

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Jovana M. Marković

**UTICAJ INKAPSULIRANOG SOKA I LIOFILIZOVANOG
TROPA KORENA I LISTA RENA (*Armoracia rusticana* L.)
NA OKSIDATIVNU STABILNOST I KVALITET MAJONEZA
TOKOM SKLADIŠTENJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2025.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Jovana M. Marković

**THE EFFECT OF ENCAPSULATED JUICE AND FREEZE
DRIED POMACE OF HORSERADISH (*Armoracia
rusticana* L.) ROOT AND LEAF ON OXIDATIVE
STABILITY AND QUALITY OF MAYONNAISE DURING
STORAGE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025.

Mentori:

dr Dragana M. Mihajlović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

dr Viktor A. Nedović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije:

dr Biljana B. Rabrenović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

dr Steva M. Lević, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

dr Verica B. Đorđević, docent

Univerzitet u Beogradu - Tehnološko-metalurški fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

Doktorska disertacija je urađena u okviru projekta integralnih i interdisciplinarnih istraživanja, pod nazivom: „Razvoj i primena novih i tradicionalnih tehnologija u proizvodnji konkurentnih prehrambenih proizvoda sa dodatom vrednošću za domaće i evropsko tržište - STVORIMO BOGATSTVO IZ BOGATSTVA SRBIJE“ (evidencioni broj projekta III 46001), finansiranog od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije, kao i Ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada između Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (evidencioni broj ugovora za 2025. godinu: 451-03-137/2025-03/200116).

Eksperimentalni deo ove disertacije izveden je u laboratorijama Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i Laboratorije za razvoj i Inovacije kompanije Polimark d.o.o. (Beograd, Srbija).

Zahvalnica

Najsrdačnije se zahvaljujem svojoj mentorki dr Dragani Mihajlović, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na nesebičnoj podršci i pomoći pruženoj tokom izrade ove doktorske disertacije. Hvala Vam na značajnom doprinosu, prenesenom znanju i korisnim savetima tokom svih faza rada na ovoj disertaciji. Zahvaljujem se na ukazanom poverenju, velikom zalaganju i prijatnom, pedagoškom pristupu, koji mi je bio vetar u leđa prilikom realizacije ove disertacije.

Neizmerno se zahvaljujem svom mentoru dr Viktoru Nedoviću, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na velikoj pomoći i značajnom doprinosu u realizaciji i pisanju ove doktorske disertacije. Veliko hvala na brojnim pruženim prilikama, ostvarenim kontaktima i otvorenim saradnjama, koje su u meni podstakle nova interesovanja u svetu istraživanja. Veoma se zahvaljujem na pruženoj podršci i prilici da budem deo Vašeg stručnog tima.

Veliko hvala dr Biljani Rabrenović, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na stručnom usmeravanju i korisnim, prijateljskim savetima tokom realizacije ove disertacije. Hvala Vam na ostvarenim kontaktima i pruženim prilikama za saradnju, koje su značajno doprinele kvalitetu ove disertacije.

Veliku zahvalnost na dragocenim savetima, stečenom znanju i nesebičnoj pomoći pruženoj tokom svih faza ove doktorske disertacije dugujem dr Stevi Leviću, vanrednom profesoru Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Hvala Vam na izdvojenom vremenu, angažovanju i velikoj posvećenosti pri pisanju naučnih radova i izvođenju eksperimentalnog dela disertacije, koja je za mene bila od izuzetne važnosti.

Zahvaljujem se dr Verici Đorđević, docentu Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na saradnji, podršci i savetima, kao i na prilici da jedan segment eksperimentalnog dela disertacije bude izveden u laboratorijama Tehnološko-metalurškog fakulteta.

Posebnu zahvalnost osećam i izražavam prema kolegini dr Ani Salević, na bezrezervnoj podršci, dobronamernim savetima i neizmernoj pomoći pruženoj u svakoj pojedinačnoj tački izvođenja ove doktorske disertacije. Veliko hvala na nesebično prenesenom znanju, velikom angažovanju i brojnim pruženim prilikama i ostvarenim kontaktima. Beskrajno se zahvaljujem na prijateljskim razgovorima i toplom, ljudskom pristupu, koji mi je pomogao da savladam brojne prepreke i nastavim dalje na svom akademskom putu.

Izuzetno se zahvaljujem dr Mirjani Pešić, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, dr Danijelu Milinčiću, višem naučnom saradniku Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, dr Urošu Gašiću, naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ (IBISS) Univerziteta u Beogradu, i dr Vladimiru Pavloviću, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na značajnom doprinosu i velikoj pomoći pruženoj tokom izvođenja eksperimenta i pisanja naučnih radova. Hvala Vam na korisnim savetima i sugestijama, koji su značajno doprineli da ova disertacija bude kompletna.

Zahvaljujem se poslovodstvu kompanije Polimark d.o.o. (Beograd, Srbija) na prilici da se jedan značajan segment eksperimentalnog dela disertacije izvede u Laboratoriji za razvoj i inovacije ove kompanije, kao i na obezbeđenim sirovinama za rad. Zahvaljujem se svim članovima pomenute laboratorije, koji su mi pomogli prilikom pripreme i analize uzoraka, kao i tumačenja dobijenih rezultata.

Zahvaljujem se svim kolegama iz laboratorija Katedre za tehnologiju konzervisanja i vrenja Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu na pruženoj podršci, prijatnoj saradnji, razumevanju i druženju. Hvala kolegama Lazaru Pejiću i Spasoju Beloševiću na pomoći prilikom izvođenja analiza i tumačenja rezultata.

Veliku zahvalnost izražavam prema Ministarstvu nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije na finansijskoj podršci pruženoj u vidu stipendiranja i kasnijeg uključivanja u naučnoistraživački rad.

Najiskrenije se zahvaljujem svim svojim dragim prijateljima i porodici na razumevanju i bezuslovnoj podršci pruženoj tokom celokupnog trajanja doktorskih studija.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, na bezgraničnoj ljubavi, svesrdnoj podršci i veri u mene, koja mi je bila glavni motiv i podstrek na ovom putovanju. Hvala majki Biljani i ocu Milivoju na toplini, razumevanju i razgovorima, koji su bili siguran put u prevazilaženju svakog problema. Najviše Vam hvala na sestri Neveni, koja je, kao i celog života, čvrsto stajala uz mene od prvog do poslednjeg momenta izrade ove disertacije. Hvala Marku na podršci, ljubavi i velikoj radosti kojom obasjava moj život. Vama posvećujem ovu disertaciju.

*„Rotkvica je vredna svoje mase u olovu,
cvekla je vredna svoje mase u srebru,
a ren je vredan svoje mase u zlatu.“*

Prorok iz Delfa u svom obraćanju bogu Apolonu

UTICAJ INKAPSULIRANOG SOKA I LIOFILIZOVANOG TROPA KORENA I LISTA RENA (*Armoracia rusticana* L.) NA OKSIDATIVNU STABILNOST I KVALITET MAJONEZA TOKOM SKLADIŠTENJA

Sažetak

U okviru ove doktorske disertacije dobijeni su sokovi korena i lista rena blagom, netermalnom, „zelenom“ i ekološki prihvatljivom metodom hladnog presovanja. Potom je izvršena karakterizacija dobijenih sokova u pogledu sadržaja fenolnih jedinjenja i procene antioksidativnog potencijala. Spektrofotometrijskom i hromatografskom analizom utvrđeno je da sokovi korena i lista rena predstavljaju bogat izvor fenolnih jedinjenja iz klase fenolnih kiselina i flavonoida, sa izraženim antioksidativnim delovanjem. To ih čini pogodnom sirovinom za dodavanje u prehrambene proizvode u cilju sprečavanja oksidacije.

U cilju očuvanja bioaktivnog potencijala sokova korena i lista rena smanjenjem sadržaja vode i enzimske aktivnosti, kao i zaštite od spoljašnjih uticaja i postizanja pogodnije forme za dodavanje u prehrambene proizvode, sokovi su podvrgnuti postupku inkapsulacije tehnikom sprej sušenja. Kao nosači za inkapsulaciju korišćene su sledeće kombinacije polisaharida: maltodekstrin/alginat, maltodekstrin/guar guma i maltodekstrin/arapska guma. Radi postizanja što detaljnijeg uvida u fizičke osobine i biološki potencijal dobijenih inkapsulata soka korena i lista rena, izvršena je detaljna fizičko-hemijska, morfološka, strukturna, spektrofotometrijska i hromatografska karakterizacija dobijenih prahova, kao i analiza stabilnosti tokom dugotrajnog skladištenja. Dobijeni rezultati ukazali su na pozitivan efekat postupka inkapsulacije na fizičko-hemijske i morfološke parametre prahova, kao i na očuvanje fenolnih konstituenata i antioksidativnog potencijala sokova korena i lista rena. Pored toga, temperatura zamrzivača (-18 °C) i inkapsulacija unutar primenjenih nosača bili su adekvatni uslovi za zadržavanje fenolnih jedinjenja i strukture prahova tokom dugotrajnog skladištenja.

Kao nusproizvod prilikom dobijanja sokova hladnim presovanjem korena i lista rena, zaostajale su velike količine tropa. U cilju potpunog iskorišćenja biljne sirovine i smanjenja količina otpada iz poljoprivrednog sektora, značajan deo ove disertacije zauzima istraživanje vezano za analizu bioaktivnog potencijala tropova rena. Spektrofotometrijskom i hromatografskom analizom utvrđeno je da, osim sokova, i tropovi korena i lista rena sadrže značajne koncentracije fenolnih jedinjenja i izražen antioksidativni potencijal. Stoga su tropovi podvrgnuti postupku liofilizacije, kako bi blagi uslovi ovog postupka sušenja u što većoj meri očuvali biološki aktivne komponente, a sami tropovi bili prevedeni u stabilniju i poželjniju formu za dodavanje u prehrambeni proizvod. Liofilizacijom je redukovana sadržaj vode tropova za više od 90%, a pritom su očuvane značajne količine biološki aktivnih komponenata i antioksidativnog potencijala, što se može zaključiti na osnovu dobijenih rezultata primenjenih metoda za određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti. To je ukazivalo na obećavajući potencijal ovih nusproizvoda rena za dodavanje u prehrambene proizvode, kako bi svojim antioksidativnim delovanjem uticali na sprečavanje oksidativne degradacije proizvoda.

Finalni deo istraživanja bio je usmeren na proizvodnju majoneza sa dodatkom sprej sušenih inkapsulata sokova i liofilizata tropova korena i lista rena. Zbog niskog prinosa inkapsulacije i najmanje poželjnih fizičko-hemijskih, morfoloških i bioaktivnih karakteristika, inkapsulat soka lista rena sa maltodekstrin/guar guma kombinacijom nosača nije korišćen za proizvodnju majoneza. Takođe, postizanje emulzije nije bilo moguće u slučaju pripreme majoneza sa dodatkom liofilizovanog tropa korena rena, zbog značajno smanjenog sadržaja vode na račun dodatog tropa. Konačno, proizvedene su sledeće formulacije majoneza: majonezi koji su sadržali sprej sušene prahove soka korena rena, majonezi koji su sadržali sprej sušene prahove soka lista rena i majonez sa liofilizovanim prahom tropa lista rena. Kao referentni uzorci pripremljeni su: kontrolni majonez bez dodatnih komponenata rena i

pozitivno kontrolni majonez sa sintetičkim antioksidansom etilendiamintetrasirćetnom kiselinom (EDTA), koji se komercijalno koristi u prehrambenoj industriji za sprečavanje oksidacije ovog proizvoda.

Nakon proizvodnje majoneza, ispitan je uticaj dodatih prahova rena na oksidativnu stabilnost, kvalitet i senzornu prihvatljivost ovog prehrambenog proizvoda. Rezultati određivanja oksidativne stabilnosti majoneza tokom osmonedeljnog skladištenja u mraku na temperaturi od 4 °C pokazali su da su svi majonezi sa dodatkom komponenata rena imali niže vrednosti peroksidnog broja, anisidinskog broja i oksidativne vrednosti od kontrolnog majoneza na kraju skladištenja. To je bio dokaz efektivnosti antioksidanasa prisutnih u renu u sprečavanju oksidacije majoneza. Primenom testa ubrzane oksidacije utvrđeno je da su inkapsulati soka korena, inkapsulati soka lista i liofilizati tropa lista rena odložili oksidaciju majoneza za 33-84% duže od majoneza sa sintetičkim antioksidansom. Osim toga, analizom kvaliteta majoneza tokom osmonedeljnog skladištenja dokazan je pozitivan uticaj dodatih komponenata rena na kiselinski broj i pH vrednost majoneza. Majonezi koji su sadržali inkapsulirane prahove soka korena i lista rena bili su ocenjeni senzornim ocenama opšte prihvatljivosti od 7 („umereno mi se dopada“) do 8 („veoma mi se dopada“), dok je majonez koji je sadržao liofilizovani trop lista rena imao niže senzorne ocene. Među svim dodatim prahovima rena, posebno se istakla formulacija inkapsuliranog soka lista rena unutar maltodekstrin/alginat kombinacije nosača, ispoljavajući najizraženije pozitivne efekte na senzornu prihvatljivost majoneza.

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije ukazuju na obećavajući potencijal prirodnih antioksidanasa sadržanih u korenu i listu rena za primenu u prehrambenoj industriji. Dodavanjem ove biološki vredne biljne sirovine u prehrambeni proizvod postignuti su brojni benefiti, kao što su: odlaganje formiranja primarnih i sekundarnih proizvoda oksidacije, poboljšanje kvaliteta i produženje roka trajanja proizvoda, redukovanje biološkog otpada i smanjena upotreba sintetičkih antioksidanasa u prehrambenoj industriji.

Ključne reči: ren (*Armoracia rusticana* L.), koren, list, antioksidativna aktivnost, fenolna jedinjenja, inkapsulacija, sprej sušenje, liofilizacija, majonez, oksidativna stabilnost

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Nauka o konzervisanju i vrenju

UDK: 633.846:664.34(043.3)

THE EFFECT OF ENCAPSULATED JUICE AND FREEZE DRIED POMACE OF HORSERADISH (*Armoracia rusticana* L.) ROOT AND LEAF ON OXIDATIVE STABILITY AND QUALITY OF MAYONNAISE DURING STORAGE

Abstract

In this dissertation, horseradish root and leaf juices were obtained by a mild, non-thermal, "green", and ecologically friendly cold-pressing method. The produced juices were then characterized in terms of phenolic compound content and antioxidant potential. Spectrophotometric and chromatographic analyzes revealed that horseradish root and leaf juices are a rich source of phenolic compounds, such as phenolic acids and flavonoids with a pronounced antioxidant activity. This makes them a suitable raw material for addition to foods to prevent oxidation.

To this end, the horseradish root and leaf juices were encapsulated by spray drying to preserve the bioactive potential, reduce the water content and enzymatic activity, protect from external factors, and achieve a more suitable form for addition to foods. The following combinations of polysaccharides were used as encapsulation carriers: maltodextrin/alginate, maltodextrin/guar gum, and maltodextrin/gum Arabic. To gain a detailed insight into the physical properties and biological potential of the encapsulates, the comprehensive physicochemical, morphological, structural, spectrophotometric, chromatographic, and stability characterization was evaluated. The results indicate a positive effect of encapsulation on the physicochemical and morphological properties of the powders, as well as on the preservation of the phenolic compounds and the antioxidant potential of horseradish juices. In addition, the encapsulation within the used carriers and the freezer storage (-18 °C) maintained the long-term stability of the phenolic compounds and the structure of horseradish powders.

After the cold-pressing of horseradish roots and leaves, large quantities of pomace remain as a by-product. In order to fully utilize plant raw materials and reduce the amount of waste in agriculture, a significant part of this dissertation is dedicated to the bioactive potential analysis of horseradish pomace. Spectrophotometric and chromatographic analysis revealed that, in addition to the juices, the horseradish pomace also contains significant amounts of phenolic compounds and a pronounced antioxidant potential. The pomace was therefore freeze dried so that the mild conditions of this drying process would preserve as many of the biologically active compounds as possible. It would also convert the pomace into a more stable and desirable form for addition to foods. Freeze drying reduced the water content of the pomaces by more than 90%. At the same time, significant amounts of biologically active compounds and antioxidant potential are retained, as indicated by the results of the methods used to determine phenolic compound content and antioxidant activity. This indicates the promising potential of these antioxidant horseradish by-products for addition to food products to prevent their oxidative degradation.

The final part of the research was focused on the production of mayonnaise with the addition of encapsulated spray dried juice and freeze dried pomace of horseradish roots and leaves. Due to the low encapsulation yield and the less desirable physicochemical, morphological, and bioactive properties, the encapsulated leaf juice within maltodextrin/guar gum carrier combination was not used for mayonnaise production. Also, mayonnaise with the addition of freeze dried horseradish root pomace was not produced. Namely, emulsification was not possible due to the significantly reduced water content in favor of the added pomace. Finally, the following mayonnaise formulations were produced: mayonnaise with spray dried horseradish root juice powders, mayonnaise with spray dried horseradish leaf juice powders, and mayonnaise with freeze dried horseradish leaf pomace. The following mayonnaises were produced as comparative samples: control mayonnaise without horseradish

ingredients and positive control mayonnaise with the synthetic antioxidant ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), which is used commercially in the food industry to prevent oxidation of this product.

After the mayonnaise production, the effect of added horseradish powders on this food product's oxidative stability, quality, and sensory acceptability was investigated. After eight weeks of storage in the dark at a temperature of 4 °C, all mayonnaises with added horseradish powders had lower peroxide, *p*-anisidine, and total oxidation values than the control mayonnaise. This was proof of the effectiveness of the antioxidants contained in horseradish in preventing the mayonnaise oxidation. Using the accelerated oxidative stability analysis, it was found that encapsulated and freeze dried horseradish powders delayed the oxidation of mayonnaise by 33-84% longer than the used synthetic antioxidant. In addition, the analysis of the mayonnaise quality during the eight-week storage period proved the positive effect of the added horseradish components on the acid and pH values of the mayonnaise. Mayonnaises containing encapsulated horseradish root and leaf powders were rated with sensory scores of overall acceptability ranging from 7 ("like moderately") to 8 ("like very much"). In contrast, mayonnaise containing freeze dried horseradish leaves pomace had lower sensory ratings. Among all the added horseradish powders, horseradish leaf juice encapsulated within a maltodextrin/alginate carrier combination has the most pronounced positive effects on the sensory acceptability of mayonnaise.

The results obtained in this dissertation indicate the promising potential of the natural antioxidants contained in the root and leaf of horseradish for use in the food industry. The addition of this biologically valuable plant-based raw material to food has contributed to numerous benefits, such as: delaying the formation of primary and secondary oxidation products, improving the quality, and extending the shelf life of the product, reducing biological waste and the use of synthetic antioxidants in the food industry.

Keywords: horseradish (*Armoracia rusticana* L.), root, leaf, antioxidant activity, phenolic compounds, encapsulation, spray drying, freeze drying, mayonnaise, oxidative stability

Scientific field: Technological engineering

Scientific subfield: Food preservation and fermentation science

UDC: 633.846:664.34(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. REN	4
2.1.1. Klasifikacija i poreklo.....	4
2.1.2. Morfološke, agrotehničke i agroekološke karakteristike.....	4
2.1.3. Hemijski sastav i nutritivna vrednost	5
2.1.4. Biološka aktivnost	6
2.1.5. Upotreba u prehrambenoj industriji i medicini.....	11
2.2. INKAPSULACIJA	13
2.2.1. Pojam, značaj i primena.....	13
2.2.2. Tehnike inkapsulacije	15
2.2.3. Nosači za inkapsulaciju	27
2.2.4. Inkapsulacija sokova različitih biljnih vrsta	32
2.3. MAJONEZ	34
2.3.1. Sirovine i njihova uloga.....	34
2.3.2. Tehnološki postupak proizvodnje.....	36
2.3.3. Tipovi kvarenja i načini prevencije	38
3. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	42
4. MATERIJALI I METODE	43
4.1. MATERIJALI	43
4.1.1. Sirovine.....	43
4.1.2. Hemikalije.....	43
4.2. METODE	44
4.2.1. Hladno presovanje korena i lista rena i karakterizacija dobijenih sokova	44
4.2.1.1. Određivanje sadržaja suve materije i sadržaja vlage	45
4.2.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativnog kapaciteta sokova	45
4.2.1.2.1. Priprema sokova za spektrofotometrijsku analizu.....	45
4.2.1.2.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja.....	45
4.2.1.2.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	46
4.2.1.2.4. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih kiselina	47

4.2.1.2.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti	48
4.2.1.2.5a. DPPH metoda	48
4.2.1.2.5b. ABTS metoda	49
4.2.1.2.5c. FRAP metoda	50
4.2.1.3. Hromatografska analiza fenolnih jedinjenja sokova	51
4.2.1.3.1. Priprema sokova za hromatografsku analizu.....	51
4.2.1.3.2. UHPLC Q-ToF MS analiza.....	51
4.2.2. Inkapsulacija sokova korena i lista rena i karakterizacija dobijenih inkapsulata.....	52
4.2.2.1. Određivanje sadržaja suve materije i sadržaja vlage	53
4.2.2.2. Određivanje prinosa inkapsulacije	53
4.2.2.3. Određivanje efikasnosti inkapsulacije	53
4.2.2.4. Određivanje aktivnosti vode inkapsulata	54
4.2.2.5. Određivanje rastvorljivosti inkapsulata	54
4.2.2.6. Određivanje higroskopnosti inkapsulata	54
4.2.2.7. Određivanje kapaciteta zadržavanja ulja inkapsulata	54
4.2.2.8. Određivanje nasipne i tapkane gustine inkapsulata	54
4.2.2.9. Određivanje kompresibilnosti inkapsulata.....	55
4.2.2.10. Mikroskopska analiza inkapsulata	55
4.2.2.11. FT-IR spektroskopska analiza inkapsulata	56
4.2.2.12. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida, fenolnih kiselina i antioksidativnog kapaciteta inkapsulata.....	56
4.2.2.13. Hromatografska analiza fenolnih jedinjenja inkapsulata	56
4.2.2.14. Određivanje stabilnosti inkapsulata tokom skladištenja	57
4.2.3. Karakterizacija tropova korena i lista rena	57
4.2.3.1. Određivanje sadržaja suve materije i sadržaja vlage	57
4.2.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida, fenolnih kiselina i antioksidativnog kapaciteta tropova.....	57
4.2.3.3. Hromatografska analiza fenolnih jedinjenja tropova	58
4.2.4. Liofilizacija tropova korena i lista rena i karakterizacija dobijenih liofilizata	58
4.2.4.1. Određivanje sadržaja suve materije i sadržaja vlage	58
4.2.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida, fenolnih kiselina i antioksidativnog kapaciteta liofilizovanih tropova	58
4.2.4.3. Hromatografska analiza fenolnih jedinjenja liofilizovanih tropova	59
4.2.5. Proizvodnja majoneza sa dodatkom komponenata rena	59
4.2.5.1. Priprema majoneza.....	59

4.2.5.2. Analiza oksidativne stabilnosti majoneza	61
4.2.5.2.1. Ekstrakcija ulja iz majoneza.....	61
4.2.5.2.2. Određivanje peroksidnog broja	61
4.2.5.2.3. Određivanje anisidinskog broja.....	61
4.2.5.2.4. Oksidativna vrednost (TOTOX vrednost).....	62
4.2.5.2.5. Test ubrzane oksidacije majoneza	62
4.2.5.3. Analiza kvaliteta majoneza	63
4.2.5.3.1. Određivanje kiselinskog broja.....	63
4.2.5.3.2. Određivanje pH vrednosti majoneza	63
4.2.5.4. Senzorna analiza majoneza	63
4.2.6. Statistička obrada podataka	64
5. REZULTATI I DISKUSIJA	65
5.1. KARAKTERIZACIJA SOKOVA KORENA I LISTA RENA.....	65
5.1.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih fenolnih kiselina sokova.....	65
5.1.2. Hromatografska analiza fenolnog profila sokova.....	67
5.1.3. Antioksidativna aktivnost sokova.....	68
5.2. KARAKTERIZACIJA INKAPSULATA SOKOVA KORENA I LISTA RENA	69
5.2.1. Fizičko-hemijska karakterizacija inkapsulata.....	70
5.2.1.1. Sadržaj suve materije i sadržaj vlage inkapsulata.....	70
5.2.1.2. Prinos inkapsulacije	71
5.2.1.3. Efikasnost inkapsulacije.....	72
5.2.1.4. Aktivnost vode inkapsulata.....	72
5.2.1.5. Rastvorljivost inkapsulata	73
5.2.1.6. Higroskopnost inkapsulata.....	73
5.2.1.7. Kapacitet zadržavanja ulja inkapsulata	74
5.2.1.8. Nasipna gustina, tapkana gustina i indeks kompresibilnosti inkapsulata	74
5.2.2. Morfološke karakteristike inkapsulata.....	76
5.2.3. FT-IR spektroskopska analiza inkapsulata	80
5.2.4. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih fenolnih kiselina inkapsulata	82
5.2.5. Hromatografska analiza fenolnog profila inkapsulata.....	84
5.2.6. Antioksidativna aktivnost inkapsulata.....	87
5.2.7. Stabilnost inkapsulata tokom skladištenja	89

5.3. KARAKTERIZACIJA TROPOVA KORENA I LISTA RENA	93
5.3.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih fenolnih kiselina tropova.....	93
5.3.2. Hromatografska analiza fenolnog profila tropova.....	94
5.3.3. Antioksidativna aktivnost tropova korena i lista rena	96
5.4. KARAKTERIZACIJA LIOFILIZOVANIH TROPOVA KORENA I LISTA RENA	97
5.4.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih fenolnih kiselina liofilizata.....	98
5.4.2. Hromatografska analiza fenolnog profila liofilizata.....	100
5.4.3. Antioksidativna aktivnost liofilizata.....	101
5.5. KARAKTERIZACIJA MAJONEZA SA DODATKOM KOMPONENATA RENA	102
5.5.1. Oksidativna stabilnost majoneza	103
5.5.2. Kvalitet majoneza	110
5.5.3. Senzorna analiza majoneza.....	112
6. ZAKLJUČAK.....	115
7. LITERATURA	121
8. PRILOZI.....	144
BIOGRAFIJA AUTORA	146
Izjava o autorstvu	147
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	148
Izjava o korišćenju	149

1. UVOD

Iako je tokom poslednjih decenija značajno intenzivirana sklonost čovečanstva ka zdravijoj ishrani i nižem kalorijskom unosu, majonez je i dalje veoma popularan proizvod koji se služi na trpezama širom sveta, zahvaljujući svom specifičnom ukusu, privlačnoj teksturi i kremastom osećaju u ustima. U fizičkom smislu, majonez predstavlja emulziju ulja dispergovanog u vodenom rastvoru sirćetne kiseline ili limunovog soka, uz pomoć prirodnih emulgatora, kao što su proteini i fosfolipidi iz žumanca jajeta (Mirzanajafi-Zanjani et al., 2019). Iako se može čuvati na sobnoj temperaturi, kvalitet ovog proizvoda tokom vremena može značajno opasti. Naime, zbog strukture lipida, odnosno njihovog sastava i sadržaja (oko 70-80%), veoma je podložan oksidativnim oštećenjima, što rezultira stvaranjem užeglog ukusa, smanjenjem nutritivne vrednosti i skraćenim rokom trajanja (Blejan and Nour, 2023). Različiti sintetički antioksidansi, kao što su etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), *t*-butil hidrohinon (TBHQ), butilhidroksianizol (BHA) i butilhidroksitoluen (BHT), pokazali su se efikasnim u sprečavanju oksidacije majoneza (Ahmadi-Dastgerdi et al., 2019; Chotphruethipong and Benjakul, 2019). Odlikuju ih visoka stabilnost, niska cena, dostupnost i dobra aktivnost uklanjanja slobodnih radikala (Xu et al., 2021). Međutim, neke studije su identifikovale sintetičke antioksidanse kao toksikološke i kancerogene agense (Ogundele, 1999; Eskandani et al., 2014; Xu et al., 2021).

Zbog zabrinutosti u vezi potencijalnih štetnih efekata sintetičkih aditiva, postoji sve veća potražnja potrošača za upotrebom antioksidanasa iz prirodnih izvora, kao što su začini i druge biljne vrste (Kishk and Elsheshetawy, 2013; Kwon et al., 2015; Shabbir et al., 2015; Ahmadi-Dastgerdi et al., 2019; Chotphruethipong and Benjakul, 2019; Mitterer-Daltoé et al., 2020; Blejan and Nour, 2023; Soltan et al., 2023). Njihovim dodavanjem u majonez mogla bi se postići stabilizacija slobodnih radikala i sprečavanje stvaranja produkata oksidacije, a time i produženje roka trajanja proizvoda. Upravo ren (*Armoracia rusticana* L.) predstavlja potcenjen i nedovoljno iskorišćen izvor aktivnih jedinjenja sa visokom biološkom vrednošću. Pripada porodici Brassicaceae i odlikuje se ostrim i začinskim ukusom i mirisom, koji potiču od izotiocijanata. Ova isparljiva jedinjenja oslobađaju se u procesu hidrolize glukozinolata, pod uticajem enzima mirozinaze (Agneta et al., 2013; Calabrone et al., 2015). Američka Uprava za hranu i lekove (*Food and Drug Administration, FDA*) dodelila je renu GRAS status (*Generally Recognized As Safe*), tj. status bezbednog za upotrebu kao začim (Cirimbei and Vizireanu, 2014). Ren se uglavnom uzgaja radi sočnog i ljutog korena, koji ima široku kulinarsku primenu (Tomsone et al., 2020c), kao dodatak uz razna jela, poput mesa, supa i morskih specijaliteta. Sa druge strane, list rena je zanemaren i obično se odlaže sa ostatkom nadzemne biomase. Međutim, on se takođe može koristiti u prehrambene svrhe: kao salata, u kombinaciji sa drugim povrćem; kuvan, poput spanaća; ili kao list za sarmu kojoj daje karakterističan pikantan ukus (Ciska et al., 2017). Ipak, u poređenju sa korenom, njegova upotreba u prehrambenoj industriji je značajno ređa i samim tim nedovoljno istražena i valorizovana. Međutim, dokazano je da se biološka aktivnost rena ogleda u antimikrobnom, insekticidnom, antikoagulativnom i gastroprotektivnom delovanju cele biljke (Filipović et al., 2015; Dekić et al., 2017; Papp et al., 2018). Pored toga, ren pokazuje izraženo antioksidativno dejstvo zahvaljujući prisustvu fenolnih jedinjenja (Tomsone et al., 2020c), najvažnijih dijetetskih antioksidanasa sa direktnim i indirektnim antioksidativnim delovanjem. Ova jedinjenja pozitivno deluju na različite hronične bolesti, podstiču digestivno i neurološko zdravlje, podržavaju zdravo starenje, smanjuju učestalost infekcija i potrebu za antibioticima (Ćujić-Nikolić et al., 2019).

Zbog sinergističkog dejstva antioksidanasa sadržanih u renu, korisno je ekstrahovati sokove korena i lista rena, koji se mogu primeniti u prehrambenim proizvodima kao aktivne komponente i alternativa sintetičkim antioksidansima radi povećanja bioaktivnog kapaciteta i oksidativne stabilnosti proizvoda. Hladno presovanje je netermalna, ekološki prihvatljiva, „zelena“ tehnika, koja se koristi za proizvodnju sokova bogatih jedinjenjima sa visokom biološkom vrednošću. Dobijanje sokova iz voća i povrća hladnim presovanjem je korisna metoda za očuvanje bioaktivnih jedinjenja. Ova tehnika izbegava upotrebu štetnih organskih rastvarača, što je čini ekološki prihvatljivom i u skladu sa principima „zelene hemije“ (Chemat et al., 2019). Osim toga, povoljna je i sa ekonomskog aspekta, jer doprinosi uštedi energije. Međutim, zbog visokog sadržaja vode i enzimske aktivnosti, bioaktivne komponente hladno presovanih sokova rena su veoma nestabilne i lako se transformišu u druga jedinjenja sa manje poželjnim senzornim karakteristikama, što ograničava njihovu primenu u prehrambenim proizvodima (Tomsone et al., 2020a). Zato je sokove rena dobijene ovim postupkom neophodno sačuvati (Tomsone et al., 2020b), ali i prevesti u oblik pogodniji za dodavanje u prehrambene proizvode.

Iz navedenih razloga, prirodni ekstrakti i sokovi od voća i povrća često se dodaju različitim prehrambenim proizvodima u obliku inkapsulata. Inkapsulacija je efikasan pristup očuvanja bioaktivnih komponenta sokova i ekstrakata, kao i kontrole njihovog oslobađanja (Nedović et al., 2011). Naime, inkapsulacioni nosači deluju kao zaštitni sloj aktivnih komponenta od nepoželjnih uslova okoline, kao što su svetlost, vlaga i kiseonik (Yousuf et al., 2016). Pored toga, inkapsuliranje sokova dovodi do lakšeg rukovanja, poboljšanja stabilnosti i bezbednosti, sprečavanja interakcija između komponenta hrane i maskiranja neprijatnih mirisa i drugih nepoželjnih senzornih svojstava aktivnih sastojaka (Lević, 2014). Sušenje raspršivanjem je najrasprostranjenija tehnika inkapsulacije u prehrambenoj industriji, zahvaljujući ekonomičnom, kontinuiranom radu i proizvodnji čestica dobrog kvaliteta (Fang and Bhandari, 2010). Zasniva se na homogenizaciji mešavine materijala jezgra i nosača i njenoj disperziji u struji toplog vazduha u komori za sušenje raspršivanjem. Važno je naglasiti ekonomsku prednost procesa inkapsulacije sokova metodom sprej sušenja, jer dolazi do prevođenja ovih proizvoda u suvi oblik. To rezultira dužim rokom trajanja i smanjenom zapreminom proizvoda, što je od izuzetnog značaja za transport i skladištenje (Cano-Chauca et al., 2005). Iako je maltodekstrin jedan od najčešće korišćenih nosača za inkapsulaciju aktivnih komponenta sušenjem raspršivanjem, neke studije su pokazale da se upotrebom kombinacije maltodekstrina i različitih hidrokoloida dobijaju inkapsulati sa povoljnijim karakteristikama (Pieczykolan and Kurek, 2019).

Prilikom dobijanja sokova od voća i povrća metodom hladnog presovanja generišu se značajne količine tropa koji zaostaje kao nusproizvod. Poslednjih godina došlo je do napretka u istraživanju sadržaja fenolnih jedinjenja u ovim nusproizvodima, izdvajanju bioaktivnih jedinjenja iz tropova i proučavanju njihovog uticaja na ljudski organizam. Tropovi od voća i povrća nude snažan potencijal kao funkcionalni dodatak mnogim prehrambenim proizvodima. Širok spektar i obilje bioaktivnih komponenta u tropu čine ga vrednim istraživanja u pogledu njegove upotrebe u industrijskom obimu. To bi pomoglo da se ograniči odlaganje ove vredne sirovine i smanji upotreba sintetičkih aditiva u hrani tako što će se zameniti biološki aktivnim komponentama iz prirodnih izvora.

Stoga je ova studija imala za cilj dobijanje sokova korena i lista rena metodom hladnog presovanja i njihovu karakterizaciju u pogledu sadržaja biološki aktivnih jedinjenja i procene antioksidativnog kapaciteta. Nakon toga, cilj je bio inkapsulirati dobijene sokove korena i lista rena tehnikom sprej sušenja unutar tri kombinacije nosača: maltodekstrin/alginat, maltodekstrin/guar guma i

maltodekstrin/arapska guma, i okarakterisati dobijene inkapsulate fizičko-hemijskom, morfološkom, strukturnom, spektrofotometrijskom i hromatografskom analizom, kao i analizom stabilnosti tokom dugotrajnog skladištenja. Osim toga, bioaktivni potencijal tropova korena i lista rena, dobijenih kao nusproizvodi hladnog presovanja korena i lista rena, analiziran je u okviru ove disertacije. Nakon toga, izvršena je liofilizacija tropova rena i karakterizacija dobijenih liofilizata u pogledu sadržaja biološki aktivnih jedinjenja i utvrđivanja antioksidativnog potencijala. Ovo istraživanje pruža veoma interesantan pristup valorizaciji tropova rena, koji se uklapa u koncept „zelene hemije“ i ekološke održivosti. Pored toga, ova studija doprinosi razvoju cirkularne ekonomije pružanjem novih uvida u valorizaciju listova rena, koji se gotovo smatraju biootpadom iz poljoprivrednog sektora. Konačno, osnovni cilj ovog istraživanja bila je proizvodnja majoneza sa dodatkom proizvedenih inkapsulata sokova i liofilizata tropova korena i lista rena. Nakon proizvodnje majoneza, cilj je bio ispitati uticaj dodatih komponenata rena na oksidativnu stabilnost i kvalitet ovog proizvoda tokom skladištenja, kao i na njegov senzorni profil i prihvatljivost od strane potrošača.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. REN

2.1.1. Klasifikacija i poreklo

Ren je višegodišnja biljka koja pripada porodici Brassicaceae, zajedno sa drugim krstašicama, poput kupusa, brokolija, karfiola, rotkvice, prokelja, slačice i drugih (Wright, 2011; Kopjar et al., 2012). Veruje se da vodi poreklo iz jugoistočne Evrope i zapadne Azije, gde se i danas mogu pronaći njegovi divlji preci (Filipović et al., 2015). Pripada rodu *Armoracia*, u koji se ubrajaju tri vrste rena, od kojih su dve evropske (*Armoracia rusticana* L. i *Armoracia macrocarpa* L.), dok je treća vrsta poreklom iz Sibira (*Armoracia sisymbroides* L.). Pretpostavlja se da je *Armoracia rusticana* L. pripitomljena od vrste *Armoracia macrocarpa* L., retke i ugrožene endemske vrste koja raste u močvarama sliva Srednjeg i Istočnog Podunavlja (Petrović et al., 2017). Za razliku od nje, *Armoracia rusticana* L. je najčešće uzgajana vrsta rena u različitim delovima sveta. Pretežno se smatra ruskom lekovitom biljkom (Filipović et al., 2015), jer se dugo nije gajila u drugim evropskim zemljama. Danas se u najvećoj meri uzgaja u Rusiji i Sjedinjenim Američkim Državama, dok su Mađarska, Letonija i Ukrajina najveći proizvođači ove biljne vrste u Evropi (Filipović et al., 2015).

Etimologija reči ren (engl. *horseradish*) zasniva se na rečima konj (engl. *horse*), koja metaforično označava nešto veliko i grubo, i *radish*, koja potiče od latinske reči *radix*, što znači koren (Charles, 2013).

Ren se vekovima uzgaja zbog kulinarskih i lekovitih svojstava (Wedelsbäck Bladh and Olsson, 2011). Od davnina je korišćen u medicinske svrhe za lečenje glavobolje, povišenog krvnog pritiska, bronhitisa, zubobolje, reumatizma, gastritisa i kašlja (Filipović et al., 2015; Papp et al., 2018). Ipak, ren je bio najpoznatiji po tome što su ga pomorci tokom dugih putovanja gajili na brodovima, kada nisu imali pristup svežem voću i povrću, kako ne bi obolevali od skorbuta. Tek nakon 300 godina, naučnici su otkrili da koren i list rena ispoljavaju tu aktivnost zahvaljujući visokom sadržaju vitamina C, višem čak tri puta nego u citrusima. Običaj da se ren koristi u ishrani ranije se ustalio u severnim nego u južnim delovima Evrope (Wedelsbäck Bladh and Olsson, 2011). Kao jedna od prvih primena rena kao začina navodi se da je zbog odsustva hlađenja i frižidera oštrina rena prekrivala ukus pokvarenog mesa (Agneta et al., 2013). Još u opisima dvorskih obroka iz 16. veka, ren se navodio kao nezamenljiv začim uz aspik, ribu i meso (Filipović et al., 2015). Ostale oblasti primene rena bile su kao konzervans, antiseptik ili kao stočna hrana.

2.1.2. Morfološke, agrotehničke i agroekološke karakteristike

Ren je zeljasta biljka koja raste u visinu do 120 cm. Odlikuje se cilindričnim korenom (dužine od 60 do 100 cm), kao i duguljastim, uskim listovima (dužine od 30 do 100 cm) (Agneta et al., 2012) (Slika 2.1). Koren karakterišu žuto-siva spoljašnjost i bela unutrašnjost. Tamnozeleni listovi rena se oblikom razlikuju: kraća peteljka, oblik režnja i glatki ili nazubljeni rub karakteristike su donjih listova, dok gornji (vršni) listovi imaju uzak centralni deo, tupi vrh i duguljastog su oblika. Ren ima beli, četvrtasti cvet u obliku grozda i glatki, smeđi plod, koji sadrži vrlo malo ili čak nijedno seme (Filipović et al., 2015).



Slika 2.1. Izgled korena i listova rena (*Armoracia rusticana* L.)

Razmnožava se vegetativno, pomoću reznica, koje se nalaze na najnižem delu korena (dužine 25-30 cm i prečnika 1-2 cm), a vegetativni rast traje od marta do novembra (Agneta et al., 2012). Sadnja se obično vrši u proleće (ređe u jesen), krajem marta do sredine aprila, polaganjem reznica u bušotine u zemlji, dubine 20 cm, pod uglom od 45°. Berba korena vrši se krajem oktobra, nedelju dana nakon uklanjanja lista i ostale nadzemne biomase, koja se uglavnom odbacuje (Agneta et al., 2012; Filipović et al., 2015). Koren rena se može skladištiti 10-12 meseci, na temperaturi od 0 °C i pri relativnoj vlažnosti 90-95% (Sahasrabudhe and Mullin, 1980). Čuva se u mraku, jer izložen svetlosti postaje zelen. Može se čuvati u hladnjačama, rovovima, podzemnim silosima i jamama (Filipović et al., 2015).

Rastu i razvoju rena pogoduje umerena klima, sa prosečnim kišnim periodima (Kosson and Horbowitz, 2009). Koren rena toleriše niske temperature i ne smrzava se, a područja sa hladnim zimama pružaju mu potreban period odmora, dok duga leta stvaraju povoljne uslove za njegov rast (Agneta et al., 2013). Plodna zemljišta sa vlažnošću do 70% i dobrom drenažom pogodna su za rast ove biljne vrste, koja je veoma osetljiva na velika kolebanja vlage u tlu i vazduhu. Struktura zemljišta za gajenje ove biljke trebalo bi da bude mrvičasta, što omogućava dobru propusnost i akumuliranje vlage u tlu. U teškim zemljištima koren je razgranat, zakrivljen i prilično oštar, a na laganim zemljištima postaje neukusan.

Najpoznatije sorte rena su ruske sorte: *Atlant*, *Valkovsky* i *Tolpuhovsky*, zatim američke sorte: *Maliner Kren*, *Big Top* i *Hybrid Horseradish*, kao i mađarska sorta: *Debrecen*. U Srbiji se u najvećoj meri uzgaja pomenuta mađarska sorta rena, koju karakterišu umerena oštrina i visok prinos, kao i koren dužine od 50 do 70 cm, prečnika od 4 do 5 cm i mase oko 200 g (Filipović et al., 2015).

2.1.3. Hemijski sastav i nutritivna vrednost

Hemijski sastav i nutritivna vrednost rena pre svega zavise od vrste i sorte rena, kao i od meteoroloških uslova i agrotehničkih mera primenjenih u proizvodnji ove biljne vrste. Visoka nutritivna vrednost i biološka aktivnost rena ogleda se u značajnom sadržaju makronutrijenata: ugljenih hidrata, proteina, lipida i dijetnih vlakana, kao i mikronutrijenata: vitamina i minerala. Hemijski sastav i energetska vrednost rena (izražena u kJ(kcal)/100 g), zasnovani na podacima Nacionalne baze podataka o nutrijentima Ministarstva poljoprivrede Sjedinjenih Američkih država (*The United States Department of Agriculture, USDA*), prikazani su u Tabeli 2.1.

Tabela 2.1. Nutritivna vrednost rena (Charles, 2013; tabela preuzeta uz modifikacije)

Sastojak	Jedinica	Vrednost na 100 g
Voda	g	85,08
Proteini	g	1,18
Ukupni lipidi	g	0,69
Ugljeni hidrati	g	11,29
Ukupni šećeri	g	7,99
Dijetna vlakna	g	3,3
Kalcijum	mg	56
Vitamin C	mg	24,9
Vitamin B ₆	mg	0,073
Vitamin B ₁₂	µg	0,00
Vitamin A	µg ekvivalent retinola	0
Vitamin A	internacionalna jedinica	2
Vitamin D	internacionalna jedinica	0
Vitamin E (α-tokoferol)	mg	0,01
Ukupne zasićene masne kiseline	g	0,090
Ukupne mononezasićene masne kiseline	g	0,130
Ukupne polinezasićene masne kiseline	g	0,339
Energija	kJ (kcal)	200,64 (48)

Izvor: Nacionalna baza podataka o nutrijentima Ministarstva poljoprivrede Sjedinjenih Američkih država, standardna referenca

Osim navedenih komponenata, ren obiluje sekundarnim biljnim metabolitima sa visokom biološkom aktivnošću, kao što su fenolna jedinjenja i produkti enzimske hidrolize glukozinolata, izotiocijanati.

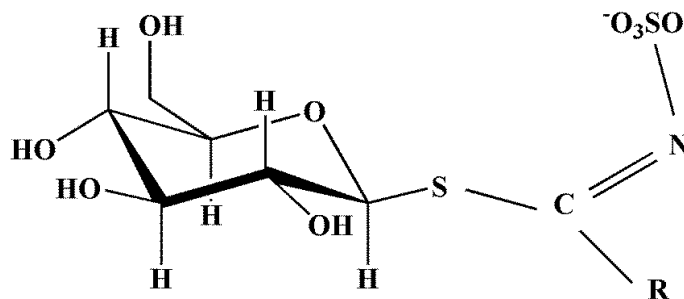
2.1.4. Biološka aktivnost

Kao što je već prethodno rečeno, ren obiluje brojnim bioaktivnim komponentama, među kojima se kao najznačajnije i najdominantnije izdvajaju: vitamin C, izotiocijanati i fenolna jedinjenja, uključujući flavonoide i fenolne kiseline (Kosson and Horbowicz, 2009; Cirimbei et al., 2013). U poslednje vreme ova biljna vrsta dobija sve veći naučni interes, upravo zbog bogatstva ovim bioaktivnim jedinjenjima. Pomenuta jedinjenja su, pored njihove važnosti za dobrobit po ljudsko zdravlje, potencijalne komponente za inovativne primene u različitim oblastima (npr. kao komponente za zaštitu od raka ili kao prirodni baktericidi, fungicidi, insekticidi, antioksidansi, itd) (Nguyen et al., 2013).

Ren obiluje vitaminom C, a njegov sadržaj u renu varira od 25-300 mg/100 g. Zanimljivo je da ren sadrži tri puta više vitamina C od citrusa (Rivelli et al., 2017). Među bioaktivnim molekulima, vitamin C je od posebnog interesa, jer ima važnu ulogu u ćelijskom rastu, štiteći biljke od oksidativnog stresa (Davey et al., 2000). Osim toga, veoma je poželjna komponenta u ljudskoj ishrani, jer deluje kao antioksidans, blokirajući neželjena dejstva slobodnih radikala. Slobodni radikali su veoma reaktivne intermedijarne čestice sa barem jednim nesporenim elektronom u svom omotaču, što ih čini jakim oksidansima, koji oštećuju ćelije lančanom reakcijom (Stojanović, 2014). Zanimljivo je da list rena, čija je upotreba u prehrambenoj industriji značajno manja u odnosu na koren, sadrži i do četiri puta više vitamina C. Koren rena sadrži najviše vitamina C kada potpuno sazri (do 100 mg/100 g), dok je visok sadržaj vitamina C pronađen u mladim listovima tokom punih razvojnih faza (do 350 mg/100 g) i u zreloj fazi ka starenju (do 280 mg/100 g) (Rivelli et al., 2017). Zbog toga što su veoma bogati ovim antioksidansom, koren i list rena se, od davnina pa sve do danas, efektivno primenjuju u lečenju

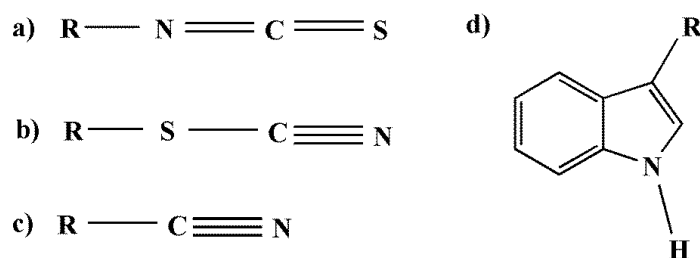
skorbuta (Wedelsbäck Bladh and Olsson, 2011). Pored vrste i genotipa, na sadržaj vitamina C mogu uticati i klima, kvalitet zemljišta i široki opseg ekoloških stresova i agronomskih praksi. Nakon žetve, mnogi drugi faktori mogu uticati na gubitak vitamina C, kao što su uslovi rukovanja, tehnike obrade i uslovi skladištenja (Davey et al., 2000; Lee and Kader, 2000; Galgano et al., 2002). Stoga su gubici vitamina C tokom prerade veoma obimni, pogotovo u slučaju povrća, gde mogu dostići vrednosti od preko 50% (Davey et al., 2000).

Oštar, ljut i prodoran miris i ukus rena potiču od izotiocijanata, jedinjenja koja se oslobađaju u procesu hidrolize glukozinolata, pod uticajem enzima mirozinaze (Agneta et al., 2013; Calabrone et al., 2015; Ciska et al., 2017). U sastavu rena sadržano je oko 20 različitih glukozinolata, među kojima su dominantni: sinigrin (83%), glukonastrutin (11%) i glukobrasicin (1%) (Agneta et al., 2014). Ren se smatra najbogatijim izvorom sinigrina u ljudskoj ishrani (Ciska et al., 2017). Značajne koncentracije glukozinolata zastupljene su i u korenu i u listu rena (2-296 i 34-201 $\mu\text{mol/g}$ suve materije (SM), respektivno). To su sekundarni biljni metaboliti koji se sastoje od: β -D-tioglukoznog dela, sulfatne grupe, koja je preko C=N veze vezana za ostatak molekula i bočnog lanca (R), po kojem se glukozinolati međusobno razlikuju (Zekić, 2013) (Slika 2.2).



Slika 2.2. Strukturna formula glukozinolata

Međutim, za biološki uticaj važniji su produkti hidrolize glukozinolata, nego oni sami. Glukozinolati se u biljci nalaze u proteinskim telima (vakuolama) i fizički su odvojeni od enzima mirozinaze, koji se nalazi u mirozinskim zrcima (Kopjar et al., 2012). Tek oštećenjem biljnog tkiva, prouzrokovanog dejstvom različitih štetočina, žetvom, industrijskom obradom hrane, seckanjem i žvakanjem, glukozinolati dolaze u kontakt s ovim endogenim enzimom, pri čemu dolazi do njihove hidrolize i nastajanja niza biološki aktivnih jedinjenja, kao što su izotiocijanati i tiocijanati (koji sadrže sumpor), kao i nitrili i indoli (koji ne sadrže sumpor) (Zekić, 2013) (Slika 2.3). Neki od nastalih razgradnih produkata mogu biti štetni, dok neki poseduju antioksidativna, antimikrobna, antifugalna, pa čak i antikancerogena svojstva.



Slika 2.3. Produkti razgradnje glukozinolata: a) izotiocijanat, b) tiocijanat, c) nitril i d) indol

Izotiocijanati su najpoznatija biološki aktivna jedinjenja od svih pomenutih jedinjenja koja nastaju enzimskom hidrolizom glukozinolata. Sastoje se od izotiocijanatne grupe ($-N=C=S$) i R-bočnog lanca, koji je identičan kao i kod odgovarajućeg glukozinolata i od kojeg potiče bioaktivnost izotiocijanata (Bertóti et al., 2019). Njihova biološka aktivnost ogleda se u izraženom antimikrobnom, insekticidnom, antikoagulativnom i gastro-zaštitnom delovanju. Oni predstavljaju dominantne komponente esencijalnog ulja rena i to: alil izotiocijanat (76-80%), 2-fenil-etil izotiocijanat (16-18%) i butil izotiocijanat (~1%), nastali od dominantnih glukozinolata: sinigrina, glukonastrutina i glukobrasicina, respektivno (Wright, 2011).

Pomenuta jedinjenja deluju kao indirektni antioksidansi, jer ne blokiraju slobodne radikale direktno, već se njihova antioksidativna aktivnost temelji na modifikovanju aktivnosti enzima faze I i II prisutnih u ljudskom organizmu (Kopjar et al., 2012; Dekić et al., 2017). Naime, enzimi faze I (enzimi citohrom P450) povećavaju reaktivnost jedinjenja rastvorljivih u mastima i kao posledica toga formiraju neke reaktivne molekule, koji mogu biti toksičniji od polaznih molekula. Enzimi faze II (glutation-S-transferaza, aldehyd reduktaze, S-metil-transferaze i N-acetil-transferaze) povećavaju rastvorljivost u vodi i izlučivanje tih štetnih molekula iz tela. Izotiocijanati iz rena smanjuju aktivnost enzima faze I, koji potpomažu nastajanje kancerogenih jedinjenja, dok pospešuju aktivnost enzima faze II, koji potpomažu izlučivanje pomenutih štetnih molekula iz tela. Zahvaljujući tome, izotiocijanati pokazuju i antikancerogeno delovanje (Kopjar et al., 2012; Zekić, 2013).

Iako je primena izotiocijanata ograničena zbog njihove visoke isparljivosti i slabe rastvorljivosti u vodi, oni pokazuju snažnu antimikrobnu aktivnost, sposobnu da inhibira rast i razvoj plesni i patogenih bakterija. Veruje se da je antimikrobna aktivnost izotiocijanata rezultat inaktivacije vanćelijskih enzima, cepanjem disulfidnih veza (Kim et al., 2015). Izotiocijanati iz korena rena pokazali su antibakterijsko delovanje protiv nekih sojeva patogenih bakterija otpornih na antibiotike, koje je čak bilo efektivnije od samih antibiotika (Kim et al., 2015). Alil izotiocijanat, koji dominira u esencijalnom ulju rena, inhibira aktivnost bakterije *Helicobacter pylori*, koja je glavni uzročnik gastritisa. S druge strane, 2-fenil-etil-izotiocijanat i drugi izotiocijanati prisutni u renu inhibiraju aktivnost enzima ureaza, koji je neophodan za preživljavanje ovih bakterija (Papp et al., 2018). U studiji autora Park et al. (2013) pokazano je da su izotiocijanati iz rena uspešni u borbi protiv oralnih patogenih mikroorganizama, delujući kao antimikrobna sredstva. Osim toga, zahvaljujući svom antimikrobnom delovanju, izotiocijanati se koriste kao sredstvo protiv kvarenja pekarskih proizvoda, različitih vrsta sira, voća i povrća, itd.

Osim toga, suzbijaju organizme koji se prenose iz zemlje, kao što su: bakterije, gljivice, virusi, nematode i korov (Tedeschi et al., 2011). Među testiranim esencijalnim uljima od 40 biljnih vrsta, esencijalno ulje rena pokazalo je najsnažniju insekticidnu aktivnost protiv larvi šampinjonske mušice (*Lycoriella ingenue*) (Agneta et al., 2013). Ekstrakti rena imali su dva puta jače insekticidno delovanje od ekstrakta belog luka prema larvama azijskog tigrastog komarca (*Aedes albopictus*) (Tedeschi et al., 2011). Zbog izraženog insekticidnog i fungistatičnog delovanja, ove biološki aktivne komponente rena su sa ekološkog i zdravstvenog aspekta dobra potencijalna zamena za sintetičke pesticide i fungicide.

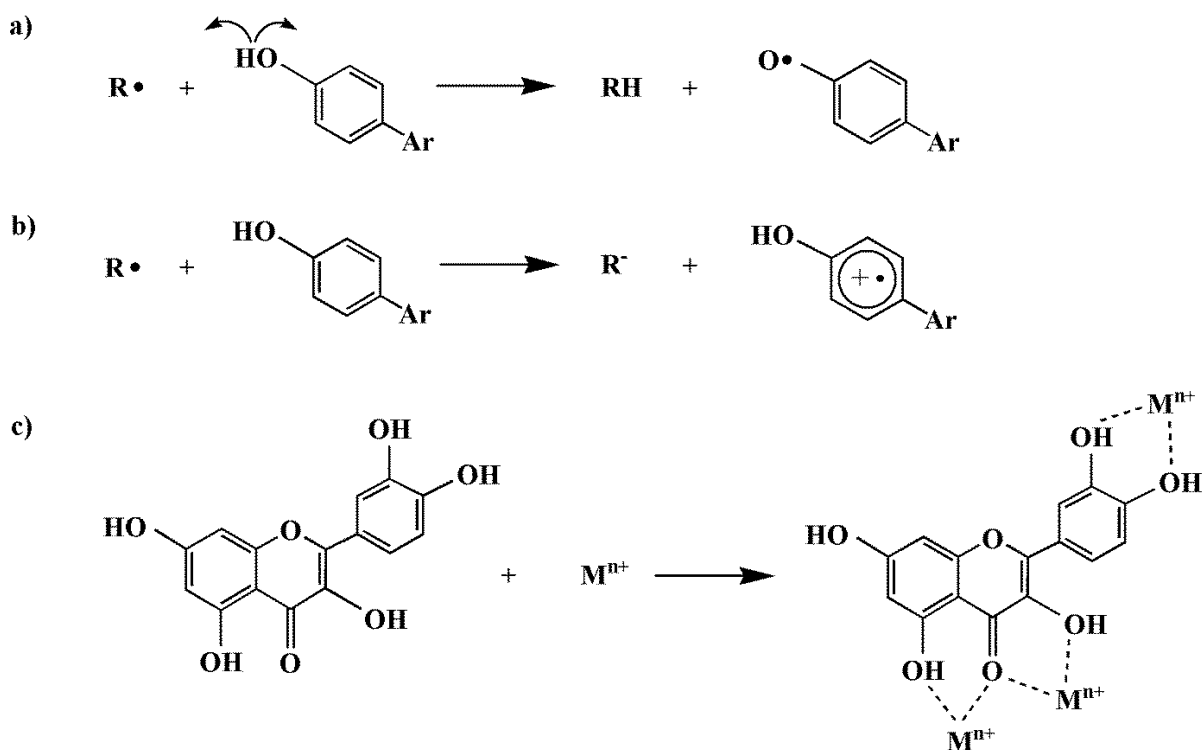
Ipak, važno je naglasiti da izotiocijanati i tiocijanati mogu ispoljavati i antinutritivna svojstva. Ova jedinjenja se smatraju goitrogenima, jer mogu uzrokovati antitireoidne efekte (Marcinkowska and Jeleń, 2020). Naime, izotiocijanati ometaju sintezu tireoidnih hormona, a tiocijanati se "takmiče" sa jodom i inhibiraju njegov unos, što negativno utiče na rad štitne žlezde. Iz tog razloga, hrana bogata ovim jedinjenjima ne preporučuje se osobama koje pate od hipotireoidizma (Verkerk et al., 2009).

Antinutritivni učinak razgradnih produkata glukozinolata primećen je u slučaju hranjenja stoke uljanom repicom, pri čemu je došlo do usporenog rasta životinja i toksičnog uticaja na jetru i štitnu žlezdu. Dakle, osim štitne žlezde, glavni ciljni organi su jetra, bubrezi i pankreas, gde dovode do promene težine i neželjenih dejstava, što je potvrđeno u studijama na glodarima (Kosson and Horbowitz, 2009). Međutim, prema Sones et al. (1984) potrebne su veoma visoke koncentracije tiocijanatnog jona (>200 mg) da bi došlo do pojave goitrogenih simptoma kod čoveka. Koncentracija izotiocijanata u ishrani je za nekoliko redova veličine niža u poređenju sa dozama korišćenim u studijama genotoksičnosti na životinjama (Okulicz, 2010). Ipak, treba voditi računa prilikom korišćenja suplemenata, kako ne bi došlo do uzimanja doza koje imaju negativan uticaj na ljudsko zdravlje (Verkerk et al., 2009).

Osim vitamina C i izotiocijanata, u renu su sadržane značajne količine fenolnih jedinjenja. To su najvažniji dijetetski antioksidansi, sa antioksidativnim potencijalom višim čak od vitamina C i E (Ćujić-Nikolić et al., 2019). Do danas je identifikovano oko 8000 fenolnih jedinjenja. Predstavljaju sekundarne metabolite, koji se svrstavaju među najzastupljenije fitohemikalije prisutne u biljkama (Sultanbawa, 2011). Ubrajaju se u prirodne, neenzimske antioksidanse, koji imaju veoma važnu ulogu protiv štetnih aktivnosti slobodnih radikala i drugih visoko reaktivnih vrsta kiseonika (Stratil et al., 2006). Svoje antioksidativno delovanje mogu ispoljiti direktno, uklanjanjem slobodnih radikala ili indirektno, regulacijom aktivnosti endogenih antioksidativnih enzima (Ćujić-Nikolić et al., 2019).

Postoje tri mehanizma antioksidativnog delovanja fenolnih jedinjenja (Slika 2.4):

- 1) Prenos vodonikovog atoma - cepanjem $-OH$ grupe vodonikov atom reaguje sa slobodnim radikalom i nastaje stabilan molekul RH i fenol-radikal ArO^{\bullet} , koji je manje reaktivan, zbog sposobnosti da stabilizuje i delokalizuje nespareni elektron;
- 2) Prenos elektrona - nastaju stabilan anjon R^{-} i katjonski radikal $ArOH^{+}$, koji je takođe stabilizovan zbog sposobnosti delokalizacije elektrona;
- 3) Helatizacija metala - fenoli vezuju metale formirajući stabilne komplekse, što sprečava učešće metala u reakcijama u kojima se proizvode slobodni radikali (Stojanović, 2014).



Slika 2.4. Mehanizmi antioksidativnog delovanja fenolnih jedinjenja:

a) prenos vodonikovog atoma, b) prenos elektrona i c) helatizacija metala

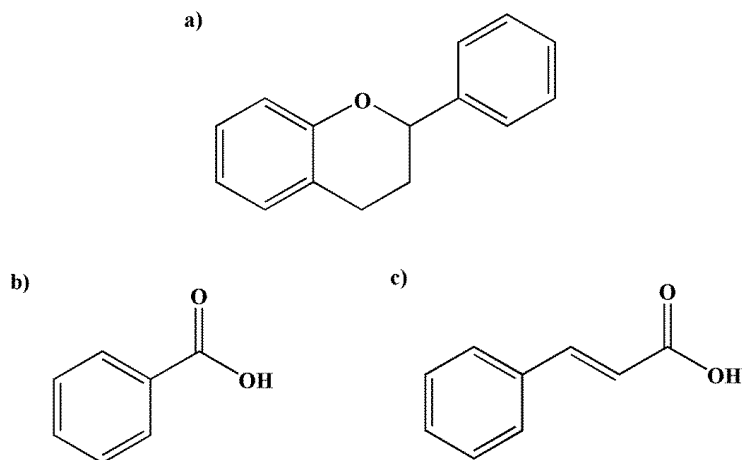
Uklanjanjem slobodnih radikala, koji dovode do starosnog oštećenja ćelija i tkiva, fenolna jedinjenja stimulišu zdravo starenje. Osim antioksidativnog delovanja, ona mogu imati brojne druge biološke aktivnosti, kao što su blagotvorni efekti na različite hronične bolesti (kardiovaskularna oboljenja, proliferacija ćelija karcinoma i stanja uzrokovana virusima i bakterijama). Pored toga, mogu uticati na poboljšanje varenja i neurološkog zdravlja. Pozitivno utiču na pamćenje i učenje, kao i na smanjenje anksioznosti i depresije. Takođe, smanjuju učestalost infekcija i upotrebu antibiotika (Ćujić-Nikolić et al., 2019).

Aktivne komponente u strukturi fenolnih jedinjenja su:

- flavonoidi: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, izoflavoni, flavononi, flavan-3-oli, antocijanidini, halkoni;
- fenolne kiseline:
 - hidroksibenzojeve (derivati benzojeve kiseline) - galna, vanilinska, elaginska, protokatehinska, siringinska, gentizinska kiselina;
 - hidroksicimetne (derivati cimetne kiseline) - *p*-kumarna, kafe, ruzmarinska, ferulna, sinapinska, hlorogena kiselina.

Flavonoidi se smatraju najkorisnijim fitohemikalijama identifikovanim u hrani (Harborne and Williams, 2000). Ugljenikov skelet flavonoida (C₆-C₃-C₆) sadrži 2 benzenova prstena (A i B), međusobno povezana tročlanim ugljeničnim nizom, koji sa atomom kiseonika formira heterociklični prsten C (Slika 2.5a). U prirodi se nalaze u obliku glikozida, povezani sa molekulima šećera (Stojanović, 2014). Fenolne kiseline dele se na derivate benzojeve kiseline (Slika 2.5b) i derivate

cimetne kiseline (Slika 2.5c). Derivati cimetnih kiselina su zastupljeniji u prirodi. Fenolne kiseline stupaju u kovalentnu vezu sa policikličnim aromatičnim ugljovodnicima i time potiskuju njihovo antikancerogeno delovanje. U ogledima na životinjama, fenolne kiseline blokiraju hemijski indukovani nastanak raka jednjaka, želuca, kože i pluća (Stojanović, 2014).



Slika 2.5. Strukturna formula a) flavonoida; i fenolnih kiselina: b) beznoeva i c) cimetna

Prema Tomsone et al. (2020), sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u listu rena varira od 711 do 5406 mg GAE/100 g SM, dok je u korenu rena sadržaj ovih jedinjenja 7-10 puta niži. Druge studije pokazale su manju razliku u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja između korena i lista rena: 174-289 mg GAE/100 g SM i 256-385 mg GAE/100 g SM, respektivno (Calabrone, 2015). Kao i u slučaju ukupnih fenolnih jedinjenja, sadržaj ukupnih flavonoida i fenolnih kiselina značajno je viši u listu nego u korenu rena, što su prijavile brojne studije (Calabrone et al., 2015; Tomsone et al., 2020b; Tomsone et al., 2020c). Dakle, fenolna jedinjenja nisu ravnomerno raspoređena u svim delovima biljke rena. Osim toga, flavonoidi su snažni UV apsorberi, koji se uglavnom akumuliraju u ćelijama epidermisa, zbog čega je i njihov sadržaj značajno viši u nadzemnim delovima biljke, tj. listu rena (Tomsone et al., 2020a). Takođe, treba uzeti u obzir da sadržaj ovih bioaktivnih komponenata zavisi od vremena berbe, uslova uzgoja i faze razvoja, što je potvrđeno u studiji autora Björkman et al. (2011) o biljnim vrstama iz porodice Brassicaceae. Bilo kako bilo, ren predstavlja veoma bogat izvor fenolnih jedinjenja sa izraženom biološkom aktivnošću.

2.1.5. Upotreba u prehrambenoj industriji i medicini

Od drevnih vremena pa sve do danas, ren je veoma popularan u Evropi i Severnoj Americi kao začim, koji se služi uz veliki broj toplih i hladnih jela od ribe, piletine i drugih vrsta mesa, kao i u salatama i supama. Ren se pojavljuje kao sastojak mnogih proizvoda u supermarketima. Pored najpopularnijeg lagano obrađenog, tj. svežeg, usitnjenog rena, postoji i niz drugih proizvoda od rena, kao što su: namazi i sosevi sa renom, senf sa renom, cvekla sa renom, itd (Filipović et al., 2015). Može se proizvoditi i kao dehidrisani ren, u obliku granula, pahuljica ili praha, i koristiti kao začim u umacima i prelivima (Filipović et al., 2015). Jedna od primena rena jeste kao zamena za vasabi, osnovni začim u japanskoj kuhinji, koji se koristi za aromatizovanje sušija i sašimija, tj. sirove morske hrane. Naime, koren vasabija je skuplji i teže ga je proizvoditi, zbog čega se zamenjuje pastom ili prahom od korena rena u koji je dodata zelena prehrambena boja (Wedelsbäck Bladh and Olsson, 2011). Iako koren rena ima veću kulinarsku vrednost, list rena može se takođe koristiti u ishrani: kao salata, u kombinaciji sa drugim povrćem; kuvan, poput spanaća; ili kao list za sarmu, kojoj daje karakterističan pikantan ukus

(Agneta et al., 2013; Ciska et al., 2017; Rivelli et al., 2017). Osim toga, list rena se može staviti ispod hleba prilikom pečenja u pećnici, kako bi doprineo ukusu i sprečio lepljenje hleba (Ciska et al., 2017). U poslednje vreme, upotreba listova rena u ljudskoj ishrani postaje sve značajnija, jer doprinosi povećanom unosu vitamina, minerala i vlakana (Ciska et al., 2017). Prahovi korena i lista rena pozitivno su uticali na bioaktivni potencijal pekarskih proizvoda kojima su dodavani, zahvaljujući antioksidansima prisutnim u renu (Tomsone et al., 2020c). Veoma je značajna upotreba rena kao konzervansa. Osim što pruža pikantan ukus, on štiti hranu od kvarenja i produžava rok trajanja mesnih i pekarskih proizvoda ili fermentisanih proizvoda, kao što su kupus i kiseli krastavci (Petrović, 2017; Papp et al., 2018).

Osim svoje kulinarske vrednosti, ren se smatra i lekovitom biljkom, jer sadrži značajne količine bioaktivnih sastojaka (Papp et al., 2018). Koristi se u medicinske svrhe za lečenje brojnih oboljenja, pogotovo u lečenju skorbuta (Wedelsbäck Bladh and Olsson, 2011; Rivelli et al., 2017). S obzirom na to da ima izraženo antimikrobno, antioksidativno i insekticidno delovanje (Filipović et al., 2015; Petrović et al., 2017), koristi se za proizvodnju različitih preparata. Pomešan sa vinom ili medom u toploj vodi pomaže u lečenju plućnih i srčanih bolesti (Papp et al., 2018). Preparati od korena i lista rena pospešuju kontraktilnost gastrointestinalnog trakta, rešavaju probleme nadimanja, konstipacije, kolitisa i dijareje (Dekić et al., 2017). Oni smanjuju bol uzrokovan reumom, jer stimulišu protok krvi u upalnim zglobovima (Agneta et al., 2013). Razređeni sok rena koristi se za lečenje zubobolje, zubnog karijesa i parodontalnih bolesti (Filipović et al., 2015; Papp et al., 2018). Preparati sa reno koriste se kao nazalni sprej za lečenje disfunkcije nosa i sinusa (Petrović et al., 2017). Osim toga, ren se koristi kao respiratorno sredstvo za lečenje problema sa kašljem, astmom i bronhitisom (Agneta et al., 2013). Iz korena rena može se ekstrahovati enzim peroksidaza, koji ima značajnu primenu u medicini. Naime, koristi se kao enzimska oznaka za detekciju proteina i nukleinskih kiselina u analitičkim tehnikama. Enzim se može koristiti u terapiji kancera, a primenu je pronašao u tzv. glukoznim štapićima, koje dijabetičari koriste za procenu šećera u urinu (Wedelsbäck Bladh and Olsson, 2011). Druge primene ovog enzima u medicini su: za određivanje glukoze i nivoa holesterola u krvi, za procenu sadržaja drugih enzima, za izvođenje imunoanaliza (ELISA test) ili za prečišćavanje DNK sonde (Bertóti et al., 2019). Osim u medicinske svrhe, peroksidaza rena koristi se za detoksikaciju zagađenih otpadnih voda iz industrije oksidacijom fenola u fenoksi radikale, koji se potom polimerizuju u manje toksična jedinjenja koja se mogu ukloniti. Dodatno, tretiranjem svinjskog stajnjaka ovim enzimom umanjen je njegov neprijatan miris za 84% (Wedelsbäck Bladh and Olsson, 2011).

Usled prisustva brojnih biološki aktivnih jedinjenja u renu, pogodno ga je dodavati u gotove prehrambene proizvode, zbog potencijalnog povećanja njihovog bioaktivnog kapaciteta, kao i zbog uticaja na kvalitet i senzorni profil obogaćenih proizvoda. Danas je dobro poznato da lekovito bilje ima izuzetan terapijski efekat zahvaljujući sinergijskom delovanju različitih bioaktivnih jedinjenja sadržanih u njegovom sastavu. Stoga postoji sve veće interesovanje za upotrebom biljnih ekstrakata umesto izolovanih jedinjenja. Sledeći koncept „zelene hemije“, najbolji metod ekstrakcije jedinjenja podrazumeva dobijanje sokova bez ikakvih rastvarača (Tomsone et al., 2020a). To se može postići hladnim presovanjem, metodom pogodnom za očuvanje biološkog potencijala biljnog materijala. Kao nusproizvodi hladnog presovanja korena i lista rena zaostaju tropovi korena i lista rena, koji takođe predstavljaju bogat izvor bioaktivnih jedinjenja i mogu se dodavati u prehrambene proizvode, čime bi se mogla postići potpuna iskoristivost biljnog materijala. Međutim, zbog očuvanja bioaktivnih jedinjenja, koja imaju tendenciju da budu visoko reaktivna i nestabilna, usled čega može doći do odvijanja nepoželjnih biohemijskih reakcija u svežim sokovima i tropovima korena i lista rena, kao i

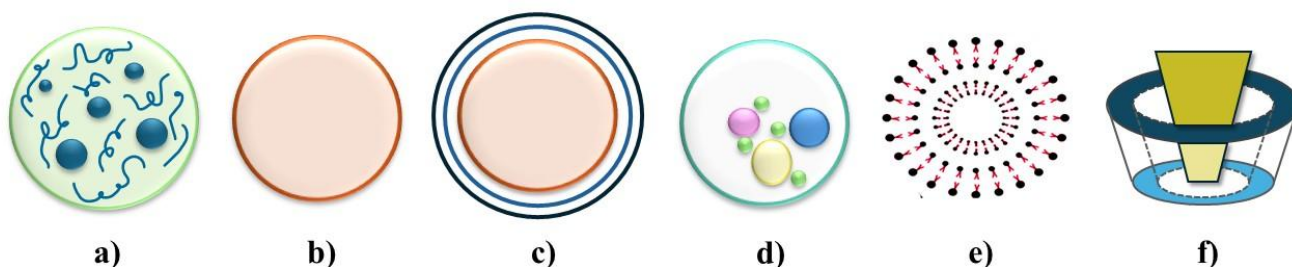
zbog pogodnije forme za dodavanje u gotov prehrambeni proizvod, sokove je pogodno podvrgnuti postupku inkapsulacije sprej sušenjem, a tropove postupku liofilizacije.

2.2. INKAPSULACIJA

2.2.1. Pojam, značaj i primena

Već duže vreme postoji trend ka zdravijem načinu života, što uključuje rastuću svest potrošača o tome koje proizvode konzumiraju i koje koristi pojedini sastojci imaju u održavanju njihovog zdravog života. Odloženo oslobađanje, termička zaštita, stabilnost, ciljana dostava bioaktivnih komponenata, kao i odgovarajući senzorni profil, odlike su prehrambenih proizvoda za kojima postoji sve veća potražnja u prehrambenoj industriji savremenog doba. Potrošački trendovi dovode do porasta potražnje za funkcionalnom hranom, ali dodavanje bioaktivnih jedinjenja u matricu hrane suočava se sa nizom izazova, kao što su nedostatak stabilnosti ili nepoželjne senzorne karakteristike. Brojni nepovoljni uslovi sredine, kao što su visoka temperatura, svetlost, vlaga, kiseonik, pritisak, toplota i pH vrednost sredine, mogu dovesti do gubitka biološke aktivnosti određenih komponenata (Fang and Bhandari, 2010; Arenas-Jal et al., 2020). Osim toga, nepovoljni uslovi gastrointestinalnog trakta takođe mogu otežati apsorpciju biološki aktivnih jedinjenja i njihovu isporuku do ciljanog mesta u organizmu (Đorđević et al., 2015). Stoga se za olakšano rukovanje aktivnom komponentom, njeno kontrolisano otpuštanje i bolju bezbednost, predlaže tehnika inkapsulacije, koja ispunjava navedene zahteve.

Inkapsulacija se može definisati kao postupak zarobljavanja ili smeštanja aktivne komponente (inkapsuliranog materijala ili jezgra) unutar strukture određenog nosača (zida, školjke, matrice, omotača ili premaza), u cilju zaštite inkapsuliranog materijala od brojnih nepoželjnih spoljašnjih faktora, čime se doprinosi produženju roka trajanja i kontrolisanom otpuštanju aktivne komponente (Nedović et al., 2011; Nedović et al., 2013). Kao rezultat inkapsulacije nastaje „inkapsulat“, tj. aktivna komponenta obložena sa jednim ili više slojeva materijala nosača. Inkapsulirani se mogu tečne, čvrste ili čak gasovite supstance (Arenas-Jal et al., 2020). Na Slici 2.6 prikazani su različiti tipovi inkapsulata koji mogu nastati različitim tehnikama inkapsulacije: a) tip matrice („matriks“ tip); b) tip jezgro/omotač („rezervoar“ tip); c) višeslojni tip; d) višejezgarni tip; e) fosfolipidni dvosloj; f) molekularna inkluzija (Đorđević et al., 2015).



