



UNIVERZITET U NIŠU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET U LESKOVCU



**Valentina M. Simić**

**OPTIMIZACIJA MIKROTALASNE  
EKSTRAKCIJE POLIFENOLNIH  
JEDINJENJA IZ PLODA ARONIJE  
(*Aronia melanocarpa* L.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Leskovac, 2018.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF TECHNOLOGY



**Valentina M. Simić**

**OPTIMIZATION OF MICROWAVE-  
ASSISTED EXTRACTION OF  
POLYPHENOLIC COMPOUNDS FROM  
CHOKEBERRIES (*Aronia melanocarpa* L.)**

DOCTORAL DISSERTATION

Leskovac, 2018.

## Подаци о докторској дисертацији

Ментор:	др Ивана Карабеговић, доцент Универзитет у Нишу, Технолошки факултет у Лесковцу
Наслов:	Оптимизација микроталасне екстракције полифенолних једињења из плода ароније ( <i>Aronia melanocarpa</i> L.)
Резиме:	<p><i>Aronia melanocarpa</i> (црна аронија) представља један од најбогатијих биљних извора полифенола, углавном антоцијана који обезбеђују високу антиоксидативну активност. У циљу проналажења техника и услова екстракције који ће омогућити добијање екстракта ароније са максималним садржајем полифенолних једињења, плодови ароније екстраховани су применом микроталаса под различитим условима (микроталасне снаге, концентрације етанола, екстракционог времена). Статистичким методама (метода одзивних површина и метода вештачке неуронске мреже у комбинацији са генетичким алгоритмом) процењени су појединачни и комбиновани утицаји процесних параметара и предложени оптимални и економски најисплатљивији услови екстракције у циљу добијања екстракта са максималним садржајем полифенолних једињења и антиоксидативном активношћу. Формулација кекса на бази пшеничног и хељдиног брашна уз додатак уситњеног плода, сока или екстракта ароније добијеног под оптималним условима, води побољшању конвенционалних рецептура и производњи функционалних брашно-кондиторских производа.</p>
Научна област:	Технолошко инжењерство
Научна дисциплина:	Прехрамбено инжењерство
Кључне речи:	Микроталасна екстракција, аронија, полифенолна једињења, оптимизација, метода одзивних површина, вештачке неуронске мреже, кекс са додатом вредношћу
УДК:	665.52.061 : 582.711.71 (043.3)
CERIF класификација:	T430 Технологија хране и пића
Тип лиценце Креативне заједнице:	CC BY-NC-ND

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor: Ivana Karabegović, PhD, assistant professor, Faculty of Technology, Leskovac, University of Niš

Title: Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from chokeberry (*Aronia Melanocarpa* L.)

Abstract: *Aronia (Aronia melanocarpa)* is one of the richest plant sources of polyphenols, mainly anthocyanins that provide a high antioxidant activity. In order to find extraction technique and conditions that will allow obtaining chokeberry extract with the maximum content of polyphenolic compounds, the microwave assisted extraction under different conditions (microwave power, ethanol concentration and extraction time) could be applied. Statistical methods (response surface methodology and artificial neural network with genetic algorithm) estimate the individual and combined effect of process parameters and proposed the optimal and most cost-effective extraction conditions which provide the highest possible content of polyphenolic compounds and antioxidant activity. The formulation of cookies based on wheat and buckwheat flour with the addition of fresh chokeberry fruits, juice or aronia extract obtained under optimum conditions leads to an improvement of conventional recipes and production of functional bakery products.

Scientific Field: Technological engineering  
Scientific Discipline: Food engineering

Key Words: microwave extraction, chokeberry, polyphenolic compounds, optimization, response surface methodology, artificial neural network, biscuits with enhanced value

UDC: 665.52.061 : 582.711.71 (043.3)

CERIF Classification: T430 Food and Beverage Technology

Creative Commons License Type: **CC BY-NC-ND**

**Autor:**

**Valentina M. Simić**, dipl. hemičar

Univerzitet u Nišu

Tehnološki fakultet u Leskovcu

**Mentor:**

**dr Ivana Karabegović**, docent

Univerzitet u Nišu

Tehnološki fakultet u Leskovcu

**Članovi komisije:**

**Prof. dr Miodrag Lazić**

Univerzitet u Nišu

Tehnološki fakultet u Leskovcu

**Prof. dr Nada Nikolić**

Univerzitet u Nišu

Tehnološki fakultet u Leskovcu

**dr Olivera Šimurina**, naučni saradnik

Naučni institut za prehrambene tehnologije u Novom Sadu

**Datum odbrane: 27. 09. 2018.**

Ova doktorska disertacija realizovana je na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, ev.br. OI 172047. Ovim putem želim da izrazim iskrenu zahvalnost svima onima koji su mi pružili pomoć i podršku tokom izrade disertacije:

- mentoru, dr Ivani Karabegović, docentu Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, neizmernu zahvalnost dugujem na formiranju ideje, pomoći u realizaciji, oblikovanju i pisanju rada kao i na razumevanju, konstruktivnim savetima i konstantnoj podršci tokom zajedničke saradnje, jednom rečiju, na stalnoj inspiraciji koju mi je, svojim nesebičnim angažovanjem, dr Karabegović pružila
- dr Miodragu Laziću, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, zahvaljujem na stručnoj pomoći i profesionalnoj podršci, kao i na ukazanom poverenju i mogućnosti da se ova disertacija realizuje u okviru Projekta pod njegovim vođstvom
- dr Nadi Nikolić, redovnom profesoru na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu i dr Oliveri Šimurini, naučnom saradniku Instituta za Prehrambene tehnologije u Novom Sadu, zahvaljujem se na ukazanoj časti prihvatanjem članstva u Komisiji, kao i na svim stručnim savetima i sugestijama
- dr Katarini Rajković, profesoru strukovnih studija na visokoj tehničko-tehnološkoj školi u Kruševcu, zahvaljujem se na angažovanju, pomoći, savetima i sugestijama prilikom primene metode veštačke neuronske mreže sa genetičkim algoritmom u optimizaciji mikrotalasne ekstrakcije ploda aronije
- dr Saši Stojičeviću, analitičaru Zdravlja Actavis u Leskovcu, posebnu zahvalnost dugujem na saradnji i nesebično pruženoj pomoći pri izradi eksperimentalne faze rada
- kolegama i prijateljima zahvaljujem se na podršci, a mojoj porodici na strpljenju i razumevanju

*Autor*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. OPŠTI DEO</b>	<b>4</b>
<i>2.1. Bioaktivna jedinjenja biljaka</i>	<b>4</b>
2.1.1. Sekundarni metaboliti biljaka	5
<i>2.2. Slobodni radikali i antioksidanti</i>	<b>7</b>
2.2.1. Slobodni radikali	7
2.2.2. Delovanje antioksidanata	8
2.2.3. Lipidna oksidacija	9
<i>2.3. Fenolni antioksidanti</i>	<b>10</b>
2.3.1. Fenolne kiseline	13
2.3.2. Flavonoidi	14
2.3.3. Stilbeni	17
2.3.4. Tanini	17
<i>2.4. Biljni izvori fenolnih antioksidanata</i>	<b>18</b>
2.4.1. Žitarice i pseudožitarice	18
2.4.2. Heljda	19
2.4.3. Voće	21
<i>2.5. Određivanje sadržaja antioksidanata i antioksidativne aktivnosti</i>	<b>24</b>
2.5.1. Određivanje sadržaja antioksidanata	24
<b>2.5.1.1. Određivanje ukupnog sadržaja polifenola</b>	<b>25</b>
<b>2.5.1.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti (in vitro)</b>	<b>25</b>
<i>2.6. Aronija</i>	<b>29</b>
2.6.1. Taksonomija i morfologija biljke	29
2.6.2. Hemijski sastav	32
2.6.3. Biološka aktivnost	35
<i>2.7. Funkcionalna hrana</i>	<b>38</b>
2.7.1. Keks kao proizvod unapređene vrednosti	41
<i>2.8. Izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz biljnih materijala</i>	<b>42</b>
2.8.1. Ekstrakcija čvrsto-tečno	42
2.8.2. Faktori koji utiču na efikasnost ekstrakcije	43
<b>2.8.2.1. Tehnološka svojstva biljnog materijala</b>	<b>43</b>
<b>2.8.2.2. Faktori koji utiču na prenos mase</b>	<b>44</b>
2.8.3. Ekstrakcija biljnog materijala	46
<b>2.8.3.1. Ekstrakcione tehnike</b>	<b>48</b>

<b>2.9. Mikrotalasna ekstrakcija</b>	<b>51</b>
2.9.1. Osnovni principi mikrotalasne ekstrakcije	53
<b>2.9.1.1. Aparatura i oprema</b>	<b>54</b>
<b>2.9.1.2. Separacija ekstrakta od iscrpljenog biljnog materijala</b>	<b>55</b>
2.9.2. Parametri koji utiču na mikrotalasnu ekstrakciju	55
<b>2.9.2.1. Izbor rastvarača</b>	<b>55</b>
<b>2.9.2.2. Odnos biljni materijal-rastvarač</b>	<b>57</b>
<b>2.9.2.3. Mikrotalasna snaga, temperatura i ekstrakciono vreme</b>	<b>58</b>
<b>2.9.2.4. Osobine uzorka i predtretman</b>	<b>59</b>
2.9.3. Primena mikrotalasne ekstrakcije	60
<b>2.10. Optimizacija procesa ekstrakcije</b>	<b>62</b>
2.10.1. Metoda odzivnih površina	64
2.10.2. Veštačke neuronske mreže	69
<b>3.1. Biljni materijal</b>	<b>77</b>
3.1.1. Određivanje sadržaja vlage	77
<b>3.2. Reagensi i hemikalije</b>	<b>77</b>
<b>3.3. Mikrotalasna ekstrakcija</b>	<b>77</b>
<b>3.4. Modelovanje i optimizacija procesnih parametara mikrotalasne ekstrakcije</b>	<b>78</b>
3.4.1. Planiranje eksperimenta	78
3.4.2. Metoda odzivnih površina (RSM)	81
3.4.3. Veštačke neuronske mreže (ANN)	82
<b>3.5. Dobijanje soka iz ploda aronije</b>	<b>84</b>
<b>3.6. Dobijanje keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde</b>	<b>84</b>
3.6.1. Priprema ekstrakata keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde	86
<b>3.7. Formulacija recepture keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde</b>	<b>86</b>
<b>3.8. Karakterizacija bioaktivnih jedinjenja</b>	<b>87</b>
3.8.1. Određivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja	88
3.8.2. Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida	88
3.8.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti (AOA)	89
<b>3.8.3.1. DPPH test</b>	<b>89</b>
<b>3.8.3.2. Određivanje redukcionog kapaciteta (Reducing power method) FRAP testom</b>	<b>90</b>
<b>3.9. Statistička obrada podataka</b>	<b>90</b>
<b>4.1. Mikrotalasna ekstrakcija</b>	<b>91</b>
4.1.1. Prinos ekstraktivnih supstanci iz ploda aronije	91
<b>4.1.1.1. Uticaj koncentracije etanola na prinos ekstraktivnih supstanci</b>	<b>93</b>
<b>4.1.1.2. Uticaj mikrotalasne snage na prinos ekstraktivnih supstanci</b>	<b>94</b>
<b>4.1.1.3. Uticaj ekstrakcionog vremena na prinos ekstraktivnih supstanci</b>	<b>95</b>
4.1.2. Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja i flavonoida u dobijenim ekstraktima ploda aronije	96



