoraka su pokazali dobra emulgujuća svojstva. Međutim, dalje povećanje sadržaja uzoraka u rastvoru (0,5% i 1%) je uticalo na smanjenje EAI i ESI vrednosti, što rezultira slabijim emulgujućim svojstvima. Svi TMIE rastvori su pokazali loša peniva svojstva, a formirane pene bile su rastresite sa velikim mehurima vazduha, dok IE rastvori uopšte nisu pokazali peniva svojstva. Sumirajući dobijene rezultate, predložen je šematski prikaz distribucije 0,1% rastvora TM, TMI, TMIE3 i IE uzoraka na površinama ulje/voda i vazduh/voda. Konačno, višekomponentni TMIE prahovi se odlikuju pozitivnim sinergizmom proteina, inulina i fenolnih jedinjenja, što potencijalno klasifikuju ove prahove kao nove funkcionalne aditive ili suplemente.

Jogurti sa ekstraktom semenke, koji su fermentisani sa starterom i odabranim *L.plantarum* sojem su pokazali dobra teksturalna i senzorna svojstva, a njihovi liofilisani prahovi najbolja antioksidativna i emulgujuća svojstva, u poređenju sa drugim analiziranim jogurtima. U jogurtima i liofilisanim jogurtima koji su fermentisani samo sa *L.plantarum*-om nije primećena proteolitička aktivnost. ATR-FTIR i Raman spektorskopija različito grupišu uzorke liofilisanih jogurta u amid regionima, što se objašnjava različitim vibracionim karakteristikama biomolekula. Međutim, ove dve vibracione tehnike se idealno dopunjuju u interpretaciji rezultata multikomponentnih uzoraka, i konkretno na ovim model uzorcima zbog specifičnih grupisanja/odvajanja u analiziranim

regionima: (1) ukazuju na specifične interakcije između potencijalno prisutnih egzopolisaharida i proteina, kao i fenolnih jedinjenja i proteina; (2) prate uticaj mikrobnih kultura i njihov afinitet prema pojedinačnim makrokonstituentima (lipidima i proteinima). Stoga je pokazana veza između ATR-FTIR odvajanja i rezultata senzorne analize koja ukazuje na lipolitičku aktivnost korišćenog *L.plantarum* soja. UHPLC-DAD MS/MS analiza ukazuje na potencijalnu enzimsku degradaciju galne kiseline. Međutim ove rezultate treba dodatno potvrditi u budućim istraživanjima. Na SEM slikama se mogu uočiti potencijalni filamenti egzopolisaharida koje luče bakterije. Ovi filamenti su odsutni kod liofilisanih jogurta sa dodatkom ekstrakta. Pored toga, čini se da u uslovima fermentacije *L.plantarum* potencijalno sintetiše i kapsularno vezane i filamentozne egzopolisaharide što direktno utiče na teksturalna svojstva jogurata. Svi liofilisani jogurti koji su fermentisani sa *L.plantarum*-om su pokazali visoku vijabilnost ćelija (>10^8 CFU/g SM), pa se ovi prahovi mogu smatrati potencijalno probiotičkim proizvodima. Štaviše, najveći broj vijabilnih bakterija je nađen u liofilisanom prahu sa ekstraktom koji je primarno fermentisan starterom i *L.plantarum*-om, čak $2{,}86 \cdot 10^9$ CFU/g SM.

4. U uslovima ***simulirane in vitro gastrointestinalne digestije***, ekstrakti pokožice i semenke grožđa pokazali su različito ponašanje, što je najverovatnije uslovljeno različitim sastavom polifenolnih jedinjenja koji su prisutni u ekstraktima. Glavna fenolna jedinjenja u polaznim ekstraktima pokožice i semenke grožđa su fenolne kiseline i flavonoli, odnosno fenolne kiseline i flavan-3-oli. Biodostupnost ukupnih fenolnih jedinjenja, izuzev flavan-3-oli, iz ekstrakta semenke je bilo skoro dva puta manje nakon digestije, u poređenju sa ekstraktom pokožice grožđa, što bi se moglo objasniti oslobađanjem hidroksicimetnih kiselina (kofeinske i p-kumarinske), iz ekstrakta pokožice grožđa. Značajan gubitak procijanidina i flavan-3-ola, sa biodostupnočću od samo 0,23% je potvrđen nakon *in vitro* digestije ekstrakta semenke, zbog njihove snažne sposobnosti da reaguju i da se vezuju za komponente digestivnog koktela. Dodatak i mešanje matriksa hrane sa ekstraktom pokožice grožđa nije značajno uticalo na biodostupnost glavnih polifenola iz pokožice, u poređenju sa njihovom digestijom bez matriksa hrane, ali je biodostupnost glavnih klasa polifenola bila značajno niža zbog značajnog doprinosa polifenola poreklom iz matriksa hrane na ukupnu količinu fenolnih jedinjenja u uzorku pre digestije. Sa druge strane, dodavanje i mešanje matriksa hrane sa ekstraktom semenke povećalo je biodotupnost procijanidina, flavan-3-ola i ostalih polifenola u poređenju sa njihovom digestijom bez matriksa hrane, što je u skladu sa biodostupnošću flavonoida. Ukupna biodostupnost fenolnih jedinjenja iz ekstrakta pokožice i semenke u prisustvu matriksa na bazi mesa i žitarica je bilo 44,1% i 50,9%. Pored toga, *in vitro* digestija je značajno povećala ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja kod oba ekstrakta grožđa (pokožica i semenka) nakon digestije sa matriksom hrane, u poređenju sa kontrolom digestije (nulto vreme digestije), što bi se osim oslobođenih fenolnih jedinjenja, redukujućih šećera i aminokiselina, moglo pripisati značajnim redukcionim svojstvima drugih sastojaka matriksa hrane, poput hidrolizata proteina mesa. Takođe je primećen je značajan uticaj jedinjenja poreklom iz matriksa hrane na antioksidativna svojstva ekstrakata grožđa: smanjena je redukujuća moć, dok su kapacitet heliranja i sposobnost uklanjanja $ABTS^{\bullet+}$ radikala značajno porasli, čemu verovatno doprinose hidrolizati proteina mesa i karnozin. Porast antioksidativnih aktivnosti digeriranih ekstrakata komine u prisustvu matriksa hrane bio je izraženiji za ekstrakt pokožice nego za ekstrakt semenke. Glavni razlog bio je visok kapacitet vezivanja flavan-3-ola sa matriksom hrane i komponentama digestivnog koktela koje poseduju antioksidativnu aktivnost. Važna karakteristika uočena u ovoj studiji, koju ne treba zanemariti, je značajan doprinos digestivnog koktela i jedinjenja matriksa hrane na ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja i antioksidativnu aktivnost. Ovaj rezultat bi trebalo detaljno proučiti u budućnosti, jer se *in vitro* modeli sve više koriste u istraživanju ponašanja specifičnih sastojaka hrane. Ova studija sugeriše da bi obogaćivanje proizvoda na bazi mesa i žitarica sa polifenolnim ekstraktima komine mogla biti dobra strategija za formulisanje zdravije ishrane. Međutim, potrebne su dalje detaljne studije, posebno da bi se razjasnilo kako se ovaj pristup odražava na stvaranje lipidnih hidroperoksida, krajnjih proizvoda lipooksidacije tokom gastrointestinalne digestije i digestije konstituenata hrane. Ravnoteža između

inhibitornih efekata polifenola na digestiju sastojaka hrane i njihovih korisnih antioksidativnih efekata se treba uzeti u obzir pri razvoju novih funkcionalnih prehrambenih proizvoda.

Biodostupnost fenolnih jedinjenja ekstrakta semenki u prisustvu termički tretiranog kozijeg mleka (proteinskog matriksa) je bilo 18,11%. Značajno manje iskorišćenje fenolnih jedinjenja je potvrđeno u prisustvu kompleksnog matriksa koji uključuje proteine kozijeg mleka i inulin, samo 6,03%. Nisko ili odsustvo biodostupnosti ukupnih i pojedinačnih fenolnih jedinjenja može biti posledica njihove smanjene stabilnosti i transformacije u intestinalnom fluidu ili posledica zadržavanja u nerastvornoj frakciji, koja može potencijalno biti dostupna za oslobađanje u fazi debelog creva. Elektroforetskom analizom rastvorljive frakcije je pokazano potpuno odsustvo polipeptidnih traka poreklom od digeriranih proteina kozijeg mleka, kod oba analizirana matriksa, što znači da su se tokom *in vitro* gastrointestinalne digestije oslobodili mali peptidi i aminokiseline. Sa druge strane, biodostupnost fenolnih jedinjenja u prisustvu inulina je bilo značajno više u poređenju sa proteinskim matriksima (43,26%), čemu najviše doprinosi biodostupnost katehina, čak 64,13%. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da se u prisustvu inulina većina fenolnih jedinjenja oslobodi u intestinalnoj fazi, dok su u prisustvu proteinskih matriksa većina fenolnih jedinjenja ostala u nerastvornoj frakciji, što ih potencijalno čini dostupnim u „colon“ fazi. Ovo treba dodatno ispitati u budućim *in vitro* istraživanjima koja bi uključivala „colon“ fazu. Svi primenjeni antioksidativni testovi (osim FCC) su pokazali više vrednosti u digeriranim TME i TMIE uzorcima, u poređenju sa digeriranim TM uzorkom, što ukazuje na dobru antioksidativnu aktivnost biodostupnih fenolnih jedinjenja. Digestivni koktel je takođe pokazao antioksidativni potencijal, što treba uzeti u obzir pri tumačenju ovih rezultata. Imajući u vidu doprinos digestivnog koktela na antioksidativna svojstva uzoraka, pokazalo se da digerirani TME uzorak koji sadrži digestivni koktel ima smanjenu TAC (za 34,56%) i FRP (za 30,45%) aktivnost, u poređenju sa nedigeriranim uzorkom, dok su kod digeriranih TMIE i IE uzoraka vrednosti za sva ispitivana antioksidativna svojstva bila manja, u poređenju sa dobijenim vrednostima za njihove nedigerirane uzorke. Ovo smanjenje antioksidativnih svojstava može biti zbog niske biodostupnosti fenolnih jedinjenja i njihove degradacije i transformacije tokom digestije. Međutim, ovo se može smatrati korisnim, jer se fenolna jedinjenja zadržana u nerastvornoj frakciji digeriranih TME i TMIE uzoraka mogu osloboditi u „colon“ fazi i ispoljiti svoja antioksidativna svojstva. Ove model studije za procenu biodostupnosti fenolnih jedinjenja u prisustvu različitih matriksa, predstavljaju osnov za procenu funkcionalnosti fenolnih jedinjenja.

6. Reference

Abd El-Fattah, A., Azzam, M., Elkashef, H., & Elhadydy, A. (2020). Antioxidant properties of milk: Effect of milk species, milk fractions and heat treatments. *International Journal of Dairy Science, 15*, 1-9. 10.3923/ijds.2020.1.9

Abdrabba, S., & Hussein, S. (2015). Chemical composition of pulp, seed and peel of red grape from Libya. *Global Journal of Scientific Researches, 3(2),* 6-11. E-ISSN: 2311-723X. http://blue-ap.com/j/Global_Journal_of_Scientific_Researches/Issue-Volume%203%20(2015)-Issue%2002

Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Uribe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry, 152*, 46-55. 10.1016/j.foodchem.2013.11.093

Acun, S., & Gül, H. (2014). Effects of grape pomace and grape seed flours on cookie quality. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 6(1),* 81-88. 10.3920/QAS2013.0264

Aghamirzaei, M., Peighambardoust, S. H., Azadmard-Damirchi, S., & Majzoobi, M. (2015). Effects of grape seed powder as a functional ingredient on flour physicochemical characteristics and dough rheological properties. *Journal of Agricultural Science and Technology, 17*, 365-373.

Aguilar, C. N., & Gutierrez-Sanchez, G. (2001). Review: Sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. *Food Science and Technology International, 7(5),* 373-382. 10.1106/69M3-B30K-CF7Q-R

Aksoylu, Z., Çağındı, Ö., & Köse, E. (2015). Effects of blueberry, grape seed powder and poppy seed incorporation on physicochemical and sensory properties of biscuit. *Journal of Food Quality, 38(3),* 164-174. 10.1111/jfq.12133

Alaimo, M. H., Farrell, H. M., & Germann, M. W. (1999). Conformational analysis of the hydrophobic peptide α_{s1}-casein(136–196). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1431*, 410-420. 10.1016/S0167-4838(99)00061-8

Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science, 4*, 200-214. 10.1016/j.crfs.2021.03.011

Aliakbarian, B., Casale, M., Paini, M., Casazza, A. A., Lanteri, S., & Perego, P. (2015). Production of a novel fermented milk fortified with natural antioxidants and its analysis by NIR spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology, 62(1, Part 2),* 376-383. 10.1016/j.lwt.2014.07.037

Almaas, H., Cases, A.-L., Devold, T. G., Holm, H., Langsrud, T., Aabakken, L., Aadnoey, T., Vegarud, G. E. (2006). *In vitro* digestion of bovine and caprine milk by human gastric and duodenal enzymes. *International Dairy Journal, 16(9),* 961-968. 10.1016/j.idairyj.2005.10.029

Almeida, M. R., de Oliveira, K., Stephani, R., & de Oliveira, L. F. (2011). Fourier-transform Raman analysis of milk powder: A potential method for rapid quality screening. *Journal of Raman Spectroscopy, 42*, 1548-1552. 10.1002/jrs.2893

Alminger, M., Aura, A.-M., Bohn, T., Dufour, C., El, S. N., Gomes, A., Karakaya, S., Martínez-Cuesta, M. C., McDougall, G. J., Requena, T., & Santos, C. N. (2014). *In vitro* models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 13*, 413-436. 10.1111/1541-4337.12081

Alyaqoubi, S., Abdullah, A., & Addai, Z. R. (2014). Antioxidant activity of goat's milk from three different locations in Malaysia. AIP Conference Proceedings, 1614, 198. 10.1063/1.4895195

Amico, V., Napoli, E. M., Renda, A., Ruberto, G., Spatafora, C., & Tringali, C. (2004). Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar `Nerello Mascalese'. *Food Chemistry, 88*(4), 599-607. 10.1016/j.foodchem.2004.02.022

Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A-L., & Haroutounian, S. A. (2012). Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their *in vitro* antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology, 48*(2), 316-322. 10.1016/j.lwt.2012.04.006

Anema, S. G. (2021). Heat-induced changes in caseins and casein micelles, including interactions with denatured whey proteins. *International Dairy Journal, 122*, 105136. 10.1016/j.idairyj.2021.105136

Anema, S. G., & Klostermeyer, H. (1996). ζ-Potentials of casein micelles from reconstituted skim milk heated at 120°C. *International Dairy Journal, 6(7),* 673-687. 10.1016/0958-6946(95)00070-4

Antonić, B., Jančíková, S., Dordević, D., & Tremlová, B. (2020). Grape pomace valorization: A systematic review and meta-analysis. *Foods, 9*(11), 1627. 10.3390/foods9111627

Antoniolli, A., Fontana, A. R., Piccoli, P., & Bottini, R. (2015). Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chemistry, 178,* 172-178. 10.1016/j.foodchem.2015.01.082

Antunes-Ricardo, M., Rodríguez-Rodríguez, C., Gutiérrez-Uribe, J. A., Cepeda-Cañedo, E., & Serna-Saldívar, S. O. (2017). Bioaccessibility, intestinal permeability and plasma stability of isorhamnetin glycosides from *Opuntia ficus-indica* (L.). *International Journal of Molecular Sciences, 18,* 1816. 10.3390/ijms18081816

AOAC. (1995). Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fibre in Foods, Method 991.43, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA, USA.

AOAC. (1999). Acidity (titratable) of fruit products, Method 942.15. Gaithersburg, MD.

Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry, 73*(2), 239-244. 10.1016/S0308-8146(00)00324-1

Arnous, A., & Meyer, A. S. (2008). Comparison of methods for compositional characterization of grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins. *Food and Bioproducts Processing, 86*(2), 79-86. 10.1016/j.fbp.2008.03.004

Augustine, S., Kudachikar, V. B., Vanajakshi, V., & Ravi, R. (2013). Effect of combined preservation techniques on the stability and microbial quality and retention of anthocyanins in grape pomace stored at low temperature. *Journal of Food Science and Technology, 50*(2), 332-338. 10.1007/s13197-011-0325-0

Axten, L. G., Wohlers, M. W., & Wegrzyn, T. (2008). Using phytochemicals to enhance health benefits of milk: Impact of polyphenols on flavor profile. *Journal of Food Science, 73*(6), H122-126. 10.1111/j.1750-3841.2008.00808.x

Ayed, N., Yu, H.-L., & Lacroix, M. (1999). Improvement of anthocyanin yield and shelf-life extension of grape pomace by gamma irradiation. *Food Research International, 32,* 539-543. 10.1016/S0963-9969(99)00124-6

Bachtarzi, N., Speciale, I., Kharroub, K., De Castro, C., Ruiz, L., & Ruas-Madiedo, P. (2020). Selection of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum)* isolated from Algerian fermented foods for the manufacture of skim-milk fermented products. *Microorganisms,* 8(8), 1101. 10.3390/microorganisms8081101

Bai, L., Huan, S., Li, Z., & McClements, D. J. (2017). Comparison of emulsifying properties of food-grade polysaccharides in oil-in-water emulsions: Gum arabic, beet pectin, and corn fiber gum. *Food Hydrocolloids, 66,* 144-153. 10.1016/j.foodhyd.2016.12.019

Bandyopadhyay, P., Ghosh, A. K., & Ghosh, C. (2012). Recent developments on polyphenol–protein interactions: Effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system. *Food & Function, 3*(6), 592-605. 10.1039/c2fo00006g.

Barać, M., Pešić, M., Vučić, T., Vasić, M., & Smiljanić, M. (2017). White cheeses as a potential source of bioactive peptides. *Mljekarstvo, 67*(1), 3-16. 10.15567/mljekarstvo.2017.0101

Barac, M., Pesic, M., Zilic, S., Smiljanic, M., Sredovic Ignjatovic, I., Vucic, T., Kostic, A., Milincic, D. (2019). The Influence of milk type on the proteolysis and antioxidant capacity of white-brined cheese manufactured from high-heat-treated milk pretreated with chymosin. *Foods, 8*(4), 128. 10.3390/foods8040128

Barac, M., Pešić, M., Žilić, S., Smiljanic, M., Stanojevic, S., Vasic, M., Despotovic, S., Vucic, T., Kostic, A. (2016). Protein profiles and total antioxidant capacity of water-soluble and water-insoluble fractions of white brined goat cheese at different stages of ripening. *International Journal of Food Science & Technology, 51,* 1140-1149. 10.1111/ijfs.13091

Barać, M. B., Smiljanić, M., Pešić, M. B., Stanojević, S. P., Jovanović, S. T, & Macej, O. D. (2013). Primary proteolysis of white brined goat cheese monitored by high molarity Tris buffer SDS- PAGE system. *Mljekarstvo / Dairy, 63*(3), 122-131. ISSN: 0026-704X

Barać, M., Smiljanić, M., Žilić, S., Pešić, M., Stanojević, S., Vasić, M., & Vučić, T. (2016). Protein profiles and total antioxidant capacity of water soluble and insoluble protein fractions of white cow cheese at different stage of ripening. *Mljekarstvo, 66*(3), 187-197. 10.15567/mljekarstvo.2016.0303

Barat, A., & Ozcan, T. (2017). Growth of probiotic bacteria and characteristics of fermented milk containing fruit matrices. *International Journal of Dairy Technology, 71*(S1), 120-129. 10.1111/1471-0307.12391

Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., & Orlien, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science & Technology, 49*, 96-109. 10.1016/j.tifs.2016.01.006

Barbé, F., Ménard, O., Le Gouar, Y., Buffière, C., Famelart, M.-H., Laroche, B., Le Feunteun, S., Dupont, D., & Rémond, D. (2013). The heat treatment and the gelation are strong determinants of the kinetics of milk proteins digestion and of the peripheral availability of amino acids. *Food Chemistry, 136*(3), 1203-1212. 10.1016/j.foodchem.2012.09.022

Baydar, N. G., & Akkurt, M. (2001). Oil content and oil quality properties of some grape seeds. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 25*(3), 163-168.

Baydar, N. G., Özkan, G., & Çetin, E. S. (2007). Characterization of grape seed and pomace oil extracts. *Grasas y Aceites, 58*(1), 29-33. 10.3989/gya.2007.v58.i1.5

Bender, A. B. B., Speroni, C. S., Salvador, P. R., Loureiro, B. B., Lovatto, N. M., Goulart, F. R., Lovatto, M. T., Miranda, M. Z., Silva, L. P., & Penna, N. G. (2017). Grape pomace skins and the effects of its inclusion in the technological properties of muffins. *Journal of Culinary Science & Technology, 15*(2), 143-157. 10.1080/15428052.2016.1225535

Benevides, J. M., Overman, S. A., & Thomas, G. J., Jr. (2004). Raman spectroscopy of proteins. *Current Protocols in Protein Science, Chapter 17*, 17.8.1-17.8.35. 10.1002/0471140864.ps1708s33

Beres, C., Costa, G. N. S., Cabezudo, I., da Silva-James, N. K., Teles, A. S. C., Cruz, A. P. G., Mellinger-Silva, C., Tonon, R. V., Cabral, L. M. C., & Freitas, S. P. (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Management, 68*, 581-594. 10.1016/j.wasman.2017.07.017

Beres, C., Freitas, S. P., de Oliveira Godoy, R. L., de Oliveira, D. C. R., Deliza, R., Iacomini, M., Mellinger-Silva, C., & Cabral, L. M. C. (2019). Antioxidant dietary fibre from grape pomace flour or extract: Does it make any difference on the nutritional and functional value?. *Journal of Functional Foods, 56*, 276-285. 10.1016/j.jff.2019.03.014

Beres, C., Simas-Tosin, F. F., Cabezudo, I., Freitas, S. P., Iacomini, M., Mellinger-Silva, C., & Cabral, L. M. C. (2016). Antioxidant dietary fibre recovery from Brazilian *Pinot noir* grape pomace. *Food Chemistry, 201*, 145-152. 10.1016/j.foodchem.2016.01.039

Bergillos-Meca, T., Cabrera-Vique, C., Artacho, R., Moreno-Montoro, M., Navarro-Alarcón, M., Olalla, M., Giménez, R., Seiquer, I., & Ruiz-López, M. D. (2015). Does *Lactobacillus plantarum* or ultrafiltration process improve Ca, Mg, Zn and P bioavailability from fermented goats' milk?. *Food Chemistry, 187*, 314-321. 10.1016/j.foodchem.2015.04.051

Bermúdez-Soto, M.-J., Tomás-Barberán, F.-A., & García-Conesa, M.-T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry, 102*(3), 865-874. 10.1016/j.foodchem.2006.06.025

Bernardes, A. L., Moreira, J. A., das Graças Vaz Tostes, M., Costa, N. M. B., Silva, P. I., & Costa, A. G. V. (2019). *In vitro* bioaccessibility of microencapsulated phenolic compounds of jussara (*Euterpe edulis* Martius) fruit and application in gelatine model-system. *LWT-Food Science and Technology, 102*, 173-180. 10.1016/j.lwt.2018.12.009

Beveridge, T. H. J., Girard, B., Kopp, T., & Drover, J. C. G. (2005). Yield and composition of grape seed oils extracted by supercritical carbon dioxide and petroleum ether: Varietal effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(5), 1799-1804. 10.1021/jf040295q

Bindon, K., Myburgh, P., Oberholster, A., Roux, K., & Du Toit, C. (2011). Response of grape and wine phenolic composition in *Vitis vinifera* L. cv. Merlot to variation in grapevine water status. *South African Journal of Enology and Viticulture, 32*, 71-88. 10.21548/32-1-1368

Blanch, M., Sanchez-Ballesta, M. T., Escribano, M. I., & Merodio, C. (2011). Fructo-oligosaccharides in table grapes and response to storage. *Food Chemistry, 129*(3), 724-730. 10.1016/j.foodchem.2011.05.011

Blessington, T., Nzaramba, M. N., Scheuring, D. C., Hale, A. L., Reddivari, L., & Miller, J. C. (2010). Cooking methods and storage treatments of potato: Effects on carotenoids, antioxidant activity, and phenolics. *American Journal of Potato Research, 87*(6), 479-491. 10.1007/s12230-010-9150-7

Bombai, G., Pasini, F., Verardo, V., Sevindik, O., Di Foggia, M., Tessarin, P., Bregoli, A. M., Taddei, P., Caboni, M. F., & Rombolà, A. D. (2017). Monitoring of compositional changes during berry ripening in grape seed extracts of cv. Sangiovese (*Vitis vinifera* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture, 97*(9), 3058-3064. 10.1002/jsfa.8151

Bordiga, M., Montella, R., Travaglia, F., Arlorio, M., & Coïsson, J. D. (2019). Characterization of polyphenolic and oligosaccharidic fractions extracted from grape seeds followed by the evaluation of prebiotic activity related to oligosaccharides. *International Journal of Food Science & Technology, 54*(4), 1283-1291. 10.1111/ijfs.14109

Boyer, J., Brown, D., & Liu, R. H. (2005). *In vitro* digestion and lactase treatment influence uptake of quercetin and quercetin glucoside by the Caco-2 cell monolayer. *Nutrition journal, 4*, 1. 10.1186/1475-2891-4-1.