Slika 2.6. Šematski prikaz različitih tipova inkapsulata: a) tip matrice; b) tip jezgro/omotač (rezervoar tip); c) višeslojni tip; d) višejezgarni tip; e) fosfolipidni dvosloj; f) molekularna inkluzija

Uspeh efikasnog procesa inkapsulacije zavisi od izbora tri faktora: ciljnih bioaktivnih molekula, materijala nosača i odgovarajuće metode inkapsulacije. Bioaktivna jedinjenja koja ispoljavaju antioksidativna i antimikrobna svojstva čine glavnu kategoriju materijala koji se podvrgavaju postupku inkapsulacije. Polifenoli (kao što su tanini, antocijanini, flavonoidi i fenolne kiseline), isparljive komponente u esencijalnim uljima, prirodni pigmenti, vitamini, polipeptidi i nutraceutici su uobičajene

supstance koje čine jezgro inkapsulata (Chaudhary et al., 2021). U zavisnosti od primenjene tehnike inkapsulacije i odabranog nosača mogu nastati inkapsulati različitog oblika i prečnika, koji može varirati u opsegu od nekoliko nanometara do nekoliko milimetara. Stoga, razlikuju se nano skala i mikro skala dobijenih inkapsulata, koje obuhvataju čestice opsega veličina od 1-1000 nm i od 1-1000 μm , respektivno. Međutim, najčešće se nanoinkapsulacijom dobijaju kapsule prečnika u opsegu od 1 nm do nekoliko stotina nanometara, a mikrokapsulacijom od 1 μm do nekoliko stotina mikrometara u prečniku. Štaviše, čestice veličina između opsega nano- i mikroinkapsulacije nazivaju se submikronskim česticama, dok se čestice veličina iznad opsega mikroinkapsulacije nazivaju makročesticama (Saifullah et al., 2019). Poslednjih decenija postoji trend rasta interesovanja za nanoinkapsulacijom, budući da može da ponudi određene prednosti u poređenju sa mikroinkapsulacijom. Uprkos tome, mikroinkapsulacija je još uvek rasprostranjenija metoda inkapsulacije u prehrambenoj industriji (Arenas-Jal et al., 2020). Oblik inkapsuliranih čestica najčešće je sferan, ali može biti i drugih oblika ili čak nepravilnog oblika (Zuidam and Shimoni, 2010). Osim čestica različitih oblika i dimenzija, koje se mogu inkorporirati u prehrambene proizvode, inkapsulacija postaje sve popularnija za upotrebu u jestivim filmovima i premazima, koji su održiva alternativa konvencionalnim sistemima za pakovanje hrane. Dodavanjem bioaktivnih jedinjenja u održive sisteme pakovanja hrane povećava se hranljiva vrednost, funkcionalnost i ukupne performanse jestivih filmova. Osim što poboljšavaju kvalitet samog filma, bioaktivne supstance utiču i na parametre kvaliteta prehrambenih proizvoda, kao što su rok trajanja, brzina peroksidacije lipida, indeks potamnjivanja, antimikrobni efekat i senzorni profil (Chaudhary et al., 2021).

Uloga inkapsulacije bioaktivnih jedinjenja može biti dvojaka. Naime, u nekim slučajevima, cilj je da osetljivi inkorporirani materijal bude u što većoj meri izolovan od spoljašnje sredine, kako bi se sprečio kontakt sa nepovoljnim faktorima okoline, olakšalo rukovanje lepljivom ili isparljivom komponentom i omogućila bolja bezbednost. S druge strane, u nekim slučajevima je cilj da se inkorporirani materijal ne izoluje u potpunosti, već da se postepeno otpušta u spoljašnju sredinu i time kontrolisano oslobađa i ispoljava svoju bioaktivnost. Generalno, inkapsulacija se u prehrambenoj industriji primenjuje iz više razloga, kao što su:

- imobilizacija aktivnih komponenata u prehrambenim sistemima;
- zaštita inkapsuliranog materijala od degradacije uzrokovane delovanjem spoljašnjih faktora (kiseonik, vlaga, svetlost, pH vrednost i toplota), čime se postiže njegoja povećana stabilnost u finalnom proizvodu;
- modifikacija fizičkih karakteristika inkorporiranog materijala u cilju olakšane manipulacije: inkapsulacijom se može smanjiti lepljivost i higroskopnost, kao i izvršiti modifikacija tačke topljenja aktivne komponente. Osim toga, može se postići transformacija tečnih komponenata u suve prahove, kojima je lakše rukovati;
- kontrolisano otpuštanje inkorporiranog materijala tokom vremena: mehanizam oslobađanja inkapsulirane aktivne komponente može biti pokrenut različitim faktorima, kao što su: rastvaranje, temperatura, pritisak, pH vrednost i enzimi. U zavisnosti od dizajna sistema, inkapsulat može oslobađati aktivnu komponentu trenutno, odloženo ili produženo tokom vremena. Pored toga, oslobađanje se može modulirati tako da se desi u određenoj fazi obrade, skladištenja ili potrošnje, ili čak na specifičnoj lokaciji u organizmu, gde će ispoljiti svoje blagotvorno delovanje;
- maskiranje neželjenih senzornih karakteristika (ukusa, mirisa i boje) inkapsuliranog materijala;

- mogućnost podešavanja svojstava aktivnih komponenata (veličina čestica, struktura, rastvorljivost u ulju ili vodi, boja, itd);
- razdvajanje komponenata unutar smeše koje bi u suprotnom međusobno reagovale (Desai and Jin Park, 2005; Zuidam and Shimoni, 2010; Lević, 2014; Arenas-Jal et al., 2020).

Inkapsulacija aktivnih materijala našla je primenu u različitim privrednim granama, kao što su: farmacija, medicina, hemijska industrija, tekstilna industrija, kozmetička industrija, metalurška industrija, biotehnologija, poljoprivreda, itd. Osim izolacije i zaštite komponenata od spoljašnjih faktora, jedan od najpopularnijih razloga za njihovo inkapsuliranje u svim industrijama je kontrolisano oslobađanje, koje se sve više koristi u lekovima, pesticidima, kozmetici, kancelarijskom materijalu, ambalaži, pa čak i tekstilu. Povrh toga, posebno je značajna primena ovog postupka u prehrambenoj industriji za inkapsulaciju pigmenta, aroma, antioksidanasa, konzervanasa, probiotika, enzima, lipida, mikroorganizama, vitamina, minerala, itd. Osim toga, inkapsulacija bi takođe mogla biti korisna u oblastima prehrambene industrije koje ne podrazumevaju preradu hrane, kao što je razvoj aktivnih pakovanja i sistema za kontrolisano oslobađanje.

Jedan od glavnih ciljeva prehrambene industrije je obogaćivanje prehrambenih proizvoda bioaktivnim komponentama, uz istovremeno minimalan uticaj na senzorna svojstva proizvoda kojima se dodaju. Da bi sistem za inkapsulaciju bio pogodan za ugradnju u prehrambeni proizvod sa tehnološke tačke gledišta, on mora biti u skladu sa sledećim karakteristikama:

- mora biti formulisan od prirodnih sastojaka prehrambenog kvaliteta, dobijenih blagim metodama ekstrakcije, koje isključuju upotrebu štetnih organskih rastvarača;
- trebalo bi da se ugradnjom ovakvog sistema u prehrambeni proizvod obezbedi visoka fizičko-hemijska stabilnost i minimalni uticaj na senzorna svojstva proizvoda;
- primenjeni nosač bi trebalo da zaštiti inkapsulirana jedinjenja od interakcije sa drugim sastojcima hrane, kao i da spreči njihovu degradaciju usled nepoželjnog uticaja temperature, svetlosti ili pH vrednosti sredine;
- poželjno je da se nakon konzumiranja obezbedi maksimalan unos inkapsuliranih jedinjenja, kao i njihovo kontrolisano oslobađanje;
- trebalo bi da ovakav sistem bude lako primenljiv za industrijsku proizvodnju (Đorđević et al., 2015).

Ovako širok spektar zahteva koje treba postići inkapsulacionim matricama kao sistemima isporuke bioaktivnih komponenata pokrenuo je razvoj različitih tehnika inkapsulacije, koje su detaljno opisane u sledećem potpoglavlju.

2.2.2. Tehnike inkapsulacije

Tehnike inkapsulacije mogu se svrstati u tri grupe: fizičke, hemijske i fizičko-hemijske tehnike (Jyothi et al., 2010). Fizički ili mehanički procesi su oni koji se oslanjaju na fizičke promene, kao što su: sušenje, geliranje ili zamrzavanje nosača, kako bi se formirale čestice. U fizičke tehnike inkapsulacije ubrajaju se: sprej sušenje, liofilizacija, oblaganje aktivne komponente zaštitnim slojem, procesi zasnovani na ekstruziji i korišćenju superkritičnih fluida. U hemijske tehnike inkapsulacije ubrajaju se: međufazna i *in situ* polimerizacija i molekulska inkluzija. Kod većine fizičkih tehnika gas se koristi kao suspendujući medijum u kome se raspršuje tečna faza, dok se kod hemijskih tehnika tečnost koristi kao medijum u kojem se formira zaštitni sloj omotača oko aktivne komponente. Neke tehnike podrazumevaju formiranje čestica uz primenu kako fizičkih, tako i hemijskih postupaka. U njih

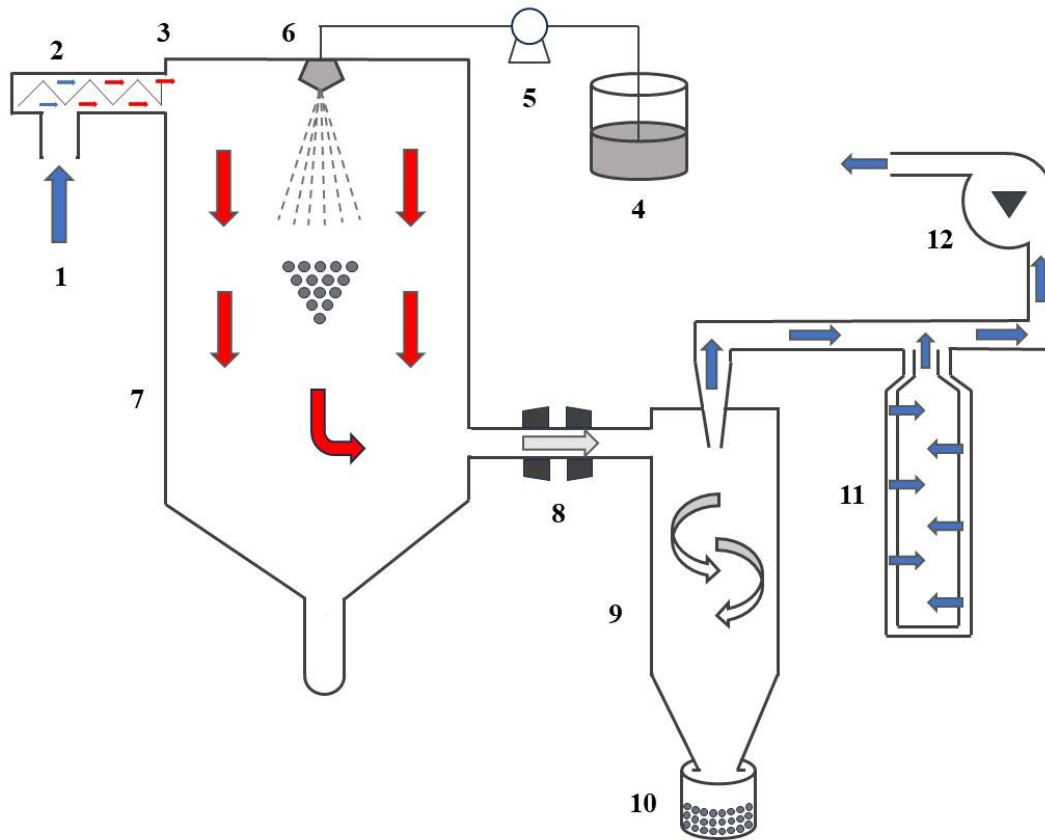
se ubajaju sledeće fizičko-hemijske tehnike inkapsulacije: sprej rashlađivanje/hlađenje, koacervacija, formiranje čestica otparavanjem rastvarača, jonsko geliranje i inkapsulacija u lipozomima (Marcillo-Parra et al., 2021).

Najvažnije inkapsulacione tehnike koje se koriste u prehrambenoj industriji biće prikazane u nastavku, sa posebnim akcentom na sprej sušenju, kao tehnici koja je najčešće korišćena u prehrambenoj industriji i koja je primenjena u eksperimentalnom delu ove disertacije.

Sprej sušenje

Inkapsulacija sprej sušenjem ili sušenjem raspršivanjem (engl. *spray drying*) je tehnika prevođenja tečnosti u stabilne i lako primenljive prahove, koja se u industriji koristi još od polovine 20. veka (Desai and Jin Park, 2005; Đorđević et al., 2015). Sprej sušenje ima široku primenu u različitim industrijskim granama, ali je posebno značajna primena ove tehnike u prehrambenoj industriji. To je najstarija i najrasprostranjenija tehnika mikroinkapsuliranja u prehrambenoj tehnologiji (Arenas-Jal et al., 2020). Prvobitno se koristila za pripremu suvih, stabilnih aditiva i aroma za hranu, dok se danas primenjuje i za inkapsulaciju biljnih ekstrakata, enzima, vitamina, minerala, probiotika, boja i etarskih ulja (Kaderides et al., 2015). Približno 90% mikroinkapsulata u prehrambenoj industriji proizvedeno je ovom metodom. Karakteristike sprej sušenja zaslužne za tako široku primenu ove inkapsulacione tehnike u prehrambenoj industriji su lako rukovanje, niski operativni troškovi i visoke stope proizvodnje (Haque et al., 2015). Proizvodni troškovi sušenja raspršivanjem niži su od troškova povezanih sa većinom drugih metoda inkapsulacije. Osim toga, postupak je kontinuiran u radu, fleksibilan u tome što nudi značajne varijacije u matrici mikroinkapsuliranja, prilagodljiv na uobičajenu opremu za obradu i industrijski je skalabilan (Desai and Jin Park, 2015). Kao rezultat, dobijaju se čestice dobrog kvaliteta i visoke mikrobiološke stabilnosti, usled niske aktivnosti vode prahova. Proizvedene čestice su malih dimenzija, što je od velikog značaja kada su u pitanju senzorne karakteristike prehrambenih proizvoda, pogotovo tekstura (Fang and Bhandari, 2010). Dodatno, ovakvim proizvodom u prahu značajno je jednostavnije manipulirati, tj. obezbediti njegovu distribuciju, pakovanje i skladištenje (Thakur et al., 2024). Prednost ove tehnike je u tome što obezbeđuje mogućnost manipulacije postupkom pripreme u cilju poboljšanja kvaliteta finalnog proizvoda.

Postupak sprej sušenja podrazumeva rastvaranje, emulgovanje ili dispergovanje aktivne komponente u rastvoru materijala nosača, a dobijena smeša se potom raspršuje u struji toplog vazduha zagrejane komore sprej sušača, pri čemu dolazi do formiranja čvrstih čestica usled otparavanja rastvarača (Slika 2.7).



Slika 2.7. Šematski prikaz sistema za sprej sušenje: 1) ulaz vazduha, 2) grejač, 3) temperaturni senzor na ulazu vazduha, 4) napojna smeša, 5) peristaltička pumpa, 6) dizna, 7) komora za sušenje, 8) temperaturni senzor na izlazu vazduha, 9) ciklon, 10) posuda za sakupljanje proizvoda, 11) filter izlaznog vazduha i 12) aspirator

Kao rastvarač za pripremu materijala nosača u postupku sprej sušenja se u najvećem broju slučajeva koristi voda, mada se mogu koristiti i organski rastvarači, kao što su etanol i aceton. Ipak, oni se značajno manje koriste zbog ekoloških, bezbednosnih i ekonomskih razloga (Zuidam and Shimoni, 2010). Osim toga, vodu je značajno poželjnije koristiti za proizvodnju sprej sušenih inkapsulata, koji će se koristiti u prehrambene svrhe (Oxley et al., 2014).

Formirana napojna smeša aktivne supstance i materijala nosača raspršuje se (atomizuje) pomoću specijalne dizne u struji toplog vazduha u zagrejanom komori za sušenje. Sušači za raspršivanje u prehrambenoj industriji obično raspršuju napojnu smešu pod pritiskom vazduha ili pomoću cetrifugalnog točka, koji se naziva još i rotirajući atomizer. Osim toga, rade sa istovremenim protokom vazduha i napojne smeše, kako bi se obezbedilo minimalno pregrevanje čestica (Zuidam and Shimoni, 2010).

Tokom procesa raspršivanja napojne smeše dolazi do formiranja čvrstih čestica usled otparavanja rastvarača. Primenjene temperature vazduha u komori sprej sušača (ulazne temperature) mogu varirati najčešće u opsegu od 150-220 °C, a sam proces traje od nekoliko milisekundi do nekoliko sekundi, što zavisi od veličine samog sušača (Zuidam and Shimoni, 2010). To obezbeđuje da se i termolabilna jedinjenja mogu sušiti ovom metodom, uz smanjenu mogućnost gubitka njihovih bioaktivnih svojstava. S obzirom na to da se aktivne komponente podvrgavaju temperaturi ulaznog vazduha samo nekoliko sekundi, izlazna temperatura vazduha i ukupno vreme sušenja mogu se smatrati

važnijim parametrom, jer se inkapsulirani prahovi duže drže u boci za prikupljanje proizvoda (kolektoru) (Đorđević et al., 2015). Kontrolisanjem procesnih parametara treba obezbediti da temperatura kapljica nikada ne pređe 100 °C (Zuidam and Shimoni, 2010). Zato se temperatura izlaznog vazduha najčešće kreće u opsegu od 50-80 °C. Temperature ulaznog i izlaznog vazduha su međusobno povezane i proporcionalne (Đorđević et al., 2015). Sa povećanjem temperature ulaznog vazduha, postiže se bolja efikasnost prenosa toplote i mase. To dovodi do bržeg uklanjanja vode, tj. korišćeni rastvarač efikasnije isparava i smanjuje se njegov sadržaj u proizvedenim česticama. To može pozitivno uticati na stabilnost čestica, usled smanjenog sadržaja vlage. Osim toga, dolazi do koncentrisanja čvrste materije (aktivna komponenta i nosač) u česticama, što rezultuje povišenim prinosom proizvoda. Ipak, previsoke temperature tokom sušenja raspršivanjem mogu izazvati transformaciju ili čak gubitak aktivnih jedinjenja. Osim toga, dovode do neuravnoteženosti između brzine isparavanja i brzine formiranja čestica. Navedeni izazovi mogli bi rezultovati smanjenom efikasnošću inkapsulacije (Đorđević et al., 2015). Stoga je neophodno postići optimalne kompromisne uslove prilikom optimizacije postupka sušenja raspršivanjem kako bi se postigla željena fizičko-hemijska svojstva i sačuvala bioaktivna jedinjenja.

Nakon otparavanja rastvarača usled visoke temperature u komori sprej sušača dolazi do formiranja malih učvršćenih kapljica, u kojima su zarobljena jedinjenja od interesa (Arenas-Jal et al., 2020). Na površini kapljice se formira film i koncentracija sastojaka u kapljici za sušenje se povećava, a kao rezultat formira se porozna, suva čestica (inkapsulat). Nastale čestice najčešće su sfernog oblika i prečnika koji varira u opsegu od nekoliko μm do 150 μm , ali najčešće manje od 40 μm (Zuidam and Shimoni, 2010; Nedović et al., 2011). Ipak, glavni nedostatak sušenja raspršivanjem je neujednačena veličina i oblik dobijenih čestica, kao i sklonost čestica ka agregaciji. Veličina sprej sušenih čestica zavisi od veličine kapljica koje se raspršuju, a na koje mogu uticati površinski napon i viskozitet tečnosti, pad pritiska na dizni za raspršivanje, brzina raspršivanja, kao i vreme sušenja (Zuidam and Shimoni, 2010). Na površini dobijenih čestica mogu se javiti neravnine, koje nastaju kao posledica brzog otparavanja tečnosti tokom postupka sprej sušenja. Osim toga, na površini se mogu javiti i pore, nastale usled pritiska unutar kapsula. Poželjno je da spoljna površina čestica bude kompaktna i bez pukotina, kako bi se obezbedila manja propustljivost gasova i bolja zaštita aktivnih jedinjenja. Nažalost, značajna količina aktivnih jedinjenja ipak ostaje na površini čestica, što je glavni razlog za njihovo brzo oslobađanje iz sprej osušenih čestica. Odnos sadržaja aktivne komponente prema sadržaju nosača u napojnoj smeši utiče na količinu aktivne komponente koja će se javiti na površini čestice, pri čemu se stabilnost može povećati povećanjem udela nosača (Đorđević et al., 2015).

Jedan od nedostataka tehnike sušenja raspršivanjem je ograničen broj dostupnih materijala nosača. S obzirom na to da se skoro svi procesi sušenja raspršivanjem u prehrambenoj industriji izvode iz vodenih napojnih smeša, primenjen nosač mora biti rastvorljiv u vodi na prihvatljivom nivou (Desai and Jin Park, 2005). Osim toga, materijali koji se koriste za oblaganje aktivnih komponentata trebalo bi da poseduju dobra svojstva emulgovanja, formiranja filma i sušenja (Peanparkdee et al., 2016). U zavisnosti od materijala koji se inkapsulira i željenih karakteristika finalnog proizvoda, vrši se odabir različitih polimernih materijala koji se mogu koristiti u ovoj inkapsulacionoj tehnici, kao što su: polisaharidi (maltodekstrin, modifikovani skrob, alginat i karboksimetilceluloza), gume (guar guma, ksantan guma i arapska guma), proteini (proteini surutke, proteini soje, natrijum-kazeinat i želatin), kao i različite mešavine ovih materijala. Jedan od razloga za brzo oslobađanje aktivnih komponentata iz inkapsulata je taj što su konvencionalne sprej osušene kapsule sačinjene od polimera rastvorljivih u vodi, tako da će lako otpustiti aktivna jedinjenja kada se ugrade u prehrambene proizvode na bazi vode (Desai and Jin Park, 2005). Stoga se savremeni trendovi kreću u smeru dobijanja inkapsuliranih sistema sa hidrofobnim ili umreženim nosačima koji se teže rastvaraju u vodi, kako bi se omogućilo postepeno i kontrolisano otpuštanje aktivnih komponentata iz nosača (Zuidam and Shimoni, 2010; Lević, 2014).

Sprej hlađenje/rashlađivanje

Sprej hlađenje ili sprej rashlađivanje (engl. *spray chilling* ili *spray cooling*) su tehnike inkapsulacije suprotne sprej sušenju, jer umesto isparavanja, dolazi do hlađenja smeše aktivne komponente i nosača (Salević et al., 2018). Kao nosači se koriste otopljeni i hidrogenizovana biljna ulja ili njihovi derivati (Desai and Jin Park, 2005). U zavisnosti od tačke topljenja primenjenih nosača razlikuju se dve tehnike sprej hlađenja: *spray chilling* (opseg tačke topljenja 32-42 °C) i *spray cooling* (opseg tačke topljenja 45-122 °C) (Đorđević et al., 2015). Aktivni agens može biti rastvoren ili dispergovan u otopljenom nosaču pre samog postupka inkapsulacije (Lević, 2014). Dakle, smeša aktivne komponente i nosača, koji je u otopljenom stanju, raspršuje se u komoru u koju je prethodno injektovan hladan vazduh. Raspršivanje se može izvesti pomoću dizne, rotirajućeg diska ili centrifugalne koekstruzije (Zuidam and Shimoni, 2010). Nakon dispergovanja napojne smeše dolazi do očvršćavanja lipida i do formiranja čestica.

Čestice proizvedene ovom tehnikom inkapsulacije su tipičnog „matriks“ tipa, tj. aktivna komponenta je raspoređena po celoj zapremini čestice, a ne samo u njenom jezgru. Dobijene čestice su najčešće sferne, ali mogu imati neravnine na površini. Karakteristike konstrukcije uređaja za sprej hlađenje/rashlađivanje su veoma značajne sa aspekta rezultujuće veličine čestica. Naime, rotirajući disk za sprej hlađenje/rashlađivanje, koji rotira velikom brzinom, pogodan je za proizvodnju čestica opsega veličina od 50-150 µm. S druge strane, diznom za raspršivanje proizvode se čestice dimenzija između 150 i 500 µm, dok se rotacionim raspršivačem male brzine dobijaju čestice većih dimenzija, od 500 do 2000 µm (Đorđević et al., 2015). Generalno, veličina čestica zavisi od koncentracije aktivne komponente, viskoziteta rastopa, temperature topljenja, konfiguracije uređaja i brzine rotacije diska za disperziju (Zuidam and Shimoni, 2010).

Prednost inkapsulacije aktivnih komponenata ovom tehnikom je u brzom, ponovljivom i kontinuiranom radu, koji stoga može biti pogodan za industrijske kapacitete proizvodnje. Osim toga, ova tehnika je isplativa i ekološki prihvatljiva, zahvaljujući minimalnim zahtevima za potrošnjom energije i odsustvom korišćenja organskih rastvarača. Ipak, samo 5% inkapsulata u prehrambenoj industriji proizvedeno je ovom tehnikom. Razlog za to mogla bi biti ograničena primena na ovaj način proizvedenih inkapsulata, zbog njihove nerastvorljivosti u vodi, usled korišćenja lipidnih nosača (Desai and Jin Park, 2005). Stoga su inkapsulati proizvedeni sprej hlađenjem/rashlađivanjem našli primenu u pekarskim proizvodima, dehidrisanim supama i proizvodima sa visokim sadržajem ulja. Osim toga, ova tehnika se široko primenjuje za inkapsulaciju termolabilnih aktivnih komponenata, kao što su arome, vitamini, minerali i proteini (Đorđević et al., 2015).

Liofilizacija

Liofilizacija (engl. *freeze drying*) je tehnika inkapsulacije koja se zasniva na uklanjanju ledenih kristala rastvarača sublimacijom, na niskim temperaturama ispod tačke mržnjenja rastvarača i pod vakuumom. Smeša aktivne komponente i nosača rastvorenog u odgovarajućem rastvaraču, prvo se zamrzava, a potom dolazi do otparavanja rastvarača sublimacijom. Zamrzavanje materijala pre liofilizacije izvodi se pri opsegu temperature od -90 do -40 °C (Zuidam and Shimoni, 2010). Kao rastvarač u ovoj inkapsulacionoj tehnici najčešće se koristi voda. Glavni princip liofilizacije zasnovan je na fizičkom fenomenu sublimacije, tj. direktnom prelasku vode iz čvrstog u gasovito stanje, bez prolaska kroz tečnu fazu (Gaidhani et al., 2015). Da bi došlo do sublimacije vode, potrebno je sniziti pritisak i temperaturu ispod trojne tačke, koja za čistu vodu iznosi oko 6,1 mbar i 0 °C (Gaidhani et al., 2015). Najčešće se koriste temperature od -90 do -20 °C kako bi se izvršila sublimacija vode u ovoj tehnici inkapsulacije (Zuidam and Shimoni, 2010). Kao rezultat sublimacije zaostaje krhka, osušena

masa sačinjena od komponenata materijala inkapsuliranog unutar korišćenog nosača, koja se može naknadno obrađivati (mlevenje, usitnjavanje i sl.) u zavisnosti od finalne namene.

Za razliku od određenih postupaka sušenja koji koriste toplotu i mogu imati štetan uticaj na termolabilne aktivne komponente, liofilizacija je blaži proces koji omogućava dobijanje proizvoda visokog kvaliteta i mikrobiološke stabilnosti (Arenas-Jal et al., 2020). Posmatrano sa aspekta dobijanja poluproizvoda i/ili finalnog proizvoda, liofilizovani prahovi jednostavniji su za čuvanje, skladištenje, transport i doziranje (Kalušević, 2017). Uzimajući u obzir blage uslove, ova tehnika našla je primenu u inkapsuliranju brojnih bioaktivnih jedinjenja osetljivih na različite faktore spoljašnje sredine, kao što su prirodni pigmenti, arome, antioksidansi, ali i žive ćelije (npr. bakterije). Osim toga, jedna od oblasti primene liofilizacije jeste naknadno sušenje aktivnih komponenata inkapsuliranih nekom drugom tehnikom inkapsulacije.

Međutim, glavne mane postupka liofilizacije su veliki utrošak energije, visoka cena i dugotrajnost postupka dehidracije (najčešće oko 20 h) (Desai and Jin Park, 2005; Salević et al., 2018). Zbog činjenica da se postupak liofilizacije izvodi pod vakumom, da zahteva primenu niskih temperatura i da je veoma dugotrajan, smatra se 30-50 puta skupljim postupkom inkapsulacije u poređenju sa sprej sušenjem (Zuidam and Shimoni, 2010). Osim toga, otvorena porozna struktura liofilizovanih inkapsulata ne predstavlja zadovoljavajuću barijeru između aktivne komponente i njenog okruženja (Zuidam and Shimoni, 2010; Nedović et al., 2011). Takođe, inkapsulacijom aktivnih komponenata primenom ove tehnike nije moguće postići kontrolisanu veličinu čestica (Obradović, 2019).

Za razliku od postupka inkapsulacije, koji se odvija na temperaturama ispod tačke mržnjenja rastvarača, otparavanje rastvarača i formiranje čestica može se odvijati i na temperaturama iznad tačke mržnjenja rastvarača. Ova tehnika se naziva vakuum sušenje i veoma je slična postupku liofilizacije. Međutim, brža je i ekonomičnija, s obzirom na to da se izvodi na temperaturi iznad tačke smrzavanja rastvarača, što je u slučaju vode, kao najčešće korišćenog rastvarača u ovoj inkapsulacionoj tehnici, iznad 0 °C (Zuidam and Shimoni, 2010).

Oblaganje u fluidizovanom sloju

Oblaganje u fluidizovanom sloju (engl. *fluid bed coating/spray coating*) je tehnika koja je prvobitno korišćena za proizvodnju farmaceutskih proizvoda, dok je danas primena ove tehnike u prehrambenom sektoru veoma značajna, a doprinos se ogleda u širokom spektru inkapsuliranih verzija prehrambenih sastojaka i aditiva (Desai and Jin Park, 2005). Ovom tehnikom se čvrste čestice oblažu slojem nosača, a sama tehnika može se koristiti kao dodatna zaštita i sekundarni sloj oblaganja sprej sušenih inkapsulata, koji u svom jezgru sadrže veoma osetljive aktivne komponente (Salević et al., 2018). Princip tehnike zasniva se na atomizaciji rastvora/rastopa/disperzije nosača u seriji ili u kontinuitetu po površini suspendovane čvrste aktivne komponente, koja se nalazi u fluidizovanom stanju (Zuidam and Shimoni, 2010). Formiranjem zaštitnog filma omotača oko aktivne komponente dolazi do stvaranja kapsula (Lević, 2014; Salević et al., 2018).

Aktivna komponenta i rastvor/rastop/disperzija nosača uvode se odvojeno u komoru sa kontrolisanom temperaturom i vlažnošću vazduha (Desai and Jin Park, 2005). U prvoj fazi, čestice materijala koji se inkapsulira suspenduju se pomoću struje vazduha na unapred definisanoj temperaturi, a nakon toga se u komoru uređaja pomoću specijalnih dizni, uvodi rastvor/rastop/disperzija nosača (Zuidam and Shimoni, 2010). Poželjne karakteristike čestica koje se oblažu su: sferičnost, velika gustina, dobra protočnost i uska distribucija veličina čestica. S druge strane, jedan od glavnih problema izvođenja ove tehnike je nekontrolisana aglomeracija čestica, koja se može javiti kada je temperatura površine čestice viša od temperature staklastog prelaza nosača (Đorđević et al., 2015; Jakišić, 2020).

Nosač se može nanositi na aktivnu komponentu u više slojeva, jer se tokom izvođenja ovog postupka suspendovane čestice kreću ka dnu i zatim ponovo ka vrhu komore, čime se postiže potpuna prekrivenost i ravnomerno oblaganje čestica (Jakišić, 2020). Promenom položaja mlaznice razlikuju se tri načina nanošenja nosača na suspendovane čestice: sa vrha komore, sa dna komore i tangencijalno nanošenje (Desai and Jin Park, 2005).

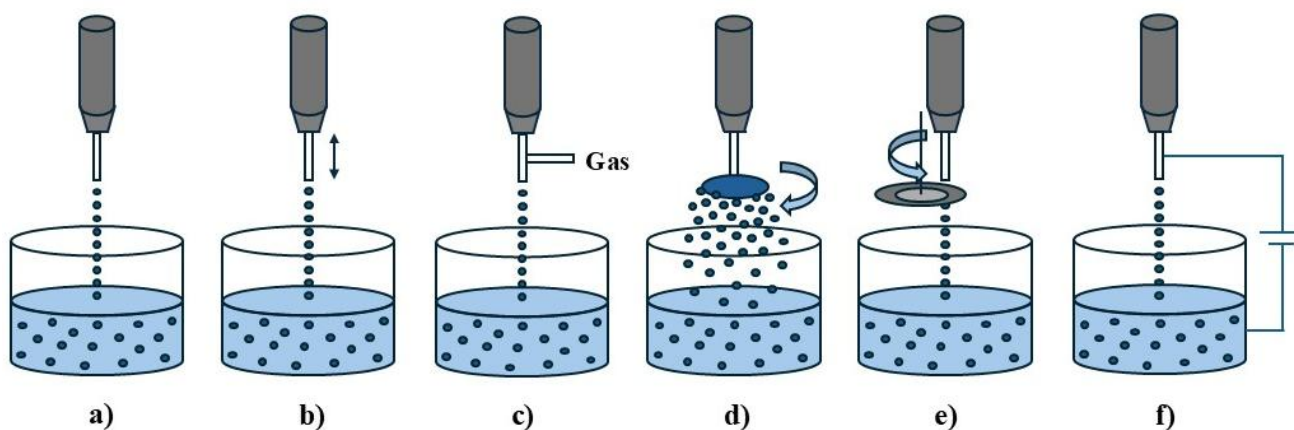
Prema Desai and Jin Park (2005), postoje tri grupe varijabli koje mogu uticati na odvijanje inkapsulacije aktivnih komponenata tehnikom oblaganja u fluidizovanom sloju: 1) procesne varijable (temperatura ulaznog vazduha, brzina ulaznog vazduha, brzina atomizacije, temperatura rastvora, sadržaj suve materije u rastvoru i pritisak atomizacije); 2) ambijentalne varijable (temperatura i relativna vlažnost ambijentalnog vazduha); i 3) termodinamičke varijable (temperatura i relativna vlažnost izlaznog vazduha).

Širi spektar nosača dostupan je za korišćenje u ovoj tehnici, u poređenju sa tradicionalnim sprej sušenjem. Nosači koji se koriste za oblaganje moraju posedovati adekvatan viskozitet, termičku stabilnost i sposobnost stvaranja filma (Đorđević et al., 2015). U tu svrhu mogu se koristiti vodeni rastvori celuloze i derivata skroba, dekstrina, proteina i guma. Osim toga, kao nosači se mogu koristiti rastopljeni lipidi, kao što su hidrogenizovana biljna ulja, masne kiseline, emulgatori i voskovi. Na početku procesa, posuda za skladištenje, ali i cev, dizna i vazduh za raspršivanje, moraju se zagrejati, kako bi se sprečilo očvršćavanje lipida. S druge strane, temperatura bliska tački topljenja lipida može izazvati stvaranje lepljivih i aglomeriranih čestica, tako da je neophodno optimizovati parametre procesa (Đorđević et al., 2015). Hladan vazduh se koristi za očvršćavanje nosača, dok se za nosače na bazi rastvarača, vrući vazduh koristi za isparavanje rastvarača. Rastopi oslobađaju svoj sadržaj povećanjem temperature ili fizičkim lomljenjem, dok nosači rastvorljivi u vodi oslobađaju svoj sadržaj dodavanjem vode (Desai and Jin Park, 2005). Posmatrano sa aspekta industrijske primene, prednost lipidnih nosača ogleda se u činjenici da je usled odsustva rastvarača ova formulacija nosača koncentrovana, za razliku od nosača rastvorljivih u vodi. To značajno skraćuje vreme obrade i utiče na isplativost procesa, jer zahvaljujući tome što nije potrebno uparavati rastvarač, energetski unos je značajno smanjen (Desai and Jin Park, 2005).

U cilju poboljšanja karakteristika inkapsulata u pogledu intenzivnije zaštite i bezbednosti inkapsulirane aktivne komponente, na suspendovane čestice moguće je naneti više slojeva nosača. Na taj način mogu nastati inkapsulati sa višezidnom morfologijom, umesto jednostavnog aktivna komponenta/nosač "rezervoar" tipa. Ipak, ne sme se zaboraviti da bi ovaj način dobijanja višeslojnih inkapsulata zahtevao značajno veće troškove proizvodnje (Zuidam and Shimoni, 2010; Đorđević et al., 2015). Osim toga, nedostatak ove tehnike inkapsulacije je dugotrajnost postupka, koji u nekim slučajevima može trajati i do 20 sati, kao i relativno velika potrošnja nosača (Lević i sar., 2014).

Ekstruzione tehnike

Tehnike ekstruzije primenjuju se u prehrambenoj industriji još od polovine 20. veka, ali u novije vreme posvećuje se značajna pažnja ovim tehnikama inkapsulacije aktivnih jedinjenja u polimerne čestice (Lević i sar., 2014; Đorđević et al., 2015). Princip ovih tehnika zasniva se na ekstruziji smeše aktivne komponente i nosača kroz otvor igle. Pri tome dolazi do formiranja kapljica koje očvršćavaju i formiraju kapsule fizičkim (npr. hlađenje ili zagrevanje) ili hemijskim putem (npr. geliranje, tj. hemijsko umrežavanje) (Đorđević et al., 2015; Salević et al., 2018).



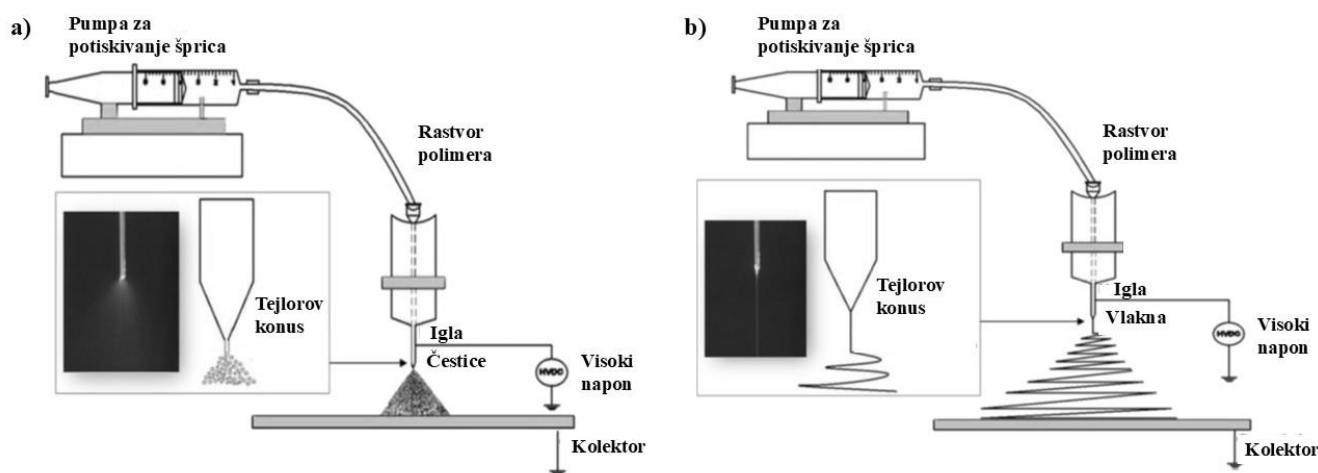
Slika 2.8. Ekstruzione tehnike: a) tehnika ukapavanja; b) vibraciona tehnika; c) tehnika ukapavanja uz dejstvo sekundarnog toka vazduha; d) raspršivanje mlaza pomoću rotirajućeg ravnog diska; e) presecanje mlaza pomoću rotirajućeg diska; f) elektrostatička ekstruzija

Zavisno od mehanizma formiranja kapljica, razlikuju se sledeće tehnike ekstruzije prikazane na Slici 2.8: tehnika ukapavanja, vibraciona tehnika, tehnika ukapavanja uz dejstvo sekundarnog toka vazduha, raspršivanje mlaza pomoću rotirajućeg ravnog diska, presecanje mlaza pomoću rotirajućeg diska i elektrostatička ekstruzija (Nedović, 1999). Među njima, kao najjednostavnija metoda, izdvaja se tehnika ukapavanja pod dejstvom gravitacije. Princip metode zasniva se na formiranju kapi aktivna komponenta/nosač na vrhu igle i otkidanju kapi pod dejstvom gravitacione sile, pri čemu ona pada u rastvor za geliranje. Nedostaci ove metode su mali kapaciteti za industrijsku primenu i relativno veliki prečnik dobijenih čestica. Iz razloga što ova metoda nije pogodna za dobijanje čestica malih dimenzija, razvijene su metode koje obezbeđuju bolju kontrolu procesnih parametara i, kao rezultat toga, dobijanje čestica traženih dimenzija. Princip vibracione tehnike zasniva se na vibriranju igle koja obezbeđuje da se kapljice otkidaju i padaju u rastvor za geliranje. U odnosu na tehniku ukapavanja, prednost ove metode je u proizvodnji čestica manjih dimenzija (<1 mm) i većoj količini proizvedenog inkapsuliranog materijala. Metoda ukapavanja uz dejstvo sekundarnog toka vazduha zasniva se na uvođenju toka vazduha u nivou otvora igle, dok se metoda raspršivanja pomoću rotirajućeg ravnog diska zasniva na raspršivanju smeše aktivna komponenta/nosač pomoću diska koji rotira velikom brzinom. Ove metode daju čestice manjih dimenzija od prethodno pomenutih tehnika. Princip metode presecanja mlaza zasniva se na formiranju čestica pomoću rotora koji preseca mlaz tečnosti i pogodna je za proizvodnju čestica iz viskoznih rastvora polimera. Prednost ove metode je dobijanje uniformnih čestica malog prečnika (<1 mm) i veliki kapacitet proizvodnje inkapsulata (Lević, 2014). Zajednička prednost svih ekstruzionih tehnika su blagi uslovi u pogledu primenjenih temperatura i korišćenih rastvarača (Đorđević et al., 2015).

Posmatrano sa aspekta dobijanja malih, uniformnih čestica i inkapsulacije osetljivih aktivnih komponenata, među ekstruzionim tehnikama posebno se izdvojila elektrostatička ekstruzija. Ova tehnika zasniva se na primeni električnog polja na tok tečnosti (na vrhu igle), pri čemu dolazi do formiranja takozvanog Tejlorovog konusa, zatim odvajanja kapi sa njegovog vrha i formiranja čestica. Kada sila elektrostatičkog polja nadvlada površinski napon tečnosti dolazi do formiranja kapi, koje se pod dejstvom gravitacije otkidaju i padaju u rastvor za geliranje. Elektrostatičkom ekstruzijom mogu se dobiti čestice malih dimenzija (<50 μm) i visoke uniformnosti (Đorđević et al., 2015). Na veličinu i uniformnost čestica dobijenih ovom tehnikom utiču sledeći parametri: razlika potencijala, prečnik igle, rastojanje između elektroda, brzina protoka tečnosti i fizičko-hemijske osobine primenjenog nosača (Kalušević, 2017). Jedan od najpogodnijih nosača za dobijanje čestica metodom elektrostatičke

ekstruzije jeste natrijum-alginat. Ovaj polisaharid u reakciji sa jonima kalcijuma prisutnim u rastvoru za geliranje (kalcijum-hlorid) daje kalcijum-alginat, koji se pokazao kao pogodan materijal za inkapsulaciju različitih aktivnih komponenata iz domena prehrambene tehnologije (Lević i sar., 2014). Međutim, povećanjem koncentracije natrijum-alginata raste i viskozitet samog rastvora, što dovodi do otežanog izvođenja elektrostatičke ekstruzije. Korišćenjem niskih koncentracija alginata do 2% dobijaju se uniformne čestice malih dimenzija ($<100\ \mu\text{m}$), dok se povećanjem koncentracije alginata u rastvoru dobijaju izdužene, nepravilne čestice većih dimenzija (Lević, 2014).

Osim elektrostatičke ekstruzije, prilikom koje nastaju mikročestice, postoje tehnike u kojima primenom elektrostatičkog polja nastaju vlakna (engl. *electrospinning*) ili čestice nanometarskih dimenzija (engl. *electrospraying*). Šematski prikaz ovih tehnika dat je na Slici 2.9.



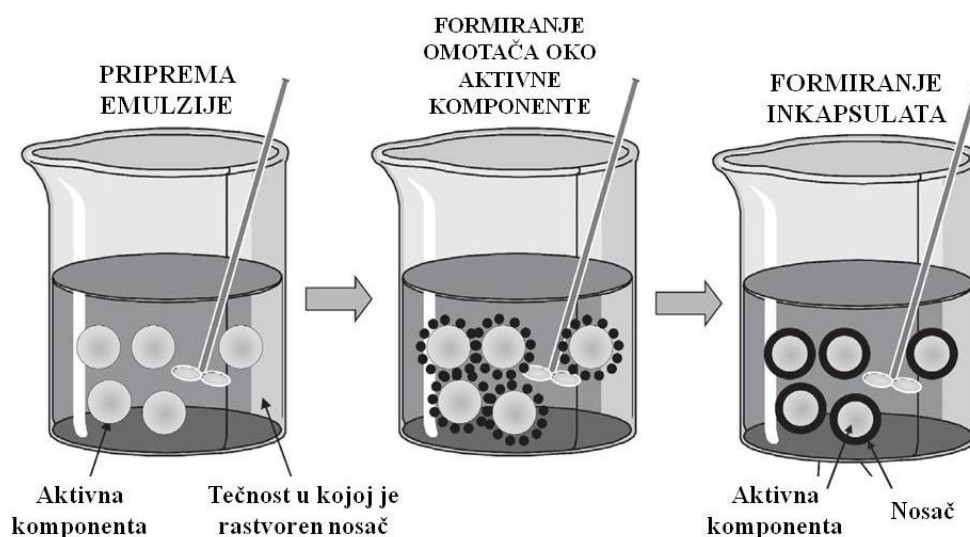
Slika 2.9. Šematski prikaz različitih tehnika inkapsulacije baziranih na primeni elektrostatičkog polja: a) *electrospraying* i b) *electrospinning* (Anu Bhushani and Anandharamakrishnan, 2014; slika uz dozvolu i modifikacije preuzeta od izdavača Elsevier)

Electrospraying i *electrospinning* su elektro-hidrodinamički procesi kod kojih dolazi do raspršivanja ili spinovanja rastvora polimera primenom električnog polja visokog napona u cilju dobijanja čestica ili vlakana, čiji prečnici mogu biti u nano, sub-mikro ili mikro opsegu (Salević, 2020). Kod ovih tehnika, aktivne komponente se rastvaraju ili disperguju u rastvoru polimera i potom inkorporiraju u strukture polimernih vlakana. Tipičnu postavku za ove tehnike čine četiri glavne komponente: 1) izvor visokog napona (1-30 kV); 2) igla od nerđajućeg čelika sa tupim krajevima; 3) pumpa za špric; i 4) uzemljeni kolektor, ravna ploča ili rotirajući bubanj. Razlika između ove dve tehnike zasniva se na koncentraciji rastvora polimera. Kada je koncentracija rastvora visoka, mlaz iz Tejlorovog konusa se stabilizuje i dolazi do stvaranja izduženih vlakana (*electrospinning*), a ukoliko je koncentracija rastvora niska, mlaz se destabilizuje i stoga se formiraju fine kapljice, koje se raspršuju u prostoru (*electrospraying*) (Anu Bhushani and Anandharamakrishnan, 2014). Potom dolazi do isparavanja rastvarača, što rezultira čvrstim polimernim vlaknima ili česticama, koje se talože na uzemljeni kolektor. Vlakna i čestice se, osim iz rastvora, mogu dobiti i iz emulzija i rastopa polimera (Salević, 2020). Na veličinu finalnog proizvoda utiču sistemski parametri (vrsta i koncentracija polimera, molekulska masa i mikrostrukturne karakteristike polimera, kao i pH vrednost, provodljivost, viskozitet i površinski napon rastvora polimera), instrumentalni parametri (primenjen električni potencijal, brzina protoka rastvora, rastojanje između vrha igle i kolektora i priroda materijala kolektora) i ambijentalni parametri (temperatura, vlažnost i protok vazduha u procesnoj komori) (Anu Bhushani and Anandharamakrishnan, 2014). Ove tehnike pokazale su visok potencijal u mikro- i

nanoinkapsulaciji bioaktivnih jedinjenja i enzima hrane. Pogodne su za inkapsulaciju termolabilnih jedinjenja, poput antioksidanasa (Salević et al., 2019), pošto se sam proces izvodi na ambijentalnoj temperaturi i atmosferskom pritisku. Takođe, predstavljaju odlične kandidate za razvoj aktivne ambalaže za pakovanje prehrambenih proizvoda, zahvaljujući povoljnim karakteristikama koje odlikuju ove tehnike, kao što su isplativost, mogućnost kontinuirane proizvodnje i jednostavan radni postupak (Salević et al., 2019). Osim toga, postoji obećavajući potencijal primene elektrospinovanih vlakana kao filtracionih membrana u preradi hrane i pića (Anu Bhushani and Anandharamakrishnan, 2014).

Emulzifikacija

U fizičkom smislu, emulzije predstavljaju dvofazne sisteme u kojima su kapljice jedne tečnosti dispergovane u zapremini druge tečnosti (Arenas-Jal et al., 2020). Da bi se obezbedila određena stabilnost emulzije, neophodno je uspostaviti takav sistem u kojem nema razdvajanja dve faze koje se ne mešaju. To se može postići upotrebom emulgujućih agenasa, kao i korišćenjem homogenizatora različitih konstrukcija, kao što su: homogenizatori, koloidni mlinovi, mikseri visokih performansi i posude za mešanje (Zudam and Shimoni, 2010).



Slika 2.10. Šematski prikaz tehnika zasnovanih na emulgovanju (Oxley et al., 2014; slika uz dozvolu i modifikacije preuzeta od izdavača Elsevier)

Princip inkapsulacije tehnikama na bazi emulzije zasniva se na dispergovanju tečnosti koja sadrži aktivnu komponentu u zapremini druge tečnosti u kojoj je sadržan nosač, a sa kojom se prirodno ne meša (Slika 2.10). Potom je potrebno izvršiti prilagođavanje dvofaznog sistema kako bi se izazvalo formiranje omotača oko kapljica dispergovane faze (Oxley et al., 2014). Razlikuju se dva osnovna tipa emulzija: voda u ulju i ulje u vodi. Prvi tip emulzije primenjuje se u slučaju inkapsulacije aktivnih komponenata rastvorljivih u vodi, dok se drugi tip primenjuje za zaštitu i isporuku lipofilnih aktivnih komponenata (arome, karotenoidi, vitamin E, biljni steroli i dijetetske masti) (Zudam and Shimoni, 2010). Osim toga, postoje i dvostruke emulzije, kao što je voda u ulju u vodi (Salević et al., 2018), koje se primenjuju za inkapsulaciju hidrofилnih aktivnih komponenata. Emulzije ulja u vodi su najčešći dvofazni sistemi koji se koriste za inkapsulaciju (Oxley et al., 2014). Važno je naglasiti da emulzifikacija može biti korak koji prethodi nekim drugim tehnikama inkapsulacije (Arenas-Jal et al., 2020). Na taj način, pripremljene emulzije ulja u vodi mogu se naknadno sušiti raspršivanjem ili liofilizacijom, a dobijene suve emulzije mogu imati primenu kao inkapsulati ili instant formule za razne prehrambene proizvode (Zuidam i Shimoni, 2010). Dakle, priprema emulzije jedan je od koraka u proizvodnji, jer se dalje mogu obrađivati i procesirati drugim metodama inkapsulacije (Lević, 2014).

Postoji mnogo tehnika inkapsulacije koje zahtevaju ili se oslanjaju na formiranje emulzije, kao što su koacervacija, polimerizacija, lipozomi ili isparavanje rastvarača (Oxley et al., 2014; Arenas-Jal et al., 2020).

Osim toga, emulzifikacija se može primeniti za proizvodnju čvrstih lipidnih inkapsulata unutar kojih je inkorporirana aktivna komponenta. Princip ove tehnike zasniva se na dispergovanju otopljenih lipidnih materijala (masti ili vosak) u vodi, na temperaturi iznad tačke topljenja lipida. Potom se vrši hlađenje, pri čemu dolazi do formiranja čvrstih lipidnih inkapsulata unutar kojih se nalazi aktivna komponenta (Zuidam and Shimoni, 2010). Ovaj postupak mogao bi predstavljati odgovarajuću alternativu prethodno opisanom postupku sprej rashlađivanja/hlađenja. Ipak, ukoliko je aktivna komponenta barem i delimično rastvorljiva u vodi, efikasnost inkapsulacije aktivne komponente u lipidima biće smanjena, što je jedan od glavnih nedostataka ove inkapsulacione tehnike (Zuidam and Shimoni, 2010; Lević, 2014).

Koacervacija

Koacervacija se smatra prvom tehnikom inkapsulacije i razvijena je polovinom 20. veka (Đorđević et al., 2015). Koristi se za inkapsulaciju hidrofobnih aktivnih komponenata unutar nosača hidrofilnih svojstava (Salević et al., 2018). Smatra se pravom tehnikom inkapsulacije, jer je aktivna komponenta (čvrsta ili tečna) u potpunosti obložena zaštitnim omotačem, tj. nosačem (Jakišić, 2020). Princip metode zasniva se na formiranju takozvanih koacervata, koji su sačinjeni od dispergovanih kapi aktivne komponente nerastvorne u vodi i hidrofilnog omotača. Naime, aktivna komponenta disperguje se u rastvoru jednog ili više polimera, nakon čega je potrebno varirati parametre sistema, kao što su temperatura i pH vrednost, kako bi se korišćeni polimer/i preveo/li u formu tečnog filma koji obavija aktivnu komponentu (Lević i sar., 2014). Dobijeni koacervati mogu se potom dodatno gelirati (očvršćavati) ili pak sušiti do praškaste forme, metodom sprej sušenja ili oblaganja u fluidizovanom sloju (Lević, 2014; Desai and Jin Park, 2020)

U zavisnosti od broja primenjenih polimera, razlikuju se jednostavna i kompleksna koacervacija. Kod jednostavne koacervacije koristi se samo jedan polimer (npr. pektin ili želatin). Na odvijanje postupka jednostavne koacervacije utiču sledeći faktori: pH vrednost, jonska snaga, temperatura i struktura makromolekula. S druge strane, u slučaju kompleksne koacervacije inkapsulati se formiraju elektrostatičkim interakcijama dva suprotno naelektrisana polimera (proteina i polisaharida) (Peanparkdee et al., 2016; Jakišić, 2020). Iz tog razloga, ova metoda se još naziva i „metoda polimer-polimer interakcija“. Kao pozitivno naelektrisani polimeri najčešće se koriste proteini (kao što su želatin, izolati sojinih proteina i izolati proteina surutke), dok se kao negativno naelektrisani polimeri koriste polisaharidi (arapska guma, pektin, alginat i karboksimetilceluloza) (Peanparkdee et al., 2016). Ipak, u praksi se najčešće koristi sistem nosača želatin-arapska guma za dobijanje koacervata iz emulzije (Lević, 2014). Postupak kompleksne koacervacije najviše zavisi od koncentracije polimera i pH vrednosti, jer smeša proteina i polisaharida formira elektrostatički kompleks u tačno određenom opsegu pH vrednosti.

Ukoliko se postignu optimalni uslovi, efikasnost inkapsulacije ovom tehnikom može dostići vrednosti blizu 100%. Prečnici koacervata mogu varirati u opsegu od 1 do 500 μm , što zavisi od proizvodnih parametara, kao što su brzina i vreme homogenizacije i odnos aktivna komponenta/nosač. Inkapsulati dobijeni ovom tehnikom veoma su higroskopi i imaju tendenciju aglomeracije, zbog čega je potrebno obezbediti određene uslove smanjenog sadržaja vlage, neophodne za njihovo bezbedno čuvanje i skladištenje (Đorđević et al., 2015). Uprkos velikom interesovanju u naučnim krugovima za inkapsulacijom aktivnih komponenata tehnikom koacervacije, ovaj postupak još uvek nije u potpunosti prihvaćen u prehrambenoj industriji zbog kompleksnosti i visoke cene (Salević et al., 2018).

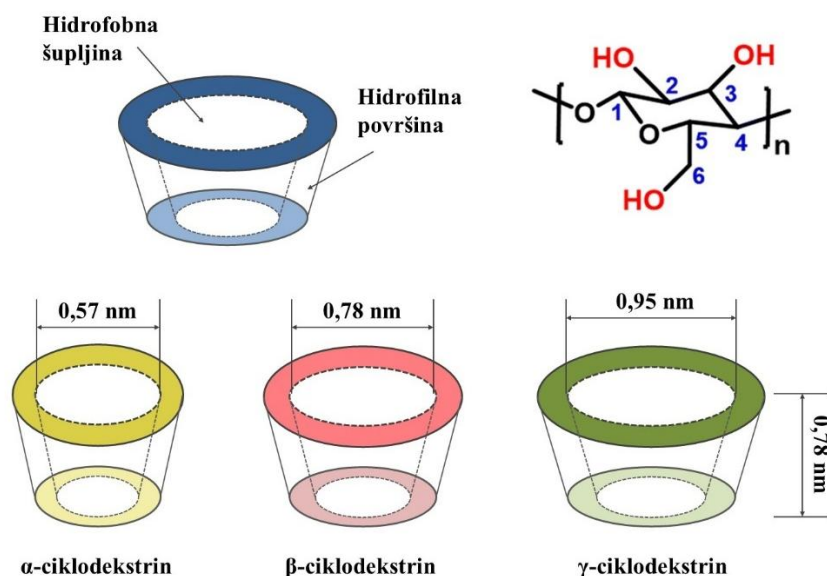
Lipozomi

Iako se ova tehnika pretežno koristi u farmaceutskoj industriji, u novije vreme sve je veće interesovanje za inkapsulacijom bioaktivnih jedinjenja tehnikom lipozoma u prehrambenoj tehnologiji za proizvodnju funkcionalne hrane (Lević, 2014; Jakišić, 2020). Lipozomi su sferne lipidne čestice koje se koriste kao nosači za inkapsulaciju zahvaljujući fosfolipidnim membranama u njihovoj strukturi unutar kojih se smešta aktivna komponenta. Sastoje se od vodene faze koja je potpuno okružena membranom na bazi fosfolipida. Osnovni mehanizam za formiranje lipozoma su hidrofilno-hidrofobne interakcije između polarnih lipida, najčešće fosfolipida, i molekula vode (Salević et al., 2018). Interakcijom između hidrofilnih glava i lipofilnih ugljovodoničnih repova polarnih lipida dolazi do formiranja lipidnog dvosloja, koji se usled mešanja u vodi zatvaraju u sfernu lipidnu česticu (lipozom) (Đorđević et al., 2015). To dispergovanje u vodi pod velikom brzinom mešanja izvodi se pomoću koloidnih mlinova ili postupkom mikrofluidizacije (Zuidam and Shimoni, 2010). U formiranim lipozomima, aktivna komponenta može se nalaziti u vodenoj fazi ili biti vezana za membranu lipozoma. Materijali koji se najčešće koriste za dobijanje stabilnih lipozoma su lecitin, holesterol i negativno naelektrisani fosfolipidi. Veličina nastalih lipozoma može varirati od nekoliko nanometara do nekoliko mikrometara (Lević i sar., 2014).

U lipozomima se mogu inkapsulirati i hidrofilne i lipofilne aktivne komponente, što ih čini pogodnim nosačem u prehrambenoj industriji. Inkapsulacija u lipozomima primenjuje se u cilju maskiranja nepoželjnih senzornih svojstava, kao i kontrolisane isporuke enzima, proteina, vitamina, minerala, aroma, kao i aktivnih komponenata sa izraženim antioksidativnim i antimikrobnim svojstvima (Đorđević et al., 2015). Ipak, ograničavajući faktor šire primene ove inkapsulacione tehnike je visoka cena proizvodnje ovakvih inkapsulacionih sistema. Osim toga, fizičko-hemijska nestabilnost tokom skladištenja, pogotovo u pogledu izražene tendencije ka aglomeraciji čestica, još jedan je od izazova za obimniju primenu tehnike inkapsulacije u lipozomima u prehrambenoj industriji. Iz navedenih razloga, ovu tehniku je ekonomski opravdano upotrebiti u slučaju inkapsulacije vrednih i skupih biološki aktivnih komponenata, poput resveratrola (Lević i sar., 2014).

Molekulska inkluzija

Za razliku od prethodno opisanih tehnika inkapsulacije, molekulska inkluzija odvija se na nivou molekula (Desai and Jin Park, 2005). Naime, smeštanjem aktivne komponente u takozvanu aktivnu šupljinu molekula karakteristične strukture postiže se inkapsulacija. Molekuli koji se najčešće koriste u ovoj tehnici su svakako ciklodekstrini, zahvaljujući specifičnom rasporedu monomera u strukturi (Đorđević et al., 2015). To su ciklični oligosaharidi, derivati skroba, koji nastaju pod uticajem enzima ciklodekstrin glukotransferaza, pri čemu dolazi do vezivanja molekula glukoze $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozidnim vezama na način da formiraju konus (Lević, 2014; Đorđević et al., 2015). Razlikuju se α -, β - i γ -ciklodekstrini izgrađeni od 6, 7 ili 8 jedinica glukoze, respektivno (Zuidam and Shimoni, 2010). Dubina šupljine u sredini molekula svih ciklodekstrina je oko 0,8 nm, dok se prečnici razlikuju kod α - (0,57 nm), β - (0,78 nm) i γ - (0,95 nm) ciklodekstrina (Lević, 2014) (Slika 2.11). Među pomenutim ciklodekstrinima, β -ciklodekstrin se izdvaja kao najčešće primenjivan nosač u ovoj inkapsulacionoj tehnici. Spoljašnji deo molekula ciklodekstrina je hidrofilan, dok je unutrašnji deo hidrofoban, te se stoga oni primenjuju za inkapsulaciju manje polarnih molekula, koji mogu biti zarobljeni u nepolarnoj unutrašnjoj šupljini hidrofobnim interakcijama (Desai and Jin Park, 2005; Salević et al., 2018).



Slika 2.11. Struktura i okvirne dimenzije α -, β - i γ -ciklodekstrina

Inkapsulacija se izvodi formiranjem inkluzionih kompleksa molekula β -ciklodekstrina sa aktivnim jedinjenjima, koja se mogu dimenzionalno uklopiti u njihovu centralnu šupljinu. Inkluzioni kompleksi formiraju se u reakciji koja se odvija samo u prisustvu vode. Kompleks aktivna komponenta-ciklodekstrin može se formirati na više načina: metodom koprecipitacije, metodom taloženja, metodom paste i metodom suvog mešanja (Hedges, 1998). Međutim, uslovi kompleksiranja su specifični za svaki pojedinačni molekul koji se inkapsulira. Tipični molekuli koji su inkapsuliraju ovom metodom su aromatična jedinjenja, zahvaljujući tome što su manje polarna od vode i imaju odgovarajuće molekulске dimenzije koje omogućavaju njihovu ugradnju u unutrašnjost molekula ciklodekstrina. Osim toga, pogodni su za zaštitu aroma od dejstva vlage, kiseonika, svetlosti i povišenih temperatura (Lević i sar., 2014). Razlikuju se tri metode za formiranje kompleksa aromatičnog jedinjenja i β -ciklodekstrina: 1) β -ciklodekstrin se rastvara u vodi i potom se dodaje aroma kako bi se formirao inkluzioni kompleks u kristalnom obliku, koji se potom odvoji i osuši; 2) β -ciklodekstrin se rastvara u manjoj količini vode nego u prvom slučaju da bi se formirala koncentrovana suspenzija, zatim se dodaje aroma kako bi se formirao inkluzioni kompleks u kristalnom obliku, koji se potom odvoji i osuši; 3) β -ciklodekstrin se rastvara u mnogo nižem sadržaju vode kako bi se formirala pasta, u koju se potom utisne aroma da bi se formirao inkluzioni kompleks. Prednost trećeg načina u odnosu na prethodna dva je u tome što ne zahteva dalje odvajanje i sušenje (Desai and Jin Park, 2005).

Prednosti ovog načina inkapsulacije su termička i hemijska stabilnost, kao i kontrolisano otpuštanje aktivne komponente (Salević et al., 2018). Međutim, visoka cena i relativno mali udeo aktivne komponente koja može da se zarobi u šupljini molekula ciklodekstrina malih razmera, predstavljaju osnovne nedostatke ove tehnike inkapsulacije. Osim toga, postoje i određena zakonska ograničenja za upotrebu β -ciklodekstrina u prehrambenoj industriji, zbog regulatornih zahteva propisanih u velikom broju država (Desai and Jin Park, 2005; Zuidam and Shimoni, 2010; Lević, 2014).

2.2.3. Nosači za inkapsulaciju

Uslovi koje neki materijal mora da ispuni da bi se mogao primenjivati kao nosač za inkapsulaciju jesu biorazgradivost i sposobnost formiranja zaštitnog sloja između unutrašnje faze inkapsulata i njenog okruženja (Salević et al., 2018). Osim toga, obavezno je da materijali koji se koriste kao nosači za inkapsulaciju imaju "GRAS" status (*Generally Recognized As Safe*), tj. da budu

proglašeni za sigurne i bezbedne od strane odgovarajućih stručnih tela, kao što je Američka uprava za hranu i lekove (Obradović, 2019). Osim toga, idealan nosač za inkapsulaciju trebalo bi da poseduje sledeće karakteristike:

- dobra reološka svojstva pri visokoj koncentraciji i lako rukovanje materijalom tokom inkapsulacije;
- sposobnost dispergovanja ili emulgovanja aktivne komponente i stabilizacije proizvedene emulzije;
- nereaktivnost sa materijalom koji se inkapsulira tokom obrade i dužeg skladištenja;
- sposobnost zadržavanja aktivnog materijala unutar njegove strukture tokom obrade ili skladištenja;
- sposobnost potpunog oslobađanja od rastvarača ili drugih materijala koji se koriste tokom procesa inkapsulacije pod uslovima sušenja ili drugih uslova uklanjanja rastvarača;
- sposobnost pružanja maksimalne zaštite aktivne komponente od spoljašnjih faktora (kiseonik, toplota, svetlost i vlaga);
- rastvorljivost u rastvaračima prihvatljivim u prehrambenoj industriji (voda i etanol);
- hemijska nereaktivnost sa aktivnom komponentom koja se inkapsulira;
- niska cena i prehrambeni kvalitet (*food-grade*) (Desai and Jin Park, 2005).

U prehrambenoj industriji se kao nosači za inkapsulaciju mogu koristiti brojni materijali, kao što su:

- polisaharidi:
 - biljnog porekla: skrob i derivati skroba (npr. maltodekstrini i ciklodekstrini), celuloza i derivati celuloze (npr. etil celuloza), ekstrudati (npr. arapska guma i guar guma) i ekstrakti (pektini i galaktomanani),
 - morskog porekla: karagenan i alginat,
 - mikrobnog/animalnog porekla: ksantan, gelan, dekstran i hitozan;
- proteini:
 - biljnog porekla: gluten i proteinski izolati (graška, soje),
 - animalnog porekla: kazein, proteini surutke i želatin;
- lipidi:
 - biljnog porekla: masne kiseline, alkoholi, gliceridi, voskovi (npr. karnauba) i fosfolipidi,
 - mikrobnog/animalnog porekla: masne kiseline, alkoholi, gliceridi, voskovi (npr. pčelinji) i fosfolipidi;
- ostali: parafin, polivinilpirolidon, polivinil alkohol i neorganski materijali (npr. oksidi aluminijuma, oksidi silicijuma) (Wandrey et al., 2010; Zobot et al., 2022).

Pošto nijedan od brojnih navedenih nosača ne može da ispuni sve gore navedene kriterijume, u praksi se materijali za oblaganje često koriste u kombinacijama, u cilju dobijanja inkapsulata sa što boljim karakteristikama. Primenom dva ili više materijala, pri čemu jedan na primer daje dobra mehanička svojstva, dok drugi predstavlja dobru barijeru za kiseonik, dobijaju se inkapsulati koji mogu pokazivati bolje fizičke, mehaničke i hemijske osobine u poređenju sa inkapsulatima sa pojedinačnim materijalima za oblaganje (Lević, 2014). Dakle, na ovaj način mogu se postići željeni rezultati kombinovanjem poželjnih svojstava različitih materijala. Osim toga, veoma je značajno razmotriti cenu

materijala i njihovu dostupnost, jer su to parametri koji diktiraju koji će se materijal koristiti kao nosač aktivne komponente (Wandrey et al., 2010).

Stoga su u ovoj studiji primenjene kombinacije maltodekstrina, kao jednog od najčešće korišćenih nosača za inkapsulaciju, sa povoljnim karakteristikama u pogledu zaštite aktivne komponente, fizičko-hemijskih karakteristika i pristupačne cene, sa alginatom, guar gumom i arapskom gumom. Tomsone et al. (2020b) su u svojoj studiji o inkapsulatima rena istakli da je kombinacija nosača maltodekstrin/arapska guma imala izraženiji pozitivan uticaj na fizičko-hemijska svojstva inkapsulata nego u slučaju kada su ovi nosači primenjeni pojedinačno. Za razliku od ove kombinacije nosača, do danas ne postoje prijavljeni literaturni podaci o inkapsulaciji sokova rena u kombinacije maltodekstrin/alginat i maltodekstrin/guar guma. S obzirom na to da su u ovoj disertaciji kao nosači za inkapsulaciju korišćeni maltodekstrin, alginat, guar guma i arapska guma, u daljem tekstu biće predstavljene njihove detaljnije karakteristike.

Maltodekstrini su oligosaharidi koji nastaju kiselinom ili enzimskom hidrolizom skroba i sastoje se od jedinica D-glukoze povezanih $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozidnim vezama (Wandrey et al., 2010). Kao nosači za inkapsulaciju aktivnih komponenata, koriste se maltodekstrini različitih dektroznih ekvivalenata (DE), koji predstavljaju meru stepena hidrolize skroba i obrnuto su proporcionalni njihovoj molekulskoj masi, od koje zavisi gustina obloge nosača oko aktivne komponente (Pieczykolan and Kurek, 2019). Različite vrednosti dektroznih ekvivalenata (najčešće DE 12-20) utiču na fizičko-hemijska svojstva maltodekstrina. Maltodekstrini sa visokom DE vrednošću imaju manju molekulsku masu, ali više –OH grupa, zbog čega im rastu higroskopnost, rastvorljivost i osmotske osobine. S druge strane, maltodekstrini sa nižim DE imaju veću molekulsku masu, ali manje –OH grupa, što utiče na porast viskoziteta i kohezivnosti, kao i na sprečavanje nastanka krupnih kristala u procesima kristalizacije. Maltodekstrini se mogu dobiti modifikacijom kukuruznog ili krompirovog skroba, što daje prednost proizvodima sa ovim nosačima na čijoj se deklaraciji može istaći tvrdnja “bez glutena” (Kalušević, 2017). Međutim, ukoliko se maltodekstrini dobijaju iz pšenice, oni mogu sadržati tragove glutena, što je značajno naglasiti ukoliko ih konzumiraju osobe obolele od celijakije (Wandrey et al., 2010).

Maltodekstrini su kremasto-beli, polisaharidni prahovi, koji su lako svarljivi i imaju blag, umereno sladak ukus (Pieczykolan and Kurek, 2019). U prehrambenoj industriji, maltodekstrini su najčešće korišćeni materijali koji se primenjuju kao nosači aktivnih komponenata, jer se odlikuju niskom cenom, dobrom rastvorljivošću, malom viskoznošću, niskim sadržajem šećera i visokom efikasnošću inkapsulacije (Pieczykolan and Kurek, 2019). Osim toga, imaju nisku higroskopnost, a njihovi rastvori su bezbojni (Rocha et al., 2018). Sve to favorizuje maltodekstrine i čini ih veoma poželjnim za dodavanje proizvodima u prehrambenoj industriji (Robert et al., 2010). Međutim, maltodekstrini pokazuju nedostatak zgrudnjavanja kapsula pod visokim temperaturama, nizak kapacitet emulgovanja i marginalno zadržavanje isparljivih materija (Šturm et al., 2019).

Stoga su brojna istraživanja pokazala da se upotrebom kombinacije maltodekstrina i hidrokoloida povećava efikasnost inkapsulacije i doprinosi razvoju inkapsulata sa izuzetno poželjnim fizičko-hemijskim, morfološkim i senzornim karakteristikama. Naime, u studiji autora Zhang et al. (2020) otkriveno je bolje zadržavanje fenolnih jedinjenja soka od brusnice kada se koristi kombinacija nosača maltodekstrin/arapska guma u poređenju sa pojedinačnim materijalima. Slično tome, Idham et al. (2012) pokazali su najvišu stopu produktivnosti i efikasnosti kombinovanog maltodekstrina i arapske gume prilikom inkapsulacije ekstrakta hibiskusa. U studiji autora Pieczykolan and Kurek

(2019) kombinacija nosača maltodekstrin/guar guma uticala je na formiranje čestica najmanjih dimenzija, ujednačene veličine i oblika, sa najvišim stepenom rastvorljivosti, najvišom efikasnošću inkapsulacije fenolnih jedinjenja i najefikasnijim očuvanjem boje kapsula soka aronije u odnosu na kombinacije sa drugim nosačima (arapska guma, pektin, β -glukan ili inulin). Stoga je u ovoj disertaciji u cilju dobijanja inkapsulata sa što poželjnijim karakteristikama, maltodekstrin kombinovan sa alginatom, guar gumom ili arapskom gumom.

Alginati su prirodni polisaharidi koji se dobijaju iz morskih algi. Komercijalno dostupni alginati, koji imaju najrasprostranjeniju upotrebu, dobijaju se iz smeđih morskih algi sledećih vrsta: *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* i *Ascophyllum nodosum*. Osim toga, alginati mogu sintetisati i neke bakterijske vrste, kao što su *Pseudomonas* i *Azotobacter* (Lević, 2014).

Imaju linearnu strukturu i sastoje se od ostataka β -D-manuronske i α -L-guluronske kiseline, koji su međusobno povezani $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozidnim vezama. U strukturi polimera postoje blokovi alternirajućih kopolimera i homopolimera, sastavljenih od β -D-manuronske (M) i α -L-guluronske kiseline (G), čiji sadržaj ima veliki uticaj na svojstva alginata (Martins et al., 2017). Sastav ovih blokova unutar strukture alginata odgovoran je pre svega za svojstva alginatnih gelova. Do formiranja gelova, tj. umrežavanja, dolazi razmenom jona natrijuma sa dvovalentnim katjonima (npr. Pb^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} i Mg^{2+}), pri čemu se obrazuju specifične strukture, koje se kolokvijalno nazivaju "kutija za jaja" (engl. „egg-box“) (Martins et al., 2017). Naime, dva ili više poliuronatnih lanaca međusobno se vezuju i stvaraju šupljine za smeštanje dvovalentnih katjona (Obradović, 2019). Ova karakteristika alginata da formiraju hidrogelove u prisustvu određenih katjona predstavlja njihovu najznačajniju odliku. Alginatni gelovi u obliku sfernih čestica različitih dimenzija najčešće su primenjivan oblik alginata kao nosača u biotehnologiji. Primena alginata kao gelova ili sfera čini ih jednim od najšire ispitivanih i korišćenih nosača za inkapsulaciju aktivnih komponenata.