4.1.2.1. Uticaj koncentracije etanolnog rastvora	102
4.1.2.3. Uticaj ekstrakcionog vremena	105
4.1.3. Antioksidativna aktivnost dobijenih ekstrakata ploda aronije	107
4.1.3.1. Uticaj koncentracije etanola	112
4.1.3.2. Uticaj snage mikrotalasa	113
4.1.3.3. Uticaj ekstrakcionog vremena	114
<b>4.2. Optimizacija operativnih uslova mikrotalasnne ekstrakcije primenom metode odzivnih površina i metode veštačke neuronske mreže</b>	<b>116</b>
4.2.1. Modelovanje i optimizacija procesa mikrotalasnne ekstrakcije primenom metode odzivnih površina	116
4.2.1.1. Modelovanje i optimizacija operativnih uslova u cilju postizanja maksimalnog prinosa ekstraktivnih supstanci	118
4.2.1.2. Modelovanje i optimizacija operativnih uslova u cilju postizanja maksimalnog ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja i flavonoida	122
4.2.1.3. Modelovanje i optimizacija operativnih uslova u cilju postizanja maksimalne antioksidativne aktivnosti ekstrakata	128
4.2.1.4. Multikriterijumska optimizacija mikrotalasnne ekstrakcije primenom funkcije poželjnosti	134
4.2.2. Optimizacija operativnih uslova u cilju postizanja maksimalne vrednosti odzivnih veličina korišćenjem metode veštačke neuronske mreže sa genetičkim algoritmom	136
4.2.2.1. Izbor optimalnih uslova u cilju dobijanja ekstrakata sa maksimalnim vrednostima odzivnih veličina korišćenjem metode veštačke neuronske mreže	137
4.2.3. Komparacija RSM i ANN-GA metode za optimizaciju mikrotalasnne ekstrakcije ploda aronije	141
<b>4.3. Formulacija sastava keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde</b>	<b>143</b>
4.3.1. Uticaj dodatka integralnog heljdinog brašna na karakteristike keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde	144
4.3.2. Uticaj dodatka ploda aronije i heljdinog brašna na karakteristike keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde	147
4.3.2.1. Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja u keksu povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde	148
4.3.2.2. Ukupni sadržaj flavonoida u keksu povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde	154
4.3.2.3. Antioksidativna aktivnost keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde određena DPPH metodom	157
4.3.2.4. Antioksidativna aktivnost keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde određena FRAP metodom	163
4.3.3. Optimizacija formulacije keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde primenom metode odzivnih površina	168
<b>5. ZAKLJUČAK</b>	<b>177</b>
<b>6. LITERATURA</b>	<b>181</b>
<b>7. PRILOG</b>	<b>224</b>
<b>BIOGRAFIJA</b>	<b>237</b>
<b>BIBLIOGRAFIJA</b>	<b>238</b>

# 1. UVOD

Aronija (*Aronia melanocarpa* L.) je žbunasta biljka iz familije *Rosaceae* koja vodi poreklo iz istočnih delova Severne Amerike, a danas se uzgaja kao industrijska biljka u različitim delovima Evrope. Koristi se kao svež ili suvi plod, obrađen u vidu soka, sirupa, džema, čaja, likera, voćnih vina i drugih napitaka. Korišćena je u evropskoj i severnoameričkoj narodnoj medicini u lečenju skleroze, visokog krvnog pritiska i prehlade (Kulling i Rawel, 2008). Zadnjih godina postaje popularna zahvaljujući visokom sadržaju polifenolnih jedinjenja, posebno antocijana, koji joj obezbeđuju izuzetnu antioksidativnu aktivnost i povoljan uticaj kod prevencije i lečenja mnogih bolesti (Lee et al., 2014). Pozitivni zdravstveni efekti: kardioprotektivni, antimutageni, antikancerogeni, baktericidni, antivirusni, hepatoprotektivni, antidijabetesni, protivupalni, radioprotektivni i imunomodulatorni potvrđeni su mnogim istraživanjima (Kokotkiewicz et al., 2010; Kullin i Rawel, 2008; Valcheva-Kuzmanova et al., 2006), dok ni u jednom nije objavljeno bilo kakvo toksično ili neželjeno dejstvo kao posledica konzumiranja ploda aronije (Kedzierska et al., 2012).

Smatra se da su plod i proizvodi na bazi ploda aronije izuzetni izvori polifenolnih jedinjenja. Oko 25% ukupnog sadržaja polifenola su antocijani (Oszmianski i Wojdylo, 2005), od kojih su cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-arabinozid najzastupljeniji sa udelom od 64,5% i 28,9%, respektivno (Cretu i Morlock, 2014). Fenolne kiseline, uglavnom hlorogena, čine 7,5% ukupnih fenola, a potvrđeno je i prisustvo derivata kvercetina i rutina (Oszmianski i Wojdylo, 2005). Za razliku od ostalog bibočastog voća, detektovan je visok sadržaj  $\beta$ -karotena (770,6  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) i dijetalnih vlakana (5,62  $\text{g}/100\text{ g}$ ) kao i niži ukupan sadržaj organskih kiselina, uglavnom L-jabučna i limunska kiselina. Od ugljenohidratnih komponenti sok ploda aronije sadrži glukozu, fruktozu, sorbitol, a detektovani su vitamini B-kompleksa, pantotenska kiselina, vitamin C i niacin (Kulling i Rawel, 2008).

Mikrotalasna ekstrakcija je jedna od novijih tehnika ekstrakcije koja se koristi za izolovanje bioaktivnih proizvoda od interesa za prehrambenu i farmaceutsku industriju. Brojna istraživanja ukazuju na prednost ove tehnike ekstrakcije uglavnom zbog značajnog smanjenja vremena trajanja ekstrakcije (Li et al., 2011; Li et al., 2012; Karabegović et al., 2013), povećanja prinosa i većeg sadržaja bioaktivnih komponenti u dobijenim ekstraktima (Liazid et al., 2010).

Temperatura, vreme trajanja, vrsta, koncentracija i potrošnja rastvarača, odnos količine rastvarača i biljnog materijala samo su neki od faktora koji pojedinačno i/ili kombinovano utiču na efikasnost ekstrakcije. Primenom statističkih metoda u toku planiranja eksperimenta (eksperimentalni dizajn) i obrade rezultata moguće je matematičko definisanje uticaja procesnih parametara na efikasnost procesa izolovanja, kao i pronalaženje optimalnih uslova u cilju dobijanja maksimalnog prinosa željenih komponenti. Metoda odzivnih površina (Response Surface Methodology-RSM) je statističko-matematička metoda koja analizira interakcije između nezavisno i zavisno promenljivih parametara procesa, utvrđuje i rešava multivarijabilne jednačine u cilju optimizacije procesa (Karabegović et al., 2013). Veštačka neuronska mreža (Artificial Neural Network-ANN) u kombinaciji sa genetičkim algoritmom (GA) je moderna alternativa uprošćenim fizičkim modelima i može se koristiti kao sredstvo za nelinearno multivarijantno modelovanje i optimizaciju procesa (Rajković et al., 2013). Mnoge publikacije dokumentuju primenu RSM ili ANN za određivanje optimalnih ekstrakcionih uslova (Ballard et al., 2010; Li et al., 2012; Cheok et al. 2012; Karabegović et al., 2013; Rajković et al., 2013).

Savremena prehrambena industrija podrazumeva više od proizvodnje hrane koja bi samo zadovoljila osnovne nutritivne potrebe organizma, ona kao imperativ postavlja proizvodnju “nutritivno vrednijih” prehrambenih proizvoda koji pored osnovne imaju i dodatnu fiziološku funkciju unapređenja opšteg stanja organizma. Primena proizvoda biljnog porekla u prehrambenoj industriji doživljava ekspanziju poslednjih godina, posebno od kada je kao svetski trend u ishrani prisutan pojam funkcionalne hrane koja uz nutritivna ima i dokazana lekovita svojstva.

Unapređenje nutritivne i funkcionalne vrednosti keksa, koji je zbog svoje visoke hranljive i energetske vrednosti vrlo konzumiran konditorski proizvod, može se postići dodatkom novih nutritivno značajnih sirovina u tradicionalne recepture. Zahvaljujući svojoj izraženoj antioksidativnoj aktivnosti koja potiče od značajnog sadržaja polifenolnih jedinjenja i tokoferola, heljda se može koristiti kao alternativa pšeničnom brašnu u formulaciji ovih proizvoda (Šimurina et al., 2009; Filipčev et al., 2011; Torbica et al., 2012). Proteini heljde ne sadrže gluten pa je pogodna za osobe koje boluju od celijakije (Ikeda, 2002). Heljdino brašno pokazuje znatno veću antioksidativnu i antiradikalnu aktivnost u poređenju sa frakcijama mlevene pšenice (Sakač, et al., 2011) što se pozitivno odražava na nutritivnu i funkcionalnu vrednost proizvoda kod kojih je deo pšeničnog brašna zamenjen heljdinim brašnom (Filipčev et al., 2011).

Dodavanjem biljnih sirovina, koje su izvor bioaktivnih jedinjenja, tradicionalnim recepturama za pekarske i fine pekarske proizvode, dobijaju se novi funkcionalni proizvodi sa dodatkom vrednošću. Istraživanja pokazuju da se u ovakvim slučajevima postiže veći sadržaj polifenola i dijetalnih vlakana što rezultira izraženijom antioksidativnom aktivnošću ovih proizvoda, boljim senzornim karakteristikama i produžavanju roka trajanja (Sudha et al., 2007; Ajila et al., 2008; Sun-Waterhouse et al., 2010; Šarić et al., 2016).