Božunović, J., Živković, S., Gašić, U., Glamočlija, J., Ćirić, A., Matekalo, D., Šiler, B., Soković, M., Tešić, Ž., & Mišić, D. (2018). *In vitro* and *in vivo* transformations of *Centaurium erythraea* secoiridoid glucosides alternate their antioxidant and antimicrobial capacity. *Industrial Crops and Products, 111*, 705-721. 10.1016/j.indcrop.2017.11.040

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry, 72*, 248-254. 10.1006/abio.1976.9999

Braga, A. R. C., Murador, D. C., de Souza Mesquita, L. M., & de Rosso, V. V. (2018). Bioavailability of anthocyanins: Gaps in knowledge, challenges and future research. *Journal of Food Composition and Analysis, 68*, 31-40. 10.1016/j.jfca.2017.07.031

Braga, G. C., Melo, P. S., Bergamaschi, K. B., Tiveron, A. P., Massarioli, A. P., & de Alencar, S. M. (2016). Extraction yield, antioxidant activity andphenolics from grape, mango and peanut agro-industrial by-products. *Ciência Rural, 46*(8), 1498-1504. 10.1590/0103.8478cr20150531

Brahmi, F., Merchiche, F., Mokhtari, S., Smail, L., Ghemghar-Haddadi, H., Yalaoui-Guellal, D., Achat, S., Elsebai, M. F., Madani, K., & Boulekbache, L. (2020). Optimization of some extraction parameters of phenolic content from apple peels and grape seeds and enrichment of yogurt by their powders: A comparative study. *Journal of Food Processing and Preservation, 45*(2), e15126. 10.1111/jfpp.15126

Bravo, L., & Mateos, R. (2008). Analysis of flavonoids in functional foods and nutraceuticals. In Jeffrey Hurst, W. (Ed.), Method of analysis for functional foods and nutraceuticals, 2nd edition, 552. CRC Press. 10.1201/9781420007152

Brenes, A., Viveros, A., Chamorro, S., & Arija, I. (2016). Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Animal Feed Science and Technology, 211*, 1-17. 10.1016/j.anifeedsci.2015.09.016

Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A. R., Martins, C., Marze, S., McClemonts, D. J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C. N., Souchon, I., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W., & Recio, I. (2019). INFOGEST

static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols, 14*(4), 991-1014. 10.1038/s41596-018-0119-1

Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Carocho, M., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Fortification of yogurts with different antioxidant preservatives: A comparative study between natural and synthetic additives. *Food Chemistry, 210*, 262-268. 10.1016/j.foodchem.2016.04.114

Carullo, G., Spizzirri, U. G., Loizzo, M. R., Leporini, M., Sicari, V., Aiello, F., & Restuccia, D. (2020). Valorisation of red grape (*Vitis Vinifera* cv. Sangiovese) pomace as functional food ingredient. *Italian Journal of Food Science, 32*(2), 367-385. 10.14674/IJFS-1758

Cavin, J.-F., Barthelmebs, L., Guzzo, J., Van Beeumen, J., Samyn, B., Travers, J.-F., & Diviès, C. (1997). Purification and characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiology Letters, 147*(2), 291-295. 10.1111/j.1574-6968.1997.tb10256.x

Cebeci, F., & Şahin-Yeşilçubuk, N. (2014). The matrix effect of blueberry, oat meal and milk on polyphenols, antioxidant activity and potential bioavailability. *International Journal of Food Sciences and Nutrition, 65*(1), 69-78. 10.3109/09637486.2013.825699

Chamorro, S., Viveros, A., Alvarez, I., Vega, E., & Brenes, A. (2012). Changes in polyphenol and polysaccharide content of grape seed extract and grape pomace after enzymatic treatment. *Food Chemistry, 133*(2), 308-314. 10.1016/j.foodchem.2012.01.031

Chan, K. M., Decker, E. A., & Feustman, C. (1994). Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 34*(4), 403-426. 10.1080/10408399409527669

Chen, G.-L., Chen, S.-G., Chen, F., Xie, Y.-Q., Han, M.-D., Luo, C.-X., Zhao, Y.-Y., Gao, Y.-Q. (2016). Nutraceutical potential and antioxidant benefits of selected fruit seeds subjected to an *in vitro* digestion. *Journal of Functional Foods, 20*, 317-331. 10.1016/j.jff.2015.11.003

Chen, H., Zheng, H., Brennan, M. A., Chen, W., Guo, X., & Brennan, C. S. (2020). Effect of black tea infusion on physicochemical properties, antioxidant capacity and microstructure of acidified dairy gel during cold storage. *Foods, 9*(6), 831. 10.3390/foods9060831

Chen, L., Zhang, Q., Ji, Z., Guowei, S., & Chen, H. (2018). Production and fermentation characteristics of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides of goat milk fermented by a novel wild *Lactobacillus plantarum* 69. *LWT-Food Science and Technology, 91*, 532-540. 10.1016/j.lwt.2018.02.002

Chen, Y., Hu, J., Yi, X., Ding, B., Sun, W., Yan, F., Wei, S., & Li, Z. (2018). Interactions and emulsifying properties of ovalbumin with tannic acid. *LWT-Food Science and Technology,, 95*, 282-288. 10.1016/j.lwt.2018.04.088

Chen, Y., Wen, J., Deng, Z., Pan, X., Xie, X., & Peng, C. (2020). Effective utilization of food wastes: Bioactivity of grape seed extraction and its application in food industry. *Journal of Functional Foods, 73*, 104113. 10.1016/j.jff.2020.104113

Cheng, Z., Moore, J., & Yu, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54*(20), 7429-7436. 10.1021/jf0611668

Chouchouli, V., Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Karvela, E., Makris, D. P., & Karathanos, V. T. (2013). Fortification of yoghurts with grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *LWT - Food Science and Technology, 53*(2), 522-529. 10.1016/j.lwt.2013.03.008

Chowdhary, P., Gupta, A., Gnansounou, E., Pandey, A., & Chaturvedi, P. (2021). Current trends and possibilities for exploitation of Grape pomace as a potential source for value addition. *Environmental Pollution, 278*, 116796. 10.1016/j.envpol.2021.116796

Cilla, A., González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F., Espín, J. C., & Barberá, R. (2009). Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Food Chemistry, 114*, 813-820. 10.1016/j.foodchem.2008.10.019

Cilla, A., Perales, S., Lagarda, M. J., Barberá, R., Clemente, G., & Farré, R. (2011). Influence of storage and *in vitro* gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity of fruit beverages. *Journal of Food Composition and Analysis, 24*(1), 87-94. 10.1016/j.jfca.2010.03.029

Ćirković, D., Matijašević, S., Deletić, N., Ćirković, B., Gašić, U., Sredojević, M., Jovanović, Z., Djurić, V., & Tešić, Ž. (2019). The effect of early and late defoliation on phenolic composition and antioxidant properties of Prokupac variety grape berries (*Vitis vinifera* L.). *Agronomy, 9*(12), 822. 10.3390/agronomy9120822.

Cirkovic Velickovic, T. D., & Stanic-Vucinic, D. J. (2018). The role of dietary phenolic compounds in protein digestion and processing technologies to improve their antinutritive properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 17*(1), 82-103. 10.1111/1541-4337.12320

Coelho, M. C., Pereira, R. N., Rodrigues, A. S., Teixeira, J. A., & Pintado, M. E. (2020). The use of emergent technologies to extract added value compounds from grape by-products. *Trends in Food Science & Technology, 106*, 182-197. 10.1016/j.tifs.2020.09.028

Corbin, K. R., Hsieh, Y. S. Y., Betts, N. S., Byrt, C. S., Henderson, M., Stork, J., DeBolt, S., Fincher, G. B., Burton, R. A. (2015). Grape marc as a source of carbohydrates for bioethanol: Chemical composition, pre-treatment and saccharification. *Bioresource Technology, 193*, 76-83. 10.1016/j.biortech.2015.06.030

Corrêa, R. C. G., Haminiuk, C. W. I., Barros, L., Dias, M. I., Calhelha, R. C., Kato, C. G., Correa, V. G., Peralta, R. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Stability and biological activity of Merlot (*Vitis vinifera*) grape pomace phytochemicals after simulated *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation. *Journal of Functional Foods, 36*, 410-417. 10.1016/j.jff.2017.07.030

Corredig, M., & Dalgleish, D. G. (1999). The mechanisms of the heat-induced interaction of whey proteins with casein micelles in milk. *International Dairy Journal, 9*, 233-236. 10.1016/S0958-6946(99)00066-7

Corsetti, A., & Valmorri, S. (2011). Lactic Acid Bacteria, *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum*. In Fuquay, J. W. (Ed.). Encyclopedia of dairy sciences, 2nd edition, (pp. 111-118). Academic Press. ISBN 9780123744074

Cruz, A. G., Cavalcanti, R. N., Guerreiro, L. M. R., Sant'Ana, A. S., Nogueira, L. C., Oliveira, C. A. F., Deliza, R., Cunha, R. L., Faria, J. A. F., & Bolini, H. M. A. (2013). Developing a prebiotic yogurt: Rheological, physico-chemical and microbiological aspects and adequacy of survival analysis methodology. *Journal of Food Engineering, 114*(3), 323-330. 10.1016/j.jfoodeng.2012.08.018

Ćujić-Nikolić, N., Stanisavljević, N., Šavikin, K., Kalušević, A., Nedović, V., Samardžić, J., & Janković, T. (2019). Chokeberry polyphenols preservation using spray drying: effect of encapsulation using maltodextrin and skimmed milk on their recovery following *in vitro* digestion. *Journal of Microencapsulation, 36*(8), 693-703. 10.1080/02652048.2019.1667448

Ćurko, N., Kovačević Ganić, K., Gracin, L., Đapić, M., Jourdes, M., & Teissedre, P. L. (2014). Characterization of seed and skin polyphenolic extracts of two red grape cultivars grown in Croatia and their sensory perception in a wine model medium. *Food Chemistry, 145*, 15-22. 10.1016/j.foodchem.2013.07.131

Cutrim, C. S., & Cortez, M. A. (2018). A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology, 71*(3), 564-578. 10.1111/1471-0307.12515

Czamara, K., Majzner, K., Pacia, M. Z., Kochan, K., Kaczor, A., & Baranska, M. (2015). Raman spectroscopy of lipids: a review. *Journal of Raman Spectroscopy, 46*(1), 4-20. 10.1002/jrs.4607

da Silva Dantas, D. L., Viera, V. B., Soares, J. K. B., dos Santos, K. M. O., do Egito, A. S., de Figueirêdo, R. M. F., dos Santos Lima, M., Machado, N. A. F., de Souza, M. F. V., da Conceição, M. L., de Cássia Ramos do Egypto Queiroga, R., & de Oliveira, M. E. G. (2022). *Pilosocereus gounellei* (xique-xique) flour: Improving the nutritional, bioactive, and technological properties of probiotic goat-milk yogurt. *LWT-Food Science and Technology, 158*, 113165. 10.1016/j.lwt.2022.113165

da Silva Haas, I. C., Toaldo, I. M., Gomes, T. M., Luna, A. S., de Gois, J. S., & Bordignon-Luiz, M. T. (2019). Polyphenolic profile, macro- and microelements in bioaccessible fractions of grape juice sediment using *in vitro* gastrointestinal simulation. *Food Bioscience, 27*, 66-74. 10.1016/j.fbio.2018.11.002

Dabetic, N., Todorovic, V. M., Djuricic, I. D., Antic Stankovic, J. J., Basic, Z. N., Vujovic, D. S., & Sobajic, S. S. (2020). Grape seed oil characterization: A novel approach for oil quality assessment. *European Journal of Lipid Science and Technology, 122*, 1900447. 10.1002/ejlt.201900447

Dabetić, N., Todorović, V., Panić, M., Radojčić Redovniković, I., & Šobajić, S. (2020). Impact of deep eutectic solvents on extraction of polyphenols from grape seeds and skin. *Applied Sciences, 10*(14), 4830. 10.3390/app10144830

Dabija, A., Oroian, M. A., Mironeasa, S., & Sidor, A. M. (2018). Physicochemical and sensory properties of yogurt with seabuckthorn powder, rosehip powder and grape seed powder extract during storage. *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM: Surveying Geology & mining Ecology Management, 18*, 429–436. 10.5593/sgem2018/6.2/S25.057

Dalgleish, D. G. (1997). Adsorption of protein and the stability of emulsions. *Trends in Food Science & Technology, 8*(1), 1-6. 10.1016/S0924-2244(97)01001-7

Dalgleish, D. G. (2006). Food emulsions—their structures and structure-forming properties. *Food Hydrocolloids, 20*(4), 415-422. 10.1016/j.foodhyd.2005.10.009

Dalgleish, D. G. (2014). Chapter 3 - The basis of structure in dairy-based foods: Casein micelles and their properties. In Boland, M., Golding, M., & Singh, H. (Ed.). Food Structures, digestion and health (pp. 83-105). Academic Press. 10.1016/B978-0-12-404610-8.00003-7

Dalgleish, D. G., & Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology, 3*, 449-467. 10.1146/annurev-food-022811-101214

Damodaran, S. (2005). Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of food science, 70*(3), R54-R66. 10.1111/j.1365-2621.2005.tb07150.x

Dan, T., Chen, H., Li, T., Tian, J., Ren, W., Zhang, H., & Sun, T. (2019). Influence of *Lactobacillus plantarum* P-8 on fermented milk flavor and storage stability. *Frontiers in Microbiology, 9*, 3133. 10.3389/fmicb.2018.03133

Das, A. K., Nanda, P. K., Madane, P., Biswas, S., Das, A., Zhang, W., & Lorenzo, J. M. (2020). A comprehensive review on antioxidant dietary fibre enriched meat-based functional foods. *Trends in Food Science & Technology, 99*, 323-336. 10.1016/j.tifs.2020.03.010

de Camargo, A. C., Regitano-d'Arce, M. A. B., Biasoto, A. C. T., & Shahidi, F. (2014). Low molecular weight phenolics of grape juice and winemaking byproducts: Antioxidant activities and inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein cholesterol and DNA strand breakage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62*(50), 12159-12171. 10.1021/jf504185s

de Freitas, V., & Mateus, N. (2011). Formation of pyranoanthocyanins in red wines: A new and diverse class of anthocyanin derivatives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 401*(5), 1463-1473. 10.1007/s00216-010-4479-9

de Gobba, C., Espejo-Carpio, F. J., Skibsted, L. H., & Otte, J. (2014). Antioxidant peptides from goat milk protein fractions hydrolysed by two commercial proteases. *International Dairy Journal, 39*(1), 28-40. 10.1016/j.idairyj.2014.03.015

de la Rosa, L., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-Garcia, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Phenolic Compounds. In Yahia, E., & Carrillo-Lopez, A. (Ed.). Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables, 1st edition. (pp. 253-271). Elsevier Inc. 10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9

de Oliveira, J. B., Egipto, R., Laureano, O., de Castro, R., Pereira, G. E., & Ricardo-da-Silva, J. M. (2019). Climate effects on physicochemical composition of Syrah grapes at low and high altitude sites from tropical grown regions of Brazil. *Food Research International, 121*, 870-879. 10.1016/j.foodres.2019.01.011

de Souza de Azevedo, P. O., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., LeBlanc, J. G., Perego, P., & de Souza Oliveira, R. P. (2018). Production of fermented skim milk supplemented with different grape pomace extracts: Effect on viability and acidification performance of probiotic cultures. *PharmaNutrition, 6*(2), 64-68. 10.1016/j.phanu.2018.03.001

de Souza, J. V., de Oliveira, A. P. D., da Silva Ferrari, I., Miyasato, I. F., de Fátima Carrijo, K., Schwan, R. F., & Dias, F. S. (2020). Autochthonous and commercial cultures with functional properties in goat milk supplemented with licuri fruit. *Food Bioscience, 35*, 100585. 10.1016/j.fbio.2020.100585

da Silva Ferreira, C., de Pinho, M. N., & Cabral, L. M. C. (2013). Solid-liquid extraction and concentration with processes of membrane technology of soluble fibers from wine grape pomace. *Técnico Lisboa*, 1-9.

De Vuyst, L., & Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS *Microbiology Reviews*, 23(2), 153-177. 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00395.x

Demirbüker Kavak, D., Akdeniz, B. (2019). Physicochemical characteristics and antioxidant capacity of traditional yogurt fortified with grape (*Vitis vinifera* L.) seed extract at different levels. *Kocatepe Veterinary Journal, 12(4)*, 389-395. 10.30607/kvj.596784

Demirkol, M., & Tarakci, Z. (2018). Effect of grape (*Vitis labrusca* L.) pomace dried by different methods on physicochemical, microbiological and bioactive properties of yoghurt. *LWT-Food Science and Technology, 97*, 770-777. 10.1016/j.lwt.2018.07.058

Deng, Q., Penner, M. H., & Zhao, Y. (2011). Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research International, 44*(9), 2712-2720. 10.1016/j.foodres.2011.05.026

Deshwal, G. K., Singh, A. K., Kumar, D., & Sharma, H. (2020). Effect of spray and freeze drying on physico-chemical, functional, moisture sorption and morphological characteristics of camel milk powder. *LWT-Food Science and Technology, 134*, 110117. 10.1016/j.lwt.2020.110117

Denkov, N. D. (2004). Mechanisms of Foam Destruction by Oil-Based Antifoams. Langmuir, 20(22), 9463-9505. 10.1021/la049676o

Devesa-Rey, R., Vecino, X., Varela-Alende, J. L., Barral, M. T., Cruz, J. M., & Moldes, A. B. (2011). Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste Management, 31*(11), 2327-2335. 10.1016/j.wasman.2011.06.001

Di Lecce, G., Arranz, S., Jáuregui, O., Tresserra-Rimbau, A., Quifer-Rada, P., & Lamuela-Raventós, R. M. (2014). Phenolic profiling of the skin, pulp and seeds of Albariño grapes using hybrid quadrupole time-of-flight and triple-quadrupole mass spectrometry. *Food Chem, 145*, 874-882. 10.1016/j.foodchem.2013.08.115

Diaz, J. T., Foegeding, E. A., Stapleton, L., Kay, C., Iorizzo, M., Ferruzzi, M. G., & Lila, M. A. (2022). Foaming and sensory characteristics of protein-polyphenol particles in a food matrix. *Food Hydrocolloids, 123*, 107148. 10.1016/j.foodhyd.2021.107148

Dickinson, E. (1999). Caseins in emulsions: interfacial properties and interactions. *International Dairy Journal, 9*(3), 305-312. 10.1016/S0958-6946(99)00079-5

Dickinson, E. (2013). Stabilising emulsion-based colloidal structures with mixed food ingredients. *Journal of the science of food and agriculture*, 93(4), 710-721. 10.1002/jsfa.6013

Dimitrellou, D., Solomakou, N., Kokkinomagoulos, E., & Kandylis, P. (2020). Yogurts supplemented with juices from grapes and berries. *Foods, 9*(9), 1158. 10.3390/foods9091158

Dimou, C., & Koutelidakis, A. (2016). Grape ppomace: A challenging renewable resource of bioactive phenolic compounds with diversified health benefits. *MOJ Food Processing and Technology, 3*, 065. 10.15406/mojfpt.2016.03.00065

dos Santos, K. M. O, de Oliveira, I. C., Lopes, M. A. C., Cruz, A. P. G., Buriti, F. C. A., & Cabral, L. M. (2017). Addition of grape pomace extract to probiotic fermented goat milk: The effect on phenolic content, probiotic viability and sensory acceptability. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 97*(4), 1108-1115. 10.1002/jsfa.7836

Drosou, C., Kyriakopoulou, K., Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., & Krokida, M. (2015). A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products, 75*, 141-149. 10.1016/j.indcrop.2015.05.063

Du, B., He, B.-J., Shi, P.-B., Li, F.-Y., Li, J., & Zhu, F.-M. (2012). Phenolic content and antioxidant activity of wine grapes and table grapes. *Journal of Medicinal Plants Research, 6*, 3381-3387. 10.5897/JMPR12.238

Dufour, C., Loonis, M., Delosière, M., Buffière, C., Hafnaoui, N., Santé-Lhoutellier, V., & Rémond, D. (2018). The matrix of fruit & vegetables modulates the gastrointestinal bioaccessibility of polyphenols and their impact on dietary protein digestibility. *Food Chemistry, 240*, 314-322. 10.1016/j.foodchem.2017.07.104

Dupont, D., & Tomé, D. (2020). Chapter 20 - Milk proteins: Digestion and absorption in the gastrointestinal tract. In Boland, M. & Singh, H. (Ed.). Milk Proteins (3rd edition) (pp. 701-714): Academic Press. 10.1016/B978-0-12-815251-5.00020-7

Dwyer, K., Hosseinian, F., & Rod, M. (2014). The market potential of grape waste alternatives. *Journal of Food Research, 3*(2), 91-106. 10.5539/jfr.v3n2p91.

Dziedzic, S. Z., & Hudson, B. J. F. (1984). Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. *Food Chemistry, 14*(1), 45-51. 10.1016/0308-8146(84)90017-7

Egger, L., Ménard, O., Baumann, C., Duerr, D., Schlegel, P., Stoll, P., Vergères, G., Dupont, D., & Portmann, R. (2019). Digestion of milk proteins: Comparing static and dynamic *in vitro* digestion systems with *in vivo* data. *Food Research International, 118*, 32-39. 10.1016/j.foodres.2017.12.049

El-Sayed, M. I., Awad, S., & Abou-Soliman, N. H. I. (2021). Improving the antioxidant properties of fermented camel milk using some strains of *Lactobacillus*. *Food and Nutrition Sciences, 12*, 352-371. 10.4236/fns.2021.124028

Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48*(5), 430-441. 10.1080/10408390701425615

Esteban-Torres, M., Mancheño, J. M., de las Rivas, B., & Muñoz, R. (2014). Production and characterization of a tributyrin esterase from *Lactobacillus plantarum* suitable for cheese lipolysis. *Journal of Dairy Science, 97*(11), 6737-6744. 10.3168/jds.2014-8234

FAO-OIV, (2016). FAO-OIV Focus 2016, Table and Dried Grapes. Food and Agricultural Organization and International Organization of Vine and Wine.

Farhadi, K., Esmaeilzadeh, F., Hatami, M., Forough, M., & Molaie, R. (2016). Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province, Iran. *Food Chemistry, 199*, 847-855. 10.1016/j.foodchem.2015.12.083

Felix da Silva, D., Junior, N. N. T., Gomes, R. G., dos Santos Pozza, M. S., Britten, M., & Matumoto-Pintro, P. T. (2017). Physical, microbiological and rheological properties of probiotic yogurt supplemented with grape extract. *Journal of Food Science and Technology, 54*(6), 1608-1615. 10.1007/s13197-017-2592-x

Feng, C., Wang, B., Zhao, A., Wei, L., Shao, Y., Wang, Y., Cao, B., & Zhang, F. (2019). Quality characteristics and antioxidant activities of goat milk yogurt with added jujube pulp. *Food Chemistry, 277*, 238-245. 10.1016/j.foodchem.2018.10.104

Fernandes, L., Casal, S., Cruz, R., Pereira, J. A., & Ramalhosa, E. (2013). Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Research International, 50*(1), 161-166. 10.1016/j.foodres.2012.09.039

Fernández-Fernández, A. M., Dellacassa, E., Nardin, T., Larcher, R., Ibañez, C., Terán, D., Gámbaro, A., Medrano-Fernandez, A., del Castillo, M. D. (2022). Tannat grape skin: A feasible ingredient for the formulation of snacks with potential for reducing the risk of diabetes. *Nutrients, 14*(3), 419. 10.3390/nu14030419

Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research, 29*(11), 751-760. 10.1016/j.nutres.2009.09.016

Fernández, K., & Labra, J. (2013). Simulated digestion of proanthocyanidins in grape skin and seed extracts and the effects of digestion on the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Food Chemistry, 139*(1), 196-202. 10.1016/j.foodchem.2013.01.021

Ferreira, C. S., Pinho, M. N., & Cabral, L. (2013). Solid-liquid extraction and concentration with processes of membrane technology of soluble fibers from wine grape pomace. *Técnico Lisboa*, 1-9.

Ferreyra, S., Bottini, R., & Fontana, A. (2021). Tandem absorbance and fluorescence detection following liquid chromatography for the profiling of multiclass phenolic compounds in different winemaking products. *Food Chemistry, 338*, 128030. 10.1016/j.foodchem.2020.128030

Ferreyra, S., Torres-Palazzolo, C., Bottini, R., Camargo, A., & Fontana, A. (2021). Assessment of *in-vitro* bioaccessibility and antioxidant capacity of phenolic compounds extracts recovered from grapevine bunch stem and cane by-products. *Food Chemistry, 348*, 129063. 10.1016/j.foodchem.2021.129063

Ferri, M., Vannini, M., Ehrnell, M., Eliasson, L., Xanthakis, E., Monari, S., Sisti, L., Marchese, P., Celli, A., & Tassoni, A. (2020). From winery waste to bioactive compounds and new polymeric biocomposites: A contribution to the circular economy concept. *Journal of Advanced Research, 24*, 1-11. 10.1016/j.jare.2020.02.015

Ferruzzi, M. G., Bordenave, N., & Hamaker, B. R. (2012). Does flavor impact function? Potential consequences of polyphenol-protein interactions in delivery and bioactivity of flavan-3-ols from foods. *Physiology & Behavior, 107*(4), 591-597. 10.1016/j.physbeh.2012.02.020

Flores-Mancha, M., Ruíz-Gutiérrez, M., Sánchez-Vega, R., Santellano-Estrada, E., & Chávez-Martínez, A. (2020). Characterization of beet root extract (*Beta vulgaris*) encapsulated with maltodextrin and inulin. *Molecules, 25*, 5498. 10.3390/molecules25235498

Foegeding, E. A., & Davis, J. P. (2011). Food protein functionality: A comprehensive approach. *Food Hydrocolloids, 25*(8), 1853-1864. 10.1016/j.foodhyd.2011.05.008

Fontana, A. R., Antoniolli, A., & Bottini, R. (2013). Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61*(38), 8987-9003. 10.1021/jf402586f

Fraige, K., Pereira-Filho, E. R., & Carrilho, E. (2014). Fingerprinting of anthocyanins from grapes produced in Brazil using HPLC–DAD–MS and exploratory analysis by principal component analysis. *Food Chemistry, 145*, 395-403. 10.1016/j.foodchem.2013.08.066

Freire, F. C., Adorno, M. A. T., Sakamoto, I. K., Antoniassi, R., Chaves, A. C. S. D., dos Santos, K. M. O., & Sivieri, K. (2017). Impact of multi-functional fermented goat milk beverage on gut microbiota in a dynamic colon model. *Food Research International, 99*, 315-327. 10.1016/j.foodres.2017.05.028.