Alginatne čestice najčešće se dobijaju tehnikama koje se baziraju na primeni spoljašnje sile za dispergovanje alginata u obliku kapi koje padaju u rastvor za geliranje, dobijajući na taj način konačni oblik i dimenzije (Martins et al., 2017). Veličina alginatnih čestica varira u opsegu od nekoliko μm do nekoliko mm, što zavisi od viskoziteta pripremljenog rastvora, kao i rastojanja od igle do rastvora za geliranje. Osim toga, procenat zastupljenosti određenih strukturnih jedinica utiče na finalnu veličinu alginatnih čestica. Kako bi se postupak inkapsulacije aktivnih materija unutar alginatnog nosača unapredio i bio što efikasniji, neophodno je poznavati difuzione karakteristike ovog materijala (Šeregelj, 2019). One zavise od veličine pora alginata, koje imaju značajan uticaj na brzinu transporta materije kroz nosač, kao i na stabilnost inkapsulirane aktivne komponente. Pore alginatnih nosača imaju dimenzije od nekoliko nanometara pa do 200 nm (Lević, 2014). Veličina pora uslovljena je sledećim faktorima: koncentracija alginata, hemijska struktura gela i kinetika formiranja gela. Kao nosač za inkapsulaciju aktivnih komponenata često se koristi alginat u obliku soli, kao što je natrijum-alginat. Rastvara se u vodi, pri čemu se dobijaju viskozni rastvori, čiji viskozitet zavisi od dužine alginatnog lanca, tj. od molekulske mase alginata. Viskozitet alginatnog rastvora proporcionalan je molekulskoj masi, tj. raste sa njenim povećanjem. Na rastvorljivost alginata utiče sadržaj soli, kao i pH vrednost rastvora. Prisustvom određenih soli, kao što je kalijum-hlorid, može doći do razdvajanja faza u rastvoru alginata. To nije povoljno sa aspekta rastvorljivosti alginata u vodi, ali se može iskoristiti za njegovo prečišćavanje i izdvajanje. Osim toga, do ove pojave dolazi i pri niskoj pH vrednosti (Obradović, 2019). Navedene karakteristike je neophodno poznavati kako bi primena alginata kao

nosača za inkapsulaciju u prehrambenoj industriji bila što efikasnija. Kada se zadovolje odgovarajući uslovi, alginat se može primeniti kao nosač u različitim tehnikama inkapsulacije.

Zahvaljujući ekološkoj prihvatljivosti, biokompatilnosti, netoksičnosti i biodegradabilnim svojstvima alginata, kao i dostupnosti i niskoj ceni sirovine, alginat je široko korišćen nosač aktivnih komponenata. Međutim, poroznost materijala, osetljivost ovakvih sistema na stresove iz okruženja i podložnost oksidaciji su nedostaci koji se moraju prevazići u cilju što efikasnije inkapsulacije aktivne komponente (Martins et al., 2017). To se može postići kombinovanjem alginata sa drugim materijalima i pripremom blendi nosača, koji će zajedno dati inkapsulate poželjnijih karakteristika nego kada se ovi materijali koriste pojedinačno.

Guar guma je hidrokolid visoke molekulske mase dobijen iz endosperma mahunarke guar (*Cyamopsis tetragonolobus* ili *Cyamopsis psoraloides*). To je prah bele do žućkasto-bele boje i bez mirisa (Sharma et al., 2018). Struktura ovog polisaharida je u obliku štapa u kojem su bočni lanci D-galaktoze pričvršćeni za lanac D-manoze, sa prosečnim molekulskim odnosom od 1:2. Pravi lanci D-manoznih jedinica su povezani $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidnom vezom, a jedinice D-galaktoze su spojene na alternativni način preko $(1\rightarrow6)$ glikozidne veze (Šeremet et al., 2024).

Većinski proizvođač guar gume je Indija, koja obuhvata 80% svetske proizvodnje ovog polimera (Sharma et al., 2018). Guar guma predstavlja primer hidrofilnog polisaharida sa izuzetno visokom molekulskom masom. Obično je nerastvorljiva u ugljovodonicima, mastima, alkoholima, estrima i ketonima, dok visoku rastvorljivost ispoljava samo u vodi. Galaktoza povezana za lance manoze stupa u vodenoj sredini u interakciju sa molekulima vode, pri čemu dolazi do intermolekularnog preplitanja lanaca, a kao posledica dolazi do zgušnjavanja i povećanja viskoziteta rastvora (Sharma et al., 2018). Guar guma može postići svoj puni viskozitet u hladnoj vodi, dok druge gume isti viskozitet postižu tek nakon dužeg zagrevanja. Ukoliko je u vodenom rastvoru guar guma prisutna u koncentraciji većoj od 1%, uticaće kako na nutritivne, tako i na fizičko-hemijske i senzorne karakteristike (Šeremet et al., 2024). Ovaj problem visokog viskoziteta može se rešiti delimičnom enzimskom hidrolizom guar gume, koja skraćuje dužinu lanca i molekulsku masu polimera (Mudgil et al., 2014). Sa povećanjem koncentracije guar gume u rastvoru raste i moć geliranja ili zgušnjavanja. Guar guma je stabilna i omogućava konstantan viskozitet u širokom pH opsegu, pri čemu je on maksimalan u pH opsegu od 6-9, a minimalan pri pH 3,5 (George et al., 2019).

Zahvaljujući hidrofilnosti, netoksičnosti, biodegradabilnosti i ekonomičnosti, guar guma je polimer koji se široko koristi u sistemima za isporuku lekova (Baena-Aristizábal et al., 2019; George et al., 2019). Osim toga, primenjuje se i u drugim granama industrije (papirnoj, kozmetičkoj, tekstilnoj, eksplozivnoj i rudarskoj industriji) (Sharma et al., 2018). Značajno je istaći upotrebu ovog prirodnog polimera u prehrambenoj industriji kao nosača za inkapsulaciju aktivnih komponenata, zahvaljujući brojnim pozitivnim svojstvima, od kojih je posebno značajan prehrambeni kvalitet (engl. *food-grade quality*). Guar guma je opsežno istražena kao nosač za tehniku inkapsulacije sprej sušenjem (Šeremet et al., 2024). Međutim, zbog izrazite viskoznosti, pogodno ju je kombinovati sa drugim nosačima, kako bi se postigli optimalni uslovi za izvođenje postupka inkapsulacije, posmatrano sa aspekta realizacije primenjene tehnike inkapsulacije, kao i dobijanja prahova visokog kvaliteta.

Arapaska guma je hidrokolid dobijen prirodnom ekstrudacijom ili povredom stabala bagrema (*Acacia* vrste), koja rastu u polusušnoj oblasti podsaharske Afrike. Na mestima povrede, guma se na stablu pojavljuje u obliku suze. Prvobitno je u tečnom obliku, a potom na vazduhu očvršćava i na taj

način štiti drvo od isušivanja i napada mikroorganizama (Prasad et al., 2022). Među različitim *Acacia* vrstama koje proizvode gumu, sistematska sadnja za proizvodnju gume vrši se samo za vrstu *Acacia senegal*, koja čini 90% proizvedene arapske gume u svetu. Za razliku od ostalih vrsta bagrema, kod kojih do povrede tkiva dolazi prirodno, kod ove vrste ju je neophodno veštački izazvati. Sudan je najveći proizvođač arapske gume na svetu (Prasad et al., 2022).

Hemijski sastav arapske gume je složen i sastoji se od grupe makromolekula koji se odlikuju visokim udelom ugljenih hidrata (97%) i niskim udelom proteina (<3%) (Šturm et al., 2019). Struktura ovog kompleksnog molekula sačinjena je od pet centralnih monomernih jedinica, uključujući galaktopiranozu, ramnopiranozu, arabinofuranozu, arabinopiranozu i uronsku kiselinu (glukuronsku ili galakturonsku). Uz ove polisaharide, prisutni su i sledeći proteini u malim količinama: hidrokisprolin, leucin, prolin i serin. Funkcionalna svojstva arapske gume pretežno zavise od pomenute proteinske frakcije (McNamee et al., 1998). Glavni lanac u strukturi formiran je od jedinica β -D-galaktopiranoze povezanih $\beta(1\rightarrow3)$ glikozidnim vezama, za koje su $\beta(1\rightarrow6)$ glikozidnim vezama zakačeni bočni lanci koji sadrže različite kombinacije arabinofuranoze, galaktopiranoze, ramnopiranoze i uronske kiseline, što čini strukturu ovog molekula veoma razgranatom (Prasad et al., 2022).

Boja praha arapske gume može varirati od bele do braonkaste boje. Zahvaljujući niskom viskozitetu u poređenju sa drugim gumama, dobroj sposobnosti emulgovanja u vodenim rastvorima, netoksičnosti, visokoj rastvorljivosti u vodi, kao i odsustvu mirisa i ukusa, arapska guma koristi se kao nosač za inkapsulaciju aktivnih jedinjenja već dugi niz godina (Šturm et al., 2019). To je najčešće korišćeni nosač koji se primenjuje u tehnici inkapsulacije aktivnih jedinjenja sprej sušenjem. Međutim, zbog toga što se proizvodi u oblastima koje su podložne nepredvidivim klimatskim varijacijama i političkim turbulencijama, koje mogu da otežaju nabavku ovog nosača, kao i zbog njegove cene, poslednjih godina postoji sve veća tendencija kombinovanja arapske gume sa drugim nosačima za inkapsulaciju, što je u velikom broju slučajeva rezultiralo poželjnijim karakteristikama dobijenih inkapsulata (McNamee et al., 1998).

2.2.4. Inkapsulacija sokova različitih biljnih vrsta

Uzimajući u obzir da sokovi različitih biljnih vrsta obiluju brojnim bioaktivnim komponentama, njihova primena u prehrambenim proizvodima u cilju odlaganja oksidacije, sprečavanja negativnog uticaja mikroorganizama ili povećanja nutritivne vrednosti proizvoda mogla bi biti veoma značajna. Međutim, visok sadržaj vode i enzimaska aktivnost svežih sokova dovode do transformacije bioaktivnih komponenata u druga jedinjenja sa manje poželjnim nutritivnim i senzornim karakteristikama, što ograničava njihovu primenu u prehrambenim proizvodima. Osim toga, sokove je poželjno prevesti u povoljniji oblik za dodavanje u prehrambene proizvode, kako bi senzorni zahtevi potrošača bili zadovoljeni. Stoga je inkapsulacija, kao efikasan pristup očuvanja bioaktivnih komponenata biljnih sokova i postizanja željenih karakteristika, veoma aktuelna tema među istraživačima poslednjih decenija (Tabela 2.2). Velika raznolikost tehnika i nosača za inkapsulaciju dovela je do proizvodnje inkapsulata izuzetnog kvaliteta i velikog potencijala primene u različitim prehrambenim proizvodima.

Tabela 2.2. Pregled dostupne literature o primerima inkapsulacije biljnih sokova primenom različitih inkapsulacionih tehnika i nosača

Biljna vrsta	Nosač	Tehnika inkapsulacije	Referenca
Malina	Maltodekstrin Arapska guma Voštani skrob	Liofilizacija	Nthimole et al. (2022)
Banana	Maltodekstrin	Sprej sušenje	Chávez-Rodríguez et al. (2013)
Amazonaska borovnica	Maltodekstrin	Liofilizacija	Mar et al. (2020)
Acerola (divlja višnja)	Maltodekstrin Arapska guma	Sprej sušenje	Righetto et al. (2006)
Peruanska zlatna bobica	Maltodekstrin Maltodekstrin/arapska guma Maltodekstrin/alginat Maltodekstrin/pektin	Liofilizacija	Dag et al. (2017)
Azijska kruška	Maltodekstrin	Sprej sušenje	Lee et al. (2017)
Nar	Maltodekstrin Proteini soje	Sprej sušenje	Robert et al. (2010)
Maraska (kisela višnja)	Maltodekstrin	Sprej sušenje	Elez Garofulić et al. (2017)
Aronija Kupina Dren	Alginat	Geliranje	Ivanova et al. (2018)
Jabuka indijskog oraha	Hitozan/proteini surutke	Sprej sušenje	Bastos et al. (2012)
Andska borovnica	Maltodekstrin Arapska guma	Liofilizacija	Estupiñan-Amaya et al. (2022)
Limun	Maltodekstrin	Sprej sušenje	Rohini et al. (2024)
Gorka dinja	Maltodekstrin Arapska guma Pektin citrusa Izolati sojinih proteina	Sprej sušenje	Wang et al. (2021)
Marakuja	Natrijum-oktenil-sukcinat derivat skroba	Sprej sušenje	Borrmann et al. (2013)
Cvekla	Izolati sojinih proteina	Liofilizacija	Tumbas Šaponjac et al. (2020)
Brokoli	Maltodekstrin	Sprej sušenje	Saavedra-Leos et al. (2021)
Ren	Maltodekstrin Arapska guma Izolati sojinih proteina Skrob	Sprej sušenje	Tomsone et al. (2020b)
Crna mrkva	Maltodekstrin Arapska guma Tapioka skrob	Sprej sušenje Liofilizacija	Murali et al. (2015)
Crvena paprika	Maltodekstrin Arapska guma Izolati sojinih proteina Blende ovih nosača	Sprej sušenje	Çalışkan Koç (2021)

Brojne studije izvestile su o inkapsulaciji prirodnih antioksidanasa sprej sušenjem i njihovoj primeni u sprečavanju oksidacije prehrambenih proizvoda bogatih uljima (Sánchez et al., 2016; Fenoglio et al., 2021; Rahmani-Manglano et al., 2024). Međutim, prema dostupnoj literaturi, ne postoje

prijavljene studije o implementaciji inkapsuliranih biljnih sokova u majonez u cilju odlaganja oksidativnih promena i očuvanja kvaliteta ovog proizvoda tokom skladištenja.

2.3. MAJONEZ

Uprkos sve većoj tendenciji potrošača za proizvodima nižeg kalorijskog unosa, majonez je i dalje jedan od najčešće konzumiranih proizvoda širom sveta (Mirzanajafi-Zanjani et al., 2019). Specifičan blag ukus, privlačna tekstura i kremasti osećaj koji se stvara u ustima prilikom konzumacije, čine ga veoma popularnim proizvodom koji se služi na trpezama širom sveta, najčešće uz salate, sendviče i mnoge druge prehrambene proizvode (Smith and Hui, 2008). Majonez se priprema vekovima unazad, a smatra se da je prvi put komercijalno proizveden početkom 20. veka (Depree and Savage, 2001). U fizičkom smislu, predstavlja emulziju ulja u vodi, uprkos tome što sadrži više od 75% ulja. Zbog ovog specifičnog odnosa sadržaja ulja i vode u formulaciji majoneza, njegova struktura može se lako narušiti (Smith and Hui, 2008). Naime, kapljice ulja dispergovane su u vodenom rastvoru sirćetne kiseline ili limunovog soka, uz pomoć prirodnih emulgatora, kao što su proteini i fosfolipidi iz žumanca jajeta (Mirzanajafi-Zanjani et al., 2019). Prema tome, kvalitet ovog prehrambenog proizvoda na bazi emulzije određen je njegovom mikrostrukturom i međusobnom interakcijom sastojaka koji ulaze u njegov sastav (Smith and Hui, 2008).

2.3.1. Sirovine i njihova uloga

Majonez se proizvodi korišćenjem sledećih sastojaka: biljnog ulja, žumanca jajeta, sirćeta ili limunovog soka, soli, šećera, vode i drugih opcionih sastojaka (začina, zgušnjivača, stabilizatora, antioksidanasa, konzervanasa i inhibitora stvaranja neželjenih kristala) (Mirzanajafi-Zanjani et al., 2019). Svaki od ovih sastojaka, u zavisnosti od koncentracije i kvaliteta, određuje karakteristike formirane emulzije (Taslikh et al., 2021). Stoga su u nastavku disertacije razmotrene karakteristike i uloga svakog pojedinačnog sastojka koji se koristi u proizvodnji majoneza.

Ulje je osnovni, kvantitativno dominantni sastojak majoneza, koji ima važnu ulogu u postizanju njegove karakteristične teksture i ukusa. U proizvodnji majoneza koriste se isključivo ulja biljnog porekla. Ona se dobijaju iz semena ili plodova uljarica metodama presovanja ili ekstrakcije. S obzirom na to su biljna ulja sastojak koji je zastupljen u najvećem procentu u sastavu majoneza (minimum 75%), veoma značajno je da budu visokog kvaliteta, što podrazumeva nizak sadržaj peroksida i slobodnih masnih kiselina (Smith and Hui, 2008). Ne postoji strogo propisana vrsta biljnog ulja koja se koristi u proizvodnji majoneza, već izbor ulja pretežno zavisi od njegovih fizičko-hemijskih karakteristika. U proizvodnji majoneza najčešće se koriste suncokretovo, sojino, repičino i maslinovo ulje, zatim kukuruzno i ulje semena pamuka, dok se retko koriste ulja sa visokim sadržajem zasićenih masnih kiselina, kao što su palmino ili ulje kikirikija, jer očvršćavaju na temperaturi frižidera i mogu dovesti do destabilizacije emulzije (Depree and Savage, 2001). U cilju postizanja senzornog kvaliteta majoneza, najčešće se koriste rafinisana, neutralna ulja, osim ukoliko se žele postići određena nutritivna svojstva ili specifičan ukus ovog proizvoda (Smith and Hui, 2008). Još jedan važan kriterijum kvaliteta je sastav masnih kiselina u ulju. Kao što je prethodno rečeno, u proizvodnji majoneza poželjno je koristiti ulja koja u svom sastavu većinski sadrže nezasićene masne kiseline. Međutim, ovakva ulja podložna su oksidativnim promenama do kojih dolazi autooksidacijom nezasićenih masnih kiselina, što negativno utiče na kvalitet i senzornu prihvatljivost proizvoda (Smith and Hui, 2008). Zahvaljujući visokom sadržaju ulja i kiseloj sredini, majonez nije povoljan matriks za rast i razvoj mikroorganizama. Ipak, prethodno spomenut problem oksidacije predstavlja glavni izazov u očuvanju kvaliteta ovog proizvoda tokom skladištenja (Mirzanajafi-Zanjani et al., 2019).

Ulje ima pozitivan uticaj na reološke i senzorne karakteristike proizvedenog majoneza. Doprinosi ukusu, teksturi, kremastosti, izgledu i roku trajanja majoneza. Osim toga, kompleksan reološki fenomen karakterističnog osećaja u ustima koji se stvara tokom konzumiranja ovog proizvoda potiče upravo od ulja prisutnog u njegovom sastavu (Mirzanajafi-Zanjani et al., 2019). Ipak, zbog izuzetno visokog sadržaja ulja, postoji zabrinutost među potrošačima zbog negativnih uticaja prekomerne konzumacije masne hrane. To je dovelo do trenda u prehrambenoj industriji ka proizvodnji majoneza sa smanjenim sadržajem ulja (Taslikh et al., 2021). Osim toga, to bi uticalo na cenu proizvoda, jer ulje zbog obima zastupljenosti u najvećoj meri doprinosi ukupnoj ceni proizvoda (Smith and Hui, 2008). Međutim, eliminacija ulja značajno utiče na senzorna i fizičko-hemijska svojstva majoneza. Naime, smanjenje njegovog sadržaja bi rezultiralo povećanjem sadržaja vodene faze, kao i smanjenjem čvrstoće i viskoziteta emulzije. Kako bi se postigla zadovoljavajuća stabilnost emulzije, bilo bi neophodno dodavati aditive u majonez ili uticati na smanjenje dimenzija kapljica ulja primenom intenzivnije homogenizacije (Mirzanajafi-Zanjani et al., 2019).

Žumance ima visok emulgujući potencijal, koji je povezan sa lipoproteinima niske gustine (engl. *LDL, low density lipoproteins*), lipoproteinima visoke gustine (engl. *HDL, high density lipoproteins*), fosfolipidima (lecitin) i nevezanim proteinima (fosvitin i livetin) prisutnim u njegovom sastavu (Mirzanajafi-Zanjani et al., 2019). Ove komponente imaju sposobnost da se adsorbuju na međufaznoj površini ulje/voda i stabilizuju emulziju majoneza (Taslikh et al., 2021). Ograničenja upotrebe žumanca su mogućnost kontaminacije *Salmonella* vrstama, cena, kao i visok sadržaj holesterola (Mirzanajafi-Zanjani et al., 2019). Jedan od pristupa za rešenje ovih izazova je upotreba biljnih proteina kao emulgatora u majonezu umesto žumanca (Mirzanajafi-Zanjani et al., 2019). Međutim, uprkos zabrinutosti u vezi sa sadržajem holesterola, žumance je i dalje najčešće korišćeno i ključno sredstvo za postizanje emulzije majoneza zahvaljujući izvanrednim emulgujućim karakteristikama. Odvijanje biohemijskih reakcija i mikrobiološka aktivnost uslovljavaju čuvanje tečnog žumanca samo određeni period. Stoga se ono često zamenjuje smrznutim ili sušenim žumancem, povrh toga što navedeni načini konzervisanja mogu negativno uticati na strukturu i emulgujuća svojstva žumanca (Depree and Savage, 2001). Osim toga, u cilju sprečavanja kontaminacije majoneza *Salmonella* vrstama, žumance se može pasterizovati, što ne bi trebalo da utiče na njegova svojstva emulgovanja (Smith and Hui, 2008). Pored uticaja na viskozitet i stabilnost emulzije, žumance predstavlja primarni izvor žute boje majoneza.

Sirće ili limunov sok imaju najvažniju ulogu u regulaciji pH vrednosti majoneza. Osim što doprinose kiselosti i osvežavajućem ukusu, imaju ulogu i u stabilizaciji emulzije. Odnos žumanca i sredstva za zakiseljavanje (npr. sirćetna ili limunska kiselina) je ključni faktor koji određuje pH vrednost majoneza. Sveže žumance ima pH vrednost oko 6,0, koja se progresivno povećava na 6,4-6,9, u zavisnosti od temperature i dužine perioda skladištenja. S druge strane, pH vrednost sirćetne kiseline je oko 2,8 (Taslikh et al., 2021). Stabilnost i viskozoelastičnost majoneza bili bi na maksimumu kada bi pH vrednost dostigla izoelektričnu tačku proteina žumanca, čime bi se smanjio površinski naboj proteina. Kapljice ulja majoneza su pozitivno naelektrisanje zbog sastava proteina, kao i pH vrednosti sredine (<4,2 za majonez). Dokazano je da kapljice koje sadrže negativno naelektrisanje imaju tendenciju da adsorbuju jone metala sa pozitivnim naelektrisanjem, što može da podstakne razvoj oksidacije lipida. Pored toga, niska pH vrednost razbija jonske mostove između fosvitina i gvožđa. Osim toga, joni gvožđa su rastvorljivi pri niskim pH vrednostima, te stoga smanjenje pH vrednosti takođe može dovesti do povećane dostupnosti jona gvožđa u majonezu, što je važno sa oksidacione tačke gledišta (Mirzanajafi-Zanjani et al., 2019). Sa stanovišta bezbednosti, ako je sirćetna kiselina u

disociranom obliku, ona se rastvara u uljnoj fazi i prema tome nema antimikrobnu aktivnost (Taslikh et al., 2021). Stoga je najmanje 60 ml sirćeta po svežem celom jajetu, 40 ml po svežem belancetu ili 20 ml po svežem žumanču (6% v/v sirćetne kiseline) potrebno za proizvodnju majoneza u kojem ne mogu preživeti *Salmonella* vrste (Mirzanajafi-Zanjani et al., 2019).

So doprinosi ukusu majoneza, a osim toga može uticati na strukturu majoneza na više načina. Pomaže u raspršivanju žumanca i povećanju dostupnosti površinski aktivnih jedinjenja. Zatim, so neutrališe naelektrisanje proteina, tako da se proteini mogu lako adsorbovati na površinu kapljica ulja. Osim toga, obezbeđuje blizinu kapljica ulja, čime jačaju međusobne interakcije (Mirzanajafi-Zanjani et al., 2019). Ovi doprinosi pomažu u stabilizaciji emulzije, čak i ako se pH vrednost majoneza razlikuje od izoelektrične tačke proteina žumanca (Smith and Hui, 2008). Konačno, so modifikuje hidrofobne interakcije između nepolarnih amino-kiselina, menjajući strukturni raspored molekula vode na međufazi ulja i vode (Taslikh et al., 2021). Međutim, prekomerna količina soli može izazvati agregaciju proteina žumanca u vodenoj fazi, a ne na površini kapljice ulja, što negativno utiče na stabilnost emulzije (Depree and Savage, 2001; Smith and Hui, 2008).

Opcioni sastojci u formulaciji majoneza uključuju: saharozu, začine (senf, biber, korijander i beli luk), pojačivače ukusa (mononatrijum-glutaminat), konzervanse (sorbinska i bezojeva kiselina i njihove soli), zgušnjivače i stabilizatore (karagenan, ksantan guma, alginat, guar guma, arapska guma, pektini, modifikovani škrob, itd). Prema Pravilniku o kvalitetu, u proizvodnji majoneza, osim sirćetne i limunske kiseline, mogu se koristiti i vinska, jabučna i mlečna kiselina, kao i njihove soli. Za sprečavanje oksidacije majoneza mogu se dodavati prirodni antioksidansi: α -tokoferol, L-askorbinska kiselina i njene soli ili sintetički antioksidansi: etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), butilhidroksianizol (BHA) i butilhidroksitoluen (BHT). Navedene sintetičke antioksidanse odlikuje visoka stabilnost, niska cena, dostupnost i dobra aktivnost uklanjanja slobodnih radikala (Xu et al., 2021), zahvaljujući čemu su se pokazali efikasnim u sprečavanju oksidacije majoneza. Međutim, zbog njihovih potencijalno toksičnih uticaja i rizika po ljudsko zdravlje, kao što su: problemi sa gastrointestinalnim traktom, kožne alergije, akumuliranje u masnom tkivu, zamašćenje jetre i kancerogeneza (Ogundele, 1999; Eskandani et al., 2014; Celus et al., 2020; Xu et al., 2021; Moradi et al., 2023), postoji sve veća potražnja potrošača za upotrebom antioksidanasa iz prirodnih izvora (Kwon et al., 2015; Mitterer-Daltoé et al., 2020; Minasian et al., 2024).

2.3.2. Tehnološki postupak proizvodnje

Iako se sastoji od relativno malo sastojaka i koraka obrade, postizanje uspešne formulacije majoneza zahteva razumevanje uloge svakog sastojka i kritičnih koraka obrade u stvaranju delikatne homogene strukture. Ipak, iako postoji razumevanje pojedinačnih faktora, njihove međusobne veze i varijabilnosti koje ih okružuju nisu do kraja poznate (Smith and Hui, 2008). Primarnu ulogu u samom postupku proizvodnje imaju homogenizatori, pomoću kojih se raspršuje ulje u fine kapljice i formira emulzija. Male šarže mogu se proizvesti pomoću miksera manjih dimenzija i kapaciteta, međutim, za komercijalnu proizvodnju majoneza koriste se koloidni mlinovi i drugi kontinualni homogenizatori. Oprema koja se koristi za proizvodnju majoneza mora biti od nerđajućeg čelika, da ne bi došlo do korozije običnog čelika i aluminijuma u prisustvu sirćetne kiseline.



Slika 2.12. Šematski prikaz tehnološkog postupka proizvodnje majoneza

Kao što se može videti na Slici 2.12, postupak proizvodnje majoneza započinje mešanjem vode (oko 1/3 ukupne vodene faze), soli, šećera i začina kako bi se dobila pasta. Potom se dodaje žumance i homogenizuje se malom brzinom. Dodavanje žumanca u vodenu fazu je važno kako bi mu se omogućilo da ispolji niska hidrofilna svojstva kada se doda ulje, što će sprečiti faznu inverziju emulzije. Postepeno dodavanje sirćeta doprinosi boljem viskozitetu proizvoda nego što se postiže dodavanjem celokupne količine sirćeta na početku postupka. Kada se ulje i sirće dodaju istovremeno, formira se emulzija vode u ulju sa viskozitetom sličnim viskozitetu ulja od kojeg je napravljena. Suprotno tome, ukoliko se sirće dodaje postepeno, formiraju se male kapljice ulja, što rezultira stabilnijom emulzijom. Ulje se u početku polako dodaje u tankom mlazu, pri čemu dolazi do formiranja velikih emulgovanih čestica ulja. Brzina dodavanja ulja postepeno se povećava, a dispergovane kapljice postaju manje i majonez postaje viskozniji. Jedan deo sirćeta dodaje se pri kraju, između dodavanja dva dela ulja (Smith and Hui, 2008).

Pomešani sastojci se upumpavaju u koloidni mlin, tj. mehanički uređaj sa rotorom velike brzine (3600 o/min) i fiksnim statorom. Veličina otvora mlina direktno utiče na veličinu kapljica ulja. Najefikasniji otvor je otvor mlina minimalnih dimenzija koji neće dovesti do destabilizacije emulzije. Propuštanjem smeše sastojaka kroz otvore mlina, formiraju se kapljice ulja i dolazi do nastanka očekivane teksture komercijalnog majoneza, koja doprinosi posebnom osećaju majoneza u ustima (Depree and Savage, 2001). Prečnik raspršenih kapljica ulja može varirati od 2 μm , kod izuzetno finih emulzija, do 10 μm ili više, kod manje kvalitetnih majoneza.

Formirana, ali još uvek relativno tečna emulzija brzo se upumpava u odgovarajuće kontejnere, u kojima se nakon nekog vremena prevodi u karakterističnu konzistenciju polučvrstog gela majoneza. Pri izboru ambalaže za pakovanje majoneza treba uzeti u obzir zahteve potrošača, troškove materijala i distribucije, kao i rok trajanja proizvoda. Ambalaža ima ključnu ulogu u očuvanju svežine i trajnosti proizvoda, jer štiti proizvod od spoljašnjih uticaja, kao što su: svetlost, vlaga, kiseonik i dejstvo mikroorganizama. Maloprodajnu ambalažu u koju se majonez pakuje čine staklenke, aluminijumske tube, višeslojna polimerna ambalaža i plastične boce. Veleprodajna ambalaža može se kretati od jedne porcije (1 supena kašika) do ambalaže od jednog do pet galona. Staklo nudi veću zaštitu od kiseonika što obezbeđuje bolju zaštitu proizvoda od oksidacije, zahvaljujući čemu ima prednost u odnosu na plastičnu ambalažu. Prilikom punjenja majoneza u ambalažu, preporučuje se da prazan prostor u posudi iznad proizvoda bude minimalan, kako bi se u što većoj meri spečila oksidacija majoneza (Smith and Hui, 2008).

Osim klasičnog, kontinualnog postupka proizvodnje majoneza korišćenjem homogenizatora ili koloidnih mlinova, koji se najčešće koristi u industrijskim pogonima, postoji i drugi način proizvodnje majoneza u vakuumu. Vakuum postupkom dobija se proizvod visokog kvaliteta, jer se isključuje prisustvo vazduha, a emulgovanje u vakuumu daje čestice manjeg promera. Homogenizacijom i raspršivanjem u vakuumu dobijaju se fine kapljice ulja sa ravnomernom raspodelom i prečnikom čak i manjim od 2 μm . Osim ove prednosti, odsustvom vazduha je mogućnost mikrobiološke kontaminacije i oksidacije ulja svedena na minimum. Ipak, glavni nedostatak ovog postupka je visoka cena uređaja i veliki zahtevi za energijom potrebnom za postizanje vakuuma.

2.3.3. Tipovi kvarenja i načini prevencije

Tokom vremena je razumevanje fizičkih i hemijskih procesa uključenih u formiranje i stabilizaciju emulzije rezultiralo poboljšanom stabilnošću majoneza i rokom trajanja koji se meri mesecima umesto nedeljama (Depree and Savage, 2001). Primarni problemi gubitka kvaliteta majoneza tokom skladištenja povezani su sa stabilnošću emulzije i kvalitetom ulja. Iako se majonez može čuvati na sobnoj temperaturi, kvalitet ovog proizvoda tokom vremena može značajno opasti, zbog čega se svrstava u kategoriju relativno lako kvarljivih proizvoda (Smith and Hui, 2008).

Osnovne vrste kvara majoneza su:

- fizičko-mehanička destabilizacija;
- mikrobiološka kontaminacija; i
- oksidativna degradacija.

Jedan od prvih znakova starenja i gubitka kvaliteta proizvoda je narušavanje njegovih teksturnih svojstava. Do razdvajanja faza majoneza može doći pri izlaganju ovog proizvoda niskim temperaturama skladištenja. Osim toga, potresi pri skladištenju i loša homogenizacija mogu dovesti do „pucanja“ emulzije i smanjenja viskoziteta majoneza. Naime, usled vibracija tokom transporta majoneza dolazi do istiskivanja mehurića vazduha iz emulzije, a kao posledica toga dolazi do separacije vode iz emulzije. Ovaj problem se može prevazići primenom stabilizatora (najčešće biljnih guma). Brzo dodavanje ulja, neregulisano i prekomerno mešanje tokom emulgovanja i visoke temperature skladištenja takođe mogu doprineti destabilizaciji emulzije (Smith and Hui, 2008). Stabilnost emulzije može se proceniti skladištenjem na povišenim temperaturama, procenom otpornosti na centrifugiranje ili merenjem stepena kremastosti majoneza nakon 24 sata (Depree and Savage, 2001). Osim toga, merenje teksture ili konzistencije majoneza, korišćenjem viskozimetra sa

ponderisanim, perforiranim klipom, još jedan je parametar procene kvaliteta majoneza. Međutim, iako ove metode ukazuju na relativnu stabilnost majoneza, one ne daju potpun opis atributa teksture majoneza i nisu u korelaciji sa realnim vremenom skladištenja. Stoga se upotreba složenijih analitičkih alata, kao što je analiza profila teksture, može koristiti za pružanje potpunije procene teksture majoneza.

Na mikrobiološku kontaminaciju majoneza najveći uticaj ima početni sadržaj mikroorganizama u sirovinama koje se koriste za njegovu proizvodnju. Među njima, sveže žumance se izdvaja kao potencijalno najrizičniji uzročnik mikrobiološkog kvarenja majoneza. Ono može sadržati različite grupe mikroorganizama (bakterije, kvasce i plesni). Međutim, najznačanije je potencijalno prisustvo patogenih mikroorganizama, kao što su *Salmonella* vrste. Zbog toga se, u cilju preveniranja kontaminacije ovim vrstama, za proizvodnju majoneza koriste pasterizovana ili sušena žumanca. Osim toga, pasterizovanom žumancu se može dodavati so, kako bi se smanjila a_w vrednost majoneza i time obezbedila dodatna otpornost na mikrobiološko kvarenje. Osim žumanca, senf i drugi začini takođe predstavljaju značajan rizik. Stoga se u proizvodnji majoneza često koriste sterilizovani ekstrakti začina ili se vrši termička obrada začina kako bi se suzbili prisutni mikroorganizmi (Smith and Hui, 2008). So ima zaštitni efekat, jer utiče na smanjenje aktivnosti vode majoneza i time doprinosi efektu konzervisanja, dok šećer može biti uzročnik fermentacije. Biljno ulje i sirće nisu pogodni medijumi za razvijanje mikroorganizama, stoga ove sirovine ne predstavljaju rizik od mikrobiološke kontaminacije majoneza (Depree and Savage, 2001). Usled izuzetno niske koncentracije vode koja je neophodna za razvoj mikroorganizama, može se reći da je ulje relativno bezbedno u pogledu mikrobiološkog kvarenja. Takođe, sirće, tačnije sirćetna kiselina prisutna u njemu, ispoljava antimikrobna svojstva i čini primarni konzervans protiv mikrobiološkog kvarenja majoneza. U pH opsegu majoneza (3,6-4,0), sirćetna kiselina postoji prvenstveno u nedisosovanom obliku, ispoljavajući maksimalnu antimikrobnu aktivnost. Ona predstavlja jači antimikrobni agens od limunske kiseline, primarnog sredstva za zakiseljavanje u limunovom soku. Dakle, osim početnog broja mikroorganizama prisutnih u sirovinama za proizvodnju majoneza, faktori kao što su pH vrednost, temperatura i period skladištenja takođe utiču na mikrobiološku kontaminaciju majoneza (Mirzanajafi-Zanjani et al., 2019). Visoka temperatura skladištenja, osim što može destabilizovati emulziju, može dovesti i do mikrobiološkog kvarenja i rizika po bezbednost proizvoda. Iako se majonez može čuvati na sobnoj temperaturi, preporučuje se transportovanje i skladištenje majoneza na temperaturi frižidera (oko 5 °C), kako bi se usporilo razmnožavanje mikroorganizama i očuvao kvalitet proizvoda. S obzirom na to da majonez ne podleže termičkoj obradi, neophodno je obezbediti maksimalno sterilne uslove tokom tehnološkog postupka proizvodnje. Većina patogenih bakterija kao što su *Escherichia coli*, *Lysteria monocytogenes*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica* i *Staphylococcus aureus* se uništavaju prilikom inokulacije u majonez. Međutim, kvasci, plesni i laktobacili mogu da rastu u majonezu i utiču na njegov rok trajanja i bezbednost (Smith and Hui, 2008). Za kontrolu rasta mikroorganizama, kao konzervansi u majonezu primenjuju se organske kiseline: sorbinska kiselina, benzoeva kiselina ili kombinacija ovih kiselina. Maksimalno dozvoljene koncentracije sorbinske i benzoeve kiseline su 1 g/kg majoneza pojedinačno ili u kombinaciji.

Iako može predstavljati veliki problem prilikom proizvodnje majoneza, mikrobiološka kontaminacija je sekundarni uzročnik kvarenja majoneza u odnosu na oksidativnu užeglost (Smith and Hui, 2008). Kao i u slučaju svih namirnica koje imaju visok sadržaj ulja, majonez je podložan kvarenju usled autooksidacije nezasićenih masnih kiselina koje ulaze u sastav triacilglicerola (TAG) biljnih ulja (Ghorbani Gorji et al., 2016). Naime, zbog sastava, strukture i sadržaja biljnih ulja u majonezu (oko 70-

80%), ovaj proizvod je veoma podložan oksidativnim oštećenjima. Kao posledica autooksidacije dolazi do nastanka užeglog ukusa i smanjenja nutritivne vrednosti i roka trajanja majoneza (Blejan and Nour, 2023). Od udela pojedinih masnih kiselina u sastavu TAG, posebno broja i položaja dvostrukih veza, zavisi njihova podložnost oksidaciji. Biljna ulja/masti sa većim udelom zasićenih masnih kiselina su manje podložna oksidaciji. Međutim, ona se ne koriste u proizvodnji majoneza, jer ne pružaju karakteristična fizička i senzorna svojstva. Osim toga, uključivanjem biljnih ulja sa višim sadržajem polinezasićenih masnih kiselina u majonez postiže se povećanje nutritivne vrednosti majoneza, ali i smanjena stabilnost usled prisustva dvostrukih veza (Ghorbani Gorji et al., 2016). Oksidativna užeglost se može javiti na površini ili u unutrašnjosti majoneza, a najčešće na međufaznoj površini između ulja i vode. Naime, dispergovanjem finih uljanih kapljica u cilju postizanja emulzije, veliki deo ulja postaje izložen vodenoj fazi. Kiseonik rastvoren u vodenoj fazi i mehurići vazduha uneti tokom homogenizacije i zarobljeni unutar emulzije doprinose velikoj verovatnoći odvijanja oksidativnih reakcija u majonezu (Moradi et al., 2023). Slobodni radikali reaguju sa molekularnim kiseonikom i formiraju peroksidne radikale (primarne proizvode oksidacije). Peroksidni radikali mogu da propagiraju dodatne slobodno-radikalske reakcije ili se dalje razlažu na aldehide, ketone, alkohole i isparljive organske kiseline (sekundarne proizvode oksidacije) (Ghorbani Gorji et al., 2016; Minasian et al., 2024). Upravo ovi sekundarni produkti oksidacije su nosioci neprijatnog ukusa i mirisa na „užeglo“, koji je karakterističan za pokvareni majonez (Smith and Hui, 2008).

Metali, svetlost i biljni pigmenti deluju kao katalizatori oksidacije. U prisustvu čak i malih koncentracija prelaznih metala u majonezu, oksidacija se može intenzivirati. Gvožđe i bakar su poznati pokretači oksidacije lipida. Kiselina prisutna u majonezu rastvara gvožđe, zbog čega je važno da oprema koja se koristi za proizvodnju ovog proizvoda bude od nerđajućeg čelika (Smith and Hui, 2008). Prisustvo metala u majonezu ne samo da može biti pokretač oksidativnih promena, već i smanjuje nutritivnu vrednost sastojaka prisutnih u njegovom sastavu. Stoga je značajno da se obezbede odgovarajući uslovi i mere predostrožnosti kako bi se smanjio rizik od negativnog uticaja metala na kvalitet majoneza (Ghorbani Gorji et al., 2016). Do oksidacije lipida, uzrokovane prisustvom svetlosti (fotooksidacija), može doći usled izlaganja lipida UV zračenju ili vidljivoj svetlosti u prisustvu fotosenzibilizatora. Fotosenzibilizatori mogu biti pigmenti prirodno prisutni u hrani, kao što su riboflavin, hlorofili i karotenoidi, zahvaljujući sistemu konjugovanih dvostrukih veza u njihovoj strukturi (Smith and Hui, 2008; Ghorbani Gorji et al., 2016). Svetlosna energija na talasnim dužinama od 365 nm podstiče oksidaciju i promenu boje majoneza, dok talasne dužine iznad 470 nm ne ispoljavaju ovaj efekat (Depree and Savage, 2001). Stoga je važno zaštititi majonez od talasnih dužina kraćih od 470 nm. Ambalažni materijali koji blokiraju talasne dužine u UV delu spektra i opsegu od 410-450 nm mogu pomoći u odlaganju oksidacije majoneza (Smith and Hui, 2008). Osim uticaja navedenih katalizatora, oksidacija majoneza se intenzivira na povišenim temperaturama skladištenja majoneza, što je u saglasnosti sa teorijom oksidacije lipida. Takođe, pH vrednost majoneza (pH~4) može imati snažan prooksidativni efekat na majonez, jer dovodi do narušavanja mostova između proteina žumanca (lipoproteina niske gustine, lipovitelina i fosvitina) i gvožđa. Nakon toga, gvožđe se oslobađa iz žumanca jajeta i postaje dostupnije kao inicijator oksidacije (Ghorbani Gorji et al., 2016).

S obzirom na to da oksidacija ulja u majonezu dovodi do razvoja potencijalno toksičnih proizvoda reakcije, nepoželjnih senzornih karakteristika i posledično smanjenog roka trajanja majoneza, razvijene su različite strategije za prevenciju oksidacije, kao što su eliminisanje faktora koji je podstiču i korišćenje antioksidanasa (Smith and Hui, 2008). Neki od načina usporavanja oksidacije ulja su smanjenje koncentracije kiseonika u hrani (pakovanjem pod vakuumom ili azotom i

korišćenjem materijala za pakovanje sa dobrim barijernim svojstvima za kiseonik) i snižavanje temperature skladištenja. Međutim, eliminisanje kiseonika u prehrambenom proizvodu je veliki izazov, tako da je jedan od najčešće primenjivanih načina za suzbijanje oksidacije ulja u majonezu upotreba antioksidanasa (Ghorbani Gorji et al., 2016). Ranije pomenuti sintetički antioksidansi (EDTA, BHA i BHT) pokazali su se efikasnim u sprečavanju oksidacije majoneza i široko se koriste u komercijalnoj, industrijskoj proizvodnji ovog proizvoda (Ahmadi-Dastgerdi et al., 2019; Chotphruethipong and Benjakul, 2019). Međutim, iako su ekonomičniji i stabilniji od prirodnih antioksidanasa, ovi antioksidansi stvorili su negativan utisak kod potrošača zbog svojih potencijalno toksičnih i kancerogenih efekata kada se koriste u visokim koncentracijama (Ogundele, 1999; Eskandani et al., 2014; Xu et al., 2021). Pored toga, postoji sve veća potražnja kupaca za zamenu hemijskih sastojaka komponentama prirodnog porekla. Stoga primena prirodnih antioksidanasa u prehrambenim proizvodima ima veliki potencijal za poboljšanje njihove oksidativne stabilnosti i zadovoljenje zahteva široke grupe potrošača. Dodavanjem različitih začina (Kwon et al., 2015), klica susama (Shabbir et al., 2015), esencijalnog ulja kumina (Ozdemir et al., 2018) i majčine dušice (Ahmadi-Dastgerdi et al., 2022), ekstrakta ruzmarina (Savani et al., 2023) i šipurka (Soltan et al., 2023) u majonez efikasno je odložena oksidacija i time produžen rok trajanja ovog proizvoda. Nedavne studije su objavile da majonezi obogaćeni inkapsuliranim limunovim sokom (Shaygannia et al., 2021), esencijalnim uljem *Cuminum cyminum* L. (Moradi et al., 2023) i ekstraktom belog luka (Hassanzadeh et al., 2023) imaju poboljšanu oksidativnu stabilnost, antimikrobna svojstva i senzorne karakteristike. Međutim, do sada nisu objavljena istraživanja o dodavanju korena i lista rena u majonez i ispitivanju njihovog uticaja na oksidativnu stabilnost i kvalitet majoneza tokom skladištenja. Stoga je ova disertacija jedna od prvih studija koja promovise karakterizaciju i valorizaciju ovih prirodnih antioksidanasa u prehrambenoj industriji.

3. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Osnovni ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije su:

- Dobijanje i karakterizacija sokova i tropova korena i lista rena u pogledu sadržaja bioaktivnih jedinjenja i utvrđivanja antioksidativnog kapaciteta;
- Ispitivanje uticaja postupka inkapsulacije unutar različitih polisaharidnih nosača tehnikom sprej sušenja na očuvanje bioaktivnog potencijala sokova korena i lista rena, kao i fizičko-hemijska, morfološka, strukturna, spektrofotometrijska i hromatografska karakterizacija dobijenih inkapsulata;
- Ispitivanje uticaja postupka liofilizacije na očuvanje bioaktivnog potencijala tropova korena i lista rena, kao i spektrofotometrijska i hromatografska karakterizacija dobijenih liofilizata;
- Implementacija inkapsulata i liofilizata rena u prehrambeni proizvod (majonez) i ispitivanje njihovog uticaja na očuvanje oksidativne stabilnosti i kvaliteta majoneza tokom skladištenja, kao i uticaja na senzorni profil i prihvatljivost ovog proizvoda od strane potrošača.

Osnovne hipoteze od kojih se polazi u istraživanju

Osnovna hipoteza ovog istraživanja je da će dodavanje inkapsulata sokova i liofilizata tropova korena i lista rena u prehrambeni proizvod (majonez) uticati na karakteristike ovog proizvoda u pogledu oksidativne stabilnosti, kvaliteta i senzornih svojstava.

Posebne hipoteze su:

- Pretpostavka da sokovi korena i lista rena sadrže značajne količine fenolnih jedinjenja i pokazuju izraženo antioksidativno delovanje;
- Pretpostavka da tropovi korena i lista rena sadrže značajne količine fenolnih jedinjenja i pokazuju izraženo antioksidativno delovanje;
- Pretpostavka da je kombinacija etanola i vode pogodno sredstvo za ekstrakciju većine hemijskih i biološki značajnih komponenata, koje su sastavni deo tropova korena i lista rena (dobijanje ekstrakata tropova neophodno je radi mogućnosti realizacije određenih instrumentalnih metoda analize);
- Pretpostavka da će postupci inkapsulacije i liofilizacije očuvati bioaktivne komponente rena;
- Pretpostavka da će dodavanje prahova sokova i tropova korena i lista rena uticati na ukupni kvalitet majoneza tokom skladištenja.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. MATERIJALI

4.1.1. Sirovine

Koren i list rena (*Armoracia rusticana* L.) sakupljeni su u naselju Donja Livadica, opština Velika Plana, Republika Srbija (44.347161, 21.135060) (Slika 4.1).



Slika 4.1. Lokalitet sakupljanja biljnog materijala

List rena (15 kg) sakupljen je u maju, a koren rena (25 kg) u oktobru 2021. godine (Slika 4.2). Oprani su kako bi se uklonile nečistoće i potom osušeni na vazduhu na sobnoj temperaturi (25 °C, 3 h). Koren i list rena isečeni su na manje komade (veličine 5 cm), upakovani u polietilenske vreće od 0,5 kg i skladišteni na temperaturi od -18 °C do dalje upotrebe.



Slika 4.2. Koren i list rena (*Armoracia rusticana* L.)

Sve sirovine korišćene za proizvodnju majoneza (suncokretovo ulje, žumance, sirće, so, šećer i sintetički antioksidans EDTA) dobijene su od kompanije Polimark d.o.o. (Beograd, Srbija).

Za inkapsulaciju soka korena i lista rena korišćeni su sledeći nosači: maltodekstrin (dekstroznog ekvivalenta 16,0-19,9) i natrijum-alginat, nabavljeni od proizvođača Cargill Inc. (SAD), kao i guar guma i arapska guma, nabavljeni od proizvođača Sigma-Aldrich (Nemačka). Svi korišćeni nosači bili su prehrambenog kvaliteta (engl. *food-grade quality*).

4.1.2. Hemikalije

Standardi i reagensi korišćeni za hromatografsku analizu bili su HPLC stepena čistoće. Sve ostale hemikalije korišćene u eksperimentu bile su čistoće koja odgovara p.a. kvalitetu. Etanol,

metanol, hlorovodonična kiselina, sirćetna kiselina (glacijalna) i natrijum-hlorid nabavljeni su od Zorka Pharma (Srbija). Folin-Ciocalteu reagens, 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, galna kiselina monohidrat, kafena kiselina, natrijum-nitrit, natrijum-hidroksid, aluminijum-hlorid i kalijum-persulfat nabavljeni su od Sigma Chemicals Co. (SAD). Natrijum-karbonat nabavljen je od LOBA Chemie (Indija); natrijum-molibdat dihidrat i kalijum-jodid od VWR International (Belgija); di-natrijum-hidrogen-fosfat dihidrat od Hemos (Srbija); natrijum-dihidrogen-fosfat monohidrat i natrijum-acetat trihidrat od ALKALOID AD (Severna Makedonija); katehin od dr Ehrenstorfer (Nemačka); (\pm)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina od Acros Organics (SAD); 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina od TermoFisher GmbH (Nemačka); gvožđe-hlorid heksahidrat i natrijum-tiosulfat od NRK Inženjering (Srbija); petrol etar od Lab Expert (Velika Britanija); dietil etar, hloroform i skrob od Centrohem (Srbija); izooktan od CHEM-LAB (Belgija); *p*-anisidin od BIOCHEM Chemopharma (Francuska); fenolftalein od Institut MOL (Srbija); kalijum-hidroksid od Alfapanon (Srbija); ultra čista voda dobijena je sistemom za prečišćavanje vode BBPS-508 (Biolab Scientific, Kanada); kvercetin (čistoća $\geq 98\%$) i gentizinska kiselina (čistoća $\geq 98\%$) nabavljene su od Vuhan ChemFaces Biochemical Co (Kina); metanol, acetonitril i mravlja kiselina HPLC stepena čistoće su proizvodi kompanije CARLO ERBA Reagents GmbH (Italija).

4.2. METODE

4.2.1. Hladno presovanje korena i lista rena i karakterizacija dobijenih sokova

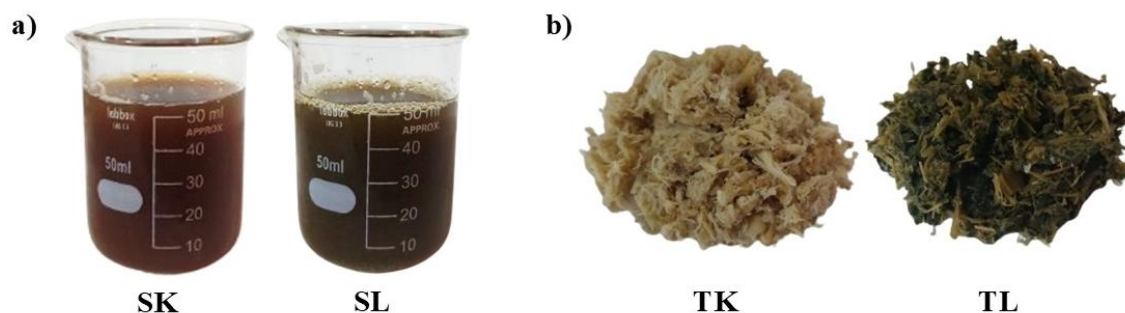
Priprema uzoraka za hladno presovanje obuhvatala je usitnjavanje i mlevenje korena i lista rena u vodenici, u cilju olakšane ekstrakcije soka. Sokovi korena i lista rena dobijeni su hladnim presovanjem korena i lista rena u mehaničkoj drvenoj presi (Enoitalia, Italija), kapaciteta 25 kg (Slika 4.3). Nakon toga, sokovi su filtrirani kroz šestoslojnu pamučnu gazu kako bi se uklonile čvrste frakcije. Dobijeni filtrati skladišteni su u plastičnim bocama na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalje upotrebe. Tropovi korena i lista rena, zaostali kao nusproizvodi hladnog presovanja, upakovani su u polietilenske vreće i skladišteni pod istim uslovima.



Slika 4.3. Hladno presovanje korena i lista rena

Na ovaj način dobijeni su sledeći uzorci (Slika 4.4), koji su korišćeni za dalje analize:

- sok korena rena (SK),
- sok lista rena (SL),
- trop korena rena (TK),
- trop lista rena (TL).



Slika 4.4. a) Sokovi (SK i SL) i b) tropovi (TK i TL) korena i lista rena

4.2.1.1. Određivanje sadržaja suve materije i sadržaja vlage

Sadržaj vlage određen je standardnom gravimetrijskom metodom (AOAC, 2005), sušenjem uzoraka na temperaturi od 105 °C u sušnici *Memmert UF-55* (Nemačka) pod atmosferskim pritiskom do konstantne mase. Za analizu je korišćeno ~3 g sokova korena i lista rena.

Sadržaj vlage i sadržaj suve materije uzoraka izraženi su procentualno, a izračunati su prema sledećim jednačinama:

$$V(\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_3} \cdot 100 \quad (1)$$

$$SM(\%) = 100 - V(\%) \quad (2)$$

gde je:

- V – sadržaj vlage uzorka (%),
- SM – sadržaj suve materije uzorka (%),
- m_1 – masa vegeglasa sa uzorkom, pre sušenja (g),
- m_2 – masa vegeglasa sa uzorkom, posle sušenja (g),
- m_3 – masa uzorka korišćenog za analizu (g).

4.2.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativnog kapaciteta sokova

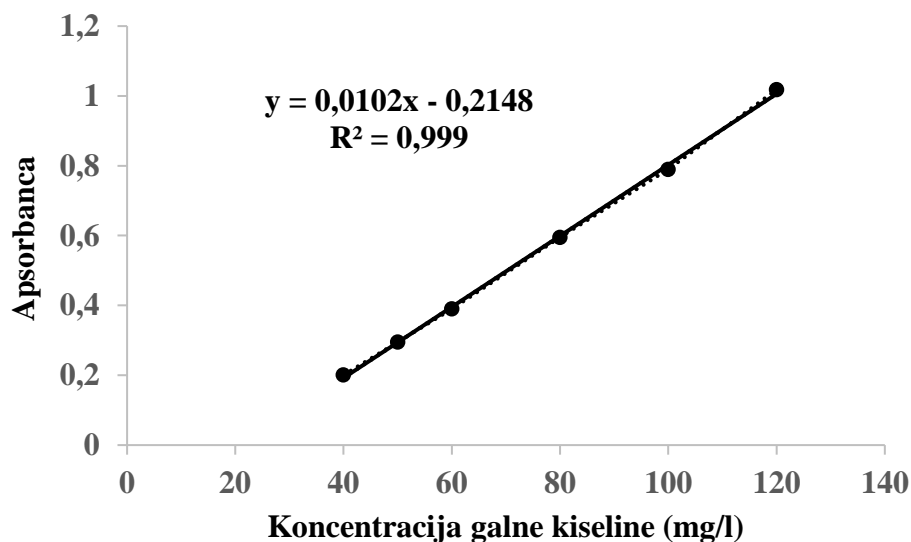
4.2.1.2.1. Priprema sokova za spektrofotometrijsku analizu

Sokovi korena i lista rena dobijeni metodom hladnog presovanja direktno su korišćeni za spektrofotometrijska određivanja ili su razblaživani destilovanom vodom po potrebi.

4.2.1.2.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u sokovima korena i lista rena određen je spektrofotometrijskom metodom koja se zasniva na određivanju redukujućeg kapaciteta fenolnih jedinjenja prema Folin-Ciocalteu reagensu, pri čemu dolazi do formiranja plavo obojenog kompleksa (Singleton and Rossi, 1965; Singleton et al., 1999). Uzorak (0,5 ml) i vodeni rastvor Folin-Ciocalteu reagensa (10% v/v; 2,5 ml) otpipetirani su u test epruvetu i snažno homogenizovani. Nakon inkubacije na tamnom mestu (25 °C, 5 min), u test epruvetu je dodat vodeni rastvor natrijum-karbonata (75 g/l; 2 ml). Reakciona smeša je potom snažno promešana i inkubirana na tamnom mestu (25 °C, 2 h). Slepa proba pripremljena je tako što je umesto uzorka otpipetirana jednaka zapremina destilovane vode. Apsorbanca nastalog plavog obojenja očitana je na talasnoj dužini od 760 nm na UV/Vis spektrofotometru HALO DB-20S (Dynamica Scientific Ltd., Velika Britanija). Jednačina kalibracione

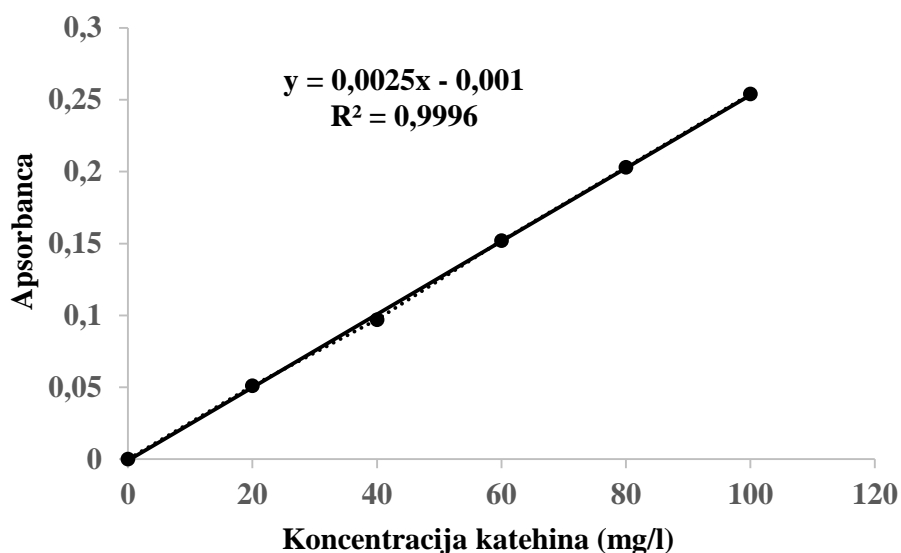
krive standardnog rastvora galne kiseline u vodi (40-120 mg/l) (Slika 4.5) korišćena je za izračunavanje koncentracije ukupnih fenolnih jedinjenja u uzorcima. Rezultati su izraženi u mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) na 100 g suve materije soka korena ili soka lista rena.



Slika 4.5. Kalibraciona kriva rastvora galne kiseline

4.2.1.2.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

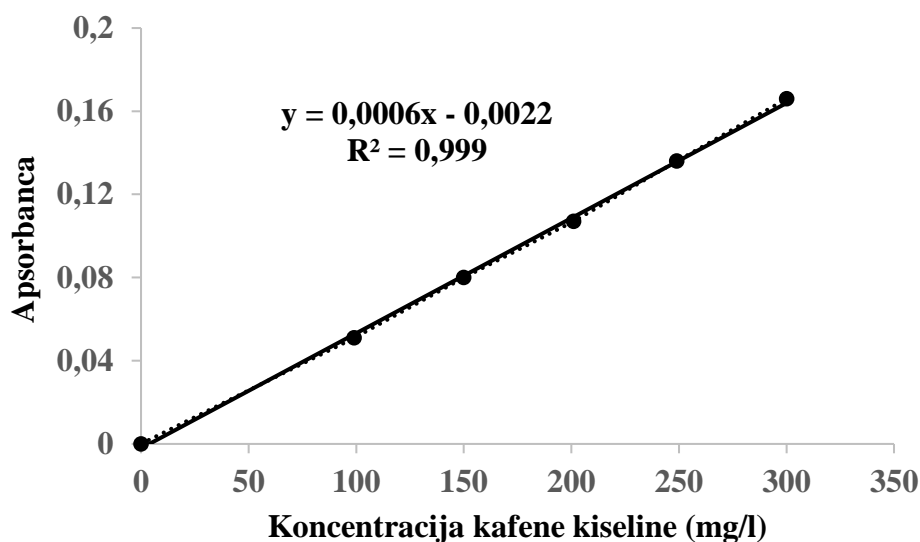
Sadržaj ukupnih flavonoida u sokovima korena i lista rena određen je spektrofotometrijskom metodom sa aluminijum-hloridom prema Zhishen et al. (1999) i Kim et al. (2003). Ova kolorimetrijska metoda zasnovana je na osobini flavonoida da kompleksiraju metalne katjone (kao što je Al^{3+}), pri čemu dolazi do građenja helata (Da Silva et al., 2015). Uzorak (0,5 ml) i destilovana voda (2 ml) otpipetirani su u test epruvetu i snažno homogenizovani. Nakon homogenizacije dodat je vodeni rastvor natrijum-nitrita (5% w/v; 0,15 ml) i reakciona smeša je inkubirana na tamnom mestu (25 °C, 5 min). Nakon inkubacije, u test epruvetu je dodat vodeni rastvor aluminijum-hlorida (10% w/v; 0,15 ml), a nakon 5 minuta inkubacije na tamnom mestu i vodeni rastvor natrijum-hidroksida (1M; 1 ml), posle čega je zapremina rastvora dopunjena do 5 ml sa destilovanom vodom i dobro homogenizovana. Slepa proba pripremljena je tako što je umesto uzorka otpipetirana jednaka zapremina destilovane vode. Apsorbance nastalog žutog obojenja očitana je na UV/Vis spektrofotometru HALO DB-20S (Dynamica Scientific Ltd., Velika Britanija) na talasnoj dužini od 415 nm, koja se primenjuje kada se u uzorcima očekuje širok spektar flavonoidnih struktura. Jednačina kalibracione krive standardnog rastvora katehina u vodi (20-100 mg/l) (Slika 4.6) korišćena je za izračunavanje koncentracije ukupnih flavonoida u uzorcima. Rezultati su izraženi u mg ekvivalenata katehina (CE) na 100 g suve materije soka korena ili soka lista rena.



Slika 4.6. Kalibraciona kriva rastvora katehina

4.2.1.2.4. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih kiselina

Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u sokovima korena i lista rena određen je spektrofotometrijskom metodom sa Arnovim reagensom prema Matkowski et al. (2008). Uzorak (0,5 ml) i vodeni rastvor hlorovodonične kiseline (0,5M; 1 ml) otpipetirani su u test epruvetu, a zatim je dodat 1 ml Arnovog reagensa (koji je pripremljen rastvaranjem 10 g natrijum-nitrita i 10 g natrijum-molibdata u 100 ml destilovane vode). Nakon toga, dodat je vodeni rastvor natrijum-hidroksida (8,5% w/v; 1 ml), nakon čega je zapremina rastvora dopunjena do 5 ml sa destilovanom vodom i dobro homogenizovana. Slepa proba pripremljena je tako što je umesto uzorka otpipetirana jednaka zapremina destilovane vode. Apsorbanca nastalog žutog obojenja očitana je na talasnoj dužini od 490 nm na UV/Vis spektrofotometru HALO DB-20S (Dynamica Scientific Ltd., Velika Britanija). Jednačina kalibracione krive standardnog rastvora kafene kiseline u vodi (51-300 mg/l) (Slika 4.7) korišćena je za izračunavanje koncentracije ukupnih fenolnih kiselina u uzorcima. Rezultati su izraženi u mg ekvivalenta kafene kiseline (CAE) na 100 g suve materije soka korena ili soka lista rena.



Slika 4.7. Kalibraciona kriva rastvora kafene kiseline

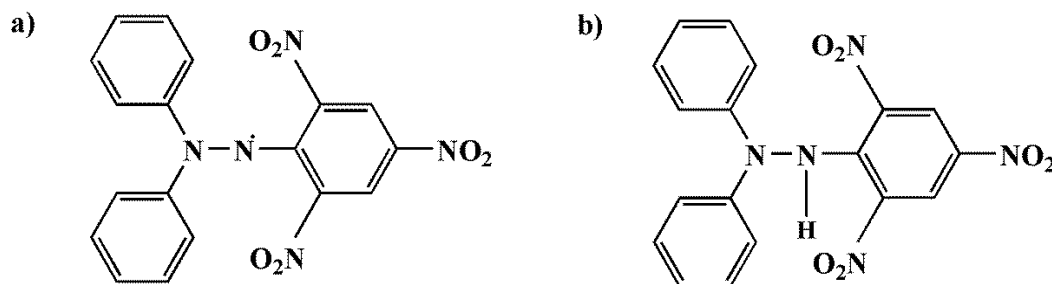
4.2.1.2.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost sokova korena i lista rena određena je korišćenjem tri metode:

1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metoda (Brand-Williams et al., 1995);
2. ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) metoda (Re et al., 1999; Salević et al., 2022);
3. FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) metoda (Benzie and Strain, 1996).

4.2.1.2.5a. DPPH metoda

DPPH metoda zasnovana je na promeni boje ljubičasto obojenog rastvora stabilnog azot-centriranog DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala u redukovanu, žuto obojenu formu DPPH-H. Pojava žute boje objašnjava se sposobnošću antioksidanasa da deluju kao donori vodonika ili elektrona, pri čemu DPPH[•] prelazi u redukovani, neutralni DPPH-H oblik (Slika 4.8).



Slika 4.8. a) Stabilan azot-centrirani DPPH[•] radikal (ljubičast) i b) njegova redukovana forma DPPH-H (žut)

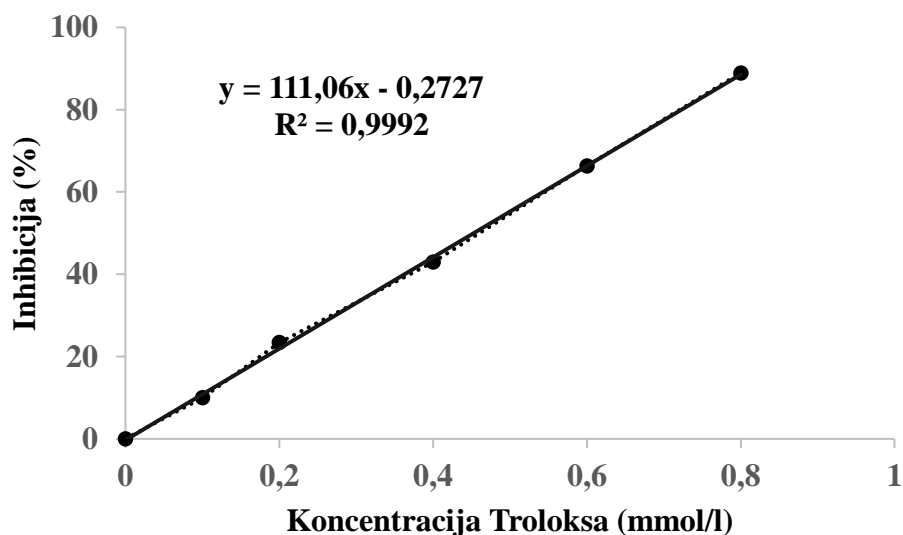
Uzorak (0,1 ml) i radni rastvor DPPH[•] radikala (1,9 ml) otpipetirani su u test epruvetu i snažno homogenizovani. Radni rastvor DPPH[•] u metanolu (0,094 mmol/l) pripremljen je neposredno pred analizu. Reakciona smeša je snažno homogenizovana i ostavljena na tamnom mestu (25 °C, 30 min). Nakon inkubacije, izmerena je apsorbancija nastalog obojenja na talasnoj dužini od 517 nm korišćenjem UV/Vis spektrofotometra HALO DB-20S (Dynamica Scientific Ltd., Velika Britanija). Slepa proba pripremljena je tako što je umesto uzorka otpipetirana jednaka zapremina destilovane vode. Inhibicija DPPH[•] radikala (I) izražena je procentualno i izračunata prema sledećoj jednačini:

$$I(\%) = \frac{A_{sp} - A_{uz}}{A_{sp}} \cdot 100 \quad (3)$$

gde je:

- A_{sp} - apsorbancija slepe probe,
- A_{uz} - apsorbancija uzorka.

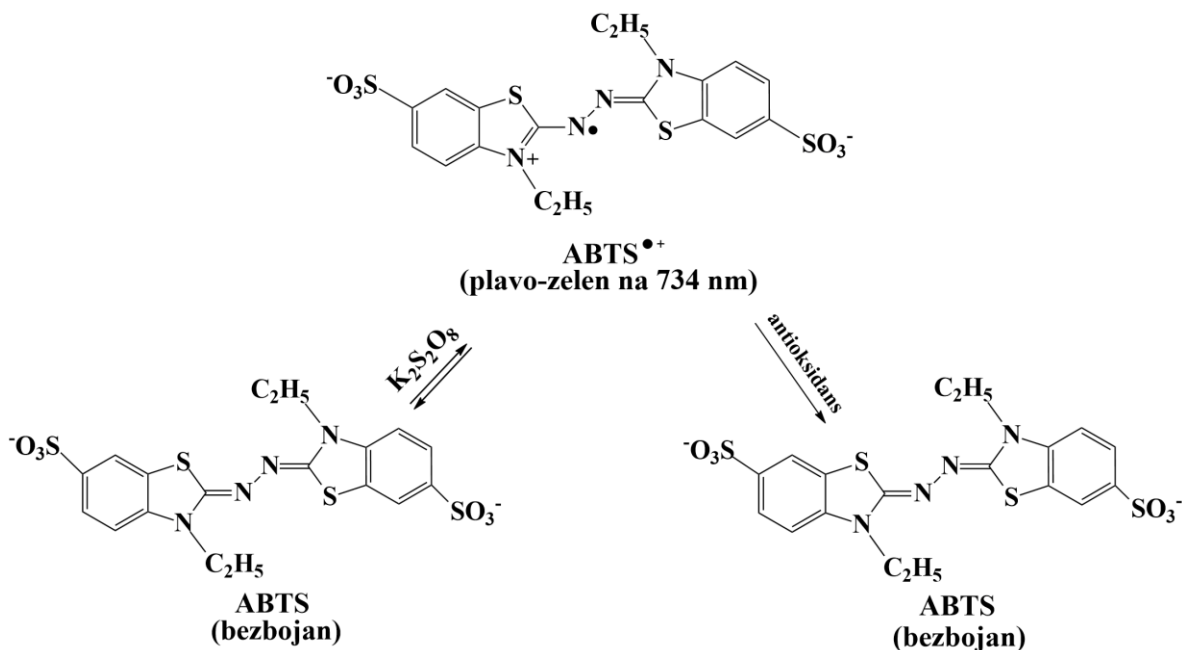
Jednačina kalibracione krive standardnog rastvora Troloksa u metanolu (0,1-0,8 mmol/l) (Slika 4.9) korišćena je za izračunavanje antioksidativne aktivnosti sokova korena i lista rena. Rezultati su izraženi u mmol ekvivalenata Troloksa (TE) na 100 g suve materije soka korena ili soka lista rena.



Slika 4.9. Kalibraciona kriva rastvora Troloksa: DPPH metoda

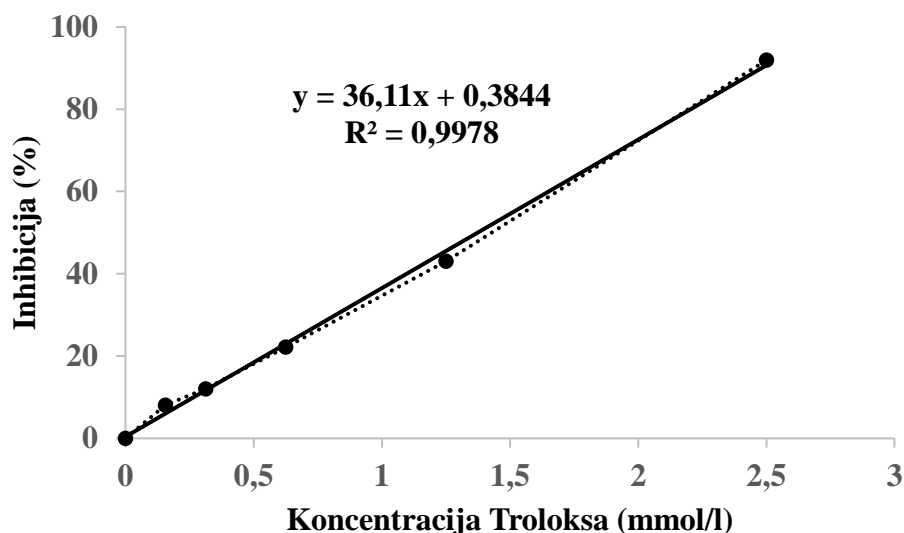
4.2.1.2.5b. ABTS metoda

ABTS metoda zasnovana je na kolorimetrijskom određivanju stepena obezbojavanja stabilnog $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) radikala u prisustvu antioksidanasa. Relativno stabilan $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikalski katjon nastaje reakcijom između ABTS i kalijum-persulfata, ima plavo-zelenu boju i pokazuje apsorpcioni maksimum na talasnoj dužini od 734 nm. Dodatkom antioksidanasa, dolazi do redukcije radikala i obezbojavanja rastvora (Slika 4.10), a intenzitet obezbojavanja proporcionalan je koncentraciji antioksidanasa i trajanju reakcije.

Slika 4.10. Redukcija $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikala u prisustvu antioksidanasa

Osnovni $\text{ABTS}^{\bullet+}$ rastvor pripremljen je mešanjem jednakih zapremina ABTS (14 mM) u fosfatnom puferu (5 mM) i kalijum-persulfata (4,9 mM) u fosfatnom puferu (5 mM). Dobijeni plavo-zeleni rastvor ostavljen je na tamnom mestu na sobnoj temperaturi 18 h. Nakon toga, pripremljen je radni $\text{ABTS}^{\bullet+}$ rastvor, razblaživanjem osnovnog $\text{ABTS}^{\bullet+}$ rastvora (približno 1/80) fosfatnim puferom

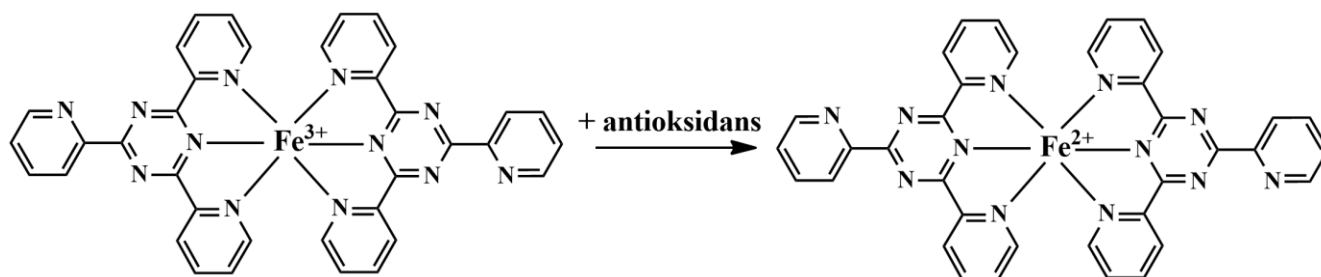
(5 mM) do postizanja vrednosti apsorbance $0,70 \pm 0,02$ na talasnoj dužini od 734 nm. Uzorak (0,03 ml) i radni ABTS^{•+} rastvor (3 ml) otpipetirani su u test epruvetu, dobro homogenizovani i inkubirani na tamnom mestu (6 min). Apsorbanca je očitavana na talasnoj dužini od 734 nm korišćenjem UV/Vis spektrofotometra HALO DB-20S (Dynamica Scientific Ltd., Velika Britanija). Slepa proba pripremljena je tako što je umesto uzorka otpipetirana jednaka zapremina destilovane vode. Inhibicija ABTS^{•+} radikala (I) izražena je procentualno i izračunata prema jednačini (3). Jednačina kalibracione krive standardnog rastvora Troloksa u 5 mM fosfatnom puferu (0,16-2,50 mmol/l) (Slika 4.11) korišćena je za izračunavanje antioksidativne aktivnosti sokova korena i lista rena. Rezultati su izraženi u mmol ekvivalenta Troloksa (TE) na 100 g suve materije soka korena ili soka lista rena.