Ciljevi ovog rada bili su:

- Ispitivanje uticaja procesnih parametara mikrotalasne ekstrakcije ploda aronije: mikrotalasne snage (300, 450 i 600 W), koncentracije etanola (25, 50 i 75%) i vremena trajanja ekstrakcije (5, 10 i 15 minuta) na prinos ekstraktivnih supstanci, ukupan sadržaj fenola, ukupan sadržaj flavonoida i antioksidativnu aktivnost određenu DPPH i FRAP metodama.
- Optimizacija operativnih uslova u cilju postizanja maksimalnog prinosa ekstraktivnih supstanci, ukupnog sadržaja fenola, ukupnog sadržaja flavonoida i antioksidativne aktivnosti, korišćenjem metode odzivnih površina i veštačke neuronske mreže u kombinaciji sa genetičkim algoritmom.
- Izbor optimalnih i ekonomski najisplativijih uslova ekstrakcije u cilju dobijanja ekstrakta sa maksimalnim sadržajem polifenolnih jedinjenja i maksimalnom antioksidativnom aktivnošću.
- Optimizacija recepture za pripremu keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde korišćenjem metode odzivnih površina u cilju dobijanja proizvoda sa većim sadržajem bioaktivnih jedinjenja.
- Ispitivanje uticaja dodavanja soka, ploda i ekstrakta aronije na krajnji sadržaj fenola, flavonoida i antioksidativnu aktivnost keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde.

## 2. OPŠTI DEO

### 2.1. *Bioaktivna jedinjenja biljaka*

Ljudska civilizacija od početka svog nastanka koristi biljke i biljne proizvode ne samo kao hranu već i kao sredstva za prevenciju, sprečavanje i lečenje bolesti ljudi i životinja. Čuvena Hipokratova (460-370 godine pre nove ere) izjava: “Neka hrana bude vaš lek, a neka je lek vaša hrana” i tradicionalni Azijski koncept “Hrana i lek su jedno” poslednjih godina postaju prihvaćeni u zapadnim zemljama kao moderan pristup zdravom i dugovečnom životu. Velikim brojem epidemioloških istraživanja kao i studijama iz oblasti nutricionizma dokazano je da su mnoga hronična oboljenja kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes i karcinomi povezani sa načinom ishrane (Jones i Jew, 2007; Peressini i Sensidoni, 2009; Jašić, 2010; Del Rio et al., 2012; Chandrasekara i Shahidi, 2015). Takođe, rizici vezani za njihovu pojavu mogu biti smanjeni konzumacijom hrane sa visokim sadržajem određenih fitohemikalija, pa tako proizvodi sa dodatnim zdravstvenim i nutritivnim vrednostima postaju paradigma u domenu poljoprivrede i prerade hrane. Savremenene naučne discipline o ishrani i proizvodnji hrane pružaju mnoštvo informacija o funkcijama i mehanizmu delovanja specifičnih bioaktivnih jedinjenja iz hrane. Promocija zdravog životnog stila, prevencija bolesti i sve veći zahtevi potrošača postavljaju prehrambenoj industriji zahtev za prevođenjem tih informacija u potrošačku stvarnost kojoj će globalni trend biti proizvodnja proizvoda ne samo sa optimalnim senzornim osobinama, već i sa povećanim nutritivnim i zdravstvenim vrednostima (Hsieh i Ofori, 2007).

Bioaktivna jedinjenja su sastojci hrane čiji značaj sa aspekta ljudskog zdravlja ne zavisi samo od njihove količinske zastupljenosti u hrani već više od njihove biološke aktivnosti i mehanizma inhibicije delovanja štetnih supstanci u organizmu. Mnogobrojna prirodna bioaktivna jedinjenja različite strukture ulaze u sastav hrane, ali ispoljavaju blagotvoran efekat na zdravlje jedino ako su konzumirana u adekvatnim količinama, u suprotnom, mogu prouzrokovati negativan zdravstveni efekat zbog izražene biološke aktivnosti u metaboličkim procesima. Iz tog razloga, Nacionalno Istraživačko Veće nacionalne Akademije nauka SAD (engl. National Research Council of the Food and Nutrition Board of the National Academy of Sciences) je na osnovu naučno dokazanih činjenica utvrdilo određene normative označene kao: preporučeni dnevni unos (engl. Recommended Dietary Allowances RDA), referentni dnevni unos (engl. Dietary

Reference Intakes DRI) i maksimalne granica unosa (Tolerable Upper Intake Level UL) (NRC, 2004; Otten et al., 2006) za većinu prirodnih bioaktivnih jedinjenja prisutinih u hrani.

Poslednjih godina mnogo naučnih publikacija posvećeno je funkcionalnoj hrani i dijetetskim suplementima i one su fokusirane ili na korisna zdravstvena svojstva određene prirodne matrice hrane (susam, čaj, začini) ili na specifična prirodna bioaktivna jedinjenja kao što su fitohemikalije. Dijetetski suplementi su proizvodi koji obezbeđuju koncentrovani oblik određenog bioaktivnog agensa iz hrane, a postavljeni su u ne-prehrambenom matriksu i koriste se sa ciljem poboljšanja zdravlja u dozama koje prevazilaze one koje bi mogle biti obezbeđene konzumacijom konvencionalne hrane. Sa druge strane, funkcionalna hrana je ona koja se konzumira kao prehrambeni proizvod, ali obezbeđuje dodatnu zdravstvenu dobrobit koja prevazilazi njenu osnovnu nutritivnu namenu (Bernal et al., 2011).

Granica između suplemenata i funkcionalne hrane nije uvek jasna, ali je glavna razlika u obliku konzumiranja: suplementi kao kapsule, pilule, tablete i drugi oblici, a funkcionalna hrana uvek u formi konvencionalne hrane (Espín et al., 2007).

Neki od termina koji su u čestoj upotrebi u kontekstu zdrave i funkcionalne ishrane su: nutrijent (supstance dobijene iz hrane koje u telu služe za stvaranje energije i strukturnih materija, za regulisanje rasta, razvoja i regeneraciju telesnih tkiva); nutrijenti bogati energijom (nutrijenti u toku čijeg metabolizma se oslobađa određena količina energije: masti, proteini i ugljeni hidrati); esencijalni nutrijenti (oni nutrijenti koji se moraju unositi hranom, jer ih organizam ne može sam sintetisati); funkcionalna hrana (hrana u koju je dodata neka komponenta sa pozitivnim uticajem na zdravlje više od konvencionalnih sirovina ili iz koje je uklonjena neka antinutritivna materija); obogaćena hrana (hrana sa dodatim prirodnim sastojcima povećanog nutritivnog i zdravstvenog efekta) (Bloch i Thomson, 1995).

### **2.1.1. Sekundarni metaboliti biljaka**

Osvrtom na poslednjih 2000 godina uviđa se da tokom čitavog ovog perioda čovečanstvo nije imalo nijedan drugi izvor lekova osim biljaka, svežih ili sušenih. Identifikovano je skoro 250 hiljada vrsta viših biljaka, od kojih 12 hiljada poseduje lekovita svojstva, ali je manje od 10% biljaka ispitano i proučeno sa fitohemijskog ili farmakološkog aspekta (Harborne et al., 1999). Ipak, iako je ovaj procenat ispitanih biljaka mali iz njih je izolovan veliki broj terapijskih

jedinjenja kao što su: alkaloidi (antipiretik kinin iz kore Peranskog drveta, antispazmolitik papaverin i narkotik morfijum iz maka), različiti glikozoidi (na primer, iz biljne vrste *Digitalis* sp. široko primenjeni kod sindroma srčane insuficijencije), biljni steroidi (koji čine bazu savremenih kontraceptiva), biljni vitamini i flavonoidi kao i veliki broj antibiotika. Sintetički aspirin dostupan je više od 100 godina, a malo je poznato da je efektivni agens aspirina najpre izolovan iz kore drveta vrbe (Nyireddy, 2004).

Prema podacima Svetske Zdravstvene Organizacije (World Health Organization, WHO) iz 1994 godine 90% svetske populacije koristi lekovito bilje za lečenje bolesti, a 81% stanovništva uopšte nema dostupnost sintetičkim lekovima. Ove činjenice ukazuju da u mnogim delovima sveta, (nerazvijene zemlje Afrike, Azije i Južne Amerike) lekovi iz biljaka imaju ozbiljan terapijski značaj koji nije dovoljno cenjen u razvijenim zemljama. U izveštaju Bayer AG Pharma Research iz 1999. godine navodi se da 90 hiljada prirodnih jedinjenja čine oko 40% ukupnih mogućih novih lekova, dok nekoliko miliona sintetičkih jedinjenja predstavljaju preostalih 60% (Nyireddy, 2004).

Biljka se, kao i svaki živi organizam, može smatrati biosintetičkom laboratorijom koja sintetiše hemijska jedinjenja kao što su biopolimeri (proteini, nukleinske kiseline, ugljeni hidrati, lipidi) koji čine primarne metabolite i imaju uticaja na strukturnu funkciju biljke i sekundarne metabolite biljke koji predstavljaju odgovor biljke na biotički i abiotički stres (Hartmann, 2007). Sekundarni metaboliti biljaka imaju višestruku ulogu u životnom ciklusu biljke. Oni štite biljku od oksidativnih procesa nastalih delovanjem faktora životne sredine kao što su svetlost (UV zračenje), vazduh, kiseonik, interakcije sa mikroorganizama, drugim biljakama i životinjama. Pored toga, sekundarni metaboliti uključeni su u obezbeđivanju svojstava fertiliteta i klijavosti polena biljke (Schijlen et al., 2004; Hidalgo i Almajno, 2017). Sekundarni metaboliti biljaka svrstani su u sledeće klase jedinjenja: alkaloidi, amini, cijanogeni glikozidi, monoterpeni, diterpeni, polifenoli, glukoinolati, neproteinske aminokiseline, fenilpropani, poliacetileni, poliketoni, seskviterpeni, tertraterpeni, triterpeni, saponini, steroli. Predpostavlja se da biljke sintetišu više od 200 hiljada različitih hemijskih jedinjenja (Wink, 2003).