Frumento, D., do Espirito-Santo, A. P., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Gallo, M., Converti, A., & Perego, P. (2013). Development of a *Lactobacillus acidophilus* fermented milk with the addition of *Vitis vinifera* marc flour. *Food technology and biotechnology, 51*(3), 370-375.

Gad, A. S., & Abd El-Salam, M. H. (2010). The antioxidant properties of skim milk supplemented with rosemary and green tea extracts in response to pasteurisation, homogenisation and the addition of salts. *International Journal of Dairy Technology, 63*(3), 349-355. 0.1111/j.1471-0307.2010.00585.x

Gaita, C., Alexa, E., Moigradean, D., Conforti, F., & Poiana, M.-A. (2020). Designing of high value-added pasta formulas by incorporation of grape pomace skins. *Romanian Biotechnological Letters, 25*(3), 1607-1614. 10.25083/rbl/25.3/1607.1614.

Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology, 26*(2), 68-87. 10.1016/j.tifs.2012.03.003

Gallo, M., Vinci, G., Graziani, G., de Simone, C., & Ferranti, P. (2013). The interaction of cocoa polyphenols with milk proteins studied by proteomic techniques. *Food Research International, 54*, 406-415. 10.1016/j.foodres.2013.07.011

Garbetta, A., Nicassio, L., D'Antuono, I., Cardinali, A., Linsalata, V., Attolico, G., & Minervini, F. (2018). Influence of *in vitro* digestion process on polyphenolic profile of skin grape (cv. *Italia*) and on antioxidant activity in basal or stressed conditions of human intestinal cell line (HT-29). *Food Research International, 106*, 878-884. 10.1016/j.foodres.2018.01.072

García-Lomillo, J., & González-SanJosé, M. L. (2017). Applications of wine pomace in the food industry: Approaches and functions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 16*(1), 3-22. 10.1111/1541-4337.12238

Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. *Food Research International, 54*(2), 1844-1858. 10.1016/j.foodres.2013.08.002

Gašić, U. M., Natić, M. M., Mišić, D. M., Lušić, D. V., Milojković-Opsenica, D. M., Tešić, Ž. Lj., & Lušić, D. (2015). Chemical markers for the authentication of unifloral *Salvia officinalis* L. honey. *Journal of Food Composition and Analysis, 44*, 128-138. 10.1016/j.jfca.2015.08.008

Gazzola, D., Vincenzi, S., Gastaldon, L., Tolin, S., Pasini, G., & Curioni, A. (2014). The proteins of the grape (*Vitis vinifera* L.) seed endosperm: Fractionation and identification of the major components. *Food Chemistry, 155*, 132-139. 10.1016/j.foodchem.2014.01.032

Georgiou, C. D., Grintzalis, K., Zervoudakis, G., & Papapostolou, I. (2008). Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(1), 391-403. 10.1007/s00216-008-1996-x

Gharras, H. (2009). Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *International Journal of Food Science & Technology, 44*, 2512-2518. 10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x

Gianazza, E., Tedesco, G., Villa, P., Scienza, A., Cargnello, G., Righetti, P. G., & Osnaghi, A. (1989). Characterization of the major proteins from *Vitis vinifera* seeds. *Plant Science, 62*, 73-81. 10.1016/0168-9452(89)90191-X

Göçer, H., & Gülçin, I. (2011). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Correlation of structure and antioxidant properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition, 62*(8), 821-825. 10.3109/09637486.2011.585963

Gođevac, D., Tešević, V., Veličković, M., Vujisić, L., Vajs, V., & Milosavljević, S. (2010). Polyphenolic compounds in seeds from some grape cultivars grown in Serbia. *Journal of the Serbian Chemical Society, 75*(12), 1641-1652. 10.2298/JSC100519131G

Gomes, T. M., Toaldo, I. M., da Silva Haas, I. C., Burin, V. M., Caliari, V., Luna, A. S., de Gois, J. S., & Bordignon-Luiz, M. T. (2019). Differential contribution of grape peel, pulp, and seed to bioaccessibility of micronutrients and major polyphenolic compounds of red and white grapes through simulated human digestion. *Journal of Functional Foods, 52*, 699-708. 10.1016/j.jff.2018.11.051

Gómez-Mejía, E., Roriz, C. L., Heleno, S. A., Calhelha, R., Dias, M. I., Pinela, J., Rosales-Conrado, N., León-González, M. E., Ferreira, I. C. F. R., & Barros, L. (2021). Valorisation of black mulberry and grape seeds: Chemical characterization and bioactive potential. *Food Chemistry, 337*, 127998. 10.1016/j.foodchem.2020.127998

Gonçalves, A., Estevinho, B. N., & Rocha, F. (2021). Methodologies for simulation of gastrointestinal digestion of different controlled delivery systems and further uptake of encapsulated bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology, 114*, 510-520. 10.1016/j.tifs.2021.06.007

González-Aguilar, G. A., Blancas-Benítez, F. J., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2017). Polyphenols associated with dietary fibers in plant foods: Molecular interactions and bioaccessibility. *Current Opinion in Food Science, 13*, 84-88. 10.1016/j.cofs.2017.03.004

González-Centeno, M. R., Rosselló, C., Simal, S., Garau, M. C., López, F., & Femenia, A. (2010). Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: Grape pomaces and stems. *LWT - Food Science and Technology, 43*(10), 1580-1586. 10.1016/j.lwt.2010.06.024

González-Paramás, A. M., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., de Pascual-Teresa, S., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2004). Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(2), 234-238. 10.1021/jf0348727

Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L. D., Hidalgo, F. J., Miyashita, K., van Camp, J., Alasalver, C., Ismail, A. B., Elmore, S., Birch, G. G., Charalampopoulos, D., Astley, S. B., Pegg, R., Zhou, P., & Finglas, P. (2018). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food Chemistry, 264*, 471-475. 10.1016/j.foodchem.2018.04.012

Grewal, M. K., Chandrapala, J., Donkor, O., Apostolopoulos, V., Stojanovska, L., & Vasiljevic, T. (2017a). Fourier transform infrared spectroscopy analysis of physicochemical changes in UHT milk during accelerated storage. *International Dairy Journal, 66*, 99-107. 10.1016/j.idairyj.2016.11.014

Grewal, M. K., Chandrapala, J., Donkor, O., Apostolopoulos, V., & Vasiljevic, T. (2017b). Predicting sediment formation in ultra high temperature-treated whole and skim milk using attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy. *74*, 39-48. 10.1016/j.idairyj.2017.01.004

Grgić, J., Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M., & Bucić-Kojić, A. (2020). Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds. *Antioxidants, 9*(10), 923. 10.3390/antiox9100923.

Guaita, M., Panero, L., Motta, S., Mangione, B., & Bosso, A. (2021). Effects of high-temperature drying on the polyphenolic composition of skins and seeds from red grape pomace. *LWT-Food Science and Technology, 145*, 111323. 10.1016/j.lwt.2021.111323

Guerrero, R. F., Liazid, A., Palma, M., Puertas, B., González-Barrio, R., Gil-Izquiredo, Á., García-Barroso, C., Cantos-Villar, E. (2009). Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chemistry, 112*, 949-955. 10.1016/j.foodchem.2008.07.014

Gül, H., Acun, S., Sen, H., Nayir, N., & Türk, S. (2013). Antioxidant activity, total phenolics and some chemical properties of Öküzgözü and Narince grape pomace and grape seed flour. *Journal of Food Agriculture and Environment, 11*(2), 28-34.

Gülçin, İ. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology, 86*(3), 345-391. 10.1007/s00204-011-0774-2

Gülçin, I., Bursal, E., Sehitoğlu, M. H., Bilsel, M., & Gören, A. C. (2010). Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology, 48*, 2227-2238. 10.1016/j.fct.2010.05.053

Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Taoubi, K., & Köksal, E. (2009). Antioxidant secoiridoids from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). *Wood Science and Technology, 43*(3), 195-212. 10.1007/s00226-008-0234-1

Gülçin, Ì., Güngör Şat, İ., Beydemir, Ş., Elmastaş, M., & İrfan Küfrevioğlu, Ö. (2004). Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophylata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chemistry, 87*(3), 393-400. 10.1016/j.foodchem.2003.12.008

Gumienna, M., Lasik, M., & Czarnecki, Z. (2011). Bioconversion of grape and chokeberry wine polyphenols during simulated gastrointestinal *in vitro* digestion. *International Journal of Food Sciences and Nutrition, 62*(3), 226-233. 10.3109/09637486.2010.532115

Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics, 476*(2), 107-112. 10.1016/j.abb.2008.01.028

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology, 186*, 1-85. 10.1016/0076-6879(90)86093-b

Han, F., Yang, P., Wang, H., Fernandes, I., Mateus, N., & Liu, Y. (2019). Digestion and absorption of red grape and wine anthocyanins through the gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology, 83*, 211-224. 10.1016/j.tifs.2018.11.025

Han, W., Han, N., He, X., & Zhao, X. (2019). Berry thinning to reduce bunch compactness improves fruit quality of Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae, 246*, 589-596. 10.1016/j.scienta.2018.11.037

Hanuaovský, O., Gálik, B., Biro, D., Šimko, M., Juráček, M., Rolinec, M., Zábranský, L., Philipp, C., Puntigam, R., Slama, J. A., & Gierus, M. (2020). The nutritional potential of grape by-products from the area of Slovakia and Austria. *Emirates Journal of Food and Agriculture, 32*(1), 1-10. 10.9755/ejfa.2020.v32.i1.2051

Haque, M. K., & Roos, Y. H. (2006). Differences in the physical state and thermal behavior of spray-dried and freeze-dried lactose and lactose/protein mixtures. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 7*(1), 62-73. 10.1016/j.ifset.2004.12.004

Haratifar, S., & Corredig, M. (2014). Interactions between tea catechins and casein micelles and their impact on renneting functionality. *Food Chemistry, 143*, 27-32. 10.1016/j.foodchem.2013.07.092

Hashemi, S. M. B., & Gholamhosseinpour, A. (2020). Effect of ultrasonication treatment and fermentation by probiotic *Lactobacillus plantarum* strains on goat milk bioactivities. *International Journal of Food Science & Technology, 55*(6), 2642-2649. 10.1111/ijfs.14517

Hasni, I., Bourassa, P., Hamdani, S., Samson, G., Carpentier, R., & Tajmir-Riahi, H.-A. (2011). Interaction of milk α- and β-caseins with tea polyphenols. *Food Chemistry, 126*(2), 630-639. 10.1016/j.foodchem.2010.11.087

He, F., Mu, L., Yan, G.-L., Liang, N.-N., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C.-Q. (2010). Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules, 15*(12), 9057-9091. 10.3390/molecules15129057

He, M., Zeng, J., Zhai, L., Liu, Y., Wu, H., Zhang, R., Li, Z., & Xia, E. (2017). Effect of *in vitro* simulated gastrointestinal digestion on polyphenol and polysaccharide content and their biological activities among 22 fruit juices. *Food Research International, 102*, 156-162. 10.1016/j.foodres.2017.10.001

He, Z., Tao, Y., Zeng, M., Zhang, S., Tao, G., Qin, F., & Chen, J. (2016). High pressure homogenization processing, thermal treatment and milk matrix affect *in vitro* bioaccessibility of phenolics in apple, grape and orange juice to different extents. *Food Chemistry, 200*, 107-116. 10.1016/j.foodchem.2016.01.045

Helal, A., & Tagliazucchi, D. (2018). Impact of *in-vitro* gastro-pancreatic digestion on polyphenols and cinnamaldehyde bioaccessibility and antioxidant activity in stirred cinnamon-fortified yogurt. *LWT-Food Science and Technology, 89*, 164-170. 10.1016/j.lwt.2017.10.047

Helal, A., Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., & Conte, A. (2014). Bioaccessibility of polyphenols and cinnamaldehyde in cinnamon beverages subjected to *in vitro* gastro-pancreatic digestion. *Journal of Functional Foods, 7*, 506-516. 10.1016/j.jff.2014.01.005

Hiolle, M., Lechevalier, V., Floury, J., Boulier-Monthéan, N., Prioul, C., Dupont, D., & Nau, F. (2020). *In vitro* digestion of complex foods: How microstructure influences food disintegration and micronutrient bioaccessibility. *Food Research International, 128*, 108817. 10.1016/j.foodres.2019.108817

Hodgkinson, A. J., Wallace, O. A. M., Boggs, I., Broadhurst, M., & Prosser, C. G. (2018). Gastric digestion of cow and goat milk: Impact of infant and young child *in vitro* digestion conditions. *Food Chemistry, 245*, 275-281. 10.1016/j.foodchem.2017.10.028

Hodgkinson, A. J., Wallace, O. A. M., Smolenski, G., & Prosser, C. G. (2019). Gastric digestion of cow and goat milk: Peptides derived from simulated conditions of infant digestion. *Food Chemistry, 276*, 619-625. 10.1016/j.foodchem.2018.10.065

Hogervorst, J. C., Miljić, U., & Puškaš, V. (2017). Extraction of bioactive compounds from grape processing by-products. In Galanakis, C. (Ed.). Handbook of grape processing by-products (1st edition), (pp. 105-135). Elsevier Inc. 10.1016/B978-0-12-809870-7.00005-3

Horne, D. S. (2006). Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science, 11*(2), 148-153. 10.1016/j.cocis.2005.11.004

Horne, D. S. (2020). Chapter 6 - Casein micelle structure and stability. In Boland M., & Singh, H. (Ed.). Milk Proteins (3rd edition). (pp. 213-250). Academic Press. 10.1016/B978-0-12-815251-5.00006-2

Hovjecki, M., Miloradovic, Z., Mirkovic, N., Radulovic, A., Pudja, P., & Miocinovic, J. (2021). Rheological and textural properties of goat milk set type yoghurt as affected by heat treatment, transglutaminase

addition and storage. *Journal of the science of food and agriculture, 101*(14), 5898-5906. 10.1002/jsfa.11242

Hovjecki, M., Miloradovic, Z., Rac, V., Pudja, P., & Miocinovic, J. (2020). Influence of heat treatment of goat milk on casein micelle size, rheological and textural properties of acid gels and set type yoghurts. *Journal of Texture Studies, 51*(4), 680-687. 10.1111/jtxs.12524

Howard, L. R., Brownmiller, C., Mauromoustakos, A., & Prior, R. L. (2016). Improved stability of blueberry juice anthocyanins by acidification and refrigeration. *Journal of Berry Research, 6*, 189-201. 10.3233/JBR-160133

Hoye, C., & Ross, C. F. (2011). Total phenolic content, consumer acceptance, and instrumental analysis of bread made with grape seed flour. *Journal of food science, 76*, S428-436. 10.1111/j.1750-3841.2011.02324.x

Hu, T., Chen, J., Xu, J., & Lu, J. (1992). The role of YunZhi polysaccharopeptide and *Ganoderma lucidum* polysaccharide in scavenging ROS. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 24*(5), 465-470.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(6), 1841-1856. 10.1021/jf030723c

Ilyas, T., Chowdhary, P., Chaurasia, D., Gnansounou, E., Pandey, A., & Chaturvedi, P. (2021). Sustainable green processing of grape pomace for the production of value-added products: An overview. *Environmental Technology & Innovation, 23*, 101592. 10.1016/j.eti.2021.101592

Imperio, D., Bordiga, M., Passos, C. P., Silva, S. P., Coimbra, M. A., Travaglia, F., Arlorio, M., Coïsson, J. D., & Panza, L. (2021). Gentianose: Purification and structural determination of an unknown oligosaccharide in grape seeds. *Food Chemistry, 344*, 128588. 10.1016/j.foodchem.2020.128588

Inglingstad, R. A., Devold, T. G., Eriksen, E. K., Holm, H., Jacobsen, M., Liland, K. H., Rukke, E. O., & Vegarud, G. E. (2010). Comparison of the digestion of caseins and whey proteins in equine, bovine, caprine and human milks by human gastrointestinal enzymes. *Dairy Science & Technology, 90*(5), 549-563. 10.1051/dst/2010018

Ioannou, A., & Varotsis, C. (2016). Real time monitoring the Maillard reaction intermediates by HPLC- FTIR. *Journal of Physical Chemistry & Biophysics, 6*. 10.4172/2161-0398.1000210

Iriondo-DeHond, M., Blázquez-Duff, J. M., del Castillo, M. D., & Miguel, E. (2020). Nutritional quality, sensory analysis and shelf life stability of yogurts containing inulin-type fructans and winery byproducts for sustainable health. *Foods, 9*(9), 1199. 10.3390/foods9091199

Ivanova, V., Stefova, M., Vojnoski, B., Dörnyei, Á., Márk, L., Dimovska, V., Stafilov, T., & Kilár, F. (2011). Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R. Macedonia and changes of their content during ripening. *Food Research International, 44*(9), 2851-2860. 10.1016/j.foodres.2011.06.046

Jackson, R. S. (2000a). 2 - Grape Species and Varieties. In Jackson, R. S. (Ed.). Wine Science (2nd Edition) (pp. 13-44). Academic Press.

Jackson, R. S. (2000b). 3 - Grapevine Structure and Function. In Jackson, R. S. (Ed.). Wine Science (2nd Edition) (pp. 45-95). Academic Press.

Jackson, R. S. (2003). Grapes. In Caballero, B. (Ed.). Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2nd Edition) (pp. 2957-2967). Academic Press.

Jaimes-Gualdrón, T. R., Alzate Ceballos, J. A., & Rojano, B. A. (2018). Oxidative stability of a dairy product pike yogurt, with anthocyanin extracts of corozo (*Bactris guineensis*) and grape (*Vitis vinifera*). *Journal of Berry Research, 9*, 141-153. 10.3233/JBR-180327

Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry, 175*, 556-567. 10.1016/j.foodchem.2014.12.013

Jakobek, L., & Matić, P. (2019). Non-covalent dietary fiber - Polyphenol interactions and their influence on polyphenol bioaccessibility. *Trends in Food Science & Technology, 83*, 235-247. 10.1016/j.tifs.2018.11.024

Jakšić, D., Ivanišević, D., Đokić, V., Brbaklić Tepavac M. (2015). *Vinski Atlas*: Popis poljoprivrede 2012, Poljoprivreda u Rebublici Srbiji, Beograd, Srbija.

Jara-Palacios, M. J., Hernanz, D., Cifuentes-Gomez, T., Escudero-Gilete, M. L., Heredia, F. J., & Spencer, J. P. E. (2015). Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. *Food Chemistry, 183*, 78-82. 10.1016/j.foodchem.2015.03.022

Jara-Palacios, M. J., Gonçalves, S., Hernanz, D., Heredia, F. J., & Romano, A. (2018). Effects of *in vitro* gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant activity of different white winemaking byproducts extracts. *Food Research International, 109*, 433-439. 10.1016/j.foodres.2018.04.060

Jara-Palacios, M. J., Hernanz, D., Escudero-Gilete, M. L., & Heredia, F. J. (2014). Antioxidant potential of white grape pomaces: Phenolic composition and antioxidant capacity measured by spectrophotometric and cyclic voltammetry methods. *Food Research International, 66*, 150-157. 10.1016/j.foodres.2014.09.009

Ji, M., Li, C., & Li, Q. (2015). Rapid separation and identification of phenolics in crude red grape skin extracts by high performance liquid chromatography coupled to diode array detection and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, 1414*, 138-146. 10.1016/j.chroma.2015.08.041

Jiang, Y., Simonsen, J., & Zhao, Y. (2011). Compression-molded biocomposite boards from red and white wine grape pomaces. *Journal of Applied Polymer Science, 119*, 2834-2846. 10.1002/app.32961

Jiménez, N., Esteban-Torres, M., Mancheño, J. M., de Las Rivas, B., & Muñoz, R. (2014). Tannin degradation by a novel tannase enzyme present in some *Lactobacillus plantarum* strains. *Applied and Environmental Microbiology, 80*(10), 2991-2997. 10.1128/aem.00324-14

Joint FAO/WHO Food Standards Programme, (2010). Secretariat of the CODEX Alimentarius Commission: CODEX Alimentarius (CODEX) Guidelines on Nutrition Labeling CAC/GL 2–1985 as Last Amended 2010. FAO, Rome.

Kalab, M., Allan-Wojtas, P., & Todd, B. P. (1983). Development of microstructure in set-style nonfat yogurt-A Review. *Food Microstructure, 2*, 51-66.

Kallithraka, S., García-Viguera, C., Bridle, P., & Bakker, J. (1995). Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. *Phytochemical Analysis, 6*, 265-267. 10.1002/pca.2800060509

Kalušević, A., Lević, S., Čalija, B., Pantić, M., Belović, M., Pavlović, V., Bugarski, B., Milić, J., Žilić, S., & Nedović, V. (2017). Microencapsulation of anthocyanin-rich black soybean coat extract by spray drying using maltodextrin, gum Arabic and skimmed milk powder. *Journal of Microencapsulation, 34*(5), 475-487. 10.1080/02652048.2017.1354939

Kalušević, A. M., Lević, S. M., Čalija, B. R., Milić, J. R., Pavlović, V. B., Bugarski, B. M., & Nedović, V. A. (2017). Effects of different carrier materials on physicochemical properties of microencapsulated grape skin extract. *Journal of Food Science and Technology, 54*(11), 3411-3420. 10.1007/s13197-017-2790-6

Kamiloglu, S., Pasli, A. A., Ozcelik, B., & Capanoglu, E. (2014). Evaluating the *in vitro* bioaccessibility of phenolics and antioxidant activity during consumption of dried fruits with nuts. *LWT - Food Science and Technology, 56*(2), 284-289. 10.1016/j.lwt.2013.11.040

Kamizake, N. K. K., Gonçalves, M. M., Zaia, C. T. B. V., & Zaia, D. A. M. (2003). Determination of total proteins in cow milk powder samples: A comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods. *Journal of Food Composition and Analysis, 16*(4), 507-516. 10.1016/S0889-1575(03)00004-8

Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(14), 4360-4367. 10.1021/jf049613b

Kanakis, C. D., Hasni, I., Bourassa, P., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. G., & Tajmir-Riahi, H.-A. (2011). Milk β-lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chemistry, 127*(3), 1046-1055. 10.1016/j.foodchem.2011.01.079

Kandylis, P., Dimitrellou, D., & Moschakis, T. (2021). Recent applications of grapes and their derivatives in dairy products. *Trends in Food Science & Technology, 114*, 696-711. 10.1016/j.tifs.2021.05.029

Karaaslan, M., Ozden, M., Vardin, H., & Turkoglu, H. (2011). Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts. *LWT - Food Science and Technology, 44*(4), 1065-1072. 10.1016/j.lwt.2010.12.009

Karakaya, S., Simsek, S., Eker, A. T., Pineda-Vadillo, C., Dupont, D., Perez, B., Viadel, B., Sanz-Buenhombre, M., Rodriguez, A. G., Kertész, Z., Hegyi, A., Bordoni, A., & El, S. N. (2016). Stability and bioaccessibility of anthocyanins in bakery products enriched with anthocyanins. *Food & Function, 7*(8), 3488-3496. 10.1039/c6fo00567e

Karaman, H. T., Küskü, D. Y., & Soylemezoglu, G. (2021). Phenolic compounds and antioxidant capacities in grape berry skin, seed and stems of six winegrape varieties grown in Turkey. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus, 20*(1), 15-25. 10.24326/asphc.2021.1.2

Karasu, S., Başlar, M., Karaman, S., Kiliçli, M., Abdullah, A., Yaman, H., & Sağdiç, O. (2016). Characterization of some bioactive compounds and physicochemical properties of grape varieties grown in turkey: Thermal degradation kinetics of anthocyanin. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 40*(2), 177-185. 10.3906/tar-1502-38

Karnopp, A. R., Figueroa, A. M., Los, P. R., Teles, J. C., Simões, D. R. S., Barana, A. C., Kubiaki, F. T., de Oliveira, J. G. B., Granato, D. (2015). Effects of whole-wheat flour and bordeaux grape pomace (*Vitis labrusca* L.) on the sensory, physicochemical and functional properties of cookies. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, 35*, 750-756. 10.1590/1678-457X.0010

Karnopp, A. R., Margraf, T., Maciel, L. G., Santos, J. S., & Granato, D. (2017). Chemical composition, nutritional and *in vitro* functional properties of by-products from the Brazilian organic grape juice industry. *International Food Research Journal, 24*(1), 207-214.

Karnopp, A. R., Oliveira, K. G., de Andrade, E. F., Postingher, B. M., & Granato, D. (2017). Optimization of an organic yogurt based on sensorial, nutritional, and functional perspectives. *Food Chemistry, 233*, 401-411. 10.1016/j.foodchem.2017.04.112

Katalinić, V., Možina, S. S., Skroza, D., Generalić, I., Abramovič, H., Mladen, M., Ljubenkov, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinc, P., & Boban, M. (2010). Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry, 119*(2), 715-723. 10.1016/j.foodchem.2009.07.019

Kellett, M. E., Greenspan, P., & Pegg, R. B. (2018). Modification of the cellular antioxidant activity (CAA) assay to study phenolic antioxidants in a Caco-2 cell line. *Food Chemistry, 244*, 359-363. 10.1016/j.foodchem.2017.10.035

Khan, I. T., Nadeem, M., Imran, M., Ullah, R., Ajmal, M., & Jaspal, M. H. (2019). Antioxidant properties of milk and dairy products: A comprehensive review of the current knowledge. *Lipids in Health and Disease, 18*(1), 41. 10.1186/s12944-019-0969-8

Kılıç Bayraktar, M., Harbourne, N. B., & Fagan, C. C. (2019). Impact of heat treatment and acid gelation on polyphenol enriched milk samples. *LWT-Food Science and Technology, 113*, 108282. 10.1016/j.lwt.2019.108282

Kim, Y.-E., Kim, J. W., Cheon, S., Nam, M. S., & Kim, K. K. (2019). Alpha-casein and beta-lactoglobulin from cow milk exhibit antioxidant activity: A plausible link to antiaging effects. *Journal of Food Science, 84*(11), 3083-3090. 10.1111/1750-3841.14812

Kinsella, J., & Melachouris, N. (2009). Functional properties of proteins in foods: A survey. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 7*(3), 219-280. 10.1080/10408397609527208

Koch, R. (1883). The new methods for studying the microcosm of soil, air, and water. *Deutsches Ärzteblatt*, 137, 244–250.