Slika 4.11. Kalibraciona kriva rastvora Troloksa: ABTS metoda

4.2.1.2.5c. FRAP metoda

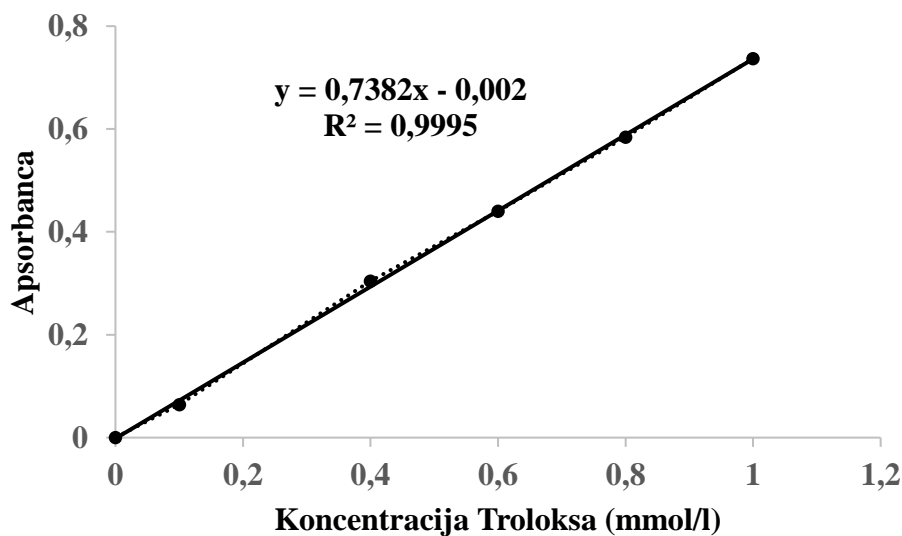
FRAP metoda zasniva se na redukciji žutog kompleksa gvožđa i 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina [Fe^{3+} -TPTZ] do intenzivno plavo obojenog [Fe^{2+} -TPTZ] kompleksa u kiseloj sredini (pH 3,6) (Slika 4.12), koji pokazuje apsorpcioni maksimum na talasnoj dužini od 593 nm.



Slika 4.12. Redukcija žutog [Fe^{3+} -TPTZ] do plavo obojenog [Fe^{2+} -TPTZ]

Uzorak (0,1 ml), destilovana voda (0,3 ml) i FRAP reagens (3 ml) otpipetirani su u test epruvetu, nakon čega je smeša inkubirana na tamnom mestu (37 °C, 40 min). FRAP reagens je pripremljen mešanjem acetatnog pufera (pH 3,6), rastvora TPTZ (10 mM) u HCl (40 mM) i $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM) u destilovanoj vodi u zapreminskom odnosu 10:1:1, respektivno. Apsorbanca je očitavana na talasnoj dužini od 593 nm korišćenjem UV/Vis spektrofotometra HALO DB-20S (Dynamica Scientific Ltd., Velika Britanija). Slepa proba pripremljena je tako što je umesto uzorka otpipetirana jednaka zapremina destilovane vode. Jednačina kalibracione krive standardnog rastvora

Troloksa u destilovanoj vodi (0,1-1,0 mmol/l) (Slika 4.13) korišćena je za izračunavanje antioksidativne aktivnosti sokova korena i lista rena. Rezultati su izraženi u mmol ekvivalenta Troloksa (TE) na 100 g suve materije soka korena ili soka lista rena.



Slika 4.13. Kalibraciona kriva rastvora Troloksa: FRAP metoda

4.2.1.3. Hromatografska analiza fenolnih jedinjenja sokova

4.2.1.3.1. Priprema sokova za hromatografsku analizu

Sokovi korena i lista rena liofilizovani su za potrebe hromatografske analize korišćenjem uređaja Christ beta 2-8 LD plus (Nemačka). Uzorci su sušeni na temperaturi od -40 °C, pri pritisku od 0,12 mbar, u trajanju od 48 h. Nakon toga, uzorak (1 g) je ekstrahovan sa 10 ml 80% (v/v) metanola koji je sadržao 0,1% HCl na orbitalnoj mešalici (25 °C, 1 h). Dobijeni ekstrakti su centrifugirani (3000×g, 10 min), a sakupljeni supernatanti su filtrirani kroz 0,22 μm PTFE (politetrafluoroetilen) špric filtere (Chemland, Stargard, Poljska) i skladišteni na temperaturi od 4 °C do dalje upotrebe.

4.2.1.3.2. UHPLC Q-ToF MS analiza

Analiza fenolnog profila sokova korena i lista rena izvedena je na sistemu tečne hromatografije ultra-visokih performansi Agilent 1290 Infinity (UHPLC) u kombinaciji sa kvadrupolnom vremenskom masenom spektrometrijom (6530C Q-ToF-MS), kompanije Agilent Technologies, Inc. (Kalifornija, SAD). Hromatografsko razdvajanje izvedeno je na 40 °C na koloni Zorbax C18 (2,1×50 mm, 1,8 μm) kompanije Agilent Technologies, Inc. (Kalifornija, SAD). Smeše mobilne faze sadržale su (A) ultra čistu vodu i (B) acetonitril (MS kvaliteta), koji je sadržao 0,1% mravlje kiseline (MS kvaliteta). Brzina protoka bila je konstantna i podešena na 0,3 ml/min, dok je zapremina injekcije bila 5 μl. Program eluiranja gradijenta započet je sa 2% rastvarača B tokom dva minuta, koji je zatim dostigao 98% B u narednih 17 minuta, a narednih 5 minuta gradijent je vraćen u početne uslove (2% B) da bi se ponovo uspostavila ravnoteža kolona do početnih uslova.

Q-ToF MS sistem bio je opremljen sa Dual Agilent Jet Stream elektrosprej jonskim (ESI) izvorom, koji je radio u pozitivnom (ESI⁺) i negativnom (ESI⁻) režimu jonizacije. Radni parametri za ESI su postavljeni na sledeći način: pritisak raspršivača od 45 psi, temperatura gasa za sušenje od 225 °C i brzina protoka od 8 l/min, temperatura gasa u omotaču od 300 °C i protok gasa u omotaču 10 l/min, kapilarni napon od 2500 V, energija fragmentora od 175 V, napon skimera od 65 V, oktopol RF pik na 750 V. QToF-MS sistem je sniman spektrom u *m/z* opsegu 100–1700, sa frekvencijom skeniranja od 2 Hz. Prikupljanje podataka za sumnjivi skrining izvedeno je koristeći režim Auto

MS/MS akvizicije sa energijom sudara od 30 eV. Parametri za Auto MS/MS režim bili su sledeći: $m/z = 100\text{--}1700$, brzina skeniranja 1 spektar/s. Za procenu i analizu podataka korišćen je softver Agilent MassHunter.

Bioaktivna jedinjenja su identifikovana na osnovu njihove monoizotopske mase, MS fragmentacije (Tabela P1) i postojećih literaturnih podataka (Tomson et al., 2013b; Agneta et al., 2014; Negro et al., 2022), a kvantifikovana su direktnim poređenjem sa dostupnim standardima (Tabela P2). Zbog nepostojanja određenih specifičnih standarda, količine pojedinačnih fenolnih derivata su kvantifikovane korišćenjem dostupnih standarda i izražene u mg/100 g liofilizovanog soka korena ili lista rena. Tačne mase komponenata su izračunate korišćenjem ChemDraw softvera (verzija 12.0, CambridgeSoft, SAD).

4.2.2. Inkapsulacija sokova korena i lista rena i karakterizacija dobijenih inkapsulata

Napojne smeše za inkapsulaciju pripremljene su rastvaranjem sledećih kombinacija nosača u soku korena ili soku lista rena: maltodekstrin/alginat (MD/AL), maltodekstrin/guar guma (MD/GG) i maltodekstrin/arapska guma (MD/GA). Smeše su sadržale 5% (w/v) nosača, u sledećim odnosima: MD/AL 4:1 (w/w), MD/GG 9:1 (w/w) i MD/GA 4:1 (w/w), u cilju postizanja adekvatne atomizacije tečnosti tokom sprej sušenja. Ove koncentracije nosača odabrane su kako bi se postigli optimalni uslovi za proces sušenja raspršivanjem, ali i kako bi se zaštitila bioaktivna jedinjenja sokova rena. Pored toga, bilo je važno obezbediti oslobađanje antioksidanasa iz inkapsulata u majonez kako bi se sprečila njegova oksidacija. Udeo guar gume u mešavini nosača sa maltodekstrinom (odnos 9:1 za MD/GG) je smanjen u poređenju sa druga dva hidrokoloida (odnos 4:1 za MD/AL i MD/GA) zbog svojstva ovog hidrokoloida da deluje kao sredstvo za zgušnjavanje. Procesu inkapsulacije prethodila je homogenizacija napojnih smeša na uređaju T-25 digital *ULTRA-TURRAX®-IKA* (Nemačka) na 8000 o/min u trajanju od 5 minuta, koja je potom nastavljena na magnetnoj mešalici (veličina magnetna 4,0×0,5 cm) na 600 o/min tokom 10 minuta, u cilju postizanja potpunog rastvaranja nosača u soku.



Slika 4.14. Laboratorijski sprej sušač *Mini B-290* (Büchi, Švajcarska)

Za sprej sušenje sokova korena i lista rena korišćen je laboratorijski sprej sušač *Mini B-290* (Büchi, Švajcarska) (Slika 4.14), koji je opremljen nozлом za raspršivanje prečnika 0,7 mm, pod sledećim uslovima: ulazna temperatura 130 ± 2 °C, izlazna temperatura 65 ± 2 °C, protok vazduha 831 l/h (pri standardnoj temperaturi i pritisku), protok tečnosti 10 ml/min (40%) i aspiracija 100%. Tokom

sprej sušenja uzorci su homogenizovani na magnetnoj mešalici (veličina magneta 4,0×0,5 cm) na 500 o/min na tamnom mestu. Za sušenje osetljivih jedinjenja izabrane su niže ulazne i izlazne temperature. Ukoliko se koriste više temperature tokom sušenja raspršivanjem, osetljiva jedinjenja mogu biti oštećena ili uništena. Sušenje raspršivanjem je veoma efikasno u prenosu toplote i uklanjanju vode iz malih kapljica, čak i na nižim temperaturama u raspršivaču. Stoga su parametri podešeni na niže ulazne i izlazne temperature kako bi se sprečilo termičko oštećenje aktivnih sastojaka. Dobijeni prahovi sokova korena i lista rena sakupljeni su u kolektoru, vakuumirani u polietilenskim vrećama i čuvani na tamnom mestu na -18 °C do dalje analize. Kao kontrolni uzorci pripremljeni su sprej sušeni sokovi korena i lista rena bez nosača.

Dobijene su sledeće formulacije prahova korena rena:

- K-K – sprej sušeni sok korena rena bez nosača (kontrola),
- IK-MD/AL – sprej sušeni sok korena rena inkapsuliran u MD/AL,
- IK-MD/GG – sprej sušeni sok korena rena inkapsuliran u MD/GG,
- IK-MD/GA – sprej sušeni sok korena rena inkapsuliran u MD/GA.

Dobijene su sledeće formulacije prahova lista rena:

- L-K – sprej sušeni sok lista rena bez nosača (kontrola),
- IL-MD/AL – sprej sušeni sok lista rena inkapsuliran u MD/AL,
- IL-MD/GG – sprej sušeni sok lista rena inkapsuliran u MD/GG,
- IL-MD/GA – sprej sušeni sok lista rena inkapsuliran u MD/GA.

4.2.2.1. Određivanje sadržaja suve materije i sadržaja vlage

Sadržaj suve materije i sadržaj vlage određeni su standardnom gravimetrijskom metodom (AOAC 2005), prethodno opisanom u potpoglavlju 4.2.1.1. Za analizu je korišćeno ~0,1 g inkapsuliranih sokova korena i lista rena.

4.2.2.2. Određivanje prinosa inkapsulacije

Prinos inkapsulacije (%) izračunat je iz odnosa ukupne suve materije dobijenih prahova (m_2) i ukupne suve materije materijala u napojnoj smeši (soka i nosača) (m_1), korišćenjem sledeće jednačine:

$$\text{Prinos (\%)} = \frac{m_2}{m_1} \cdot 100 \quad (4)$$

4.2.2.3. Određivanje efikasnosti inkapsulacije

Efikasnost enkapsulacije (EE) analizirana je korišćenjem metode koju su opisali Ghandehari Yazdi et al. (2021), uz male modifikacije. Efikasnost inkapsulacije izražena je kao odnos između inkapsuliranog sadržaja fenolnih jedinjenja (engl. *EPC*, *Encapsulated Phenolic Content*) i ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja (engl. *TPC*, *Total Phenolic Content*). Sadržaj inkapsuliranih fenolnih jedinjenja izračunat je iz razlike između TPC i sadržaja fenolnih jedinjenja na površini inkapsulata (engl. *SPC*, *Surface Phenolic Content*). Za određivanje TPC, 0,2 g inkapsulata dodato je u 10 ml destilovane vode i dobijena disperzija je homogenizovana 1 min. Za određivanje SPC, 0,2 g inkapsulata je dodato u 10 ml metanol:etanol smeše (1:1 v/v), i nastala disperzija je homogenizovana 1 min i potom filtrirana kroz 0,45 μm PTFE (politetrafluoroetilen) špric filter (Chemland, Stargard, Poljska). Koncentracije TPC i SPC određene su Folin-Ciocalteu metodom (opisanom u potpoglavlju 4.2.1.2.2), a efikasnost inkapsulacije izračunata je prema sledećoj jednačini:

$$EE (\%) = \frac{EPC}{TPC} \cdot 100 = \frac{TPC - SPC}{TPC} \cdot 100 \quad (5)$$

gde je:

- *EPC* – sadržaj fenolnih jedinjenja unutar inkapsulata,
- *SPC* – sadržaj fenolnih jedinjenja na površini inkapsulata,
- *TPC* – ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja inkapsulata.

4.2.2.4. Određivanje aktivnosti vode inkapsulata

Aktivnost vode (a_w vrednost) inkapsulata izračunata je korišćenjem a_w -metra *LabSwift-aw* Novasina (Švajcarska) na temperaturi od 25 °C, prema uputstvima proizvođača. Ukratko, inkapsulati su ravnomerno raspoređeni i napunjeni do oznake u posudi za uzorak. Napunjena posuda za uzorke postavljena je u mernu komoru *LabSwift-aw* uređaja. Merenje je završeno kada je očitana a_w vrednost na ekranu bila stabilna.

4.2.2.5. Određivanje rastvorljivosti inkapsulata

Rastvorljivost inkapsulata (%) izračunata je prema metodi koju je opisala Šregelj (2019). Uzorak (0,15 g, računato na suhu osnovu) je rastvoren u destilovanoj vodi (15 ml) uz konstantno mešanje na 150 o/min (30 min), nakon čega je vršeno centrifugiranje rastvora brzinom od 3000 o/min (5 min) u centrifugi *Boeco U-320* (Hamburg, Nemačka). Supernatant je sušen u sušnici *Memmert UF-55* (Švabah, Nemačka) na 105 °C do konstantne mase. Rastvorljivost inkapsulata izračunata je na osnovu mase čvrstih rezidua nakon rastvaranja i sušenja (m_2) i početne mase uzorka (m_1), prema sledećoj jednačini:

$$\text{Rastvorljivost (\%)} = \frac{m_2}{m_1} \cdot 100 \quad (6)$$

4.2.2.6. Određivanje higroskopnosti inkapsulata

Higroskopnost inkapsulata određena je prema metodi opisanoj u radu autora Tomsone et al. (2020b). Uzorak (1 g) je prenet u Petri šolju i postavljen u eksikator u kome su prethodno postignuti sledeći uslovi: temperatura 25 °C i relativna vlažnost vazduha 75,29% (postiže se korišćenjem zasićenog rastvora natrijum-hlorida). Nakon nedelju dana izmerena je masa uzorka. Higroskopnost je procenjena gravimetrijski, na osnovu kapaciteta upijanja vlage, izraženog u gramima apsorbovane vlage na 100 g suve materije inkapsulata.

4.2.2.7. Određivanje kapaciteta zadržavanja ulja inkapsulata

Određivanje kapaciteta inkapsulata da zadrže ulje izvršeno je gravimetrijski, prema metodi opisanoj u radu autora Huang and Ma (2016). Uzorak (0,5 g) je preliven suncokretovim uljem (5 ml), snažno homogenizovan i ostavljen pod stacionarnim uslovima na sobnoj temperaturi tokom 24 h. Nakon centrifugiranja (5000 o/min, 5 min), supernatant je odstranjen, a rezidue su izmerene. Kapacitet zadržavanja ulja izražen je u g ulja po g uzorka.

4.2.2.8. Određivanje nasipne i tapkane gustine inkapsulata

Nasipna i tapkana gustina inkapsulata određena je prema proceduri koju propisuje Evropska farmakopeja (European Pharmacopeia, 2014). Nasipna gustina određena je iz količnika odmerene mase uzorka (2 g) i očitane zapremine koju je uzorak zauzeo u menzuri od 10 ml. Vrednost nasipne gustine izražena je u g inkapsulata po cm^3 . Tapkana gustina je izračunata nakon manuelnog tapkanja istih uzoraka i to 10, 250 i 500 puta. Vrednost tapkane gustine je određena iz količnika mase uzorka i zapremine nakon 500 tapkanja, ukoliko razlika između zapremine nakon 250 i 500 tapkanja nije bila veća od 0,2 cm^3 . Vrednost tapkane gustine izražena je u g inkapsulata po cm^3 .

4.2.2.9. Određivanje kompresibilnosti inkapsulata

Kompresibilnost inkapsulata izražena je preko indeksa kompresibilnosti i Hausnerovog odnosa, koji su izračunati korišćenjem sledećih jednačina:

$$\text{Indeks kompresibilnosti (\%)} = (\text{tapkana gustina} - \text{nasipna gustina}) / \text{tapkana gustina} \cdot 100 \quad (7)$$

$$\text{Hausnerov odnos} = \text{tapkana gustina} / \text{nasipna gustina} \quad (8)$$

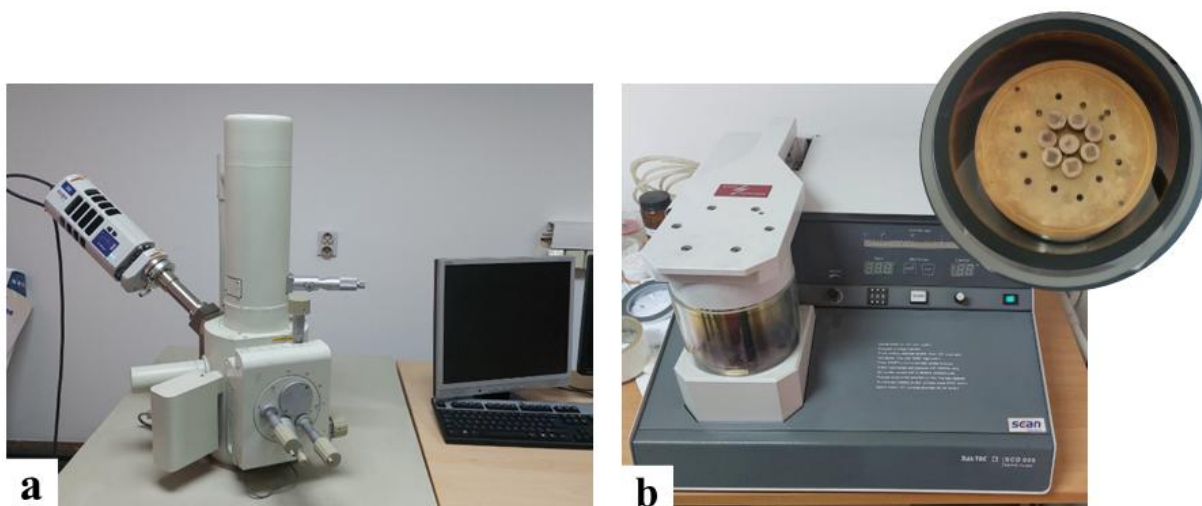
Na osnovu ovih parametara klasifikovana je protočnost i kohezivnost inkapsulata koristeći podatke iz Tabele 4.1.

Tabela 4.1. Klasifikacija protočnosti i kohezivnosti inkapsulata (Jinapong et al., 2008)

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

4.2.2.10. Mikroskopska analiza inkapsulata

Morfologija inkapsulata ispitivana je korišćenjem skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM) uz prethodno nanošenje zlata korišćenjem struje od 30 mA sa udaljenosti od 50 mm tokom 100 s. Ispitivanja su vršena na Jeol JSM-6390LV uređaju (JEOL, Tokio, Japan) (Slika 4.15a), a nanošenje zlata vršeno je pomoću uređaja Baltec SCD 005 Sputter Coater (BAL-TEC AG, Balzers, Lihtenštajn) (Slika 4.15b). Prečnik sprej sušenih čestica izračunat je kao srednja vrednost prečnika uzorka od 100 inkapsulata korišćenjem programa Image J (Nacionalni institut za zdravlje, Betesda, SAD).



Slika 4.15. a) Skenirajući elektronski mikroskop i b) uređaj za naparavanje zlatom

4.2.2.11. FT-IR spektroskopska analiza inkapsulata

Hemijske karakteristike inkapsulata analizirane su korišćenjem infracrvenog spektrometra sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) IRAffinity-1 (Shimadzu, Kjoto, Japan) (Slika 4.16). Spektri su snimljeni u spektralnom opsegu od $4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$, sa rezolucijom od 4 cm^{-1} , a 100 akumuliranih skeniranja je korišćeno za dobijanje spektara. Pre analize, prahovi su pomešani sa kalijum-bromidom, usitnjeni i kompresovani u pelete. Za vizuelizaciju FT-IR spektara korišćen je softver za optičku spektroskopiju Spectragryph (Menges, 2020).



Slika 4.16. Infracrveni spektrometar sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)

4.2.2.12. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida, fenolnih kiselina i antioksidativnog kapaciteta inkapsulata

Za potrebe spektrofotometrijskog određivanja, inkapsulati sokova korena i lista rena (1 g) rastvoreni su u destilovanoj vodi (10 ml) neposredno pred izvođenje analize.

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, sadržaj ukupnih flavonoida i sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u inkapsulatima sokova korena i lista rena određeni su spektrofotometrijski prema metodama prethodno opisanim u potpoglavljima 4.2.1.2.2., 4.2.1.2.3. i 4.2.1.2.4., respektivno. Rezultati su izraženi u mg ekvivalenta galne kiseline (GAE), mg ekvivalenta katehina (CE) i mg ekvivalenta kafene kiseline (CAE) na 100 g suve materije inkapsulata sokova korena i lista rena, respektivno.

Antioksidativna aktivnost inkapsulata sokova korena i lista rena određena je korišćenjem tri metode: DPPH, ABTS i FRAP, prethodno opisanim u potpoglavljima 4.2.1.2.5a., 4.2.1.2.5b. i 4.2.1.2.5c., respektivno. Rezultati su izraženi u mmol Troloks ekvivalenta (TE) na 100 g suve materije inkapsulata sokova korena i lista rena.

4.2.2.13. Hromatografska analiza fenolnih jedinjenja inkapsulata

Za potrebe hromatografske analize, inkapsulati sokova korena i lista rena (1 g) ekstrahovani su sa 10 ml 80% (v/v) metanola koji je sadržao 0,1% HCl. Ekstrakcija je izvedena na orbitalnoj mešalici u trajanju od 1h, na sobnoj temperaturi. Dobijeni ekstrakti su centrifugirani ($3000\times g$, 10 min), a supernatant je sakupljen i skladišten na temperaturi od $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalje upotrebe.

Hromatografska analiza inkapsulata izvršena je prema metodi prethodno opisanoj u potpoglavlju 4.2.1.3.2. Količine pojedinačnih fenolnih derivata su kvantifikovane korišćenjem dostupnih standarda i izražene u mg/100 g inkapsulata sokova korena i lista rena.

4.2.2.14. Određivanje stabilnosti inkapsulata tokom skladištenja

Stabilnost inkapsulata, posmatrano sa aspekta očuvanja sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, ispitivana je tokom šestomesečnog skladištenja inkapsulata pod tri različita temperaturna uslova: u zamrzivaču (-18 °C), u frižideru (4 °C) i na sobnoj temperaturi (25 °C). Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja inkapsulata određivan je metodom po Singleton and Rossi (1965) i Singleton et al. (1999), na način prethodno opisan u potpoglavlju 4.2.1.2.2.

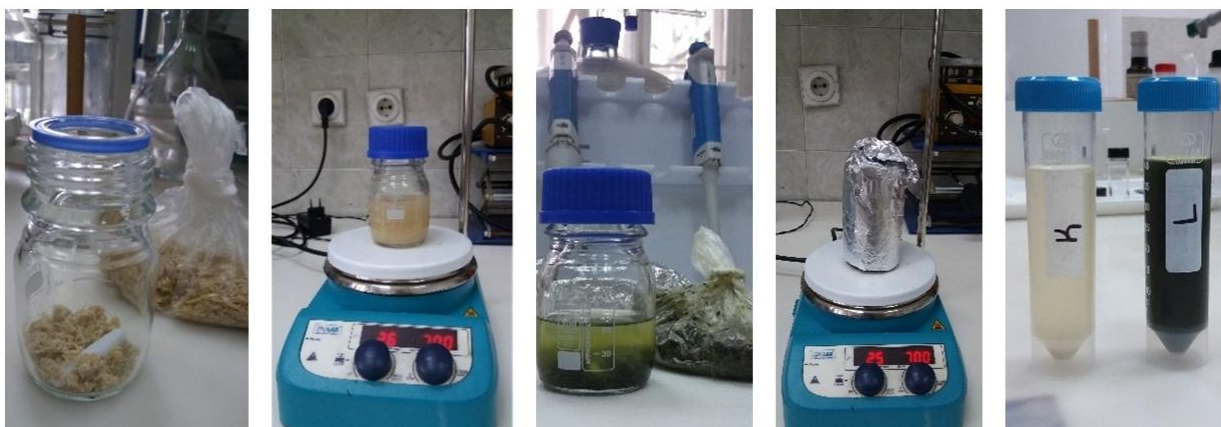
4.2.3. Karakterizacija tropova korena i lista rena

4.2.3.1. Određivanje sadržaja suve materije i sadržaja vlage

Sadržaj suve materije i sadržaj vlage određeni su standardnom gravimetrijskom metodom (AOAC, 2005), prethodno opisanom u potpoglavlju 4.2.1.1. Za analizu je korišćeno ~3 g tropa korena i lista rena.

4.2.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida, fenolnih kiselina i antioksidativnog kapaciteta tropova

U cilju spektrofotometrijske analize, pripremljeni su ekstrakti tropova korena i lista rena konvencionalnom metodom ekstrakcije, tj. maceracijom biljnog materijala sa 80% (v/v) etanolom. Tropovi korena i lista rena (5 g) preliveni su sa 80% (v/v) etanolom (50 ml). Stakleni sud je potom zatvoren i ekstrakcija je izvedena mešanjem na magnetnoj mešalici (veličina magneta 4,0×0,5 cm) na 700 o/min tokom 60 minuta na sobnoj temperaturi u mraku (Slika 4.17). Ekstrakti tropova su zatim filtrirani kroz šestoslojnu medicinsku gazu i skladišteni u mraku na 4 °C do dalje upotrebe (najduže 72 h).



Slika 4.17. Priprema ekstrakata tropova korena i lista rena

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, sadržaj ukupnih flavonoida i sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u tropovima korena i lista rena određen je spektrofotometrijski, metodama prethodno opisanim u potpoglavljljima 4.2.1.2.2., 4.2.1.2.3. i 4.2.1.2.4., respektivno. Rezultati su izraženi u mg ekvivalenata galne kiseline (GAE), mg ekvivalenata katehina (CE) i mg ekvivalenata kafene kiseline (CAE) na 100 g suve materije tropa korena ili tropa lista rena, respektivno.

Antioksidativna aktivnost tropova korena i lista rena određena je korišćenjem tri metode: DPPH, ABTS i FRAP, prethodno opisanim u potpoglavljljima 4.2.1.2.5a., 4.2.1.2.5b. i 4.2.1.2.5c., respektivno. Rezultati su izraženi u mmol Troloks ekvivalenata (TE) na 100 g suve materije tropa korena ili tropa lista rena.

4.2.3.3. Hromatografska analiza fenolnih jedinjenja tropova

U cilju hromatografske analize, tropovi korena i lista rena (1 g) ekstrahovani su sa 10 ml 80% (v/v) metanola koji je sadržao 0,1% HCl. Ekstrakcija je izvedena na orbitalnoj mešalici u trajanju od 1h, na sobnoj temperaturi. Dobijeni ekstrakti su centrifugirani (3000×g, 10 min), a supernatant je sakupljen i skladišten na temperaturi od 4 °C do dalje upotrebe.

Hromatografska analiza tropova izvršena je prema metodi prethodno opisanoj u potpoglavlju 4.2.1.3.2. Količine pojedinačnih fenolnih jedinjenja kvantifikovane su korišćenjem dostupnih standarda i izražene u mg/100 g tropa korena ili lista rena.

4.2.4. Liofilizacija tropova korena i lista rena i karakterizacija dobijenih liofilizata

Tropovi korena i lista rena dobijeni nakon hladnog presovanja podvrgnuti su postupku liofilizacije korišćenjem uređaja Christ beta 2-8 LD plus (Nemačka). Uzorci su sušeni na temperaturi od -40 °C, pri pritisku od 0,12 mbar, u trajanju od 48 h. Nakon liofilizacije, uzorci su vakuumirani u polietilenskim vrećama i čuvani na tamnom mestu na 4 °C do dalje upotrebe.



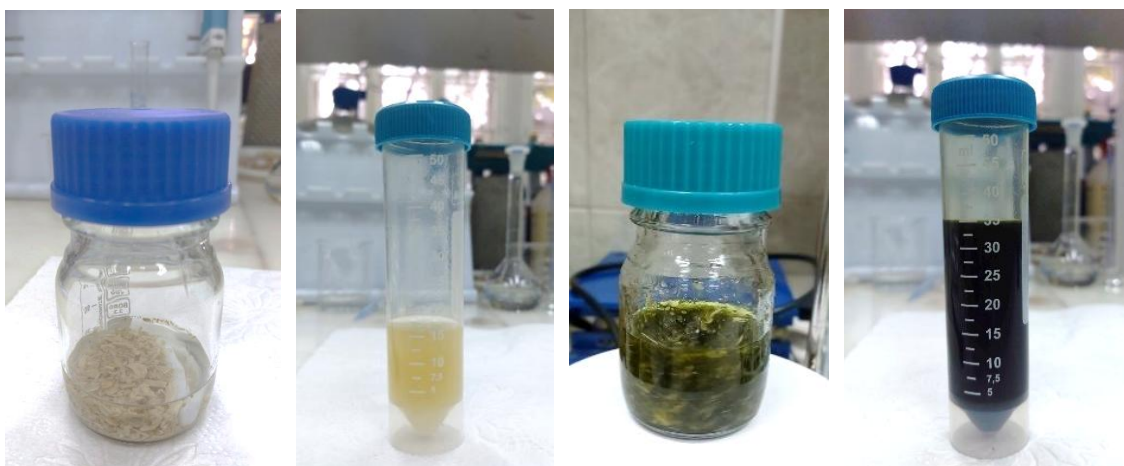
Slika 4.18. Liofilizovani tropovi korena i lista rena

4.2.4.1. Određivanje sadržaja suve materije i sadržaja vlage

Sadržaj suve materije i sadržaj vlage određeni su standardnom gravimetrijskom metodom (AOAC, 2005), prethodno opisanom u potpoglavlju 4.2.1.1. Za analizu je korišćeno ~0,1 g liofilizovanog tropa korena i lista rena.

4.2.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida, fenolnih kiselina i antioksidativnog kapaciteta liofilizovanih tropova

U cilju spektrofotometrijske analize, pripremljeni su ekstrakti liofilizovanih tropova korena i lista rena konvencionalnom metodom ekstrakcije, tj. maceracijom biljnog materijala sa 80% (v/v) etanolom. Liofilizovani trop korena (5 g) i liofilizovani trop lista (2,5 g) preliveni su sa 80% (v/v) etanola (50 ml). Stakleni sud je potom zatvoren i ekstrakcija je izvedena mešanjem na magnetnoj mešalici (veličina magneta 4,0×0,5 cm) na 700 o/min tokom 60 minuta na sobnoj temperaturi u mraku (Slika 4.19). Ekstrakti tropova su zatim filtrirani kroz šestoslojnu medicinsku gazu i skladišteni u mraku na 4 °C do dalje upotrebe (najduže 72 h).



Slika 4.19. Priprema ekstrakata liofilizata tropova korena i lista rena

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, sadržaj ukupnih flavonoida i sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u liofilizovanim tropovima korena i lista rena određen je spektrofotometrijski, metodama prethodno opisanim u potpoglavljima 4.2.1.2.2., 4.2.1.2.3. i 4.2.1.2.4., respektivno. Rezultati su izraženi u mg ekvivalenata galne kiseline (GAE), mg ekvivalenata katehina (CE) i mg ekvivalenata kafene kiseline (CAE) na 100 g suve materije liofilizovanog tropa korena ili liofilizovanog tropa lista rena, respektivno.

Antioksidativna aktivnost liofilizovanih tropova korena i lista rena određena je korišćenjem tri metode: DPPH, ABTS i FRAP, prethodno opisanim u potpoglavljima 4.2.1.2.5a., 4.2.1.2.5b. i 4.2.1.2.5c., respektivno. Rezultati su izraženi u mmol Troloks ekvivalenata (TE) na 100 g suve materije liofilizovanog tropa korena ili liofilizovanog tropa lista rena.

4.2.4.3. Hromatografska analiza fenolnih jedinjenja liofilizovanih tropova

U cilju hromatografske analize, liofilizovani tropovi korena i lista rena (1 g) ekstrahovani su sa 10 ml 80% (v/v) metanola koji je sadržao 0,1% HCl. Ekstrakcija je izvedena na orbitalnoj mešalici u trajanju od 1h, na sobnoj temperaturi. Dobijeni ekstrakti su centrifugirani (3000×g, 10 min), a supernatant je sakupljen i skladišten na temperaturi od 4 °C do dalje upotrebe.

Hromatografska analiza liofilizata izvršena je prema metodi prethodno opisanoj u potpoglavlju 4.2.1.3.2. Količine pojedinačnih fenolnih jedinjenja kvantifikovane su korišćenjem dostupnih standarda i izražene u mg/100 g liofilizovanog tropa korena ili liofilizovanog tropa lista rena.

4.2.5. Proizvodnja majoneza sa dodatkom komponenata rena

4.2.5.1. Priprema majoneza

Uzorci majoneza sa dodatkom komponenata rena pripremani su u Laboratoriji za razvoj i inovacije kompanije Polimark d.o.o. (Beograd, Srbija). Majonezi su pripremani prema formulacijama prikazanim u Tabeli 4.2, a proračun količina komponenata rena koje su dodavane zasnovan je na jednakom sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja od 400 mg GAE/kg majoneza.

Tabela 4.2. Formulacije za proizvodnju majoneza

Uzorak	Suncokretovo ulje (%)	Žumance (%)	Sirće (%)	So (%)	Šećer (%)	Voda (%)	Komponenta rena (%)	Antioksidans (EDTA) (%)
M(K)	75	3	3	1	3	15,00	/	/
M(PK)	75	3	3	1	3	14,9926	/	0,0074
M(K-K)	75	3	3	1	3	12,91	2,09	/
M(IK-MD/AL)	75	3	3	1	3	12,50	2,50	/
M(IK-MD/GG)	75	3	3	1	3	12,54	2,46	/
M(IK-MD/GA)	75	3	3	1	3	12,45	2,55	/
M(L-K)	75	3	3	1	3	14,41	0,59	/
M(IL-MD/AL)	75	3	3	1	3	14,24	0,76	/
M(IL-MD/GA)	75	3	3	1	3	14,17	0,83	/
M(LTK)	75	3	3	1	3	3,58	11,42	/
M(LTL)	75	3	3	1	3	12,83	2,17	/

M(K) – kontrola (majonez bez antioksidanasa), M(PK) – pozitivna kontrola (majonez sa sintetičkim antioksidansom EDTA), M(K-K) – majonez sa sprej sušenim sokom korena rena, M(IK-MD/AL) – majonez sa inkapsuliranim sokom korena rena unutar MD/AL, M(IK-MD/GG) – majonez sa inkapsuliranim sokom korena rena unutar MD/GG, M(IK-MD/GA) – majonez sa inkapsuliranim sokom korena rena unutar MD/GA, M(L-K) – majonez sa sprej sušenim sokom lista rena, M(IL-MD/AL) – majonez sa inkapsuliranim sokom lista rena unutar MD/AL, M(IL-MD/GA) – majonez sa inkapsuliranim sokom lista rena unutar MD/GA, M(LTK) – majonez sa liofilizovanim tropom korena rena, M(LTL) – majonez sa liofilizovanim tropom lista rena.



Slika 4.20. Priprema uzoraka majoneza

Proizvodnja majoneza je započeta mešanjem žumanca u prahu, šećera i soli sa vodom u uređaju Thermomix™ Tm5 (Vorwerk, Wuppertal, Nemačka) (Slika 4.20), brzinom od 5000 o/min u trajanju od 30 s. Zatim je u tankom mlazu postepeno dodavano suncokretovo ulje. Nakon dodavanja 2/3 potrebne količine ulja, dodato je sirće, nakon čega je nastavljeno sa dodavanjem preostale trećine ulja. Potom je dodata potrebna količina određene komponente rena i mešanje je nastavljeno u trajanju od 15 s. Komponente rena dodavane su u poslednjoj fazi proizvodnje majoneza, kako se usled homogenizacije ne bi narušila struktura dodatih inkapsulata. U slučaju proizvodnje pozitivnog kontrolnog uzorka, sintetički antioksidans je pomešan sa ostalim suvim sastojcima i dodat je u prvoj fazi proizvodnje majoneza. Uzorci su upakovani u plastične posude od 200 g (Slika 4.21) i skladišteni u mraku, u rashladnom uređaju na temperaturi od 4 °C tokom 8 nedelja.



Slika 4.21. Pakovanje proizvedenih majoneza

4.2.5.2. Analiza oksidativne stabilnosti majoneza

4.2.5.2.1. Ekstrakcija ulja iz majoneza

U erlenmajer sa šlifom odmeren je uzorak majoneza (25 g), preliven sa petrol etrom (100 ml) i ekstrahovan na orbitalnom šejkeru (16 h, 150 o/min) na sobnoj temperaturi na tamnom mestu. Nakon toga, uzorak je profiltriran kroz kvalitativni filter papir i potom je vršeno uparavanje rastvarača na temperaturi od 40-60 °C (Slika 4.22). Ekstrahovano ulje korišćeno je za analize oksidativne stabilnosti i kvaliteta majoneza.



Slika 4.22. Ekstrakcija ulja iz majoneza

4.2.5.2.2. Određivanje peroksidnog broja

Određivanje peroksidnog broja vršeno je metodom jodometrijske titracije prema SRPS EN ISO 3960:2017. U erlenmajer sa šlifom odmereno je približno 1 g ekstrahovanog ulja, 10 ml smeše glacijalne sirćetne kiseline i hloroforma (3:2 v/v) i 0,2 ml zasićenog rastvora kalijum-jodida. Erlenmajer je potom zatvoren i snažno mućkan (1 min), usled čega je došlo do pojave intenzivno žute boje. Nakon toga, dodato je 20 ml prokuvane i ohlađene destilovane vode i par kapi 0,5% rastvora skroba, što je rezultiralo pojavom plave boje. Titracija je vršena 0,01M rastvorom natrijum-tiosulfata do obezbojenja koje je postojano 30 s, što je ukazivalo na završnu tačku titracije. Smeša svih reagenasa bez dodavanja uzorka je korišćena kao slepa proba. Peroksidni broj (Pbr), izražen u miliekivalentima O₂ po kg ulja, izračunat je prema sledećoj jednačini:

$$Pbr \left(\frac{meq O_2}{kg} \right) = \frac{(V_1 - V_0) \cdot c}{m} \cdot 1000 \quad (9)$$

gde je:

- V_1 – zapremina rastvora Na₂S₂O₃ utrošenog za titraciju uzorka, u ml,
- V_0 – zapremina rastvora Na₂S₂O₃ utrošenog za titraciju slepe probe, u ml,
- c – koncentracija Na₂S₂O₃ korišćenog za titraciju, u mol/l,
- m – masa uzorka, u gramima.

4.2.5.2.3. Određivanje anisidinskog broja

Anisidinski broj govori o koncentraciji sekundarnih proizvoda oksidacije (AOCS, 2017). Određivanje anisidinskog broja zasniva se na reakciji viših nezasićenih aldehida sa *p*-anisidinom u kiseloj sredini, pri čemu nastaju Šifove baze koje imaju apsorpcioni maksimum u UV oblasti (330-350 nm). Povećanje apsorbanse rastvora ulja na 350 nm, usled reakcije sa *p*-anisidinom, merilo je prisutnih karbonilnih jedinjenja. Vrednost ove apsorbanse pomnožena sa 100 daje anisidinski broj.

Određivanje anisidinskog broja izvedeno je prema standardnoj metodi SRPS EN ISO 6885:2017. Pre analize pripremljen je *p*-anisidinski reagens, rastvaranjem 0,125 g *p*-anisidina u 50 ml glacijalne sirćetne kiseline. U normalni sud od 25 ml odmereno je oko 2 g ekstrahovanog ulja, dopunjeno do crte izooktanom i snažno mućkano. U set epruveta preneto je po 5 ml pripremljenog

rastvora ulja i dopunjeno sa 1 ml prethodno pripremljenog *p*-anisidinskog reagensa, zatim dobro promešano i ostavljeno u mraku 10 minuta, nakon čega je izmerena apsorbanca na UV/Vis spektrofotometru HALO DB-20S (Dynamica Scientific Ltd., Velika Britanija). Slepna proba pripremljena je tako što je umesto 5 ml uzorka otpipetirana ista zapremina izooktana.

Spektrofotometrijsko merenje započeto je očitavanjem apsorbance rastvora uzorka koji je reagovao sa *p*-anisidinom na 350 nm, prema slepoj probi. Potom je kiveta isprana izooktanom i očitana je apsorbanca rastvora uzorka koji nije reagovao sa *p*-anisidinom, prema slepoj probi. Anisidinski broj (*Abr*), izražen kao 100 puta veća optička gustina, merena spektrofotometrijski kao apsorbanca 1% rastvora na 350 nm, izračunat je prema sledećoj jednačini:

$$Abr (100 \cdot A_{350nm}^{1\%}) = \frac{25 \cdot (1,2 \cdot A_1 - A_0)}{m} \quad (10)$$

gde je:

- A_0 – apsorbanca rastvora uzorka za ispitivanje koji nije reagovao sa *p*-anisidinom, meren prema slepoj probi,
- A_1 – apsorbanca rastvora uzorka za ispitivanje koji je reagovao sa *p*-anisidinom, meren prema slepoj probi,
- m – masa dela uzorka za ispitivanje, u gramima.

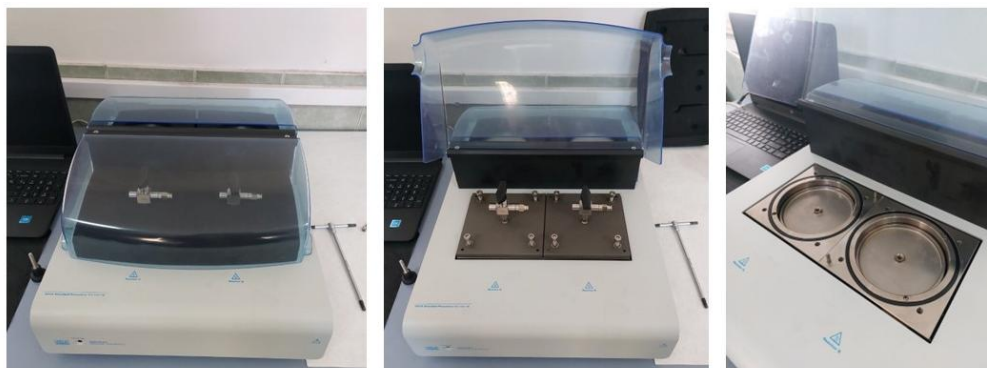
4.2.5.2.4. Oksidativna vrednost (TOTOX vrednost)

Oksidativna vrednost ili TOTOX vrednost (engl. *Total Oxidation Value*) predstavlja sadržaj primarnih i sekundarnih produkata oksidacije ulja. TOTOX vrednost je izračunata prema sledećoj jednačini (Holm and Ekbohm-Olsson, 1972; Dimić i Turkulov, 2000):

$$TOTOX = 2Pbr + Abr \quad (11)$$

4.2.5.2.5. Test ubrzane oksidacije majoneza

Oksidativna stabilnost proizvedenih majoneza procenjena je i primenom testa ubrzane oksidacije, neposredno nakon njihove pripreme. Korišćen je OXITEST reaktor (VELP, Usmate, MB, Italija) sa dve oksidacione komore, koje rade na temperaturi od 90 °C i pri pritisku kiseonika od 6 bar (Slika 4.23). Majonezi (10 g) su homogeno raspoređeni u posudama za uzorke ovog reaktora i testirano je njihovo „vreme stabilnosti“, odnosno vreme dok pritisak kiseonika u komori nije počeo da se smanjuje, direktno ukazujući na oksidaciju lipida. Indukcioni period (IP), izražen u minutima, izračunat je na osnovu podataka oksidacione krive, korišćenjem dvotangentne metode programa OXISoft™ instrumenta.



Slika 4.23. OXITEST reaktor (VELP, Usmate, MB, Italija)

4.2.5.3. Analiza kvaliteta majoneza

4.2.5.3.1. Određivanje kiselinskog broja

Sadržaj slobodnih masnih kiselina određen je metodom alkalometrijske titracije prema SRPS EN ISO 660:2021. U erlenmajer je odmereno ekstrahovano ulje (5 g), smeša 95% (v/v) etanola i dietil etra (1:1, 50 ml) (prethodno neutralisana 1% rastvorom fenolftaleina do pojave bledo ružičaste boje) i par kapi 1% rastvora fenolftaleina. Titracija je vršena 0,1M standardnim etanolnim rastvorom kalijum-hidroksida uz kružno mešanje do završne tačke titracije, koju označava pojava bledo ružičaste boje, postojana minimalno 10 sekundi. Kiselinski broj (Kbr) izračunat je prema sledećoj jednačini:

$$Kbr \left(\frac{mg KOH}{g} \right) = \frac{56,1 \cdot V \cdot c}{m} \quad (12)$$

gde je:

- V – zapremina 0,1M KOH utrošenog za titraciju, u ml,
- c – koncentracija KOH korišćenog za titraciju, u mol/l,
- $56,1$ – molekulska masa KOH, u g/mol,
- m – masa uzorka, u gramima.

4.2.5.3.2. Određivanje pH vrednosti majoneza

Korišćenjem uređaja Cyberscan PC 5000 (Eutech Instruments, Singapur) određena je pH vrednost uzoraka, zaranjanjem elektrode pH-metra direktno u uzorak i očitavanjem vrednosti (Slika 4.24).



Slika 4.24. Određivanje pH vrednosti majoneza

4.2.5.4. Senzorna analiza majoneza

Senzorni profil uzoraka majoneza okarakterisan je ispitivanjem stepena prihvatljivosti proizvoda od strane potrošača, korišćenjem hedonske skale sa devet podeoka, pri čemu je broj 1 označavao izuzetno nedopadanje, broj 5 nit mi se dopada nit mi se ne dopada, a broj 9 izuzetno dopadanje. Analizirani su sledeći senzorni atributi proizvoda: boja i izgled, miris, ukus, tekstura i opšta prihvatljivost. U ispitivanju su učestvovali obučeni panelisti (prema standardu ISO 8586:2012) iz kompanije Polimark d.o.o. (Beograd, Srbija), kao i neobučeni panelisti, studenti Odseka za prehrambenu tehnologiju i biohemiju Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Senzorni tim bio je sačinjen od 54 ocenjivača, među kojima je bilo 44% muškaraca i 56% žena, koji redovno

konzumiraju majonez i čiji je prosek godina 26. Niko od ocenjivača nije bio obavešten o sastavu uzoraka pre ocenjivanja. Uslovi i metodologija senzorne evaluacije sprovedeni su prema sledećim ISO standardima: ISO 8589:2007 i ISO 11136:2014. Senzorna analiza je obavljena u skladu sa Kodeksom profesionalne etike Univerziteta u Beogradu (Senat Univerziteta u Beogradu), kako bi svaki ocenjivač objektivno mogao da dodeli odgovarajuću ocenu. Senzornoj evaluaciji je prethodio informisani pristanak svih učesnika, navodeći da su svesni da su pristali da učestvuju u ovoj studiji, da su njihovi odgovori poverljivi i da se mogu koristiti, da nikakvi podaci o učesnicima neće biti objavljeni bez njihovog znanja i da se mogu povući iz studije u bilo kom trenutku. Svi testirani proizvodi bili su bezbedni za upotrebu. Uzorak kontrole (majonez bez antioksidanasa), pozitivne kontrole (majonez sa komercijalnim sintetičkim antioksidansom koji se koristi u pomenutoj kompaniji) i majoneza sa komponentama rena servirani su u providne plastične posude, kako bi panelisti mogli bolje uočiti boju i izgled proizvoda. Majonezi bez dodatih inkapsulata (kontrola) i sa sintetičkim antioksidansom (pozitivna kontrola) servirani su potrošačima kao referentni proizvodi. Uzorci su šifrovani trocifrenim brojevima dobijenim potpuno slučajnim izborom (iz tablice slučajnih brojeva). Panelistima je predloženo da prvo ocene boju i izgled, a da potom proizvode degustiraju i ocene preostala senzorna svojstva. Za ispiranje usta između proba servirane su čašice sa vodom i dvopek.

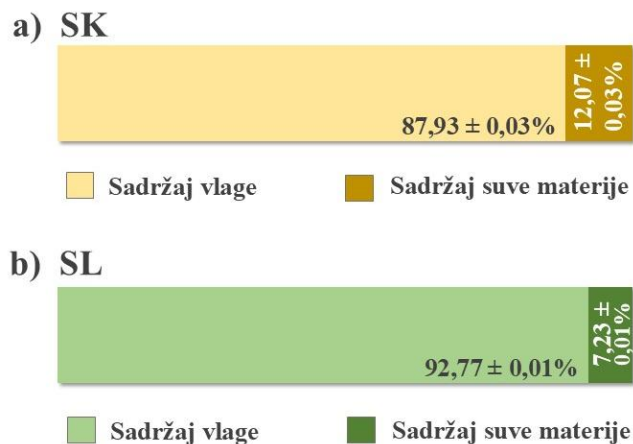
4.2.6. Statistička obrada podataka

Statistička obrada rezultata izvedena je primenom softverskog paketa SPSS Statistics 25.0 (IBM, Armonk, Njujork, SAD). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija. Ispitivan je uticaj korišćenih nosača (nezavisna varijabla) na različite parametre inkapsulata (zavisna varijabla). Prvobitno je testirana homogenost varijansi *Levene* testom i normalnost podataka *Shapiro-Wilk* testom. Ako varijanse nisu bile homogene i podaci nisu sledili normalnu raspodelu, korišćen je neparametarski *Kruskal-Wallis* test uz *post hoc* poređenje *Mann-Whitney U* testom. Kada su varijanse bile homogene i podaci normalno raspoređeni, primenjena je jednofaktorska analiza varijanse (*one-way ANOVA*) uz *post hoc* poređenje *Duncan* testom višestrukih intervala. Odstupanje veličine čestica inkapsuliranih prahova od normalne (Gausove) raspodele određeno je *Kolmogorov-Smirnov* testom normalnosti. Nivo statističke značajnosti za sve primenjene testove bio je postavljen na $p < 0,05$.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. KARAKTERIZACIJA SOKOVA KORENA I LISTA RENA

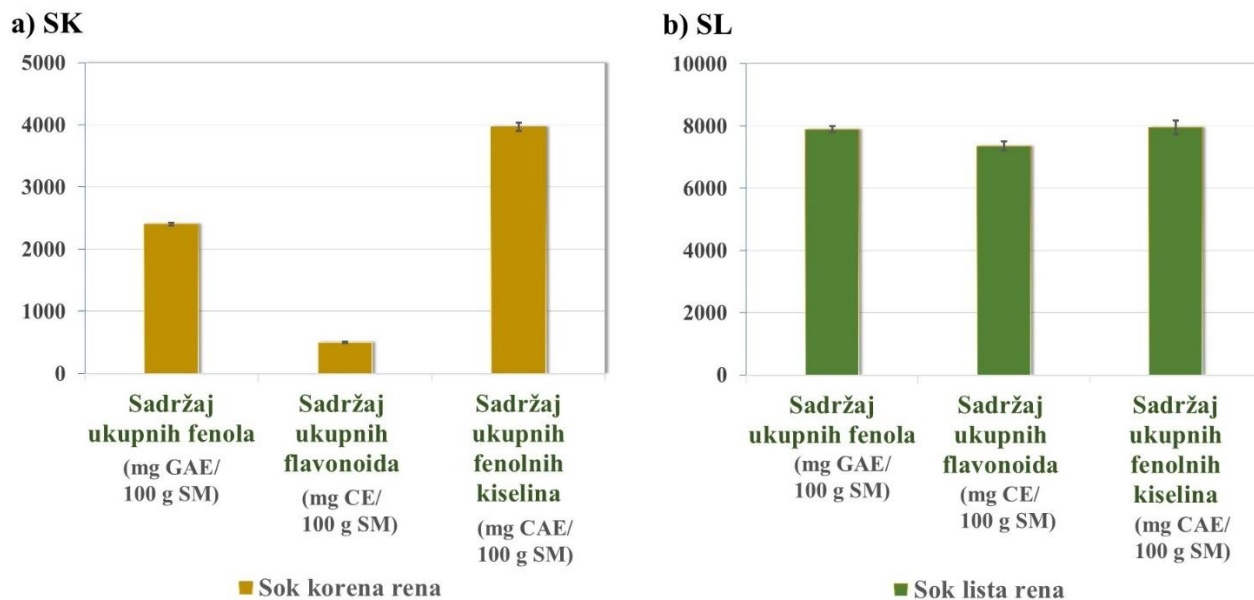
U cilju izražavanja rezultata spektrofotometrijske i hromatografske analize sokova korena i lista rena, određen je sadržaj suve materije, koji je iznosio 12,07% za sok korena rena i 7,23% za sok lista rena (Slika 5.1). Prema dostupnim literaturnim podacima, sadržaj suve materije korena varira u opsegu od 24-36% (Sahasrabudhe and Mullin, 1980; Agneta et al., 2014), pa se može zaključiti da je nakon presovanja korena rena u soku zadržano oko 30-50% suve materije. Sadržaj suve materije soka lista rena bio je značajno niži u odnosu na sok korena rena. Stoga je prinos hladnog presovanja soka lista rena bio ~10% viši od prinosa hladnog presovanja soka korena rena.



Slika 5.1. Sadržaj vlage i sadržaj suve materije sokova a) korena (SK) i b) lista (SL) rena

5.1.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih fenolnih kiselina sokova

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, sadržaja ukupnih flavonoida i sadržaja ukupnih fenolnih kiselina u sokovima korena i lista rena prikazani su na Slici 5.2.



Slika 5.2. Sadržaj ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih fenolnih kiselina sokova a) korena (SK) i b) lista (SL) rena

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) u soku korena rena ($2400,44 \pm 22,82$ mg GAE/100 g SM) bio je oko 4 puta niži u poređenju sa sokom lista rena ($7888,20 \pm 105,99$ mg GAE/100 g SM). To je u saglasnosti sa prijavljenim literaturnim podacima drugih autora o višem sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja u listu nego u korenu rena (Calabrone et al., 2015; Tomsone et al., 2020b; Tomsone et al., 2020c). Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u sokovima korena i lista rena, analiziranim u okviru ove disertacije, bio je viši nego u korenu i listu rena prijavljenom u literaturi (Tomsone et al., 2013a; Karafyllaki et al., 2023), što se može objasniti ekstrahovanjem i povećanom dostupnošću fenolnih jedinjenja nakon hladnog presovanja, kao i hidrofилnom prirodom ovih bioaktivnih komponenata (Barros et al., 2013). Takođe, na razlike u sadržaju ovih jedinjenja mogli su uticati različiti agroekološki i agrotehnički uslovi, kao i različiti načini ekstrakcije i obrade biljnog materijala. Prijavljen je niži TPC u sokovima drugih vrsta iz Brassicaceae familije: u rotkvici $0,48-3,29$ mg GAE/100 g, kupusu $1,90-3,60$ mg GAE/100 g i karfiolu $2,24-2,69$ mg GAE/100 g (Önder et al., 2020). Prema tome, analizom sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja utvrđeno je da sokovi korena i lista rena predstavljaju veoma bogat izvor ovih antioksidanasa, čineći ih sirovinom sa izraženim potencijalom za primenu u prehrambenim proizvodima u cilju sprečavanja oksidacije i produženja roka trajanja proizvoda.

Sadržaj ukupnih flavonoida (TFC) u soku korena rena ($499,75 \pm 9,18$ mg CE/100 g SM) bio je ~20 puta niži od soka lista rena ($7353,62 \pm 143,80$ mg CE/100 g SM). To se može objasniti činjenicom da su flavonoidi snažni UV apsorberi, koji učestvuju u fotozaštiti biljke i pretežno se akumuliraju u ćelijama epidermisa, zbog čega je njihov sadržaj značajno viši u nadzemnim delovima biljke (Bozzo and Unterlander, 2021). Sličan trend, ali značajno niži opseg vrednosti sadržaja ukupnih flavonoida, prijavljen je u vodeno-metanolnim ekstraktima korena ($1,26-0,75$ mg QE/g SM) i lista ($1,71-0,95$ mg QE/g SM) rena (Calabrone et al., 2015). Takođe, rezultati dobijeni u okviru ove disertacije bili su značajno viši u poređenju sa sadržajem ukupnih flavonoida u svežem ($5889,85$ mg CE/100 g SM), zamrznutom ($6178,03$ mg CE/100 g SM) i osušenom ($287,79$ mg CE/100 g SM) listu rena (Tomsone and Kruma, 2014). Suprotno tome, prethodne studije prijavile su viši sadržaj ukupnih flavonoida u etanolnim ekstraktima korena rena podvrgnutog različitim načinima termičke obrade ($603,50-738,38$ mg CE/100 g SM) (Tomsone et al., 2013a), kao i u sprej sušenom soku korena (620 mg CE/100 g SM) i lista (12006 mg CE/100 g SM) rena (Tomsone et al., 2020b). Kao i u slučaju sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, različiti uslovi gajenja, primenjeni načini ekstrakcije i obrada biljnog materijala mogli su dovesti do navedenih razlika u sadržaju ukupnih flavonoida u poređenju sa prijavljenim literaturnim podacima. Generalno se može zaključiti da sokovi korena i lista rena predstavljaju veoma bogate izvore ovih sekundarnih biljnih metabolita sa brojnim biološkim aktivnostima i izraženim antioksidativnim delovanjem.

Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina (TPAC) pratio je isti trend kao i u slučaju TPC i TFC. Dakle, značajno viši TPAC bio je zastupljen u soku lista ($7943,71 \pm 222,37$ mg CAE/100 g SM) nego u soku korena ($3963,91 \pm 69,52$ mg CAE/100 g SM) rena. Iako su flavonoidi dominantni fenoli, čineći dve trećine svih fenolnih jedinjenja, fenolne kiseline, zbog svog izraženog antioksidativnog potencijala i brojnih zdravstvenih benefita, postale su predmet interesovanja sve većeg broja konzumenata koji vode računa o pravilnoj ishrani (Robbins, 2003). Kao posledica toga, saopštene su brojne studije o sadržaju fenolnih kiselina u ekstraktima različitih biljnih vrsta, kao što su: mušmula ($3,20$ mg CAE/g), trnjina ($4,13$ mg CAE/g), glog ($2,05$ mg CAE/g) (Katanić Stanković et al., 2022), beli ($0,13-1,13$ μ g CAE/g SM) i crni dud ($2,53-14,92$ μ g CAE/g SM) (Polumackanycz et al., 2021), brusnica ($42,54-50,98$ mg CAE/g) (Barak et al., 2019), raž ($12,19-550,58$ mg CAE/kg) (Kulichová et al., 2019), kamilica ($5-34$ mg CAE/g) (Chen et al., 2022), *Thymus* vrste ($22,95-59,62$ mg CAE/g SM) (Vergun et al., 2022), *Crambe* vrste ($\sim 2-10$ mg CAE/g) (Vergun et al., 2021), itd. Takođe, Vergun et al. (2021) su saopštili da je u nadzemnom delu rena bilo zastupljeno $2-7$ mg CAE/g, a u sprej sušenom soku korena i lista rena

2461 i 3629 mg CAE/100 g SM, respektivno, kako su prijavili Tomson et al. (2020b). Rezultati određivanja sadržaja ukupnih fenolnih kiselina sokova korena i lista rena dobijeni u okviru ove disertacije bili su značajno viši od rezultata navedenih studija, ističući sokove korena i lista rena kao sirovinu koja obiluje ovim biološki aktivnim komponentama sa širokim spektrom antioksidativnog delovanja.

5.1.2. Hromatografska analiza fenolnog profila sokova

Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja u sokovima korena i lista rena određen hromatografskom analizom prikazan je u Tabeli 5.1. U soku korena rena ukupno je identifikovano i kvantifikovano 13 fenolnih jedinjenja, među kojima su pronađene sledeće klase fenolnih jedinjenja: 1) fenolne kiseline i njihovi derivati (6 jedinjenja) i 2) flavonoli i njihovi derivati (7 jedinjenja). Fenolne kiseline i njihovi derivati bili su zastupljeni u soku korena rena u koncentraciji od 117,64 mg/100 g, što je činilo 45,92% od ukupno kvantifikovanih fenolnih jedinjenja, dok su flavonoli i njihovi derivati bili zastupljeni u koncentraciji od 138,46 mg/100 g, što je činilo 54,08% od ukupno kvantifikovanih fenolnih jedinjenja. Dominantna fenolna jedinjenja u soku korena rena bili su kempferol (91,26 mg/100 g) i heksozid dihidroksibenzojeve kiseline izomer II (55,41 mg/100 g). U soku lista rena ukupno je identifikovano i kvantifikovano 16 fenolnih jedinjenja, među kojima su pronađene sledeće klase fenolnih jedinjenja: 1) fenolne kiseline i njihovi derivati (6 jedinjenja), 2) flavonoli i njihovi derivati (9 jedinjenja) i 3) derivati elagitanina (1 jedinjenje). Od ukupno kvantifikovanih fenolnih jedinjenja, fenolne kiseline i njihovi derivati činili su 26,94% (53,15 mg/100 g), flavonoidi i njihovi derivati 68,48% (135,08 mg/100 g) i derivati elagitanina 4,58% (9,04 mg/100 g). Dominantna fenolna jedinjenja u soku lista rena bili su kempferol-3-*O*-(2"-pentozil)heksozid (66,66 mg/100 g) i heksozid dihidroksibenzojeve kiseline izomer I (19,91 mg/kg). Fenolne kiseline su kvantitativno bile dominantnije u soku korena rena nego u soku lista rena, dok se sadržaj flavonoida u soku korena i lista rena nije značajno razlikovao. Suprotan trend rezultata dobijenih spektrofotometrijskim i hromatografskim određivanjem ukupnih i pojedinačnih fenolnih jedinjenja mogao je poticati od razlika u pripremi uzoraka za analizu, korišćenim ekstrakcionim medijumima, primenjenoj metodologiji i dostupnosti korišćenih standardnih jedinjenja. Derivati elagitanina detektovani su u soku lista rena, dok nisu pronađeni u soku korena rena. S obzirom na to da su ova jedinjenja takođe pokazala osobinu uklanjanja slobodnih radikala (Johana Ortega Villalba et al., 2020), njihov doprinos antioksidativnoj aktivnosti soka lista rena bi mogao biti značajan.

Tabela 5.1. Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja i njihovih derivata (mg/100 g soka) u soku korena (SK) i soku lista rena (SL) određen hromatografskom analizom

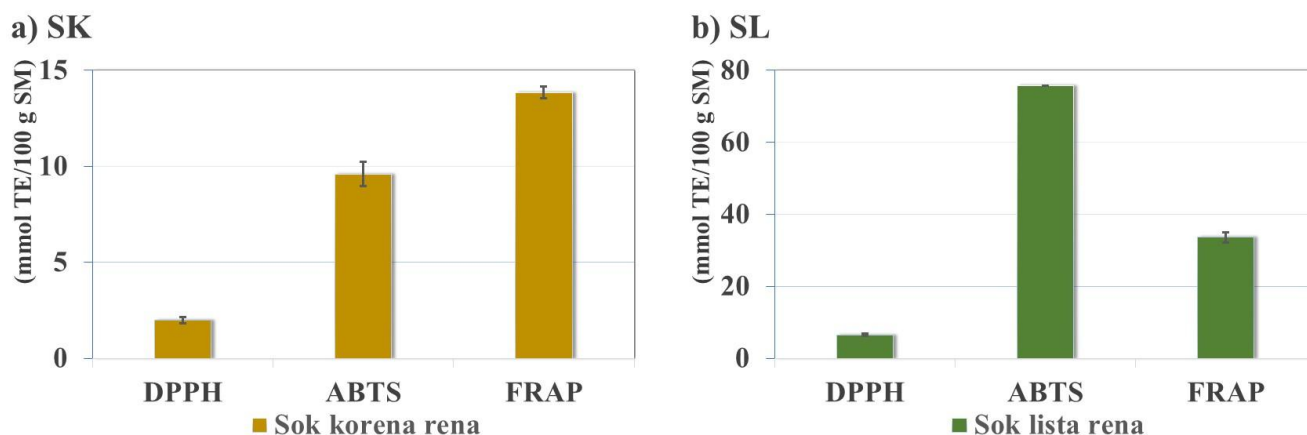
Broj	Naziv jedinjenja	SK	SL
<i>Fenolne kiseline i derivati</i>			
		<i>mg/100 g</i>	
1	Dihidroksibenzoeva kiselina heksozid izomer I ^b	10,21	19,91
2	Dihidroksibenzoeva kiselina heksozid izomer II ^b	55,41	16,78
3	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina izomer I ^b	15,08	4,90
4	Siringinska kiselina heksozid ^b	5,21	8,71
5	Dihidroksibenzoeva kiselina ^b	17,52	1,95
6	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina izomer II ^b	14,20	0,90
		Σ	117,64
			53,15
<i>Flavonoli i derivati</i>			
7	Kempferol 3- <i>O</i> -(6''-pentozil)heksozid-7- <i>O</i> -heksozid ^c	/	13,11
8	Kvercetin 3- <i>O</i> -(6''-pentozil)heksozid ^c	/	22,46
9	Kempferol 3- <i>O</i> -(2''-heksozil)heksozid ^c	4,60	14,36
10	Kempferol 3- <i>O</i> -(2''-pentozil)heksozid ^c	17,97	66,66
11	Morin ^c	10,27	<LOQ
12	Kempferol 3- <i>O</i> -(6''-ramnozil)heksozid ^c	/	0,77
13	Kempferol 3- <i>O</i> -(2''-pentozil)pentozid ^c	3,24	/
14	Kvercetin ^a	5,70	7,42
15	Kempferol ^c	91,26	9,61
16	Izoramnatin ^c	5,43	0,69
		Σ	138,46
			135,08
<i>Ostala detektovana fenolna jedinjenja</i>			
17	Elagitanin derivat ^b	/	9,04
		ΣΣ	256,10
			174,12

^aJedinjenja kvantifikovana korišćenjem dostupnih standarda. ^bJedinjenja kvantifikovana i izražena kao ekvivalenti gentizinske kiseline. ^cJedinjenja kvantifikovana i izražena kao ekvivalenti kvercetina. / -Nedetektovana fenolna jedinjenja. <LOQ - < Limit kvantifikacije.

5.1.3. Antioksidativna aktivnost sokova

Antioksidativni kapacitet sokova korena i lista rena određen je primenom DPPH, ABTS i FRAP metode, a dobijeni rezultati prikazani su na Slici 5.3. Ukupan antioksidativni kapacitet uzoraka veoma je teško odrediti zbog raznovrsnosti i složenosti antioksidativnih jedinjenja (Dai and Mumper, 2010). Takođe, postoje brojna ograničenja samih metoda za određivanje antioksidativnog potencijala uzoraka, koja podrazumevaju selektivnost ka samo hidrofobnim ili samo hidrofilnim komponentama, upotrebu različitih standarda za izražavanje rezultata, različite pH vrednosti odvijanja reakcije, osetljivost reagenasa na svetlost, interakcije sa drugim komponentama hrane, itd. Stoga je veoma značajno kombinovati više različitih metoda u cilju što pouzdanije procene antioksidativne aktivnosti uzoraka (Charles, 2013). U ovoj disertaciji, korišćene su metode čiji se mehanizam zasniva na aktivnosti antioksidanasa iz korena i lista rena da neutrališu slobodne radikale (DPPH[•] i ABTS^{•+}) doniranjem protona ili elektrona, na taj način sprečavajući njihovu radikalsku aktivnost i dalje interakcije sa drugim molekulima prisutnim u hrani. Osim toga, procenjena je sposobnost antioksidanasa prisutnih u korenu i listu rena da izvrše redukciju Fe³⁺ jona, primenom FRAP metode. Ove metode često se koriste za procenu antioksidativnog potencijala sokova i ekstrakata povrća i voća, pa je stoga njihovim korišćenjem omogućeno upoređivanje dobijenih rezultata sa literaturnim podacima.

Niži antioksidativni potencijal (mmol TE/100 g SM) soka korena rena: $1,98 \pm 0,16$ (DPPH), $9,60 \pm 0,64$ (ABTS) i $13,84 \pm 0,31$ (FRAP) u poređenju sa antioksidativnim potencijalom (mmol TE/100 g SM) soka lista rena: $6,58 \pm 0,40$ (DPPH), $75,62 \pm 0,00$ (ABTS) i $33,61 \pm 1,35$ (FRAP) potvrđen je primenom sve tri metode za određivanje antioksidativne aktivnosti analiziranih sokova. Dobijeni rezultati bili su u saglasnosti sa rezultatima određivanja sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih fenolnih kiselina. Među metodama koje se zasnivaju na sposobnosti antioksidanasa da hvataju slobodne radikale, više vrednosti antioksidativne aktivnosti dobijene su ABTS metodom nego DPPH metodom. To se može objasniti činjenicom da je u sokovima korena i lista rena sadržano više hidrofилnih antioksidanasa (kao što su fenolna jedinjenja), koji interaguju sa hidrofилnim radikalom (ABTS^{•+}), nego hidrofobnih, koji bi hvatali hidrofobne DPPH[•] radikale. Sok korena rena imao je nižu, a sok lista rena višu ABTS aktivnost od sokova drugog povrća iz porodice Brassicaceae, kao što su: rotkvica (22-30 mmol TE/100 g), kupus (25-28 mmol TE/100 g) i karfiol (25-27 mmol TE/100 g) (Önder et al., 2020). Sun et al. (2007) saopštili su niže vrednosti antioksidativnog potencijala soka brokolija određenih DPPH (0,4 mmol TE/l) i ABTS (2,2 mmol TE/l) metodom u poređenju sa rezultatima antioksidativne aktivnosti sokova korena i lista rena dobijenim u ovoj disertaciji. Vrednosti antioksidativne aktivnosti sokova različitih sorti belog kupusa (4,75 mmol TE (DPPH), 11,52 mmol TE (ABTS) i 19,09 μ mol Fe²⁺ (FRAP)) (Šamec et al., 2011) bile su u opsegu vrednosti antioksidativne aktivnosti sokova korena i lista rena. Navedena poređenja ukazuju na visok antioksidativni kapacitet hladno presovanih sokova korena i lista rena i njihov potencijal za implementaciju u prehrambene proizvode podložne oksidaciji u cilju očuvanja oksidativne stabilnosti i produženja roka trajanja.



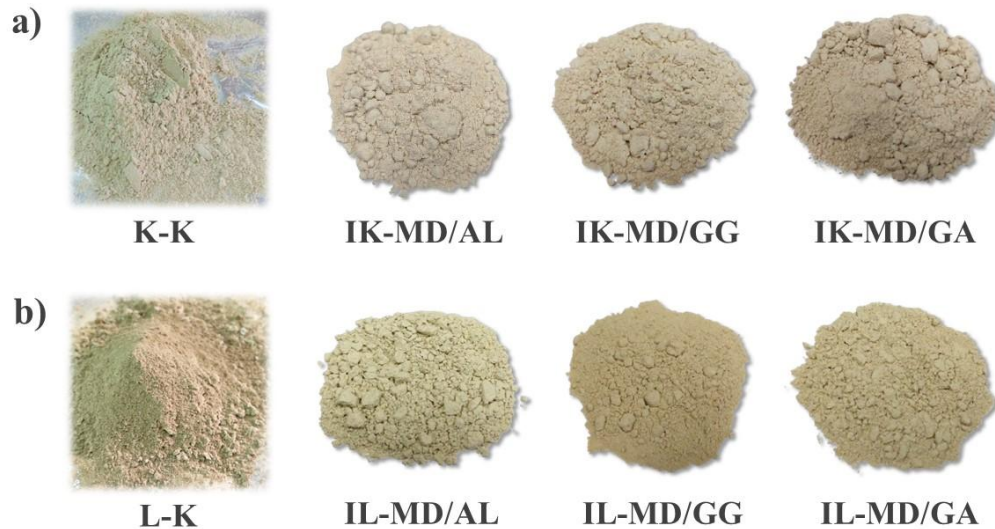
Slika 5.3. Antioksidativna aktivnost sokova a) korena (SK) i b) lista (SL) rena, određena DPPH, ABTS i FRAP metodom

5.2. KARAKTERIZACIJA INKAPSULATA SOKOVA KORENA I LISTA RENA

Zbog visokog sadržaja vode i enzimske aktivnosti, bioaktivne komponente sokova od povrća i voća su veoma nestabilne i lako se transformišu u druga jedinjenja sa manje poželjnim senzornim karakteristikama, što ograničava njihovu primenu u prehrambenim proizvodima (Tomsone et al., 2020b). Stoga je sokove dobijene hladnim presovanjem poželjno zaštititi i sačuvati od spoljašnjih uticaja, u cilju očuvanja njihovog bioaktivnog potencijala. To se može postići inkapsuliranjem sokova unutar strukture različitih biopolimernih nosača, koji formiraju zaštitni sloj oko aktivnih komponenata i time ih čuvaju od nepoželjnih uslova okoline, kao što su svetlost, vlaga i kiseonik (Yousuf et al., 2016).

U tu svrhu, sokovi korena i lista rena inkapsulirani su tehnikom sprej sušenja unutar sledećih kombinacija nosača: maltodekstrin/alginat, maltodekstrin/guar guma i maltodekstrin/arapska guma, a dobijeni prahovi prikazani su na Slici 5.4. U nastavku disertacije nalaze se rezultati fizičko-hemijske,

morfološke, spektrofotometrijske i hromatografske analize dobijenih inkapsulata, kao i studija njihove stabilnosti tokom skladištenja. Nakon toga, inkapsulati su implementirani u prehrambeni proizvod (majonez) i ispitan je njihov uticaj na oksidativnu stabilnost, kvalitet i senzornu prihvatljivost majoneza tokom skladištenja.

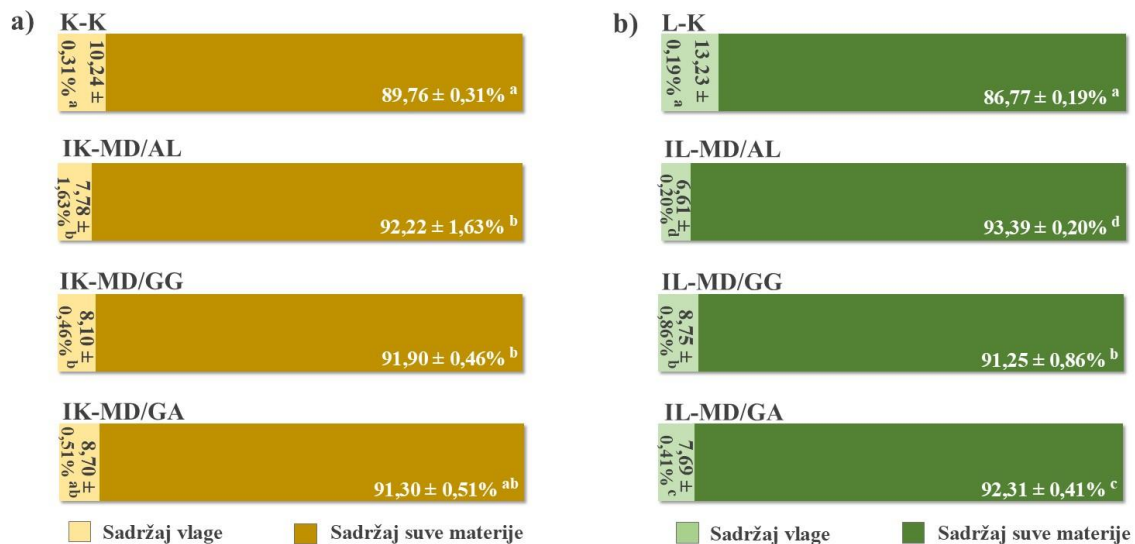


Slika 5.4. Sprej sušeni sokovi a) korena (K-K, IK-MD/AL, IK-MD/GG i IK-MD/GA) i b) lista (L-K, IL-MD/AL, IL-MD/GG i IL-MD/GA) rena

5.2.1. Fizičko-hemijska karakterizacija inkapsulata

5.2.1.1. Sadržaj suve materije i sadržaj vlage inkapsulata

Sadržaj vlage, aktivnost vode i higroskopnost su važni parametri koji određuju fizičko-hemijsku i biološku stabilnost inkapsuliranih komponenata. Sadržaj vlage i sadržaj suve materije sprej sušenih sokova korena i lista rena bez nosača (kontrolni uzorci: K-K i L-K) i inkapsuliranih unutar različitih nosača (IK-MD/AL, IK-MD/GG i IK-MD/GA; IL-MD/AL, IL-MD/GG i IL-MD/GA) prikazani su na Slici 5.5.