Polifenolna jedinjenja kao sekundarni metaboliti biljaka u biljnim organizmima ostvaruju različite funkcije. Pored gore navedenih (zaštita od negativnih uticaja faktora sredine) vrše indirektan uticaj na rast biljke i doprinose formiranju senzornih osobina (miris, ukus, boja) biljke.

Sekundarni metaboliti biljaka nalaze primenu kao prehrambeni aditivi, mirisi, pigmenti, lekovi. Dokazano je da ove fitohemikalije poseduju širok spektar bioloških aktivnosti i daju mogućnost nekim proizvodima dobijenim iz biljaka da smanje rizik od hroničnih bolesti. Sekundarni metaboliti biljaka kao bioaktivna jedinjenja imaju manji kapacitet dejstva u poređenju sa farmaceutskim lekovima, ali ako se konzumiraju redovno i u značajnim količinama, kao deo ishrane, mogu imati primetan dugoročni fiziološki efekat (Espín et al., 2007; Zhang et al., 2011).

## ***2.2. Slobodni radikali i antioksidanti***

### **2.2.1. Slobodni radikali**

Kiseonik ( $O_2$ ) je vitalni element bez koga je život na Zemlji nezamisliv, ali u nekim svojim formama ovaj element je i toksičan. Većina štetnih efekata kiseonika posledica su formiranja radikala kiseonika kao što su: superoksid ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroperoksil ( $HOO^{\cdot}$ ), hidroksil ( $OH^{\cdot}$ ), peroksil ( $ROO^{\cdot}$ ) i alkoksil radikal ( $RO^{\cdot}$ ) koji zajedno sa neradikalnim vodonik-peroksidom ( $H_2O_2$ ), ozonom ( $O_3$ ) i singlet kiseonikom ( $O_2$ ) predstavljaju takozvane reaktivne kiseonične vrste (engl. reactive oxygen species, ROS). U reaktivne vrste azota (engl. reactive nitrogen species, RNS) spadaju azot(I)-oksid (NO), peroksinitrit ( $ONOO^{\cdot}$ ), peroksinitrat ( $OONO^{\cdot}$ ) i one se zajedno sa ROS neprestano proizvode u ljudskom organizmu kroz mnoge fiziološke procese i reakcije i izazivaju oksidativna oštećenja u ljudskim ćelijama (Denev et al., 2012). Superoksid radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) nastaje *in vivo* u fagocitnim ćelijama delovanjem NADPH oksidaze, ali i pomoću drugih enzima kao što su ksantin oksidaze i ksantin dehidrogenaze koje redukuju  $O_2$  do  $O_2^{\cdot-}$  ili autooksidacijom mnogih biomolekula poput gliceraldehida, FMNH<sub>2</sub>, FADH<sub>2</sub>, adrenalina, noradrenalina i dopamina (Kirsch, 2003). Hidroksil radikali su najjači oksidanti među ROS, a njihov izvor su u najvećoj meri reakcije Fentono-ovog tipa i metalima katalizovana Haver-Weiss ova reakcija (Martinez-Cayuela, 1995). Peroksil i alkoksil radikali su dobri oksidanti koji lako mogu "izvući" atom vodonika iz različitih biomolekula, a formiraju se raspadom organskih peroksida ili reakcijom  $O_2$  sa ugljenik centričnim radikalima.  $H_2O_2$  se neprekidno *in vivo* stvara u mnogim tkivima, a singletni kiseonik često nastaje fotosenzitivnim reakcijama. Da bi se suprotstavile napadu ROS i RNS vrsta, žive ćelije su razvile kompleksan sistem biološke odbrane pomoću enzimskih i neenzimskih antioksidnata koji prevode ROS i RNS u bezopasne vrste, a termin



antioksidant definisan je kao svaka supstanca koja u malim koncentracijama (u poređenju sa koncentracijom oksidabilnog supstrata) ima sposobnost da značajno odloži ili spreči oksidaciju supstrata (Denev et al., 2012).

### **2.2.2. Delovanje antioksidanata**

Može se reći da su antioksidanti prema mehanizmu delovanja aktivni na tri nivoa u odbrani od ROS i RNS. Preventivni antioksidanti deluju "na prvoj liniji odbrane" sprečavajući njihovo stvaranje, drugi red su takozvani antioksidanti "hvatači" ("skevindžeri" - eng. scavengers) brzo uklanjaju ROS i RNS pre napada na biološki esencijalne molekule, a na trećem nivou odbrane, razni enzimi popravljaju „oštećenja“, „čiste otpad“ i obnavljaju izgubljene funkcije ćelije. Tako se dejstvom enzima superoksid-dezmutazom superoksid radikal prevodi u kiseonik i vodonik-peroksid, a vodonik-peroksid u vodu i kiseonik enzimom katalaza. Za odbranu od delovanja peroksil, hidroksil, singlet kiseonik i peroksinitrit radikala odgovorni su antioksidanti „skevindžeri" pri čemu nema enzimskog delovanja (Huang et al., 2005). Ovi neenzimski ili egzogeni antioksidanti, kao što su vitamin C i E i veliki broj fitohemikalija (na pr. fenoli), preuzimaju značajnu ulogu kao "hvatači" oksidanata i slobodnih radikala. Ravnoteža koja *in vivo* postoji između antioksidanata i prooksidanata može biti poremećena faktorima kao što su stres, zračenje, ishrana, zagađena atmosfera, pušenje što doprinosi nastanku takozvanog oksidativnog stresa koji predstavlja fiziološko stanje i preduslov za razvoj mnogih oboljenja, čime se nameće neophodnost unosa egzogenih antioksidanata putem ishrane (Denev et al., 2012). Tako, oksidacija LDL inicira arterosklerozu koja uzrokuje kardiovaskularna oboljenja, a oksidacija DNK je osnova za pojavu mutageneza koje dovode do raznih karcenogeneza (Berliner et al., 1995).

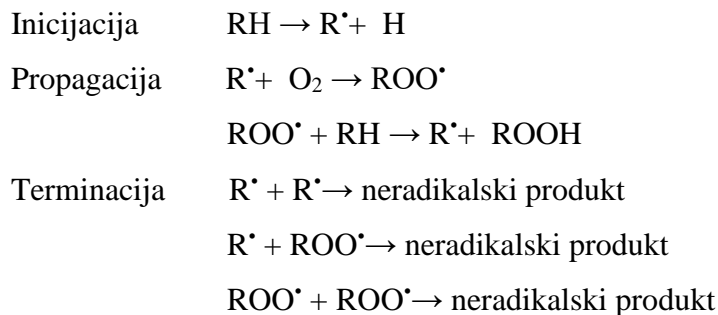
Podela antioksidanata na primarne koji predajom elektrona ili atoma vodonika radikalskim česticama vrše njihovu transformaciju u stabilnije vrste i tako odlažu ili inhibiraju oksidaciju i sekundarne koji inteziviraju delovanje primarnih antioksidanata i sprečavaju nastanak prooksidanata, bazirana je na razlici nivoa delovanja antioksidanata pri inhibiranju oksidacije (Maisuthisakul et al., 2007).

### 2.2.3. Lipidna oksidacija

Lipidna oksidacija je glavni uzrok kvarenja hrane i degradacije njenog kvaliteta u smislu stvaranja neprijatnih mirisa i ukusa, promene teksture i boje, smanjenja roka trajanja prehrambenih proizvoda i generalno, smanjenja njene nutritivne vrednosti (Alamed et al., 2009). U cilju kontrole stepena i obima lipidne oksidacije u hrani primenjene su brojne metode, ali se kao najefikasnije rešenje pokazalo dodavanje antioksidanta koji su postali neophodna grupa prehrambenih aditiva uglavnom zbog svojstva da produžavaju rok trajanja prehrambenih proizvoda bez ikakvih negativnih uticaja na njihov senzorni ili nutritivni kvalitet (Shahidi i Ambigaipalan, 2015). Antioksidanti koji se koriste u prehranbenoj proizvodnji trebalo bi da poseduju sledeće osobine (Kiokias et al., 2008):

- netoksični, jeftini i efikasni u malim koncentracijama
- visok stepen stabilnosti i mogućnost održavanja tokom procesa proizvodnje
- bez sopstvenog mirisa, ukusa ili boje
- lako inkorporiranje i dobra rastvorljivost u produktu u kome su primenjeni

Autooksidacija je primarni proces degradacije lipida u hrani i predstavlja lančanu reakciju slobodnih radikala iniciranu izlaganjem lipida svetlosti, toploti, jonizujućem zračenju, metalnim jonima ili metaloproteinskim katalizatorima kao i dejstvu enzima lipoksigenaze. Šema autooksidacije uključuje inicijaciju (nastajanje lipidnih slobodnih radikala), propagaciju i terminaciju (nastajanje neradikalnih produkata) može se prikazati na sledeći način (Shahidi i Ambigaipalan, 2015):



Primarni proizvod lipidne oksidacije je vodonik–peroksid koji iako ne utiče na kvalitet ukusa hrane, ispoljava štetne zdravstvene efekte, a kao nestabilna molekulska vrsta lako se raspada uz formiranje mnogih proizvoda kao što su aldehidi, ketoni, alkoholi ili ugljovodonici koji doprinose neprijatnom ukusu i mirisu lipida u hrani. Takođe, aldehidi mogu reagovati sa hidrogensulfidnom i amino grupom iz proteina i potencijalno uticati na njihovu funkcionalnost, a moguće je i reakcija nezasićenih aldehida sa histidinom iz mioglobina što ubrzava oksidaciju oksimioglobina (Shahidi, 1998).