Komes, D., Bušić, A., Belščak-Cvitanović, A., Brnčić, M., Bosiljkov, T., Vojvodić, A., & Dujmić, F. (2017). Novel approach to the development of functional goat's milk-based beverages using medicinal plant extracts in combination with high intensity ultrasound treatment. *Food technology and biotechnology, 55*(4), 484-495. 10.17113/ftb.55.04.17.5123

Kopf-Bolanz, K. A., Schwander, F., Gijs, M., Vergères, G., Portmann, R., & Egger, L. (2014). Impact of milk processing on the generation of peptides during digestion. *International Dairy Journal, 35*(2), 130-138. 10.1016/j.idairyj.2013.10.012

Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods, 1*(2), 177-187. 10.1016/j.jff.2009.01.007

Kostić, A. Ž., Barać, M. B., Stanojević, S. P., Milojković-Opsenica, D. M., Tešić, Ž. L., Šikoparija, B., Radišić, P., Prentović, M., & Pešić, M. B. (2015). Physicochemical composition and techno-functional properties of bee pollen collected in Serbia. *LWT - Food Science and Technology, 62*(1, Part 1), 301-309. 10.1016/j.lwt.2015.01.031

Kostić, A. Ž., Mačukanović-Jocić, M. P., Špirović Trifunović, B. D., Vukašinović, I. Ž., Pavlović, V. B., & Pešić, M. B. (2017). Fatty acids of maize pollen – Quantification, nutritional and morphological evaluation. *Journal of Cereal Science, 77*, 180-185. 0.1016/j.jcs.2017.08.004

Kostić, A. Ž., Milinčić, D. D., Stanisavljević, N. S., Gašić, U. M., Lević, S., Kojić, M. O., Tešić, Ž. Lj., Nedović, V., Barać, M. B., & Pešić, M. B. (2021). Polyphenol bioaccessibility and antioxidant properties of in vitro digested spray-dried thermally-treated skimmed goat milk enriched with pollen. *Food Chemistry, 351*, 129310. 10.1016/j.foodchem.2021.129310

Kouřimská, L., Sabolová, M., Horčička, P., Rys, S., & Božik, M. (2018). Lipid content, fatty acid profile, and nutritional value of new oat cultivars. *Journal of Cereal Science, 84*, 44-48. 10.1016/j.jcs.2018.09.012

Kurt, A., Torun, H., Colak, N., Seiler, G., Hayirlioglu-Ayaz, S., & Ayaz, F. A. (2017). Nutrient profiles of the hybrid grape cultivar 'Isabel' during berry maturation and ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 97*(8), 2468-2479. 10.1002/jsfa.8061

Kusuda, M., Hatano, T., & Yoshida, T. (2006). Water-soluble complexes formed by natural polyphenols and bovine serum albumin: Evidence from gel electrophoresis. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 70*, 152-160. 10.1271/bbb.70.152

Ky, I., Lorrain, B., Kolbas, N., Crozier, A., & Teissedre, P.-L. (2014). Wine by-products: Phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties. *Molecules, 19*(1), 482-506. 10.3390/molecules19010482

Lachman, J., Hejtmánková, A., Táborský, J., Kotíková, Z., Pivec, V., Střalková, R., Vollmannová, A., Bojnanská, T., & Dědina, M. (2015). Evaluation of oil content and fatty acid composition in the seed of grapevine varieties. *LWT - Food Science and Technology, 63*(1), 620-625. 10.1016/j.lwt.2015.03.044

Lamothe, S., Azimy, N., Bazinet, L., Couillard, C., & Britten, M. (2014). Interaction of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. *Food & Function, 5*(10), 2621-2631. 10.1039/c4fo00203b

Lamothe, S., Guérette, C., Dion, F., Sabik, H., & Britten, M. (2019). Antioxidant activity of milk and polyphenol-rich beverages during simulated gastrointestinal digestion of linseed oil emulsions. *Food Research International, 122*, 149-156. 10.1016/j.foodres.2019.03.068

Lang, F., Wen, J., Wu, Z., Pan, D., & Wang, L. (2022). Evaluation of probiotic yoghurt by the mixed culture with *Lactobacillus plantarum* A3. *Food Science and Human Wellness, 11*(2), 323-331. 10.1016/j.fshw.2021.11.006

Lang, Y., Li, B., Gong, E., Shu, C., Si, X., Gao, N., Zhang, W., Cui, H., & Meng, X. (2021). Effects of α-casein and β-casein on the stability, antioxidant activity and bioaccessibility of blueberry anthocyanins with an *in vitro* simulated digestion. *Food Chemistry, 334*, 127526. 10.1016/j.foodchem.2020.127526

Larrauri, J. A., Rupérez, P., & Saura-Calixto, F. (1997). Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45*(4), 1390-1393. 10.1021/jf960282f

Laurent, C., Besançon, P., & Caporiccio, B. (2007). Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. *Food Chemistry, 100*, 1704-1712. 10.1016/j.foodchem.2005.10.016

Lavelli, V., Sri Harsha, P. S. C., Torri, L., & Zeppa, G. (2014). Use of winemaking by-products as an ingredient for tomato puree: The effect of particle size on product quality. *Food Chemistry, 152*, 162-168. 10.1016/j.foodchem.2013.11.103

Leal, C., Santos, R. A., Pinto, R., Queiroz, M., Rodrigues, M., José Saavedra, M., Barros, A., & Gouvinhas, I. (2020). Recovery of bioactive compounds from white grape (*Vitis vinifera* L.) stems as potential antimicrobial agents for human health. *Saudi Journal of Biological Sciences, 27*(4), 1009-1015. 10.1016/j.sjbs.2020.02.013

Lei, C., Tang, X., Li, H., Chen, H., & Yu, S. (2020). Molecular hybridization of grape seed extract: Synthesis, structural characterization and anti-proliferative activity *in vitro*. *Food Research International, 131*, 109005. 10.1016/j.foodres.2020.109005

Li-Chan, E. C. Y. (2007). Vibrational spectroscopy applied to the study of milk proteins. *Lait, 87*, 443-458. 10.1051/lait:2007023

Li, C., Dai, T., Chen, J., Li, X., Li, T., Liu, C., & McClements, D. J. (2021). Protein-polyphenol functional ingredients: The foaming properties of lactoferrin are enhanced by forming complexes with procyanidin. *Food Chemistry, 339*, 128145. 10.1016/j.foodchem.2020.128145

Li, C., Yu, W., Wu, P., & Chen, X. D. (2020). Current *in vitro* digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology, 96*, 114-126. 10.1016/j.tifs.2019.12.015

Li, T., Li, X., Dai, T., Hu, P., Niu, X., Liu, C., & Chen, J. (2020). Binding mechanism and antioxidant capacity of selected phenolic acid - β-casein complexes. *Food Research International, 129*, 108802. 10.1016/j.foodres.2019.108802

Li, X. Y., Cheng, M., Li, J., Zhao, X., Qin, Y. S., Chen, D., Wang, J. M., & Wang, C. F. (2020). Change in the structural and functional properties of goat milk protein due to pH and heat. *Journal of Dairy Science, 103*(2), 1337-1351. 10.3168/jds.2019-16862

Li, Z., Jiang, A., Yue, T., Wang, J., Wang, Y., & Su, J. (2013). Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. *Journal of Dairy Science, 96*(7), 4242-4251. 10.3168/jds.2012-6511

Lingua, M. S., Fabani, M. P., Wunderlin, D. A., & Baroni, M. V. (2016). *In vivo* antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile. *Journal of Functional Foods, 20*, 332-345. 10.1016/j.jff.2015.10.034

Lingua, M. S., Theumer, M. G., Kruzynski, P., Wunderlin, D. A., & Baroni, M. V. (2019). Bioaccessibility of polyphenols and antioxidant properties of the white grape by simulated digestion and Caco-2 cell assays: Comparative study with its winemaking product. *Food Research International, 122*, 496-505. 10.1016/j.foodres.2019.05.022

Lingua, M. S., Wunderlin, D. A., & Baroni, M. V. (2018). Effect of simulated digestion on the phenolic components of red grapes and their corresponding wines. *Journal of Functional Foods, 44*, 86-94. 10.1016/j.jff.2018.02.034

Liu, F., Ma, C., Gao, Y., & McClements, D. J. (2017). Food-grade covalent complexes and their application as nutraceutical delivery systems: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 16*(1), 76-95. 10.1111/1541-4337.12229

Liu, X., Li, J., Tian, Y., Liao, M., & Zhang, Z. (2016). Influence of berry heterogeneity on phenolics and antioxidant activity of grapes and wines: A primary study of the new winegrape cultivar meili (*Vitis vinifera* L.). *PLoS One, 11*(3), e0151276. 10.1371/journal.pone.0151276

Llobera, A., & Cañellas, J. (2007). Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. *Food Chemistry, 101*, 659-666. 10.1016/j.foodchem.2006.02.025

López-Belchí, M. D., Caamaño, E. F., Pascual, G., Noriega, F., Fierro-Morales, P., Romero-Román, M. E., Jara, P., Schoebitz, M., Serra, I., & Moreno, D. A. (2021). Spray-dried formulations rich in malvidin from tintorera grape wastes: Characterization, stability, and storage. *Processes, 9*(3). 10.3390/pr9030518

López-Castejón, M. L., Bengoechea, C., Espinosa, S., & Carrera, C. (2019). Characterization of prebiotic emulsions stabilized by inulin and β-lactoglobulin. *Food Hydrocolloids, 87*, 382-393. 10.1016/j.foodhyd.2018.08.024

Lorenz, M., Jochmann, N., von Krosigk, A., Martus, P., Baumann, G., Stangl, K., & Stangl, V. (2007). Addition of milk prevents vascular protective effects of tea. *European Heart Journal, 28*(2), 219-223. 10.1093/eurheartj/ehl442

Lorenzo, J. M., Estévez, M., Barba, F. J., Thirumdas, R., Franco, D., & Munekata, P. E. S. (2019). 11 - Polyphenols: Bioaccessibility and bioavailability of bioactive components. In Barba, F. J., Saraiva, J. M. A., Cravotto, G., & Lorenzo, J. M. (Ed.). Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds (pp. 309-332). Woodhead Publishing.

Lorrain, B., Chira, K., & Teissedre, P. L. (2011). Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chemistry, 126*(4), 1991-1999. 10.1016/j.foodchem.2010.12.062

Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2020). Microencapsulation of pineapple peel extract by spray drying using maltodextrin, inulin, and arabic gum as wall matrices. *Foods, 9*(6), 718. 10.3390/foods9060718

Lucarini, M., Durazzo, A., Kiefer, J., Santini, A., Lombardi-Boccia, G., Souto, E. B., Romani, A., Lampe, A., Nicoli, S. F., Gabrielli, P., Bevilacqua, N., Campo, M., Morassut, M., & Cecchini, F. (2020). Grape seeds: chromatographic profile of fatty acids and phenolic compounds and qualitative analysis by FTIR-ATR Spectroscopy. *Foods, 9*(1), 10. 10.3390/foods9010010

Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2018). *In vitro* digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International, 107*, 423-436. 10.1016/j.foodres.2018.02.055

Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez Álvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2018). Changes in bioaccessibility, polyphenol profile and antioxidant potential of flours obtained from persimmon fruit (*Diospyros kaki*) co-products during *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry, 256*, 252-258. 10.1016/j.foodchem.2018.02.128

Luo, L., Cui, Y., Zhang, S., Li, L., Suo, H., & Sun, B. (2017). Detailed phenolic composition of Vidal grape pomace by ultrahigh-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B, 1068-1069*, 201-209. 10.1016/j.jchromb.2017.10.031

Lutterodt, H., Slavin, M., Whent, M., Turner, E., & Yu, L. (2011). Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. *Food Chemistry, 128*(2), 391-399. 10.1016/j.foodchem.2011.03.040

Maante-Kuljus, M., Rätsep, R., Mainla, L., Moor, U., Starast, M., Põldma, P., & Karp, K. (2019). Technological maturity of hybrid vine (*Vitis*) fruits under Estonian climate conditions. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science, 69*(8), 706-714. 10.1080/09064710.2019.1641547

Maante-Kuljus, M., Vool, E., Rätsep, R., & Karp, K. (2015). The effect of genotype on table grapes soluble solids content. *Agronomy Research, 13*, 141-147.

Maathuis, A., Havenaar, R., He, T., & Bellmann, S. (2017). Protein digestion and quality of goat and cow milk infant formula and human milk under simulated infant conditions. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 65*(6), 661-666. 10.1097/mpg.0000000000001740

Mahmoudi, I., Telmoudi, A., Ben Moussa, O., Chouaibi, M., & Hassouna, M. (2020). Quality characteristics of goat yogurt containing *Lactobacillus* probiotic bacteria. *Journal of Agricultural Science and Technology, 23*, 83-96.

Malićanin, M., Rac, V., Antić, V., Antić, M., Palade, L. M., Kefalas, P., & Rakić, V. (2014). Content of antioxidants, antioxidant capacity and oxidative stability of grape seed oil obtained by ultra sound assisted extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 91*(6), 989-999. 10.1007/s11746-014-2441-2

Mammadova, S. M., Fataliyev, H. K., Gadimova, N. S., Aliyeva, G. R., Tagiyev, A. T, & Baloglanova, K. V. (2020). Production of functional products using grape processing residuals. *Food Science and Technology (Campinas), 40*(1). 10.1590/fst.30419

Mandić, A., Đilas, S., Ćetković, G., Čanadanović-Brunet, J., & Tumbas Šaponjac, V. (2008). Polyphenolic composition and antioxidant activities of grape seed extract. *International Journal of Food Properties, 11*, 713-726. 10.1080/10942910701584260

Mar, J. M., da Silva, L. S., Lira, A. C., Kinupp, V. F., Yoshida, M. I., Moreira, W. P., Bruginski, E., Campos, F. R., Machado, M. B., de Souza, T. P., Campelo, P. H., de Araújo Bezerra, J., & Sanches, E. A. (2020). Bioactive compounds-rich powders: Influence of different carriers and drying techniques on the chemical stability of the *Hibiscus acetosella* extract. *Powder Technology, 360*, 383-391. 10.1016/j.powtec.2019.10.062

Marchiani, R., Bertolino, M., Belviso, S., Giordano, M., Ghirardello, D., Torri, L., Piochi, M., & Zeppa, G. (2016). Yogurt enrichment with grape pomace: Effect of grape cultivar on physicochemical, microbiological and sensory properties. *Journal of Food Quality, 39*, 77-89. 10.1111/jfq.12181

Marchiani, R., Bertolino, M., Ghirardello, D., McSweeney, P. L. H., & Zeppa, G. (2016). Physicochemical and nutritional qualities of grape pomace powder-fortified semi-hard cheeses. *Journal of Food Science and Technology, 53*(3), 1585-1596. 10.1007/s13197-015-2105-8.

Marie, A., Aura, A.-M., Bohn, T., Dufour, C., El, S., Gomes, A., Karakaya, S., Martínez-Cuesta, M. C., McDougall, G., Requena, T., & Santos, C. (2014). *In vitro* models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 413-436. 10.1111/1541-4337.12081

Marinelli, V., Padalino, L., Nardiello, D., Del Nobile, M. A., & Conte, A. (2015). New approach to enrich pasta with polyphenols from grape marc. *Journal of Chemistry*, 1-8. 10.1155/2015/734578

Markoska, T., Huppertz, T., Grewal, M. K., & Vasiljevic, T. (2018). Structural changes of milk proteins during heating of concentrated skim milk determined using FTIR. *International Dairy Journal, 89*. 10.1016/j.idairyj.2018.08.010

Markoska, T., Huppertz, T., Grewal, M. K., & Vasiljevic, T. (2019). FTIR analysis of physiochemical changes in raw skim milk upon concentration. *LWT-Food Science and Technology, 102*, 64-70. 10.1016/j.lwt.2018.12.011

Martinez-Ferez, A., Rudloff, S., Guadix, A., Henkel, C. A., Pohlentz, G., Boza, J. J., Guadix, E. M., & Kunz, C. (2006). Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. *International Dairy Journal, 16*(2), 173-181. 10.1016/j.idairyj.2005.02.003

McClements, D. J. (2021). Advances in edible nanoemulsions: Digestion, bioavailability, and potential toxicity. *Progress in Lipid Research, 81*, 101081. 10.1016/j.plipres.2020.101081

McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., & Stewart, D. (2005). Anthocyanins from red wine – Their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry, 66*, 2540-2548. 10.1016/j.phytochem.2005.09.003

McGoverin, C. M., Clark, A. S. S., Holroyd, S. E., & Gordon, K. C. (2010). Raman spectroscopic quantification of milk powder constituents. *Analytica Chimica Acta, 673*(1), 26-32. 10.1016/j.aca.2010.05.014

Medouni-Adrar, S., Boulekbache-Makhlouf, L., Cadot, Y., Medouni-Haroune, L., Dahmoune, F., Makhoukhe, A., & Madani, K. (2015). Optimization of the recovery of phenolic compounds from Algerian grape by-products. *Industrial Crops and Products, 77*, 123-132. 10.1016/j.indcrop.2015.08.039

Meini, M. R., Cabezudo, I., Boschetti, C. E., & Romanini, D. (2019). Recovery of phenolic antioxidants from Syrah grape pomace through the optimization of an enzymatic extraction process. *Food Chemistry, 283*, 257-264. 10.1016/j.foodchem.2019.01.037

Mendes, J. A. S., Xavier, A. M. R. B., Evtuguin, D. V., & Lopes, L. P. C. (2013). Integrated utilization of grape skins from white grape pomaces. *Industrial Crops and Products, 49*, 286-291. 10.1016/j.indcrop.2013.05.003

Meral, R., & Doğan İ, S. (2013). Grape seed as a functional food ingredient in bread-making. *International Journal of Food Sciences and Nutrition, 64*(3), 372-379. 10.3109/09637486.2012.738650

Miguel-Chávez, R. S. (2017). Phenolic antioxidant capacity: A Review of the state of the art. In Soto Hernández, M. (Ed.). Phenolic compounds-Biological activity. (pp. 59-74). ISBN 978-953-51-2960-8. 10.5772/66897

Milanović, J., Malićanin, M., Rakić, V., Jevremović, N., Karabegović, I., & Danilović, B. (2021). Valorization of winery waste: Prokupac grape seed as a source of nutritionally valuable oil. *Agronomy, 11*(9), 1864. 10.3390/agronomy11091864

Mildner-Szkudlarz, S., & Bajerska, J. (2013). Protective effect of grape by-product-fortified breads against cholesterol/cholic acid diet-induced hypercholesterolaemia in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 93*(13), 3271-3278. 10.1002/jsfa.6171

Mildner-Szkudlarz, S., Bajerska, J., Zawirska-Wojtasiak, R., & Górecka, D. (2013). White grape pomace as a source of dietary fibre and polyphenols and its effect on physical and nutraceutical characteristics of wheat biscuits. *Journal of the science of food and agriculture, 93*. 10.1002/jsfa.5774

Mildner-Szkudlarz, S., Siger, A., Szwengiel, A., & Bajerska, J. (2015). Natural compounds from grape by-products enhance nutritive value and reduce formation of CML in model muffins. *Food Chemistry, 172*, 78-85. 10.1016/j.foodchem.2014.09.036

Mildner-Szkudlarz, S., Zawirska-Wojtasiak, R., Szwengiel, A., & Pacyński, M. (2011). Use of grape by-product as a source of dietary fibre and phenolic compounds in sourdough mixed rye bread. *International Journal of Food Science & Technology, 46*, 1485-1493. 10.1111/j.1365-2621.2011.02643.x

Millqvist-Fureby, A., Malmsten, M., & Bergenståhl, B. (1999). Surface characterisation of freeze-dried protein/carbohydrate mixtures. *International Journal of Pharmaceutics, 191*(2), 103-114. 10.1016/S0378-5173(99)00285-9

Miloradovic, Z. N., Kljajević, N. V., Jovanovic, S. T., Vucic, T. R., & Macej, O. D. (2014). The effect of heat treatment and skimming on precipitate formation in caprine and bovine milks. *Journal of Dairy Research, 82*, 22-28. 10.1017/S0022029914000636

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feuntein, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W., & Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function, 5*(6), 1113-1124. 10.1039/c3fo60702j

Minjares-Fuentes, R., Femenia, A., Garau, M. C., Meza-Velázquez, J. A., Simal, S., & Rosselló, C. (2014). Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: A response surface methodology approach. *Carbohydrate Polymers, 106*, 179-189. 10.1016/j.carbpol.2014.02.013

Miocinovic, J., Miloradovic, Z., Josipovic, M., Nedeljković, A., Radovanovic, M., & Pudja, P. (2016). Rheological and textural properties of goat and cow milk set type yoghurts. *International Dairy Journal, 58*, 43-45. 10.1016/j.idairyj.2015.11.006

Mitic, M. N., Souquet, J.-M., Obradovic, M. V., & Mitic, S. S. (2012). Phytochemical profiles and antioxidant activities of Serbian table and wine grapes. *Food Science and Biotechnology, 21*(6), 1619 - 1626. 10.1007/s10068-012-0215-x

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* ATCC 7469. *Journal of Functional Foods, 40*, 391-399. 10.1016/j.jff.2017.11.016

Moeller, H., Martin, D., Schrader, K., Hoffmann, W., & Lorenzen, P. (2017). Native casein micelles as nanocarriers for β-carotene: pH-and temperature-induced opening of the micellar structure. *International Journal of Food Science & Technology, 52*(5), 1122-1130. 10.1111/ijfs.13387

Moeller, H., Martin, D., Schrader, K., Hoffmann, W., & Lorenzen, P. (2018). Spray- or freeze-drying of casein micelles loaded with Vitamin D2: Studies on storage stability and *in vitro* digestibility. *LWT-Food Science and Technology, 97*, 87-93. 10.1016/j.lwt.2018.04.003

Mohansrinivasan, V., Devi, C. S., Deori, M., Biswas, A., & Naine, J. (2015). Exploring the anticancer activity of grape seed extract on skin cancer cell lines A431. *Brazilian Archives of Biology and Technology, 58*, 540-546. 10.1590/S1516-8913201500076

Mohd Yusof, H., Mohamad, R., Zaidan, U. H., & Abdul Rahman, N. (2020). Sustainable microbial cell nanofactory for zinc oxide nanoparticles production by zinc-tolerant probiotic *Lactobacillus plantarum* strain TA4. *Microbial Cell Factories, 19*, 10. 10.1186/s12934-020-1279-6

Monteiro, G. C., Minatel, I. O., Junior, A. P., Gomez-Gomez, H. A., de Camargo, J. P. C., Diamante, M. S., Silva Pereira Basílio, L., Tecchio, M. A., & Pereira Lima, G. P. (2021). Bioactive compounds and antioxidant capacity of grape pomace flours. *LWT-Food Science and Technology, 135*, 110053. 10.1016/j.lwt.2020.110053

Montilla, A., Balcones, E., Olano, A., & Calvo, M. M. (1995). Influence of heat treatments on whey protein denaturation and rennet clotting properties of cow's and goat's milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43*(7), 1908-1911. 10.1021/jf00055a028

Moreno-Montoro, M., Navarro-Alarcón, M., Bergillos-Meca, T., Giménez-Martínez, R., Sánchez-Hernández, S., & Olalla-Herrera, M. (2018). Physicochemical, nutritional, and organoleptic characterization of a skimmed goat milk fermented with the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* C4. *Nutrients, 10*(5), 633. 10.3390/nu10050633

Moreno, T., de Paz, E., Navarro, I., Rodriguez-Rojo, S., Matias, A., Duarte, C., Sanz-Buenhombre, M., & Cocero, M. (2016). Spray drying formulation of polyphenols-rich grape marc extract: Evaluation of operating conditions and different natural carriers. *Food and Bioprocess Technology, 9*. 10.1007/s11947-016-1792-0

Moros, J., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2007). Evaluation of nutritional parameters in infant formulas and powdered milk by Raman spectroscopy. *Analytica Chimica Acta, 593*(1), 30-38. 10.1016/j.aca.2007.04.036

Moser, S., Chegeni, M., Jones, O. G., Liceaga, A., & Ferruzzi, M. G. (2014). The effect of milk proteins on the bioaccessibility of green tea flavan-3-ols. *Food Research International, 66*, 297-305. 10.1016/j.foodres.2014.09.018

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods, 65*(1-2), 55-63. 10.1016/0022-1759(83)90303-4

Muhlack, R. A., Potumarthi, R., & Jeffery, D. W. (2018). Sustainable wineries through waste valorisation: A review of grape marc utilisation for value-added products. *Waste Management, 72*, 99-118. 10.1016/j.wasman.2017.11.011

Natić, M., Dabić Zagorac, D., Gašić, U., Dojcinovic, B., Ćirić, I., Relić, D., Todić, S., & Sredojević, M. (2021). Autochthonous and international grape varieties grown in Serbia - Phenolic and elemental composition. *Food Bioscience, 40*, 100889. 10.1016/j.fbio.2021.100889

Nechita, A., Cotea, V. V., Nechita, C. B., Pincu, R. R, Mihai, C. T., & Colibaba, C. L. (2012). Study of cytostatic and cytotoxic activity of several polyphenolic extracts obtained from *Vitis vinifera*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 40*, 216-221. 10.15835/nbha4017534

Nehir El, S., Karakaya, S., Simsek, S., Dupont, D., Menfaatli, E., & Eker, A. T. (2015). *In vitro* digestibility of goat milk and kefir with a new standardised static digestion method (INFOGEST cost action) and bioactivities of the resultant peptides. *Food & Function, 6*(7), 2322-2330. 10.1039/c5fo00357a

Niaura, G. (2006). Raman spectroscopy in analysis of biomolecules. In Meyers, R. A. (Ed.). Encyclopedia of Analytical Chemistry (pp. 2-29). John Wiley & Sons Ltd. 10.1002/9780470027318.a0212

Nijdam, J. J., & Langrish, T. A. G. (2006). The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. *Journal of Food Engineering, 77*, 919-925. 10.1016/j.jfoodeng.2005.08.020

Nikitina, E., Petrova, T., Vafina, A., Ezhkova, A., Nait Yahia, M., & Kayumov, A. (2022). Textural and functional properties of skimmed and whole milk fermented by novel *Lactiplantibacillus plantarum* AG10 strain isolated from silage. *Fermentation*, 8(6), 290. 10.3390/fermentation8060290

Nishitani, Y., & Osawa, R. (2003). A novel colorimetric method to quantify tannase activity of viable bacteria. *Journal of Microbiological Methods, 54*(2), 281-284. 10.1016/s0167-7012(03)00063-0

Nogales-Bueno, J., Baca-Bocanegra, B., Rooney, A., Hernández-Hierro, J. M., José Heredia, F., & Byrne, H. J. (2017). Linking ATR-FTIR and Raman features to phenolic extractability and other attributes in grape skin. *Talanta, 167*, 44-50. 10.1016/j.talanta.2017.02.008

O'Connell, J. E., Fox, P. D., Tan Kintia, R., & Fox, P. F. (1998). Effects of tea, coffee and cocoa extracts on the colloidal stability of milk and concentrated milk. *International Dairy Journal, 8*(8), 689-693. 10.1016/S0958-6946(98)00105-8

O'Kennedy, B. T., & Mounsey, J. S. (2009). The dominating effect of ionic strength on the heat-induced denaturation and aggregation of β-lactoglobulin in simulated milk ultrafiltrate. *International Dairy Journal, 19*(3), 123-128. 10.1016/j.idairyj.2008.09.004

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. 10.1016/j.ifset.2012.06.002

Obreque-Slier, E., Peña-Neira, Á., López-Solís, R., Zamora-Marín, F., Ricardo-da Silva, J. M., & Laureano, O. (2010). Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from carménère and cabernet sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*(6), 3591-3599. 10.1021/jf904314u

Obreque-Slier, E., Peña-Neira, Á., López-Solís, R., Cáceres-Mella, A., Toledo-Araya, H., & López-Rivera, A. (2013). Phenolic composition of skins from four Carmenet grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *LWT-Food Science and Technology, 54*, 404-413. 10.1016/j.lwt.2013.06.009

OIV, (2017). Focus OIV 2017. Distribution of the world's grapevine varieties. International Organisation of Vine and Wine.