Slika 5.5. Sadržaj vlage i sadržaj suve materije sprej sušenih prahova soka a) korena (K-K, IK-MD/AL, IK-MD/GG i IK-MD/GA) i b) lista (L-K, IL-MD/AL, IL-MD/GG i IL-MD/GA) rena (^{a,b,c...} Različita slova među sprej sušenim prahovima soka korena, odnosno lista rena, ukazuju na značajne razlike;

p<0,05)

Inkapsulacijom sokova korena i lista rena unutar različitih polisaharidnih nosača smanjen je sadržaj vlage u poređenju sa kontrolnim uzorcima, čime je potencijalno postignuta povećana otpornost inkapsulata prema mikrobiološkom kvarenju i fizičko-hemijskoj degradaciji. U ovom pogledu posebno su se istakli uzorci inkapsulirani unutar MD/AL, koji su sadržali najniži procenat vlage u slučaju soka korena (7,78%), kao i soka lista rena (6,61%). Sadržaj vlage inkapsulata ekstrakta žižule sa alginatom, koje su razvili Khoshdouni Farahani et al. (2022), određen je standardnom gravimetrijskom metodom (AOAC, 1995) i iznosio je između 10 i 20%. Viši sadržaj vlage kvantifikovan je u uzorcima inkapsuliranim unutar MD/GA u poređenju sa drugim inkapsuliranim formulacijama sokova korena i lista rena. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima autora Pieczykolan and Kurek (2019), koji su prijavili viši sadržaj vlage u soku od aronije inkapsuliranom u MD i GA nego u inulinu, guar gumi, pektinu i beta-glukanu. Različiti sadržaji vlage mogli su biti posledica prisustva hidrofilnih grupa i sklonosti hidrokoloida da vezuju vodu, u čemu se posebno ističu upravo ova dva hidrokoloida. Naime, hemijska struktura maltodekstrina i arapske gume sastoji se od velikog broja grananja i hidrofilnih grupa, odakle potiče karakteristika da tokom manipulacije ovim prahom lako dolazi do vezivanja molekula vode iz ambijentalnog vazduha (Mahdavi et al., 2016). Najviši sadržaj vlage među svim inkapsuliranim formulacijama kvantifikovan je u soku lista rena inkapsuliranom unutar MD/GG. Iako je sadržaj guar gume zbog osobine da brzo vezuje vodu (Mudgil et al., 2014) u formulaciji inkapsulata bio smanjen (odnos MD/GG 9:1) u poređenju sa udelom drugih hidrokoloida (odnos MD/AL 4:1 i MD/GA 4:1), došlo je do formiranja veoma viskozne koloidne disperzije. To je doprinelo stvaranju krupnih kapljica napojne smeše, čime je otežano njihovo sušenje u struji toplog vazduha sprej sušača, rezultujući višim sadržajem vlage ove formulacije inkapsuliranih sokova.

5.2.1.2. Prinos inkapsulacije

S obzirom na to da je prinos veoma važan indikator za industrijsku prihvatljivost procesa inkapsulacije, cilj optimizacije procesa je da se izaberu nosači koji obezbeđuju visok prinos inkapsulacije. Rezultati određivanja prinosa inkapsulacije sokova korena i lista rena inkapsuliranih unutar različitih nosača prikazani su u Tabelama 5.2 i 5.3.

Prinos sprej sušenih prahova veći od 50% predstavlja indikator uspešnog sušenja u laboratorijskim uslovima (Du et al., 2014). U tom pogledu, među inkapsulatima soka korena rena izdvojili su se prahovi sa MD/AL, čiji je prinos inkapsulacije iznosio 58,32%. Ostale formulacije inkapsuliranog soka korena rena (MD/GG i MD/GA) imale su niži prinos inkapsulacije, ukazujući na njihovu povećanu lepljivost i taloženje materijala na zidovima komore sprej sušača. Među inkapsulatima soka lista rena, najviši prinos inkapsulacije imali su prahovi sa MD/GA (78,50%), što je bilo u opsegu prijavljenih vrednosti prinosa inkapsuliranog vitamina C sa različitim koncentracijama arapske gume (61,1-83,2%) (Barra et al., 2019). Tan et al. (2015) su prijavili niži prinos inkapsulata ekstrakta gorke dinje unutar različitih odnosa MD i GA (51,29-62,15%). Inkapsulati soka lista rena sa alginatom rezultirali su nižim prinosom (44,78%), zbog povećane lepljivosti čestica, poteškoća sa sakupljanjem čestica u komori za sušenje raspršivanjem usled njihovog taloženja po zidovima i donekle smanjenih performansi sušača. Slični nalazi i još niži prinosi inkapsulacije (15,50-22,50%) prijavljeni su za sprej sušene inkapsulate ekstrakta žižule kada je natrijum-alginat korišćen kao glavni nosač za inkapsulaciju (Khoshdouni Farahani et al., 2022). Veoma nizak prinos inkapsulata soka lista rena sa MD/GG (15,14%) mogao se pripisati osobini guar gume da intenzivno vezuje vodu, zbog čega se u prehrambenoj industriji koristi kao sredstvo za zgušnjavanje (Gupta and Variyar, 2018). Time je značajno povećan viskozitet napojne smeše inkapsulacione formulacije sa ovom kombinacijom nosača. Priprema inkapsulacione smeše sa ovim hidrokoloidom na sobnoj temperaturi, kao i njeno kontinuirano mešanje, doprineli su postepenom vezivanju vode (Mudgil et al., 2014), a posledično i povećanju viskoziteta ove napojne smeše. Sve navedeno rezultovalo je krupnim kapljicama ove inkapsulacione formulacije, koje su kapale u komoru za sušenje, dovodeći do značajnih gubitaka i izuzetno niskog

prinosa inkapsulacije. Ravichandran et al. (2014) su izvestili da, iz istog razloga, ekstrakt betalaina nije bilo moguće sušiti raspršivanjem kada je GG korišćena kao nosač. Da bi se prevazišao ovaj problem, predlaže se dalja optimizacija temperaturnih uslova tokom pripreme napojne smeše, kao i variranje njenog sastava u pogledu sadržaja nosača. Takođe, povećanjem ulazne temperature sušenja mogla bi se postići veća efikasnost prenosa toplote i mase, što bi moglo dovesti do bržeg uklanjanja vlage i smanjenog prijanjanja čestica na zidove komore za sušenje. Međutim, u obzir se mora uzeti uticaj viših temperatura sušenja na stabilnost i očuvanje bioaktivnih jedinjenja.

5.2.1.3. Efikasnost inkapsulacije

Na efikasnost inkapsulacije dobijenih inkapsulata soka korena rena značajno je uticao tip korišćenog nosača, kao što se može videti u Tabeli 5.2. S druge strane, efikasnost inkapsulacije soka lista rena unutar različitih nosača nije se značajno razlikovala (Tabela 5.3). Vrednosti efikasnosti inkapsulacije kretale su se u opsegu od 70,96% (IK-MD/AL) do 80,51% (IK-MD/GA) u slučaju inkapsulata soka korena rena i u opsegu od 69,93% (IL-MD/GG) do 70,48% (IL-MD/AL) u slučaju inkapsulata soka lista rena. Ovi rezultati efikasnosti inkapsulacije ističu sprej sušenje kao odgovarajuću tehniku inkapsuliranja i korišćene biopolimere kao obećavajuće nosače ekstrakata bogatih fenolnim jedinjenjima. Dobijeni rezultati su bili u opsegu prijavljenih vrednosti efikasnosti inkapsulacije različitih biljnih ekstrakata inkapsuliranih u istim nosačima kao u ovoj studiji (Navarro-Flores et al., 2020; Khoshdouni Farahani et al., 2022). Više vrednosti efikasnosti inkapsulacije mogle bi se postići povećanjem udela nosača u napojnoj smeši za inkapsulaciju. Međutim, prilikom dodavanja inkapsulata u hranu, važno je obezbediti oslobađanje antioksidanasa iz inkapsulata u proizvod kako bi se sprečila njegova oksidacija. Štaviše, viši sadržaj nosača u inkapsuliranim formulacijama rezultirao bi prahovima sa nižim sadržajem TPC. To bi značilo da bi veće količine praha morale da se dodaju prehrambenom proizvodu da bi se postigao željeni antioksidativni efekat. Ovo bi uticalo, kako na ekonomski aspekt proizvodnje hrane sa dodatkom inkapsulata, tako i na fizičko-hemijska i senzorna svojstva prehrambenog proizvoda u koji se dodaju. Razlike u efikasnosti inkapsulacije prahova se mogu pripisati razlikama između polimernih matrica formiranih od pojedinačnih upotrebljenih nosača, koji imaju različita svojstva zadržavanja fenolnih jedinjenja.

5.2.1.4. Aktivnost vode inkapsulata

Na osnovu prikazanih rezultata u Tabelama 5.2 i 5.3 može se zaključiti da su vrednosti aktivnosti vode svih sprej sušenih prahova soka korena rena (0,27-0,32) i soka lista rena (0,19-0,33) proizvedenih u okviru ove disertacije bili u opsegu preporučenih granica mikrobiološke stabilnosti (<0,6) i stabilnosti hrane prema potamnivanju, oksidaciji i enzimskoj aktivnosti (0,2-0,4) (Šregelj, 2019). To ove prahove čini pogodnim za primenu u prehrambenoj industriji, kako u pogledu mikrobiološke i hemijske stabilnosti, tako i u pogledu dobrih karakteristika rukovanja (Gul and Dervisoglu, 2020). Među inkapsulatima soka korena, značajno niže vrednosti aktivnosti vode imali su uzorci sa MD/AL (0,28) i MD/GG (0,27) u odnosu na kontrolu (0,32). S druge strane, aktivnost vode nije se značajno promenila inkapsulacijom soka korena rena unutar MD/GA (0,32). Ova vrednost aktivnosti vode bila je nešto viša od rezultata koje su prijavili Archaina et al. (2019) prilikom inkapsulacije ekstrakta rozele unutar istog nosača (0,23-0,26). Razlog tome je mogao biti niži sadržaj GA u napojnoj smeši ili niža ulazna temperatura tokom sušenja raspršivanjem u ovoj disertaciji u poređenju sa pomenutom studijom. Međutim, treba uzeti u obzir da osim vrste nosača i ulazne temperature tokom sušenja raspršivanjem, na vrednosti aktivnosti vode utiču i sadržaj vlage, sastav i brzina protoka napojne smeše, kao i izlazne temperature tokom sprej sušenja (Tontul and Topuz, 2017). Aktivnost vode inkapsuliranog soka lista rena unutar MD/AL (0,19) i MD/GA (0,30) značajno je smanjena u poređenju sa kontrolom L-K (0,32), dok je inkapsulacijom unutar MD/GG došlo do značajnog povećanja vrednosti ovog parametra (0,33). Prethodno komentarisana visoka viskoznost

inkapsulacione smeše koja je sadržala GG, rezultirala je kapljicama velikih dimenzija koje je bilo teško osušiti, uzrokujući najviši sadržaj vlage i aktivnost vode ove formulacije u poređenju sa ostalim inkapsuliranim prahovima.

5.2.1.5. Rastvorljivost inkapsulata

Rastvorljivost je važno fizičko-hemijsko svojstvo inkapsuliranih prahova kao potencijalnih sastojaka hrane. U prehrambenoj industriji poželjno je koristiti prahove sa visokim stepenom rastvorljivosti u vodi u cilju njihove potpune iskoristivosti i biodostupnosti. Na osnovu rezultata prikazanih u Tabelama 5.2 i 5.3 može se zaključiti da su svi inkapsulirani prahovi soka korena i soka lista rena pokazali jako visok stepen rastvorljivosti (>92%). Među inkapsuliranim prahovima soka korena rena, najviša vrednost rastvorljivosti zapažena je kod uzorka IK-MD/GG. Razlog tome mogla je biti najmanja veličina čestica koja omogućava najveću specifičnu kontaktnu površinu kroz koju voda može lakše da proдре i rastvori inkapsulat. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa prijavljenim rezultatima autora Pieczykolan and Kurek (2019) o najmanjoj veličini čestica i najvećoj rastvorljivosti inkapsuliranog soka aronije unutar MD/GG, u poređenju sa drugim nosačima korišćenim za inkapsulaciju (inulin, guar guma, pektin i β -glukan). Štaviše, sa povećanjem sadržaja maltodekstrina, zbog visoke rastvorljivosti ovog oligosaharida, povećava se i rastvorljivost inkapsulata (Tontul and Topuz, 2017), što bi mogao biti razlog za bolju rastvorljivost inkapsulata sa MD/GG (9:1) u odnosu na uzorke sa MD/AL (4:1) i MD/GA (4:1). Rastvorljivost inkapsulata soka lista rena sa MD/GG i MD/GA nije se značajno razlikovala od kontrolnog uzorka, ukazujući na to da dodavanje ovih nosača soku od lista rena u napojnoj smeši nije imalo uticaja na ovaj parametar dobijenih prahova. Inkapsulati sa manje vlage su se teže rastvarali, što je rezultiralo najnižom rastvorljivošću uzorka IL-MD/AL. Tomsone et al. (2020b) saopštili su za oko 5% niže vrednosti rastvorljivosti inkapsulata sokova korena i lista rena, kada je MD/GA korišćen kao nosač, u poređenju sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji. Visok stepen rastvorljivosti pokazali su inkapsulati rena koji sadrže MD/GA. Upravo je visoka rastvorljivost jedan od osnovnih razloga zašto se ovi nosači najčešće koriste u prehrambenoj industriji za inkapsulaciju sprej sušenjem (Lourenço et al., 2020). Na rastvorljivost inkapsulata mogu uticati i morfološke karakteristike (Kalušević, 2017), pa su tako inkapsulirani prahovi soka lista rena, čije su čestice imale udubljena i neravnine na površini, pokazale viši procenat rastvorljivosti, usled lakšeg prodiranja vode u unutrašnjost inkapsulata.

5.2.1.6. Higroskopnost inkapsulata

Higroskopnost se definiše kao sposobnost prahova da apsorbuju vlagu iz okoline i predstavlja jedan od najvažnijih parametara kvaliteta prahova, jer utiče na njihovu fizičku stabilnost i uslove skladištenja. Rezultati određivanja higroskopnosti sprej sušenih prahova sokova korena i lista rena prikazani su u Tabelama 5.2 i 5.3. Među sprej sušenim prahovima soka korena rena, najhigroskopniji uzorak bio je kontrolni uzorak bez nosača (27,12 g vlage/100 g SM), dok su inkapsulirani prahovi soka korena rena unutar svih primenjenih biopolimernih nosača imali niže vrednosti ovog parametra (23,90-24,97 g vlage/100 g SM). Inkapsulati IK-MD/AL i IK-MD/GG nisu se značajno razlikovali u pogledu ovog parametra. S druge strane, IK-MD/GA pokazao je značajno nižu higroskopnost od ostalih uzoraka, što bi moglo biti posledica najvišeg sadržaja vlage. Najnižu higroskopnost inkapsuliranog soka od aronije u istoj kombinaciji nosača (MD/GA) su takođe saopštili Pieczykolan and Kurek (2019). Ovo bi moglo ukazivati na potencijalno najduži vek trajanja ove formulacije inkapsuliranih prahova. Kao i u slučaju prahova soka korena rena, najhigroskopniji uzorak među prahovima soka lista rena bio je kontrolni (28 g vlage/100 g SM), dok su inkapsulirani prahovi imali nižu higroskopnost (19,40-25,94 g vlage/100 g SM). Uzorak IL-MD/GG bio je manje higroskopan od drugih prahova, na šta je mogao uticati viši sadržaj maltodekstrina, što je u saglasnosti sa Ferrari et al. (2012), koji su potvrdili efikasnost ovog nosača u smanjenju higroskopnosti inkapsuliranog ekstrakta kupine. Takođe, veća molekulska masa GG mogla je doprineti niskoj higroskopnosti IL-MD/GG (Mahdavi et al., 2016). Na

najnižu higroskopnost ovog uzorka najverovatnije je uticao viši sadržaj vlage u poređenju sa drugim formulacijama inkapsulata lista rena. S druge strane, najniži sadržaj vlage uzorka IL-MD/AL mogao je uticati na najvišu higroskopnost ovog praha. Naime, veći gradijent koncentracije vode između praha i ambijentalnog vazduha rezultira većom sposobnošću ovih prahova da apsorbuju vlagu iz okoline (Tonon et al., 2008). Dobijene su nešto više vrednosti higroskopnosti za inkapsulate rena sa MD/GA (23,90 i 22,69 g/100 g SM) nego za inkapsulirani ekstrakt jabutikabe sa istom mešavinom nosača (17,55-17,96 g/100 g) (Silva et al., 2013), što može biti posledica različitog odnosa upotrebljenih nosača i nižih temperatura sušenja. Dobijeni rezultati određivanja higroskopnosti sprej sušenih prahova sugerišu da inkapsulacija soka korena i soka lista rena unutar različitih biopolimernih nosača dovodi do niže higroskopnosti prahova, kao i smanjenja sadržaja vlage i aktivnosti vode, što potencijalno ukazuje na veću stabilnost i duži vek trajanja ovih prahova.

5.2.1.7. Kapacitet zadržavanja ulja inkapsulata

Osobina inkapsulata da apsorbuju ulje je značajan fizičko-hemijski parametar prahova, koji može uticati na teksturu proizvoda kojem se prahovi dodaju, kao i na zadržavanje ukusa i osećaj u ustima koji se stvara tokom konzumacije proizvoda. Prahovi sa visokim kapacitetom zadržavanja ulja predstavljaju potencijalni sastojak za stabilizaciju celokupnog sistema namirnica sa visokim sadržajem lipida. Naime, dodavanjem inkapsuliranih prahova koji vezuju ulje u optimalnim količinama može se potencijalno smanjiti mogućnost odvajanja ulja od majoneza tokom skladištenja. Na osnovu rezultata prikazanih u Tabelama 5.2 i 5.3, može se zaključiti da je inkapsulacijom sokova korena i lista rena došlo do povećanja kapaciteta zadržavanja ulja. Tome je mogla doprineti veća aglomeracija i manja kontaktna površina kontrolnih uzoraka, potvrđena SEM analizom. Ipak, na kapacitet zadržavanja ulja najveći uticaj imaju sadržaj i vrsta hidrofobne frakcije u strukturi materijala (Bashir and Haripriya, 2016). Među svim inkapsuliranim prahovima sokova korena i lista rena, najviši kapacitet zadržavanja ulja bio je zapažen u formulacijama koje su sadržale arapsku gumu. To je negativno naelektrisani polisaharidno-proteinski kompleks, čiji hidrofobni razgranati proteini zadržavaju ulje unutar polisaharidnog matriksa, dok hidrofilni delovi olakšavaju stabilizaciju emulzije (Xu et al., 2018). Ovi rezultati bili su u saglasnosti sa rezultatima autora Nthimole et al. (2022), koji su saopštili 3-5 puta viši kapacitet zadržavanja ulja inkapsuliranog soka od maline unutar arapske gume u poređenju sa drugim korišćenim nosačima (maltodekstrin i voštani skrob). Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji sugerišu da bi inkapsulati sa arapskom gumom potencijalno mogli biti najefikasniji u očuvanju ukusa i produženju roka trajanja proizvoda kojima su dodati. Takođe, prahovi sa visokom vrednošću ovog fizičko-hemijskog parametra su poželjniji za upotrebu u hrani koja sadrži visoke koncentracije ulja (Tontul and Topuz, 2017), što je veoma značajno posmatrano sa aspekta dodavanja inkapsuliranih prahova u majonez.

5.2.1.8. Nasipna gustina, tapkana gustina i indeks kompresibilnosti inkapsulata

Nasipna i tapkana gustina inkapsuliranih sokova korena i lista rena pružaju značajne informacije o pakovanju, transportu i uslovima skladištenja prahova. Na osnovu vrednosti nasipne i tapkane gustine inkapsulata može se odrediti kompresibilnost uzoraka i izraziti preko indeksa kompresibilnosti i Hausnerovog odnosa. Rezultati određivanja nasipne i tapkane gustine, kao i kompresibilnosti inkapsuliranih prahova korena i lista rena prikazani su u Tabelama 5.2 i 5.3. Nasipne gustine svih inkapsuliranih formulacija sokova korena i lista rena bile su u opsegu vrednosti tipičnih za prehrambene prahove (0,3-0,8 g/cm³) (Kobo et al., 2022). Tapkana gustina svih prahova imala je više vrednosti od nasipne, što se može pripisati smanjenju zapremine usled tapkanja i gustom pakovanju čestica. Sprej sušeni sokovi korena i lista rena bez nosača imali su više vrednosti nasipne gustine od svih inkapsuliranih formulacija, što se može objasniti višim sadržajem vlage koji je uticao na pojavu lepljivosti i aglomeracije, kao i većom gustinom vode u odnosu na suhu materiju, o čemu su izveštavali i drugi autori (Mahdavi et al., 2016; Tontul and Topuz, 2017). Vrednosti nasipne, odnosno tapkane,

gustine nisu se značajno razlikovale između tri različite formulacije inkapsulata soka korena rena, ukazujući na to da tip nosača nije uticao na vrednosti ovih parametara. Među inkapsulatima soka lista, IL-MD/AL je imao značajno više vrednosti za ove parametre u poređenju sa drugim formulacijama inkapsulata, što bi moglo biti posledica veličine čestica. Naime, manje čestice ovog praha obezbeđuju veću kontaktnu površinu sa okolinom zbog smanjenja međučestičnih šupljina (Hernández-Nava et al., 2020), u poređenju sa većim česticama IL-MD/GG i IL-MD/GA (Lourenço et al., 2020). Nasipna gustina uzorka IL-MD/GA bila je $0,44 \text{ g/cm}^3$, što je u saglasnosti sa rezultatima određivanja nasipne gustine ekstrakta gorke dinje inkapsuliranog u MD/GA ($0,5 \text{ g/cm}^3$) (Tan et al., 2015). Uzorak IL-MD/GG imao je najniže vrednosti ovih parametara, što se može objasniti njihovom morfologijom. Brzo isparavanje vode tokom sušenja raspršivanjem stvara udubljenja na površini čestica, otežavajući njihovo pakovanje i slaganje. Niže vrednosti nasipne gustine prahova ukazuju na prisustvo vazдушnih džepova u šupljinama, što može dovesti do oksidacije i negativno uticati na stabilnost prahova tokom skladištenja (Nthimole et al., 2022; Mkhari et al., 2023).

Na osnovu nasipne i tapkane gustine, određeni su indeks kompresibilnosti i Hausnerov odnos inkapsulata, dajući informacije o protočnosti i kohezivnosti prahova. Odsustvo nosača u kontrolnim uzorcima dovelo je do formiranja velikih aglomerata, što je rezultiralo niskim vrednostima ovih parametara u poređenju sa inkapsuliranim uzorcima. Čestice velikih dimenzija imaju bolju tečljivost i manju kohezivnost, usled veće površine čestica, tj. slabijih kohezivnih sila i sila trenja koje se suprotstavljaju protoku. Drugi autori su izvestili o sličnim nalazima (Jinapong et al., 2008; Šeregelj et al., 2019). Vrednosti indeksa kompresibilnosti, odnosno Hausnerovog odnosa inkapsulata sokova korena i lista rena nisu se značajno razlikovale, što sugerise da tip nosača nije imao uticaja na ove parametre. Kategorizacijom protočnosti prahova na osnovu indeksa kompresibilnosti (Tabela 4.1) utvrđeno je da inkapsulati soka korena rena imaju zadovoljavajuću, a inkapsulati soka lista rena lošu protočnost. S druge strane, na osnovu vrednosti Hausnerovog odnosa može se zaključiti da inkapsulirane formulacije soka korena i lista rena pripadaju kategoriji visoke kohezivnosti prahova.

Tabela 5.2. Fizičko-hemijske karakteristike sprej sušenih prahova soka korena rena

Fizičko-hemijski parametar	K-K	IK-MD/AL	IK-MD/GG	IK-MD/GA
Prinos (%)	74,26	58,32	46,16	41,66
Efikasnost inkapsulacije (%)	/	70,96	71,13	80,51
Aktivnost vode (a_w)	$0,315 \pm 0,00^a$	$0,279 \pm 0,00^b$	$0,274 \pm 0,00^c$	$0,318 \pm 0,00^a$
Rastvorljivost (%)	$94,00 \pm 0,61^b$	$92,58 \pm 0,77^c$	$96,06 \pm 0,83^a$	$94,36 \pm 0,28^b$
Higroskopnost (g/100g SM)	$27,12 \pm 0,15^a$	$24,83 \pm 0,06^b$	$24,97 \pm 0,07^b$	$23,90 \pm 0,20^c$
Kapacitet zadržavanja ulja (g ulja/g)	$1,25 \pm 0,05^c$	$1,48 \pm 0,07^b$	$1,57 \pm 0,07^{ab}$	$1,67 \pm 0,04^a$
Nasipna gustina (g/cm^3)	$0,65 \pm 0,01^a$	$0,51 \pm 0,01^b$	$0,51 \pm 0,01^b$	$0,51 \pm 0,00^b$
Tapkana gustina (g/cm^3)	$0,72 \pm 0,02^a$	$0,72 \pm 0,03^a$	$0,71 \pm 0,02^a$	$0,72 \pm 0,02^a$
Indeks kompresibilnosti (%)	$9,66 \pm 0,31^b$	$29,31 \pm 1,59^a$	$28,59 \pm 1,10^a$	$29,04 \pm 1,51^a$
Hausnerov odnos	$1,11 \pm 0,01^b$	$1,41 \pm 0,03^a$	$1,40 \pm 0,02^a$	$1,41 \pm 0,03^a$

^{a,b,c...} Različita slova u istom redu ukazuju na značajne razlike ($p < 0,05$).

Tabela 5.3. Fizičko-hemijske karakteristike sprej sušenih prahova soka lista rena

Fizičko-hemijski parametar	L-K	IL-MD/AL	IL-MD/GG	IL-MD/GA
Prinos (%)	46,70	44,78	15,14	78,50
Efikasnost inkapsulacije (%)	/	70,48	69,93	70,00
Aktivnost vode (a_w)	0,319 ± 0,00 ^b	0,192 ± 0,00 ^d	0,326 ± 0,00 ^a	0,297 ± 0,00 ^c
Rastvorljivost (%)	94,85 ± 0,31 ^a	93,54 ± 0,83 ^b	95,47 ± 0,66 ^a	95,05 ± 0,04 ^a
Higroskopnost (g/100g SM)	28,00 ± 1,16 ^a	25,94 ± 0,64 ^b	19,40 ± 0,59 ^d	22,69 ± 0,30 ^c
Kapacitet zadržavanja ulja (g ulja/g)	1,45 ± 0,05 ^b	1,49 ± 0,05 ^b	1,47 ± 0,04 ^b	1,73 ± 0,03 ^a
Nasipna gustina (g/cm ³)	0,63 ± 0,01 ^a	0,47 ± 0,01 ^b	0,38 ± 0,02 ^d	0,44 ± 0,01 ^c
Tapkana gustina (g/cm ³)	0,75 ± 0,02 ^a	0,77 ± 0,00 ^a	0,59 ± 0,01 ^c	0,70 ± 0,01 ^b
Indeks kompresibilnosti (%)	15,79 ± 0,29 ^b	38,55 ± 1,70 ^a	36,40 ± 2,16 ^a	36,77 ± 1,13 ^a
Hausnerov odnos	1,19 ± 0,00 ^b	1,63 ± 0,04 ^a	1,57 ± 0,06 ^a	1,58 ± 0,03 ^a

^{a,b,c...} Različita slova u istom redu ukazuju na značajne razlike ($p < 0,05$).

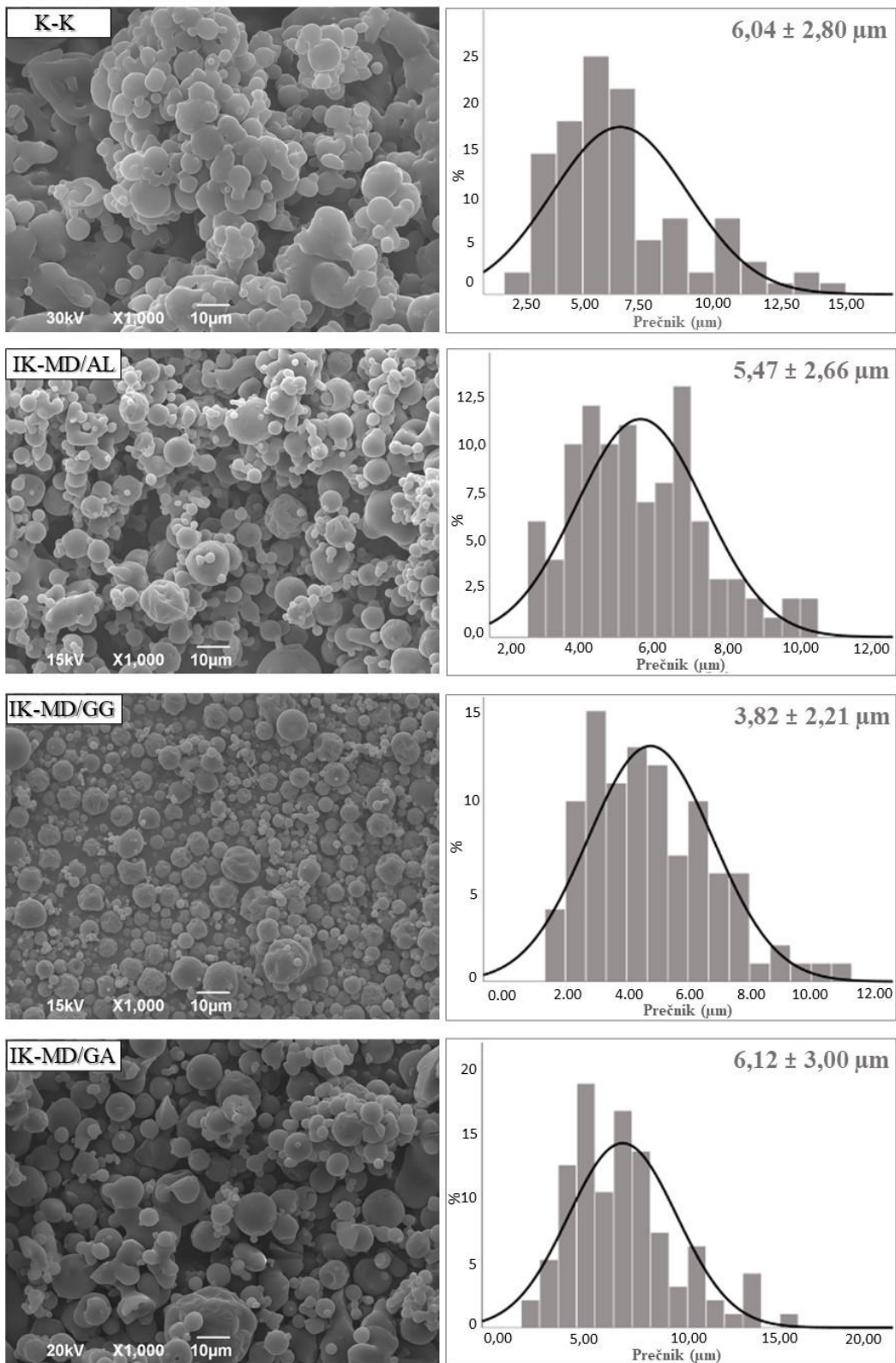
5.2.2. Morfološke karakteristike inkapsulata

Korišćenjem skenirajućeg elektronskog mikroskopa i snimanjem pod različitim uvećanjima omogućen je detaljan uvid u morfološke karakteristike inkapsuliranih sokova korena i lista rena. Dobijeni mikrografi, kao i distribucija veličina čestica, prikazani su na Slikama 5.6 i 5.7. U kontrolnim uzorcima sokova korena i lista rena sušenih raspršivanjem uočeni su nepravilan oblik, lepljivost, aglomeracija i prijanjanje manjih čestica na površinu većih. To se može objasniti odsustvom nosača i povećanim sadržajem vlage. Površina svih inkapsuliranih formulacija sokova korena i lista rena bila je bez vidljivih lomova ili pukotina, što je od velikog značaja posmatrano sa aspekta sprečavanja oksidacije i zaštite bioaktivnih jedinjenja (Mkhari et al., 2023). S druge strane, nepravilan oblik čestica i hrapava površina sa udubljenjima i neravninama mogle su biti posledica trenutnog isparavanja vode u kontaktu sa vrućim vazduhom tokom sušenja raspršivanjem.

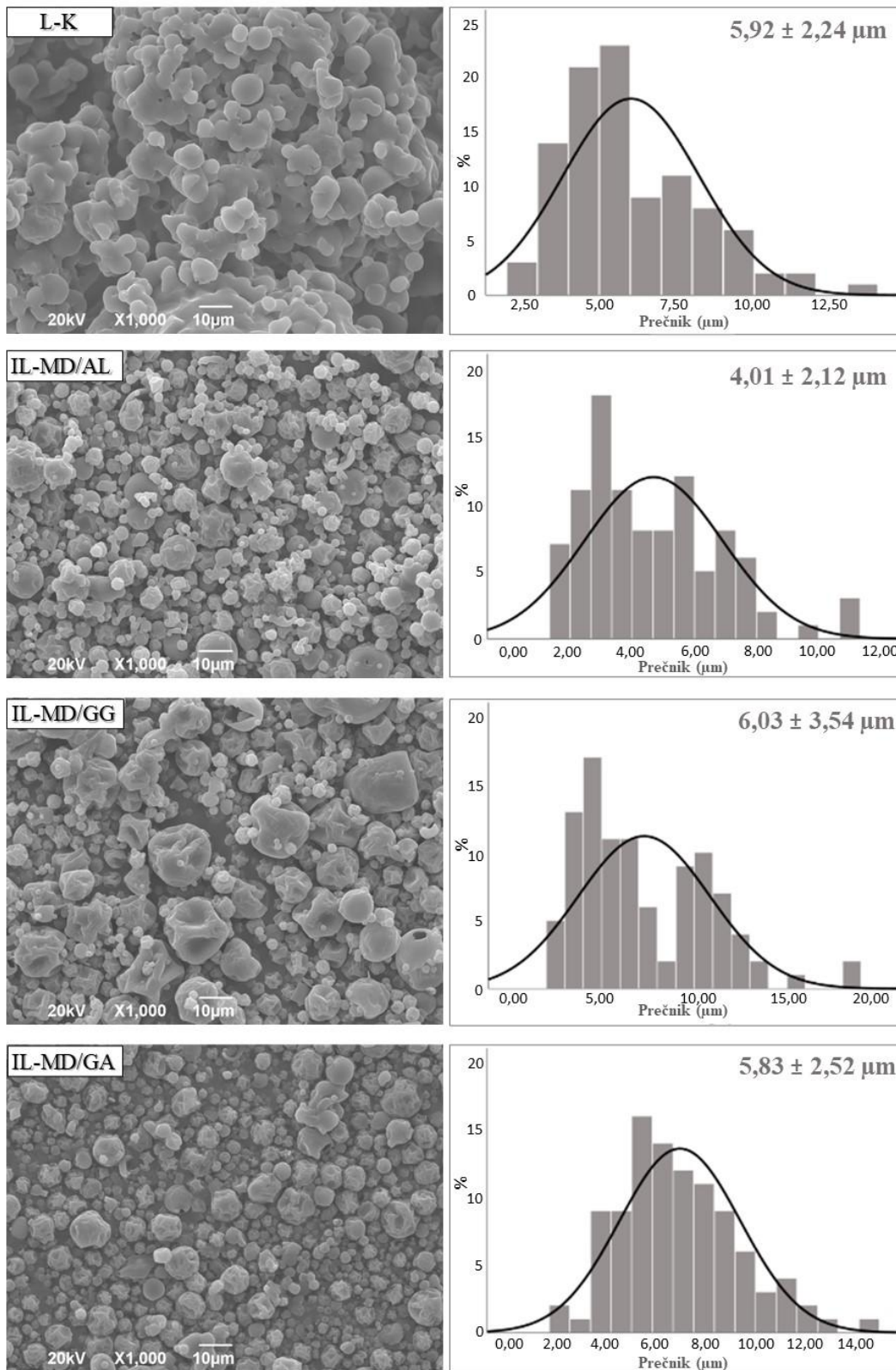
Kada je reč o inkapsulatima soka korena rena, prosečni prečnik čestica bio je u rasponu od 3,82 (IK-MD/GG) do 6,12 (IK-MD/GA) μm , što je u opsegu veličina čestica karakterističnih za prahove osušene raspršivanjem. Blaga aglomeracija uzorka IK-MD/AL u odnosu na druge inkapsulate korena mogla je biti posledica svojstva alginata da superiorno bubri i vezuje vodu (Praptiningsih and Palupi, 2014). Svi prahovi soka korena rena, osim kontrolnog, imali su normalnu distribuciju veličina čestica, ukazujući na pozitivan efekat korišćenih nosača na ujednačenost veličine čestica. Sušeni prahovi soka korena rena sastojali su se od pretežno sfernih čestica sa ređom pojavom udubljenja na njihovoj površini. To je moglo pozitivno uticati na stabilnost ovih inkapsulata, usled manje podložnosti oksidaciji glatkih površina u odnosu na hrapave (Nthimole et al., 2022). Generalno, sferni oblik i glatka površina ukazuju na potpunu pokrivenost jezgra nosačima, a samim tim i na visoku efikasnost inkapsulacije (Arenas-Jal et al., 2020), što je u skladu sa dobijenim rezultatima određivanja ovog fizičko-hemijskog parametra (Tabela 5.2).

Opseg prosečnih prečnika čestica inkapsuliranih prahova soka lista rena iznosio je od 4,01 (IL-MD/AL) do 6,03 (IL-MD/GG) μm . Značajno različite veličine čestica uzorka IL-MD/GG mogle su biti rezultat otežane disperzije tokom sušenja raspršivanjem usled visokog viskoziteta smeše za inkapsulaciju. Iako je prosečna veličina čestica IL-MD/AL bila 4,01 μm , najveća distribucija veličine čestica bila je u opsegu od 3 μm , što su takođe izvestili Khoshdouni Farahani et al. (2022) o

ekstraktima žižule inkapsuliranim unutar alginata (prosečna veličina čestica 6,51 μm). Pojava udubljenja na površini čestica mogla je biti posledica niske temperature i brzine sušenja, jer su, usled sporije difuzije vode, čestice imale više vremena da se deformišu i skupe (Simon-Brown et al., 2016). Za razliku od IL-MD/AL i IL-MD/GG, gde je došlo do blage aglomeracije čestica, ova pojava nije otkrivena u formulaciji inkapsulata lista rena sa MD/GA. To je bilo u skladu sa rezultatima autora Archaina et al. (2019), koji su izvestili da je lepljivost čestica smanjena sa povećanjem sadržaja arapske gume, prilikom inkapsuliranja ekstrakta rozele. Štaviše, među svim inkapsuliranim formulacijama soka lista rena, normalna raspodela veličina čestica bila je zapažena samo u slučaju uzorka IL-MD/GA, dodatno ističući ovu inkapsuliranu formulaciju u pogledu morfoloških karakteristika.



Slika 5.6. Skenirajući elektronski mikrografi neinkapsuliranog (K-K) i inkapsuliranog soka korena rena (IK-MD/AL, IK-MD/GG i IK-MD/GA) i distribucije njihovih prečnika



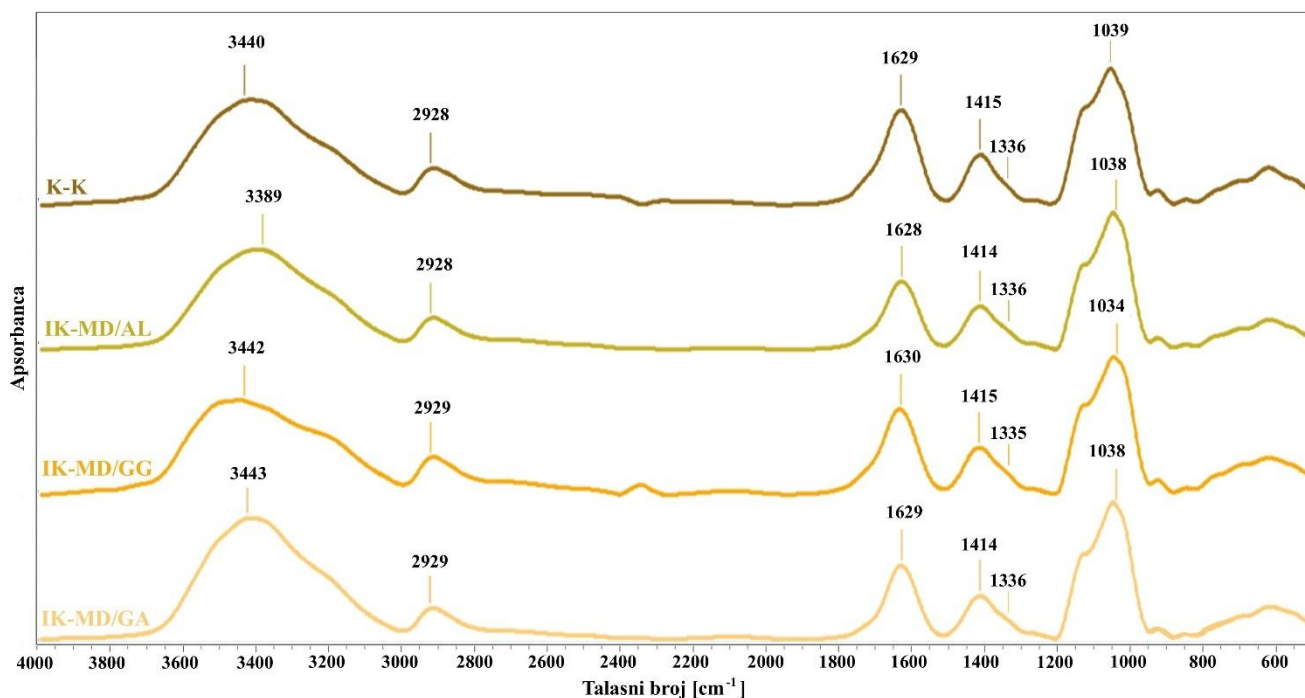
Slika 5.7. Skenirajući elektronski mikrografi neinkapsuliranog (L-K) i inkapsuliranog soka lista rena (IL-MD/AL, IL-MD/GG i IL-MD/GA) i distribucije njihovih prečnika

5.2.3. FT-IR spektroskopska analiza inkapsulata

Strukturna karakterizacija sprej sušenih kontrolnih i inkapsuliranih prahova, kao i analiza potencijalnih hemijskih interakcija i funkcionalnih grupa između nosača i sokova korena ili lista rena izvršena je FT-IR spektroskopijom, a poređenje njihovih spektara prikazano je na Slikama 5.8 i 5.9.

Na FT-IR spektrima svih uzoraka sprej sušenog soka korena rena (Slika 5.8) zapažene su tipične veze i pikovi karakteristični za polisaharide. U spektralnom području od $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$, široki pik apsorpcije se pripisuje slobodnim, inter- i intramolekulskim vezama --OH grupa, a takođe pokazuje nekoliko svojstava rastežućih veza slobodne --OH grupe (Hamidabadi Sherahi et al., 2017). Štaviše, Sharma and Mazumdar (2013) sugerišu da ove trake mogu poticati od vodonične veze --OH grupa glukopiranoznog prstena u strukturi polisaharidnog lanca. Singh et al. (2018) su izvestili da se široke trake u ovom spektralnom opsegu mogu pripisati i --OH grupama fenolnih jedinjenja (Singh et al., 2018). Intenzivne trake na $\sim 2930\text{ cm}^{-1}$ verovatno su rezultat vibracije simetričnih i asimetričnih istezanja C--H veze iz slobodnih šećera (Hamidabadi Sherahi et al., 2017). Apsorpcioni pik na 1629 cm^{-1} karakterističan je za deformacione vibracije slabih vodoničnih veza između hidroksilnih grupa adsorbovane vode (Marsooli et al., 2019). Trake u spektralnom području od $1600\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ su najverovatnije povezane sa fenolnim jedinjenjima u soku korena rena. Intenzivan pik na 1414 cm^{-1} je najverovatnije posledica simetričnog istezanja karboksilnih grupa (Lee et al., 2011), koje mogu poslužiti kao mesto vezivanja jona poput kalcijuma i stoga imaju važan uticaj na svojstva viskoznosti i sposobnost formiranja gela (Hamidabadi Sherahi et al., 2017). Apsorpcioni pik na 1336 cm^{-1} mogao je poticati od sulfonske grupe sumpornih jedinjenja prisutnih u Brassicaceae vrstama (Singh et al., 2018). Nekoliko traka u spektralnom području od $1200\text{--}950\text{ cm}^{-1}$ mogle su biti povezane sa tipičnim C--O--C vezama (De Souza et al., 2015) i vibracijama istezanja alkoholne C--O veze u C--OH trakama ugljenih hidrata (Hamidabadi Sherahi et al., 2017). Područje između 800 i 1200 cm^{-1} poznato je kao područje „otiska prsta“ (engl. *fingerprint region*) ugljenih hidrata, koji se može koristiti kao dobar indikator za procenu strukturnih razlika u različitim polisaharidnim nosačima (Hamidabadi Sherahi et al., 2017).

FT-IR analizom sprej sušenih prahova soka korena rena pokazano je da nije došlo do značajnog odstupanja i pomeranja pikova na spektrima inkapsuliranih prahova u odnosu na spektar kontrolnog uzorka, ukazujući da između soka korena i primenjenih nosača najverovatnije nije došlo do značajnih hemijskih interakcija. Iz toga se može zaključiti da je došlo do formiranja višekomponentne smeše soka korena rena i nosača u inkapsulatima, koja je i nakon sprej sušenja zadržala postojeće veze i hemijsku stabilnost.

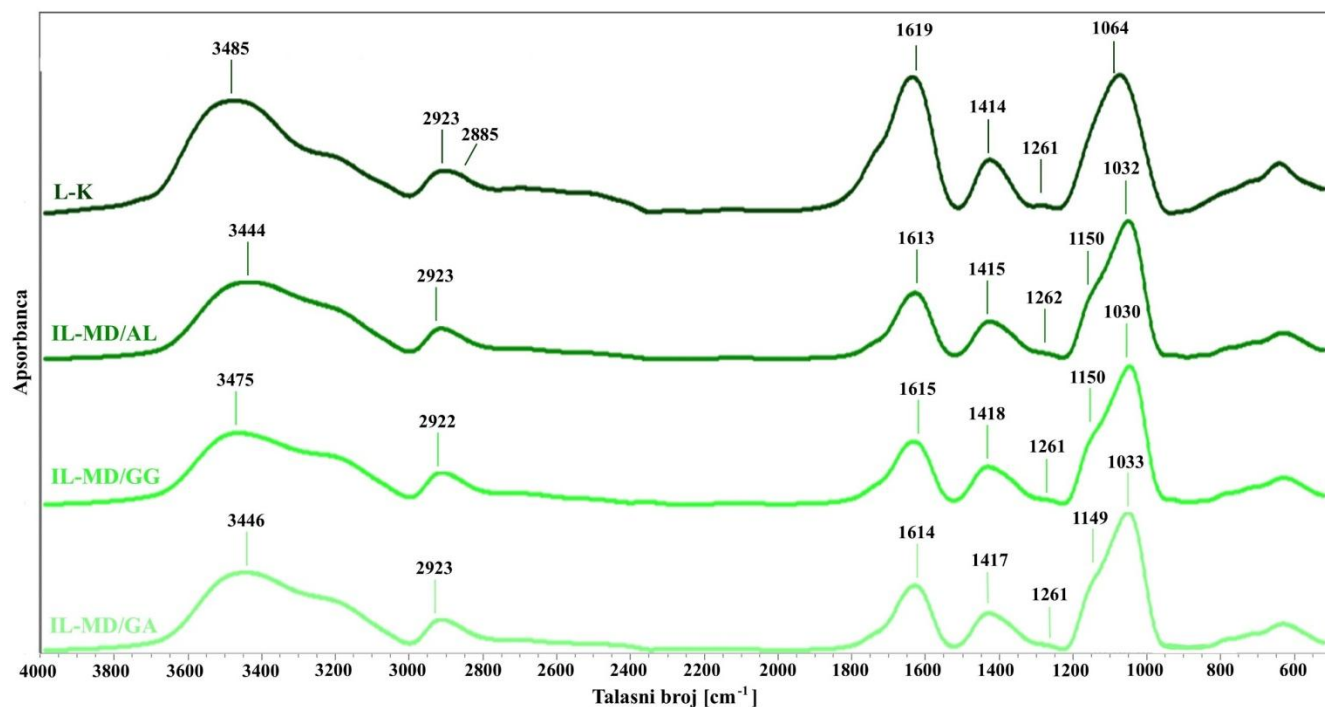


Slika 5.8. FT-IR spektri sprej sušenog kontrolnog (K-K) i inkapsuliranog (IK-MD/AL, IK-MD/GG i IK-MD/GA) soka korena rena

Na FT-IR spektrima sprej sušenih prahova lista rena (Slika 5.9) može se videti široki apsorpcioni opseg u području od 3000-3700 cm⁻¹, koji predstavlja snažnu vibraciju istežanja hidroksilne grupe (Arepally et al., 2020). Ova traka je delovala intenzivnije u spektru kontrolnog sprej sušenog uzorka (L-K) u poređenju sa spektrima inkapsuliranih uzoraka (IL-MD/AL, IL-MD/GG i IL-MD/GA), što bi moglo biti posledica višeg sadržaja vode (Dima et al., 2022) i/ili fenolnih jedinjenja (Salević et al., 2022). Slabi apsorpcioni pikovi na 2923 i 2885 cm⁻¹ ukazivali su na prisustvo simetričnih i asimetričnih CH₂ rasteznih vibracija metilenske grupe, respektivno (Abasi et al., 2018). Apsorpciona traka u području od 1700-1780 cm⁻¹ karakteristična je za C=O istežanje (Lević, 2014). Intenzivna traka na 1619 cm⁻¹ može se pripisati adsorbovanoj vodi (Popova et al., 2012), dok je traka na 1414 cm⁻¹ najverovatnije povezana sa simetričnim istežanjem karboksilnih grupa (Lee et al., 2011). Kao što je već prethodno rečeno, spektralni opseg između 800 i 1200 cm⁻¹ poznat je kao region „otiska prsta“ ugljenih hidrata (Arepally et al., 2020). Pik u obliku ramena na 1150 cm⁻¹, uočen samo na spektrima inkapsuliranih uzoraka, odgovarao je C–O–C vibracijama istežanja u glikozidnim vezama (Cavalu et al., 2018; Arepally et al., 2020), koje su karakteristične za primenjene nosače (Smrčková et al., 2013; Cavalu et al., 2018). Intenzivni apsorpcioni pikovi na 1030 i 1064 cm⁻¹ bili su karakteristični za apsorpcije C–O veze (Cheng et al., 2017; Cavalu et al., 2018), kao i slab apsorpcioni pik na 1261 cm⁻¹, koji verovatno potiče od sekundarnih biljnih metabolita, kao što su fenolna jedinjenja prisutna u soku lista rena (Schulz and Baranska., 2007).

Upoređujući spektre sprej sušenog kontrolnog i inkapsuliranog soka od listova rena, može se primetiti da su konkurentni pikovi pronađeni u istom spektralnom području bez značajnog odstupanja. Ovo sugerise da su sok i nosači formirali jednostavnu mešavinu u inkapsulatima. Manje varijacije u obliku ili intenzitetu traka u posmatranim spektrima mogu biti posledica preklapanja traka nosača/soka. Takođe, postojale su varijacije u položaju –OH trake (spektralni region 3000-3700 cm⁻¹) nakon inkapsulacije. Iako se ova promena može pripisati dodavanju nosača, neki autori sugerisu da bi razlike

u FT-IR spektrima mogle biti rezultat hemijskih interakcija, kao što je vodonična veza (Rigolon et al., 2024). Ipak, može se zaključiti da sok od lista rena najverovatnije nije značajno interagovao sa nosačima i da je zadržao hemijsku stabilnost, čak i nakon inkapsulacije sprej sušenjem.



Slika 5.9. FT-IR spektri sprej sušenog kontrolnog (L-K) i inkapsuliranog (IL-MD/AL, IL-MD/GG i IL-MD/GA) soka lista rena

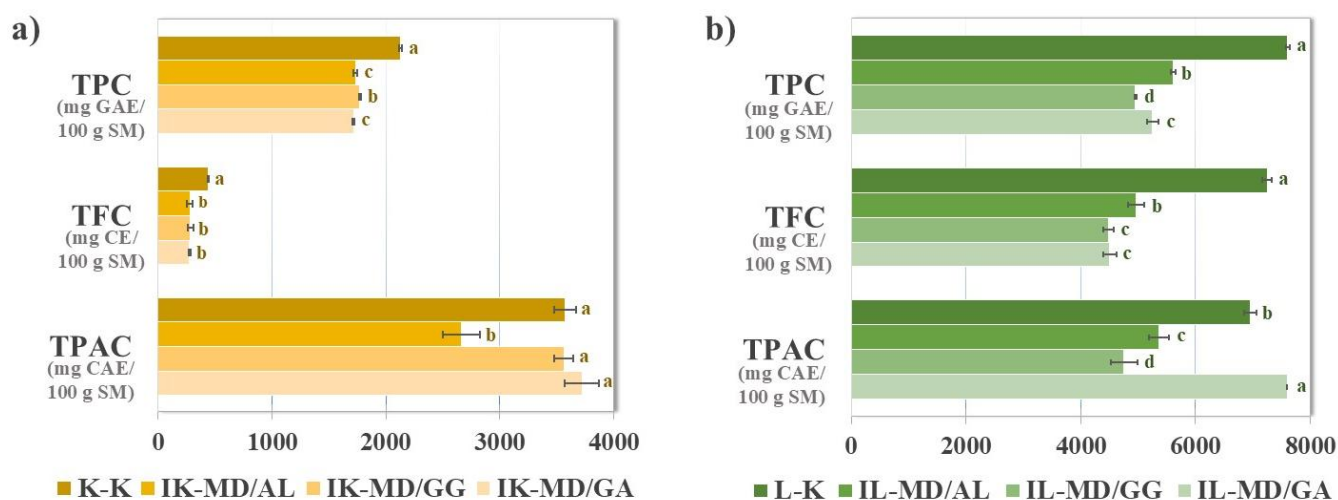
5.2.4. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih fenolnih kiselina inkapsulata

Kako je već prethodno utvrđeno, fenolna jedinjenja predstavljaju moćne antioksidanse, koji mogu delovati direktno, uklanjanjem slobodnih radikala, ili indirektno, regulacijom aktivnosti endogenih antioksidativnih enzima. Rezultati određivanja sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) u inkapsulatima sokova korena i lista rena spektrofotometrijskom metodom sa Folin-Ciocalteu reagensom prikazani su na Slici 5.10. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja inkapsuliranih prahova soka korena rena bio je u opsegu od $1717,27 \pm 9,27$ (IK-MD/GA) do $1771,35 \pm 7,10$ (IK-MD/GG) mg GAE/100 g SM (Slika 5.10a). Ovi rezultati su u saglasnosti sa prijavljenim rezultatima autora Tomsone et al. (2020b) ($321-1840$ mg GAE/100 g SM) prilikom inkapsulacije soka rena sa MD, MD/GA, izolatima sojinih proteina i skrobom. Dobijeni inkapsulati sadržali su više ukupnih fenolnih jedinjenja od inkapsuliranih ekstrakata nusproizvoda citrusa ($1,26$ mg GAE/g SM) (Papoutsis et al., 2018), pokožice grožđa ($26,26$ mg GAE/g SM) (Kuck and Noreña, 2016), borovnice (295 mg GAE/100 g) (Fang and Bhandari, 2010) i višnje ($24,6$ mg GAE/g SM) (Can Karaca et al., 2016). Ovo poređenje ističe inkapsulate soka korena rena kao bogat izvor fenolnih jedinjenja u poređenju sa drugim sirovinama. Značajne razlike u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja postojale su među svim testiranim inkapsulatima soka lista rena, a TPC je varirao od $4956,71 \pm 20,31$ (IL-MD/GG) do $5612,22 \pm 34,08$ (IL-MD/AL) mg GAE/100 g SM (Slika 5.10b). Rezultati TPC bili su u rasponu onih koje su prijavili Tomsone et al. (2020b) za sok rena inkapsuliran u različitim biopolimerima ($1867-6150$ mg GAE/100 g SM). Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u inkapsulatima lista rena bio je oko 7 puta viši u poređenju sa inkapsuliranim sokom druge vrste iz porodice Brassicaceae (brokoli) (Saavedra-Leos et al., 2021). Na osnovu spektrofotometrijske analize pokazano je da je značajno niži sadržaj ukupnih fenolnih

jedinjenja detektovan u inkapsulatima soka korena nego u inkapsulatima soka lista rena, što je u skladu sa prijavljenom literaturom (Calabrone et al., 2015; Tomsone et al., 2020b; Tomsone et al., 2020c), s obzirom na to da fenolna jedinjenja nisu ravnomerno raspoređena u celoj biljci.

Aktivne komponente u strukturi fenolnih jedinjenja su flavonoidi i fenolne kiseline. Flavonoidi se smatraju najkorisnijim fitohemikalijama identifikovanim u hrani, zbog izraženih antioksidativnih svojstava, jačih čak i od vitamina C i E (Pal and Verma, 2013; Cirimbei and Vizireanu, 2014). Rezultati određivanja sadržaja ukupnih flavonoida (TFC) inkapsuliranih sokova korena i lista rena prikazani su na Slici 5.10. Vrednosti TFC inkapsulata soka korena rena bile su u opsegu od $277,47 \pm 6,70$ (IK-MD/GA) do $287,27 \pm 22,62$ (IK-MD/GG) mg CE/100 g SM (Slika 5.10a). Nisu postojale značajne razlike u vrednostima TFC inkapsuliranih prahova soka korena rena, što je ukazivalo da su različiti nosači imali isti efekat na sadržaj ukupnih flavonoida u inkapsulatima. Niže vrednosti TFC u korenu rena ekstrahovanom različitim organskim rastvaračima prijavili su Calabrone et al. (2015), što ističe hladno presovanje kao povoljniji metod ekstrakcije, kako u pogledu zaštite životne sredine, tako i u pogledu veće dostupnosti bioaktivnih komponenata. Kada je reč o inkapsulatima soka lista rena, rezultati određivanja TFC pratili su sličan trend kao i za TPC, krećući se u opsegu od $4480,00 \pm 92,37$ (IL-MD/GG) do $4969,13 \pm 140,30$ (IL-MD/AL) mg CE/100 g SM (Slika 5.10b). Niže vrednosti TFC prijavljene su u tropovima svežeg i osušenog lista rena (Tomsone et al., 2020a) ili metanolnim ekstraktima listova rena (Calabrone et al., 2015). Ovo poređenje je istaklo inkapsulirani sok od lista rena kao bogat izvor flavonoida, dobijen blagim, netermalnim, „zelenim“ i ekološki prihvatljivim metodom hladnog presovanja.

Uprkos tome što su flavonoidi dominantna klasa fenolnih jedinjenja prisutnih u hrani, zahvaljujući antioksidativnom potencijalu i brojnim zdravstvenim benefitima fenolnih kiselina, za njima se javlja sve veće interesovanje (Robbins, 2003). Rezultati određivanja sadržaja ukupnih fenolnih kiselina (TPAC) inkapsuliranih sokova korena i lista rena prikazani su na Slici 5.10. Vrednosti TPAC za inkapsulirane prahove soka korena rena kretale su se u opsegu od $2662,15 \pm 162,68$ (IK-MD/AL) do $3720,32 \pm 150,78$ (IK-MD/GA) mg CAE/100 g SM (Slika 5.10a). Kombinacija nosača MD/GA pokazala se najefikasnijom u očuvanju fenolnih kiselina soka korena rena, u poređenju sa drugim analiziranim formulacijama nosača. Naime, u uzorku IK-MD/GA sadržan je viši nivo TPAC nego u kontrolnom uzorku ($3570,63 \pm 96,49$ mg CAE/100 g SM), što bi moglo biti posledica gubitka fenolnih kiselina tokom sušenja raspršivanjem bez nosača, koji bi mogli pružiti zaštitu ovim bioaktivnim jedinjenjima. Prisustvo fenolnih kiselina u arapskoj gumi (Ali Alshehry, 2023) takođe je moglo doprineti sadržaju TPAC u ovim inkapsulatima. Uzorak IK-MD/AL imao je značajno niži TPAC od drugih inkapsuliranih formulacija soka korena rena, što je moglo biti posledica aglomeracije čestica i najniže rastvorljivosti. U inkapsulatima soka lista rena detektovan je visok sadržaj ukupnih fenolnih kiselina, u rasponu od $4757,99 \pm 228,36$ (IL-MD/GG) do $7597,44 \pm 0,00$ (IL-MD/GA) mg CAE/100 g SM (Slika 5.10b). Kao i u slučaju inkapsulata korena rena, može se zapaziti efektivnije inkorporiranje fenolnih kiselina unutar strukture arapske gume, nego alginata ili guar gume. Inkapsulati rena dobijeni u ovoj disertaciji imali su više vrednosti TPAC u poređenju sa plodovima *Capsicum* vrsta (2,24-13,74 mg CAE/g SM) (Mňahončáková et al., 2021), ekstraktima *Salvia* vrsta (10,13-40,23 mg CAE/g) (Svydenko, 2022), prahom drenjine (2,62 mg CAE/g SM) (Šimora et al., 2023) i kineskim lekovitim biljkama (0,20-5,55 mg CAE/g SM) (Konieczynski et al., 2020). Ovo sugerše da inkapsulirani sokovi korena i lista rena predstavljaju bogat izvor fenolnih kiselina. Prema publikovanim podacima autora Robbins (2003), procenjeno je da dnevni unos fenolnih kiselina ishranom iznosi do 1 g, što je sadržano u ~30 g inkapsulata soka korena ili ~18 g inkapsulata soka lista rena.



Slika 5.10. Sadržaj ukupnih fenola (TPC), ukupnih flavonoida (TFC) i ukupnih fenolnih kiselina (TPAC) inkapsulata soka a) korena (K-K, IK-MD/AL, IK-MD/GG i IK-MD/GA) i b) lista (L-K, IL-MD/AL, IL-MD/GG i IL-MD/GA) rena ^(a, b, c, ...) Različita slova u okviru iste metode ukazuju na značajne razlike; $p < 0,05$

5.2.5. Hromatografska analiza fenolnog profila inkapsulata

Detaljan profil pojedinačnih fenolnih jedinjenja identifikovanih i kvantifikovanih u metanolnim ekstraktima inkapsulata sokova korena i lista rena prikazan je u Tabelama 5.4 i 5.5.

Kada je reč o inkapsuliranim prahovima soka korena rena, ista fenolna jedinjenja identifikovana su u kontrolnom uzorku i inkapsulatima, što ukazuje da su sva pronađena jedinjenja poticala iz soka korena rena. Najviši ukupan sadržaj svih identifikovanih fenolnih jedinjenja bio je u kontroli K-K (264,15 mg/100 g), dok je sadržaj fenolnih jedinjenja u inkapsulatima varirao od 233,51 (IK-MD/AL) do 256,29 (IK-MD/GG) mg/100 g. Ovi rezultati bili su u saglasnosti sa rezultatima spektrofotometrijske analize. Glavne i jedine identifikovane klase fenolnih jedinjenja u prahovima soka korena rena bili su derivati fenolnih kiselina (43,8-45,8%) i flavonola (54,2-56,2%), što je u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima o karakterizaciji fenolnog profila korena rena i njegovih proizvoda (Negro et al., 2022; Karafyllaki et al., 2023). Među pojedinačnim fenolnim kiselinama, kvantitativno najzastupljeniji bili su izomeri heksozida dihidroksibenzojeve kiseline (58,69-67,73 mg/100 g), zatim izomeri hidroksibenzojeve kiseline, dihidroksibenzojeva kiselina i heksozid siringinske kiseline. S druge strane, kempferol (93,55-99,31 mg/100 g) je bio dominantni flavonol i, generalno, dominantno fenolno jedinjenje pronađeno u analiziranim inkapsulatima soka korena rena. Zatim je usledio kempferol 3-*O*-(2"-pentozil)heksozid (12,90-22,75 mg/100 g), dok su ostali glikozidi kempferola bili prisutni u niskim koncentracijama ili u tragovima. Slično rezultatima u ovoj disertaciji, različiti derivati kempferola prethodno su izolovani i okarakterisani iz fermentisanih i nefermentisanih ekstrakata korena rena (Negro et al., 2022) i proizvoda od rena (Karafyllaki et al., 2023). Drugi flavonolni aglikoni (kvercetin, morin i izoramnetin) su takođe otkriveni, ali je njihov pojedinačni sadržaj bio niži od 9 mg/100 g u svim formulacijama inkapsulata. Konačno, male varijacije u ukupnom ili pojedinačnom sadržaju fenolnih jedinjenja između inkapsulata verovatno su posledica njihove degradacije tokom sušenja raspršivanjem i/ili međusobne interakcije fenolnih jedinjenja i nosača.

Tabela 5.4. Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja i njihovih derivata (mg/100 g inkapsulata) u metanolnim ekstraktima inkapsulata soka korena rena određen hromatografskom analizom

Broj	Naziv jedinjenja	K-K	IK-MD/AL	IK-MD/GG	IK-MD/GA	
<i>Fenolne kiseline i derivati</i>						
<i>mg/100 g</i>						
1	Dihidroksibenzoeva kiselina heksozid izomer I ^b	10,64	13,10	13,88	13,94	
2	Dihidroksibenzoeva kiselina heksozid izomer II ^b	56,68	45,59	53,85	51,79	
3	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina izomer I ^b	14,64	13,11	13,45	13,26	
4	Siringinska kiselina heksozid ^b	4,52	2,77	4,90	4,64	
5	Dihidroksibenzoeva kiselina ^b	15,57	15,91	14,95	16,89	
6	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina izomer II ^b	13,70	13,00	12,81	12,59	
		Σ	115,75	103,48	113,84	113,11
<i>Flavonoli i derivati</i>						
7	Kempferol 3- <i>O</i> -(2''-heksozil)heksozid ^c	/	4,12	8,11	4,21	
8	Kempferol 3- <i>O</i> -(2''-pentozil)heksozid ^c	22,75	12,90	14,66	13,41	
9	Morin ^c	8,40	5,41	6,26	4,90	
10	Kempferol 3- <i>O</i> -(6''-ramnozil)heksozid ^c	2,18	2,00	1,64	2,43	
11	Kempferol 3- <i>O</i> -(2''-pentozil)pentozid ^c	3,46	2,59	2,90	3,11	
12	Kempferol 3- <i>O</i> -(6''-malonil)heksozid ^c	/	/	<LOQ	/	
13	Kvercetin ^a	8,26	4,07	5,03	4,27	
14	Kempferol ^c	98,54	93,55	99,31	94,52	
15	Izoramnetin ^c	4,81	5,39	4,54	6,81	
		Σ	148,40	130,03	142,45	133,66
		ΣΣ	264,15	233,51	256,29	246,77

^aJedinjenja kvantifikovana korišćenjem dostupnih standarda. ^bJedinjenja kvantifikovana i izražena kao ekvivalenti gentizinske kiseline. ^cJedinjenja kvantifikovana i izražena kao ekvivalenti kvercetina. / - Nedetektovana fenolna jedinjenja. <LOQ - < Limit kvantifikacije.

Sličan ukupan sadržaj svih identifikovanih fenolnih jedinjenja uočen je u kontroli (181,10 mg/100 g) i inkapsulatima soka lista rena (188,15 (IL-MD/AL), 180,42 (IL-MD/GG), 174,12 (IL-MD/GA) mg/100 g). Ispitivani inkapsulati lista rena sadržali su 22,73-27,77% derivata fenolnih kiselina, 66,99-72,03% flavonolnih aglikona i glikozida i 5,23-6,09% derivata elagitanina u odnosu na ukupno kvantifikovana fenolna jedinjenja. Među kvantifikovanim fenolnim kiselinama, najzastupljeniji su bili izomeri heksozida dihidroksibenzoeve kiseline (28,22-35,42 mg/100 g), zatim heksozid siringinske kiseline (9,60-14,87 mg/100 g), dok su ostala jedinjenja iz ove klase bila prisutna u niskim koncentracijama ili tragovima (<LOQ). Dihidroksibenzoeva kiselina i njeni derivati bila su dominantna fenolna jedinjenja iz klase fenolnih kiselina u svim inkapsuliranim formulacijama sokova korena i lista rena. Tomsone et al. (2020a) izvestili su o nižim nivoima *p*-hidroksibenzoeve kiseline (0,23-0,46 mg/100 g SM) i siringinske kiseline (0,34-2,09 mg/100 g SM) u tropu listova rena podvrgnutom različitim načinima sušenja u odnosu na rezultate dobijene u ovoj disertaciji. Razlog tome mogla je biti hidrosolubilnost fenolnih jedinjenja i prelazak u sok tokom presovanja listova rena, dok je samo mali deo zaostao u tropu. Niži nivoi *p*-hidroksibenzoeve kiseline pronađeni su u svežem i smrznutom korenu rena (0,50 i 0,40 mg/100 g SM, respektivno), dok su vakuum mikrotalasno sušenje i liofilizacija rezultirali gubitkom ovog jedinjenja (Tomsone et al., 2013a). Različiti agroekološki i agrrotehnički uslovi rasta biljaka i primenjeni postupci ekstrakcije, kao i zaštita bioaktivnih komponenata delovanjem nosača, mogli su značajno uticati na sastav i sadržaj fenolnih kiselina. Među kvantifikovanim

flavonolima dominirali su kempferol, kvercetin i njihovi glikozidi. Najčešće su identifikovani različiti kempferol glikozidi (komponente pod brojem 7, 9, 10, 11 i 12). Kempferol 3-*O*-(2"-pentozil)heksozid bilo je kvantitativno najzastupljenije fenolno jedinjenje u svim inkapsulatima lista rena (58,99-71,14 mg/100 g). Pored toga, jedinjenja prepoznata kao kempferol-3-*O*-(6"-pentozil)heksozid-7-*O*-heksozid i kempferol-3-*O*-(2"-heksozil)heksozid takođe su otkriveni u svim inkapsulatima lista rena, ali u značajno nižim količinama. Ostali derivati kempferola su bili prisutni u tragovima (<LOQ) i/ili selektivno pronađeni u inkapsulatima, kao što je kaempferol-3-*O*-(2"-pentozil)pentozid, koji je otkriven samo u IL-MD/GG, na osnovu čega se može pretpostaviti da on nije poticao iz soka lista rena, već iz guar gume (Kaushal and Bhatia, 1982), koja je korišćena kao nosač u ovoj formulaciji. S druge strane, izoramnetin je identifikovan samo u kontrolnom uzorku, dok u inkapsuliranim prahovima soka lista rena nije pronađen, što je moglo biti zbog fenol/nosač interakcija ili poteškoća tokom ekstrakcije i pripreme uzoraka za hromatografsku analizu. Pored različitih derivata kempferola, jedan derivat kvercetina je takođe otkriven i prepoznat kao kvercetin-3-*O*-(6"-pentozil)-heksozid, čiji sadržaj je varirao između 23,94 (L-K) i 30,42 (IL-MD/GA) mg/100 g. Najniži sadržaj ovog jedinjenja je detektovan u kontrolnom uzorku (L-K), tako da se može pretpostaviti da je delimično razgrađen tokom sušenja raspršivanjem. Generalno, male razlike u sadržaju svih identifikovanih jedinjenja u inkapsulatima mogu biti posledica potencijalnih fenol-nosač interakcija, otežane ekstrakcije fenolnih jedinjenja ili njihovog zadržavanja u matricama nosača. Prema dostupnoj literaturi, samo nekoliko studija je istraživalo fenolni profil listova rena, tj. njihovog etanolnog ekstrakta (Tomsone and Kruma, 2013), sušenog tropa (Tomsone et al., 2020a; Tomsone et al., 2020c) i inkapsuliranog soka (Tomsone et al., 2020b). U ovim studijama, fenolne kiseline i flavonoidi su bile jedine klase fenolnih jedinjenja identifikovane u listovima rena, pri čemu su flavonoidi dominirali, slično rezultatima dobijenim u okviru ove disertacije. Nasuprot tome, fenolne kiseline kvantitativno su preovladale nad flavonoidima u korenu rena (Karafyllaki et al., 2023) i drugim *Brassica* vrstama (Bajkacz et al., 2021).

Osim fenolnih jedinjenja, u inkapsulatima sokova korena i lista rena analizirano je i potencijalno prisustvo glukozinolata, s obzirom na to da je poznato da ren predstavlja dobar izvor ovih jedinjenja (Agneta et al., 2014; Negro et al., 2022). Međutim, glukozinolati u ovim uzorcima nisu detektovani, što je verovatno posledica aktivnosti enzima mirozinaze (Nguyen et al., 2013). Tokom mlevenja i presovanja korena ili lista rena u sok, oslobođeni glukozinolati se veoma brzo razgrađuju/konvertuju u isparljive izotiocijanate (Li and Kushad, 2004; Tomsone et al., 2013b), koji zajedno sa fenolnim jedinjenjima potencijalno mogu doprineti snažnoj *in vivo* i *in vitro* antioksidativnoj aktivnosti inkapsuliranih sokova korena i lista rena (Nguyen et al., 2013).

Tabela 5.5. Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja i njihovih derivata (mg/100 g inkapsulata) u metanolnim ekstraktima inkapsulata soka lista rena određen hromatografskom analizom

Broj	Naziv jedinjenja	L-K	IL-MD/AL	IL-MD/GG	IL-MD/GA
<i>Fenolne kiseline i derivati</i>					
<i>mg/100 g</i>					
1	Dihidroksibenzoeva kiselina heksozid izomer I ^b	22,73	18,10	19,37	20,40
2	Dihidroksibenzoeva kiselina heksozid izomer II ^b	12,69	10,12	11,86	11,32
3	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina izomer I ^b	<LOQ	3,42	<LOQ	3,24
4	Siringinska kiselina heksozid ^b	14,87	12,46	9,79	9,60
5	Dihidroksibenzoeva kiselina ^b	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
6	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina izomer II ^b	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Σ		50,29	44,10	41,02	44,56
<i>Flavonoli i derivati</i>					
7	Kempferol 3- <i>O</i> -(6''-pentozil)heksozid-7- <i>O</i> -heksozid ^c	14,09	18,92	17,97	16,04
8	Kvercetin 3- <i>O</i> -(6''-pentozil)heksozid ^c	23,94	26,82	27,39	30,42
9	Kempferol 3- <i>O</i> -(2''-heksozil)heksozid ^c	12,45	9,65	16,39	8,46
10	Kempferol 3- <i>O</i> -(2''-pentozil)heksozid ^c	60,68	71,14	58,99	59,01
11	Kempferol 3- <i>O</i> -(6''-ramnozil)heksozid ^c	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
12	Kempferol 3- <i>O</i> -(2''-pentozil)pentozid ^c	/	/	<LOQ	/
13	Kvercetin ^a	4,95	3,47	4,40	2,54
14	Kempferol ^c	5,22	2,60	4,82	2,68
15	Izoramnetin ^c	<LOQ	/	/	/
Σ		121,33	132,60	129,96	119,15
<i>Ostala detektovana jedinjenja</i>					
16	Elagitanin derivat ^b	9,48	11,45	9,44	10,41
$\Sigma\Sigma$		181,10	188,15	180,42	174,12

^aJedinjenja kvantifikovana korišćenjem dostupnih standarda. ^bJedinjenja kvantifikovana i izražena kao ekvivalenti gentizinske kiseline. ^cJedinjenja kvantifikovana i izražena kao ekvivalenti kvercetina. / - Nedetektovana fenolna jedinjenja. <LOQ - < Limit kvantifikacije.