Antioksidanti deluju na više različitih nivoa u oksidativnom procesu lipida tako što smanjuju koncentraciju kiseonika „presretanjem“ i inaktivacijom singletnog kiseonika, sprečavaju fazu inicijacije „hvatanjem“ inicijalnih slobodnih radikala (npr. hidroksil radikal), vezuju i time deaktiviraju katalizatore metalne jone, razgrađuju primarne proizvode oksidacije do neradikalnih hemijskih vrsta i prekidaju lančane reakcije kako bi se zaustavio stalni priliv vodonika iz substrata hrane (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

### ***2.3. Fenolni antioksidanti***

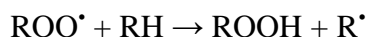
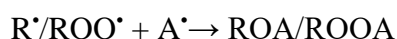
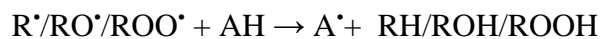
Većina antioksidanata koja se unosi putem hrane je biljnog porekla iz lekovitog bilja, žitarica, voća i povrća pri čemu njihovoj antioksidativnoj aktivnosti najviše doprinose polifenoli, vitamini C i E, karotenoidi (Harbone i Williams, 2000). Fenolna jedinjenja ili polifenoli sa više od 8000 poznatih jedinjenja predstavljaju jednu od najrasprostranjenijih klasa među jedinjenjima poreklom iz biljaka i poslednjih decenija postali su predmet istraživanja naučne javnosti zaokupivši pažnju i naučnika i potrošača, upravo zbog svojih izuzetnih antioksidativnih svojstva i pozitivnog zdravstvenog efekta (Harbone i Williams, 2000; Lee i Lee, 2006). Prirodni polifenoli su strukturno raznovrsni i variraju od jednostavnih, individualnih molekula kao što su fenolne kiseline, do visoko polimerizovanih jedinjenja kao što su proantocijanidini (tanini) (Santos-Buelga i Sacalbert, 2000). Fenolna jedinjenja imaju najmanje jedan aromatičan prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa i mogu se podeliti u zavisnosti od osnovne hemijske strukture u najmanje 10 različitih klasa, pri čemu jednu od najvažnijih klasa sa više od 5000 opisanih jedinjenja čine flavonoidi (Del Rio et al., 2012). Priroda i struktura biljnih fenola se međusobno znatno razlikuje, ali se oni uglavnom nalaze u obliku glikozida ili su esterifikovani. Pozitivni efekti na zdravlje ostvareni su preko nekoliko mehanizama delovanja polifenola: eliminacija

slobodnih radikala, zaštita i regeneracija drugih antioksidanata unetih ishranom (na primer vitamina E) i heliranje prooksidativnih metala (Rommel i Wrolstad, 1993).

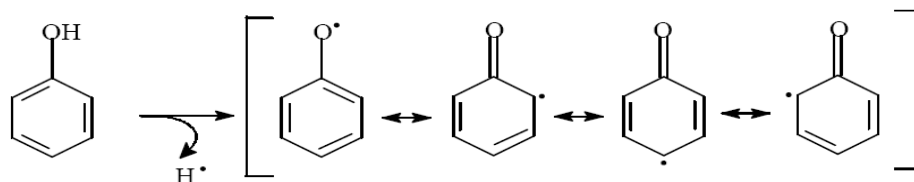
Atribut antioksidanta može se pripisati polifenolnom jedinjenju ako ispunjava sledeće uslove (Stojičević, 2012):

- Sprečava ili usporava oksidaciju substrata na kome je primenjen u maloj koncentraciji (u odnosu na sam substrat izložen oksidaciji)
- Neophodno je da novonastali radikal iz polifenola bude stabilan

Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja zavisi od broja i rasporeda hidroksilnih grupa u molekulu (Sang et al., 2002). Mehanizam delovanja zasniva se na donaciji vodonikovog atoma lipidnom radikalu pri čemu nastaju derivati lipida i antioksidativni radikali koji su stabilniji i manje skloni autooksidaciji (Kiokias et al., 2008) i u kasnijem ishodu mogu dodatno ometati lančane reakcije propagacije što se može predstaviti šematskim prikazom (Shahidi i Ambigaipalan, 2015):



Nakon doniranja atoma vodonika fenoksil radikal se stabilizuje delokalizacijom svog nesparenog elektrona unutar aromatičnog jezgra pri čemu se javlja više rezonantnih struktura prikazanih na slici 2.1 (Mišan, 2009).



Slika 2.1 Rezonantna stabilizacija fenoksil radikala

Fenolni antioksidanti mogu se prema poreklu podeliti na sintetičke i prirodne (Tabela 2.1) među kojima su najbrojniji flavonoidi (Tabela 2.2) (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

Tabela 2.1 Klasifikacija fenolnih antioksidanata

Prirodni	Fenolne kiseline	Hidroksibenzoeva i derivati	Galna, p- hidroksibenzoeva, Vanilinska, Elaginska
		Hidroksicimetna i derivati	Kafeinska, Ferulna, Sinapinska, Hlorogena
	Flavonoidi	Flavonoli, Flavoni, Katehoni, Flavanoni, Antocijanidini, Isoflavonoidi	
		Stilbeni	Resveratol
	Lignini		
	Tanini	Hidrolizabilnitanini	Elagitanini, Galotanini
		Kondenzovanitanini(proantocijanidini)	Monomeri, Dimeri, Trimeri, 4-6meri, 7-10meri, Polimeri
Sintetički	BHT, BHA, TBHQ, PG		
BHT-butilovani hidroksitoluen, BHA-butilovani hidroksianizol, PG-propilgalat i TBHQ-terc-butilhidrohinon			

Tabela 2.2 Klasifikacija flavonoida

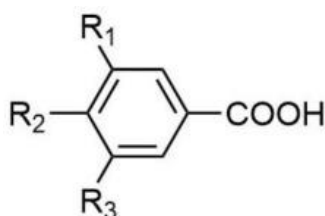
Flavonoidi					
Flavonoli	Flavoni	Flavanoli (katehini)	Flavanoni	Antocijanidini	Isoflavonoidi
Kvercentin	Apigenin	(+)-katehin	Eriodiktiol	Cijanidin	Genistein
Kamferol	Hrizin	(-)-epakatehin	Naringenin	Leukocijanidin	Daidzein
Isoramentin	Luteolin	(+)-galokatehin	Morin	Delfinidin	Glicitein
	Rutin	(-)-epigalokatehin		Prodelfinidin Leukodelfinidon	

Sintetički fenolni antioksidanti dozvoljeni zadnjih 60 godina za upotrebu u prehrambenoj industriji su: BHA-butilovani hidroksianizol (smeša izomera 2-terc-butil-4-hidroksianizola i 3-terc-butil-4-hidroksianizola), BHT-butilovani hidroksitoluen (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol),

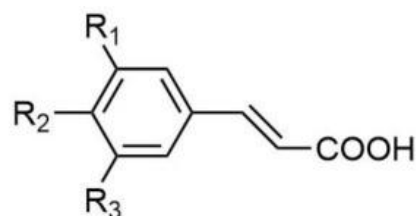
PG-propilgalat i TBHQ-terc-butilhidrohinon (Saad et al., 2007). Tržište hrane i pića povezano sa upotrebom antioksidanata ima vrednost od 500 milijardi dolara i očekivanu stopu rasta od 5-7% godišnje, a primena sintetičkih fenolnih antioksidanata u prehrambenim proizvodima strogo je regulisana uredbama vlade određene države zbog mogućih toksičnih efekata izazvanih njihovom pimenom (Shahidi i Ambigaipalan, 2015). Iako je njihova efikasnost dokazana, od nedavno je upotreba sintetičkih antioksidanata opala zahvaljujući potvrđenim kancerogenim i toksičnim svojstvima nekih od njih i opravdanoj zabrinutosti potrošača (Moure et al., 2001). Izvori prirodnih antioksidanta su pre svega različiti delovi biljaka (seme, lišće, cvet, koren, plodovi) bogati fenolnim jedinjenjima. Veliki broj naučnih istraživanja objavljen je na temu biološke aktivnosti fenolnih jedinjenja i njihove antioksidativne aktivnosti.

### 2.3.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline mogu se podeliti u dve grupe: derivati hidroksibenzoeve kiseline (hidroksibenzoeva, galna, vanilinska i elaginska kiselina) i derivati hidroksicimetne kiseline (p-kumarinska, kafeinska, ferulna, hlogena i hidroksicimetna kiselina). Osnovna strukture ovih grupacija prikazane su na slici 2.2, a supstituenti koji se mogu naći na različitim pozicijama u aromatičnom jezgru ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ) dati su u tabeli 2.3 (Hidalgo i Almajno, 2017).



Derivati hidroksibenzoeve kiseline



Derivati hidroksicimetne kiseline

Slika 2.2 Struktura fenolnih kiselina

Fenolne kiseline se u biljnom materijalu nalaze uglavnom u vezanoj formi u obliku estara ili glikozida (Jimenez-Garcia et al., 2012). Supstituenti na aromatičnom jezgru utiču na stabilizaciju pa samim tim i na antioksidativne osobine fenolnih kiselina. Zahvaljujući svom prisustvu u hrani biljnog porekla ljudi svakodnevno konzumiraju izvesnu količinu ovih vrednih bioaktivnih

jedinjenja (od 25 mg do 1g na dnevnoj bazi) u zavisnosti od zastupljenosti voća, povrća, žitarica, čaja, kafe i začina u ishrani (Clifford, 1999).

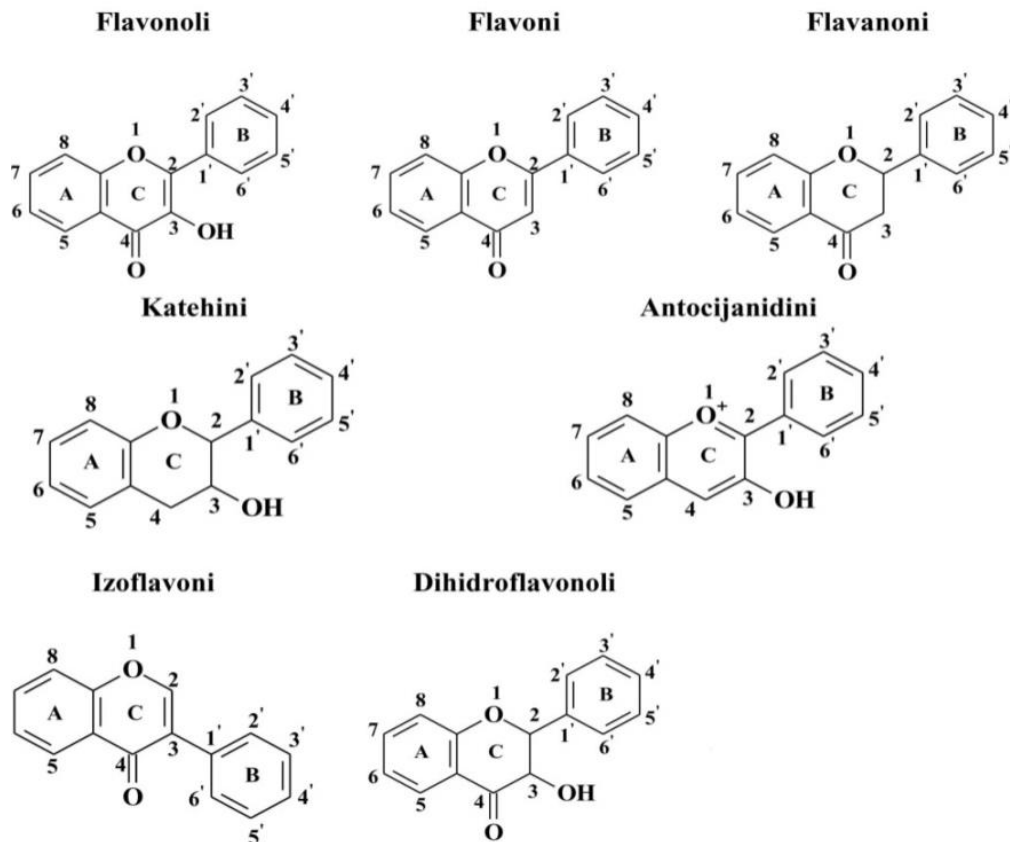
Tabela 2.3 Supstituenti derivata fenolnih kiselina