OIV, (2019). OIV Statistical report on world vitiviniculture. International Organisation of Vine and Wine.

Oliveira, A. P., Silva, L. R., Ferreres, F., Guedes de Pinho, P., Valentão, P., Silva, B. M., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2010). Chemical assessment and *in vitro* antioxidant capacity of *Ficus carica* Latex. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*(6), 3393-3398. 10.1021/jf9039759

Oliveira, D. M., Marques, D. R., Kwiatkowski, A., Monteiro, A. R. G., & Clemente, E. (2013). Sensory analysis and chemical characterization of cereal enriched with grape peel and seed flour. *Acta Scientiarum Technology, 35*, 427-431. 10.4025/actascitechnol.v35i3.13176

Oliveira, J., Alhinho da Silva, M., Teixeira, N., de Freitas, V., & Salas, E. (2015). Screening of anthocyanins and anthocyanin-derived pigments in red wine grape pomace using LC-DAD/MS and MALDI-TOF techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63*(35), 7636-7644. 10.1021/acs.jafc.5b00256

Olubi, O., Felix-Minnaar, J. V., & Jideani, V. A. (2019). Physicochemical and fatty acid profile of egusi oil from supercritical carbon dioxide extraction. *Heliyon, 5*(1), e01083. 10.1016/j.heliyon.2018.e01083

Ortega-Heras, M., Gómez, I., de Pablos-Alcalde, S., & González-Sanjosé, M. L. (2019). Application of the just-about-right scales in the development of new healthy whole-wheat muffins by the addition of a product obtained from white and red grape pomace. *Foods, 8*(9), 419. 10.3390/foods8090419

Ozdal, T., Capanoglu, E., & Altay, F. (2013). A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International, 51*(2), 954-970. 10.1016/j.foodres.2013.02.009

Ozdal, T., Yalcinkaya, İ., Toydemir, G., & Capanoglu, E. (2018). Polyphenol-protein interactions and changes in functional properties and digestibility. In book. Reference Module in Food Science. 10.1016/B978-0-08-100596-5.21490-X

Pan, L.-H., Liu, F., Luo, S.-Z., & Luo, J.-p. (2019). Pomegranate juice powder as sugar replacer enhanced quality and function of set yogurts: Structure, rheological property, antioxidant activity and *in vitro* bioaccessibility. *LWT-Food Science and Technology, 115*, 108479. 10.1016/j.lwt.2019.108479

Pantelić, M. M., Dabić Zagorac, D. Č., Davidović, S. M., Todić, S. R., Bešlić, Z. S., Gašić, U. M., Tešić, Ž. Lj., & Natić, M. M. (2016). Identification and quantification of phenolic compounds in berry skin, pulp, and seeds in 13 grapevine varieties grown in Serbia. *Food Chemistry, 211*, 243-252. 10.1016/j.foodchem.2016.05.051

Pardo, J. E., Fernández, E., Rubio, M., Alvarruiz, A., & Alonso, G. L. (2009). Characterization of grape seed oil from different grape varieties (*Vitis Vinifera*). *European Journal of Lipid Science and Technology, 111*, 188-193. 10.1002/ejlt.200800052

Park, H., Lee, M., Kim, K.-T., Park, E., & Paik, H.-D. (2018). Antioxidant and antigenotoxic effect of dairy products supplemented with red ginseng extract. *Journal of Dairy Science, 101*(10), 8702-8710. 10.3168/jds.2018-14690

Park, Y. W. (2017). Goat Milk – Chemistry and Nutrition. In Park, Y. W., Haenlein, G. F. W., & Wendorff, W. L. (Ed.). Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals (2nd edition). (pp. 42-83). JohnWiley & Sons Ltd.

Pasini Deolindo, C. T., Monteiro, P. I., Santos, J. S., Cruz, A. G., da Silva, M. C., & Granato, D. (2019). Phenolic-rich *Petit Suisse* cheese manufactured with organic Bordeaux grape juice, skin, and seed extract: Technological, sensory, and functional properties. *LWT-Food Science and Technology, 115*, 108493. 10.1016/j.lwt.2019.108493

Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26*(3), 716-723. 10.1021/jf60217a041

Peixoto, C. M., Dias, M. I., Alves, M. J., Calhelha, R. C., Barros, L., Pinho, S. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry, 253*, 132-138. 0.1016/j.foodchem.2018.01.163

Pękal, A., & Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods, 7*(9), 1776-1782. 10.1007/s12161-014-9814-x

Perestrelo, R., Lu, Y., Santos, S. A. O., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P., Câmara, J. S., & Rocha, S. M. (2012). Phenolic profile of Sercial and Tinta Negra *Vitis vinifera* L. grape skins by HPLC-DAD-ESI-MS^n. Novel phenolic compounds in *Vitis vinifera* L. grape. *Food Chemistry, 135*, 94-104. 10.1016/j.foodchem.2012.04.102

Pérez-Ortiz, J. M., Alguacil, L. F., Salas, E., Hermosín-Gutiérrez, I., Gómez-Alonso, S., & González-Martín, C. (2019). Antiproliferative and cytotoxic effects of grape pomace and grape seed extracts on colorectal cancer cell lines. *Food science & nutrition, 7*(9), 2948-2957. 10.1002/fsn3.1150

Pérez Navarro, J., Izquierdo-Cañas, P. M., Mena-Morales, A., Martínez-Gascueña, J., Chacón-Vozmediano, J. L., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I., & Gómez-Alonso, S. (2019). Phenolic compounds profile of different berry parts from novel *Vitis vinifera* L. red grape genotypes and Tempranillo using HPLC-DAD-ESI-MS/MS: A varietal differentiation tool. *Food Chemistry, 295*, 350-360. 10.1016/j.foodchem.2019.05.137

Perna, A., Simonetti, A., Grassi, G., & Gambacorta, E. (2018). Effect of α_{S1}-casein genotype on phenolic compounds and antioxidant activity in goat milk yogurt fortified with *Rhus coriaria* leaf powder. *Journal of Dairy Science, 101*, 7691-7701. 10.3168/jds.2018-14613

Perumalla, A. V. S., & Hettiarachchy, N. S. (2011). Green tea and grape seed extracts — Potential applications in food safety and quality. *Food Research International, 44*(4), 827-839. 10.1016/j.foodres.2011.01.022

Pesic, M. B., Barac, M. B., Stanojevic, S. P., & Vrvić, M. M. (2016). Heat-induced casein–whey protein interactions in caprine milk: Whether are similar to bovine milk? In Nedović, V. (Ed.). Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food. (pp.163-175). Springer International Publishing Switzerland. 10.1007/978-3-319-24040-4_9

Pešić M. B., Barać M. M., Maćej O. D, Ristić N. M, Stanojević S. P, Vrvić M. M (2011): Micellar/Serum distribution of heat-induced whey protein/κ-CN complexes in caprine milk. 2nd FCUB ERA Workshop: Food Chemistry and Biotechnology, Belgrade, Serbia, October 18-19, p. 21 (Web. www.fcub-era.rs)

Pešić M.B., Barać M. B., Stanojević S. P., Maćej, O. D., Vrvić M. M. (2013): Emulsifying properties of caprine milk: the influence of pHs, 24th International Scientific-Expert Conference on Agriculture and Food Industry, Sarajevo, Bosnia and Hercegovina, September 25-28, Book of Abstracts, 112. (http://www.agriconference.ba/)

Pešić, M. B. (2011). Biohemijske karakteristike i tehnološka funkcionalna svojstva termički i enzimski tretiranih mleka različitog porekla. Doktorska disertacija, Hemijski Fakultet, 12.07.2011, Beograd.

Pesic, M. B., Barac, M. B., Stanojevic, S. P., Ristic, N. M., Macej, O. D., & Vrvic, M. M. (2012). Heat induced casein–whey protein interactions at natural pH of milk: A comparison between caprine and bovine milk. *Small Ruminant Research, 108*(1), 77-86. 10.1016/j.smallrumres.2012.06.013

Pesic, M. B., Barac, M. B., Stanojevic, S. P., & Vrvic, M. M. (2014). Effect of pH on heat-induced casein-whey protein interactions: A comparison between caprine milk and bovine milk. *International Dairy Journal, 39*(1), 178-183. 10.1016/j.idairyj.2014.06.006

Pešić. M. B. Barać, M. B., Stanojević S. P., Kostić A.Ž, Vrvić M. M. (2014). Foaming properties of caprine milk: whether are improved by heating?, II International Congress "Food Technology, Quality and Safety"-FoodTech 2014, 28-30 October, Novi Sad, Book of Abstracts, pp 63. http://niv.ns.ac.rs/full/Effecm14.pdf

Pešić, M.B., Barać, M.B., Stanojević, S.P., Vrvić, M.M. (2018). Structure and function of milk protein complexes generating during milk processing. UNIFood Conference University of Belgrade (210th Anniversary), Belgrade, Serbia, 5-6 Octobre 2018.

Petrovic, M. P., Caro Petrović, V., Ruzic Muslic, D., Maksimovic, N., Cekic, B., Ilić, Z. Z., & Kurcubic, V. (2017). Strategy for sustainable development and utilization of sheep and goat resources in serbia. In 2nd International Conference on Sustainable Agriculture and Food Security: A Comprehensive Approach, KnE Life Sciences, pp. 11–21. 10.18502/kls.v2i6.1015

Pineda-Vadillo, C., Nau, F., Guerin Dubiard, C., Cheynier, V., Meudec, E., Sanz-Buenhombre, M., Guadarrama, A., Tóth, T., Csavajda, E., Hingyi, H., Karakaya, S., Sibakov, J., Capozzi, F., Bordoni, A., & Dupont, D. (2016). *In vitro* digestion of dairy and egg products enriched with grape extracts: Effect of the food matrix on polyphenol bioaccessibility and antioxidant activity. *Food Research International, 88*, 284-292. 10.1016/j.foodres.2016.01.029

Pineda-Vadillo, C., Nau, F., Guerin-Dubiard, C., Jardin, J., Lechevalier, V., Sanz-Buenhombre, M., Guadarrama, A., Tóth, T., Csavajda, E., Hingyi, H., Karakaya, S., Sibakov, J., Capozzi, F., Bordoni, A., & Dupont, D. (2017). The food matrix affects the anthocyanin profile of fortified egg and dairy matrices during processing and *in vitro* digestion. *Food Chemistry, 214*, 486-496. 10.1016/j.foodchem.2016.07.049

Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology, 17*, 579-590. 10.1016/j.tifs.2006.05.003

Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., & Núñez, M. J. (2005). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(6), 2111-2117. 10.1021/jf0488110

Ping, L., Brosse, N., Sannigrahi, P., & Ragauskas, A. (2011). Evaluation of grape stalks as a bioresource. *Industrial Crops and Products, 33*, 200-204. 10.1016/j.indcrop.2010.10.009

Pinho, S. C. M., Faria, M. A., Melo, A., Pinto, E., Almeida, A., Alves, R., Cabrita, A. R. J., Fonseca, A. J. M., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2021). Effect of skimmed milk on intestinal tract: Prevention of increased reactive oxygen species and nitric oxide formation. *International Dairy Journal, 118*, 105046. 10.1016/j.idairyj.2021.105046

Pintać, D., Majkić, T., Torović, L., Orčić, D., Beara, I., Simin, N., Mimica-Dukić, N., & Lesjak, M. (2018). Solvent selection for efficient extraction of bioactive compounds from grape pomace. *Industrial Crops and Products, 111,* 379-390. 10.1016/j.indcrop.2017.10.038

Planinić, M., Aliakbarian, B., Perego, P., Greganić, K., Tomas, S., & Bucić-Kojić, A. (2015). Influence of temperature and drying time on extraction yield of phenolic compounds from grape pomace variety "Portogizac". *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 29,* 343-350. 10.15255/CABEQ.2015.2278

Podsędek, A., Majewska, I., Redzynia, M., Sosnowska, D., & Koziołkiewicz, M. (2014). *In vitro* inhibitory effect on digestive enzymes and antioxidant potential of commonly consumed fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62*(20), 4610-4617. 10.1021/jf5008264

Pompeu, D. R., Larondelle, Y., Rogez, H., Abbas, O., Pierna, J. A. F., & Baeten, V. (2017). Characterization and discrimination of phenolic compounds using Fourier transform Raman spectroscopy and chemometric tools. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement – DOAJ, 22,* 13-28. 10.25518/1780-4507.16270

Poncet-Legrand, C., Edelmann, A., Putaux, J.-L., Cartalade, D., Sarni-Manchado, P., & Vernhet, A. (2006). Poly(l-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids, 20*(5), 687-697. 10.1016/j.foodhyd.2005.06.009

Power, O., Jakeman, P., & FitzGerald, R. J. (2013). Antioxidative peptides: Enzymatic production, *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids, 44*(3), 797-820. 10.1007/s00726-012-1393-9

Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry, 269*(2), 337-341. 10.1006/abio.1999.4019

Prigent, S. V. E., Voragen, A. G. J., van Koningsveld, G. A., Baron, A., Renard, C. M. G. C., & Gruppen, H. (2009). Interactions between globular proteins and procyanidins of different degrees of polymerization. *Journal of Dairy Science, 92*(12), 5843-5853. 10.3168/jds.2009-2261

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(10), 4290-4302. 10.1021/jf0502698

Prozil, S. O., Evtuguin, D. V., & Lopes, L. P. C. (2012). Chemical composition of grape stalks of *Vitis vinifera* L. from red grape pomaces. *Industrial Crops and Products, 35*(1), 178-184. 10.1016/j.indcrop.2011.06.035

Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Radojčin, M., & Dragović-Uzelac, V.. (2016). Influence of acidity and extraction time on the recovery of flavonoids from grape skin pomace optimized by response surface methodology. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 30,* 455-464. 10.15255/CABEQ.2016.914

Qie, X., Cheng, Y., Chen, Y., Zeng, M., Wang, Z., Qin, F., Chen, J., Li, W., & He, Z. (2022). *In vitro* phenolic bioaccessibility of coffee beverages with milk and soy subjected to thermal treatment and protein-phenolic interactions. *Food Chemistry, 375,* 131644. 10.1016/j.foodchem.2021.131644

Qu, Y., Tian, Y., Chen, Y., & He, L. (2020). Chemical profiling of red wines using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). *Analytical Methods, 12*(10), 1324-1332. 10.1039/d0ay00099j

Quan, T. H., Benjakul, S., Sae-leaw, T., Balange, A. K., & Maqsood, S. (2019). Protein–polyphenol conjugates: Antioxidant property, functionalities and their applications. *Trends in Food Science & Technology, 91,* 507-517. 10.1016/j.tifs.2019.07.049

Quan, W., Qie, X., Chen, Y., Zeng, M., Qin, F., Chen, J., & He, Z. (2020). Effect of milk addition and processing on the antioxidant capacity and phenolic bioaccessibility of coffee by using an *in vitro* gastrointestinal digestion model. *Food Chemistry, 308,* 125598. 10.1016/j.foodchem.2019.125598

Quero, J., Jiménez-Moreno, N., Esparza, I., Osada, J., Cerrada, E., Ancín-Azpilicueta, C., & Rodríguez-Yoldi, M. J. (2021). Grape stem extracts with potential anticancer and antioxidant properties. *Antioxidants, 10*(2), 243. 10.3390/antiox10020243

Rahimi Yazdi, S., & Corredig, M. (2012). Heating of milk alters the binding of curcumin to casein micelles. A fluorescence spectroscopy study. *Food Chemistry, 132*(3), 1143-1149. 10.1016/j.foodchem.2011.11.019

Ramos-Pineda, A. M., Carpenter, G. H., García-Estévez, I., & Escribano-Bailón, M. T. (2020). Influence of chemical species on polyphenol–protein interactions related to wine astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68*(10), 2948-2954. 10.1021/acs.jafc.9b00527

Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2012). Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. *Food Chemistry, 135*, 1411-1418. 10.1016/j.foodchem.2012.06.025

Razumovsky, L., & Damodaran, S. (1999). Surface activity−compressibility relationship of proteins at the air−water interface. *Langmuir, 15*(4), 1392-1399. 10.1021/la980873v

Reiner, J., Protte, K., & Hinrichs, J. (2020). Investigation of the applicability of raman spectroscopy as online process control during consumer milk production. *ChemEngineering, 4*(3), 45. 10.3390/chemengineering4030045

Restuccia, D., Sicari, V., Pellicanò, T. M., Spizzirri, U. G., & Loizzo, M. R. (2017). The impact of cultivar on polyphenol and biogenic amine profiles in Calabrian red grapes during winemaking. *Food Research International, 102*, 303-312. 10.1016/j.foodres.2017.10.012

Ribeiro, L. F., Ribani, R. H., Francisco, T. M. G., Soares, A. A., Pontarolo, R., & Haminiuk, C. W. I. (2015). Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. *Journal of Chromatography B, 1007*, 72-80. 10.1016/j.jchromb.2015.11.005

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science, 2*(4), 152-159. 10.1016/S1360-1385(97)01018-2

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine, 20*(7), 933-956. 10.1016/0891-5849(95)02227-9

Rockenbach, I. I., Gonzaga, L. V., Rizelio, V. M., de Souza Schmidt Gonçalves, A. E., Genovese, M. I., & Fett, R. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Research International, 44*(4), 897-901. 10.1016/j.foodres.2011.01.049

Rockenbach, I. I., Jungfer, E., Ritter, C., Santiago-Schübel, B., Thiele, B., Fett, R., & Galensa, R. (2012). Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MS^n and LC-ESI-FTICR-MS. *Food Research International, 48*(2), 848-855. 10.1016/j.foodres.2012.07.001

Rodríguez-Durán, L. V., Valdivia-Urdiales, B., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2011). Novel strategies for upstream and downstream processing of tannin acyl hydrolase. *Enzyme research, 2011*, 823619. 10.4061/2011/823619

Rodríguez-Roque, M. J., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Pilar Cano, M., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2015). Impact of food matrix and processing on the *in vitro* bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. *Journal of Functional Foods, 14*, 33-43. 10.1016/j.jff.2015.01.020

Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2014). *In vitro* bioaccessibility of health-related compounds as affected by the formulation of fruit juice- and milk-based beverages. *Food Research International, 62*, 771-778. 10.1016/j.foodres.2014.04.037

Rodriguez-Saona, L., & Wrolstad, R. (2001). Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F1.1.1-F1.1.11.

Rodríguez, H., Angulo, I., de Las Rivas, B., Campillo, N., Páez, J. A., Muñoz, R., & Mancheño, J. M. (2010). p-Coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: structural insights into the active site and decarboxylation catalytic mechanism. *Proteins, 78*(7), 1662-1676. 10.1002/prot.22684

Rodríguez Montealegre, R., Romero Peces, R., Chacón Vozmediano, J. L., Martínez Gascueña, J., & García Romero, E. (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis, 19*(6), 687-693. 10.1016/j.jfca.2005.05.003

Rygula, A., Majzner, K., Marzec, K. M., Kaczor, A., Pilarzyk, M., & Baranska, M. (2013). Raman spectroscopy of proteins: A Review. *Journal of Raman Spectroscopy, 44*, 1061-1076. 10.1002/jrs.4335

Sagdic, O., Ozturk, I., Ozkan, G., Yetim, H., Ekici, L., & Yilmaz, M. T. (2011). RP-HPLC-DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: Evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices. *Food Chemistry, 126*(4), 1749-1758. 10.1016/j.foodchem.2010.12.075

Sánchez, B., Fernández-García, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Ruas-Madiedo, P. (2010). Technological and probiotic selection criteria of a bile-adapted *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain. *International Dairy Journal, 20*(11), 800-805. 10.1016/j.idairyj.2010.06.004

Sanchón, J., Fernández-Tomé, S., Miralles, B., Hernández-Ledesma, B., Tomé, D., Gaudichon, C., & Recio, I. (2018). Protein degradation and peptide release from milk proteins in human jejunum. Comparison with *in vitro* gastrointestinal simulation. *Food Chemistry, 239*, 486-494. 10.1016/j.foodchem.2017.06.134

Sansone, F., Esposito, T., Rosaria Lauro, M., Picerno, P., Mencherini, T., Gasparri, F., De Santis, S., Chieppa, M., Cirillo, C., & Aquino, R. (2018). Application of spray drying particle engineering to a high-functionality/low-solubility milk thistle extract: Powders production and characterization. *Molecules, 23*, 1716. 10.3390/molecules23071716

Sant'Anna, V., Christiano, F. D. P., Marczak, L. D. F., Tessaro, I. C., & Thys, R. C. S. (2014). The effect of the incorporation of grape marc powder in fettuccini pasta properties. *LWT - Food Science and Technology, 58*(2), 497-501. 10.1016/j.lwt.2014.04.008

Saura-Calixto, F. (1998). Antioxidant dietary fiber product: A new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46*(10), 4303-4306. 10.1021/jf9803841

Saura-Calixto, F., Goñi, I., Mañas, E., & Abia, R. (1991). Klason lignin, condensed tannins and resistant protein as dietary fibre constituents: determination in grape pomaces. *Food Chemistry, 39*(3), 299-309. 10.1016/0308-8146(91)90147-G

Schaller-Povolny, L., & Smith, D. (2002). Interaction of milk proteins with inulin. *Milchwissenschaft, 57*(9-10), 494-497.