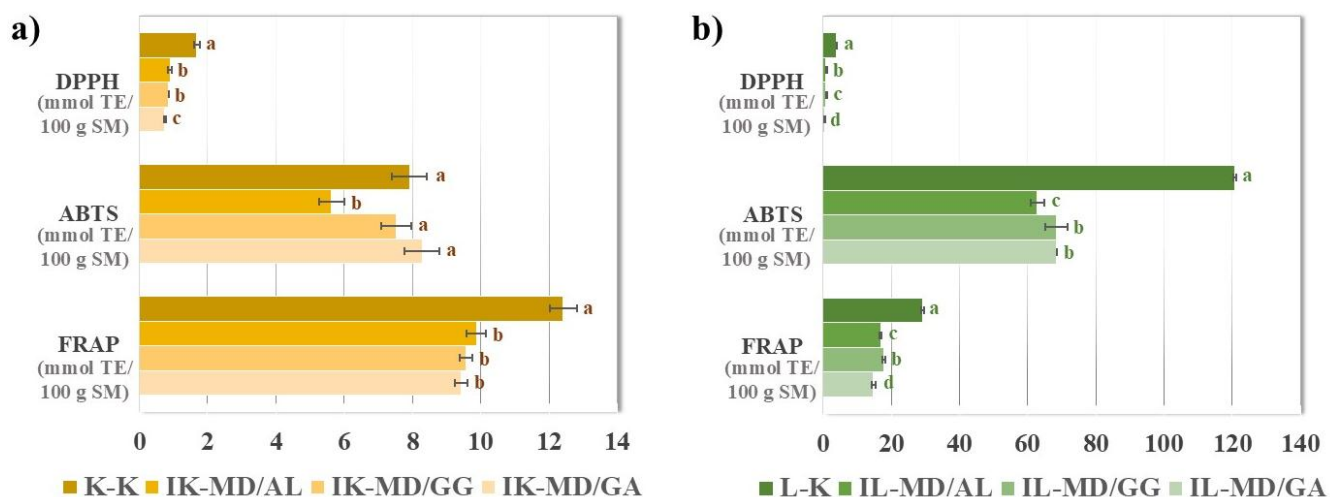
5.2.6. Antioksidativna aktivnost inkapsulata

Različita bioaktivna jedinjenja prisutna u renu pokazuju različite mehanizme antioksidativnog delovanja i moguće sinergističke interakcije, te je stoga bilo neophodno kombinovati različite metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta inkapsulata rena, kao što su DPPH, ABTS i FRAP. Metode DPPH i ABTS primenjene su u cilju procene sposobnosti antioksidanasa da neutrališu slobodne radikale, dok je FRAP metodom određena sposobnost antioksidanasa da redukuju jone gvožđa pri niskoj pH vrednosti. Rezultati antioksidativnih testova, izraženi u mmol TE/100 g SM, predstavljeni su na Slici 5.11 i bili su u rasponu od $0,75 \pm 0,03$ do $0,93 \pm 0,06$ (DPPH), $5,64 \pm 0,38$ do $8,29 \pm 0,51$ (ABTS) i $9,42 \pm 0,19$ do $9,87 \pm 0,29$ (FRAP) za inkapsulate soka korena (Slika 5.11a) i od $0,48 \pm 0,03$ do $0,94 \pm 0,03$ (DPPH), $62,82 \pm 2,02$ do $68,53 \pm 3,29$ (ABTS) i $14,86 \pm 0,49$ do $17,81 \pm 0,39$ (FRAP) za inkapsulate soka lista rena (Slika 5.11b). Dobijene vrednosti određivanja antioksidativne aktivnosti varirale su u zavisnosti od primenjenog testa i korišćenog nosača za inkapsulaciju. Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti DPPH metodom bile su značajno niže od vrednosti dobijenih ABTS metodom u slučaju svih inkapsulata soka korena i lista rena. To je mogao biti rezultat nedostatka ovog radikala da reaguje samo sa hidrofobnim komponentama, kao i njegove neosetljivosti ka hidrofobnim komponentama ili antioksidansima velikih dimenzija (Solaberrieta et al., 2020). Osim toga, na ove razlike mogla je uticati i veća reaktivnost ABTS^{•+} radikala u poređenju sa DPPH[•] radikalom

(Charles, 2013), a sličan trend naveli su i drugi autori (Tomsone and Kruma, 2017; Tomsone et al., 2020a; Tomsone et al., 2020b; Salević et al., 2022;).

Kada je reč o inkapsuliranim sokovima korena rena, prisustvo –OH grupa u strukturi dihidroksibenzojeve kiseline, kempferola, kvercetina, izoramnetina i morina mogle su doprineti antioksidativnoj aktivnosti inkapsulata. Naime, one imaju ulogu donora vodonika ili elektrona, a učestvuju i u stabilizaciji i delokalizaciji nesparenog elektrona unutar aromatičnog fenolnog prstena (Salević et al., 2019). Negro et al. (2022) su izvestili da su derivati kvercetina i kempferola takođe dominantni flavonoidi u fermentisanim/nefermentisanim ekstraktima korena rena. Dokazani sinergistički efekat ova dva flavonoida mogao je da doprinese antioksidativnoj aktivnosti inkapsulata (Gafrikova et al., 2014). Tomsone et al. (2020b) su prijavili značajno veće vrednosti antioksidativnog kapaciteta inkapsulata korena rena sa MD/GA, na koje je mogao uticati sastav rena, postupak proizvodnje soka, uslovi inkapsulacije i primenjena metodologija. Za razliku od MD/GA, prema dostupnoj literaturi, ne postoje prijavljeni podaci o inkapsulaciji soka korena rena u MD/AL i MD/GG. Inkapsulirani sok korena rena unutar ovih nosača pokazao je visoku antioksidativnost, što bi moglo doprineti produženom antioksidativnom efektu nakon njihove primene u prehrambenim proizvodima.

Među inkapsulatima lista rena, najvišu antioksidativnu ABTS i FRAP aktivnost u poređenju sa drugim inkapsuliranim formulacijama pokazao je uzorak IL-MD/GG. Tome je mogao doprineti najviši sadržaj kvercetina i kempferola detektovan u ovom uzorku i njihov, već pomenuti, sinergistički efekat (Gafrikova et al., 2014). Generalno, kvercetin i njegovi derivati bili su kvantitativno zastupljeniji u inkapsuliranim prahovima soka lista nego soka korena rena. Međutim, pored koncentracije pojedinačnih jedinjenja, na antioksidativnu aktivnost uticala je i struktura antioksidanasa, odnosno broj i položaj –OH grupa, prisustvo dvostrukih veza i aromatičnih prstenova (Solaberrieta et al., 2020). Orto-dihidroksi struktura na B prstenu molekula kvercetina pruža najbolja svojstva doniranja elektrona, a 2,3-dvostruka veza sa 4-okso funkcijom u C prstenu je odgovorna za delokalizaciju elektrona iz B prstena. 3- i 5-hidroksilne grupe sa 4-okso funkcijom u A i C prstenu doprinose maksimalnom potencijalu uklanjanja radikala (Dai and Mumper, 2010). Kempferol, dominantni flavonoid kvantifikovan u inkapsuliranom soku korena rena, ima jednu –OH grupu manje od kvercetina na B prstenu, što je moglo uticati na manje izraženu antioksidativnu aktivnost. Morin sadrži dve –OH grupe na B prstenu, koje se nalaze u meta poziciji. Za razliku od toga, u molekulu kvercetina, one se nalaze u orto poziciji, što doprinosi najizraženijoj antioksidativnoj aktivnosti ovog flavonoida (Dai and Mumper, 2010). Izoramnetin je detektovan u inkapsulatima soka korena, dok je u slučaju prahova soka lista pronađen samo u kontrolnom uzorku. U strukturi B prstena ovog flavonoida, osim –OH grupe, nalazi se i –OCH₃ grupa, koja manje doprinosi antioksidativnoj aktivnosti u poređenju sa dve –OH grupe (Salević et al., 2019). Dakle, iako je hromatografska analiza pokazala kvantitativno viši sadržaj flavonola u prahovima korena, u prahovima lista detektovani su flavonoli sa snažnijim antioksidativnim delovanjem, što bi moglo povoljno uticati na ukupan antioksidativni kapacitet ovih inkapsulata. Tome je moglo doprineti i prisustvo derivata elagitanina, koji takođe imaju svojstvo uklanjanja radikala bez kiseonika (Johana Ortega Villalba et al., 2020). Slični rezultati procene antioksidativnog potencijala prijavljeni su u drugim studijama kada su inkapsulirani nusproizvodi limuna (2,99-3,70 mM TE/g, FRAP) (Papoutsis et al., 2018), acerole (139,69-151,19 µmol TE/g, DPPH; 129,16-155,24 µmol TE/g, ABTS; 236,14-378,85 µmol TE/g, FRAP) (Rezende et al., 2018) i papaje (0,51 mg TE/g, DPPH; 0,45 mg TE/g, ABTS); 0,35 mg TE/g, FRAP) (Gomes et al., 2018). Ovo poređenje ukazuje na visok antioksidativni kapacitet inkapsuliranog soka lista rena, kao potcenjen i nedovoljno istražen izvor antioksidativnih komponenata, koji se može upotrebiti u sektoru prehrambene industrije kao zamena za sintetičke antioksidanse.



Slika 5.11. Antioksidativna aktivnost inkapsulata soka a) korena (K-K, IK-MD/AL, IK-MD/GG i IK-MD/GA) i b) lista (L-K, IL-MD/AL, IL-MD/GG i IL-MD/GA) rena određena DPPH, ABTS i FRAP metodom (^{a, b, c...} Različita slova u okviru iste metode ukazuju na značajne razlike; $p < 0,05$)

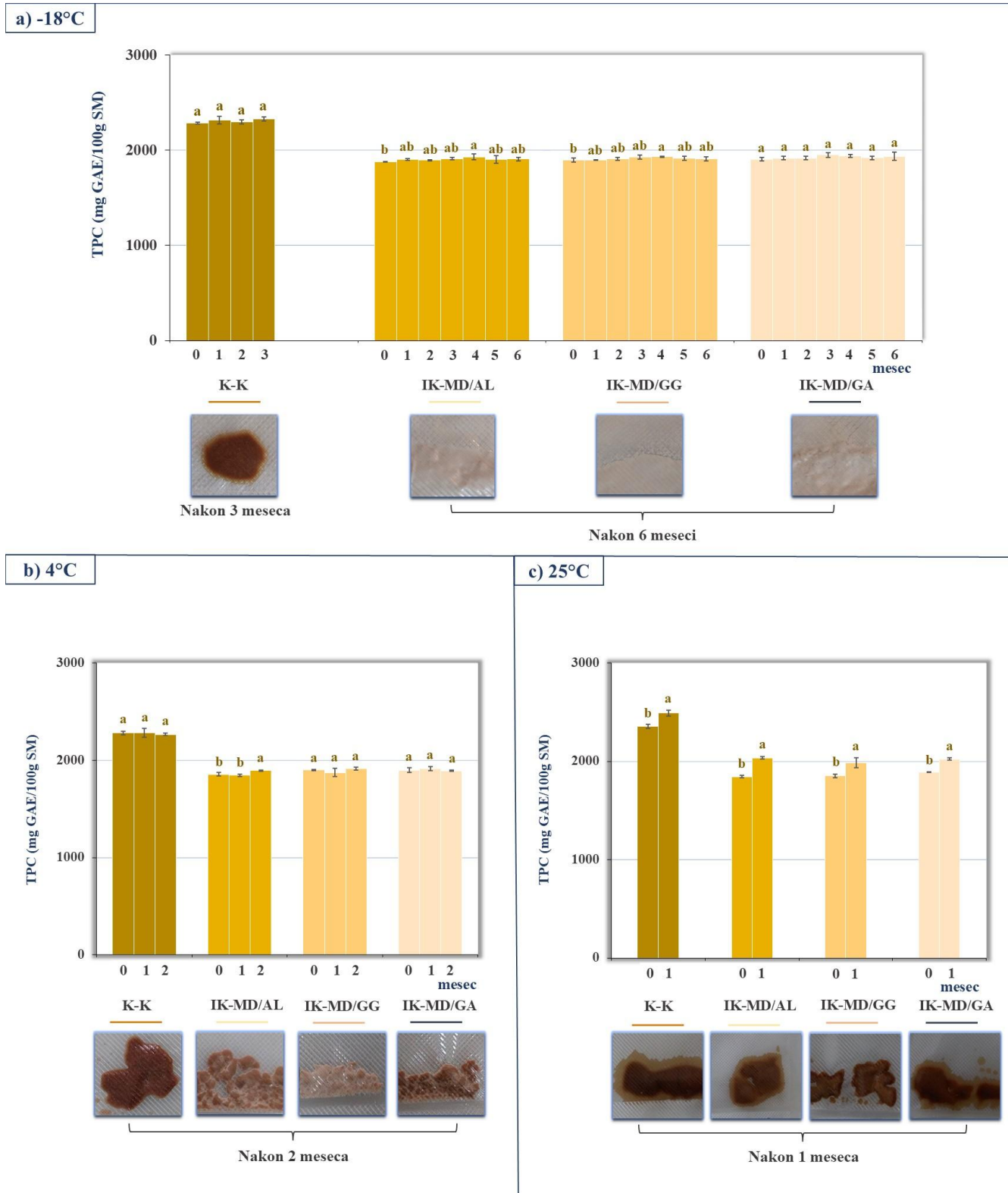
5.2.7. Stabilnost inkapsulata tokom skladištenja

Stabilnost inkapsulata procenjena je na osnovu sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) tokom šest meseci skladištenja pod različitim temperaturnim uslovima: u zamrzivaču ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$), u frižideru ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) i na sobnoj temperaturi ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Dobijeni rezultati studije šestomesečnog skladištenja inkapsulata i procene njihove stabilnosti na osnovu TPC, kao i vizuelnog izgleda tokom skladištenja, prikazani su na Slikama 5.12 i 5.13.

Inkapsulati soka korena rena čuvani na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ zadržali su svoju strukturu tokom šestomesečnog skladištenja, a TPC se nije značajno smanjio (Slika 5.12). Lepljivost čestica, formiranje trajnih agregata i gubitak praškastog oblika javili su se u kontrolnom uzorku čuvanom na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ nakon 3 meseca skladištenja, kao i u svim uzorcima skladištenim na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ posle 1 meseca, odnosno na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ posle 2 meseca, te stoga ovi uzorci nisu dalje analizirani. Razlog za to je mogla biti enzimska aktivnost i intenziviranje biohemijjskih reakcija na višim temperaturama skladištenja. Brzo uklanjanje vode tokom sušenja raspršivanjem moglo je dovesti do formiranja amorfnih materijala u stanju neravnoteže, koji su podložni različitim promenama tokom skladištenja, kao što su kristalizacija, aglomeracija i slepljivanje (Beristain et al., 2003). Viši sadržaj vlage i aktivnost vode kontrolnog uzorka mogli su uticati na povećanu lepljivost i formiranje čvrstih pogača, koje su se javile na svim temperaturama skladištenja inkapsulata. Zbog toga se inkapsulacija soka korena rena u MD/AL, MD/GG i MD/GA i skladištenje na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ preporučuju kao najpogodniji način za očuvanje fenolnih jedinjenja soka korena rena, kao i vizuelnog izgleda prahova, tokom dugotrajnog skladištenja.

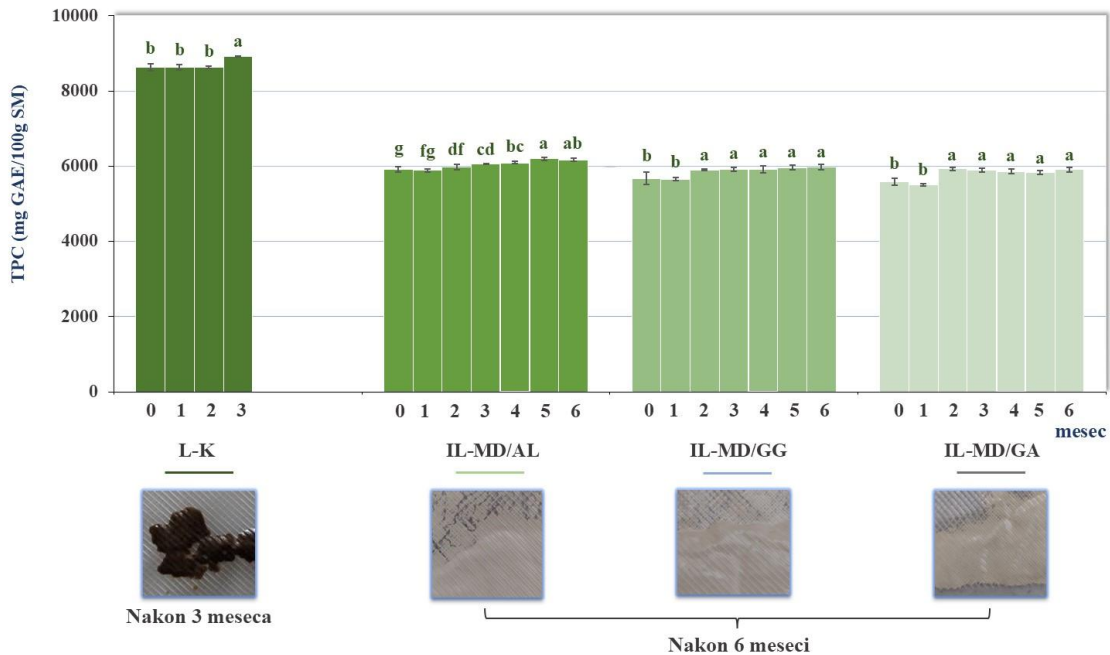
Slično kao i u slučaju inkapsulata soka korena, inkapsulati soka lista rena bili su stabilni u pogledu TPC tokom skladištenja pod svim primenjenim temperaturnim uslovima (Slika 5.13), ukazujući da su svi materijali nosača pružili dobru zaštitu fenolnim jedinjenjima iz soka lista rena. Manje fluktuacije u TPC tokom skladištenja mogle su se pripisati strukturnim promenama fenolnih molekula (Tsali and Goula, 2018). Prema literaturnim podacima, različiti temperaturni uslovi mogu uzrokovati smanjenje (Fang and Bhandari, 2010; Dadi et al., 2020) ili povećanje sadržaja fenolnih jedinjenja (Flores et al., 2014) u inkapsulatima tokom skladištenja. Nasuprot tome, neke studije su prijavile da nije bilo značajnih promena u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja u inkapsulatima skladištenim na različitim temperaturama (Tonon et al., 2008; Zokti et al., 2016). Iako se TPC inkapsulata soka lista rena nije značajno smanjio, gubitak praškastog oblika se ubrzavao sa povećanjem

temperature skladištenja. Pojava lepljivosti i agregacije primećena je u kontrolnim uzorcima čuvanim na -18, 4 i 25 °C (posle 3, 2 i 1 meseca skladištenja, respektivno) i u inkapsuliranim uzorcima čuvanim na 4 i 25 °C (posle 2 i 1 meseca skladištenja, respektivno), te stoga ovi uzorci nisu dalje analizirani. Samo inkapsulirani sok lista rena (u MD/AL, MD/GG i MD/GA) čuvan na -18 °C zadržao je formu praha nakon 6 meseci skladištenja. To je ukazivalo da je inkapsuliranjem u pomenute noseće materijale i skladištenjem na temperaturi zamrzivača (-18 °C) očuvana stabilnost fenolnih jedinjenja i strukture prahova soka lista rena.

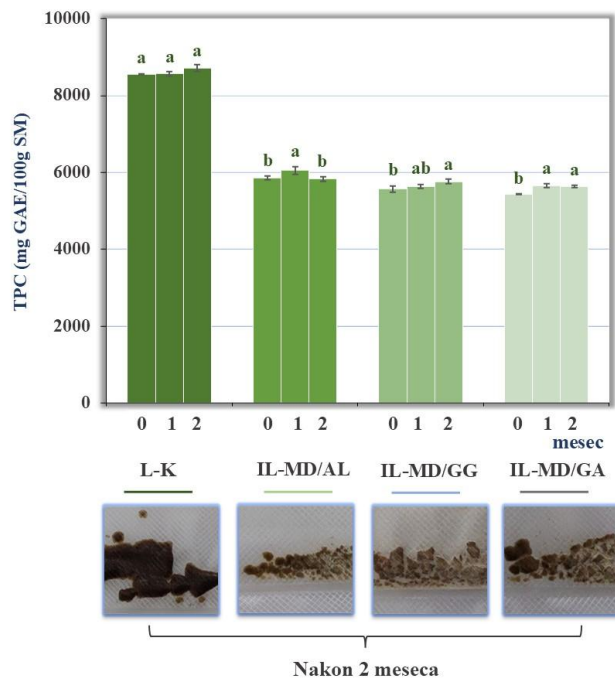


Slika 5.12. Stabilnost prahova u pogledu sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) i vizuelni izgled neinkapsuliranog (K-K) i inkapsuliranog soka korena rena (IK-MD/AL, IK-MD/GG i IK-MD/GA) uskladištenog na: a) -18 °C, b) 4 °C i c) 25 °C (a, b, c... Različita slova u okviru istog uzorka ukazuju na značajne razlike; p<0,05)

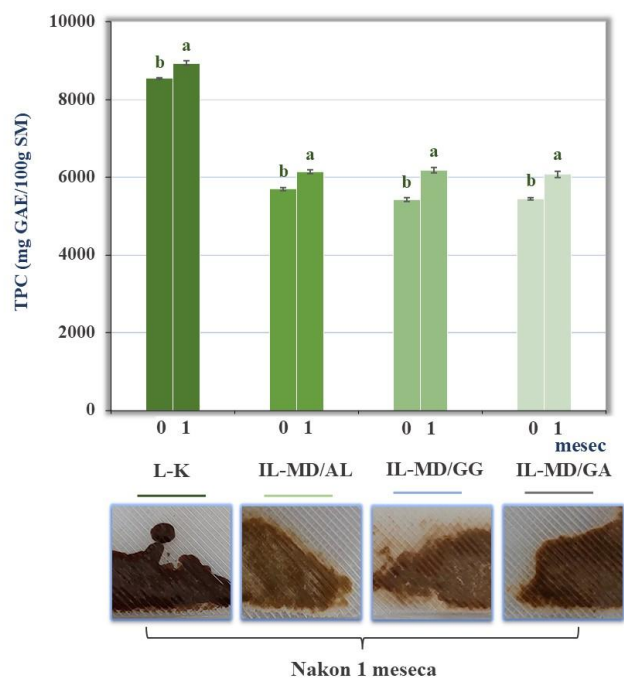
a) -18°C



b) 4°C



c) 25°C



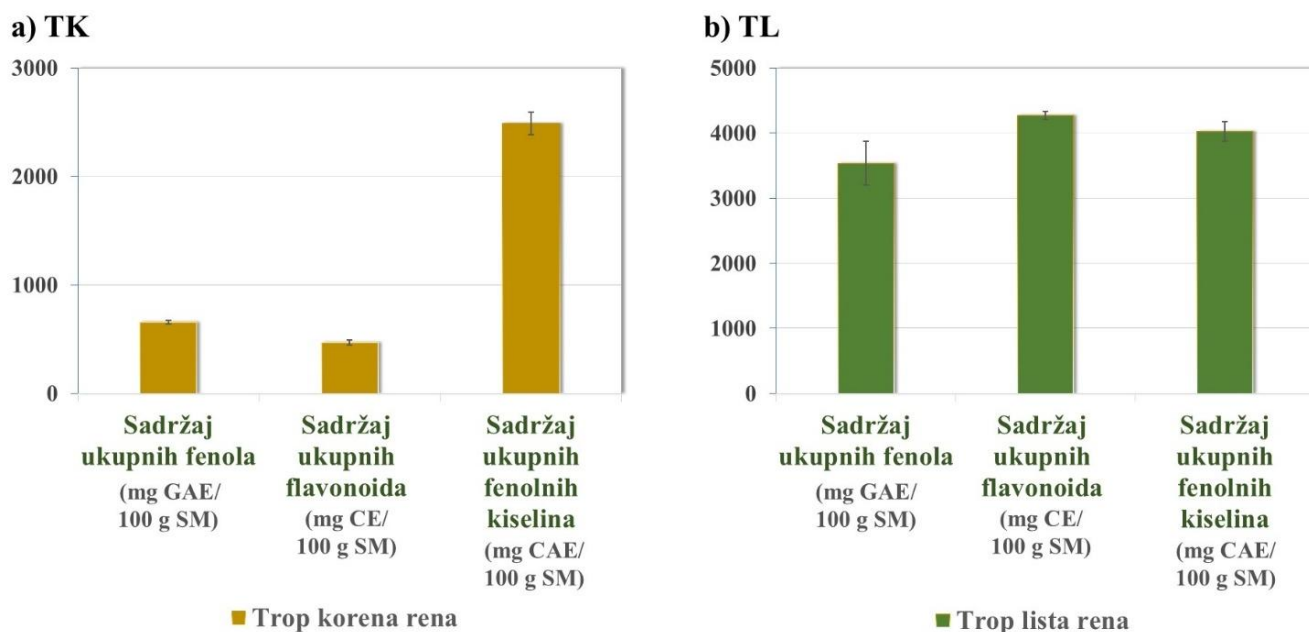
Slika 5.13. Stabilnost u pogledu sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) i vizuelni izgled neinkapsuliranog (L-K) i inkapsuliranog soka lista rena (IL-MD/AL, IL-MD/GG i IL-MD/GA) uskladištenog na: a) -18 °C, b) 4 °C i c) 25 °C (a, b, c... Različita slova u okviru istog uzorka ukazuju na značajne razlike; p<0,05)

5.3. KARAKTERIZACIJA TROPOVA KORENA I LISTA RENA

Dobijanjem sokova od voća i povrća metodom hladnog presovanja generišu se značajne količine tropa koji zaostaje kao nusproizvod. Ove otpadne sirovine postale su predmet istraživanja brojnih naučnih studija objavljenih tokom poslednjih decenija. Fokus je pretežno na istraživanju sadržaja polifenolnih jedinjenja u ovim nusproizvodima, izdvajanju bioaktivnih jedinjenja iz tropova i proučavanju njihovog uticaja na ljudski organizam. Tropovi voća i povrća nude snažan potencijal kao funkcionalni dodatak mnogim prehrambenim proizvodima. Širok spektar i obilje prirodnih komponenata u tropu čine ga vrednim istraživanja u pogledu njegove upotrebe na industrijskom nivou. To bi pomoglo da se ograniči odlaganje ove vredne sirovine i smanji upotreba sintetičkih aditiva u hrani tako što će se zameniti prirodnim dodacima koji se nalaze u tropu. Stoga je bioaktivni potencijal tropova korena i lista rena, dobijenih kao nusproizvoda hladnog presovanja korena i lista rena u cilju ekstrakcije sokova, analiziran u okviru ove disertacije. Karakterizacija bioaktivnih komponenata tropova korena i lista rena izvedena je primenom spektrofotometrijskih i hromatografskih analitičkih metoda. Rezultati pomenutih analiza izraženi su na suhu osnovu tropova, koja je iznosila $35,80 \pm 0,56\%$ za trop korena rena i $22,14 \pm 0,21\%$ za trop lista rena.

5.3.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih fenolnih kiselina tropova

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, sadržaja ukupnih flavonoida i sadržaja ukupnih fenolnih kiselina u tropovima korena i lista rena prikazani su na Slici 5.14.



Slika 5.14. Sadržaj ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih fenolnih kiselina tropova a) korena (TK) i b) lista (TL) rena

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) u tropu korena rena ($655,59 \pm 15,28$ mg GAE/100 g SM) bio je više od 5 puta niži u poređenju sa tropom lista rena ($3534,55 \pm 338,40$ mg GAE/100 g SM), što je u saglasnosti sa rezultatima određivanja TPC u sokovima korena i lista rena dobijenim u okviru ove disertacije. Viši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u listu nego u korenu rena prijavili su i drugi autori (Calabrone et al., 2015; Tomsone et al., 2020b; Tomsone et al., 2020c). Takođe, prijavljeni su i literaturni podaci o većoj zastupljenosti fenolnih jedinjenja u listu nego u korenu drugih biljnih vrsta, kao što su: bela i crvena rotkvica (Goyeneche et al., 2015; Rathi et al., 2019), vasabi (Shin et al., 2014),

slatki krompir (Truong et al., 2007), itd. To se može pripisati oštećenju ćelijskih komponenata izazvanom toksičnim jonima na nivou korena, i/ili prioritetu odlaganja energije za sintezu fenolnih jedinjenja u listovima, kako bi se zaštitili fotosintetski aktivni listovi biljaka (Petridis et al., 2012). Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja tropova korena i lista rena bio je u saglasnosti sa vrednostima koje su prijavili Kuppasamy et al. (2020) za različite ekstrakte sledećeg tropa od povrća: ljske rotkvice, ljske crnog i belog luka, ljske krompira i pulpe mrkve (4,7-105,2 mg GAE/g).

Kao i u slučaju TPC, sadržaj ukupnih flavonoida (TFC) bio je značajno niži u tropu korena rena ($467,78 \pm 22,39$ mg CE/100 g SM) u poređenju sa tropom lista rena ($4272,81 \pm 62,58$ mg CE/100 g SM). Kao što je prethodno komentarisano u slučaju sokova korena i lista rena (potpoglavlje 4.1.1.), flavonoidi se sintetišu i akumuliraju u nadzemnim delovima biljke, i to pretežno u listovima, odakle se tokom vremena translociraju na druge organe, a od regulacije ovog sinteza-transport odnosa zavisi njihov konačan sadržaj u različitim biljnim organima (Del Baño et al., 2004). Dobijeni TFC rezultati bili su u opsezima vrednosti ovog parametra prijavljenim za različite bio-otpade, kao što su: kora pomorandže i banane (~80 i ~40 mg kvercetin ekvivalent (QE)/g, respektivno) (Hussain et al., 2022) i otpaci (ljske, listovi, stabljike) crnog luka (1,72-2,13 mg CE/g), belog luka (0,62-0,83 mg CE/g) i karfiola (0,24-0,35 mg CE/g) (Munir et al., 2018). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da tropovi korena i lista rena predstavljaju veoma bogat prirodni izvor flavonoida, koji zbog svoje izražene antioksidativnosti čine ove sirovine veoma pogodnim za industrijsku eksploataciju u cilju smanjenja upotrebe sintetičkih antioksidanasa i redukovanja količine otpada iz poljoprivrednog sektora.

Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina (TPAC) pratio je isti trend kao i u slučaju TPC i TFC, dakle, značajno viši TPAC bio je zastupljen u tropu lista ($4022,36 \pm 152,16$ mg CAE/100 g SM) nego u tropu korena ($2487,57 \pm 104,97$ mg CAE/100 g SM) rena. Tomsone et al. (2020a) prijavili su niže vrednosti TPAC u tropu lista rena (3214 mg CAE/100 g SM), na šta su mogli uticati različiti uslovi gajenja i prerade rena. U poređenju sa TPAC sadržanom u soku korena i lista rena (3963,91 i 7943,71 mg CAE/100 g SM, respektivno), trop je sadržao niže, ali značajne količine ukupnih fenolnih kiselina. Stoga je valorizacija ove potencijalno otpadne biomase bogate fenolnim kiselinama i drugim antioksidansima veoma značajna sa aspekta ekonomičnosti i minimiziranja količina otpada iz prehrambene industrije.

5.3.2. Hromatografska analiza fenolnog profila tropova

Fenolni profil tropova korena i lista rena, identifikovan i kvantifikovan hromatografskom analizom, prikazan je u Tabeli 5.6. U tropu korena rena ukupno je identifikovano i kvantifikovano 14 fenolnih jedinjenja, koja su pripadala sledećim klasama fenolnih jedinjenja: 1) fenolne kiseline i njihovi derivati (5 jedinjenja) i 2) flavonoli i njihovi derivati (9 jedinjenja). Fenolne kiseline i njihovi derivati bili su zastupljeni u tropu korena rena u koncentraciji od 34,56 mg/100 g, što je činilo 18,15% od ukupno kvantifikovanih fenolnih jedinjenja, dok su flavonoli i njihovi derivati bili zastupljeni u koncentraciji od 155,87 mg/100 g, što je činilo 81,85% od ukupno kvantifikovanih fenolnih jedinjenja. Među fenolnim kiselinama kvantifikovanim u tropu korena rena, dominantan je bio heksozid izomer II dihidroksibenzojeve kiseline (16,69 mg/100 g), dok je glavni fenolni konstituent tropa korena rena i kvantitativno najzastupljeniji među flavonolima bio kempferol (84,52 mg/100 g). Ovi rezultati bili su u saglasnosti sa rezultatima hromatografske analize soka korena rena dobijenog hladnim presovanjem, kao i njegovih inkapsuliranih formulacija unutar različitih biopolimera. Heksozid siringinske kiseline, koji je bio identifikovan u soku korena rena, nije pronađen u njegovom tropu, a interesantno je da su neki heksozidi kempferola, kao što su kempferol-3-*O*-(6"-ramnozil)heksozid i kempferol-3-*O*-(6"-malonil)heksozid, bili identifikovani u tropu korena rena, dok u soku korena rena nisu bili pronađeni. Generalno, sadržaj svih kvantifikovanih fenolnih kiselina bio je niži u tropu nego u soku korena rena, dok je sadržaj pojedinih flavonoida varirao. Kempferol-3-*O*-(2"-heksozil)heksozid, kvercetin,

kempferol i izoramnetin bili su više sadržani u soku nego u tropu korena rena za 5,56, 23,85, 7,38 i 64,53%, respektivno, dok su svi drugi identifikovani flavonoli bili u višoj koncentraciji zastupljeni u tropu korena rena. To ukazuje da, osim soka, i trop korena rena predstavlja bogat izvor različitih fenolnih jedinjenja, koji dokazano imaju širok spektar bioloških aktivnosti. Fenolni profil tropa lista rena sačinjavalo je 12 fenolnih jedinjenja, koji pripadaju sledećim klasama: 1) fenolne kiseline i njihovi derivati (4 jedinjenja) i 2) flavonoli i njihovi derivati (8 jedinjenja). Fenolne kiseline i njihovi derivati bili su zastupljeni u tropu lista rena u koncentraciji od 6,71 mg/100 g, što je činilo 5,98% od ukupno kvantifikovanih fenolnih jedinjenja, dok su flavonoli i njihovi derivati bili dominantni fenolni konstituenti prisutni u koncentraciji od 105,60 mg/100 g, što je činilo 94,02% od ukupno kvantifikovanih fenolnih jedinjenja. Među fenolnim kiselinama kvantifikovanim u tropu lista rena, dominantan je bio izomer I *p*-hidroksibenzoeve kiseline (3,78 mg/100 g), dok je kvantitativno najzastupljeniji među flavonolima i, generalno, fenolnim jedinjenjima, bio kempferol-3-*O*-(2"-pentozil)heksozid (83,31 mg/100 g). Heksozid izomera I dihidroksibenzoeve kiseline bio je dominantno fenolno jedinjenje iz klase fenolnih kiselina i njihovih derivata u soku lista rena, dok ovo jedinjenje u tropu lista rena nije pronađeno. Slično tome, ni izomer II *p*-hidroksibenzoeve kiseline, identifikovan u soku lista rena, nije pronađen u njegovom tropu. Nasuprot tome, kempferol-3-*O*-(6"-pentozil)-7-*O*-heksozid, kempferol-3-*O*-(6"-ramnozil)-heksozid i kvercetin-3-*O*-(6"-pentozil)heksozid bili su identifikovani u tropu lista rena, dok u soku lista rena nisu bili pronađeni. Sa druge strane, flavonolni aglikoni (kvercetin i izoramnetin) i derivati elagitanina nisu zaostajali u tropu, već su u potpunosti difundovali u sok prilikom hladnog presovanja lista rena. Tomson et al. (2020a) izvestili su o nižim nivoima *p*-hidroksibenzoeve kiseline (0,26 mg/100 g SM), dok drugi derivati benzoevih kiselina detektovani u okviru ove disertacije (dihidroksibenzoeva i siringinska kiselina) nisu detektovani u tropu lista rena prijavljenom u studiji pomenutih autora. S druge strane, u njihovoj studiji u tropu lista rena pronađeni su i derivati cimetnih kiselina, kao što su: sinapinska, kumarna, hlorogena i ferulna, koji nisu detektovani u ovoj disertaciji. Do ovih razlika je moglo doći usled promene fenolnog sastava i narušavanja strukture biljnog materijala pri ekstrakciji soka rena presovanjem, kao i različitih uslova gajenja i prerade rena. Iako je sadržaj fenolnih jedinjenja u tropu lista rena bio niži nego u soku lista rena, važna biološki aktivna jedinjenja, kao što su fenolne kiseline i flavonoidi, ulaze u njegov sastav i čine ga bogatim resursom antioksidanasa.

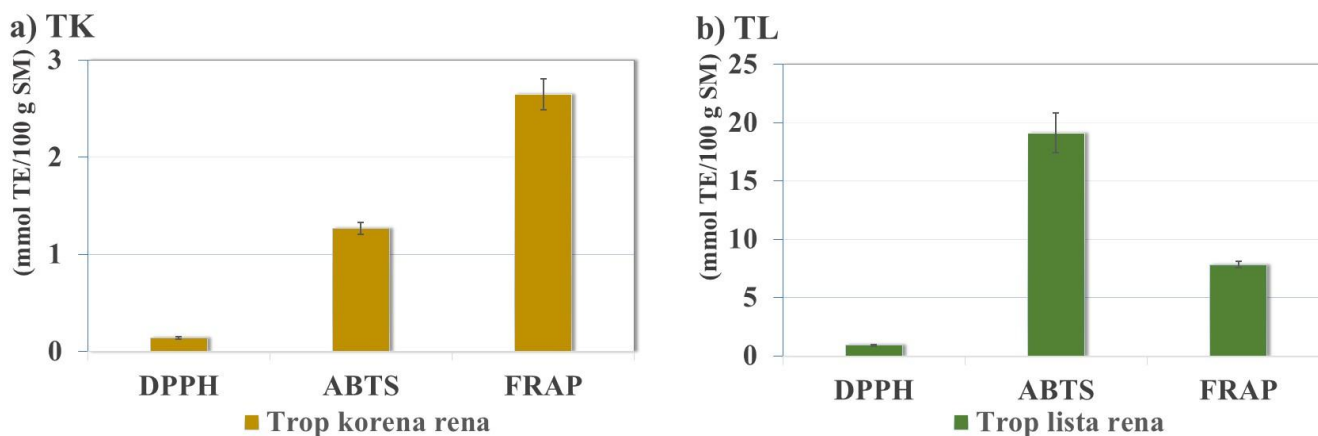
Tabela 5.6. Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja i njihovih derivata (mg/100 g tropa) u tropu korena (TK) i tropu lista rena (TL) određen hromatografskom analizom

Broj	Naziv jedinjenja	TK	TL
<i>Fenolne kiseline i derivati</i>			
		<i>mg/100 g</i>	
1	Dihidroksibenzoeva kiselina heksozid izomer I ^b	2,86	/
2	Dihidroksibenzoeva kiselina heksozid izomer II ^b	16,69	0,29
3	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina izomer I ^b	6,48	3,78
4	Siringinska kiselina heksozid ^b	/	2,64
5	Dihidroksibenzoeva kiselina ^b	0,79	<LOQ
6	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina izomer II ^b	7,75	/
		Σ	34,57
		Σ	6,71
<i>Flavonoli i derivati</i>			
7	Kempferol 3- <i>O</i> -(6''-pentozil)heksozid-7- <i>O</i> -heksozid ^c	/	7,48
8	Kvercetin 3- <i>O</i> -(6''-pentozil)heksozid ^c	/	4,00
9	Kempferol 3- <i>O</i> -(2''-heksozil)heksozid ^c	4,35	7,08
10	Kempferol 3- <i>O</i> -(2''-pentozil)heksozid ^c	22,49	83,31
11	Morin ^c	22,27	<LOQ
12	Kempferol 3- <i>O</i> -(6''-ramnozil)heksozid ^c	4,28	<LOQ
13	Kempferol 3- <i>O</i> -(2''-pentozil)pentozid ^c	8,35	0,63
14	Kempferol 3- <i>O</i> -(6''-malonil)heksozid ^c	3,34	/
15	Kvercetin ^a	4,34	/
16	Kempferol ^c	84,52	3,10
17	Izoramnetin ^c	1,93	/
		Σ	155,87
		ΣΣ	190,44
		Σ	105,60
		ΣΣ	112,31

^aJedinjenja kvantifikovana korišćenjem dostupnih standarda. ^bJedinjenja kvantifikovana i izražena kao ekvivalenti gentizinske kiseline. ^cJedinjenja kvantifikovana i izražena kao ekvivalenti kvercetina. / - Nedetektovana fenolna jedinjenja. <LOQ - < Limit kvantifikacije.

5.3.3. Antioksidativna aktivnost tropova

Antioksidativni potencijal tropova korena i lista rena procenjen je primenom DPPH, ABTS i FRAP metode, a dobijeni rezultati prikazani su na Slici 5.15.

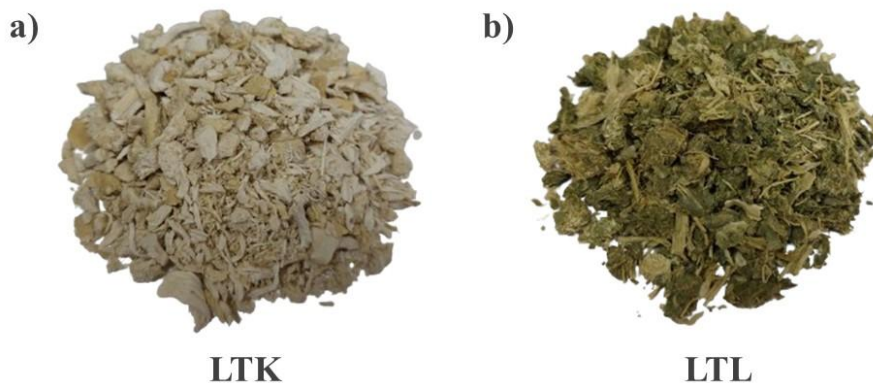


Slika 5.15. Antioksidativna aktivnost tropova a) korena (TK) i b) lista (TL) rena određena DPPH, ABTS i FRAP metodom

Trop korena rena imao je značajno niži antioksidativni kapacitet (mmol TE/100 g SM: $0,14 \pm 0,01$ (DPPH), $1,27 \pm 0,06$ (ABTS) i $2,65 \pm 0,16$ (FRAP)) od tropa lista rena (mmol TE/100 g SM: $0,90 \pm 0,07$ (DPPH), $19,11 \pm 1,70$ (ABTS) i $7,83 \pm 0,26$ (FRAP)), što potvrđuju rezultati određivanja antioksidativnosti sve tri primenjene metode. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima određivanja antioksidativne aktivnosti sokova korena i lista rena, iz čega se može zaključiti da je list rena superiorniji izvor antioksidanasa u poređenju sa korenom rena, što je u saglasnosti sa prijavljenom literaturom (Calabrone et al., 2015; Tomsone et al., 2020b; Tomsone et al., 2020c). Kao i u slučaju sokova korena i lista rena, pretpostavlja se da je i u tropovima korena i lista rena sadržano više hidrofилnih nego hidrofobnih antioksidanasa, što je rezultiralo višim vrednostima antioksidativne aktivnosti procenjene ABTS nego DPPH metodom. Iako se ABTS metoda temelji na proceni aktivnosti uzorka da uklanja slobodne radikale, a FRAP metoda na proceni redukujuće aktivnosti uzorka, obe metode zasnivaju se na istom mehanizmu prenosa elektrona (Tiwari et al., 2019). Povrh toga, vrednosti ova dva parametra su se razlikovale, što bi verovatno moglo biti zbog različitih reakcionih uslova koji su usvojeni za merenje antioksidativnih aktivnosti, posebno u smislu pH vrednosti (FRAP: 3,6; ABTS: 7,4) i oksidacionih molekula (Fe(II)-TPTZ naspram ABTS), što je rezultiralo različitim vrednostima antioksidativnog kapaciteta (Müller et al., 2011). Antioksidativna aktivnost tropova korena i lista rena bila je u opsegu prijavljenih vrednosti antioksidativne aktivnosti tropova različitih biljnih vrsta, kao što su: malina (DPPH: 361,27-567,00 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$) (Krivokapić et al., 2021), jabuka (DPPH: 0,76-9,75 g AA/kg; FRAP: 0,26-10,87 g AA/kg) (Suárez et al., 2010) i paradajz (DPPH: 11,18-21,44 $\mu\text{mol TE}/\text{g}$; FRAP: 12,02-43,37 $\mu\text{mol TE}/\text{g}$) (Chada et al., 2022). Stoga se može zaključiti da se tropovi korena i lista rena, koji zaostaju kao nusproizvodi prilikom dobijanja sokova hladnim presovanjem, takođe mogu koristiti u prehrambenoj industriji kao izvor antioksidanasa. Primenom ove vredne sirovine u prehrambenim proizvodima, mogli bi se postići brojni benefiti, kao što su: odlaganje formiranja primarnih i sekundarnih produkata oksidacije, uticaj na senzorne karakteristike proizvoda, poboljšanje kvaliteta i produženje roka trajanja proizvoda, redukovanje biološkog otpada i smanjena upotreba sintetičkih antioksidanasa u prehrambenoj industriji.

5.4. KARAKTERIZACIJA LIOFILIZOVANIH TROPOVA KORENA I LISTA RENA

Kao što se može videti u prethodnom poglavlju, tropovi korena i lista rena predstavljaju bogat izvor bioaktivnih jedinjenja sa izraženim antioksidativnim potencijalom. To ih čini pogodnom sirovinom za dodavanje u prehrambene proizvode, u cilju sprečavanja oksidativnih promena i produženja roka trajanja. Međutim, tropovi dobijeni nakon hladnog presovanja mogu podleći različitim degradacionim promenama, usled mikrobiološke i/ili enzimske aktivnosti. To bi moglo negativno uticati na njihov bioaktivni potencijal i ograničiti njihovu dalju primenu u prehrambenim proizvodima. Stoga su okarakterisani tropovi korena i lista rena povrgnuti postupku liofilizacije, kako bi se u što većoj meri očuvale bioaktivne komponente, a sami tropovi preveli u sušeni oblik pogodan za dalju primenu u prehrambenim proizvodima (Slika 5.16).

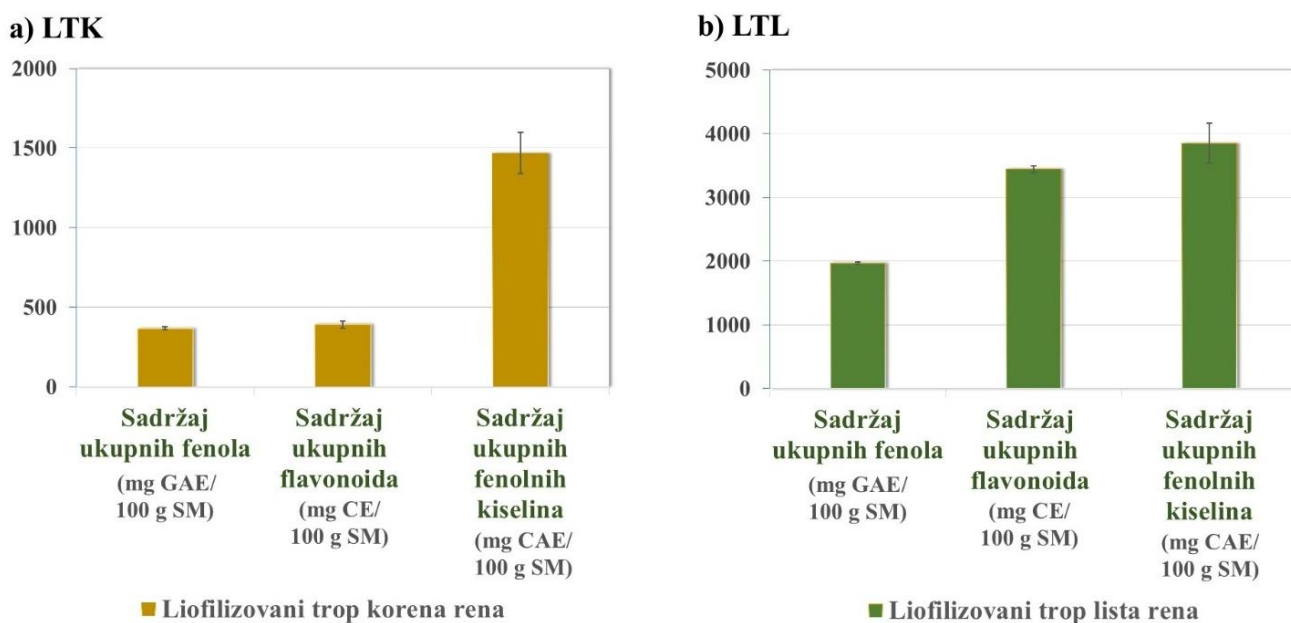


Slika 5.16. Izgled liofilizovanih tropova a) korena (LTK) i b) lista (LTL) rena

Liofilizacijom tropova smanjen je sadržaj vlage za oko 92% i iznosio je $4,82 \pm 0,37\%$ za trop korena rena i $6,36 \pm 0,22\%$ za trop lista rena. S obzirom na to da su značajne količine korena i lista rena (25 i 15 kg, respektivno) korišćene za dobijanje soka, generisane su velike zapremine rezidua, tj. tropova korena i lista rena. Tako da je liofilizacijom značajno smanjena zapremina dobijenih tropova, a time i troškovi pakovanja, skladištenja i transporta. Valorizacijom ovog nusproizvoda redukuju se količine biološkog otpada iz poljoprivrednog sektora, što predstavlja jedan od aspekata „zelene hemije“ i ekološke održivosti. Nakon liofilizacije, izvedena je spektrofotometrijska i hromatografska analiza osušenih tropova korena i lista rena u cilju detaljne identifikacije i kvantifikacije njihovih fenolnih profila i antioksidativnih kapaciteta. Rezultati pomenutih analiza izraženi su na suvu osnovu liofilizovanog tropa, koja je iznosila $95,18 \pm 0,37\%$ za trop korena rena i $93,64 \pm 0,22\%$ za trop lista rena. Na osnovu sadržaja fenolnih jedinjenja određene su količine liofilizovanih tropova korena i lista rena koje će se dodavati u majonez u cilju očuvanja oksidativne stabilnosti i kvaliteta ovog gotovog proizvoda tokom skladištenja.

5.4.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih fenolnih kiselina liofilizata

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, sadržaja ukupnih flavonoida i sadržaja ukupnih fenolnih kiselina u liofilizovanim tropovima korena i lista rena prikazani su na Slici 5.17.



Slika 5.17. Sadržaj ukupnih fenola (TPC), ukupnih flavonoida (TFC) i ukupnih fenolnih kiselina (TPAC) liofilizovanih tropova a) korena (LTK) i b) lista (LTL) rena

Liofilizati tropa korena rena imali su niži sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja ($367,85 \pm 11,05$ mg GAE/100 g SM) u odnosu na trop lista rena ($1969,32 \pm 21,17$ mg GAE/100 g SM), što je u saglasnosti sa prethodno analiziranim rezultatima u okviru ove disertacije. Liofilizacija tropova korena i lista rena rezultirala je jednakim smanjenjem sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (oko 44%) u slučaju oba analizirana tropa. Tseng and Zhao (2012) prijavili su da je, u poređenju sa drugim načinima sušenja (sušenje u konvencionalnoj sušnici, vakuum sušnici i na ambijentalnom vazduhu), liofilizacija bila najefikasniji metod sušenja u pogledu zadržavanja fenolnih jedinjenja komine grožđa. U radu autora Tomsone et al. (2020a) takođe je zabeležen pad TPC u tropu lista rena nakon liofilizacije. Ipak, izvestili su da je ovo bio najpogodniji metod sušenja tropa lista rena posmatrano sa aspekta očuvanja fenolnih jedinjenja u poređenju sa mikrotalasnim vakuum sušenjem i konvektivnim sušenjem na 40, 60 i 80 °C. Međutim, u radu pomenutih autora zabeležene su više vrednosti sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja liofilizovanog tropa lista rena (3232 mg GAE/100 g SM) u odnosu na liofilizovani trop lista rena ispitivan u ovoj disertaciji. Ove razlike mogu se pripisati upotrebi različitih ekstrakcionih tehnika, kao i različitom geografskom poreklu, uslovima rasta i momentu prikupljanja testiranih biljaka, iz razloga što ovi parametri utiču na sintezu i akumulaciju fenolnih jedinjenja u različitim delovima biljke. Povrh svega, liofilizovani tropovi korena i lista rena bili su bogatiji ukupnim fenolnim jedinjenjima od liofilizovanog tropa crne ribizle (Kapasakalidis et al., 2006) i mrkve (Borowska et al., 2017), ukazujući na njihov veliki potencijal kao dobrih izvora ovih bioaktivnih komponenata.

Sadržaj ukupnih flavonoida (TFC) u liofilizovanom tropu korena rena iznosio je $390,84 \pm 20,70$ mg CE/100 g SM, dok je liofilizovani trop lista rena sadržao približno desetostruko višu koncentraciju ovih jedinjenja ($3440,13 \pm 60,01$ mg CE/100 g SM). Nakon liofilizacije, u tropu korena i tropu lista rena zadržano je 83,55% i 80,51% ukupnih flavonoida, respektivno. Dobijeni rezultati bili su u saglasnosti sa prijavljenim TFC zadržavanjem od 84,18% nakon liofilizacije guave, koja je dokazano bila efektivniji metod sušenja posmatrano sa aspekta očuvanja ukupnih flavonoida u poređenju sa sušenjem u sušnici (Nunes et al., 2016). Slično tome, Tomsone et al. (2020a) su favorizovali liofilizaciju kao najpovoljniji metod sušenja u pogledu zadržavanja ukupnih flavonoida u poređenju sa mikrotalasnim vakuum sušenjem i konvektivnim sušenjem na 40, 60 i 80 °C. Međutim, u poređenju sa rezultatima dobijenim u okviru ove disertacije, pomenuti autori prijavili su značajno veće gubitke ovih

jedinjenja nakon liofilizacije tropa lista rena (52,78%). Na ove razlike mogli su uticati različiti uslovi pod kojima je vršena liofilizacija, geografsko poreklo, uslovi gajenja rena, kao i sastav i stabilnost flavonoidnih jedinjenja prisutnih u tropu lista rena.

U tropu korena rena nakon sušenja liofilizacijom bilo je sadržano $1467,04 \pm 129,12$ mg CAE/100 g SM ukupnih fenolnih kiselina (TPAC), dok je liofilizovani trop lista rena sadžao $3851,63 \pm 316,34$ mg CAE/100 g SM ovih jedinjenja. Liofilizacijom je uzrokovan gubitak od 41,03% TPAC u tropu korena rena, dok je gubitak ukupnih fenolnih kiselina u tropu lista rena nakon liofilizacije iznosio samo 4,24%. Blagi uslovi liofilizacije, kao što su niska temperatura i vakuum, uticali su na smanjenje aktivnosti enzima prisutnih u tropovima korena i lista rena, što je rezultiralo niskom degradacijom ovih biološki aktivnih jedinjenja. To je potvrđeno u brojnim studijama u kojima je liofilizacija favorizovana kao najefikasniji metod sušenja posmatrano sa aspekta očuvanja fenolnih kiselina u odnosu na druge načine sušenja, i to u sledećim biljnim vrstama: stevija (Periche et al., 2016), perila (Xing et al., 2017), kaki jabuka (Kayacan et al., 2020), šljiva (Yener et al., 2023), itd. Kvantifikacija ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih fenolnih kiselina ističe veliki potencijal liofilizovanih tropova korena i lista rena za industrijsku eksploataciju u pogledu njihovog dodavanja prehrambenim proizvodima u cilju odlaganja oksidacione degradacije i produženja roka trajanja. To bi pomoglo da se ograniči odlaganje ove vredne sirovine i smanji upotreba sintetičkih aditiva u prehrambenoj industriji.

5.4.2. Hromatografska analiza fenolnog profila liofilizata

Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja liofilizovanih tropova korena i lista rena kvantifikovan hromatografskom analizom prikazan je u Tabeli 5.7.

U liofilizovanom tropu korena rena ukupno je identifikovano i kvantifikovano 14 fenolnih jedinjenja, koji pripadaju sledećim klasama: 1) fenolne kiseline i njihovi derivati (6 jedinjenja) i 2) flavonoli i njihovi derivati (8 jedinjenja). Od ukupno kvantifikovanih fenolnih jedinjenja liofilizovanog tropa korena rena, 26,50% činile su fenolne kiseline i njihovi derivati, sadržani u koncentraciji od 78,08 mg/100 g, dok su 73,50% činili flavonoli i njihovi derivati, sadržani u koncentraciji od 216,59 mg/100 g. Kao i u svim prethodno analiziranim komponentama korena rena (sok, inkapsulati soka i trop), dominantno jedinjenje iz klase fenolnih kiselina i njihovih derivata bio je heksozid izomera II dihidroksibenzojeve kiseline (46,87 mg/100 g), dok je iz klase flavonola kvantitativno dominantan bio kempferol (89,51 mg/100 g). Ukupno 10 fenolnih jedinjenja detektovano je u liofilizovanom tropu lista rena, i to 3 jedinjenja iz klase fenolnih kiselina i njihovih derivata i 7 jedinjenja iz klase flavonola i njihovih derivata. Fenolne kiseline činile su 14,27% (15,498 mg/100 g), a flavonoli 85,73% (93,10 mg/100 g) od ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja kvantifikovanih hromatografskom analizom u liofilizovanom tropu lista rena. Izomer I *p*-hidroksibenzojeve kiseline i kempferol-3-*O*-(2"-pentozil)heksozid bili su dominantni fenolni konstituenti liofilizovanog tropa lista rena iz klase fenolnih kiselina i flavonola, respektivno. Tomsone et al. (2020a) izvestili su o nižim nivoima *p*-hidroksibenzojeve kiseline (0,23-0,46 mg/100 g SM) i siringinske kiseline (0,34-2,09 mg/100 g SM) u tropu listova rena podvrgnutom različitim tehnikama sušenja, među kojima je liofilizacija bila najpovoljniji metod sušenja posmatrano sa aspekta očuvanja fenolnih komponenata. Slično tome, zbog blagih uslova i primenjenih niskih temperatura tokom ovog načina sušenja, liofilizacijom je zadržano više fenolnih jedinjenja u crnom grožđu, u poređenju sa sušenjem u sušnici (60 °C) ili na suncu (Çoklar and Akbulut, 2017). Takođe, u poređenju sa sušenjem u sušnici na 60 °C, postupkom liofilizacije očuvane su značajno više koncentracije različitih fenolnih jedinjenja u ekstraktima biljke *Arthrocnemum macrostachyum* iz porodice Amaranthaceae (ElNaker et al., 2021). Generalno se, na osnovu rezultata hromatografske analize dobijenih u okviru ove disertacije, može zaključiti da su liofilizovani tropovi korena i lista rena bogati izvori različitih fenolnih komponenata sa visokim antioksidativnim kapacitetom.

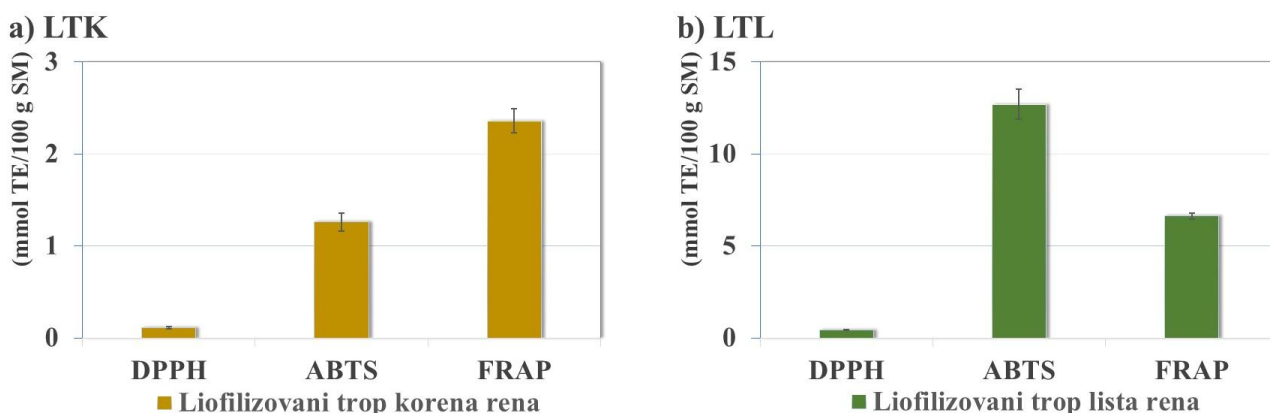
Tabela 5.7. Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja i njihovih derivata (mg/100 g liofilizata) u liofilizovanom tropu korena (LTK) i liofilizovanom tropu lista rena (LTL) određen hromatografskom analizom

Broj	Naziv jedinjenja	LTK	LTL
<i>Fenolne kiseline i derivati</i>			
		<i>mg/100 g</i>	
1	Dihidroksibenzoeva kiselina heksozid izomer I ^b	2,88	/
2	Dihidroksibenzoeva kiselina heksozid izomer II ^b	46,87	1,35
3	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina izomer I ^b	13,47	7,96
4	Siringinska kiselina heksozid ^b	2,79	6,18
5	Dihidroksibenzoeva kiselina ^b	1,87	/
6	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina izomer II ^b	10,20	/
		Σ	78,08
			15,49
<i>Flavonoli i derivati</i>			
7	Kempferol 3- <i>O</i> -(6''-pentozil)heksozid-7- <i>O</i> -heksozid ^c	/	10,95
8	Kvercetin 3- <i>O</i> -(6''-pentozil)heksozid ^c	/	5,87
9	Kempferol 3- <i>O</i> -(2''-heksozil)heksozid ^c	7,80	11,47
10	Kempferol 3- <i>O</i> -(2''-pentozil)heksozid ^c	55,18	61,35
11	Morin ^c	28,92	/
12	Kempferol 3- <i>O</i> -(6''-ramnozil)heksozid ^c	8,08	0,14
13	Kempferol 3- <i>O</i> -(2''-pentozil)pentozid ^c	16,55	1,07
14	Kvercetin ^a	6,83	/
15	Kempferol ^c	89,51	2,25
16	Izorametnin ^c	3,72	/
		Σ	216,59
			93,10
		ΣΣ	294,67
			108,59

^aJedinjenja kvantifikovana korišćenjem dostupnih standarda. ^bJedinjenja kvantifikovana i izražena kao ekvivalenti gentizinske kiseline. ^cJedinjenja kvantifikovana i izražena kao ekvivalenti kvercetina. / - Nedetektovana fenolna jedinjenja.

5.4.3. Antioksidativna aktivnost liofilizata

Rezultati određivanja antioksidativnog kapaciteta liofilizovanih tropova korena i lista rena, primenom DPPH, ABTS i FRAP metode, prikazani su na Slici 5.18.



Slika 5.18. Antioksidativna aktivnost liofilizovanih tropova a) korena (LTK) i b) lista (LTL) rena određena DPPH, ABTS i FRAP metodom

Isti trend zapažen je u slučaju sve tri primenjene metode: liofilizovani trop korena rena imao je nižu antioksidativnu aktivnost (mmol TE/100 g SM: 0,11 ± 0,01 (DPPH), 1,26 ± 0,10 (ABTS), i 2,36 ±

0,13 (FRAP)) od liofilizovanog tropa lista rena (mmol TE/100 g SM: $0,45 \pm 0,02$ (DPPH), $12,70 \pm 0,82$ (ABTS), i $6,62 \pm 0,18$ (FRAP)). Antioksidativnost tropa korena rena nakon liofilizacije smanjena je za 21,43% (DPPH), 0,79% (ABTS) i 10,94% (FRAP). Gubici antioksidativnog potencijala tropa lista rena nakon liofilizacije iznosili su 50,00% (DPPH), 33,54% (ABTS) i 15,45% (FRAP). Morais et al. (2015) prijavili su gubitak redukujućeg antioksidativnog kapaciteta (FRAP) nakon liofilizacije kore avokada (za 60,96%), ananasa (za 56,97%), banane (za 95,58%), papaje (za 48,72%), marakuje (za 23,41%) i lubenice (za 38,07%), dok je FRAP aktivnost kore dinje porasla za 36,90% nakon liofilizacije. Na očuvanje antioksidativne aktivnosti ljuske mahuna kakaoa najpovoljnije je uticala liofilizacija (DPPH: 70,80 $\mu\text{mol TE/g}$; ABTS: 112,4 $\mu\text{mol TE/g}$) u poređenju sa mikrotalasnim (DPPH: 59,30 $\mu\text{mol TE/g}$; ABTS: 89,38 $\mu\text{mol TE/g}$) i konvektivnim sušenjem (DPPH: 35,80 $\mu\text{mol TE/g}$; ABTS: 64,50 $\mu\text{mol TE/g}$) (Valadez-Carmona et al., 2017). Kao i u pomenutim studijama, uklanjanje vode iz tropa sublimacijom, usled primene niskih temperatura u kombinaciji sa niskim pritiscima, rezultiralo je visokim kvalitetom proizvoda i očuvanjem antioksidativnog potencijala tropova korena i lista rena. Na ovaj način osušeni tropovi korena i lista rena pogodni su za dodavanje u gotove prehrambene proizvode, sa ciljem odlaganja oksidativne degradacije i poboljšanja njihovog kvaliteta tokom dugotrajnog skladištenja.

5.5. KARAKTERIZACIJA MAJONEZA SA DODATKOM KOMPONENATA RENA

Na osnovu fizičko-hemijske, morfološke, spektrofotometrijske i hromatografske karakterizacije inkapsulata sokova korena i lista rena, može se reći da pomenute komponente rena predstavljaju bogat izvor antioksidanasa. Dodatno, u cilju potpunog iskorišćenja biljnog materijala i smanjenja količine otpadnih materija, analiziran je i bioaktivni potencijal tropova korena i lista rena, zaostalih kao nusproizvoda dobijanja sokova metodom hladnog presovanja. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da sve analizirane komponente rena sadrže fenolna jedinjenja i imaju izražen antioksidativni potencijal, zbog čega ih je potencijalno poželjno dodavati prehrambenim proizvodima u cilju sprečavanja oksidacije. Jedan od najčešće konzumiranih proizvoda širom sveta sa visokim sadržajem ulja je majonez. Visoka podložnost kvarenju ovog proizvoda tokom skladištenja u najvećem broju slučajeva rezultat je oksidativne degradacije nezasićenih masnih kiselina prisutnih u ulju. Kao što je već ranije spomenuto, u prehrambenoj industriji se problem oksidacije majoneza prevazilazi korišćenjem veštačkih antioksidanasa, kao što su etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), butilhidroksianizol (BHA), butilhidroksitoluen (BHT) i *t*-butil hidrohinon (TBHQ). Međutim, zbog njihovih potencijalno toksičnih i kancerogenih efekata (Martínez-Tomé et al., 2001), postoji sve veća potražnja kupaca za antioksidansima prirodnog porekla. Dodavanjem prirodnih antioksidanasa u majonez može se poboljšati kvalitet proizvoda produženjem oksidativne stabilnosti, obogaćivanjem proizvoda bioaktivnim komponentama i povećanom prihvatljivošću proizvoda od strane potrošača. Stoga su u okviru ove disertacije inkapsulati sokova i liofilizati tropova korena i lista rena dodavani majonezu i potom je praćen njihov uticaj na oksidativnu stabilnost i kvalitet ovog proizvoda tokom osmonedeljnog skladištenja.

Majonezi sa dodatkom komponenata rena proizvedeni su u Laboratoriji za razvoj i inovacije kompanije Polimark d.o.o. (Beograd). Kao referentni proizvodi pripremljeni su kontrolni majonez: M(K), bez dodatka komponenata rena i pozitivno kontrolni majonez: M(PK), sa dodatkom sintetičkog antioksidansa (EDTA), koji se konvencionalno koristi u ovoj kompaniji za sprečavanje oksidacije majoneza. U slučaju dodavanja prahova soka korena rena, proizveden je majonez sa sprej sušenim sokom korena rena bez nosača: M(K-K), kao i majonezi sa tri inkapsulirane formulacije soka korena rena: M(IK-MD/AL), M(IK-MD/GG) i M(IK-MD/GA). Kada je reč o prahovima soka lista rena, proizveden je majonez sa sprej sušenim sokom lista rena bez nosača: M(L-K), kao i majonezi sa inkapsulatima soka lista rena: M(IL-MD/AL) i M(IL-MD/GA). Zbog izuzetno niskog prinosa

inkapsulacije (15,14%), inkapsulate soka lista rena sa nosačem MD/GG nije bilo opravdano koristiti u proizvodnji majoneza iz ekonomskih, tehnoloških i industrijskih razloga. Dodatno, ovaj uzorak imao je najmanje poželjna fizičko-hemijska, morfološka i bioaktivna svojstva u poređenju sa drugim inkapsuliranim formulacijama soka lista rena. Što se tiče dodavanja liofilizovanih tropova korena i lista rena, proizveden je majonez sa dodatkom liofilizovanog tropa lista rena: M(LTL), dok postizanje emulzije nije bilo moguće u slučaju proizvodnje majoneza sa dodatkom liofilizovanog tropa korena rena: M(LTK). Naime, zbog najnižeg sadržaja fenolnih jedinjenja u liofilizovanom tropu korena rena (367,85 mg GAE/100 g SM) u poređenju sa svim drugim komponentama rena korišćenim za proizvodnju majoneza (1717,27-7608,04 mg GAE/100 g SM), bilo je potrebno dodati najveću količinu ove komponente kako bi se postigla jednaka koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja od 400 mg GAE/kg majoneza u svim proizvedenim majonezima. Stoga je na račun dodatih liofilizata tropa korena rena (11,42%) sadržaj vode u ovoj formulaciji majoneza značajno smanjen (3,58%), zbog čega formiranje emulzije nije bilo moguće.



Slika 5.19. Proizvedene formulacije majoneza: kontrolni majonez M(K), majonez sa sintetičkim antioksidansom M(PK), majonezi sa sprej sušenim sokom korena rena M(K-K), M(IK-MD/AL), M(IK-MD/GG), M(IK-MD/GA), majonezi sa sprej sušenim sokom lista rena M(L-K), M(IL-MD/AL), M(IL-MD/GA), majonez sa liofilizovanim tropom lista rena M(LTL)

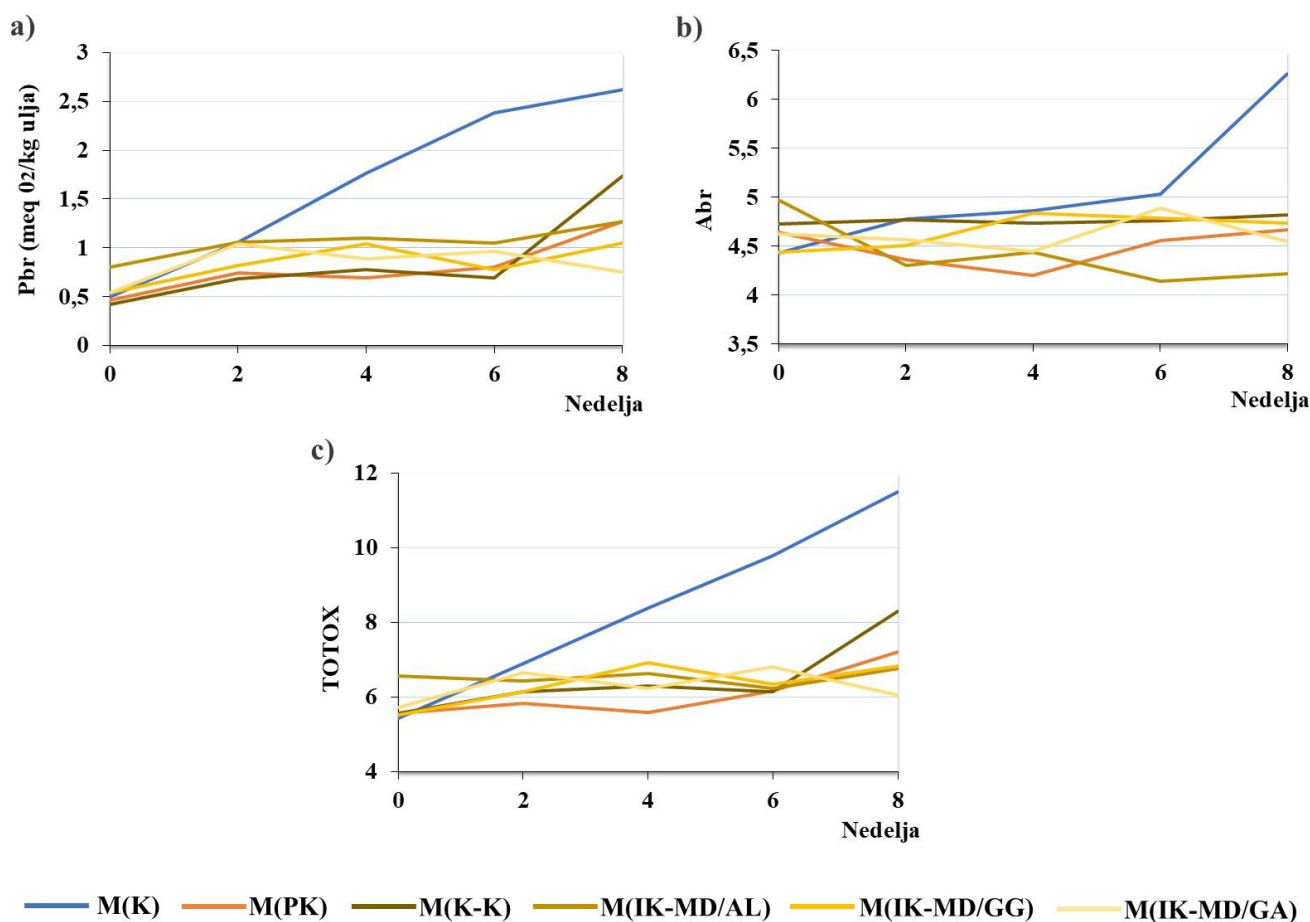
Proizvedeni majonezi sa inkapsuliranim sokovima korena i lista rena i liofilizovanim tropom lista rena, kao i kontrolni majonezi (Slika 5.19), analizirani su u pogledu oksidativne stabilnosti, kvaliteta i senzorne prihvatljivosti od strane potrošača, kako bi se sveukupno sagledao potencijal primene pomenutih komponenata rena u industrijskoj proizvodnji ovog gotovog prehrambenog proizvoda.