<b>Derivati hidroksibenzoevikiseline</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>Derivati hidroksicimetne kiseline</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
<b><i>p</i>-Hidroksibenzoeva</b>	H	OH	H	<b><i>p</i>-Kumarinska</b>	H	OH	H
<b>Protokatekuinska</b>	OH	OH	H	<b>Kafeinska</b>	OH	OH	H
<b>Vanilinska</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	H	<b>Ferulna</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	H
<b>Siringinska</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	<b>Sinapapinska</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
<b>Galna</b>	OH	OH	H				

### 2.3.2. Flavonoidi

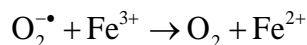
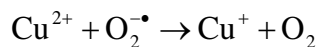
Dominantna klasa biljnih fenola su flavonoidi i oni predstavljaju oko dve trećine fenola koji se unose ishranom (Robbins, 2003). Flavonoidni derivati se strukturalno razlikuju u pogledu grupa koje okružuju heterociklični kiseonični prsten, ali svi imaju karakteristični C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> ugljenični difenilpropanenski skelet sa različitim nivoima hidroksilacije i metoksilacije (Rice-Evans et al., 1996). U odnosu na vezani šećerni ostatak dele se na aglikone koji nisu vezani za šećerni ostatak i glikozoide vezane za jednu ili više ostatka šećera (Davies i Schwinn, 2006). Najčešće vezane šećerne jedinice su ostaci glukoze, ali se od glikolizovanih šećera javljaju i galaktoza, ramnoza, ksiloza, arabinoza i rutinoza (Rice-Evans et al., 1996; Urquiaga i Leighton, 2000). Flavonoidno jezgro može biti vezano za strukturno različite ostatke tako da su flavonoidi podeljeni u sedam klasa: flavanoli, flavonoli, flavoni, antocijanidini, izoflavoni, katehini i dihidroflavonoli (Heim et al., 2002) što je prikazano na slici 2.3.

Mogućnost „hvatanja“ slobodnih radikala flavonoida povećava se stabilizacijom odnosno delokalizacijom antioksidantnog fenolnog radikala (što je omogućeno prisustvom dvostruke veze između C<sub>2</sub> i C<sub>3</sub> atoma kombinovano sa keto grupom u položaju 4) i prisustvom slobodnih hidroksilnih grupa (Heim et al., 2002). Razlog veće antiradikalske aktivnosti flavanola u odnosu na flavone proističe od prisustva većeg broja hidroksilnih grupa, posebno kada se nalazi u položaju 3 (Rice-Evans et al., 1996).



Slika 2.3 Strukture klasa flavonoida (adaptirano, Heim et al., 2002)

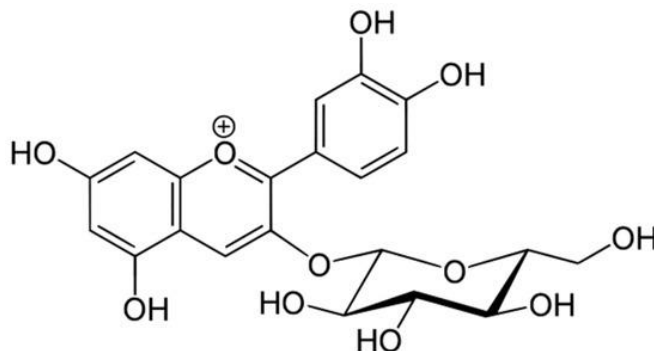
Helatni kompleksi koje flavonoidi formiraju sa jonima metala kao što su bakar i gvožđe (katalitički joni), onemogućavaju stvaranje visokoreaktivnih hidroksil radikala uključivanjem ovih metala u takozvanim Fentonovim reakcijama čiji se mehanizam može prikazati na sledeći način (Haliwel et al., 1995):



Oko 17 antocijanidina nađeno je u prirodi, a samo 6 među njima su prisutni u prehranbenim namirnicama: cijanidin, delphinidin, petunidin, peonidin, pelargonidin i malvidin (Wu et al., 2006). Antocijani su biljni pigmenti rastvorljivi u vodi, odgovorni za plavu, ljubičastu i crvenu boju mnogih biljnih tkiva. Nastaju spajanjem antocijanidina za šećernu jedinicu. U bobičastom voću



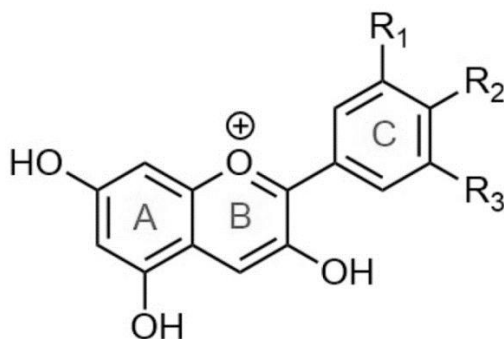
uglavnom su prisutni 3-glukozidi, a cijanidin-3-glikozid (Slika 2.4) je najzastupljeniji. Flavilijum (2-fenilhromenilijum) jon je osnova antocijanidina, a razne hemijske grupe supstituisane na različitim pozicijama (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>) formiraju ova jedinjenja u prirodi. Struktura ovog jona prikazana je na slici 2.5 dok su različiti supstituenti antocijanidina uglavnom prisutnih u bobičastom voću dati u tabeli 2.4 (Hidalgo i Almajno, 2017).



Slika 2.4 Struktura cijanidin-3-glikozida (Hidalgo i Almajno, 2017).

Tabela 2.4 Supstituenti antocijanidina prisutnih u bobičastom voću

Antocijanidin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Pelargonidin (Pg)	H	OH	H
Cijanidin (Cy)	OH	OH	H
Delfinidin (Dp)	OH	OH	OH
Peonidin (Pn)	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Petunidin (Pt)	OCH <sub>3</sub>	OH	OH
Malvidin (Mv)	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>



Slika 2.5 Struktura flavilijum jona

Preporučeni dnevni unos flavonoida putem ishrane je preko 100 mg (vrednost koja je približna zbiru preporučenih dnevnih unosa drugih antioksidanata kao što su  $\beta$ -karoten, vitamin C i vitamin E) što govori u prilog činjenici da flavonoidi imaju izuzetno pozitivan uticaj na zdravlje. Na osnovu sprovedenih istraživanja utvrđeno je da ispoljavaju antilipoperoksidatno, antitumorno, antiishemijsko, antialergijsko i antiinflamatorno delovanje. Jedan od dokaza pozitivnog dejstva je i takozvani „francuski paradoks“ odnosno pojava da stanovnici nekih regija Francuske, iako svojstvenom ishranom unose veliku količinu masti, manje oboljevaju od koronarnih bolesti srca zahvaljujući redovnoj konzumaciji crvenog vina koje sadrži visok nivo flavonoida (približno 200 mg po čaši) i resveratrola (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

### **2.3.3. Stilbeni**

Trans-resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) i njegov glukozid najznačajniji je predstavnik stilbena sa potvrđenim pozitivnim zdravstvenim dejstvima kao što su antioksidativna i antikancerogena aktivnost (Burns et al., 2002; Torres et al., 2010). Najvažniji resveratrol u biljkama je trans-resveratrol-3-O- $\beta$ -glukozid poznat i kao polidatin, odgovoran za odbranu biljke od raznih oštećenja (Jensen et al., 2010), a najznačajniji stilben poreklom iz hrane je resveratrol iz crvenog vina i kikirikija (Burns et al., 2002).

### **2.3.4. Tanini**

U odnosu na hemijsku strukturu, tanini mogu biti hidrolizabilni tanini ili kondenzovani tanini-proantocijanidini. Hidrolizabilni tanini su prisutni uglavnom u obliku glikozilovane galne kiseline, dok su kondenzovani tanini ologomeri i polimeri flavonoida, posebno flavan-3-ola (Khanbabaee i van Ree, 2001). Glavni izvori proantocijanidina su plodovi voća, posebno jagoda, kakao, čaj i neka pića kao vino ili pivo, dok se hidrolizabilni tanini mogu naći u jagodama, mahunarkama i lisnatom povrću (Serrano et al., 2009). *In vitro* ispitivanjima je potvrđeno da tanini inhibiraju peroksidaciju lipida i dejstvo lipoksigenaze, a takođe pokazuju antiradikalno delovanje prema hidroksil, superoksid i peroksid radikalima odgovornim za prooksidantno delovanje; utiču na rast bakterijske flore u smislu inhibicije; značajno inhibiraju citopatogene efekte HIV virusa; ispoljavaju antiproliferativno dejstvo u odnosu na različite tipove ćelija karcinoma (dojke, prostate, debelog creva i melanoma) (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

## ***2.4. Biljni izvori fenolnih antioksidanata***

Fenolna jedinjenja sa potvrđenom antioksidativnom aktivnošću nalaze se u većoj ili manjoj meri u velikom broju biljnih vrsta. Značajniji izvori ovih prirodnih bioaktivnih jedinjenja su voće (grožđe, trešnja, jabuka, kajsija, nar, citrusno voće), a posebno bobičasto voće (borovnica, kupina, crna ribizla, malina, brusnica, aronija), povrće (šargarepa, beli luk, krompir, cvekla, špargla, celer, zelena salata, spanać, paradajz), žitarice (pšenica, ječam, ovas, pirinač, raž), pseudocerealijske kao što je heljda, leguminoze, uljarice (soja, uljana repica, seme lana, seme susama, seme pamuka, maslina), koštunjavo voće (orah, badem, lešnik, indijski orah, kikiriki, pistači, pekan orah, kesten), čaj, kafa, kakao, začinsko i lekovito bilje (ruzmarin, žalfija, karanfilić, đumbir, crni biber, origano, kurkuma, seme peskavice) (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