Schiano, E., Piccolo, V., Novellino, E., Maisto, M., Iannuzzo, F., Summa, V., & Tenore, G. C. (2022). Thinned nectarines, an agro-food waste with antidiabetic potential: HPLC-HESI-MS/MS phenolic characterization and *in vitro* evaluation of their beneficial activities. *Foods, 11*(7), 1010. 10.3390/foods11071010

Sęczyk, Ł., Sugier, D., Świeca, M., & Gawlik-Dziki, U. (2021). The effect of *in vitro* digestion, food matrix, and hydrothermal treatment on the potential bioaccessibility of selected phenolic compounds. *Food Chemistry, 344*, 128581. 10.1016/j.foodchem.2020.128581

Sengul, H., Surek, E., & Nilufer-Erdil, D. (2014). Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (*Punica granatum*) phenolics and anthocyanins using an *in-vitro* gastrointestinal digestion model. *Food Research International, 62*, 1069-1079. 10.1016/j.foodres.2014.05.055

Serpen, A., Gökmen, V., & Fogliano, V. (2012). Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. *Meat Science, 90*(1), 60-65. 10.1016/j.meatsci.2011.05.027

Serra, A., Macià, A., Romero, M.-P., Valls, J., Bladé, C., Arola, L., & Motilva, M.-J. (2010). Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in *in vitro* and *in vivo* models. *British Journal of Nutrition, 103*(7), 944-952. 10.1017/S0007114509992741

Sharma, H., Singh, A. K., Deshwal, G. K., Rao, P. S., & Kumar, M. D. (2021). Functional *Tinospora cordifolia* (*giloy*) based pasteurized goat milk beverage: Impact of milk protein-polyphenol interaction on

bioactive compounds, anti-oxidant activity and microstructure. *Food Bioscience, 42*, 101101. 10.1016/j.fbio.2021.101101

Sharma, R. J., Gupta, R. C., Singh, S., Bansal, A. K., & Singh, I. P. (2016). Stability of anthocyanins- and anthocyanidins-enriched extracts, and formulations of fruit pulp of *Eugenia jambolana* ('jamun'). *Food Chemistry, 190*, 808-817. 10.1016/j.foodchem.2015.06.029

Shori, A. B. (2022). Storage quality and antioxidant properties of yogurt fortified with polyphenol extract from nutmeg, black pepper, and white pepper. *Electronic Journal of Biotechnology, 57*, 24-30. 10.1016/j.ejbt.2022.03.003

Siebert, K. J., Troukhanova, N. V., & Lynn, P. Y. (1996). Nature of polyphenol−protein interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44*(1), 80-85. 10.1021/jf9502459

Silva, F. A., de Oliveira, M. E. G, de Figueirêdo, R. M. F., Sampaio, K. B., Leita de Souza, E., de Oliveira, C. E. V., Pintado, M. M. E., & de Cássia Ramos do Egypto Queiroga, R. (2017). Effect of Isabel grape addition on the physicochemical, microbiological and sensory characteristics of probiotic goat milk yogurt. *Food & Function, 8*(6), 2121-2132. 10.1039/C6FO01795A

Silva, F. A., de Cássia Ramos do Egypto Queiroga, R., de Souza, E. L., Voss, G. B., da Silva Campelo Borges, G., dos Santos Lima, M., Pintado, M. M. E., & da Silva Vasconcelos, M. A. (2022). Incorporation of phenolic-rich ingredients from integral valorization of Isabel grape improves the nutritional, functional and sensory characteristics of probiotic goat milk yogurt. *Food Chemistry, 369*, 130957. 10.1016/j.foodchem.2021.130957

Silva, L. A., Lopes Neto, J. H. P., & Cardarelli, H. R. (2019). Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*: technological properties, biological activity, and potential application in the food industry. *Annals of Microbiology, 69*(4), 321-328. 10.1007/s13213-019-01456-9

Silva, M. G., de Paula, I. L., Stephani, R., Edwards, H. G. M., & de Oliveira, L. F. C. (2021). Raman spectroscopy in the quality analysis of dairy products: A literature review. *Journal of Raman Spectroscopy*. *52*(12), 2444-2478. 10.1002/jrs.6214

Simonetti, A., Perna, A., Grassi, G., & Gambacorta, E. (2021). *In vitro* phenols bioaccessibility and antioxidant activity of goat milk yogurt fortified with *Rhus coriaria* leaf powder. *Journal of Food Science, 86*(4), 1400-1409. 10.1111/1750-3841.15661

Simonovic, Z., Petrovic, D., & Curcic, N. (2019). Production of grapes and wine in Serbia. *Ekonomika, 65*, 11-20. 10.5937/ekonomika1904011S

Simsek, S., Sánchez-Rivera, L., El, S. N., Karakaya, S., & Recio, I. (2017). Characterisation of *in vitro* gastrointestinal digests from low fat caprine kefir enriched with inulin. *International Dairy Journal, 75*, 68-74. 10.1016/j.idairyj.2017.07.004

Singha, I., & Das, S. K. (2015). Free radical scavenging properties of skin and pulp extracts of different grape cultivars *in vitro* and attenuation of H2O2-induced oxidative stress in liver tissue *ex vivo*. *Indian Journal of Clinical Biochemistry, 30*(3), 305-312. 10.1007/s12291-014-0442-4

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology, 299*, 152-178. 10.1016/S0076-6879(99)99017-1

Smith, I. N., & Yu, J. (2015). Nutritional and sensory quality of bread containing different quantities of grape pomace from different grape cultivars. *EC Nutrition, 2*, 291-301.

Soto, M. U. R., Brown, K., & Ross, C. F. (2012). Antioxidant acivity and consumer acceptance of grape seed flour-containing food products. *International Journal of Food Science & Technology, 47*, 592-602. 10.1111/j.1365-2621.2011.02882.x

Sousa, E. C., Uchôa-Thomaz, A. M. A., Carioca, J. O. B., de Morais, S. M., de Lima, A., Martins, C. G., Alexandrino, C. D., Ferreira, P. A. T., Rodrigues, A. L. M., Rodrigues, S. P., Silva, J. d. N., & Rodrigues, L. L. (2014). Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera* L.), Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil. *Food Science and Technology, 34*, 135-142. 0.1590/S0101-20612014000100020

Spigno, G., Pizzorno, T., & De Faveri, D. M. (2008). Cellulose and hemicelluloses recovery from grape stalks. *Bioresource Technology, 99*(10), 4329-4337. 10.1016/j.biortech.2007.08.044

Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering, 81*(1), 200-208. 10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021

Šporin, M., Avbelj, M., Kovač, B., & Možina, S. S. (2018). Quality characteristics of wheat flour dough and bread containing grape pomace flour. *Food Science and Technology International, 24*(3), 251-263. 10.1177/1082013217745398

Sridhar, K., & Charles, A. L. (2021). Fortification using grape extract polyphenols – A review on functional food regulations. *International Journal of Food Science & Technology, 56*(8), 3742-3751. 10.1111/ijfs.15001

Sroka, Z., & Cisowski, W. (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology, 41*(6), 753-758. 10.1016/S0278-6915(02)00329-0

Stanisavljević, N., Samardžić, J., Janković, T., Šavikin, K., Mojsin, M., Topalović, V., & Stevanović, M. (2015). Antioxidant and antiproliferative activity of chokeberry juice phenolics during *in vitro* simulated digestion in the presence of food matrix. *Food Chemistry, 175*, 516-522. 10.1016/j.foodchem.2014.12.009

Sugiyama, H., Akazome, Y., Shoji, T., Yamaguchi, A., Yasue, M., Kanda, T., & Ohtake, Y. (2007). Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*(11), 4604-4609. 10.1021/jf070569k

Šuković, D., Knežević, B., Gašić, U., Sredojević, M., Ćirić, I., Todić, S., Mutić, J., & Tešić, Ž. (2020). Phenolic profiles of leaves, grapes and wine of grapevine variety vranac (*Vitis vinifera* L.) from Montenegro. *Foods, 9*(2), 138. 10.3390/foods9020138

Sun, X., Cheng, X., Zhang, J., Ju, Y., Que, Z., Liao, X., Lao, F., Fang, Y., & Ma, T. (2020). Letting wine polyphenols functional: Estimation of wine polyphenols bioaccessibility under different drinking amount and drinking patterns. *Food Research International, 127*, 108704. 10.1016/j.foodres.2019.108704

Surber, G., Rohm, H., & Jaros, D. (2022). The role of exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* on physical properties of stirred skim milk gel. *Dairy*, 3(4), 761-775. 10.3390/dairy3040052

Szabó, É., Marosvölgyi, T., Szilágyi, G., Kőrösi, L., Schmidt, J., Csepregi, K., Márk, L., & Bóna, Á. (2021). Correlations between total antioxidant capacity, polyphenol and fatty acid content of native grape seed and pomace of four different grape varieties in Hungary. *Antioxidants, 10*(7), 1101. 10.3390/antiox10071101

Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., & Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry, 113*(4), 1226-1233. 10.1016/j.foodchem.2008.08.013

Tagliazucchi, D., Helal, A., Verzelloni, E., & Conte, A. (2012). The type and concentration of milk increase the *in vitro* bioaccessibility of coffee chlorogenic acids. *Journal of agricultural and Food Chemistry, 60*(44), 11056-11064. 10.1021/jf302694a

Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of grape. *Food Chemistry, 120*, 599-606. 10.1016/j.foodchem.2009.10.030

Talwalkar, A., & Kailasapathy, K. (2004). A Review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: Influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 3*(3), 117-124. 10.1111/j.1541-4337.2004.tb00061.x

Tang, G.-Y., Zhao, C.-N., Liu, Q., Feng, X.-L., Xu, X.-Y., Cao, S.-Y., Meng, X., Li, S., Gan, R.-Y., & Li, H.-B. (2018). Potential of grape wastes as a natural source of bioactive compounds. *Molecules, 23*(10), 2598. 10.3390/molecules23102598

Tarko, T., Duda-Chodak, A., & Zajac, N. (2013). Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by *in vitro* simulation methods. A review. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny, 64*, 79-84.

Taterka, H., & Castillo, M. (2015). The effect of whey protein denaturation on light backscatter and particle size of the casein micelle as a function of pH and heat-treatment temperature. *International Dairy Journal, 48*, 53-59. 10.1016/j.idairyj.2015.01.017

Thakur, N., Raigond, P., Singh, Y., Mishra, T., Singh, B., Lal, M. K., & Dutt, S. (2020). Recent updates on bioaccessibility of phytonutrients. *Trends in Food Science & Technology, 97*, 366-380. 10.1016/j.tifs.2020.01.019

Thakur, S., Singh, N., Kaur, A., & Singh, B. (2017). Effect of extrusion on physicochemical properties, digestibility, and phenolic profiles of grit fractions obtained from dry milling of normal and waxy corn. *Journal of Food Science, 82*(5), 1101-1109. 10.1111/1750-3841.13692

Theagarajan, R., Narayanaswamy, L. M., Dutta, S., Moses, J. A., & Chinnaswamy, A. (2019). Valorisation of grape pomace (cv. *Muscat*) for development of functional cookies. *International Journal of Food Science & Technology, 54* 1299-1305. 10.1111/ijfs.14119

Tolano-Villaverde, I. J., Brauer, J. M., Ocaño-Higuera, V. M., Torres-Arreola, W., Ramirez-Wong, B., Herrera-Urbina, R., & Marquez Rios, E. (2016). Effect of pH and chitosan concentration on gelation of protein concentrate from giant squid mantle (*Dosidicus gigas*). *International Journal of Food Science & Technology, 51*, 1360-1368. 10.1111/ijfs.13095

Tomas, M., Beekwilder, J., Hall, R. D., Diez Simon, C., Sagdic, O., & Capanoglu, E. (2017). Effect of dietary fiber (inulin) addition on phenolics and *in vitro* bioaccessibility of tomato sauce. *Food Research International, 106*, 129-135. 10.1016/j.foodres.2017.12.050

Tomas, M., Rocchetti, G., Ghisoni, S., Giuberti, G., Capanoglu, E., & Lucini, L. (2020). Effect of different soluble dietary fibres on the phenolic profile of blackberry puree subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion and large intestine fermentation. *Food Research International, 130*, 108954. 10.1016/j.foodres.2019.108954

Tomić, N., Koković, J., Jakšić, D., Ninkov, J., Vasin, J., Malićanin, M., & Marković, S. B. (2017). Terroir of the Tri Morave Wine Region (Serbia) as a basis for producing wines with geographical indication. *Geographica Pannonica, 21*, 166-178. 10.5937/GeoPan1703166T

Tournour, H. H., Segundo, M. A., Magalhães, L. M., Barreiros, L., Queiroz, J., & Cunha, L. M. (2015). Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. *Industrial Crops and Products, 74*, 397-406. 10.1016/j.indcrop.2015.05.055

Tseng, A., & Zhao, Y. (2012). Effect of different drying methods and storage time on the retention of bioactive compounds and antibacterial activity of wine grape pomace (Pinot Noir and Merlot). *Journal of Food Science, 77*(9), H192-201. 10.1111/j.1750-3841.2012.02840.x

Tseng, A., & Zhao, Y. (2013). Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chemistry, 138*, 356-365. 10.1016/j.foodchem.2012.09.148

Unusan, N. (2020). Proanthocyanidins in grape seeds: An updated review of their health benefits and potential uses in the food industry. *Journal of Functional Foods, 67*, 103861. 10.1016/j.jff.2020.103861

Varandas, S., Teixeira, M. J., Marques, J. C., Aguiar, A., Alves, A., & Bastos, M. M. S. M. (2004). Glucose and fructose levels on grape skin: interference in *Lobesia botrana* behaviour. *Analytica Chimica Acta, 513*(1), 351-355. 10.1016/j.aca.2003.11.086

Vatai, T., Škerget, M., & Knez, Ž. (2009). Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering, 90*(2), 246-254. 10.1016/j.jfoodeng.2008.06.028

Venkitasamy, C., Zhao, L., Zhang, R., & Pan, Z. (2019). Grapes. In Pan, Z., Zhang, R., & Zicari, S. (Ed.). Integrated processing technologies for food and agricultural by-products. (pp. 133-163). Elsevier Inc. 10.1016/B978-0-12-814138-0.00006-X

Verruck, S., Dantas, A., & Prudencio, E. S. (2019). Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health. *Journal of Functional Foods, 52*, 243-257. 10.1016/j.jff.2018.11.017

Vieira, S. A., Zhang, G., & Decker, E. A. (2017). Biological implications of lipid oxidation products. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 94*(3), 339-351. 10.1007/s11746-017-2958-2

Villalva, M., Jaime, L., Arranz, E., Zhao, Z., Corredig, M., Reglero, G., & Santoyo, S. (2020). Nanoemulsions and acidified milk gels as a strategy for improving stability and antioxidant activity of yarrow phenolic compounds after gastrointestinal digestion. *Food Research International, 130*, 108922. 10.1016/j.foodres.2019.108922

Vodnar, D. C., Adriana, P., Dulf, F. V., & Socaciu, C. (2010). HPLC characterization of lactic acid formation and FTIR fingerprint of probiotic bacteria during fermentation processes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 38*, 109-113. 10.15835/nbha3824752

Vučić, V., Arsić, A., Petrović, S., Milanović, S., Gurinović, M., & Glibetić, M. (2015). Trans fatty acid content in Serbian margarines: Urgent need for legislative changes and consumer information. *Food Chemistry, 185*, 437-440. 10.1016/j.foodchem.2015.04.018

Walker, R., Tseng, A., Cavender, G., Ross, A., & Zhao, Y. (2014). Physicochemical, nutritional, and sensory qualities of wine grape pomace fortified baked goods. *Journal of Food Science, 79*(9), S1811-1822. 10.1111/1750-3841.12554

Wang, H. R., Sui, H. C., Ding, Y. Y., & Zhu, B. T. (2018). Stimulation of the production of prostaglandin E_2 by ethyl gallate, a natural phenolic compound richly contained in *Longan*. *Biomolecules, 8*(3), 91. 10.3390/biom8030091

Wang, S., Amigo-Benavent, M., Mateos, R., Bravo, L., & Sarriá, B. (2017). Effects of *in vitro* digestion and storage on the phenolic content and antioxidant capacity of a red grape pomace. *International Journal of Food Sciences and Nutrition, 68*(2), 188-200. 10.1080/09637486.2016.1228099

Wang, S., Gu, B.-J., & Ganjyal, G. M. (2019). Impacts of the inclusion of various fruit pomace types on the expansion of corn starch extrudates. *LWT-Food Science and Technology, 110*, 223-230. 10.1016/j.lwt.2019.03.094

Wang, X., Ye, A., Lin, Q., Han, J., & Singh, H. (2018). Gastric digestion of milk protein ingredients: Study using an *in vitro* dynamic model. *Journal of Dairy Science, 101*(8), 6842-6852. 10.3168/jds.2017-14284

Waterhouse, G. I., Sun-Waterhouse, D., Su, G., Zhao, H., & Zhao, M. (2017). Spray-drying of antioxidant-rich blueberry waste extracts; interplay between waste pretreatments and spray-drying process. *Food and Bioprocess Technology, 10*(6), 1074-1092. 10.1007/s11947-017-1880-9

Wiercigroch, E., Szafraniec, E., Czamara, K., Pacia, M. Z., Majzner, K., Kochan, K., Kaczor, A., Baranska, M., & Malek, K. (2017). Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 185*, 317-335. 10.1016/j.saa.2017.05.045

Wijendran, V., & Hayes, K. C. (2004). Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annual Review of Nutrition, 24*(1), 597-615. 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132106

Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczuk, A., Oniszczuk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., & Matwijczuk, A. (2020). Influence of *in vitro* digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols—A non-systematic Review. *Nutrients, 12*(5), 1401. 10.3390/nu12051401

Wolfe, K. L., & Liu, R. H. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*(22), 8896-8907. 10.1021/jf0715166

Wu, L.-C., & Lu, Y.-W. (2004). Electrophoretic method for the identification of a haze-active protein in grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(10), 3130-3135. 10.1021/jf0352982

Wu, W., Clifford, M., & Howell, N. K. (2007). The effect of instant green tea on the foaming and rheological properties of egg albumen proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 87*(10), 1810-1819. 10.1002/jsfa.2809

Xia, E., He, X., Li, H., Wu, S., Li, S., & Deng, G. (2013). Biological activities of polyphenols from grapes. In Watson, R. R., Preedy, V. R., & Zibadi, S. (Ed). Polyphenols in Human Health and Disease. (pp.47-58). Academic Press. 10.1016/B978-0-12-398456-2.00005-0

Xie, Y., Kosinska, A., Xu, H., & Andlauer, W. (2013). Milk enhances intestinal absorption of green tea catechins in in vitro digestion/Caco-2 cells model. *Food Research International, 53*, 793-800. 10.1016/j.foodres.2012.07.063

Yadav, K., Bajaj, R. K., Mandal, S., Saha, P., & Mann, B. (2017). Evaluation of total phenol content and antioxidant properties of encapsulated grape seed extract in yoghurt. *International Journal of Dairy Technology, 71*(1), 96-104. 10.1111/1471-0307.12464

Ye, A., Cui, J., Carpenter, E., Prosser, C., & Singh, H. (2019). Dynamic *in vitro* gastric digestion of infant formulae made with goat milk and cow milk: Influence of protein composition. *International Dairy Journal, 97*, 76-85. 10.1016/j.idairyj.2019.06.002

Ye, J., Fan, F., Xu, X., & Liang, Y. (2013). Interactions of black and green tea polyphenols with whole milk. *Food Research International, 53*(1), 449-455. 10.1016/j.foodres.2013.05.033

Yedro, F. M., García-Serna, J., Cantero, D. A., Sobrón, F., & Cocero, M. J. (2015). Hydrothermal fractionation of grape seeds in subcritical water to produce oil extract, sugars and lignin. *Catalysis Today, 257*, 160-168. 10.1016/j.cattod.2014.07.053

Yi, C., Shi, J., Kramer, J., Xue, S., Jiang, Y., Zhang, M., Ma, Y., & Pohorly, J. (2009). Fatty acid composition and phenolic antioxidants of winemaking pomace powder. *Food Chemistry, 114*, 570-576. 10.1016/j.foodchem.2008.09.103

Yi, J., Zhang, Y., Liang, R., Zhong, F., & Ma, J. (2015). Beta-carotene chemical stability in nanoemulsions was improved by stabilized with beta-lactoglobulin–catechin conjugates through free radical method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63*(1), 297-303. 10.1021/jf5056024

Yilmaz-Ersan, L., Ozcan, T., Akpınar-Bayizit, A., & Şahin, S. (2016). The antioxidative capacity of kefir produced from goat milk. *International Journal of Chemical Engineering and Applications, 7*, 22-26. 10.7763/IJCEA.2016.V7.535

Yilmaz, Y., & Toledo, R. T. (2006). Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis, 19*(1), 41-48. 10.1016/j.jfca.2004.10.009

Yu, H., Jeon, H., Myeong, J., Kwon, C. W., & Chang, P.-S. (2021). Influence of creamer addition on chlorogenic acid bioaccessibility and antioxidant activity of instant coffee during *in vitro* digestion. *LWT-Food Science and Technology, 151*, 112178. 10.1016/j.lwt.2021.112178

Yu, J., & Ahmedna, M. (2013). Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science and Technology, 48*(2), 221-237. 10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x

Yuksel, Z., Avci, E., & Erdem, Y. K. (2010). Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins. *Food Chemistry, 121*(2), 450-456. 10.1016/j.foodchem.2009.12.064

Yurliasni, Hanum, Z., Muliawan, F., & Kardima, A. (2019). Quality of fermented goat milk and powder milk using *Lactobacillus plantarum* and optimizing their antibacterial ability against enterobacteriaceae. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 387*, 012020. 10.1088/1755-1315/387/1/012020

Zaupa, M., Calani, L., Del Rio, D., Brighenti, F., & Pellegrini, N. (2015). Characterization of total antioxidant capacity and (poly)phenolic compounds of differently pigmented rice varieties and their changes during domestic cooking. *Food Chemistry, 187*, 338-347. 10.1016/j.foodchem.2015.04.055

Zdunić, G., Gođevac, D., Šavikin, K., Krivokuća, D., Mihailović, M., Pržić, Z., & Marković, N. (2019). Grape seed polyphenols and fatty acids of autochthonous Prokupac vine variety from Serbia. *Chemistry and Biodiversity, 16*(7), e1900053. 10.1002/cbdv.201900053

Zhan, F., Li, J., Wang, Y., Shi, M., Li, B., & Sheng, F. (2018). Bulk, foam, and interfacial properties of tannic acid/sodium caseinate nanocomplexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66*(26), 6832-6839. 10.1021/acs.jafc.8b00503

Zhang, Q., Cheng, Z., Wang, Y., & Fu, L. (2021). Dietary protein-phenolic interactions: characterization, biochemical-physiological consequences, and potential food applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 61*(21), 3589-3615. 10.1080/10408398.2020.1803199

Zhang, X.-K., Li, S.-Y., Zhao, X., Pan, Q.-H., Shi, Y., & Duan, C.-Q. (2020). HPLC-MS/MS-based targeted metabolomic method for profiling of malvidin derivatives in dry red wines. *Food Research International, 134*, 109226. 10.1016/j.foodres.2020.109226

Zhao, Q., Yu, X., Zhou, C., Yagoub, A. E. G, & Ma, H. (2020). Effects of collagen and casein with phenolic compounds interactions on protein *in vitro* digestion and antioxidation. *LWT- Food Science and Technology, 124*, 109192. 10.1016/j.lwt.2020.109192

Zhao, X., Cheng, M., Zhang, X., Li, X., Chen, D., Qin, Y., Wang, J., & Wang, C. (2020). The effect of heat treatment on the microstructure and functional properties of whey protein from goat milk. *Journal of Dairy Science, 103*(2), 1289-1302. 10.3168/jds.2019-17221

Zhou, T., Li, Q., Zhang, J., Yang, H., & Zhao, G. (2010). Identification of four low molecular and water-soluble proteins from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *International Journal of Food Science & Technology, 45*(6), 1243-1249. 10.1111/j.1365-2621.2010.02264.x

Zhou, T., Zhang, T., Liu, W., & Zhao, G. (2011). Physicochemical characteristics and functional properties of grape (*Vitis vinifera* L.) seeds protein. *International Journal of Food Science & Technology, 46*(3), 635-641. 10.1111/j.1365-2621.2010.02532.x

Zoffoli, J. P., & Latorre, B. A. (2011). Table grape (*Vitis vinifera* L.). In Yahia, E. M. (Ed.). Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits. (pp.179-214). Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. 10.1533/9780857092885.179

Zou, Z., Duley, J. A., Cowley, D. M., Reed, S., Arachchige, B. J., Bhandari, B., Shaw, P. N., & Bansal, N. (2022). Physicochemical properties and whey proteomes of camel milk powders produced by different concentration and dehydration processes. *Foods, 11*(5), 727. 10.3390/foods11050727

7. Prilozi

7.1 Tabele

Tabela P1. Literaturni podaci o detektovanim fenolnim jedinjenjima u različitim sortama grožđa korišćenjem različitih hromatografskih tehnika.