5.5.1. Oksidativna stabilnost majoneza

Budući da je u fizičkom smislu emulzija ulja u vodi, majonez je veoma podložan autooksidaciji nezasićenih masnih kiselina zbog velike kontaktne površine uljane faze sa vodom, koja sadrži velike količine kiseonika (Ahmadi-Dastgerdi et al., 2022). Autooksidacija nezasićenih masnih kiselina odvija se u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija, tokom kojih se formiraju lipidni peroksidni radikali (ROO•) i hidroperoksidi (ROOH) (primarni produkti oksidacije), koji se dalje razlažu na aldehide, ketone, alkohole i isparljive organske kiseline (sekundarni produkti oksidacije) (Ghorbani Gorji et al., 2016). Prema tome, ukupno stanje oksidacije lipida majoneza tokom osmonedeljnog skladištenja u mraku na temperaturi od 4 °C ispitano je određivanjem sadržaja primarnih i sekundarnih produkata

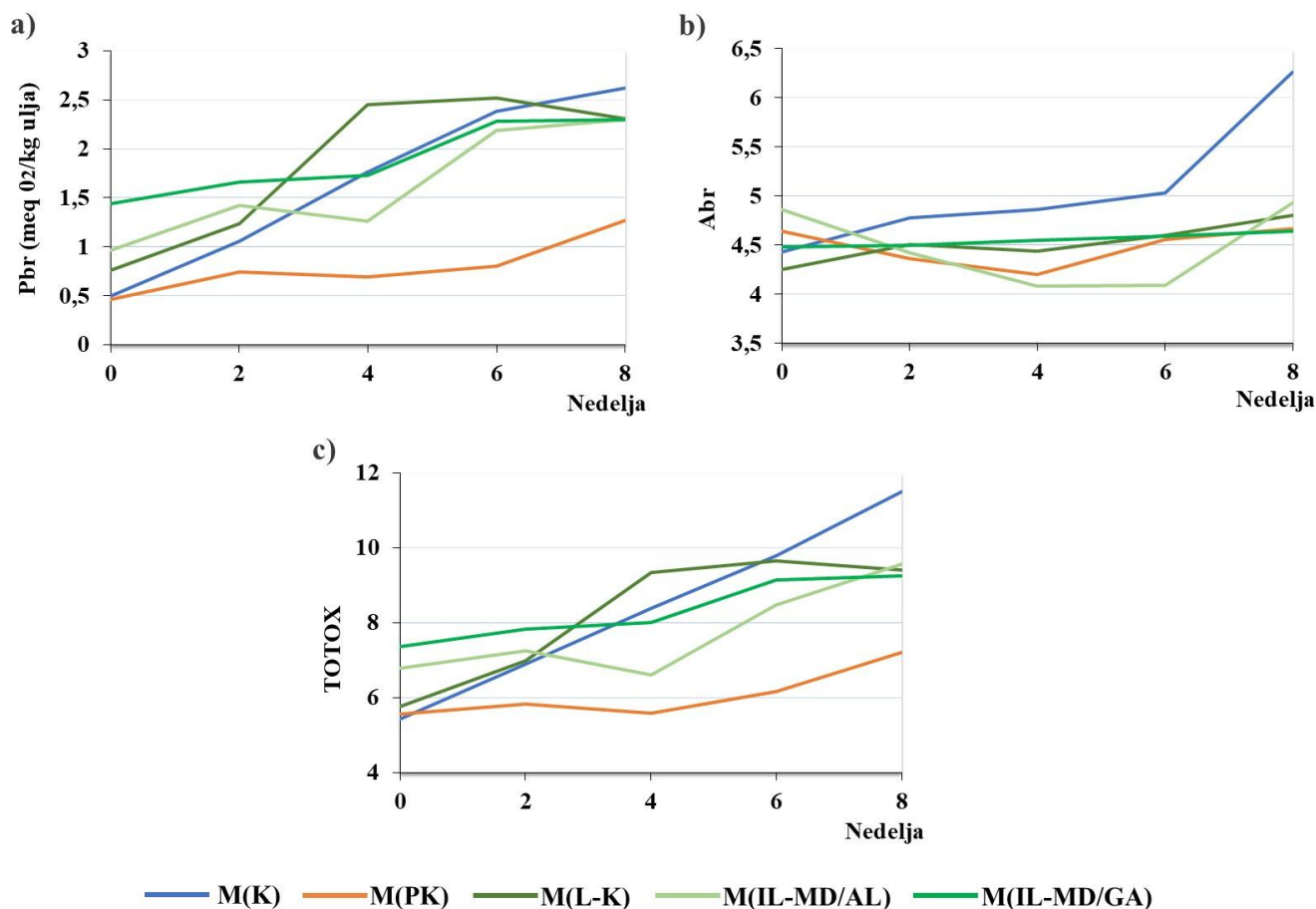
oksidacije, o kojima direktno govore vrednosti peroksidnog broja (Pbr), anisidinskog broja (Abr) i oksidativne vrednosti (TOTOX vrednost) majoneza.

Svi majonezi sa dodatkom inkapsulata soka korena rena imali su niže vrednosti peroksidnog i anisidinskog broja od kontrolnog majoneza na kraju skladištenja (Slika 5.20), direktno ukazujući na uticaj antioksidanasa iz korena rena na sprečavanje oksidacije majoneza. Posle 8 nedelja skladištenja, Pbr majoneza sa inkapsulatima korena rena pratio je sledeći redosled: M(IK-MD/GA)<M(IK-MD/GG)<M(IK-MD/AL),M(PK)<M(K-K)<M(K). Fluktuacije peroksidnog broja tokom skladištenja mogle su biti posledica sporijeg formiranja lipidnih peroksida i hidroperoksida od njihovog razlaganja na sekundarne fragmente, što je rezultiralo smanjenjem peroksidnog broja. S druge strane, povećanje peroksidnog broja moglo je biti rezultat ubrzanja oksidacije lipida tokom vremena. Zaštitni efekat inkapsulacionih nosača na bioaktivna jedinjenja korena rena i njihovo postepeno oslobađanje tokom skladištenja uticali su na niži peroksidni broj majoneza sa inkapsulatima korena rena u poređenju sa kontrolnim majonezom. Anisidinski broj kontrolnog majoneza povećavao se tokom skladištenja, dok su kod majoneza sa inkapsulatima zapažene fluktuacije u vrednostima ovog parametra. To je moglo biti zbog postepene degradacije biopolimernih matrica pod uticajem spoljašnjih faktora. Zbog toga se anisidinski broj majoneza sa dodatim inkapsulatima soka korena rena nije značajno povećao nakon 8 nedelja skladištenja. Osim toga, raznolikost fenolnih jedinjenja prisutnih u prahovima rena i endogeni faktori majoneza, kao što su pH vrednost i sadržaj ulja, mogli su uticati na stabilnost ovih jedinjenja tokom skladištenja (Tomsone et al., 2020c). Povrh svega, peroksidni i anisidinski broj svih proizvedenih majoneza bili su ispod bezbednosne granice (10 meq O₂/kg ulja i 10, respektivno) (Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za jestiva biljna ulja i masti, margarin i druge masne namaze, majonez i srodne proizvode, 2013) na kraju skladištenja. Ovo ukazuje da su temperatura od 4 °C i odsustvo svetlosti bili optimalni uslovi za skladištenje ovih majoneza posmatrano sa aspekta očuvanja oksidativne stabilnosti. Efekat biljnih antioksidanasa na sprečavanje oksidacije majoneza takođe je prijavljen u drugim istraživanjima, dodavanjem žalfije (Rasmy et al., 2012), đumbira u prahu (Kishk and Elsheshetawy, 2013), ekstrakta semena grožđa (Altunkaya et al., 2013), listova indijskog oraha (Chotphruethipong and Benjakul, 2019) i nusproizvoda od repe (Lazăr et al., 2022). Na kraju skladištenja, najvišu TOTOX vrednost imao je kontrolni majonez, zatim pozitivna kontrola i na kraju majonezi sa dodatkom inkapsulata soka korena rena (Slika 5.20). Dobijeni rezultati ističu visoku stabilnost inkapsuliranog soka korena rena u matrici hrane, kao i obećavajući potencijal ovih prirodnih antioksidanasa da održe oksidativnu stabilnost majoneza tokom skladištenja i time smanje upotrebu sintetičkih antioksidanasa u prehrambenoj industriji.



Slika 5.20. a) Peroksidni broj (Pbr), b) anisidinski broj (Abr) i c) oksidativna vrednost (TOTOX vrednost) majoneza sa dodatkom sprej sušenog soka korena rena u poređenju sa kontrolnim uzorcima

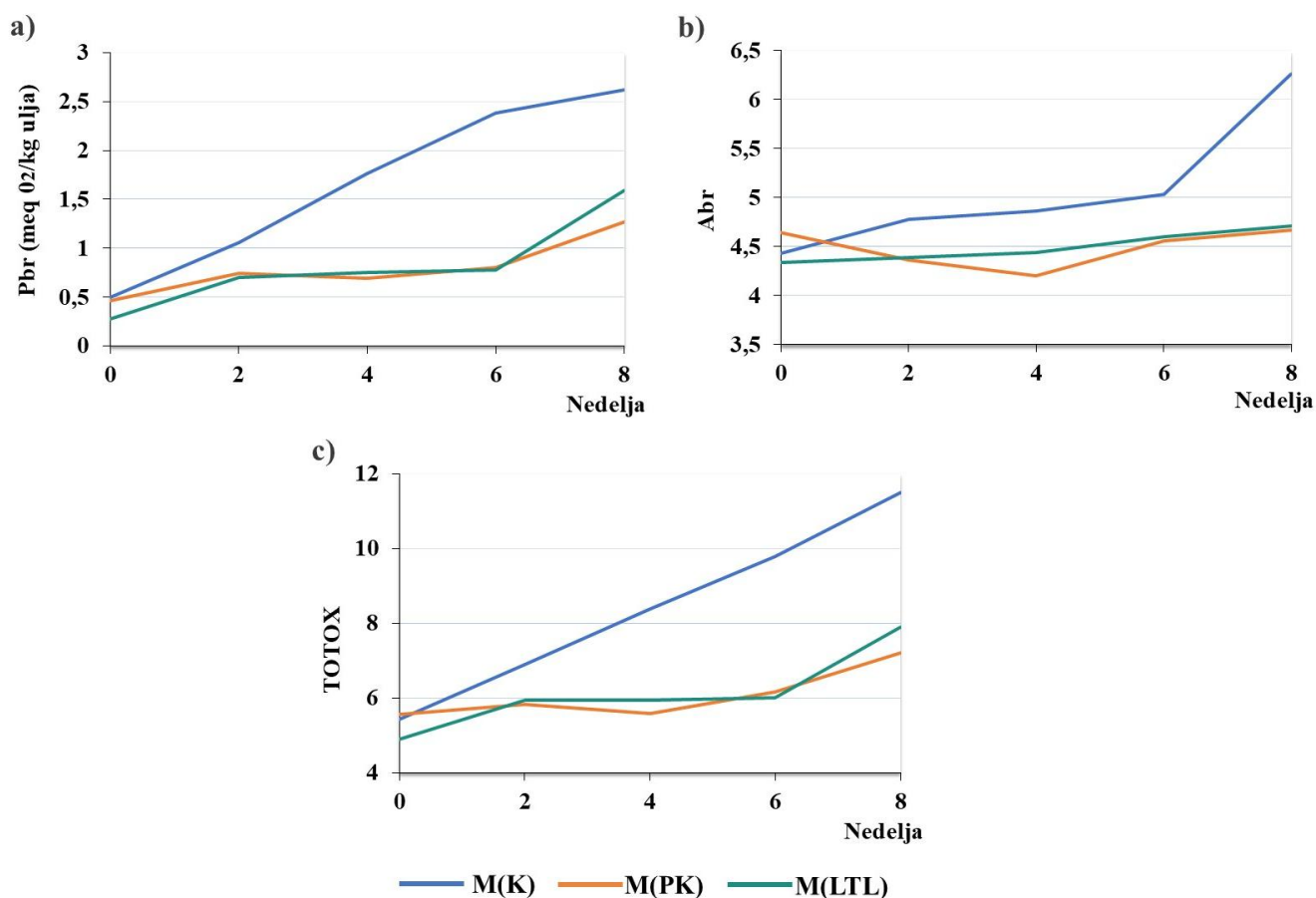
Slično kao i prahovi soka korena rena, i prahovi soka lista rena (L-K, IL-MD/AL i IL-MD/GA) pokazali su inhibitorno dejstvo na formiranje produkata oksidacije majoneza tokom skladištenja. Majonezi sa dodatkom inkapsulata lista rena imali su više vrednosti peroksidnog i anisidinskog broja na kraju skladištenja nego majonez sa dodatkom EDTA, ali niže vrednosti od kontrolnog majoneza (Slika 5.21). To je ukazivalo da bioaktivna jedinjenja lista rena u majonezu pokazuju antioksidativno delovanje. Nakon osmonedeljnog skladištenja, vrednosti peroksidnog broja, kao i vrednosti anisidinskog broja svih majoneza sa inkapsulatima lista rena, nisu se značajno razlikovale, ukazujući na relativno slično ponašanje svih inkapsuliranih formulacija soka lista rena u proizvodu. Međutim, vrednosti ovih parametara su varirale tokom skladištenja majoneza, što bi moglo biti posledica različitih brzina degradacije biopolimernih nosača. Kwon et al. (2015) su izvestili o sličnim vrednostima Pbr i Abr majoneza sa dodatkom različitih začina nakon 6 nedelja skladištenja (2,48-10,10 meq O₂/kg i 2,30-7,12, respektivno). Rezultati dobijeni u ovom istraživanju bili su u opsegu vrednosti koje su saopštili Shabbir et al. (2015) za majoneze sa dodatkom klica susama nakon 45 dana skladištenja (1,29-3,30 meq O₂/kg i 3,44-4,70, respektivno). TOTOX vrednosti majoneza kontinuirano su rasle tokom osam nedelja skladištenja (Slika 5.21), što je u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživanja o oksidativnoj stabilnosti majoneza tokom skladištenja (Ahmadi-Dastgerdi et al., 2019; Ahmadi-Dastgerdi et al., 2022). Značajno niže TOTOX vrednosti majoneza koji su sadržali inkapsulate lista rena u odnosu na kontrolni uzorak ukazivale su na izuzetan potencijal ovih prahova za upotrebu u prehrambenoj industriji u cilju sprečavanja oksidacije proizvoda bogatih uljima.



Slika 5.21. a) Peroksidni broj (Pbr), b) anisidinski broj (Abr) i c) oksidativna vrednost (TOTOX vrednost) majoneza sa dodatkom sprej sušenog soka lista rena u poređenju sa kontrolnim uzorcima

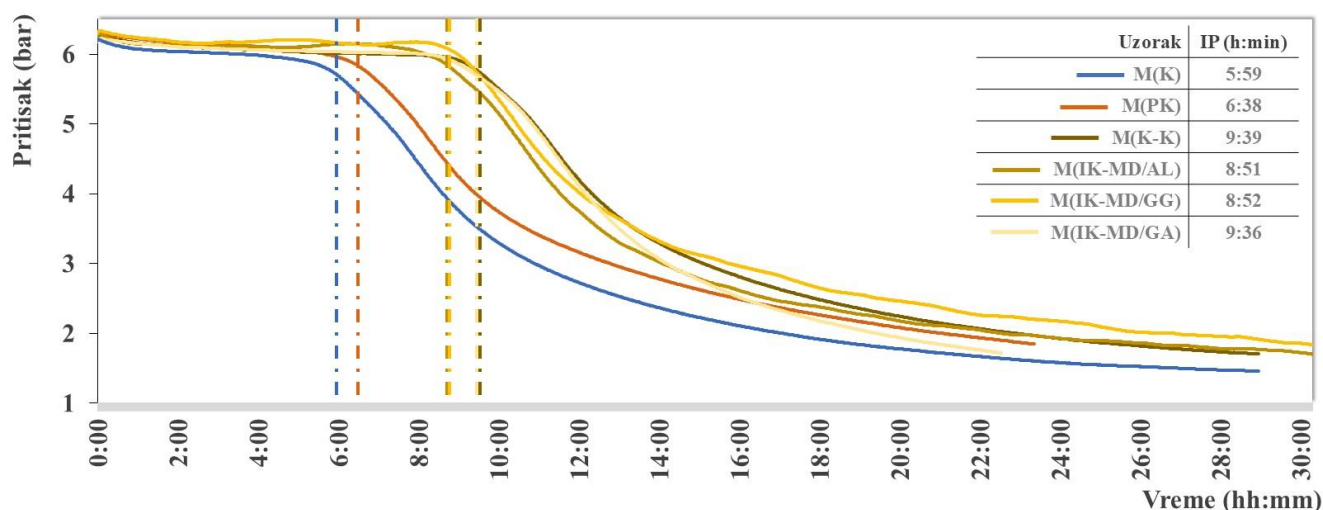
Za razliku od majoneza sa inkapsuliranim prahovima, čije su vrednosti parametara oksidativne stabilnosti varirale tokom skladištenja usled postepene degradacije biopolimerne matrice i otpuštanja bioaktivnih komponenata, u slučaju majoneza sa liofilizovanim tropom lista rena ove vrednosti su se kontinuirano povećavale sa porastom vremena skladištenja. Ipak, po završetku osmonedeljnog skladištenja, majonez koji je sadržao liofilizovani trop lista rena imao je niže vrednosti peroksidnog, anisidinskog i TOTOX broja u poređenju sa kontrolnim uzorkom (Slika 5.22). Zaštitni efekat tropa lista rena od oksidacije nezasićenih masnih kiselina u majonezu mogao bi se pripisati prisustvu fenolnih jedinjenja u njegovom sastavu. Ovi prirodni antioksidansi deluju kao helatori metala, sprečavajući nastanak hidroperoksida i njihovih produkata razgradnje, i na taj način inhibirajući lipidnu oksidaciju majoneza (Khalid et al., 2021). Postepeno povećanje peroksidnog broja tokom skladištenja prijavljeno je za majonez obogaćen korom cvekle, koja zaostaje kao nusproizvod prilikom prerade (Lazār et al., 2022). Kao i u slučaju dobijenih rezultata određivanja oksidativne stabilnosti u okviru ove disertacije, trend kontinuiranog porasta peroksidnog i anisidinskog broja tokom skladištenja majoneza koji je sadržao ekstrakte kore jabuke prijavljen je u istraživanju autora Khalid et al. (2021). Vrednosti peroksidnog i anisidinskog broja majoneza koji je sadržao različite koncentracije ekstrakta kore jabuke (1,3-3,22 meq O₂/kg i 3,42-4,71, respektivno) bile su u saglasnosti sa rezultatima ovih parametara oksidativne stabilnosti majoneza sa komponentama rena (0,75-2,30 meq O₂/kg i 4,22-4,93, respektivno) nakon istog perioda skladištenja. Dobijeni rezultati saglasni su sa rezultatima istraživanja o oksidativnoj stabilnosti majoneza tretiranog ekstraktom ljubičaste kukuruzne ljuske, kod kog je

povećanje vrednosti anisidinskog broja bilo niže od majoneza tretiranog sa BHT ili EDTA tokom 10 nedelja skladištenja (Li et al., 2014).



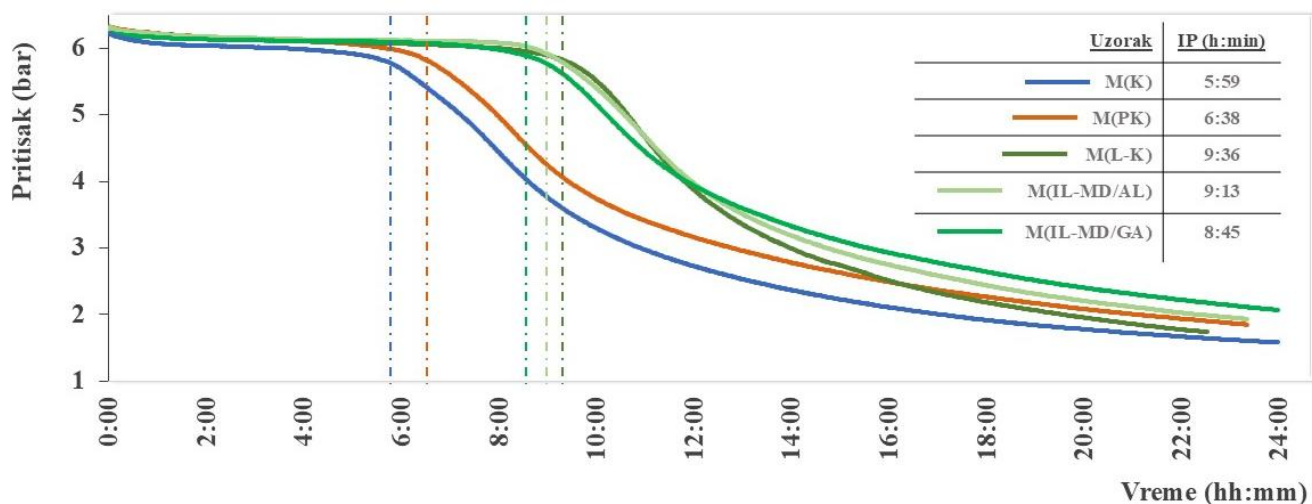
Slika 5.22. a) Peroxidni broj (Pbr), b) anisidinski broj (Abr) i c) oksidativna vrednost (TOTOX vrednost) majoneza sa dodatkom liofilizovanog tropa lista rena u poređenju sa kontrolnim uzorcima

Kapacitet sprej sušenih prahova soka korena rena da odlože oksidaciju majoneza određen je i primenom testa ubrzane oksidacije (OXITEST analiza), neposredno nakon pripreme majoneza. Niska vrednost indukcionog perioda (IP) majoneza ukazuje na njegovu visoku podložnost oksidaciji. IP ispitivanih uzoraka majoneza sa dodatkom sušenih prahova rena kretala se od 531 do 579 min. To implicira da su inkapsulati soka korena rena produžili IP majoneza u poređenju sa kontrolnim uzorkom (za 172-220 min), kao i sa sintetičkim antioksidansom (za 133-181 min) (Slika 5.23). Vrednosti indukcionog perioda majoneza sa inkapsulatima soka korena rena nisu se značajno razlikovale (531 (M(IK-MD/AL)), 532 (M(IK-MD/GG)) i 576 (M(IK-MD/GA)) min), što je ukazivalo na slično ponašanje ovih inkapsulata u majonezu. Rezultati testa ubrzane oksidacije bili su u skladu sa TOTOX vrednostima na kraju skladištenja. Karadag et al. (2020) prijavili su niže IP vrednosti (318-382 min) majoneza sa sirćetom proizvedenim iz različitih biljaka. Test ubrzane oksidacije proizvedenih majoneza bio je od izuzetnog značaja, jer je njime dokazana superiorna antioksidativna aktivnost inkapsulata soka korena rena nad konvencionalnim, sintetičkim antioksidansom (EDTA) u sprečavanju oksidativne degradacije majoneza, što je rezultiralo značajnim produženjem roka trajanja ovog proizvoda.



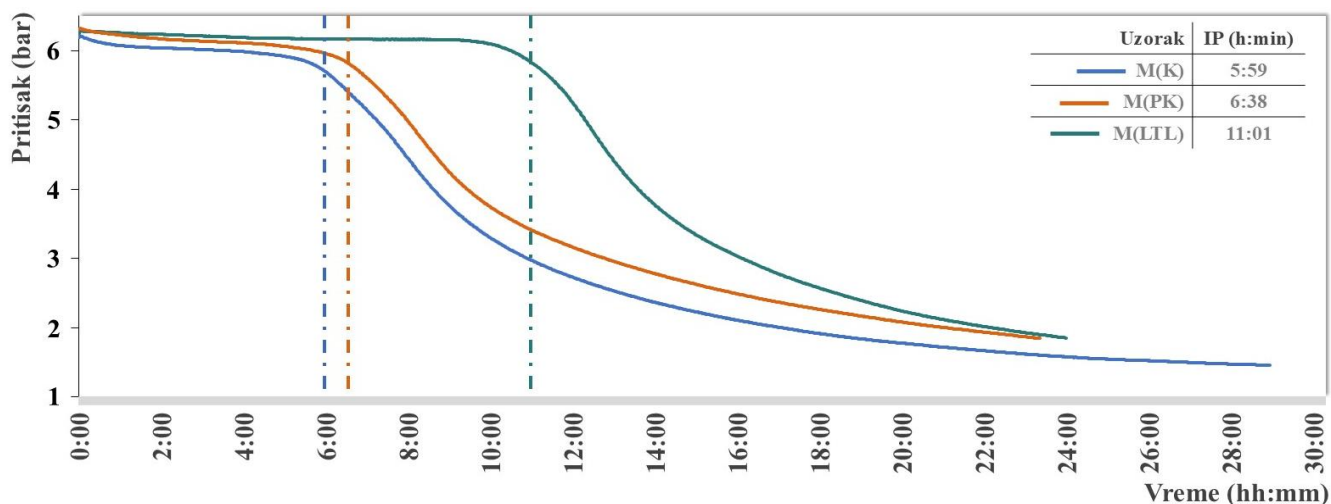
Slika 5.23. Test ubrzane oksidacije (OXITEST analiza) majoneza sa dodatkom sprej sušenog soka korena rena u poređenju sa kontrolnim uzorcima

Kao i u slučaju majoneza sa dodatkom inkapsulata soka korena rena, i majonezi koji su sadržali inkapsulate soka lista rena pokazivali su višu IP vrednost u odnosu na kontrolni majonez (za 166-217 min) (Slika 5.24). Za razliku od TOTOX vrednosti, rezultati testa ubrzane oksidacije su pokazali da inkapsulati soka lista rena produžavaju indukcionu period majoneza i u odnosu na sintetički antioksidans (za 127-178 min). Ovo se može objasniti sposobnošću inkapsulata da postepeno oslobađaju antioksidanse tokom vremena, produžavajući vreme do krajnje tačke oksidacije, a samim tim i rok trajanja majoneza. Naime, inkapsulirani fenoli rena sa kateholnom grupom, kao što je kvercetin, mogli bi da inhibiraju formiranje metalom indukovanih kiseonikovih radikala (Dai and Mumper, 2010; De Bruno et al., 2021). Niska pH vrednost majoneza dovodi do narušavanja jonskih mostova između fosvitina i gvožđa iz žumanca jajeta (Mirzanajafi-Zanjani et al., 2019). Dakle, kontrolisano oslobađanje ovog fenolnog jedinjenja iz inkapsulata moglo bi sprečiti dejstvo Fe^{2+} na ciljne molekule, kao što su lipidi, a time i oksidaciju majoneza tokom skladištenja. Duži IP majoneza sa IL-MD/AL nego sa IL-MD/GA mogao je biti posledica slabe hidrosolubilnosti alginata u kiseloj pH sredini majoneza (Takeuchi et al., 1998; Tsai et al., 2017), čime je usporeno oslobađanje antioksidanasa iz inkapsulata i produžena oksidativna stabilnost majoneza. Dobijeni rezultati su bili u opsegu prijavljenih IP vrednosti (278-824 min) za niskomasne, veganske majoneze sa dodatkom guma izolovanih iz nusproizvoda hladnog ceđenja ulja čija semenki, lanenog semena i rukole (Hijazi et al., 2022). Konačno, majonezi koji su sadržali inkapsulate soka lista rena pokazali su slabiju podložnost oksidaciji od majoneza sa konvencionalnim sintetičkim antioksidansom (EDTA). To je ukazivalo na veliki potencijal upotrebe ovih antioksidanasa iz prirodnog izvora u industrijskoj proizvodnji proizvoda bogatih lipidima kao zamene za sintetičke antioksidanse.



Slika 5.24. Test ubrzane oksidacije (OXITEST analiza) majoneza sa dodatkom sprej sušenog soka lista rena u poređenju sa kontrolnim uzorcima

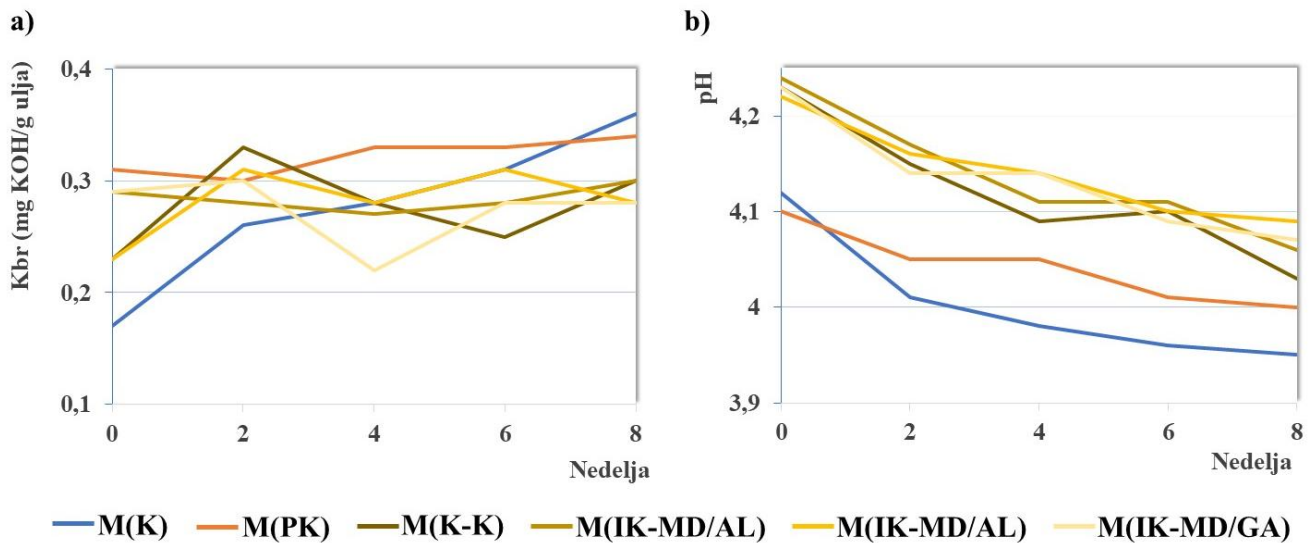
Testom ubrzane oksidacije utvrđeno je da je majonez koji je sadržao liofilizovani trop lista rena imao najvišu vrednost inducionog perioda (661 min) (Slika 5.25), ukazujući na potencijalno najizraženiju oksidativnu stabilnost ovog proizvoda. Liofilizati tropa lista rena produžili su IP majoneza u poređenju sa kontrolnim uzorkom (za 302 min, tj. 84,12%), kao i sa sintetičkim antioksidansom (za 263 min, tj. 66,08%). Slično tome, prelive za salatu na bazi emulzije obogaćeni nusproizvodima iz semenki ulja grožđa i nara pokazali su visok IP (3,22-26,76 i 2,49-24,76 h, respektivno) u poređenju sa kontrolnim uzorcima (0,43-8,82 h) (Aksoy et al., 2022). Majonez sa liofilizovanim tropom lista rena imao je za 52-85% duži IP od majoneza sa nanočesticama ekstrakta tropa masline inkapsuliranog unutar gume dobijene iz semena rukole ili čije (Akcicek et al., 2022). Dobijeni rezultati su veoma obećavajući i ukazuju na veliki potencijal analiziranog nusproizvoda lista rena za primenu u prehrambenoj industriji, u cilju očuvanja oksidativne stabilnosti proizvoda. Takođe, dokazana je superiornost tropa lista rena u odlaganju oksidacije majoneza u poređenju sa sintetičkim antioksidansom EDTA, koji se koristi u tu svrhu u industrijskoj proizvodnji majoneza. Stoga bi upotreba ove biološki vredne otpadne sirovine mogla imati višestruki značaj: očuvanje kvaliteta i produžetak roka trajanja proizvoda, smanjenje upotrebe sintetičkih antioksidanasa i redukovanje količina biološkog otpada iz poljoprivrednog sektora.



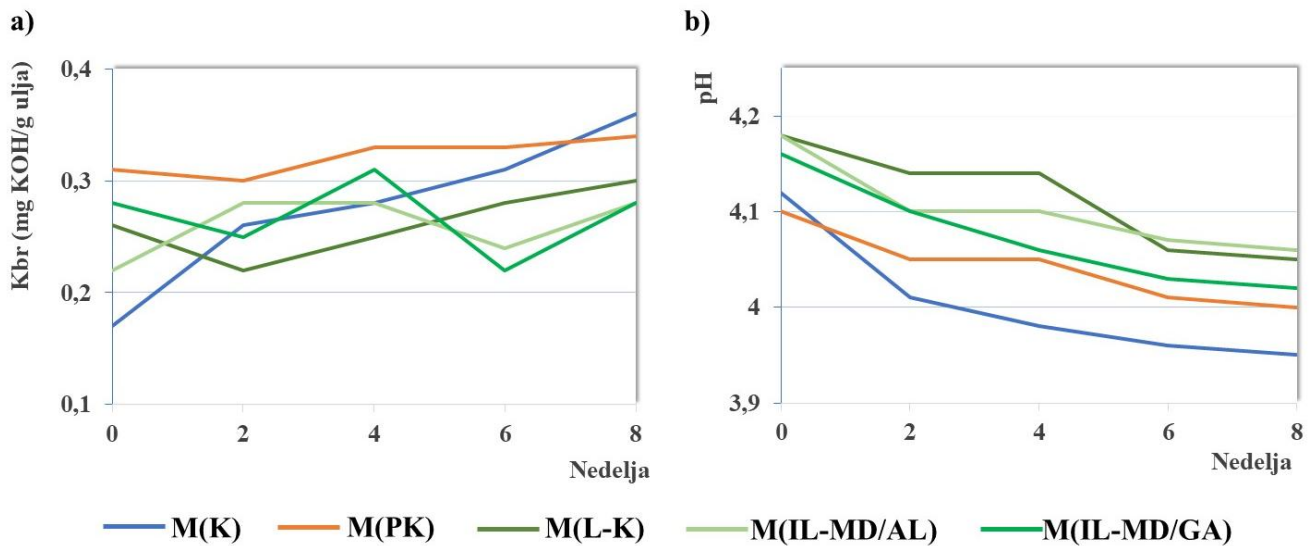
Slika 5.25. Test ubrzane oksidacije (OXITEST analiza) majoneza sa dodatkom liofilizovanog tropa lista rena u poređenju sa kontrolnim uzorcima

5.5.2. Kvalitet majoneza

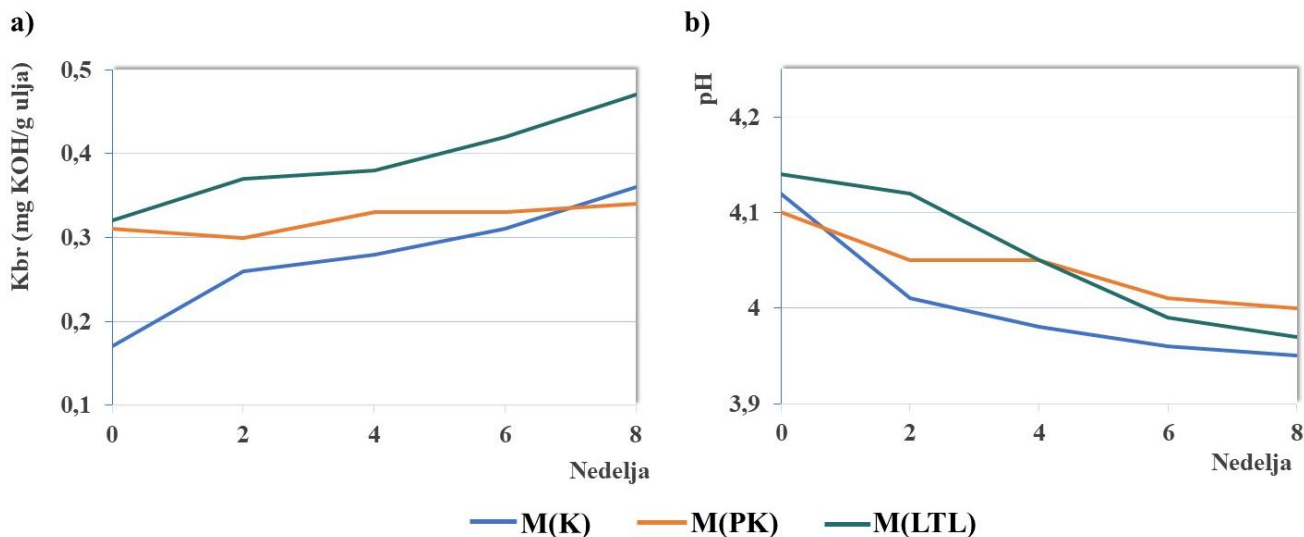
Kvalitet proizvedenih majoneza sa dodatkom inkapsuliranih sokova korena i lista rena i liofilizovanog tropa lista rena procenjen je na osnovu pH vrednosti i kiselinskog broja majoneza tokom osmonedeljnog skladištenja u mraku na temperaturi od 4 °C.



Slika 5.26. a) Kiselinski broj i b) pH vrednost majoneza sa dodatkom sprej sušenog soka korena rena u poređenju sa kontrolnim uzorcima



Slika 5.27. a) Kiselinski broj i b) pH vrednost majoneza sa dodatkom sprej sušenog soka lista rena u poređenju sa kontrolnim uzorcima



Slika 5.28. a) Kiselinski broj i b) pH vrednost majoneza sa dodatkom liofilizovanog tropa lista rena u poređenju sa kontrolnim uzorcima

Kiselinski broj je direktni indikator hidrolize lipida, koja dovodi do stvaranja slobodnih masnih kiselina. Kao što se može primetiti na Slici 5.28, kiselost kontrolnog i pozitivno kontrolnog majoneza, kao i majoneza sa liofilizatima tropa lista rena postepeno se povećavala tokom skladištenja. Sa druge strane, kiselinski brojevi majoneza koji su sadržali inkapsulirane prahove sokova korena i lista rena varirali su tokom skladištenja (Slike 5.26 i 5.27). Razlog tome je mogla biti postepena degradacija biopolimernih nosača i kontrolisano oslobađanje bioaktivnih komponenata, kao što je već prethodno diskutovano za Pbr i Abr. Za razliku od majoneza sa liofilizovanim tropom lista rena, svi majonezi koji su sadržali različite formulacije inkapsulata sokova korena i lista rena imali su niži kiselinski broj od kontrolnih majoneza nakon osam nedelja skladištenja. To se upravo može objasniti postepenim otpuštanjem antioksidanasa iz inkapsulata tokom vremena, održavajući kiselost majoneza niskom tokom dugotrajnog skladištenja. Soltan et al. (2023) i Kishk and Elsheshetawy (2013) prijavili su viši Kbr majoneza sa dodatkom ekstrakta šipurka i praha đumbira, respektivno, nakon istog perioda skladištenja. Povećanje Kbr tokom skladištenja može biti posledica aktivnosti hidrolitičkih i oksidativnih enzima u jajima ili acidotolerantnih mikroorganizama prisutnih u vodenoj fazi majoneza (Blejan and Nour, 2023).

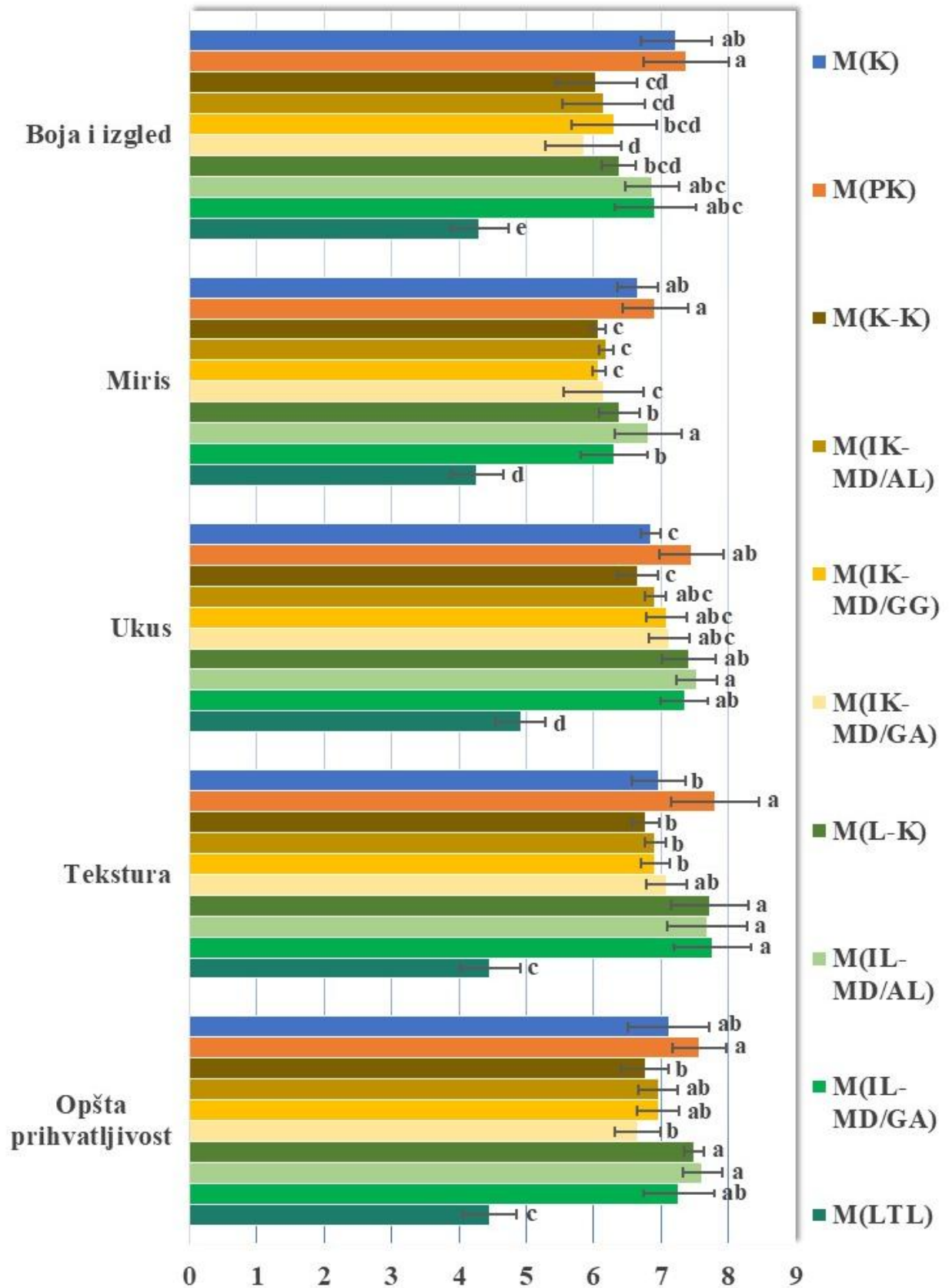
pH vrednost je važan parametar prehrambenih proizvoda sa stanovišta mikrobiološke stabilnosti, a dobijeni rezultati određivanja ovog parametra kvaliteta različitih formulacija majoneza prikazani su na Slikama 5.26, 5.27 i 5.28. U odnosu na vrednosti kiselinskog broja, uzorci majoneza pokazivali su suprotan trend pH vrednosti, koje su se kontinuirano smanjivale sa porastom vremena skladištenja. Sličan trend smanjenja pH vrednosti tokom različitih perioda skladištenja majoneza prijavili su i drugi autori (Worrasinchai et al., 2006; Kishk and Elsheshetawy, 2013; Nour, 2021; Savani et al., 2023). Na početnu pH vrednost majoneza značajno je uticalo dodavanje različitih formulacija inkapsulata i liofilizata rena. S obzirom na to da pH vrednost biljaka iz porodice Brassicaceae iznosi približno 5,3 (Hanschen et al., 2014), dodavanje komponenata rena dovelo je do povećanja pH vrednosti majoneza u poređenju sa kontrolnim uzorkom (pH 4,12). Veći uticaj na povećanje vrednosti ovog parametra kvaliteta majoneza imali su inkapsulati korena (oko 2,67%) nego lista (oko 1,46%) rena, što se može objasniti razlikama u količini inkapsulata koje su dodate proizvodu. Svi uzorci majoneza sa različitim formulacijama inkapsulata i liofilizata rena imali su više pH vrednosti od kontrolnih majoneza nakon osam nedelja skladištenja. Na smanjenje pH vrednosti proizvoda tokom skladištenja značajno može uticati aktivnost nepatogenih, acidotolerantnih bakterija mlečne kiseline

(Worrasinchai et al., 2006), kao i razgradnja određenih estarskih grupa ulja i njihova konverzija u kisele grupe (Minasian et al., 2024). Dodavanje svih formuliranih prahova rena (inkapsulata i liofilizata) u majoneze dovelo je do sporijeg smanjenja pH vrednosti u odnosu na kontrolni majonez, što se može pripisati antibakterijskom dejstvu rena. Niska pH vrednost i visoka kiselost sredine izazivaju narušavanje strukture mostova između gvožđa i fosvitina, proteina iz žumanca jajeta, što dovodi do oslobađanja gvožđa i oksidacije lipida (Honold et al., 2016). O sličnim promenama pH vrednosti tokom skladištenja izvestili su Minasian et al. (2024) za majoneze sa dodatkom inkapsuliranog etarskog ulja *Prangos ferulacea*. Stoga se iz dobijenih rezultata može zaključiti da su dodati inkapsulati sokova korena i lista rena, kao i liofilizati tropa lista rena, pozitivno uticali na pH vrednost i kiselost majoneza, ukazujući na značaj njihove uloge u prevenciji oksidacije majoneza, ograničavanjem oslobađanja jona gvožđa.

5.5.3. Senzorna analiza majoneza

Rezultati senzorne evaluacije različitih formulacija majoneza prikazani su na Slici 5.29. Dodavanje inkapsulata sokova korena i lista rena majonezu uticalo je na razlike u senzornim ocenama boje i izgleda majoneza u poređenju sa kontrolnim uzorcima. To se može objasniti efektom dodatih inkapsulata na odstupanje od standardne boje majoneza na koju su potrošači naviknuti. Takođe, nerastvoreni inkapsulati mogli su doprineti nižim senzornim ocenama izgleda majoneza (Slika 5.19). Međutim, trebalo bi uzeti u obzir da se inkapsulati tokom vremena rastvaraju u majonezu, što bi moglo doprineti povećanju senzorne ocene ovog parametra tokom skladištenja. Kao što se može videti na Slici 5.19, boja i izgled majoneza sa dodatim inkapsuliranim sokovima korena i lista rena bili su slični standardnom majonezu M(PK), dok su majonezi sa sprej sušenim sokovima korena i lista rena bez nosača: M(K-K) i M(K-L), izgledali drugačije. To implicira da je upotrebom različitih nosača za inkapsulaciju maskirana boja sokova korena i lista rena, što je rezultiralo višim ocenama ovog senzornog atributa. U ovom pogledu posebno su se istakli majonezi sa inkapsulatima soka lista rena (IL-MD/AL i IL-MD/GA), čiji se boja i izgled nisu značajno razlikovali od kontrolnih majoneza. Slične senzorne ocene boje (oko 7) prijavili su Rahim et al. (2024) za majoneze formulisane sa sprej sušenim mešavinama ulja čije i ribljeg ulja, inkapsuliranih unutar MD i GA. Boju i izgled majoneza sa dodatim liofilizatima tropa lista rena M(LTL) panelisti su ocenili značajno manje prihvatljivim u poređenju sa drugim formulacijama majoneza. Kao što se može videti na Slici 5.19, izgled ove formulacije majoneza razlikovao se od drugih i veoma značajno je odstupao od izgleda standardnog majoneza M(PK), što je rezultiralo nižim ocenama ispitivanih senzornih atributa. Majonezi koji su sadržali inkapsulate soka korena imali su niže senzorne ocene mirisa i ukusa od majoneza sa inkapsulatima soka lista. Razlog bi mogao biti procentualno veći udeo komponenata korena u majonezima nego komponenata lista, čime je u ovim majonezima potencijalno bilo prisutno više oštrih, isparljivih jedinjenja rena. M(K-K) je imao najniže senzorne rezultate za ove parametre u odnosu na druge majoneze koji su sadržali sprej sušene prahove, što se može objasniti odsustvom nosača, koji bi maskirao komponente soka korena rena koje utiču na ova senzorna svojstva. Suprotno tome, senzorne ocene mirisa i ukusa uzorka M(IL-MD/AL) i majoneza sa EDTA nisu se značajno razlikovale, ukazujući na dobra svojstva ove kombinacije nosača (MD/AL) u maskiranju specifičnih mirisa isparljivih materija rena. Panelisti su ukus i miris majoneza koji je sadržao liofilizate tropa lista rena ocenili senzornim ocenama od 4 („malo mi se ne dopada“) do 5 („nit mi se dopada, nit mi se ne dopada“), koje su bile značajno niže u odnosu na sve druge proizvedene formulacije majoneza. Zbog dodavanja inkapsulata i značajnog smanjenja sadržaja vode u ovim formulacijama, majonezi sa sprej sušenim prahovima korena rena bili su viskoziji i razlikovali su se od teksture standardnog majoneza M(PK). Takođe, s obzirom na to da je veličina kapljica ulja majoneza najčešće oko 1-20 μm (Gaikwad et al., 2017) i da ljudski jezik ne može razlikovati čestice manje od 3 μm kao pojedinačne čestice (Mirzanajafi-Zanjani et al., 2019), inkapsulati korena rena (veličine čestica 3,82-6,12 μm) mogli su uticati na teksturu majoneza. Sa druge strane, ocene teksture majoneza koji sadrže inkapsulate lista rena

nisu se razlikovale od ocena pozitivne kontrole M(PK), dok su bile značajno više od onih za kontrolni majonez (MK), majoneze sa inkapsulatima korena rena i majonez sa liofilizatima tropa lista rena. Liofilizovani trop lista rena koji je dodat u majonez negativno je uticao na teksturu ovog proizvoda, koju su ocenjivači označili najmanje prihvatljivom u poređenju sa svim drugim pripremljenim formulacijama majoneza. Senzorne ocene teksture majoneza sa dodatkom komponenata rena bile su u skladu sa prijavljenom literaturom o dodavanju različitih biljaka majonezu (Raikos et al., 2016; Ahmadi-Dastgerdi et al., 2019). Konačno, rezultati opšte prihvatljivosti bili su u skladu sa rezultatima svih procenjenih senzornih svojstava, tako da su panelisti majoneze sa inkapsulatima soka lista ocenili senzorno prihvatljivijim od majoneza sa inkapsulatima soka korena rena, dok su majonezi koji su sadržali liofilizovani trop lista rena bili značajno manje prihvatljivi od svih ostalih proizvedenih majoneza. S obzirom na to da se liofilizovani trop lista rena pokazao najefektivnijom od svih ispitivanih komponenata rena u očuvanju oksidativne stabilnosti majoneza, a ocenjen je najnižim senzornim ocenama, predlaže se optimizacija proizvodnje majoneza u pogledu redukovanja količine tropa, kao i njegovog usitnjavanja i spršaivanja pre dodavanja u proizvod. Generalno se može zaključiti da su majonezi koji su sadržali inkapsulirane prahove sokova korena i lista rena bili senzorno prihvatljivi, sa senzornim ocenama opšte prihvatljivosti od 7 („umereno mi se dopada“) do 8 („veoma mi se dopada“). Posebno je važno istaći uzorak M(IL-MD/AL) kojeg su panelisti ocenili senzorno prihvatljivijim čak i od komercijalnog, standardnog majoneza sa sintetičkim antioksidansom M(PK). Konačno, senzorna procena majoneza je ukazala na veliki potencijal inkapsuliranih sokova korena i lista rena kao zamene za sintetičke antioksidanse, ističući IL-MD/AL formulaciju inkapsulata sa najizraženijim pozitivnim efektima na senzornu prihvatljivost majoneza.



Slika 5.29. Senzorna analiza majoneza sa dodatim komponentama rena (a, b, c... Različita slova u okviru istog senzornog atributa ukazuju na značajne razlike; $p < 0,05$)

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu postavljenih ciljeva i rezultata dobijenih u okviru prvog dela doktorske disertacije, koji se odnosio na dobijanje i karakterizaciju sokova korena i lista rena, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Sledeći koncept „zelene hemije“, primenjena je metoda hladnog presovanja, u cilju ekstrakcije sokova iz korena i lista rena, kao i očuvanja biološki aktivnih komponenata ovog vrednog povrtarskog useva. Primenom ove blage, netermalne i ekološki prihvatljive metode ekstrakcije, dobijeni su sok korena i sok lista rena.
- Analizom sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja dobijeni su sledeći rezultati za sok korena rena: 2400,44 mg GAE/100 g SM i sok lista rena: 7888,20 mg GAE/100 g SM. Takođe, u dobijenim sokovima procenjen je sadržaj ukupnih flavonoida i ukupnih fenolnih kiselina, kao dominantnih klasa fenolnih jedinjenja. Sadržaj ukupnih flavonoida iznosio je 499,75 mg CE/100 g SM u soku korena rena i 7353,62 mg CE/100 g SM u soku lista rena. Kao i u slučaju sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i ukupnih flavonoida, analizom ukupnog sadržaja fenolnih kiselina pokazana je kvantitativna dominantnost ovih jedinjenja u soku lista rena (7943,71 mg CAE/100 g SM) u poređenju sa sokom korena rena (3963,91 mg CAE/100 g SM). Spektrofotometrijskom analizom ukupnog sadržaja različitih grupa fenolnih jedinjenja utvrđeno je da su fenolna jedinjenja većinski akumulirana u nadzemnim delovima biljke. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da hladno presovani sokovi korena i lista rena predstavljaju veoma bogat izvor fenolnih jedinjenja, flavonoida i fenolnih kiselina sa dokazanom biološkom aktivnošću.
- Hromatografskom analizom soka korena i soka lista rena identifikovane su sledeće klase fenolnih jedinjenja: fenolne kiseline i njihovi derivati, flavonoidi i njihovi derivati, kao i derivati elagitanina. Među 13 detektovanih fenolnih jedinjenja u soku korena rena, kvantitativno dominantni su bili kempferol (91,26 mg/100 g) i heksozid dihidroksibenzojeve kiseline izomer II (55,41 mg/100 g), dok su u soku lista rena, među 16 detektovanih jedinjenja, kvantitativno najzastupljeniji bili kempferol-3-*O*-(2"-pentozil)heksozid (66,66 mg/100 g) i heksozid dihidroksibenzojeve kiseline izomer I (19,91 mg/100 g).
- Antioksidativna aktivnost dobijenih sokova procenjena metodama čiji se mehanizam zasniva na aktivnosti antioksidanasa da neutrališu slobodne DPPH[•] i ABTS^{•+} radikale iznosila je, respektivno, za sok korena rena: 1,98 i 9,60 mmol TE/100 g SM i za sok lista rena: 6,58 i 75,62 mmol TE/100 g SM. Sposobnost antioksidanasa prisutnih u sokovima korena i lista rena da izvrše redukciju Fe³⁺ jona procenjena je primenom FRAP metode i dobijeni su sledeći rezultati: 13,84 mmol TE/100 g SM za sok korena rena i 33,61 mmol TE/100 g SM za sok lista rena. Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti ističu potencijal sokova korena i lista rena za primenu u prehrambenim proizvodima kao antioksidativnih konstituenata, u cilju sprečavanja oksidacije i produženja roka trajanja.

Kao nusproizvodi prilikom dobijanja sokova hladnim presovanjem zaostali su tropovi korena i lista rena u značajnim količinama. U cilju potpunog iskorišćenja sirovine i redukovanja biološkog otpada iz poljoprivrednog sektora, procenjen je bioaktivni potencijal tropova korena i lista rena u pogledu sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativnog kapaciteta. Na osnovu dobijenih rezultata, izvedeni su sledeći zaključci:

- Spektrofotometrijskom analizom utvrđeno je da tropovi korena i lista rena sadrže značajne količine ukupnih fenolnih jedinjenja (655,59 i 3534,55 mg GAE/100 g SM), ukupnih flavonoida (467,78 i 4272,81 mg CE/100 g SM) i ukupnih fenolnih kiselina (2487,57 i 4022,36

mg CAE/100 g SM). Sumarnom analizom sokova i tropova može se zaključiti da list rena predstavlja bogatiji izvor fenolnih konstituenata u poređenju sa korenom rena.

- Hromatografskom analizom utvrđeno je da, osim sokova korena i lista rena, trop rena takođe predstavlja bogat izvor različitih fenolnih jedinjenja iz klase flavonoida i fenolnih kiselina, koji dokazano imaju širok spektar bioloških aktivnosti. U tropu korena rena ukupno je identifikovano i kvantifikovano 14 fenolnih jedinjenja, među kojima je glavni i kvantitativno najzastupljeniji fenolni konstituent bio kempferol (84,52 mg/100 g). S druge strane, fenolni profil tropa lista rena sačinjavalo je 12 fenolnih jedinjenja, od kojih je kempferol-3-O-(2"-pentozil)heksosid (84,52 mg/100 g) bio zastupljen u najvišoj koncentraciji.
- Kao i u slučaju sokova korena i lista rena, antioksidativna aktivnost tropova korena i lista rena procenjena je metodama koje se zasnivaju na neutralizaciji aktivnosti DPPH[•] i ABTS^{•+} radikala, kao i redukciji Fe³⁺ jona (FRAP metoda) i dobijeni su sledeći rezultati (mmol TE/100 g SM) za tropove korena i lista rena: 0,14 i 0,90 (DPPH), 1,27 i 19,11 (ABTS) i 2,65 i 7,83 (FRAP), respektivno. Iako je antioksidativni potencijal tropova korena i lista rena bio niži u poređenju sa sokovima, biološki aktivna jedinjenja, poput fenolnih kiselina i flavonoida, čine ga bogatim resursom antioksidanasa. To implicira da bi se dodavanjem tropova rena u prehrambene proizvode mogli postići brojni benefiti, poput sprečavanja oksidacije i produženja roka trajanja, kao i obogaćivanja samih proizvoda ovim jedinjenjima sa izraženom biološkom aktivnošću. Osim toga, na ovaj način moglo bi se doprineti razvoju cirkularne ekonomije, usled valorizacije ove sirovine bogate fenolnim jedinjenjima i redukcije otpada iz prehrambene industrije.

Drugi deo disertacije bio je usmeren na inkapsulaciju sokova korena i lista rena metodom sprej sušenja, unutar sledećih kombinacija polisaharidnih nosača: maltodekstrin/alginat (MD/AL), maltodekstrin/guar guma (MD/GG) i maltodekstrin/arapska guma (MD/GA). Dobijene su po četiri formulacije sprej sušenih sokova korena i lista rena: kontrolni uzorci (sprej sušeni sok korena (K-K) i sprej sušeni sok lista (L-K) rena bez korišćenih nosača) i po tri formulacije inkapsulata soka korena rena (IK-MD/AL, IK-MD/GG i IK-MD/GA) i soka lista rena (IL-MD/AL, IL-MD/GG i IL-MD/GA) sa tri različite kombinacije nosača. Potom je izvršena fizičko-hemijska, morfološka, strukturna, spektrofotometrijska i hromatografska analiza, kao i analiza stabilnosti formulisanih prahova sa ciljem njihove karakterizacije kao pojedinačnih prehrambenih sastojaka, ali i posmatrano sa aspekta njihove potencijalne primene u prehrambenim proizvodima. Na osnovu dobijenih rezultata iz ovog dela disertacije, izvedeni su sledeći zaključci:

- Inkapsulacijom sokova korena i lista rena unutar različitih polisaharidnih nosača postignuto je smanjenje sadržaja vlage, aktivnosti vode i higroskopnosti u poređenju sa kontrolnim uzorcima bez nosača, čime je potencijalno postignuta povećana otpornost inkapsulata prema mikrobiološkom kvarenju i fizičko-hemijskoj degradaciji. U ovom pogledu, posebno su se istakle formulacije inkapsulata koje su sadržale MD/AL kombinaciju nosača. S druge strane, inkapsulirani prahovi imali su više vrednosti rastvorljivosti i kapaciteta zadržavanja ulja, što je ukazivalo na pozitivan uticaj inkapsulacije na fizičko-hemijske karakteristike inkapsulata sokova rena. Inkapsulati koji su sadržali GA bili su najefektivniji u zadržavanju ulja, dok su uzorci sa GG pokazali najviši procenat rastvorljivosti u vodi. Kategorizacijom dobijenih vrednosti indeksa kompresibilnosti i Hausnerovog odnosa, izračunatih na osnovu nasipne i tapkane gustine prahova, može se zaključiti da među različitim formulacijama inkapsuliranih prahova rena nije bilo značajne razlike i da su svi pripadali kategoriji visoke kohezivnosti prahova. Prinos inkapsulacije prahova bio je u opsegu od 41,66 (IK-MD/GA) do 58,32% (IK-MD/AL) za inkapsulate soka korena i od 15,14 (IL-MD/GG) do 78,50% (IL-MD/GA) za inkapsulate soka lista. Uzorak IL-MD/GG pokazao je najmanje poželjne fizičko-hemijske karakteristike i izuzetno nizak prinos inkapsulacije (15,14%) u poređenju sa ostalim

inkapsuliranim formulacijama soka korena i lista rena, što je mogla biti posledica visokog viskoziteta napojne smeše koja je sadržala GG. Generalno, može se zaključiti da su inkapsuliranjem sokova korena i lista rena unutar različitih kombinacija polisaharidnih nosača postignute značajno povoljnije fizičko-hemijske karakteristike prahova u poređenju sa kontrolnim uzorcima, tj. sprej sušenim sokovima bez nosača.

- Detaljnim uvidom u morfološke karakteristike prahova rena SEM analizom pokazano je da je inkapsuliranjem sokova korena i lista rena postignut pravilniji oblik, odsustvo lepljivosti i smanjena aglomeracija čestica, u poređenju sa kontrolnim uzorcima bez nosača. Površine čestica svih inkapsuliranih prahova bile su bez vidljivih lomova ili pukotina, što je veoma značajno sa aspekta sprečavanja oksidacije i zaštite bioaktivnih jedinjenja. Čestice inkapsuliranog soka korena rena imale su prosečni prečnik u rasponu od 3,82 (IK-MD/GG) do 6,12 (IK-MD/GA) μm , dok je prosečni prečnik čestica inkapsuliranog soka lista rena bio u opsegu od 4,01 (IL-MD/AL) do 6,03 (IL-MD/GG) μm . Inkapsulati soka korena imali su čestice pravilnijeg oblika i sa manje udubljenja i neravnina na površini u poređenju sa inkapsulatima soka lista rena. Takođe, za razliku od sprej sušenih formulacija soka korena rena, u čijem slučaju su svi inkapsulati imali normalnu distribuciju veličina čestica, među sprej sušenim formulacijama soka lista rena to je bio slučaj samo kod inkapsulata koji su sadržali GA. Stoga se može zaključiti da su inkapsulati soka korena rena imali povoljnije morfološke karakteristike u poređenju sa inkapsulatima soka lista rena.
- Primenom FT-IR spektroskopije analizirane su hemijske karakteristike inkapsuliranih sokova korena i lista rena, a dobijeni rezultati su pokazali da između primenjenih nosača i soka korena ili soka lista rena nisu postojale izražene hemijske interakcije. Dakle, formirana je višekomponentna smeša soka korena ili soka lista rena i nosača u inkapsulatima. Iz toga se može zaključiti da sokovi rena najverovatnije nisu stupili u interakciju sa nosačima i zadržali su postojeće veze i hemijsku stabilnost, čak i nakon inkapsulacije sprej sušenjem.
- Inkapsulirani sokovi korena i lista rena sadržali su značajne količine ukupnih fenolnih jedinjenja (1717,27-5612,22 mg GAE/100 g SM), ukupnih flavonoida (277,47-4969,13 mg CE/100 g SM) i ukupnih fenolnih kiselina (2662,15-7597,44 mg CAE/100 g SM). Posmatrano sa aspekta zadržavanja ukupnih fenolnih jedinjenja i ukupnih flavonoida, najvišu efikasnost pokazao je nosač MD/GG u slučaju inkapsulata soka korena rena i MD/AL u slučaju inkapsulata soka lista rena, dok je najefektivniji nosač za očuvanje ukupnih fenolnih kiselina i soka korena i soka lista rena bio MD/GA.
- UHPLC Q-ToF-MS analizom inkapsulata identifikovano je i kvantifikovano po 15 fenolnih jedinjenja (uglavnom derivata fenolnih kiselina i flavonoida) u inkapsuliranim sokovima korena i lista rena. Nakon inkapsulacije sprej sušenjem, kempferol (93,55-99,31 mg/100 g) i heksozid dihidroksibenzoeve kiseline izomer II (45,59-53,85 mg/100 g) ostala su kvantitativno dominantna jedinjenja u inkapsulatima soka korena, a kempferol-3-O-(2"-pentozil)heksozid (58,99-71,14 mg/100 g) i heksozid dihidroksibenzoeve kiseline izomer I (18,10-20,40 mg/100 g) u inkapsulatima soka lista rena.
- Antioksidativni potencijal inkapsuliranih prahova sokova korena i lista rena potvrđen je primenom sve tri korišćene metode (DPPH, ABTS i FRAP). Naime, za inkapsulate soka korena rena antioksidativni potencijal je iznosio (mmol TE/100 g SM): 0,75-0,93 (DPPH), 5,64-8,29 (ABTS) i 9,42-9,87 (FRAP), dok je za inkapsulate soka lista rena bio u rasponu od 0,48-0,94 (DPPH), 62,82-68,53 (ABTS) i 14,86-17,81 (FRAP). Rezultati primenjenih antioksidativnih testova ukazivali su na funkcionalnost inkapsuliranih sokova korena i lista rena u pogledu sposobnosti inhibitornog delovanja na slobodne DPPH^{*} i ABTS^{*+} radikale, kao i redukcije Fe³⁺ jona. To je ukazivalo na visok potencijal ovih sprej sušenih prahova za primenu u prehrambenim proizvodima u cilju sprečavanja oksidacije i zamene sintetičkih antioksidanasa.

- Stabilnost sprej sušenih prahova procenjena je na osnovu sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) tokom šest meseci skladištenja na -18, 4 i 25 °C. Uprkos TPC stabilnosti, odsustvo nosača kod kontrolnih uzoraka i više temperature skladištenja (4 i 25 °C) uticale su na pojavu lepljivosti i aglomeracije čestica, što je dovelo da gubitka forme praha. Stoga se, na osnovu dobijenih rezultata, može zaključiti da su inkapsulacija sokova korena i lista rena unutar MD/AL, MD/GG i MD/GA i skladištenje na -18 °C najpogodniji način za očuvanje fenolnih jedinjenja sokova korena i lista rena, kao i vizuelnog izgleda prahova tokom dugotrajnog skladištenja.

Tropovi korena i lista rena povrgnuti su postupku liofilizacije, u cilju što efikasnijeg očuvanja bioaktivnog potencijala i postizanja pogodnije forme za njihovo dodavanje u gotov proizvod. Liofilizovani tropovi korena i lista rena analizirani su u pogledu sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativnog kapaciteta, a na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

- Postupkom liofilizacije smanjen je sadržaj vlage tropova za više od 90%, čime je potencijalno postignuta njihova povećana otpornost prema mikrobiološkom kvarenju i fizičko-hemijskoj degradaciji. Osim toga, liofilizacijom tropova značajno je smanjena zapremina koju zauzimaju, a time i troškovi pakovanja, skladištenja i transporta.
- Analizom sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih fenolnih kiselina utvrđeno je da su nakon liofilizacije u tropovima korena i lista rena očuvane značajne količine pomenutih fenolnih jedinjenja i to: 367,85 mg GAE/100 g SM, 390,84 mg CE/100 g SM i 1467,04 mg CAE/100 g SM, respektivno, u liofilizovanom tropu korena rena i 1969,32 mg GAE/100 g SM, 3440,13 mg CE/100 g SM i 3851,63 mg CAE/100 g, respektivno, u liofilizovanom tropu lista rena.
- Hromatografskom analizom liofilizovanih tropova identifikovane su i kvantifikovane fenolne komponente iz klase fenolnih kiselina i flavonoida, i to 14 jedinjenja u liofilizovanom tropu korena i 10 jedinjenja u liofilizovanom tropu lista rena. Nakon liofilizacije, heksozid dihidroksibenzojeve kiseline izomer II (46,87 mg/100 g) i kempferol (89,51 mg/100 g) ostala su kvantitativno dominantna jedinjenja iz pomenutih klasa fenolnih jedinjenja u slučaju tropa korena rena, dok je u slučaju tropa lista rena među fenolnim kiselinama najzastupljeniji ostao izomer I *p*-hidroksibenzojeve kiseline (7,96 mg/100 g), a među flavonoidima kempferol 3-*O*-(2"-pentozil)heksozid (61,35 mg/100 g).
- DPPH, ABTS i FRAP metodama potvrđen je antioksidativni potencijal liofilizovanog tropa korena (0,11, 1,26 i 2,36 mmol TE/100 g SM, respektivno) i liofilizovanog tropa lista rena (0,45, 12,70 i 6,62 mmol TE/100 g SM, respektivno). Generalno, rezultati dobijeni analizom tropova nakon liofilizacije ukazuju da je uklanjanje vode iz tropa sublimacijom, usled primene niske temperature i pritiska, rezultiralo visokim kvalitetom proizvoda i očuvanjem antioksidativnog potencijala tropova korena i lista rena.

Na osnovu detaljne karakterizacije inkapsulata sokova i liofilizata tropova korena i lista rena, može se zaključiti da sve analizirane komponente rena sadrže fenolna jedinjenja i imaju izražen antioksidativni potencijal, zbog čega ih je poželjno dodavati prehrambenim proizvodima bogatim uljima u cilju sprečavanja oksidacije. Stoga je treći deo ove doktorske disertacije obuhvatio proizvodnju majoneza sa dodatkom komponenata rena u Laboratoriji za razvoj i inovacije kompanije Polimark d.o.o. (Beograd, Srbija). Nakon toga, izvršena je karakterizacija proizvedenih majoneza u pogledu oksidativne stabilnosti, kvaliteta i senzorne prihvatljivosti od strane potrošača, sa ciljem sveukupne analize potencijala primene pomenutih komponenata rena u industrijskoj proizvodnji ovog prehrambenog proizvoda.

- Proizveden je majonez sa sprej sušenim sokom korena rena bez nosača: M(K-K), kao i majonezi sa tri inkapsulirane formulacije soka korena rena: M(IK-MD/AL), M(IK-MD/GG) i M(IK-MD/GA). Zatim, proizveden je majonez sa sprej sušenim sokom lista rena bez nosača: M(L-K), kao i majonezi sa inkapsulatima soka lista rena: M(IL-MD/AL) i M(IL-MD/GA). Zbog izuzetno niskog prinosa inkapsulacije (15,14%) i najmanje poželjnih fizičko-hemijskih, morfoloških i bioaktivnih svojstava, inkapsulate soka lista rena sa nosačem MD/GG nije bilo opravdano koristiti u proizvodnji majoneza iz ekonomskih, tehnoloških i industrijskih razloga.
- Kada je reč o dodavanju liofilizovanih tropova rena, proizveden je majonez sa dodatkom liofilizovanog tropa lista rena: M(LTL), dok postizanje emulzije nije bilo moguće u slučaju pripreme majoneza sa dodatkom liofilizovanog tropa korena rena: M(LTK), zbog značajno smanjenog sadržaja vode na račun dodatog tropa korena rena i postizanja jednake koncentracije ukupnih fenolnih jedinjenja (400 mg GAE/kg majoneza) u svim proizvedenim formulacijama.
- Kao referentni proizvodi pripremljeni su kontrolni majonez: M(K), bez dodatka komponenata rena i pozitivno kontrolni majonez: M(PK), sa dodatkom veštačkog antioksidansa (EDTA), koji se konvencionalno koristi u pomenutoj kompaniji za sprečavanje oksidacije majoneza.
- Na osnovu rezultata određivanja oksidativne stabilnosti majoneza tokom osmonedeljnog skladištenja u mraku na temperaturi od 4 °C pokazano je da su svi majonezi sa dodatkom komponenata rena imali niže vrednosti peroksidnog i anisidinskog broja od kontrolnog majoneza na kraju skladištenja. Oksidativna vrednost (TOTOX vrednost) nakon osmonedeljnog skladištenja pratila je sledeći redosled: majonez sa inkapsulatima soka korena rena < majonez sa EDTA < majonez sa liofilizovanim tropom lista rena < majonez sa inkapsulatima soka lista rena < kontrolni majonez. Dobijeni rezultati ukazali su na uticaj antioksidanasa prisutnih u renu na odlaganje oksidacije majoneza u poređenju sa kontrolnim uzorkom. U tom pogledu, posebno se istakao inkapsulirani sok korena rena, koji je bio efektivniji u odlaganju oksidacije majoneza čak i od komercijalnog, sintetičkog antioksidansa EDTA.
- Primenom testa ubrzane oksidacije (OXITEST analiza) utvrđeno je da inkapsulati soka korena, inkapsulati soka lista i liofilizati tropa lista rena odlažu oksidaciju majoneza za 48-60, 46-54 i 84%, respektivno, duže od kontrolnog majoneza i za 33-45, 32-39 i 66%, respektivno, duže od majoneza sa EDTA. Dobijeni rezultati su veoma obećavajući i ukazuju na izuzetan potencijal analiziranih komponenata rena za primenu u prehrambenoj industriji, koja bi mogla imati višestruki značaj: očuvanje kvaliteta i produžetak roka trajanja proizvoda, smanjenje upotrebe sintetičkih antioksidanasa i redukovanje količina biološkog otpada iz poljoprivrednog sektora.
- Analizom kvaliteta majoneza tokom osmonedeljnog skladištenja dokazan je pozitivan uticaj dodatih komponenata rena na njegov kiselinski broj i pH vrednost, u čemu su se posebno istakli inkapsulirani sokovi korena i lista rena. Svi majonezi sa dodatim komponentama rena imali su više pH vrednosti od kontrolnih majoneza nakon osam nedelja skladištenja, ukazujući na značaj njihove uloge u ograničavanju oslobađanja jona gvožđa i prevenciji oksidacije majoneza.
- Senzorna analiza majoneza sa dodatim komponentama rena pokazala je da su panelisti majoneze sa inkapsulatima soka lista rena ocenili senzorno prihvatljivijim od majoneza sa inkapsulatima soka korena rena, dok su majonezi koji su sadržali liofilizovani trop lista rena bili značajno manje prihvatljivi od svih ostalih proizvedenih majoneza. Majonezi koji su sadržali inkapsulirane prahove sokova korena i lista rena bili su ocenjeni senzornim ocenama opšte prihvatljivosti od 7 („umereno mi se dopada“) do 8 („veoma mi se dopada“), dok je majonez koji je sadržao liofilizovani trop lista rena imao niže senzorne ocene opšte prihvatljivosti u opsegu od 4 („malo mi se ne dopada“) do 5 („nit mi se dopada, nit mi se ne dopada“). Među svim proizvedenim formulacijama majoneza, posebno se istakao M(IL-MD/AL), kojeg su panelisti ocenili kao senzorno prihvatljiviji čak i od majoneza sa sintetičkim antioksidansom M(PK). Konačno, senzorna procena majoneza ukazala je na veliki potencijal inkapsulata korena

i lista rena kao zamene za sintetičke antioksidanse, ističući IL-MD/AL formulaciju inkapsulata sa najizraženijim pozitivnim efektima na senzornu prihvatljivost majoneza.

Kao generalni zaključak svih rezultata dobijenih u okviru ove doktorske disertacije može se navesti da je na osnovu analiziranih karakteristika polaznih sirovina (soka i tropa korena i lista rena), zatim njihovih inkapsulata i liofilizata i, konačno, proizvoda u koji su dodati (majonez), dokazan obećavajući potencijal prirodnih antioksidanasa sadržanih u ovoj vrednoj biljnoj sirovini u pogledu održanja oksidativne stabilnosti majoneza tokom skladištenja. Na taj način mogla bi se smanjiti upotreba sintetičkih antioksidanasa u prehrambenoj industriji, što je sa ekološkog i zdravstvenog aspekta od velikog značaja. Osim toga, ovo istraživanje doprinosi razvoju cirkularne i održive bioekonomije pružanjem novih uvida u potpuno iskorišćenje biljnog materijala i valorizaciju tropova, koji se gotovo smatraju biootpadom iz poljoprivrednog sektora, a koji su pokazali veliki potencijal za primenu u prehrambenoj industriji.

7. LITERATURA

- Abasi, C. Y., Wankasi, D., Dikio, E. D. (2018): Adsorption study of lead(II) ions on poly(methyl methacrylate) waste material. *Asian Journal of Chemistry*, 30: 859–867. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2018.21112>
- Agneta, R., Möllers, C., De Maria, S., Rivelli, A. R. (2014): Evaluation of root yield traits and glucosinolate concentration of different *Armoracia rusticana* accessions in Basilicata region (southern Italy). *Scientia Horticulturae*, 170: 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.03.025>
- Agneta, R., Möllers, C., Rivelli, A. R. (2013): Horseradish (*Armoracia rusticana*), a neglected medical and condiment species with a relevant glucosinolate profile: A review. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60(7): 1923–1943. <https://doi.org/10.1007/s10722-013-0010-4>
- Agneta, R., Rivelli, A. R., Ventrella, E., Lelario, F., Sarli, G., Bufo, S. A. (2012): Investigation of glucosinolate profile and qualitative aspects in sprouts and roots of horseradish (*Armoracia rusticana*) using LC-ESI–hybrid linear ion trap with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and infrared multiphoton dissociation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(30): 7474–7482. <https://doi.org/10.1021/jf301294h>
- Ahmadi-Dastgerdi, A., Ezzatpanah, H., Asgary, S., Dokhani, S., Rahimi, E., Gholami-Ahangaran, M. (2019): Oxidative stability of mayonnaise supplemented with essential oil of *Achillea millefolium* ssp *millefolium* during storage. *Food Science and Technology*, 13(1). <https://doi.org/10.15673/fst.v13i1.1340>
- Ahmadi-Dastgerdi, A., Fallah, N., Zokaei, M., Gholami-Ahangaran, M. (2022): The role of thyme (*Zataria multiflora* Boiss) essential oil as natural antioxidant on the lipid oxidation in mayonnaise. *Journal of Food Quality*, 2022(5): 1–7. <https://doi.org/10.1155/2022/1527289>
- Akcicek, A., Karasu, S., Bozkurt, F., Kayacan, S. (2022): Egg yolk-free vegan mayonnaise preparation from pickering emulsion stabilized by gum nanoparticles with or without loading olive pomace extracts. *ACS Omega*, 7(30): 26316–26327. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c02149>
- Aksoy, F. S., Tekin-Cakmak, Z. H., Karasu, S., Aksoy, A. S. (2022): Oxidative stability of the salad dressing enriched by microencapsulated phenolic extracts from cold-pressed grape and pomegranate seed oil by-products evaluated using OXITEST. *Food Science and Technology*, 42: e57220. <https://doi.org/10.1590/fst.57220>
- Ali Alshehry, G. (2023): The role of gum Arabic for a protective kidney dysfunction induced gentamicin on diabetes rats. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2023: 1–8. <https://doi.org/10.1155/2023/9757383>
- Altunkaya, A., Hedegaard, R. V., Harholt, J., Brimer, L., Gökmen, V., Skibsted, L. H. (2013): Oxidative stability and chemical safety of mayonnaise enriched with grape seed extract. *Food and Function*, 4(11): 1647–1653. <https://doi.org/10.1039/c3fo60204d>
- Anu Bhushani, J., Anandharamakrishnan, C. (2014): Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. *Trends in Food Science & Technology*, 38(1): 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.004>
- AOAC. (1995): Official methods of analysis. 16th Ed. Association of official analytical chemists. Washington DC, USA.