### **2.4.1. Žitarice i pseudožitarice**

Fenolne kiseline i flavonoidi nalaze se u žitaricama u slobodnom i konjugovanom obliku, ali je najveća koncentracija ukupnih fenola prisutna u spoljašnjim slojevima zrna (ljuska, perikarp, semenica, ćelije aleurona) za razliku od znatno nižeg sadržaja ovih jedinjenja u unutrašnjim slojevima odnosno u endospermu (Kahkonen et al., 1999; Liyana-Pathirana i Shahidi, 2006). Ekstrakti zrna pšenice ispoljili su jako antioksidativno dejstvo zahvaljujući fenolima pšenice odnosno njihovoj antiradikalnoj aktivnosti i reakcijama heliranja metala. Nađeno je da zrna pšenice sadrže veliki broj fenolnih jedinjenja kao što su ferulna, vanilinska, kafeinska, siringinska, p-kumarinska i sinapinska kiselina, ali da nijedno od njih ne doprinosi u većoj meri antioksidativnoj aktivnosti proizvoda od pšenice. Ferulna kiselina bila je najdominantnija sa sadržajem od 90% ukupnih fenolnih kiselina (Liyana-Pathirana i Shahidi, 2005, 2006). Ukupan sadržaj fenola i antioksidativna aktivnost (određena DPPH i FRAP testom) nekih žitarica i heljde data je u tabeli 2.5.

Tabela 2.5 Ukupan sadržaj fenola i antioksidativna aktivnost nekih žitarica i heljde (adaptirano Đorđević et al., 2010)

Žitarica	Ukupan sadržaj fenola (mg galne kiseline/g suvog ekstrakta)	DPPH (IC <sub>50</sub> ) (μg/ml)	FRAP (nmol Fe <sup>2+</sup> /mg suvog ekstrakta)
Ječam	16,4	>200	15,56
Heljda	50,7	76,7	49,43
Pšenica	16,2	>200	12,15
Pirinač	13,2	>200	8,94

#### 2.4.2. Heljda

Sve veća potražnja svetskog tržišta za bezglutenskim proizvodima na bazi žitarica istakla je značaj nekih pseudožitarica kao što su amarant, kinoa i heljda, a karakterišu se izvrsnim nutritivnim profilom. Tako su brojna istraživanja, u skladu sa rastućim trendom, fokusirana na formulaciji kvalitetnih, zdravih bezglutenskih proizvoda (hleba, testenina, keksa itd.) jer bi njihova dostupnost osigurala adekvatni unos nutrijenata osobama obolelim od celiakije (Alvarez-Jubete et al., 2010a). Heljda, dodata hrani može obezbediti povoljne zdravstvene efekte i sprečiti oksidaciju hrane tokom procesa obrade i skladištenja, a istovremeno doprineti unapređenju funkcionalnosti proizvoda (Lin et al., 2009).

Heljda (*Fagopyrum esculentum Moench*) je pseudožitarica koja pripada porodici *Polygonaceae*, a poreklom je iz Kine. Kao kultivisana biljka gaji se u celom svetu zbog svoje visoke nutritivne vrednosti (Choy et al., 2013). Takođe, može se smatrati jednim od najznačajnijih alternativnih useva pogodnih za organski uzgoj bez upotrebe veštačkih đubriva i pesticida (Bonafaccia et al., 2003b). Heljda se u vidu heljdinog brašna i kroz različite proizvode (nudle, špagete, palačinke itd.) koristi u Kini, Japanu, Rusiji, Tajvanu, Centralnoj i Istočnoj Evropi (Holasova et al., 2002; Lin et al., 2009). Iako nije žitarica, heljda se obično svrstava u žitarice zbog sličnosti u načinu gajenja i glavne nutritivne vrednosti koja je slična onoj kod žita. Poseban značaj heljde je u tome što ne sadrži gluten (Nikolić et al., 2011).

Povoljan sadržaj i odnos amino kiselina u proteinima heljde uglavnom potiče od relativno visokog sadržaja lizina i arginina (Watanabe, 1998; Bonafaccia et al., 2003a), esencijalnih mineralnih materija (Stadman et al., 2001), mikroelemenata (Bonafaccia et al., 2003b), selena

(Stibilj et al., 2004) kao i skroba, prehrambenih vlakana, vitamina B1, B2 i C (Watanabe, 1998; Bonafaccia et al., 2003a; Skrabanja et al., 2004) koji čine heljdu i njene proizvode poželjnom prehrambenom sirovinom.

Flavonoli, rutin, hiperin, kvercetin i kvercitrin kao i flavoni, viteksin, izoviteksin, orijentin i izoorijentin izolovani su iz nezrelog semena heljde (Guo et al., 2012; Luo et al., 2014), a samo šest flavonoida je identifikovano u zreloom semenu i njegovoj ljusci (rutin i isoviteksin su izolovani iz zrna dok su u ljusci nađeni rutin, kvercentin, viteksin, izoviteksin, orijentin i izoorijentin). Četiri derivata katehina, većinom (-)-epikatehin, (+)-katehin-7-O- $\beta$ -D-glukopiranozid, (-)-epikatehin-3-O-(3,4-O-metil)galat i (-)-epikatehin-3-O-p-hidroksibenzoat nađena su u ekstraktu heljdinog griza (Dietrych-Szostak i Oleszek, 1999). Kondenzovani tanini heljde sačinjavaju smešu proantocijanidina sa različitim nivoima polimerizacije (Watanabe et al., 1997).

Fenolna jedinjenja heljde poseduju izuzetnu antioksidativnu aktivnost, znatno veću u odnosu na pšenicu, ječam ili ovas (Halosava et al., 2002; Sensoy et al., 2006; Đorđević et al., 2010; Wronkowska et al., 2010; Reni Sun, 2014). Pri ispitivanju antioksidativnih svojstava metanolnih ekstrakata amaranta, kinoa, heljde i pšenice nađeno je da je sadržaj ukupnih fenola u heljdi najveći i opada u nizu: heljda>kinoa>pšenica>amarant, a takođe i antioksidativna aktivnost određivana DPPH testom (Alvarez-Jubete et al., 2010).

Poređenjem sa većinom žitarica, povrća pa čak i voća, heljda sadrži više rutina (kvercentin-3-rutinozid) zahvaljujući kome ispoljava antioksidativno, antiinflamatorno i antikancerogeno dejstvo, a utvrđeno je da utiče na smanjenje krhkosti krvnih sudova (hemoragična bolest) i hipertenzije (Oomah i Maza, 1996; Watanabe et al., 1997). Potvrđeno je da antioksidativna jedinjenja heljde poseduju antimikrobnu aktivnost, pa se shodno tome može smatrati agansom za sprečavanje delovanja mikotoksičnih patogena u hrani (Chitarrine et al., 2014). Prisustvo prirodnih antioksidanata heljde u hrani sprečava lipidnu peroksidaciju čime se produžava njen rok upotrebe i skladištenja bez značajnijih hemijskih promena (Dietrych-Szostak i Oleszek, 1999).

Heljda ima svojstvo funkcionalne hrane i kao takva pogodan je sastojak prehrambenih proizvoda koji pretenduju da ponesu ovaj atribut, a posebno je primenjiva kao važna sirovina u pekarskim proizvodima koji predstavljaju proizvode velikog značaja u odnosu na činjenicu da ih svakodnevno konzumira većina svetskog stanovništva (Holasova et al., 2002)

U radu Sedej i saradnika (2011b) ispitivana je antioksidativna aktivnost i reološke osobine frakcija mlevenja pšenice i heljde, gde je dokazano da heljdina brašna ispoljavaju znatno veće antioksidativno dejstvo u odnosu na brašna dobijena mlevenjem pšenice. Jedino je helatna aktivnost pšeničnog brašna bila veća. Sposobnost ekstrakta ovih proizvoda mlevenja da neutrališu DPPH radikale imala je opadajući trend: integralno heljdino brašno>belo heljdino brašno>pšenične mekinje>integralno pšenično brašno>brašno tip 850>brašno tip 500>brašno tip 400. Heljdina brašna, posebno integralno heljdino brašno, imala su znatno veći sadržaj fenola u poređenju sa ostalim frakcijama zahvaljujući prisustvu perikarpa i aleuronskih slojeva bogatih antioksidativnim komponentama (Sedej et al., 2011b). Takođe, utvrđeno je da se supstitucija pšeničnog brašna heljdinim brašnom u procentnom udelu od najmanje 5% može smatrati mešavinom dobrog kvaliteta. Ovakve mešavine, između ostalog, poseduju visok stepen absorpcije vode, maksimalni viskozitet testa i dužu stabilnost u odnosu na pšenično brašno (Nikolić et al., 2011). Supstitucijom belog brašna heljdinim brašnom sa udelom od 15% u formulaciji hleba unapređene funkcionalne vrednosti povećava se antioksidativna aktivnost ovog finalnog proizvoda zbog povećanog sadržaja rutina i kvercentina unetih dodatkom heljdinog brašna (Lin et al., 2009). Rezultati ispitivanja ukazuju da dodavanje heljdinog brašna kao prirodnog izvora bioaktivnih komponenti i faktora koji utiče na formiranje optimalne strukture testa u formulaciji bezglutenskog hleba poboljšava njegove senzorne osobine (Wronkowska et al., 2010). Heljda je aplicirana i u drugim proizvodima kao što su testenine, hleb, palačinke od više vrsta žita, instant nudle (Choy et al., 2013), medenjaci unapređenog sastava dodatkom heljde (Filipčev et al., 2011). Bezglutenski krekeri na bazi heljdinog brašna uspešno promovišu upotrebu heljde jer predstavljaju proizvod široke potrošnje i masovne proizvodnje, a i pored toga što sadrže visok procenat masti (do 30%), prirodni antioksidanti heljde inhibiraju peroksidaciju lipida i sprečavaju proces kvarenja tokom obrade i sladištenja (Sedej, 2011a)

### **2.4.3. Voće**

U najvećoj meri antioksidanti prisutni u voću su polifenoli, uglavnom flavonoidi (u obliku estra i glikozida), vitamini A, B, C i E i u manjoj meri karotenoidi (Lim et al., 2007). Utvrđeno je da sadržaj flavanola šljive, jabuke, breskve, jagode iznosi 70-370mg/100 g suvog ostatka, dok su niže vrednosti od oko 4 mg/100 g suvog ostatka nađene kod avokada, banane i kruške (Garcia-