Jedinjenja	***Deo grozda***				***Sorta grožđa***	***Ekstrakciono sredstvo***	***Uređaj korišćen za identifikaciju i/ili kvantifikaciju***	***Reference***
	Se	**Po**	**Pe**	**K**				
Fenolne kiseline *(hidroksibenzoeve, hidroksicimetne kiseline i derivati)*								
Galna kiselina	+	+	+	+	Chardonnay Sauvignon blanc Moscatel Gewurztraminer **Riesling** Viogner Cencibel **Cabernet Sauvignon** **Merlot** Syrah	Metanol/voda/mravlja kiselina (50:48,5;1,5 v/v)	1. HPLC-PAD 2. HPLC-FD	(Rodríguez Montealegre et al., 2006)
Heksozid galne kiseline	+	+	+					
Di-heksozid galne kiseline	+	+	+					
Dimer-galat	+							
Dimer-digalat	+							
Etil-estar galne kiseline	+							
Metil-galat	+							
Etil-galat				+				
Protokatehinska kiselina	+	+		+				
Protokatehuinska kiselina-(*O*)-heksozid		+			Jaen Tinto Palomino negro Tintilla de Rota **Cabernet Sauvignon** Tempranillo	Metanol/mravlja kiselina (95:5 v/v)	HPLC MS/MS	(Guerrero et al., 2009)
2,5-dihidroksibenzoeva kiselina	+							
2,4-dihidroksibenzoeva kiselina	+							
p-hidroksibenzoeva kiselina	+	+						
p-hidroksibenzoil-glukozid		+			**Italijanski riesling** Rajnski riesling	1. Etanol 2. Etil acetat (90%)	HPLC-DAD	(Mandić et al., 2008)
Heksozid-hidroksibezoeve kiseline	+	+						
Etil-estar dihidroksibezoeve kiseline		+						
(Izomer) heksozid dihidroksibezoeva kiselina	+	+		+				
Vanilinska kiselina	+	+			**Italijanski Riesling** Traminer **Smederevka** Black Burgundac Game noar **Muscat Hamburg** **Prokupac** Game bojadiser	Metanol/voda (50:50 v/v)	1. HPLC-PDA 2. LC-MS	(Gođevac et al., 2010)
Kaftarna kiselina-vaniloil pentozid		+						
Siringinska kiselina	+	+		+				
(*trans*) Ferulinska kiselina	+	+	+	+				
(*cis*/*trans*) Feruoil-tartarna kiselina (Fertarna kiselina)		+		+				
Hininska kiselina		+						
Feruoil-3-*O*-hininska kiselina		+						
p-kumarna kiselina	+	+	+	+	**Merlot**	Etanol/voda (50:50 v/v)	RP-HPLC-DAD	(Bindon et al., 2011)
p-kumarna kiselina-eritrozid		+						
(Izomer) *p*-kumarna kiselina-heksozid		+						
Kumarne kiseline-*O*-heksozid	+	+	+					
Metil estar-*p*-kumarne kiseline		+			Carmenere **Cabernet Sauvignon**	Etanol/voda (1:9 v/v) +5g/L vinske kiseline	HPLC-DAD	(Obreque-Slier et al., 2010)
p-kumaroilhininska kiselina		+						
(*cis*/*trans*) *p*-kumaroiltartarna kiselina (Kutarna kiselina)	+	+		+				
o-kumarinska kiselina				+				
Hidroksicimetna kiselina		+						

2-hidroksicimetna kiselina	+				Primitivo Sangiovese Pino noar Negro Amaro **Cabernet Sauvignon** Isabel	Metano/voda/sirćetna kiselina (80:15:5, v/v)	HPLC-DAD	(Rockenbach et al., 2011)
Kofeinska kiselina	+	+		+				
(*cis*/*trans*) Kofeoil-tartarna kiselina (Kaftarna kiselina)	+	+	+	+				
Kofeoil-kumaroil-tartarna kiselina	+							
Kofeoil-šikimska kiselina	+	+						
Hlorogenska kiselina (5-*O*-kofeoilhininska kiselina)	+	+		+				
(*trans*) Cinaminska kiselina	+			+				
Sinapinska kiselina	+	+			Emir Game Kalecik karasi Narince Okuzgozu	Etanol/voda (95:5 v/v), 60°C	RP-HPLC-DAD	(Sagdic et al., 2011)
Gentizinska kiselina	+	+						
Heksozid-gentizinske kiseline	+							
Elaginska kiselina	+	+						
Heksozid-elaginske kiseline	+							
Pentozid-elaginske kiseline	+							
3-hidroksitirasol				+	Sercial Tinta Negra	1. Etanol/voda (50:50 v/v) +1% sirćetna kiselina 2. Metanol/voda (50:50 v/v) +1% sirćetna kiselina	HPLC-DAD-ESI.MS^n	(Perestrelo et al., 2012)
Flavan-3-oli i pro(anto)cianidini								
Katehin	+	+	+	+				
(Epi)katehin	+	+	+	+				
Katehin-3-*O*-galat	+	+						
(Izomer) (Epi)katehin-heksozid	+							
(Izomer)(Epi)katehin-(epi)katehin-galat (I,II,III)	+							
(Epi)katehin-(3-*O*)-galat	+	+	+	+	**Merlot** **Cabernet Sauvignon** Širaz Maximo	Metanol+0,1% HCl (v/v)	LC-ESI-MS/MS	(Fraige et al., 2014)
(Epi)katehin-3-*O*-vanilat	+							
(Epi)katehin-3-*O*-kumarat	+							
(Epi)katehin-etil dimer	+							
(Epi)katehin-etil trimer	+							
Epigalokatehin	+	+			Primitivo Sangiovese Pino noar Negro Amaro **Cabernet Sauvignon** Isabel	Aceton/voda (70:30, v/v)	1. HPLC-DAD-MS^n 2. LC-ESI-FTICR-MS	(Rockenbach et al., 2012)
Galokatehin	+	+						
Epigalokatehin-galat	+	+						
Galokatehin-galat	+	+						
(Epi)galokatehin-(epi)katehin	+							
Epigalokatehin-3-*O*-galat metil etar	+							
Procijanidin dimer	+			+				
(Izomer) pro(anto)cijanidin dimer B tip	+	+						
Procijanidin B1	+	+	+	+				
Procijanidin B2	+	+	+	+				
Procijanidin B3	+	+	+	+	Carmenere **Merlot** Cabernet franc **Cabernet Sauvignon**	Etanol:voda (1:9 v/v) +5g/L vinske kiseline	HPLC-DAD	(Obreque et al., 2013)
Procijanidin B4	+	+	+	+				
Procijanidin B5	+	+						
Procijanidin B7			+	+				
Procijanidin dimer monogalat	+			+	Plavac mali Babić	1. Aceton/voda (80:20 v/v) 2. Metanol/voda (60:40 v/v) 3. Zakušeljeni methanol (0,1% HCl)	HPLC-UV-Fluo/MS	(Ćurko et al., 2014)
Procijanidin B-galat (I,II,III,IV)	+		+					
Procijanidin B2-galat	+	+		+				
Procijanidin dimer digalat (A i B tip)	+							
(Izomer) pro(anto)cijanidin dimer A tip	+							

Procijanidin trimer (I, II,III,IV,V)	+	+	+	+	Albariño	Etanol/voda (80:20 v/v), pH 3,5 (sirćetna kiselina)	1. HPLC-ESI-QqToF-MS 2. HPLC-ESI-QqQ-MS	(Di Lecce et al., 2014)
Pro(anto)cijanidini trimer monogalat	+							
(Izomer) pro(anto)cijanidin trimer B tip	+							
Procijanidin C1	+							
Procijanidin trimer digalat	+							
Procijanidin tetramer (I, II)	+			+				
Prodelfinidin dimer B tip	+							
Izomer čalkan-flavan-3-ol dimer	+				Zalema Sovinjon blank Pedro Ximénez Moscatel Baladí Parellada Montepila Airén Verdejo	Metanol/voda (75:25 v/v)	RRLC-MS	(José Jara-Palacios et al., 2014)
Flavonoli								
Kvercetin	+	+	+	+				
Kvercetin-3-*O*-glukozid	+	+	+	+				
Kvercetin-(3-*O*)-pentozid		+		+				
Kvercetin-3-*O*-galaktozid	+	+	+	+				
Izokvercetin				+				
Kvercetin-3-*O*-heksuronid (glukuronid)	+	+	+	+				
Kvercetin-3-*O*-heksuronid metil etar		+						
Kvercetin-3-*O*-rutinozid (Rutin)	+	+	+	+	**Muscat Hamburg**	Etanol/voda (70:30 v/v)	LC-MS/MS	(Ji et al., 2015)
Dihidrokvercetin-3-*O*-ramnozid	+	+						
Kvercetin-3-*O*-(6”-ramnozil)heksozid		+						
Miricetin	+	+		+				
Miricetin-3-*O*-heksozid (glukozid)		+		+	Touriga Nacional Touriga Franca Tinta Roriz	Etanol/voda (80:20 v/v)	HPLC-DAD	(Tournour et al., 2015)
Miricetin di-heksozid		+						
Miricetin-3-*O*-glukuronid		+		+				
Miricetin-7-*O*-pentozid		+			**Cabernet Sauvignon** **Merlot** Cabernet franc Sangioves Syrah Pino noar **Prokupac** **Riesling** Petra Sauvignon blanc Welschriesling Chardonnay Pino gris	1. Metanol/voda (80:20, v/v)+0,1% HCl **2.** Zakišeljen methanol (0,1% HCl v/v)	1. UHPLC-DAD MS/MS 2. UHPLC-LTQ Orbitrap MS	(Pantelić et al., 2016)
Miricetin-7-*O*-heksuronid		+						
Miricetin-3-*O*-heksuronid-7-*O*-heksozid		+						
Izoramnetin				+				
Izoramnetin-3-*O*-heksozid (glukozid)	+	+		+				
Izoramnetin-3-(*O*)-glukuronid		+		+				
Izoramnetin-3-*O*-(6-*O*-feruloil)glukozid			+					
Siringetin				+				
Siringetin-3-*O*-heksozid (glukozid)		+		+				
Siringetin-3-(6”-kumaroil)glukozid		+						
Siringetin-3-*O*-glukozid-6-*O*-ramnozil-glukozid		+						
Laricitrin				+	Syrah **Merlot** **Cabernet Sauvignon**	Zakišeljeni methanol (0,1% HCl v/v)	HPLC-PDA-ESI-MS/MS	(Lingua et al., 2016)
Laricitrin-3-galaktozid		+						
Laricitrin-3-glukozid		+		+				
Kampferol	+			+				
Kampferol-3-*O*-glukozid	+	+	+		Hosseini Ghara Shira Agh Shani Ghara Shani	Metanol/HCl (99:1 v/v)	HPLC-PDA	(Farhadi et al., 2016)
Kampferol-3-(*O*)-glukuronid	+	+	+	+				
Kampferol-3-(*O*)-galaktozid	+	+	+	+				
Kampferol-3-*O*-rutinozid	+	+	+					

Dihidrokampferol-3-*O*-glukozid	+				Ghara Ghandome Muscat Alexandria			
Kampferol-7-*O*-heksuronid		+						
Kampferol-3-*O*-(6”-*cis*-*p*-kumaroil)-β-glukozid		+						
Taksifolin		+			Vidal	1. Metanol:voda (80:20 v/v) 2. Aceton:voda (75:25 v/v)	1. UHPLC-FT-ICR/MS 2. UPLC-QqQ/MS	(Luo et al., 2017)
Taksifolin pentozid		+						
(*trans*) taksifolin-3-*O*-pentozid		+						
Morin		+						
Astilbin	+			+				
Flavanoni, flavone i kumarini								
Naringin	+	+			Moribel Tinto Fragoso Tempranillo	Metanol/voda/mravlja kiselina (50:48,5;1,5 v/v)	HPLC-DAD-ESI-MS/MS	(Pérez Navarro et al., 2019)
Naringenin		+						
Hesperetin	+	+						
Hesperidin				+				
Eriodiktiol				+	*Vitis labrusca* cv. Bordeaux	Etanol/voda (60:40 v/v) (ultrazvučno kupatilo, 305W, 50/60Hz)	1. HPLC-DAD 2. HPLC-FD	(Pasini Deolindo et al., 2019)
Eriodiktiol glukozid		+						
Apigenin	+	+		+				
Aeskulin	+	+						
Stilbeni								
(*cis*/*trans*) Resveratrol	+		+	+	Syrah **Cabernet Sauvignon** Malbec Pino noar Marselan	50mM acetatni puffer (tretman enzimima)	HPLC-DAD	(Meini et al., 2019)
(*cis*/*trans*) Piceid	+	+						
Resveratrol dimer	+	+						
Resveratrol trimer	+							
Resveratrol tetramer	+	+						
Ɛ-viniferin			+					
Antocijani					**Vranac**	1. Metanol/voda (70:30 v/v)+0,1% HCl **2.** Zakišeljen metanol (0,1% HCl v/v)	UHPLC-LTQ Orbitrap MS	(Šuković et al., 2020)
(Izomer) Peonidin-3-*O*-heksozid (glukozid)		+		+				
Peonidin-3,5-di-*O*-heksozid (glukozid)		+						
Peonidin-3-*O*-heksozid piruvat		+						
Peonidin-3-*O*-(6”-acetil)heksozid (glukozid)		+		+	Chardonnay **Bagrina** **Župljanka** Gamay **Začinak** **Crna Tamjanika** **Merlot** **Prokupac** Frankovka **Cabernet Sauvignon**	Zakišeljeni etanol (70%) (50°C, ultrazvučno kupatilo 59Hz)	HPLC-DAD	(Dabetić et al., 2020)
Peonidin-3-*O*-(6”-kafeoil)heksozid		+						
Peonidin-3-*O*-(6”-*p*-kumaroil)heksozid (glukozid)		+		+				
Peonidin-3-O-(6”- *trans*-*p*-kumaroil)-β-D-glukozid		+						
Delfinidin-3-*O*-glukozid	+	+		+				
(Izomer) Delfinidin-3,5-di-*O*-heksozid (glukozid)		+						
Delfinidin-3-*O*-heksuronid		+						
Delfinidin-3-*O*-heksozid piruvat		+						
Delfinidin-3-*O*-(6”-acetil)heksozid		+						
Delfinidin-3-*O*-(6”-*p*-kumaroil)heksozid (glukozid)		+		+	Niagara Rosada Maximo Bordo Violeta	Metanol/voda/sirćetna kiselina (80:19:1 v/v)	HPLC-DAD	(Monteiro et al., 2021)
Delfinidin-3-*O*-(6”-kafeoil)glukozid		+						
Malvidin-3-*O*-heksozid (glukozid)	+	+		+				
Malvidin-3,5-di-(*O*)-heksozid (glukozid)	+	+		+				
Malvidin-3-*O*-pentozid		+			**Vranac** **Muscat Hamburg** **Plovdina** **Župljanka**	**1.** Metanol/voda (80:20 v/v)+0,1% HCl	1. UHPLC-DAD MS/MS 2. UHPLC-LTQ Orbitrap MS	(Natić et al., 2021)
Malvidin-3-*O*-heksozid-acetaldehid (Vitisin B)		+						
Malvidin-3-*O*-heksozid-piruvat (Vitisin A)		+						
Malvidin-3-*O*-heksozid aceton		+						

(Izomer) Malvidin-3-*O*-(6”-acetil)heksozid (glukozid)		+	+	Chasselas Muscat **Beogradska besemena Smederevka**	**2.** Zakišeljen methanol (0,1% HCl v/v)		
Malvidin-3-*O*-(6”-kafeoil)heksozid (glukozid)		+	+				
Malvidin-3-*O*-(6”-*p*-kumaroil)heksozid-piruvat		+					
Malvidin-3-*O*-(6”-*p*-kumaroil)heksozid (glukozid)		+	+				
Malvidin-3-*O*-(6”-p-kumaroil)glukozid-5-glukozid		+		Rabigato Malvasia Fina Fernao Pires Viosinho Moscatel	Metanol/voda (70:30 v/v)	RP-HPLC-DAD	(Leal et al., 2020)
Malvidin-3-*O*-(6”-*trans*-*p*-kumaroil)-β-D-glukozid		+					
(Izomer) cianidin-3-*O*-heksozid (glukozid)	+	+	+				
Cianidin-3-*O*-arabinozid		+					
Cianidin-3,5-di-(*O*)-glukozid		+	+				
Cianidin-3-*O*-(6”-*p*-kumaroil)heksozid		+					
Cianidin-3-*O*-(6”- *trans*-*p*-kumaroil)-β-D-glukozid		+					
Cianidin-3-*O*-(6”-kafeoil)glukozid		+		**Cabernet Sauvignon** **Merlot** Syrah Bogazkere Nero d’ Avola Sangiovese	Metanol +(voda) +0,01%HCl	HPLC-DAD	(Tahmaz et al., 2021)
Petunidin-3-*O*-heksozid (glukozid)		+	+				
Petunidin-3-*O*-(6”-acetil)heksozid (glukozid)		+	+				
Petunidin-3-*O*-(6”-kafeoil)glukozid		+					
Petunidin-3-*O*-(6”-p-kumaroil)glukozid		+	+				
Petunidin-3-*O*-(6”- *trans*-*p*-kumaroil)-β-D-glukozid		+					
Pelargonidin-3-*O*-(6”-ramnozil)glukozid		+					

Skraćenice: Se-semenka; Po-pokožica; Pe-šepurina; K-komina.

Tabela P2. Lista kvantifikovanih fenolnih jedinjenja sa korelacionim koeficijentima, limitom detekcije (LOD) i limitom kvantifikacije (LOQ), korišćenjem UHPLC DAD MS/MS uređaja (jedinjenja prikazana u Tabeli 4.28 i Tabeli 4.29).

N°	Fenolna jedinjenja	R^2	LOD, mg/L	LOQ, mg/L
1	Galna kiselina[1]	0,9908	0,17	0,56
2	Protokatehinska kiselina[1]	0,9993	0,06	0,20
3	Elaginska kiselina[1]	0,9914	0,24	0,79
4	Hlorogenska kiselina[1]	0,9982	0,10	0,32
5	Ferulinska kiselina[1]	0,9907	0,10	0,33
6	Kofeinska kiselina[1]	0,9937	0,17	0,58
7	p-Kumarinska kiselina[1]	0,9954	0,15	0,51
8	Kvercetin[1]	0,9976	0,12	0,39
9	Kvercetin-3-O-galaktozid[1]	0,9986	0,08	0,28
10	Rutin[1]	0,9994	0,06	0,18
11	Izoramnetin[1]	0,9963	0,11	0,38
12	Izoramnetin-3-O -glukozid[1]	0,9943	0,09	0,31
13	Kampferol[1]	0,9983	0,09	0,31
14	Luteolin[1]	0,9975	0,11	0,37
15	Genistein[1]	0,9947	0,16	0,54
16	Aeskulin[1]	0,9999	0,02	0,06
17	Floretin[1]	0,9987	0,08	0,27
18	Taksifolin[1]	0,9959	0,14	0,48
19	Pterostilbeni[1]	0,9912	0,10	0,35
20	Eriodiktiol[1]	0,9958	0,14	0,48
21	Katehin[2]	0,9996	0,03	0,11
22	Malvidin-3-O-glukozid[2]	0,9931	0,09	0,31
23	Malvidin-3,5-di-O-glukozid[2]	0,9983	0,04	0,13
24	Peonidin-3-O-glukozid[2]	0,9916	0,10	0,33

Napomena: [1] UHPLC-DAD MS/MS kvatifikovana fenolna jedinjenja; [2] UHPLC-MS/MS Orbitrap kvantifikovana fenolna jedinjenja

Tabela P3. Karakterizacija fenolnih jedinjenja u vodenim ekstraktima liofilisane komine crvene sorte grožđa Prokupac i njenih konstituenata korišćenjem UHPLC Orbitrap MS (jedinjenja prikazana u Tabeli 4.13,Tabeli 4.14 i Tabela 4.15). Za svako detektovano jedinjenje je dato retenciono vreme (t_R), i njegovi MS^2, MS^3 i MS^4 fragmenti.

t_R	*Fenolna jedinjenja*	*m/z*	MS^2 fragmenti	MS^3 fragmenti	MS^4 fragmenti
Hidroksibenzoeva kiselina i njeni derivati					
1,90	Diheksozid galne kiseline[b]	493	332(10), **331**(100)	**169**(100), 125(20)	**125**(100)
2,04	Heksozid galne kiseline izomer 1[b]	331	271(20), 241(10), **169**(100), 125(5)	**125**(100)	**107**(100), 81(10)
2,52	Galna kiselina[a]	169	**125**(100)	**107**(100)	–
3,81	Heksozid galne kiseline izomer 2[b]	331	**169**(100), 125(5)	**125**(100)	110(10), 97(30), **81**(100), 53(30)
3,86	Heksozid dihidroksibenzoeve kiseline[b]	315	**153**(100), 152(50), 109(15), 108(10)	**109**(100)	123(25), 109(10), 85(10), **81**(100)
4,33	Protokatehinska kiselina[a]	153	**109**(100), 95(75), 79(20), 59(10)	**81**(100), 68(25), 65(15)	–
5,08	Heksozid hidroksibenzoeve kiseline[b]	299	**137**(100)	**93**(100)	–
5,20	Galoil-HHDP-heksoza*[b]	633	463(10), **301**(100)	301(50), 284(25), **257**(100), 229(50), 185(40)	257(10), 240(10), **229**(100), 213(20), 185(50)
5,37	*p*-Hidroksibenzoeva kiselina[a]	137	109(10), **93**(100)	**93**(10)	–
5,44	Gentizinska kiselina[a]	153	136(5), 125(10), **109**(100), 95(20), 79(10)	81(85), **67**(100), 63(60)	–
6,81	Etil-galat[b]	197	**169**(100), 151(20), 125(15)	**125**(100)	**81**(100)
6,82	Vanilinska kiselina[a]	167	153(10), **152**(80), 124(10), **123**(100), 108(20)	**108**(100)	**79**(100)
6,84	Elaginska kiselina[a]	301	284(40), 271(60), **257**(100), 229(85), 185(40)	**229**(100), 213(20), 185(85)	**201**(100), 185(95), 157(30), 145(20), 129(10)
Hidroksicimetna kiselina i njeni derivati					
4,73	Kofeoiltartarna kiselina[c]	311	179(40), 177(15), **149**(100)	131(50), 103(90), **87**(100), 59(25)	**59**(100)
4,74	Kofeinska kiselina[a]	179	**135**(100), 117(10), 91(20), 59(15)	**107**(100), 59(50)	–
5,26	Hlorogenska kiselina[a]	353	**191**(100), 179(5)	173(75), **127**(100), 111(40), 93(60), 85(90)	109(40), 99(50), **85**(100)
5,77	Feruloiltartarna kiselina[c]	325	265(20), 235(15), **193**(100), 149(10), 113(5)	178(65), **149**(100), 134(40)	**134**(100)
6,37	*p*-Kumarinska kiselina[a]	163	**119**(100)	119(60), 101(20), 93(25), **91**(100), 72(10)	–
7,02	Ferulinska kiselina[a]	193	178(70), **149**(100), 134(50)	**134**(100)	**106**(100)
Flavan-3-oli i procijanidini					
3,10	B tip procijanidin trimer izomer 1[d]	865	**695**(100), 577(60), 425(30), 407(30), 287(30)	**543**(100), 451(45), 243(60)	**525**(100), 391(40)
3,66	B tip procijanidin trimer izomer 2[d]	865	**695**(100), 577(80), 425(30), 407(40), 287(35)	**543**(100), 451(45), 243(60)	**525**(100), 391(40)
4,90	B tip procijanidin dimer izomer 1[d]	577	451(30), **425**(100), 407(50), 289(25), 287(10)	**407**(100), 381(5), 273(10)	389(30), 297(30), **285**(100), 243(70)
5,25	B tip procijanidin trimer izomer 3[d]	865	**695**(100), 577(70), 425(30), 407(40), 287(30)	**543**(100), 451(45), 243(60)	**525**(100), 391(40)
5,35	Katehin[a]	289	271(5), **245**(100), 205(40), 179(15), 125(5)	227(30), **203**(100), 187(25), 175(10), 161(20)	188(70), 185(20), **175**(100), 161(40), 157(10)
5,57	B tip procijanidin dimer izomer 2[d]	577	451(30), **425**(100), 407(50), 289(25), 287(10)	**407**(100), 381(5), 273(10)	389(30), 297(30), **285**(100), 243(70)
5,82	B tip procijanidin dimer galat izomer 1[d]	729	**577**(100), 559(50), 425(30), 407(50), 289(5)	559(50), 421(70), 425(50), **407**(100), 289(40)	389(25), 297(30), **285**(100), 255(20), 243(20)
5,83	Epikatehin[d]	289	271(5), **245**(100), 205(40), 179(15), 125(5)	227(35), **203**(100), 187(30), 175(15), 161(25)	188(60), 185(20), **175**(100), 161(35), 157(15)
5,85	B tip procijanidin trimer izomer 4[d]	865	**695**(100), 577(80), 425(35), 407(35), 287(30)	**543**(100), 451(45), 243(60)	**525**(100), 391(40)
6,08	B tip procijanidin dimer galat izomer 2[d]	729	711(10), 603(30), 577(90), 559(90), **407**(100)	389(25), 297(30), **285**(100), 255(20), 243(20)	**257**(100), 241(10), 213(5)
6,47	B tip procijanidin dimer digalat izomer 1[d]	881	**729**(100), 711(30), 577(20), 559(25), 407(30)	711(20), 603(70), 577(65), 559(50), **407**(100)	389(15), 297(20), **285**(100), 255(30)
6,79	(epi)Katehin galat[d]	441	331(10), **289**(100), 271(10), 169(25)	271(5), **245**(100), 205(40), 179(20)	227(20), **203**(100), 187(20), 175(10), 161(20)
7,40	B tip procijanidin dimer digalat izomer 2[d]	881	**729**(100), 711(35), 589(40), 577(25), 559(20)	711(80), **603**(100), 577(60), 559(70), 407(90)	–
Flavonol aglikoni i glikozidi					
5,89	Aromadendrin-7-*O*-heksozid[e]	449	288(15), **287**(100), 269(40), 259(40)	**259**(100), 243(15), 201(5)	241(30), **215**(100), 173(35), 125(60)
5,93	Kvercetin-3,7-di-*O*-heksozid[e]	625	**463**(100), 301(30)	**301**(100), 300(30)	283(20), 273(25), 257(10), **179**(100), 151(75)
6,22	Miricetin-3-*O*- heksozid[e]	479	317(80), **316**(100), 299(5), 179(10)	287(30), **271**(100), 179(40)	271(15), **243**(100), 227(30)
6,42	Kvercetin-3-*O*-rutinozid[a]	609	343(5), **301**(100), 300(30), 271(10), 255(5)	273(25), 257(20), **179**(100), 151(75)	**151**(100)
6,70	Laricitrin-3-*O*- heksozid[e]	493	**331**(100), 330(25), 317(40)	**316**(100), 301(15), 285(5), 179(10), 151(10)	299(15), 287(25), 271(80), **179**(100), 151(35)