- AOAC. (2005): Determination of moisture, ash, protein and fat. Official method of analysis of the Association of Analytical Chemists. 18th Edition. Washington DC, USA.
- AOCS (American Oil Chemists Society). (2017): Official Method. p-Anisidine Value. Cd 18-90.
- Archaina, D., Vasile, F., Jiménez-Guzmán, J., Alamilla-Beltrán, L., Schebor, C. (2019): Physical and functional properties of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract spray dried with maltodextrin-gum arabic mixtures. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(9). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14065>
- Arenas-Jal, M., Suñé-Negre, J. M., García-Montoya, E. (2020): An overview of microencapsulation in the food industry: Opportunities, challenges, and innovations. *European Food Research and Technology*, 246: 1371–1382. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03496-x>
- Arepally, D., Reddy, R. S., Goswami, T. K. (2020): Studies on survivability, storage stability of encapsulated spray dried probiotic powder. *Current Research in Food Science*, 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2020.09.001>
- Baena-Aristizábal, C. M., Foxwell, M., Wright, D., Villamizar-Rivero, L. (2019): Microencapsulation of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with guar gum: Preliminary approach using spray drying. *Journal of Biotechnology*, 302: 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.06.007>
- Bajkacz, S., Ligor, M., Baranowska, I., Buszewski, B. (2021): Separation and determination of chemopreventive phytochemicals of flavonoids from Brassicaceae plants. *Molecules*, 26(16). <https://doi.org/10.3390/molecules26164734>
- Barak, T. H., Celep, E., İnan, Y., Yesilada, E. (2019): Influence of in vitro human digestion on the bioavailability of phenolic content and antioxidant activity of *Viburnum opulus* L. (European cranberry) fruit extracts. *Industrial Crops and Products*, 131: 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.037>
- Barra, P. A., Márquez, K., Gil-Castell, O., Mujica, J., Ribes-Greus, A., Faccini, M. (2019): Spray-drying performance and thermal stability of L-ascorbic acid microencapsulated with sodium alginate and gum Arabic. *Molecules*, 24(16): 2872. <https://doi.org/10.3390/molecules24162872>
- Barros, L., Pereira, E., Calhella, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R. (2013): Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5(4): 1732–1740. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.07.019>
- Bashir, M., Haripriya, S. (2016): Assessment of physical and structural characteristics of almond gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93: 476–482. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.009>
- Bastos, D. da S., Gonçalves, M. do P., Andrade, C. T. de, Araújo, K. G. de L., Rocha Leão, M. H. M. da. (2012): Microencapsulation of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice using a new chitosan–commercial bovine whey protein isolate system in spray drying. *Food and Bioproducts Processing*, 90(4): 683–692. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.04.005>
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1): 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

- Beristain, C. I., Azuara, E., Tamayo, T. T., Vernon-Carter, E. J. (2003): Effect of caking and stickiness on the retention of spray-dried encapsulated orange peel oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(15): 1613–1616. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1602>
- Bertóti, R., Böszörményi, A., Alberti, A., Béni, S., M-Hamvas, M., Szőke, E., Vasas, G., Gonda, S. (2019): Variability of bioactive glucosinolates, isothiocyanates and enzyme patterns in horseradish hairy root cultures initiated from different organs. *Molecules*, 24: 2828. <https://doi.org/10.3390/molecules24152828>
- Björkman, M., Klingen, I., Birch, A. N., Bones, A. M., Bruce, T. J., Johansen, T. J., Meadow, R., Mølmann, J., Seljåsen, R., Smart, L., Stewart, D. (2011): Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health—Influences of climate, environment and agronomic practice. *Phytochemistry*, 72(7): 538–556. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.014>
- Blejan, A. M., Nour, V. (2023). Physico-chemical characteristics, sensory attributes and oxidative stability of soy milk mayonnaise enriched in carotenoids from tomato by-products. *Applied Sciences*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/app13127101>
- Borowska, E. J., Piłat, B., Narwojsz, A., Urban, P. (2017): The effect of drying methods on the content of selected bioactive compounds and fibre in carrot pomace. *Polish Journal of Natural Science*, 32(2): 311–321.
- Borrmann, D., Pierucci, A. P. T. R., Leite, S. G. F., Leão, M. H. M. da R. (2013): Microencapsulation of passion fruit (*Passiflora*) juice with n-octenylsuccinate-derivatised starch using spray-drying. *Food and Bioproducts Processing*, 91(2023): 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.08.001>
- Bozzo, G. G., Unterlander, N. (2021): In through the out door: Biochemical mechanisms affecting flavonoid glycoside catabolism in plants. *Plant Science*, 308: 110904. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.110904>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995): Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28: 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Calabrone, L., Larocca, M., Marzocco, S., Martelli, G., Rossano, R. (2015): Total phenols and flavonoids content, antioxidant capacity and lipase inhibition of root and leaf horseradish (*Armoracia rusticana*) extracts. *Food and Nutrition Sciences*, 06(01): 64–74. <https://doi.org/10.4236/fns.2015.61008>
- Çalışkan Koç, G. (2021): Physicochemical, reconstitution, and morphological properties of red pepper juice (*Capsicum annuum* L.) powder. *Journal of Food Science and Technology*, 58: 4011–4023. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04864-x>
- Can Karaca, A., Guzel, O., Ak, M. M. (2016): Effects of processing conditions and formulation on spray drying of sour cherry juice concentrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(2): 449–455. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7110>
- Cano-Chauca, M., Stringheta, P. C., Ramos, A. M., Cal-Vidal, J. (2005): Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6(4): 420–428. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003>

- Cavalu, S., Bisboaca, S., Mates, I. M., Pasca, P. M., Laslo, V., Costea, T., Fritea, L., Vicas, S. (2018): Novel formulation based on chitosan-Arabic gum nanoparticles entrapping propolis extract production, physico-chemical and structural characterization. *Revista de Chimie*, 69(12): 3756–3760. <https://doi.org/10.37358/rc.18.12.6836>
- Celus, M., Kyomugasho, C., Keunen, J., Van Loey, A. M., Grauwet, T., Hendrickx, M. E. (2020): Simultaneous use of low methylesterified citrus pectin and EDTA as antioxidants in linseed/sunflower oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 100: 105386. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105386>
- Chada, P. S. N., Santos, P. H., Rodrigues, L. G. G., Goulart, G. A. S., Azevedo dos Santos, J. D., Maraschin, M., Lanza, M. (2022): Non-conventional techniques for the extraction of antioxidant compounds and lycopene from industrial tomato pomace (*Solanum lycopersicum* L.) using spouted bed drying as a pre-treatment. *Food Chemistry: X*, 13. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100237>
- Charles, D. J. (2013): Antioxidant properties of spices, herbs and other sources. Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4310-0>
- Chaudhary, V., Thakur, N., Kajla, P., Thakur, S., Punia, S. (2021): Application of encapsulation technology in edible films: carrier of bioactive compounds. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5: 734921. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.734921>
- Chávez-Rodríguez, A. M., Pérez-Martínez, J. D., Ibarra-Junquera, V., Escalante-Minakata, P., VillaVelazquez-Mendoza, C. I., Dibildox-Alvarado, E., de Jesús Ornelas-Paz, J. (2013): Microencapsulation of banana juice from three different cultivars. *International Journal of Food Engineering*, 9(1). <https://doi.org/10.1515/ijfe-2012-0169>
- Chemat, F., Abert Vian, M., Ravi, H. K., Khadhraoui, B., Hilali, S., Perino, S., Fabiano Tixier, A. S. (2019): Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications and prospects. *Molecules*, 24(16): 3007. <https://doi.org/10.3390/molecules24163007>
- Cheng, W., Fan, F., Zhang, Y., Pei, Z., Wang, W., Pei, Y. (2017): A facile approach for fabrication of core-shell magnetic molecularly imprinted nanospheres towards hypericin. *Polymers*, 9(4): 135. <https://doi.org/10.3390/polym9040135>
- Chen, M., He, X., Sun, H., Sun, Y., Li, L., Zhu, J., Xia, G., Guo, X., Zang, H. (2022): Phytochemical analysis, UPLC-ESI-Orbitrap-MS analysis, biological activity, and toxicity of extracts from *Tripleurospermum limosum* (Maxim.) *Arabian Journal of Chemistry*, 15(5): 103797. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103797>
- Chotphruethipong, L., Benjakul, S. (2019): Use of cashew (*Anacardium occidentale* L.) leaf extract for prevention of lipid oxidation in mayonnaise enriched with fish oil. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(10): 825–836. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v19_10_02
- Cirimbei, M.R., Dinica, R., Gitin, L., Vizireanu, C. (2013): Study on herbal actions of horseradish (*A Armoracia rusticana*). *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 19: 111–115.
- Cirimbei, M., Vizireanu, C. (2014): Comparison of different solvents for isolation of antioxidant compounds of horseradish. *Analecta Technica Szegedinensia*, 8(1): 12–17. <https://doi.org/10.14232/analecta.2014.1.12-17>

- Ciska, E., Horbowicz, M., Rogowska, M., Kosson, R., Drabińska, N., Honke, J. (2017): Evaluation of seasonal variations in the glucosinolate content in leaves and roots of four European horseradish (*Armoracia rusticana*) landraces. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 67: 301–308. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2016-0029>
- Çoklar, H., Akbulut, M. (2017): Effect of sun, oven and freeze-drying on anthocyanins, phenolic compounds and antioxidant activity of black grape (Eksikara) (*Vitis vinifera* L.). South African Journal of Enology and Viticulture, 38(2): 264–272. <https://doi.org/10.21548/38-2-2127>
- Ćujić-Nikolić, N., Šavikin, K., Bigović, D., Trifković, K., Đorđević, V., Bugarski, B. (2019): Potential of encapsulated phytochemicals in hydrogel particles. Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy, 305–342. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816505-8.00009-6>
- Dadi, D. W., Emire, S. A., Hagos, A. D., Eun, J. B. (2020): Physical and functional properties, digestibility, and storage stability of spray- and freeze-dried microencapsulated bioactive products from *Moringa stenopetala* leaves extract. Industrial Crops and Products, 156: 112891. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112891>
- Dag, D., Kilercioglu, M., Oztop, M. H. (2017): Physical and chemical characteristics of encapsulated goldenberry (*Physalis peruviana* L.) juice powder. LWT - Food Science and Technology, 83: 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.007>
- Dai, J., Mumper, R. J. (2010): Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 15(10): 313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Da Silva, L. A. L., Pezzini, B. R., Soares, L. (2015): Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) leaves. Pharmacognosy magazine, 11(41): 96. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.149721>
- Davey, M. W., Montagou, M. V., Sanmartin, M. (2000): Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80: 825–860. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<825::AID-JSFA598>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<825::AID-JSFA598>3.0.CO;2-6)
- De Bruno, A., Romeo, R., Gattuso, A., Piscopo, A., Poiana, M. (2021): Functionalization of a vegan mayonnaise with high value ingredient derived from the agro-industrial sector. Foods, 10(11): 2684. <https://doi.org/10.3390/foods10112684>
- Dekić, M. S., Radulović, N. S., Stojanović, N. M., Randjelović, P. J., Stojanović-Radić, Z. Z., Najman, S., Stojanović, S. (2017): Spasmolytic, antimicrobial and cytotoxic activities of 5-phenylpentyl isothiocyanate, a new glucosinolate autolysis product from horseradish (*Armoracia rusticana* P. Gaertn., B. Mey. and Scherb., Brassicaceae). Food Chemistry, 232: 329–339. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.150>
- Del Baño, M. J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., Marín, M. P., Del Río, J. A., Ortuño, A., Ibarra, I. (2004): Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Postulation of a biosynthetic pathway. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(16): 4987–4992. <https://doi.org/10.1021/jf040078p>
- Depree, A., Savage, P. (2001): Physical and flavor stability of mayonnaise. Trends in Food Science and Technology, 12(5–6): 157–163. [https://doi.org/10.1016/s0924-2244\(01\)00079-6](https://doi.org/10.1016/s0924-2244(01)00079-6)

- Desai, K. G. H., Jin Park, H. (2005): Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying technology*, 23(7): 1361–1394. <https://doi.org/10.1081/DRT-200063478>
- De Souza, V. B., Thomazini, M., de Carvalho Balieiro J. C., Fávaro-Trindade C. S. (2015): Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). *Food and Bioproducts Processing*, 93: 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.11.001>
- Dima, P., Gulbinas, G., Stubbe, P. R., Mendes, A. C., Chronakis, I. S. (2022): Electrohydrodynamic drying of probiotics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 82. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103201>
- Dimić, E., Turkulov, J. (2000): Kontrola kvaliteta u tehnologiji jestivih ulja. Univerzitet u Novom Sadu – Tehnološki fakultet.
- Du, J., Ge, Z. Z., Xu, Z., Zou, B., Zhang, Y., Li, C. M. (2014): Comparison of the efficiency of five different drying carriers on the spray drying of persimmon pulp powders. *Drying Technology*, 32(10): 1157–1166. <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.886259>
- Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., Nedović, V. (2015): Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, 7: 452–490. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9106-7>
- Elez Garofulić, I., Zorić, Z., Pedisić, S., Dragović-Uzelac, V. (2017): Retention of polyphenols in encapsulated sour cherry juice in dependence of drying temperature and wall material. *LWT - Food Science and Technology*, 83: 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.017>
- ElNaker, N. A., Daou, M., Ochsenkühn, M. A., Amin, S. A., Yousef, A. F., Yousef, L. F. (2021): A metabolomics approach to evaluate the effect of lyophilization versus oven drying on the chemical composition of plant extracts. *Scientific Reports*, 11(1): 22679. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02158-6>
- Eskandani, M., Hamishehkar, H., Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. (2014): Cytotoxicity and DNA damage properties of tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. *Food Chemistry*, 153: 315–320. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.08>
- Estupiñan-Amaya, M., Fuenmayor, C. A., López-Córdoba, A. (2022): Evaluation of mixtures of maltodextrin and gum Arabic for the encapsulation of Andean blueberry (*Vaccinium meridionale*) juice by freeze-drying. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(11): 7379–7390. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16093>
- European Pharmacopeia. (2014): 8th ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare of the Council of Europe (EDQM).
- Fang, Z., Bhandari, B. (2010): Encapsulation of polyphenols - A review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(10): 510–523. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>
- Fenoglio, D., Soto Madrid, D., Alarcón Moyano, J., Ferrario, M., Guerrero, S., Matiacevich, S. (2021): Active food additive based on encapsulated yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract: effect of drying methods on the oxidative stability of a real food matrix (mayonnaise). *Journal of Food Science and Technology*, 58(4): 1574–1584. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04669-y>

- Ferrari, C. C., Germer, S. P. M., de Aguirre, J. M. (2012): Effects of spray-drying conditions on the physicochemical properties of blackberry powder. *Drying Technology*, 30(2): 154–163. <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.628429>
- Filipović, V., Popović, V., Aćimović, M. (2015): Organic production of horseradish (*Armoracia Rusticana* Gaertn., Mey., Scherb.) in Serbian metropolitan regions. *Procedia Economics and Finance*, 22: 105–113. [https://doi.org/10.1016/s2212-5671\(15\)00232-4](https://doi.org/10.1016/s2212-5671(15)00232-4)
- Flores, F. P., Singh, R. K., Kong, F. (2014): Physical and storage properties of spray-dried blueberry pomace extract with whey protein isolate as wall material. *Journal of Food Engineering*, 137: 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.03.034>
- Gafrikova, M., Galova, E., Sevcovicova, A., Imreova, P., Mucaji, P., Miadokova, E. (2014): Extract from *Armoracia rusticana* and its flavonoid components protect human lymphocytes against oxidative damage induced by hydrogen peroxide. *Molecules*, 19(3): 3160–3172. <https://doi.org/10.3390/molecules19033160>
- Gaidhani, K. A., Harwalkar, M., Bhambere, D., Nirgude, P. S. (2015): Lyophilization/freeze drying—a review. *World journal of pharmaceutical research*, 4(8): 516–543.
- Gaikwad, M., Syed, H., Shinde, D. (2017): To study the physico chemical properties of flavoured mayonnaise. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(5): 06–09.
- Galgano, F., Favati, F., Lapelosa, L., Albanese D., Montanari, L. (2002): Effect of chilling on the vitamin C content of fennel during storage. *Italian Journal of Food Science*, 14: 167–173.
- George, A., Shah, P. A., Shrivastav, P. S. (2019): Guar gum: Versatile natural polymer for drug delivery applications. *European Polymer Journal*, 112: 722–735. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.10.042>
- Ghandehari Yazdi, A.P., Barzegar, M., Sahari, M.A., Ahmadi Gavlighi, H. (2021): Encapsulation of pistachio green hull phenolic compounds by spray drying. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 23(1): 51–64.
- Ghorbani Gorji, S., Smyth, H. E., Sharma, M., Fitzgerald, M. (2016): Lipid oxidation in mayonnaise and the role of natural antioxidants: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 56: 88–102. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.08.002>
- Gomes, W. F., França, F. R. M., Denadai, M., Andrade, J. K. S., da Silva Oliveira, E. M., de Brito, E. S., Rodrigues, S., Narain, N. (2018): Effect of freeze- and spray-drying on physico-chemical characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of papaya pulp. *Journal of Food Science and Technology*, 55(6): 2095–2102. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3124-z>
- Goyeneche, R., Roura, S., Ponce, A., Vega-Gálvez, A., Quispe-Fuentes, I., Uribe, E., Di Scala, K. (2015): Chemical characterization and antioxidant capacity of red radish (*Raphanus sativus* L.) leaves and roots. *Journal of Functional Foods*, 16: 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.049>
- Gul, O., Dervisoglu, M. (2020): Optimization of spray drying conditions for microencapsulation of *Lactobacillus casei* Shirota using response surface methodology. *European Food Science and Engineering*, 1(1): 1–8.
- Gupta, S., Variyar, P. S. (2018): Guar Gum: A versatile polymer for the food industry. *Biopolymers for Food Design*, 383–407. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811449-0.00012-8>

- Hansch, F. S., Lamy, E., Schreiner, M., Rohn, S. (2014): Reactivity and stability of glucosinolates and their breakdown products in foods. *Angewandte Chemie - International Edition*, 53(43): 11430–11450. <https://doi.org/10.1002/anie.201402639>
- Hamidabadi Sherahi, M., Fathi, M., Zhandari, F., Hashemi, S. M. B., Rashidi, A. (2017): Structural characterization and physicochemical properties of *Descurainia sophia* seed gum. *Food Hydrocolloids*, 66: 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.010>
- Harborne, J. B., Williams, C. A. (2000): Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6): 481–504.
- Hassanzadeh, H., Rahbari, M., Galali, Y., Hosseini, M., Ghanbarzadeh, B. (2023): The garlic extract-loaded nanoemulsion: Study of physicochemical, rheological, and antimicrobial properties and its application in mayonnaise. *Food Science & Nutrition*, 11(7): 3799–3810. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3365>
- Haque, M. A., Timilsena, Y. P., Adhikari, B. (2015): Spray drying. *Drying Technologies for Foods: Fundamentals & Applications*. Nema PK, Kaur, BP & Mujumdar, AS (Eds) New India Publishing Agency, India, 374.
- Hedges, R. A. (1998): Industrial applications of cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 98: 2035–2044.
- Hernández-Nava, R., López-Malo, A., Palou, E., Ramírez-Corona, N., Jiménez-Munguía, M. T. (2020): Encapsulation of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) by complex coacervation between gelatin and chia mucilage and its properties after spray drying. *Food Hydrocolloids*, 109: 106077. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106077>
- Hijazi, T., Karasu, S., Tekin-Çakmak, Z. H., Bozkurt, F. (2022): Extraction of natural gum from cold-pressed chia seed, flaxseed, and rocket seed oil by-product and application in low fat vegan mayonnaise. *Foods*, 11(3): 363. <https://doi.org/10.3390/foods11030363>
- Holm, U., Ekblom-Olsson, K. (1972): p-Anisidin as a reagent of secondary oxidation products in oils and fats. Paper presented at the The 11th World Congress of the International Society for Fat Research, Göteborg.
- Honold, P. J., Jacobsen, C., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H. G., Hermund, D. B. (2016): Potential seaweed-based food ingredients to inhibit lipid oxidation in fish-oil-enriched mayonnaise. *European Food Research and Technology*, 242(4): 571–584. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2567-y>
- Huang, Y. L., Ma, Y. S. (2016): The effect of extrusion processing on the physicochemical properties of extruded orange pomace. *Food Chemistry*, 192: 363–369. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.039>
- Hussain, O. A., Abdel Rahim, E. A., Badr, A. N., Hathout, A. S., Rashed, M. M., Fouzy, A. S. M. (2022): Total phenolics, flavonoids, and antioxidant activity of agricultural wastes, and their ability to remove some pesticide residues. *Toxicology Reports*, 9: 628–635. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.03.038>
- ISO 8589:2007. Sensory Analysis—General Guidance for Design of Test Rooms. ISO: Genève, Switzerland, 2007. <https://www.iso.org/standard/76667.html>

- ISO 8586:2012. Sensory Analysis—General Guidelines for the Selection, Training and Monitoring of Selected Assessors and Expert Sensory Assessors. ISO: Genève, Switzerland, 2012. <https://www.iso.org/standard/45352.html>
- ISO 11136:2014. Sensory Analysis—Methodology—General Guidance for Conducting Hedonic Tests with Consumers in a Controlled Area. ISO: Genève, Switzerland, 2014. <https://www.iso.org/standard/50125.html>
- Ivanova, M., Petkova, N., Balabanova, T., Ognyanov, M., Vlaseva, R. (2018): Food design of dairy desserts with encapsulated Cornelian cherry, chokeberry and blackberry juices. Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI: Food Technology/Analele Universității Dunărea de Jos din Galați, Fascicula VI: Tehnologia Produselor Alimentare, 42(1).
- Jakišić, M. (2020): Funkcionalni proizvodi na bazi cerealija i pseudocerealija sa dodatkom inkapsuliranog ekstrakta tropa cvekle. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu – Tehnološki fakultet.
- Jinapong, N., Suphantharika, M., Jamnong, P. (2008): Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. Journal of Food Engineering, 84(2): 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.04.032>
- Johana Ortega Villalba, K., Vaillant Barka, F., Vélez Pasos, C., Emilio Rodríguez, P. (2020): Food ellagitannins: Structure, metabolomic fate, and biological properties. Tannins - Structural Properties, Biological Properties and Current Knowledge, 26–46. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86420>
- Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., Srawan, G. Y. (2010): Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. Journal of microencapsulation, 27(3): 187–197. <https://doi.org/10.3109/02652040903131301>
- Kaderides, K., Goula, A. M., Adamopoulos, K. G. (2015): A process for turning pomegranate peels into a valuable food ingredient using ultrasound-assisted extraction and encapsulation. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 31: 204–215. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.08.006>
- Kalušević, A. (2017): Mikroinkapsulacija bioaktivnih jedinjenja iz sporednih proizvoda prehrambene industrije. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet.
- Kapasakalidis, P. G., Rastall, R. A., Gordon, M. H. (2006): Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(11): 4016–4021. <https://doi.org/10.1021/jf0529991>
- Karadag, A., Bozkurt, F., Bekiroglu, H., Sagdic, O. (2020): Use of principal component analysis and cluster analysis for differentiation of traditionally-manufactured vinegars based on phenolic and volatile profiles, and antioxidant activity. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 70(4): 347–360. <https://doi.org/10.31883/pjfn/127399>
- Karafyllaki, D., Narwojsz, A., Kurp, L., Sawicki, T. (2023): Effects of different processing methods on the polyphenolic compounds profile and the antioxidant and anti-glycaemic properties of horseradish roots (*Armoracia rusticana*). European Food Research and Technology, 249(7): 1739–1747. <https://doi.org/10.1007/s00217-023-04248-3>

- Katanić Stanković, J. S., Mićanović, N., Grozdanić, N., Kostić, A., Gašić, U., Stanojković, T., Popović-Djordjević, J. B. (2022): Polyphenolic profile, antioxidant and antidiabetic potential of medlar (*Mespilus germanica* L.), blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and common hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) fruit extracts from Serbia. *Horticulturae*, 8(11): 1053. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8111053>
- Kaushal, G. P., Bhatia, I. S. (1982): A study of polyphenols in the seeds and leaves of guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L. Taub). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33(5): 461–470.
- Kayacan, S., Karasu, S., Akman, P. K., Goktas, H., Doymaz, I., Sagdic, O. (2020): Effect of different drying methods on total bioactive compounds, phenolic profile, in vitro bioaccessibility of phenolic and HMF formation of persimmon. *LWT - Food Science and Technology*, 118: 108830. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108830>
- Khalid, M. U., Shabbir, M. A., Mustafa, S., Hina, S., Quddoos, M. Y., Mahmood, S., Maryam, Y., Faisal, F., Rafique, A. (2021): Effect of apple peel as an antioxidant on the quality characteristics and oxidative stability of mayonnaise. *Applied Food Research*, 1(2): 100023. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2021.100023>
- Khoshdouni Farahani, Z., Mousavi, M., Seyedain Ardebili, M., Bakhoda, H. (2022): The influence of sodium alginate and sodium alginate/WPI as coating material on microcapsules of Jujube extract produced by spray dryer. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(12): e17175. <https://doi.org/10.1111/jfpp.17175>
- Kim, D. O., Jeong, W., Lee, C. Y. (2003): Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81(3): 321–326. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00423-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00423-5)
- Kim, H. Y., Phan-a-god, S., Shin, I. S. (2015): Antibacterial activities of isothiocyanates extracted from horseradish (*Armoracia rusticana*) root against antibiotic-resistant bacteria. *Food Science and Biotechnology*, 24: 1029–1034. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0131-y>
- Kishk, Y. F. M., Elsheshetawy, H. E. (2013): Effect of ginger powder on the mayonnaise oxidative stability, rheological measurements, and sensory characteristics. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(2): 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2013.07.016>
- Kobo, G. K., Kaseke, T., Fawole, O. A. (2022): Micro-encapsulation of phytochemicals in passion fruit peel waste generated on an organic farm: Effect of carriers on the quality of encapsulated powders and potential for value-addition. *Antioxidants*, 11(8): 1579. <https://doi.org/10.3390/antiox11081579>
- Konieczynski, P., Zarkov, A., Viapiana, A., Kaszuba, M., Bielski, L., Wesolowski, M. (2020): Investigations of metallic elements and phenolics in Chinese medicinal plants. *Open Chemistry*, 18(1): 1381–1390. <https://doi.org/10.1515/chem-2020-0130>
- Kopjar, M., Šubarić, D., Piližota, V. (2012): Glukozinolati: Bidostupnost i utjecaj na zdravlje ljudi. *Hrana u zdravlju i bolesti, Znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*. 1, 22–35.
- Kosson, R., Horbowicz, M. (2008): Effect of long term storage on some nutritive components and isothiocyanates content in roots of two horseradish types. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 69. <https://doi.org/10.2478/v10032-008-0030-3>

- Krivokapić, S., Vlaović, M., Vratnica, B. D., Perović, A., Perovic, S. (2021): Biowaste as a potential source of bioactive compound—a case study of raspberry fruit pomace. *Foods*, 10(4): 706. <https://doi.org/10.3390/foods10040706>
- Kuck, L. S., Noreña, C. P. Z. (2016): Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food Chemistry*, 194: 569–576. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.066>
- Kulichová, K., Sokol, J., Nemeček, P., Maliarová, M., Maliar, T., Havrlentová, M., Kraic, J. (2019): Phenolic compounds and biological activities of rye (*Secale cereale* L.) grains. *Open Chemistry*, 17(1): 988–999. <https://doi.org/10.1515/chem-2019-0103>
- Kuppusamy, S., Venkateswarlu, K., Megharaj, M. (2020): Examining the polyphenol content, antioxidant activity and fatty acid composition of twenty-one different wastes of fruits, vegetables, oilseeds and beverages. *SN Applied Sciences*, 2(4): 1–13. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2441-9>
- Kwon, H., Ko, J. H., Shin, H. S. (2015): Evaluation of antioxidant activity and oxidative stability of spice-added mayonnaise. *Food Science and Biotechnology*, 24(4): 1285–1292. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0165-1>
- Lazăr, S., Constantin, O. E., Horincar, G., Andronoiu, D. G., Stănciuc, N., Muresan, C., Râpeanu, G. (2022): Beetroot by-product as a functional ingredient for obtaining value-added mayonnaise. *Processes*, 10(2): 227. <https://doi.org/10.3390/pr10020227>
- Lee, B. R., Lee, K. H., Kang, E., Kim, D. S., Lee, S. H. (2011): Microfluidic wet spinning of chitosan-alginate microfibers and encapsulation of HepG2 cells in fibers. *Biomicrofluidics*, 5(2). <https://doi.org/10.1063/1.3576903>
- Lee, C.-G., Ahmed, M., Jiang, G.-H., Eun, J.-B. (2017): Color, bioactive compounds and morphological characteristics of encapsulated Asian pear juice powder during spray drying. *Journal of Food Science and Technology*, 54(9): 2717–2727. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2708-3>
- Lee, S. K., Kader, A. A. (2000): Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Biotechnology*, 20: 207–220. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00133-2](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00133-2)
- Lević, S., Kalušević, A., Đorđević, V., Bugarski, B., Nedović, V. (2014): Savremeni procesi inkapsulacije u tehnologiji hrane. *Hrana i ishrana*, 55: 7–12.
- Lević, S. M. (2014): Inkapsulacija aroma u karnauba vosku, alginatu i polivinil-alkoholu. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet.
- Li, C. Y., Kim, H. W., Li, H., Lee, D. C., Rhee, H. I. (2014): Antioxidative effect of purple corn extracts during storage of mayonnaise. *Food Chemistry*, 152: 592–596. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.152>
- Li, X., Kushad, M. M. (2004): Correlation of glucosinolate content to myrosinase activity in horseradish (*Armoracia rusticana*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23): 6950–6955. <https://doi.org/10.1021/jf0401827>

- 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. <https://doi.org/10.3390/foods9060718>
- Mahdavi, S., Jafari, S. M., Assadpoor, E., Dehnad, D. (2016): Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85: 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.011>
- Marcillo-Parra, V., Tupuna-Yerovi, D. S., González, Z., Ruales, J. (2021): Encapsulation of bioactive compounds from fruit and vegetable by-products for food application – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 116: 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.009>
- Marcinkowska, M., Jeleń, H. H. (2020): Determination of the odor threshold concentrations and partition coefficients of isothiocyanates from Brassica vegetables in aqueous solution. *LWT - Food Science and Technology*, 131: 109793. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109793>
- Mar, J. M., Silva, L. S., Rabelo, M. D. S., Muniz, M. P., Nunomura, S. M., Correa, R. F., Kinupp, V. F., Campelo, P. H., Sanches, E. A. (2020): Encapsulation of Amazonian blueberry juices: Evaluation of bioactive compounds and stability. *LWT - Food Science and Technology*, 124: 109152. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109152>
- Marsooli, M. A., Fasihi-Ramandi, M., Adib, K., Pourmasoud, S., Ahmadi, F., Ganjali, M. R., Nasab, A. S., Nasrabadi, M. R., Plonska-Brzezinska, M. E. (2019): Preparation and characterization of magnetic Fe₃O₄/CdWO₄ and Fe₃O₄/CdWO₄/PrVO₄ nanoparticles and investigation of their photocatalytic and anticancer properties on PANC1 cells. *Materials*, 12(19): 3274. <https://doi.org/10.3390/ma12193274>
- Martínez-Tomé, M., Jiménez, A. M., Ruggieri, S., Frega, N., Strabbioli, R., Murcia, M. A. (2001): Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. *Journal of Food Protection*, 64(9): 1412–1419. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.9.1412>
- Martins, E., Poncelet, D., Rodrigues, R. C., Renard, D. (2017): Oil encapsulation techniques using alginate as encapsulating agent: applications and drawbacks. *Journal of Microencapsulation*, 34(8): 754–771. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1403495>
- Matkowski, A., Tasarz, P., Szypuła, E. (2008): Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2(11): 321–330.
- McNamee, B. F., O’Riorda, E. D., O’Sullivan, M. (1998): Emulsification and microencapsulation properties of gum Arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(11): 4551–4555. <https://doi.org/10.1021/jf9803740>
- Menges, F. (2020): Spectragryph-optical spectroscopy software. *Version*, 1(5): 2016–2017.
- Minasian, D., Pirouzifard, M., Almasi, H., Hassanzadeh, H. (2024): Development of *Prangos ferulacea* essential oil based nanoemulsions/pickering emulsion and examination of their performance in mayonnaise shelf life. *Journal of Agriculture and Food Research*, 18: 101335. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101335>
- Mirzanajafi-Zanjani, M., Yousefi, M., Ehsani, A. (2019): Challenges and approaches for production of a healthy and functional mayonnaise sauce. *Food Science and Nutrition*, 7(8): 2471–2484. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1132>

- Mitterer-Daltoé, M., Bordim, J., Lise, C., Breda, L., Casagrande, M., Lima, V. (2020): Consumer awareness of food antioxidants. Synthetic vs. Natural. *Food Science and Technology*, 41(1): 208–212. <https://doi.org/10.1590/fst.15120>
- Mkhari, T., Kaseke, T., Fawole, O. A. (2023): Encapsulation of betalain-rich extract from beetroot postharvest waste using a binary blend of gum Arabic and maltodextrin to promote a food circular bioeconomy. *Frontiers in Nutrition*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1235372>
- Mňahončáková, E., Vergun, O., Grygorieva, O., Sedláčková, V. H., Ivanišová, E., Šramková, K. F., Hružová, M., Brindza, J. (2021): Evaluation of the antioxidant potential of *Capsicum Annuum* L., *C. Baccatum* L. and *C. Chinense* Jacq. Cultivars. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 20(2): 223–236. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2021.0941>
- Moradi, A., Davati, N., Emamifar, A. (2023): Effects of *Cuminum cyminum* L. essential oil and its nanoemulsion on oxidative stability and microbial growth in mayonnaise during storage. *Food Science & Nutrition*, 11(8): 4781–4793. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3457>
- Morais, D. R., Rotta, E. M., Sargi, S. C., Schmidt, E. M., Bonafe, E. G., Eberlin, M. N., Sawaya, A. C. H. F., Visentainer, J. V. (2015): Antioxidant activity, phenolics and UPLC-ESI(-)-MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. *Food Research International*, 77: 392–399. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.036>
- Mudgil, D., Barak, S., Khatkar, B. S. (2014): Guar gum: Processing, properties and food applications - A Review. *Journal of Food Science and Technology*, 51(3): 409–418. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0522-x>
- Müller, L., Fröhlich, K., Böhm, V. (2011): Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129(1): 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.045>
- Munir, A., Sultana, B., Bashir, A., Ghaffar, A., Munir, B., Shar, G. A., Nazir, A., Iqbal, M. (2018): Evaluation of antioxidant potential of vegetables waste. *Polish Journal of Environmental Studies*, 27(2): 947–952. <https://doi.org/10.15244/pjoes/69944>
- Murali, S., Kar, A., Mohapatra, D., Kalia, P. (2015): Encapsulation of black carrot juice using spray and freeze drying. *Food Science and Technology International*, 21(8): 604–612. <https://doi.org/10.1177/1082013214557843>
- Navarro-Flores, M. J., Ventura-Canseco, L. M. C., Meza-Gordillo, R., Ayora-Talavera, T. del R., Abud-Archila, M. (2020): Spray drying encapsulation of a native plant extract rich in phenolic compounds with combinations of maltodextrin and non-conventional wall materials. *Journal of Food Science and Technology*, 57: 4111–4122. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04447-w>
- Nedović, V. (1999): Imobilisani ćelijijski sistemi u fermentaciji piva. Zadužbina Andrejević, Beograd.
- Nedović, V., Kalušević, A., Manojlović, V., Lević, S., Bugarski, B. (2011): An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1: 1806–1815. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>
- Nedović, V., Kalušević, A., Manojlović, V., Petrović, T., Bugarski, B. (2013): Encapsulation systems in the food industry. In: S. Yanniotis, P. Taoukis, N. G. Stoforos, V. T. Karathanos (Eds.),

- Advances in Food Process Engineering Research and Applications. (pp. 229-253). New York: Springer.
- Negro, E. J., Sendker, J., Stark, T., Lipowicz, B., Hensel, A. (2022): Phytochemical and functional analysis of horseradish (*Armoracia rusticana*) fermented and non-fermented root extracts. *Fitoterapia*, 162: 105–282. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2022.105282>
- Nguyen, N. M., Gonda, S., Vasas, G. (2013): A review on the phytochemical composition and potential medicinal uses of horseradish (*Armoracia rusticana*) root. *Food Reviews International*, 29(3): 261–275. <https://doi.org/10.1080/87559129.2013.790047>
- Nour, V. (2021): Oxidative stability, physico-chemical and sensory properties of mayonnaise enriched with carotenoids from sea buckthorn pomace during refrigerated storage. *Journal of Food and Nutrition Research*, 60(2): 168-177.
- Nthimole, C. T., Kaseke, T., Fawole, O. A. (2022): Micro-encapsulation and characterization of anthocyanin-rich raspberry juice powder for potential applications in the food industry. *Processes*, 10(5): 1038. <https://doi.org/10.3390/pr10051038>
- Nunes, J. C., Lago, M. G., Castelo-Branco, V. N., Oliveira, F. R., Torres, A. G., Perrone, D., Monteiro, M. (2016): Effect of drying method on volatile compounds, phenolic profile and antioxidant capacity of guava powders. *Food Chemistry*, 197: 881–890. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.050>
- Obradović, N. (2019): Karakterizacija i primena prirodnih hidrogelova za inkapsulaciju probiotske starter kulture. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu – Tehnološko-metalurški fakultet.
- Ogundele, M. O. (1999): Cytotoxicity of EDTA used in biological samples: effect on some human breast-milk studies. *Journal of Applied Toxicology*, 19(6): 395–400. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1263\(199911/12\)19:6<395::aid-jat590>3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1263(199911/12)19:6<395::aid-jat590>3.0.co;2-5)
- Okulicz, M. (2010): Multidirectional time-dependent effect of sinigrin and allyl isothiocyanate on metabolic parameters in rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65: 217–224. <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0183-3>
- Önder, F. C., Doğrular, N., Güzdüzalp, E., Barlak, S., Ay, M. (2020): A comparative study of three Brassicaceae vegetables grown in Canakkale: Determination of total phenolic content and antioxidant activity of pulp and juice samples of radish (*Raphanus sativus* L.), cabbage (*Brassica oleracea* L. var *capitata* L) and cauliflower (*Brassica oleracea* L.). *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(1): 30–38. <https://doi.org/10.28979/comufbed.633456>
- Oxley, J. (2014): Overview of microencapsulation process technologies. In *Microencapsulation in the food industry* (pp. 35-46). Academic Press.
- Ozdemir, N., Kantekin-Erdogan, M. N., Tat, T., Tekin, A. (2018): Effect of black cumin oil on the oxidative stability and sensory characteristics of mayonnaise. *Journal of Food Science and Technology*, 55: 1562–1568. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3075-4>
- Pal, D., Verma, P. (2013): Flavonoids: A powerful and abundant source of antioxidants. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3): 95–98.
- Papoutsis, K., Golding, J. B., Vuong, Q., Pristijono, P., Stathopoulos, C. E., Scarlett, C. J., Bowyer, M. (2018): Encapsulation of citrus by-product extracts by spray-drying and freeze-drying using

- combinations of maltodextrin with soybean protein and κ -carrageenan. *Foods*, 7(7): 115. <https://doi.org/10.3390/foods7070115>
- Papp, N., Gonda, S., Kiss-Szikszai, A., Plaszkó, T., Lőrincz, P., Vasas, G. (2018): Ethnobotanical and ethnopharmacological data of *Armoracia rusticana* P. Gaertner, B. Meyer et Scherb. in Hungary and Romania: a case study. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65(7): 1893–1905. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0663-0>
- Park, H. W., Choi, K. D., Shin, I. S. (2013): Antimicrobial activity of isothiocyanates (ITCs) extracted from horseradish (*Armoracia rusticana*) root against oral microorganisms. *Biocontrol science*, 18(3): 163–168. <https://doi.org/10.4265/bio.18.163>
- Peanparkdee, M., Iwamoto, S., Yamauchi, R. (2016): Microencapsulation: a review of applications in the food and pharmaceutical industries. *Reviews in Agricultural Science*, 4: 56–65. <https://doi.org/10.7831/ras.4.56>
- Periche, A., Castelló, M. L., Heredia, A., Escriche, I. (2016): Effect of different drying methods on the phenolic, flavonoid and volatile compounds of *Stevia rebaudiana* leaves. *Flavour and Fragrance Journal*, 31(2): 173–177. <https://doi.org/10.1002/ffj.3298>
- Petridis, A., Therios, I., Samouris, G., Tananaki, C. (2012): Salinity-induced changes in phenolic compounds in leaves and roots of four olive cultivars (*Olea europaea* L.) and their relationship to antioxidant activity. *Environmental and Experimental Botany*, 79: 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.01.007>
- Petrović, S., Drobac, M., Ušjak, Lj., Filipović, V., Milenković, M., Niketić, M. (2017): Volatiles of roots of wild-growing and cultivated *Armoracia macrocarpa* and their antimicrobial activity, in comparison to horseradish, *A. rusticana*. *Industrial Crops & Products*, 109: 398–403. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.056>
- Pieczykolan, E., Kurek, M. A. (2019): Use of guar gum, gum arabic, pectin, beta-glucan and inulin for microencapsulation of anthocyanins from chokeberry. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129: 665–671. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.073>
- Polumackanycz, M., Wesolowski, M., Viapiana, A. (2021): *Morus alba* L. and *Morus nigra* L. leaves as a promising food source of phenolic compounds with antioxidant activity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 76(4): 458–465. <https://doi.org/10.1007/s11130-021-00922-7>
- Popova, G. Y., Chesalov, Y. A., Sadovskaya, E. M., Andrushkevich, T. V. (2012): Effect of water on decomposition of formic acid over V–Ti oxide catalyst: Kinetic and in situ FTIR study. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 357: 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2012.02.005>
- Praptiningsih, Y., Palupi, N. (2014): Characterization of functional properties of oxidized tapioca and sodium alginate. In *Proceeding of International Seminar ISOSTECH* (pp. 99–102).
- Prasad, N., Thombare, N., Sharma, S. C., Kumar, S. (2022): Gum arabic—A versatile natural gum: A review on production, processing, properties and applications. *Industrial Crops and Products*, 187: 115304. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115304>
- Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za jestiva biljna ulja i masti, margarin i druge masne namaze, majonez i srodne proizvode. (2013): „Službeni glasnik RS“, br. 43/2013.

- Rahim, M. A., Imran, M., Khan, F. A., Al-Asmari, F., Mosa, O. F., Almalki, R. S., Zongo, E. (2024): Omega-3-enriched and oxidative stable mayonnaise formulated with spray-dried microcapsules of chia and fish oil blends. *ACS omega*, 9(7): 8221–8228. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c08807>
- Rahmani-Manglano, N. E., Guadix, E. M., Yesiltas, B., Prieto, C., Lagaron, J. M., Jacobsen, C., García-Moreno, P. J. (2024): Non-emulsion-based encapsulation of fish oil by coaxial electrospraying assisted by pressurized gas enhances the oxidative stability of a capsule-fortified salad dressing. *Food Chemistry*, 431. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137157>
- Raikos, V., McDonagh, A., Ranawana, V., Duthie, G. (2016): Processed beetroot (*Beta vulgaris* L.) as a natural antioxidant in mayonnaise: Effects on physical stability, texture and sensory attributes. *Food Science and Human Wellness*, 5(4): 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.10.002>
- Rasmy, N., Hassan, A., Foda, M., Al-Moghazy, M. M. (2012): Assessment of the antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) extracts on the shelf life of mayonnaise. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 7: 28–40.
- Ravichandran, K., Palaniraj, R., Saw, N. M. M. T., Gabr, A. M. M., Ahmed, A. R., Knorr, D., Smetanska, I. (2014): Effects of different encapsulation agents and drying process on stability of betalains extract. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9): 2216–2221. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0728-6>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rezende, Y. R. R. S., Nogueira, J. P., Narain, N. (2018): Microencapsulation of extracts of bioactive compounds obtained from acerola (*Malpighia emarginata* DC) pulp and residue by spray and freeze drying: Chemical, morphological and chemometric characterization. *Food Chemistry*, 254: 281–291. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.026>
- Righetto, A. M., Netto, F. M. (2006): Vitamin C stability in encapsulated green West Indian cherry juice and in encapsulated synthetic ascorbic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(8): 1202–1208. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2469>
- Rigolon, T. C. B., Silva, R. R. A., de Oliveira, T. V., Nascimento, A. L. A. A., de Barros, F. A. R., Martins, E., Campelo, P. H., Stringheta, P. C. (2024): Exploring anthocyanins-polysaccharide synergies in microcapsule wall materials via spray drying: Interaction characterization and evaluation of particle stability. *Measurement: Food*, 13: 100126. <https://doi.org/10.1016/j.meaf00.2023.100126>
- Rivelli, A.R., Caruso, M.C., De Maria, S., Galgano, F. (2017): Vitamin C content in leaves and roots of horseradish (*Armoracia rusticana*): Seasonal variation in fresh tissues and retention as affected by storage conditions. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29: 799–806. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2017.v29.i10.1294>
- Robbins, R. J. (2003): Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10): 2866–2887. <https://doi.org/10.1021/jf026182t>
- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., Saenz, C. (2010): Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying.

- International Journal of Food Science & Technology, 45(7): 1386–1394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02270.x>
- Rocha, J. C. G., de Barros, F. A. R., Perrone, Í. T., Viana, K. W. C., Tavares, G. M., Stephani, R., Stringheta, P. C. (2018): Microencapsulation by atomization of the mixture of phenolic extracts. Powder Technology, 343: 317–325. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.11.040>
- Rohini, C., Kanchana, S., Geetha, P. S., Mini, M. L., Arul Arasu, P. (2024): Optimize the process for encapsulated spray dried lemon juice powder to enhance the vitamin C. World Journal of Advanced Research and Reviews, 21(1): 2064–2072. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2024.21.1.0045>
- Saavedra-Leos, M. Z., Leyva-Porras, C., Toxqui-Terán, A., Espinosa-Solis, V. (2021): Physicochemical properties and antioxidant activity of spray-dry broccoli (*Brassica oleracea* var Italica) stalk and floret juice powders. Molecules, 26(7): 1973. <https://doi.org/10.3390/molecules26071973>
- Sahasrabudhe, M. R., Mullin, W. J. (1980): Dehydration of horseradish roots. Journal of Food Science, 45(5): 1440–1441.
- Saifullah, M., Shishir, M. R. I., Ferdowsi, R., Rahman, M. R. T., Van Vuong, Q. (2019): Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review. Trends in Food Science & Technology, 86: 230–251. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.030>
- Salević, A. (2020): Sinteza i karakterizacija aktivnih vlakana i filmova na bazi poli(ϵ -kaprolaktona) i zeina. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet.
- Salević, A., Prieto, C., Cabedo, L., Nedović, V., Lagaron, J. M. (2019): Physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties of electrospun poly(ϵ -caprolactone) films containing a solid dispersion of sage (*Salvia officinalis* L.) extract. Nanomaterials, 9(2): 270. <https://doi.org/10.3390/nano9020270>
- Salević, A., Stojanović, D., Lević, S., Pantić, M., Đorđević, V., Pešić, R., Bugarski, B., Pavlović, V., Uskoković, P., Nedović, V. (2022): The structuring of sage (*Salvia officinalis* L.) extract-incorporating edible zein-based materials with antioxidant and antibacterial functionality by solvent casting versus electrospinning. Foods, 11(3): 390. <https://doi.org/10.3390/foods11030390>
- Salević, A. S., Kalušević, A. M., Lević, S. M., Nedović, V. A. (2018): Encapsulation of bioactive compounds derived from fruit processing by-products. Journal of Agricultural Sciences, Belgrade, 63(2): 113–137. <https://doi.org/10.2298/JAS1802113S>
- Šamec, D., Piljac-Žegarac, J., Bogović, M., Habjanič, K., Grúz, J. (2011): Antioxidant potency of white (*Brassica oleracea* L. var. capitata) and Chinese (*Brassica rapa* L. var. pekinensis (Lour.)) cabbage: The influence of development stage, cultivar choice and seed selection. Scientia Horticulturae, 128(2): 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.01.009>
- Sánchez, M. D. R. H., Cuvelier, M. E., Turchiuli, C. (2016): Effect of α -tocopherol on oxidative stability of oil during spray drying and storage of dried emulsions. Food Research International, 88: 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.035>
- Savani, P., Puthiyedath, A., Chandran K, R., George, S., Prasad, P. S., Annapure, U. S. (2023): Evaluation of the sensory properties and antioxidant activity of clean rosemary extracts for an

- effective replacement of EDTA in Mayonnaise. *Applied Food Research*, 3(1): 100302. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100302>
- Schulz, H., Baranska, M. (2007): Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 43(1): 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2006.06.001>
- Senat Univerziteta u Beogradu. (2016): Kodeks profesionalne etike Univerziteta u Beogradu. Službeni glasnik Republike Srbije, 189: 16.
- Šregelj, V. (2019): Inkapsulirani karotenoidi iz sporednog proizvoda prerade šargarepe u funkcionalnoj hrani. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu – Tehnološki fakultet.
- Šregelj, V., Tumbas Šaponjac, V., Lević, S., Kalušević, A., Četković, G., Čanadanović-Brunet, J., Nedović, V., Stajčić, S., Vulić, J., Vidaković, A. (2019): Application of encapsulated natural bioactive compounds from red pepper waste in yogurt. *Journal of Microencapsulation*, 36(8): 704–714. <https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1668488>
- Šeremet, D., Žižek, K., Žepić, I., Kovačević, M., Nodilo, L. N., Vrsaljko, D., Katančić, Z., Sokač, K., Kuzmić, S., Komes, D. (2024): Effect of guar gum-based carriers on the physical and bioactive properties of spray-dried delivery systems of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.). *Food hydrocolloids*, 150: 109658. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109658>
- Shabbir, M. A., Iftikhar, F., Khan, M. R., Murtaza, M. A., Rafiq Khan, M., Anjum Murtaza, M., Saeed, M., Mahmood, S., Siraj, N. (2015): Effect of sesame sprouts powder on the quality and oxidative stability of mayonnaise. *Journal of Food and Nutrition Research*, 3(3): 138–145. <https://doi.org/10.12691/jfnr-3-3-2>
- Sharma, G., Sharma, S., Kumar, A., Ala'a, H., Naushad, M., Ghfar, A. A., Mola, G. T., Stadler, F. J. (2018): Guar gum and its composites as potential materials for diverse applications: A review. *Carbohydrate polymers*, 199: 534–545. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.053>
- Sharma, V. K., Mazumdar, B. (2013): Feasibility and characterization of gummy exudate of *Cochlospermum religiosum* as pharmaceutical excipient. *Industrial Crops and Products*, 50: 776–786. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.041>
- Shaygannia, S., Eshaghi, M. R., Fazel, M., Hashemiravan, M. (2021): The effect of microencapsulation of phenolic compounds from lemon waste by Persian and basil seed gums on the chemical and microbiological properties of mayonnaise. *Preventive Nutrition and Food Science*, 26(1): 82. <https://doi.org/10.3746/pnf.2021.26.1.82>
- Shin, S. W., Ghimeray, A. K., Park, C. H. (2014): Investigation of total phenolic, total flavonoid, antioxidant and allyl isothiocyanate content in the different organs of *Wasabi Japonica* grown in an organic system. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 11(3): 38–45. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v11i3.7>
- Silva, P. I., Stringheta, P. C., Teófilo, R. F., de Oliveira, I. R. N. (2013): Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering*, 117(4): 538–544. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.08.039>
- Simon-Brown, K., Solval, K. M., Chotiko, A., Alfaro, L., Reyes, V., Liu, C., Dzandu, B., Kyereh, E., Goldson Barnaby, A., Thompson, I., Xu, Z., Sathivel, S. (2016): Microencapsulation of ginger

(*Zingiber officinale*) extract by spray drying technology. LWT - Food Science and Technology, 70: 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.030>

- Šimora, V., Ďúranová, H., Brindza, J., Moncada, M., Ivanišová, E., Joanidis, P., Straka, D., Gabríny, L., Kačániová, M. (2023): Cornelian cherry (*Cornus mas*) powder as a functional ingredient for the formulation of bread loaves: Physical properties, nutritional value, phytochemical composition, and sensory attributes. *Foods*, 12(3): 593. <https://doi.org/10.3390/foods12030593>
- Singh, A., Sharma, B., Deswal, R. (2018): Green silver nanoparticles from novel Brassicaceae cultivars with enhanced antimicrobial potential than earlier reported Brassicaceae members. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 47: 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.01.001>
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3): 144–158.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Smith, J. S., Hui, Y. H. (2008): Food processing: principles and applications. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9780470290118>
- Smrčková, P., Horský, J., Šárka, E., Koláček, J., Netopilík, M., Walterová, Z., Kruliš, Z., Synystysya, A., Hrušková, K. (2013): Hydrolysis of wheat B-starch and characterisation of acetylated maltodextrin. *Carbohydrate Polymers*, 98(1): 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.065>
- Solaberrieta, I., Jiménez, A., Cacciotti, I., Garrigós, M. C. (2020): Encapsulation of bioactive compounds from aloe vera agrowastes in electrospun poly (ethylene oxide) nanofibers. *Polymers*, 12(6): 1323. <https://doi.org/10.3390/polym12061323>
- Soltan, O. I. A., Gazwi, H. S. S., Ragab, A. E., Aljohani, A. S. M., El-Ashmawy, I. M., Batiha, G. E. S., Hafiz, A. A., Abdel-Hameed, S. M. (2023): Assessment of bioactive phytochemicals and utilization of *Rosa canina* fruit extract as a novel natural antioxidant for mayonnaise. *Molecules*, 28(8): 3350. <https://doi.org/10.3390/molecules28083350>
- Sones, K., Heaney, R. K., Fenwick, G. R. (1984): An estimate of the mean daily intake of glucosinolates from cruciferous vegetables in the UK. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35: 712–720. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740350619>
- SRPS EN ISO 3960:2017. Animal and vegetable fats and oils – Determination of peroxide value – Iodometric (visual) endpoint determination, pp. 1–10.
- SRPS EN ISO 660:2021. Animal and vegetable fats and oils - Determination of acid value and acidity.
- SRPS EN ISO 6885:2017. Animal and vegetable fats and oils – Determination of the anisidine value, pp. 1–7.
- Stojanović, B. T. (2014): Hemijski sastav i antioksidativna aktivnost metanolnih i acetonskih ekstrakata pulpe i kore odabranih vrsta voća sa područja Jugoistočne Srbije. Doktorska disertacija. Univerzitet u Nišu - Prirodno-matematički fakultet.

- Stratil, P., Klejdus, B., Kubáň, V. (2006): Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(3): 607–616. <https://doi.org/10.1021/jf052334j>
- Šturm, L., Črnivec, I. G. O., Istenič, K., Ota, A., Megušar, P., Slukan, A., Humar, M., Lević, S., Nedović, V., Kopinč, R., Deželak, M., Pereyra Gonzales, A., Ulrih, N. P. (2019): Encapsulation of non-dewaxed propolis by freeze-drying and spray-drying using gum Arabic, maltodextrin and inulin as coating materials. *Food and Bioproducts Processing*, 116: 196–211. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.05.008>
- Suárez, B., Álvarez, Á. L., García, Y. D., Barrio, G. del, Lobo, A. P., Parra, F. (2010): Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace. *Food Chemistry*, 120(1): 339–342. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.073>
- Sultanbawa, Y. (2011): Plant antimicrobials in food applications: Minireview. *Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances*, 2: 1084–99.
- Sun, T., Powers, J. R., Tang, J. (2007): Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. *Food Chemistry*, 105(1): 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.048>
- Svydenko, L. (2022): Polyphenol compounds and antioxidant activity of *Salvia officinalis* L. and *Salvia sclarea* L. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality*, 6(2). <https://doi.org/10.15414/ainhlq.2022.0015>
- Takeuchi, H., Yasuji, T., Hino, T., Yamamoto, H., Kawashima, Y. (1998): Spray-dried composite particles of lactose and sodium alginate for direct tableting and controlled releasing. *International Journal of Pharmaceutics*, 174(1-2): 91–100. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00248-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00248-8)
- Tan, S. P., Kha, T. C., Parks, S., Stathopoulos, C., Roach, P. D. (2015): Optimising the encapsulation of an aqueous bitter melon extract by spray-drying. *Foods*, 4(3): 400–419. <https://doi.org/10.3390/foods4030400>
- Taslikh, M., Mollakhalili-Meybodi, N., Alizadeh, A. M., Mousavi, M.-M., Nayebzadeh, K., Mortazavian, A. M. (2021): Mayonnaise main ingredients influence on its structure as an emulsion. *Journal of Food Science and Technology*, 59(6): 2108–2116. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05133-1>
- Tedeschi, P., Leis, M., Pezzi, M., Civolani, S., Maietti, A., Brandolini, V. (2011): Insecticidal activity and fungitoxicity of plant extracts and components of horseradish (*A Armoracia rusticana*) and garlic (*Allium sativum*). *Journal of Environmental Science and Health*, 46: 486–490. <https://doi.org/10.1080/03601234.2011.583868>
- Thakur, C., Kaushal, M., Vaidya, D., Verma, A. K., Gupta, A., Sharma, R. (2024): Unlocking the potential of spray drying for agro-products: Exploring advanced techniques, carrier agents, applications, and limitations. *Food and Bioprocess Technology*, 1–40. <https://doi.org/10.1007/s11947-024-03544-4>
- Tiwari, S., Upadhyay, N., Singh, A. K., Meena, G. S., Arora, S. (2019): Organic solvent-free extraction of carotenoids from carrot bio-waste and its physico-chemical properties. *Journal of Food Science and Technology*, 56(10): 4678–4687. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03920-5>

- Tomsone, L., Galoburda, R., Kruma, Z., Cinkmanis, I. (2020a): Characterization of dried horseradish leaves pomace: phenolic compounds profile and antioxidant capacity, content of organic acids, pigments and volatile compounds. *European Food Research and Technology*, 246(8): 1647–1660. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03521-z>
- Tomsone, L., Galoburda, R., Kruma, Z., Durrieu, V., Cinkmanis, I. (2020b): Microencapsulation of horseradish (*Armoracia rusticana* L.) juice using spray-drying. *Foods*, 9(9): 1332. <https://doi.org/10.3390/foods9091332>
- Tomsone, L., Galoburda, R., Kruma, Z., Majore, K. (2020c): Physicochemical properties of biscuits enriched with horseradish (*Armoracia rusticana* L.) products and bioaccessibility of phenolics after simulated human digestion. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 70(4): 419–428. <https://doi.org/10.31883/pjfn/130256>
- Tomsone, L., Kruma, Z. (2013): Comparison of different solvents for isolation of phenolic compounds from horseradish (*Armoracia rusticana* L.) leaves. *Food Sciences*, 104–110.
- Tomsone, L., Kruma, Z. (2014): Influence of freezing and drying on the phenol content and antioxidant activity of horseradish and lovage. In *Food for Consumer Well-Being, The 9th Baltic Conference on Food Science and Technology*, 192–197.
- Tomsone, L., Kruma, Z. (2017): Influence of harvest time on the phenolic content of horseradish leaves. *FoodBalt*. <https://doi.org/10.22616/foodbalt.2017.019>
- Tomsone, L., Kruma, Z., Galoburda, R., Dimins, F., Kreicbergs, V. (2013a): Influence of technological processes on the phenol content and antioxidant properties of horseradish roots (*Armoracia rusticana* L.). 2nd International Conference on Nutrition and Food Sciences IPCBEE, Singapor. <https://doi.org/10.7763/IPCBEE>
- Tomsone, L., Kruma, Z., Galoburda, R., Talou, T. (2013b): Composition of volatile compounds of horseradish roots (*Armoracia rusticana* L.) depending on the genotype. *Rural Sustainability Research*, 29: 1–10. <https://doi.org/doi:10.2478/plua-2013-0001>
- Tonon, R. V., Brabet, C., Hubinger, M. D. (2008): Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 88(3): 411–418. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.02.029>
- Tontul, I., Topuz, A. (2017): Spray-drying of fruit and vegetable juices: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties. *Trends in Food Science and Technology*, 63: 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.009>
- Truong, V. D., McFeeters, R. F., Thompson, R. T., Dean, L. L., Shofran, B. (2007): Phenolic acid content and composition in leaves and roots of common commercial sweetpotato (*Ipomea batatas* L.) cultivars in the United States. *Journal of Food Science*, 72(6): C343–C349. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00415.x>
- Tsai, F. H., Kitamura, Y., Kokawa, M. (2017): Effect of gum Arabic-modified alginate on physicochemical properties, release kinetics, and storage stability of liquid-core hydrogel beads. *Carbohydrate Polymers*, 174: 1069–1077. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.031>
- Tsali, A., Goula, A. M. (2018): Valorization of grape pomace: Encapsulation and storage stability of its phenolic extract. *Powder Technology*, 340: 194–207. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.09.011>

- 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-H201. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02840.x>
- Tumbas Šaponjac, V. T., Čanadanovic-Brunet, J. S., Četkovic, G. S., Jakšić, M. V., Vulić, J. J., Stajčić, S. S., Šeregelj, V. N. (2020): Optimisation of beetroot juice encapsulation by freeze-drying. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 70(1). <https://doi.org/10.31883/pjfn/115153>
- Valadez-Carmona, L., Plazola-Jacinto, C. P., Hernández-Ortega, M., Hernández-Navarro, M. D., Villarreal, F., Necochea-Mondragón, H., Ortiz-Moreno, A., Ceballos-Reyes, G. (2017): Effects of microwaves, hot air and freeze-drying on the phenolic compounds, antioxidant capacity, enzyme activity and microstructure of cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 41: 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.012>
- Vergun, O., Rakhmetov, D., Shymanska, O., Bondarchuk, O., Ivanišová, E., Kačaniová, M., Grygorieva, O., Brindza, J. (2021): Assessment of antioxidant and antimicrobial activities of *Crambe* Spp. during vegetation. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 20(2): 197–211. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2021.0927>
- Vergun, O., Svydenko, L., Grygorieva, O., Sedláčková, V. H., Šramková, K. F., Ivanišová, E., Brindza, J. (2022): Polyphenol component and antioxidant activity of *Thymus* spp. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 16: 1–14. <https://doi.org/10.5219/1715>
- Verkerk, R., Schreiner, M., Krumbein, A., Ciska, E., Holst, B., Rowland, I., Schrijver, R., Hansen, M., Gerhauser, C., Mithen, R., Dekker, M. (2009): Glucosinolates in Brassica vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53: S219–S219. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800065>
- Wandrey, C., Bartkowiak, A., Harding, S. E. (2010): Materials for encapsulation. In N. J. Zuidam & V. A. Nedović (Eds.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. (pp. 31–100). New York: Springer
- Wang, L., Clardy, A., Hui, D., Wu, Y. (2021): Physicochemical properties of encapsulated bitter melon juice using spray drying. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 26: 100278. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2021.100278>
- Wedelsbäck Bladh, K., Olsson, K. M. (2011): Introduction and use of horseradish (*A Armoracia rusticana*) as food and medicine from antiquity to the present: Emphasis on the Nordic countries. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 17: 197–213. <https://doi.org/10.1080/10496475.2011.595055>
- Worrasinchai, S., Suphantharika, M., Pinjai, S., Jamnong, P. (2006): β -Glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. *Food Hydrocolloids*, 20(1): 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.03.005>
- Wright, J. (2011): *The herb society of America's essential guide to horseradish*. The Herb Society of America. Kirtland, Ohio, USA.
- Xing, Y., Lei, H., Wang, J., Wang, Y., Wang, J., Xu, H. (2017): Effects of different drying methods on the total phenolic, rosmarinic acid and essential oil of purple perilla leaves. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 20(6): 1594–1606. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1413957>

- Xu, T., Gao, C. C., Yang, Y., Shen, X., Huang, M., Liu, S., Tang, X. (2018): Retention and release properties of cinnamon essential oil in antimicrobial films based on chitosan and gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 84: 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.003>
- Xu, X., Liu, A., Hu, S., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M.-R., Wang, X., Martínez, M., Anadón, A., Martínez, M.-A. (2021): Synthetic phenolic antioxidants: Metabolism, hazards and mechanism of action. *Food Chemistry*, 353: 129488. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129488>
- Yener, E., Saroglu, O., Sagdic, O., Karadag, A. (2023): The effects of different drying methods on the *in vitro* bioaccessibility of phenolics, antioxidant capacity, and morphology of European plums (*Prunes domestica* L.). *ACS omega*, 9(11): 12711–12724. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c08383>
- Yousuf, B., Gul, K., Wani, A. A., Singh, P. (2016): Health benefits of anthocyanins and their encapsulation for potential use in food systems: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(13): 2223–2230. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.805316>
- Zabot, G. L., Schaefer Rodrigues, F., Polano Ody, L., Vinícius Tres, M., Herrera, E., Palacin, H., Córdova-Ramos, J. S., Best, I., Olivera-Montenegro, L. (2022): Encapsulation of bioactive compounds for food and agricultural applications. *Polymers*, 14(19): 4194. <https://doi.org/10.3390/polym14194194>
- Zekić, M. (2013): Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu - Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije.
- Zhang, J., Zhang, C., Chen, X., Quek, S.Y. (2020): Effect of spray drying on phenolic compounds of cranberry juice and their stability during storage. *Journal of Food Engineering*, 269(6): 109744. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109744>
- Zhishen, J., Mengcheng, M., Jianming, W. (1999): The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4): 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
- Zokti, J. A., Baharin, B. S., Mohammed, A. S., Abas, F. (2016): Green tea leaves extract: Microencapsulation, physicochemical and storage stability study. *Molecules*, 21(8): 940. <https://doi.org/10.3390/molecules21080940>
- Zuidam, N. J., Shimoni, E. (2010): Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In: Zuidam, N.J., Nedovic, V.A (Eds.), *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing*. Springe, Dordrecht, pp. 3–29.

8. PRILOZI

Tabela P1. UHPLC Q-ToF MS identifikacija fenolnih jedinjenja i njihovih derivata u metanolnim ekstraktima sokova, inkapsulata, tropova i liofilizovanih tropova korena i lista rena (jedinjenja prikazana u tabelama 5.1, 5.4, 5.5, 5.6 i 5.7). Za svako detektovano jedinjenje dato je retenciono vreme (tR), molekulska formula, izračunata masa, nađena masa i MS² fragmenti.

Broj	tR	Molekulska formula	Naziv jedinjenja	Izračunata masa	Nađena masa m/z	mDa	MS ² fragmenti
<i>Fenolne kiseline i derivati</i>							
1	2,42	C ₁₃ H ₁₅ O ₉ ⁻	Dihidroksibenzoeva kiselina heksozid izomer I	315,07216	315,07485	-2,69	108,02241(14), 109,03020(100) , 152,01230(20), 153,01964(60)
2	3,91	C ₁₃ H ₁₅ O ₉ ⁻	Dihidroksibenzoeva kiselina heksozid izomer II	315,07216	315,07499	-2,84	108,02237(13), 109,03090(100) , 152,01245(22), 153,02000(64)
3	4,50	C ₇ H ₅ O ₃ ⁻	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina izomer I	137,02442	137,02540	-0,99	/
4	5,19	C ₁₅ H ₁₉ O ₁₀ ⁻	Siringinska kiselina heksozid	359,09780	359,10210	-4,30	123,00957(34), 138,03241(100) , 153,05644(31), 167,00069(11), 182,02280(68), 197,04661(31)
5	5,86	C ₇ H ₅ O ₄ ⁻	Dihidroksibenzoeva kiselina	153,01933	153,02078	-1,44	108,02189(100) , 109,02941(63)
6	8,29	C ₇ H ₅ O ₃ ⁻	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina izomer II	137,02442	137,02504	-0,62	/
<i>Flavonoli i derivati</i>							
7	6,47	C ₃₂ H ₃₇ O ₂₀ ⁻	Kempferol 3- <i>O</i> -(6''-pentozil)heksozid-7- <i>O</i> -heksozid	741,18780	741,19360	-5,80	284,03413(15), 285,03946(12), 446,08632(13), 447,09191(5), 579,13809(100)
8	7,41	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₆ ⁻	Kvercetin 3- <i>O</i> -(6''-pentozil)heksozid	595,12990	595,13360	-3,70	271,02548(4), 300,03045(100) , 301,03490(30), 302,03702(5)
9	7,47	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	Kempferol 3- <i>O</i> -(2''-heksozil)heksozid	609,14560	609,15118	-5,58	227,03429(4), 255,03090(7), 284,03378(100) , 285,04114(78), 286,04346(14), 429,08618(5)
10	7,81	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₅ ⁻	Kempferol 3- <i>O</i> -(2''-pentozil)heksozid	579,13500	579,14102	-6,02	227,03791(3), 255,03097(7), 284,03560(100) , 285,04102(57), 429,08438(2)
11	7,82	C ₁₅ H ₉ O ₇ ⁻	Morin	301,03480	301,04021	-5,41	107,01514(42), 125,02514(18), 151,00455(100) , 161,03099(18), 179,00048(18), 245,04711(25)
12	8,09	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅ ⁻	Kempferol 3- <i>O</i> -(6''-ramnozil)heksozid	593,15060	593,16048	-9,88	241,00505(6), 255,03097(5), 284,03436(52), 285,04180(100) , 286,04569(19)

13	8,22	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₄ ⁻	Kempferol 3-O-(2''-pentozil)pentozid	549,12440	549,12934	-4,94	227,03376(3), 255,03078(7), 284,03412(100) , 285,03978(38), 399,07361(2), 417,08473(2)
14	8,49	C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄ ⁻	Kempferol 3-O-(6''-malonil)heksozid	533,09310	533,09846	-5,36	255,03155(7), 257,03518(3), 284,03383(90), 285,04103(100) , 449,15278(4), 489,10602(6)
15	9,43	C ₁₅ H ₉ O ₇ ⁻	Kvercetin	301,03538	301,03895	-3,57	107,01405(44), 121,03010(45), 151,00383(100) , 178,99977(19)
16	10,24	C ₁₅ H ₉ O ₆ ⁻	Kempferol	285,04046	285,04337	-2,91	151,00670(6), 185,06096(13), 211,04014(8), 229,05085(12), 239,0354(10), 285,04218(100)
17	10,45	C ₁₆ H ₁₁ O ₇ ⁻	Izoramnetin	315,05103	315,05391	-2,88	151,00379(43), 227,03459(6), 271,02699(9), 283,02285(11), 300,02797(100) , 301,03062(20)
Ostala detektovana jedinjenja							
18	6,53	C ₂₉ H ₂₃ O ₁₉ ⁻	Elagitandin derivat	675,08340	675,0906	-7,20	300,02780(3), 301,03729(9), 380,99461(37), 381,99609(8), 382,9927(3), 675,09073(100)

Tabela P2. Parametri jednačine i koeficijent korelacije (R²) standarda fenolnih jedinjenja korišćenih za kvantifikaciju primenom UHPLC Q-ToF MS analize (jedinjenja prikazana u tabelama 5.1, 5.4, 5.5, 5.6 i 5.7)

Standard	Y=a·X±b	R ²
Gentizinska kiselina	Y=1726721,3256·X+466061,0629	0,9924
Kvercetin	Y=769214,5670·X+825343,6827	0,9915

BIOGRAFIJA AUTORA

Master inž. Jovana (Milivoje) Marković rođena je 19.04.1994. godine u Aranđelovcu, Republika Srbija. Osnovnu školu završila je u Topoli, a srednje obrazovanje (Gimnazija, prirodno-matematički smer) stekla je u Aranđelovcu. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, studijski program: Prehrambena tehnologija, modul Tehnologija konzervisanja i vrenja, upisala je školske 2013/14. godine. Osnovne akademske studije završila je 2017. godine, sa opštim uspehom 9,85 i ocenom 10 na završnom radu, pod nazivom: „Primena i značaj antioksidanata u industrijskoj proizvodnji gotove hrane“. Školske 2017/18. godine upisala je master akademske studije na istom fakultetu, studijski program: Prehrambena tehnologija, modul Prehrambeni inženjering. Sve ispite predviđene planom i programom master akademskih studija položila je sa prosečnom ocenom 10,00. Master rad, pod nazivom „Stabilnost karotenoida pri suvoj i vlažnoj toplotnoj obradi bundeve“, odbranila je 2018. godine, sa ocenom 10.

Tokom osnovnih i master akademskih studija, bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja i Fonda za mlade talente (stipendija „Dositeja“) Ministarstva omladine i sporta Republike Srbije. Školske 2016/17. godine nagrađena je za izuzetan uspeh tokom studija na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Bila je dobitnica nagrade za najboljeg diplomiranog studenta Poljoprivrednog fakulteta 2017. godine, koju dodeljuje Zadužbina „Nikola Spasić“.

Doktorske akademske studije na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program: Prehrambena tehnologija, upisala je školske 2018/19. godine. Ispite predviđene planom i programom doktorskih akademskih studija položila je sa prosečnom ocenom 9,86. Kandidatkinja je angažovana na Katedri za tehnologiju konzervisanja i vrenja, Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na predmetima: Tehnologija gotove hrane i Funkcionalna svojstva hrane, na kojima izvodi laboratorijske vežbe od školske 2018/19. godine do danas. Bila je angažovana kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije na projektu: „Razvoj i primena novih i tradicionalnih tehnologija u proizvodnji konkurentnih prehrambenih proizvoda sa dodatkom vrednošću za domaće i evropsko tržište - STVORIMO BOGATSTVO IZ BOGATSTVA SRBIJE“ (evidencioni broj projekta III 46001) na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2019. godine. Od 2020. godine angažovana je na istraživanjima u okviru Ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada između Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (evidencioni broj ugovora za 2025. godinu: 451-03-137/2025-03/200116). Učesnica je strateškog projekta bilateralne naučne saradnje između Republike Srbije i Narodne Republike Kine za period 2024-2026. godine. Na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2022. godine je izabrana u zvanje istraživač-pripravnik na period od 3 godine, a potom 2025. godine u zvanje istraživač-saradnik na period od 4 godine u oblasti biotehničkih nauka, grana - prehrambeno inženjerstvo, naučna disciplina - tehnologija biljnih proizvoda, uža naučna disciplina - metode konzervisanja.

Do sada je, u saradnji sa drugim autorima, objavila 27 publikacija, od kojih 4 rada u međunarodnim časopisima (jedan u kategoriji M21a, dva u kategoriji M21 i jedan u kategoriji M23), 2 rada u nacionalnom časopisu međunarodnog značaja (kategorija M24), 20 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima (kategorija M34) i 1 saopštenje na nacionalnom naučnom skupu (kategorija M64).

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Jovana Marković

Broj indeksa: TH 180043

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Uticaj inkapsuliranog soka i liofilizovanog tropa korena i lista rena (*Armoracia rusticana* L.) na oksidativnu stabilnost i kvalitet majoneza tokom skladištenja

- 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 kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Jovana Marković

Broj indeksa: TH 180043

Studijski program: Prehrambena tehnologija

Naslov rada: Uticaj inkapsuliranog soka i liofilizovanog tropa korena i lista rena (*Armoracia rusticana* L.) na oksidativnu stabilnost i kvalitet majoneza tokom skladištenja

Mentori: prof. dr Dragana Mihajlović i prof. dr Viktor Nedović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora 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:

Uticaj inkapsuliranog soka i liofilizovanog tropa korena i lista rena (*Armoracia rusticana* L.) na oksidativnu stabilnost i kvalitet majoneza tokom skladištenja

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala 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 odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
- ③ 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
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.