6,72	Kvercetin-3-*O*-heksuronid[e]	477	302(10), **301**(100)	273(20), 257(20), **179**(100), 151(75)	**151**(100)
6,74	Kvercetin-3-*O*-glukozid[a]	463	**301**(100), 300(30)	273(25), 257(20), **179**(100), 151(75)	**151**(100)
7,05	Kvercetin-3-*O*-ramnozid[a]	447	**301**(100), 300(35), 284(20)	273(25), 257(20), **179**(100), 151(75)	**151**(100)
7,12	Siringetin-3-*O*- heksozid[e]	507	387(20), 345(50), **344**(100), 329(10)	329(90), **316**(100), 301(85), 287(10), 273(80)	**301**(100), 300(20), 287(10), 273(60)
7,15	Kampferol-3-*O*-glukozid[a]	447	327(20), 285(80), **284**(100), 255(10)	**255**(100), 227(10)	**227**(100), 211(60)
7,26	Izoramnetin-3-*O*-glukozid[a]	477	357(20), 315(50), **314**(100), 300(5), 299(5)	300(30), **285**(100), 271(75), 257(10), 243(25)	**270**(100)
7,32	Izoramnetin-3-*O*-heksuronid[e]	491	473(10), 315(90), **301**(100), 300(60)	283(15), 272(20), 256(10), **179**(100), 151(75)	**151**(100)
7,98	Aromadendrin[e]	287	269(10), **259**(100), 243(15), 201(10)	241(25), **215**(100), 173(30), 151(20), 125(65)	200(25), 187(10), **173**(100), 158(15)
8,79	Kvercetin[a]	301	283(15), 271(60), 257(25), **179**(100), 151(80)	**151**(100)	**107**(100), 83(10)
9,73	Kampferol[a]	285	**255**(100), 227(10)	**211**(100), 195(5), 167(15)	211(40), **137**(100)
9,95	Izoramnetin[a]	315	301(20), **300**(100)	283(30), **271**(100), 255(50), 227(52), 151(90)	**243**(100), 227(70), 216(10), 199(20)
Stilbenoidi					
6,62	Resveratrol[a]	227	**185**(100), 159(30), 143(20)	157(10), **143**(100), 117(5)	**115**(100)
7,35	Resveratrol-3-O-glukozid[f]	389	**227**(100)	**185**(100), 183(40), 159(35), 157(30), 143(20)	–
8,97	Resveratrol dimer izomer 1[f]	453	417(30), 407(40), 359(90), **341**(100), 300(20)	323(10), 297(15), 282(30), 231(15), **217**(100)	–
8,39	Resveratrol tetramer izomer 1[f]	905	**811**(100), 717(50), 451(10), 359(15)	**717**(100), 611(5), 451(5), 358(10)	699(20), **675**(100), 623(30), 611(80), 357(60)
8,64	Resveratrol tetramer izomer 2[f]	905	**811**(100), 717(60), 451(15), 359(15)	**717**(100), 675(5), 611(5), 451(5), 357(10)	699(50), 675(90), 623(15), 611(65), **357**(100)
9,17	Resveratrol dimer izomer 2[f]	453	435(10), 369(10), 359(30), **347**(100), 333(40)	329(10), 305(20), **253**(100), 240(30), 225(10)	**225**(100), 209(10)
9,24	Resveratrol trimer izomer 1[f]	679	**585**(100), 491(10)	**491**(100), 479(20), 385(10)	473(40), 447(30), 421(20), 397(25), **385**(100)
9,55	Resveratrol trimer (kao α-viniferin)[f]	677	**571**(100), 529(10), 501(20), 465(30), 437(20)	529(30), 501(70), **465**(100), 437(30), 423(20)	447(10), 437(30), **423**(100), 421(60), 371(40)
9,72	Resveratrol trimer izomer 2[f]	679	661(70), 637(20), **585**(100), 573(90), 451(35)	567(90), 543(50), 491(70), **479**(100), 347(20)	461(70), 435(75), **385**(100), 355(40), 327(30)
Antocijani					
4,64	Delfinidin-3-*O*-glukozid[a]	465	304(15), **303**(100)	303(50), 285(5), **257**(100), 247(10), 229(30)	**229**(100), 213(15), 201(25), 173(15)
4,65	Malvidin-3,5-di-*O*-glukozid[a]	655	494(15), **493**(100), 332(10), 331(70)	**331**(100)	316(80), **315**(100), 299(90), 298(30), 287(70)
4,78	Cijanidin-3-*O*-glukozid[a]	449	288(10), **287**(100)	**287**(100), 259(15), 241(20), 231(20), 213(30)	195(10), **185**(100), 167(10), 157(25), 141(20)
4,82	Cijanidin-3-*O*-sambubiozid[a]	581	288(10), **287**(100)	287(60), 259(40), 241(50), 231(70), **213**(100)	195(10), 185(100), 167(10), 157(20), 141(20)
5,04	Cijanidin-3-*O*-arabinozid[a]	479	318(10), **317**(100)	**302**(100), 274(10)	**274**(100), 246(15), 228(10), 218(15)
5,07	Petunidin-3-*O*-heksozid[g]	419	288(10), **287**(100)	287(60), 259(40), 241(50), 231(70), **213**(100)	195(10), 185(100), 167(10), 157(20), 141(20)
5,15	Pelargonidin-3-*O*-glukozid[a]	433	272(10), **271**(100)	**271**(100), 243(50), 225(60), 215(70), 197(80)	197(5), 169(100), 153(5), 141(30)
5,42	Peonidin-3-*O*-glukozid[a]	463	302(10), **301**(100)	287(10), **286**(100)	268(20), **258**(100), 230(25), 202(10)
5,47	Malvidin-3-*O*-glukozid[a]	493	332(15), **331**(100)	316(80), **315**(100), 299(90), 287(75), 270(50)	**313**(100), 287(80), 285(60), 257(50)
5,97	Malvidin-3-*O*-heksozid-acetaldehid[g]	517	356(15), **355**(100)	**339**(100), 322(30), 311(15), 294(40), 266(20)	337(70), 321(30), **311**(100), 309(80), 281(30)
6,24	Malvidin-3-*O*-heksozid-(8,8)-metilmetine-(epi)katehin[g]	505	302(10), **301**(100)	287(10), **286**(100)	268(20), **258**(100), 230(25), 202(10)
6,30	Peonidin-3-*O*-(6"-acetil)heksozid[g]	809	647(5), 519(20), **357**(100), 341(5)	**341**(100), 327(60), 313(10), 296(10), 268(20)	339(90), 313(80), **311**(100), 283(50)
6,32	Malvidin-3-*O*-(6"-acetil)heksozid[g]	535	332(15), **331**(100)	316(80), **315**(100), 299(90), 287(75), 270(50)	**313**(100), 287(80), 285(60), 257(50)
6,44	Delfinidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil) heksozid[g]	611	304(15), **303**(100)	303(50), 285(5), **257**(100), 247(10), 229(30)	**229**(100), 213(15), 201(25), 173(15)
6,67	Malvidin-3-*O*-(6"-kafeoil)heksozid[g]	655	332(15), **331**(100)	316(80), **315**(100), 299(90), 287(75), 270(50)	**313**(100), 287(80), 285(60), 257(50)
6,73	Petunidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil) heksozid[g]	625	318(10), **317**(100)	**302**(100), 274(10)	**274**(100), 246(15), 228(10), 218(15)
7,03	Peonidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil) heksozid[g]	609	302(10), **301**(100)	287(10), **286**(100)	268(20), **258**(100), 230(25), 202(10)
7,10	Malvidin-3-*O*-(6"-*p*-kumaroil) heksozid[g]	639	332(15), **331**(100)	316(80), **315**(100), 299(90), 287(75), 270(50)	**313**(100), 287(80), 285(60), 257(50)

[a]Jedinjenja kvantifikovana korišćenjem dostupnih standarda; Jedinjenja kvantifikovana i izražena kao mg ekvivalenti *p*-hidroksibenzoeve kiseline[b]; kofeinske kiseline[c]; katehina[d]; kvercetina[e]; resveratrola[f]; malvidin-3-*O*-glukozid[g] po kg SM uzorka. *Galoil-HHDP-heksoza – galoil-heksahidroksidifenil kiselina-heksozid

Tabela P4. Kalibracione krive, korelacioni koeficijenti (r^2), limiti detekcije (LOD), limiti kvantifikacije (LOQ), i linearni rasponi za 28 standarda korišćenjem UHPLC Orbitrap MS (jedinjenja prikazana u Tabeli 4.13,Tabeli 4.14, Tabela 4.15 i Tabela 4.18).

Fenolna jedinjenja	Linearna jedinačina ($y=a+b*x$)	r^2	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Linearni raspon (mg/L)
Hidroksibenzoeva kiselina i njeni derivati					
Galna kiselina	y = -2.08E+7 + 3.86E+7*x	0.9908	0.17	0.56	0.50 - 2.00
Protokatehinska kiselina	y = 3.73E+5 + 1.72E+5*x	0.9993	0.06	0.20	0.01 - 2.00
p-Hydroksibenzoeva kiselina	y = 9.83E+5 + 2.71E+7*x	0.9948	0.08	0.27	0.01 - 1.11
Gentizinska kiselina	y = -1.76E+4 + 8.65E+5*x	0.9907	0.21	0.71	0.10 - 2.00
Vanilinska kiselina	y = -1.08E+5 + 1.24E+7*x	0.9922	0.09	0.30	0.01 - 0.95
Hidroksicimetna kiselina i njeni derivati					
Kofeinska kiselina	y = - 1.30E+6 + 2.43E+7*x	0.9939	0.17	0.58	0.01 - 1.90
Hlorogenska kiselina	y = - 6.67E+6 + 1.70E+7*x	0.9982	0.10	0.32	0.01 - 2.10
p-Kumarinska kiselina	y = 7.85E+5 + 5.44E+6*x	0.9937	0.16	0.53	0.05 - 1.90
Ferulinska kiselina	y = 5.24E+3 + 1.04E+7*x	0.9910	0.11	0.36	0.01 - 1.00
Flavan-3-oli and procijanidini					
Katehin	y = - 3.56E+4+ 3.60E+5*x	0.9977	0.08	0.26	0.15 - 1.50
Flavonol aglikoni i glikozidi					
Kvercetin-3-*O*-rutinozid	y = - 3.72E+5 + 1.98E+7*x	0.9994	0.06	0.18	0.01 - 2.00
Kvercetin-3-*O*-glukozid	y = 7.13E+5 + 3.33E+7*x	0.9986	0.08	0.28	0.01 - 2.00
Kvercetin-3-*O*-ramnozid	y = 9.31E+5 + 3.69E+7*x	0.9919	0.14	0.48	0.03 - 1.50
Kampferol -3-*O*-glukozid	y = - 1.07E+5 + 1.33E+7*x	0.9984	0.02	0.07	0.01 - 0.50
Izoramnetin-3-*O*-glukozid	y = 6.45E+5 + 2.06E+7*x	0.9933	0.21	0.71	0.03 - 2.00
Kvercetin	y = - 1.31E+6 + 1.70E+7*x	0.9911	0.11	0.36	0.05 - 1.00
Kampferol	y = - 1.21E+6 + 3.18E+7*x	0.9983	0.09	0.31	0.10 - 1.10
Izoramnetin	y = - 5.51E+6 + 8.99E+6*x	0.9974	0.10	0.34	0.25 - 2.00
Stilbenoidi					
Resveratrol	y = - 1.36E+5 + 4.50E+6*x	0.9985	0.08	0.27	0.01 - 2.00
Resveratrol-3-*O*-glukozid	y = 3.84E+4 + 2.85E+6*x	0.9965	0.12	0.41	0.01 - 2.00
Anthocyanins					
Delfinidin-3-*O*-glukozid	y = - 1.73E+4 + 4.26E+5*x	0.9988	0.04	0.13	0.05 - 1.00
Malvidin-3,5-di-*O*-glukozid	y = - 6.79E+3 + 4.09E+5*x	0.9983	0.04	0.13	0.10 - 1.00
Cijanidin-3-*O*-glukozid	y = - 1.61E+4 + 6.21E+5*x	0.9988	0.04	0.13	0.03 - 1.00
Cijanidin-3-*O*-sambubiozid	y = - 4.98E+3 + 4.32E+5*x	0.9994	0.03	0.10	0.05 - 1.00
Cijanidin-3-*O*-arabinozid	y = - 1.96E+4 + 5.98E+5*x	0,9994	0.03	0.10	0.05 - 1.00
Pelargonidin-3-*O*-glukozid	y = - 8.57E+3 + 8.09E+5*x	0.9988	0.04	0.14	0.03 - 1.00
Peonidin-3-*O*-glukozid	y = - 7.44E+3 + 2.86E+5*x	0.9916	0.10	0.33	0.05 - 1.00
Malvidin-3-*O*-glukozid	y = - 1.04E+4 + 6.94E+5*x	0.9931	0.09	0.31	0.05 - 1.00

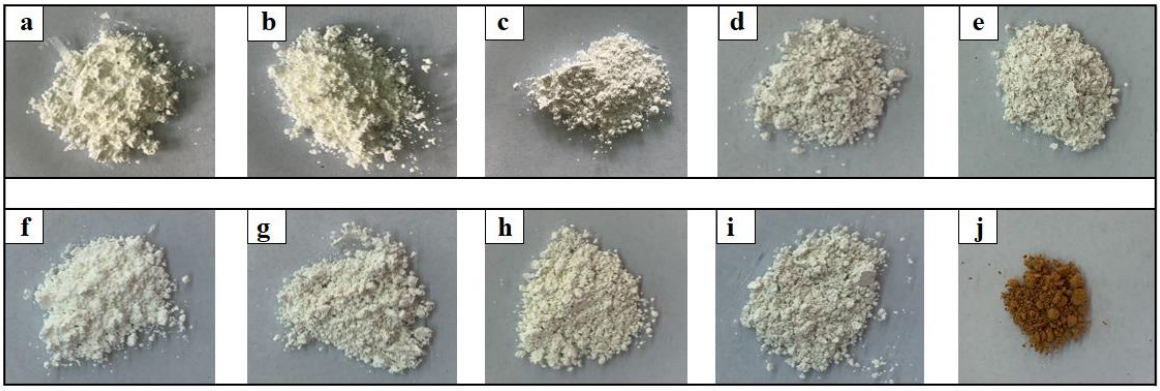
Napomena: UHPLC-MS/MS Orbitrap kvantifikovana fenolna jedinjenja

Tabela P5. Kalibracione krive, korelacioni koeficijenti (r^2), limiti detekcije (LOD), limiti kvantifikacije (LOQ), za kvantifikovana fenolna jedinjenja, korišćenjem UHPLC DAD MS/MS uređaja (jedinjenja prikazana u Tabeli 4.19, Tabela 4.22, Tabela 4.27, Tabela 4.34 i Tabeli 4.35).

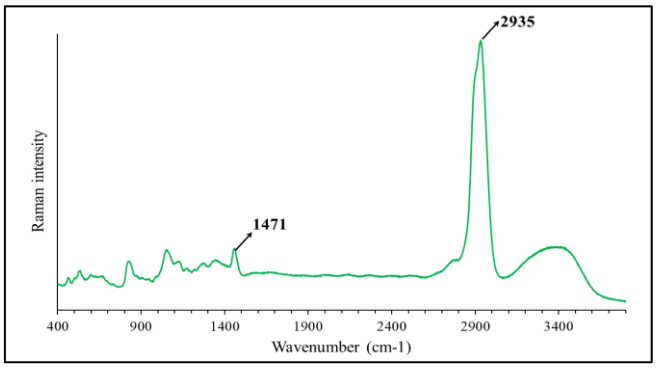
Fenolna jedinjenja	**t_R (min)**	**Linearna jedinačina (*Y=a+b*X*)**	**r^2**	**LOD (mg/L)**	**LOQ (mg/L)**
Galna kiselina	1.92	Y = - 39972.3 + 878796*X	0.9959	0.08	0.27
Protokatehinska kiselina	3.71	Y = - 117212 + 3417570*X	0.9942	0.10	0.33
Kofeinska kiselina	5.53	Y = - 157197 + 10806700*X	0.9980	0.06	0.19
Katehin	4.99	Y = - 3539.10 + 3535423*X	0.9983	0.05	0.16
Katehin galat	6.22	Y = - 92987.3 + 3017810*X	0.9961	0.08	0.26
Galokatehin	3.72	Y = - 9632.86 + 187473*X	0.9986	0.05	0.16
Epigalokatehin	4.64	Y = - 4911.87 + 152360*X	0.9945	0.09	0.31
Epigalokatehin galat	6.79	Y = 7027.22 + 363232*X	0.9929	0.10	0.32
Kvercetin-3-*O*-glukozid	6.19	Y = - 53503.4 + 6308160*X	0.9926	0.11	0.36
Izoramnetin-3-*O*-glukozid	6.63	Y = - 16925.9 + 1161160*X	0.9992	0.04	0.12
Kampferol	8.80	Y = - 43114.9 + 392203*X	0.9917	0.12	0.39
Apigenin-7-*O*-glukozid	6.91	Y = - 137958 + 9050410*X	0.9988	0.03	0.11
Naringenin	8.53	Y = - 225683 + 6063340*X	0.9921	0.11	0.38
Eskuletin	5.30	Y = - 102582 + 6232950*X	0.9923	0.11	0.37

7.2. Slike

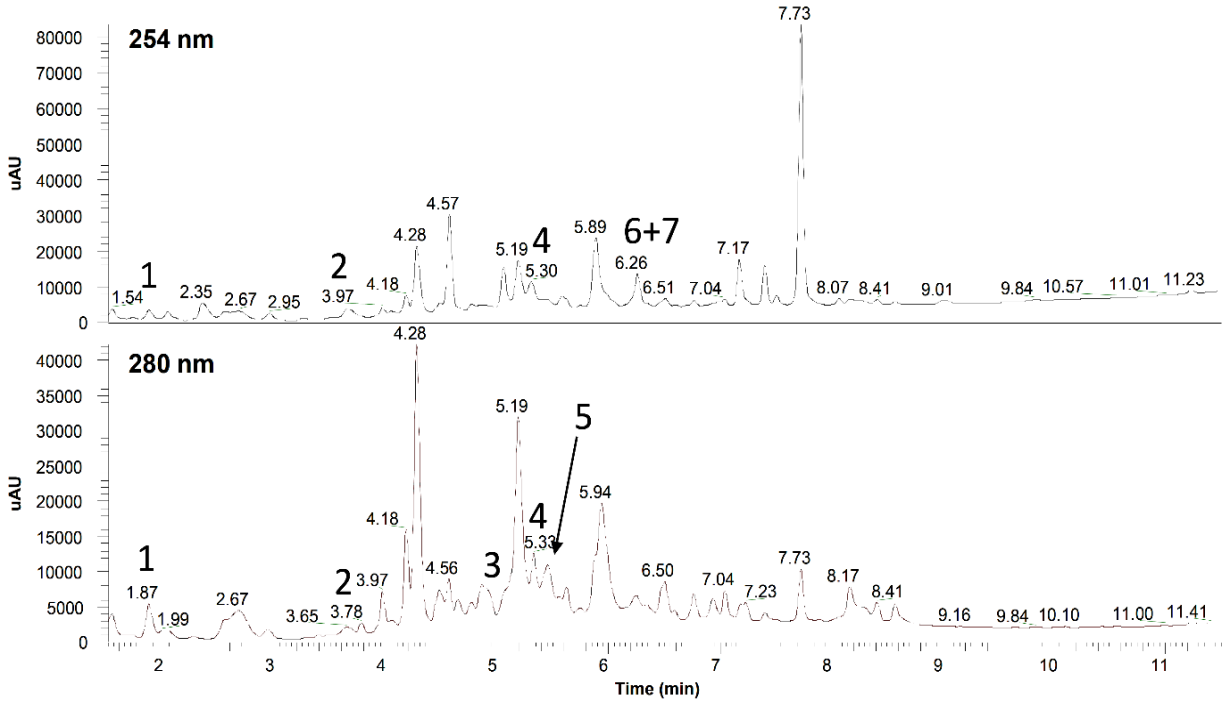
Slika P1. Slike od: sušenih toplim vazduhom (a-e) i liofilisanih (f-j) uzoraka komine Prokupca izdvojene posle fermentacije i njegovih konstituenata posebno. Cela komina (a,f); samlevena cela komina (b,g); šepurina/peteljčica (c,h); semenka (d,i); i pokožica (e,j).



Slika P2. Slike sprej osušenih praškastih funkcionalnih aditiva na bazi kozjeg mleka, inulina i ekstrakta semenki koje su izdvojene iz komine: odmašćeno sirovo kozje mleko (a); termički tretirano kozje mleko (90°C, 10min) (b); funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozjeg mleka obogaćenog različitim koncentracijama ekstrakta semenke (c-e); odmašćeno termički tretirano kozje mleko/inulin (f); funkcionalni aditivi na bazi odmašćenog termički tretiranog kozjeg mleka sa dodatkom sprej osušenog praha inulin/ekstrakt (g-i); sprej osušeni prah inulin/ekstrakt (j).



Slika P3. Raman spektar čistog inulina



Slika P4. UV hromatogram TME3 uzorka, na 254nm i 280nm (1-Galna kiselina; 2-Protokatehinska kiselina; 3-Katehin; 4-Eskuletin; 5-Kofeinska kiselina; 6 – Kvercetin-3-*O*-glukozid; 7 – Katehin galat)

8. Biografija autora

Danijel D. Milinčić, *rođen je 29.11.1993. u Kruševcu. Diplomirao je na katedri za Prehrambenu tehnologiju, smer Konzervisanje i vrenje, na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, 2016. godine, sa prosečnom ocenom 9,95 i ocenom 10 na završnom radu iz oblasti hemije i biohemije hrane pod nazivom:" Interakcije polifenolnih jedinjenja sa proteinima mleka". Masterirao je 2017. godine na istom fakultetu, smer Hemija i biohemija hrane, sa prosečnom ocenom 10,00 i ocenom 10 na master radu iz oblasti hemije i biohemije hrane pod nazivom:"Karakterizacija biološki aktivnih komponenata sušenih pokožica grožđa". Školske 2017/2018. godine upisao je doktorske akademske studije, takođe na Poljoprivrednom fakultetu.*

Školske 2016/2017; 2017/2018; 2018/2019; 2019/2020; 2020/2021; 2021/2022. godine je bio angažovan kao saradnik u nastavi van radnog odnosa na Katedri za Hemiju i biohemiju, Poljoprivrednog faklulteta, na predmetu Osnovi biohemije, gde je pomagao u izvođenju laboratorijskih vežbi za smerove Fitomedicina i Hortikultura. Od juna 2018. goodine je izabran u zvanje istraživač-saradnik, u oblasti Biotehničkih nauka, grana Prehrambeno inženjerstvo, naučna disciplina Tehnologija biljnih proizvoda, uža naučna disciplina Hemija proizvoda biljnog porekla.

Do sada je bio stipendista Ministarstva obrazovanja, nauke i tehnološkog razvoja, za školske 2013/2014; 2014/2015; i 2015/2016. godine, i Fonda za mlade talente Ministarstva omladine i sporta Republike Srbije (Dositeja), za školosku 2016/2017. godinu. Kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, bio je angažovan na projektu TP31069, „Korišćenje biljnih izvora proteina, dijetalnih vlakna i antioksidanasa u proizvodnji hrane". Angažovan je na projektu IDEJA, koji finansira Fond za nauku Republike Srbije, ev. br. 7744714, „Functional products based on goat's milk proteins and bioactive compounds extracted from grape pomace and edible mushrooms–FUNPRO".

Nagrađen je za izuzetan uspeh tokom studija na Poljoprivrednom fakultetu, Univerzitet u Beogradu. Nosioc je druge nagrade za izlaganje rada na 10th International Conference of Students of Agronomy, University of Kragujevac, Faculty of Agronomy in Čačak, 2017. Ko-autor je rada koji je nagrađen godišnjom nagradom (2021) Poljoprivrednog fakulteta, za jedan od dva najbolja rada iz oblasti nauke o hrani, koji je objavljen u Food Chemistry. Ko-autor je rada koji je bio „Top Cited Article", u časopisu Cereal Chemistry, za 2020-2021 godinu. Ko-autor je na radovima iz kategorije M21a, koji su nagrađeni na farmaceutskom fakultetu (2021-2022). Autor je postera koji je nagrađen prvom nagradom na internacionalnoj konferenciji održanoj 2022 godine u Sarajevu (32nd International Scientific-Expert Conference of Agriculture and Food Industry 1st -2nd December 2022 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina).

Njegov naučno-istraživački rad je fokusiran na hemiju i biohemiju hrane, sa specijalnim naglaskom na bioaktivne komponente hrane, funkcionalna i tehno-funkcionalna svojstva hrane, in vitro digestije, proteine hrane i biohemijske transformacije tokom procesuiranja hrane.

Do sada je kao autor ili koautor, sa kolegama i profesorima publikovao 28 naučnih radova na SCI listi (M21a; M21; M22; i M23); 3 poglavlja u stranim knjigama; više od 50 saopštenja na međunarodnim i nacionalnim kongresima; i 1 laboratorijski priručnik. Njegovi radovi su do sada citirani 263 puta; h-index je 8 (prema Scopus bazi), ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2476-9426. Autor je do sada bio recenzent u nekoliko vodećih međunarodnih časopisa, kao što su: Journal of Agricultural and Food Chemistry; Journal od Food Processing and Preservation; International dairy journal; Food Control; Foods, Molecules; Dairy; International journal of molecular science; Sustainability; i Quality assurance and safety of crops & foods.

Član je udrženja prehrambenih tehnologa Srbije, Srpskog hemijskog društva i Društva za ishranu Srbije (Serbian nutrition society). Kao član organizacionog odbora učestvovao je u pripremi i realizaciji 2nd UNIFood International Conference (Belgrade 2021).

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Danijel D. Milinčić

Broj indeksa TH170001

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Sporedni proizvodi vinske industrije kao izvor bioaktivnih jedinjenja: karakterizacija i mogućnost primene u prehrambenoj industriji

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, _____

_____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime Danijel D. Milinčić

Broj indeksa TH170001

Studijski program Prehrambena tehnologija

Naslov rada Sporedni proizvodi vinske industrije kao izvor bioaktivnih jedinjenja: karakterizacija i mogućnost primene u prehrambenoj industriji

Mentor dr Mirjana B. Pešić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sa predao radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktor nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, _____

_____

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Sporedni proizvodi vinske industrije kao izvor bioaktivnih jedinjenja: karakterizacija i mogućnost primene u prehrambenoj industriji

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilozima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo-nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo-nekomercijalno-bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo-nekomercijalno-deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo-bez prerade (CC BY-SA)
6. Autorstvo-deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

Potpis autora

U Beogradu, _____

_____

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo–nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. **Autorstvo–nekomercijalno–bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. **Autorstvo–nekomercijalno–deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo–bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. **Autorstvo–deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.