Alonso et al., 2004). Ispitivanjem pojedinih vrsta voća dokazano je da je najveći sadržaj fenola prisutan kod brusnice, jagode, crnog grožđa, borovnice, šljive i belog grožđa (158,8; 72,3; 63,7; 62,0; 58,2 i 52,3  $\mu\text{mol/g}$  suvog ostatka, respektivno), dok je citrusno voće imalo vrlo nizak sadržaj fenola i to limun 19,6 i narandža 18,9  $\mu\text{mol/g}$  suvog ostatka (Vinson et al., 2001). Generalno, antioksidativna aktivnost voćnih ekstrakata bila je veća nego antioksidativna aktivnost individualnih vitamina i većine fenola što ukazuje na postojanje sinergijskog delovanja smeše antioksidativnih jedinjenja iz voća. Ispitivanja su pokazala da osobe koje redovno konzumiraju sveže ili sušeno voće u znatno manjoj meri oboljevaju od gojaznosti, dijabetesa tipa 2, kardiovaskularnih bolesti, različitih tipova karcinoma i drugih hroničnih bolesti (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

Aronija, kao i jagoda, malina, borovnica, kupina, brusnica, ribizla i dud su neke od vrsta bobičastog (jagodičastog) voća ili "crvenog voća" što je zajednički naziv koji se primenjuje za sitne, male voćne polodove koji rastu u grmovima, imaju sladak ili gorak ukus i intenzivno su obojeni, uglavnom crveno, plavo ili ljubičasto. Koriste se celi plodovi jer semenke unutar njih ne otežavaju njihovu konzumaciju niti negativno utiču na senzorne osobine ploda. I pored toga što sadrži visok nivo šećera, bobičasto voće ima relativno malu kalorijsku vrednost (od 136 do 240 kJ/100 g voća za jagodu i borovnicu, respektivno), mali sadržaj masti, ali veliku količinu prehrambenih vlakana (celuloza, hemiceluloza, pektin), a od organskih kiselina, limunsku, jabučnu, vinsku, oksalnu i fumarnu (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

Bobičasto voće je jedan od najbogatijih izvora fenolnih antioksidanata, kojih u ovim plodovima ima i do 4 puta više nego u plodovima ostalog voća, do 10 puta više nego u povrću ili žitaricama (Sun et al., 2001; Halvorsen, et al 2002). Prilikom ispitivanja ćelijske antioksidativne aktivnosti više vrsta bobičastog voća, utvrđeno je da su divlja borovnica, kupina, malina i kultivisana borovnica imale znatno veću vrednost merenog parametra u poređenju sa bananom i dinjom koje su imale najmanju vrednost (Wolfe et al., 2008). U nekim publikacijama navode se primeri dobre korelacije antioksidativne aktivnosti merene DPPH testom i ukupnog sadržaja antocijana iz ekstrakata antocijanima bogatog voća (Espín et al., 2000; Jakobek et al., 2007). Zbog visokog sadržaja polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti koje ispoljava, potrošnja bobičastog voća u celom svetu je znatno povećana, a upotreba se proširila ne samo na konzumiranje svežih plodova veći i na primenu u dijetetskim suplementima i kozmetičkim preparatima (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

Trend u savremenoj pekarskoj industriji je širenje asortimana pekarskih proizvoda u pravcu proizvodnje dijetetskih i funkcionalnih proizvoda koji mogu naći primenu u prevenciji nutritivnih nedostataka važnih hranljivih materija u ishrani. Ovaj zahtev ostvaruje se dodatkom svežeg ili sušenog (u obliku praha ili usitnjenog) voća, kao i voća u formi pirea, kaša, soka ili ekstrakata tradicionalnim ili već postojećim recepturama.

Dodatak sušenog voća doprinosi povećanju sadržaja vitamina, K, Ca, Fe i prehrambenih vlakana u finalnom proizvodu. Tako, dodavanjem 10% sprasenog sušenog voća (prethodno osmatki dehidriranog u melasi) ili 30% osmatki dehidriranog u melasi, usitnjenog i sušenog voća u formulaciji za hleb unapređene vrednosti, sadržaj K i Ca povećan je 4-25 puta, sadržaj Fe 28% (dodatkom sušene brusnice) i 2,4 puta (dodatkom sušene jabuke), sadržaj prehrambenih vlakana je skoro dupliran (dodatkom sušene jabuke i šipka) (Filipčev, 2009). Čak su i nus-proizvodi odnosno sporedni proizvodi koji nastaju pri preradi voća našli primenu u pekarskoj industriji: uključivanje sprasene kore manga u formulaciju biskvita (Ajila et al., 2008), keks sa dodatkom pulpe narandže (Larrea et al., 2005), mafini sa dodatkom sprasene kore jabuke (Rupasinghe et al., 2008). Uključivanjem taloga nastalog ceđenjem soka jabuke u formulaciju kolača, sadržaj prehrambenih vlakana u kolaču povećan je za 36,8% a istovremeno je izbegnuta upotreba sintetičkih pojačivača ukusa jer je ovaj nus-proizvod prerade jabuke doprino prijatnom voćnom ukusu kolača (Sudha et al., 2007). Ova hranljiva masa ostatka jabuka bogata prehrambenim vlaknima i značajnim količinama fenolnih antioksidanata korišćena je u formulaciji ekstrudiranog flipsa i keksa, gde je sa povećanjem udela dodatka nus-proizvoda prerade jabuke od 0 do 30% značajno rastao i sadržaj prehrambenih vlakana, fenola i antioksidativna aktivnost ovih proizvoda (Reis et al., 2012). U radu Parimita i saradnika (2015) voćne pločice na bazi pulpe jabuke i banana pripremane sa variranjem udela dodatih omega-3 masnih kiselina, pokazano je da dodatak omega-3 masnih kiselina sa udelom od 1% daje finalni proizvod sa najboljim organoleptičkim i fizičko-hemijskim osobinama i antioksidativnom aktivnošću (Parimita et al., 2015). Takođe, mnogobrojni su primeri uspešno realizovane primene nus-proizvoda prerade šargarepe u finalnim proizvodima kao što su hleb, kolači, salatni prelive i funkcionalna pića (Bellur Nagarajaiah i Prakash, 2015).



## ***2.5. Određivanje sadržaja antioksidanata i antioksidativne aktivnosti***

Određivanje sadržaja antioksidanata i antioksidativne aktivnosti neophodno je u kontekstu komparacije nutritivnih i funkcionalnih vrednosti sastojaka hrane, namirnica i komercijalnih prehrambenih proizvoda kao i u kontekstu obezbeđenja određenih regulativa i standarda kvaliteta koji se tiču zdrave ishrane.

Pri određivanju antioksidativne aktivnosti hrane jedan pristup proističe iz hemije hrane odnosno određivanja vrste i količine antioksidanata u hrani, a drugi pristup tiče se biološko-medicinskog aspekta odnosno određivanja biološkog dejstva antioksidanata iz hrane i njihove biodostupnosti (bioraspoloživosti) (Roginsky i Lissi, 2005).

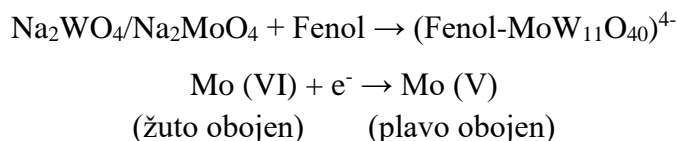
Određivanje antioksidativne aktivnosti *in vivo* uslovljeno je delovanjem mnogih faktora, a jedan od njih je biodostupnost antioksidanata koja se u velikoj meri razlikuje među različitim fenolnim jedinjenjima. Tako, na primer kod polifenola aronije, katehin i kvercentin su u većoj meri apsorbovani od antocijana čija je izmerena koncentracija u plazmi oglednih životinja bila vrlo niska (Matsumoto et al., 2001). Za ostvarenje svoje efikasne biološke aktivnosti i funkcije, antioksidant mora biti apsorbovan, transportovan, distribuiran i zadržan u biološkim tečnostima, ćelijama i tkivima kao što su plazma, eritrociti, urin, pljuvačka, suze, cerebrospinalna tečnost ljudi i eksperimentalnih životinja. Jedan od parametra biodostupnosti je koncentracija ključnih bioaktivnih metabolita u plazmi i tkivima i on obezbeđuje uspostavljanje korelacije između unosa polifenola i potencijalnih efekata na zdravlje (Denev et al., 2012).

### **2.5.1. Određivanje sadržaja antioksidanata**

Određivanje sadržaja antioksidanta može se vršiti hromatografskim metodama među kojima su najširu primenu našle: tečna hromatografija visokih performansi HPLC (engl. High Performance Liquid Chromatography) sa ultravioletnim (UV) detektorom i detektorom sa nizom dioda (Diode-Array-Detector DAD), masena spektroskopija ili različite rutinske i manje specifične spektrofotometrijske metode (Hidalgo i Almajano, 2017).

### 2.5.1.1. *Određivanje ukupnog sadržaja polifenola*

Za određivanje ukupnog sadržaj polifenola (engl. Total Polyphenol Content, TPC) može se koristiti kolorimetrijska spektrofotometrijska metoda sa Folin-Ciocalteu reagensom koji sadrži kompleks fosfomolibdata/fosfotungstata u vrlo baznoj sredini (5-10% rastvor natrijum-karbonata). Reakcija je zasnovana na transferu elektrona iz fenolnog jedinjenja dok se merenje absorbance plavoobojenog kompleksa vrši na maksimalnoj talasnoj dužini od 750 nm (Bessada et al., 2015). Naime, disocijacijom fenola dolazi do formiranja protona i fenoksidnog jona koji vrši redukciju Folin-Ciocalteu reagensa do jona (Fenol-MoW<sub>11</sub>O<sub>40</sub>)<sup>4-</sup> plave boje (Mišan, 2009):

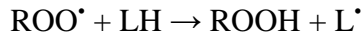
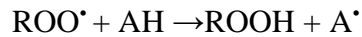


Folin-Ciocalteu metoda bazirana je na merenju redukujućeg kapaciteta polifenolnih jedinjenja na osnovu opisane redoks reakcije pa zato, pored određivanja ukupnih fenola, može biti i metoda za merenje ukupne antioksidativne aktivnosti prirodnih proizvoda (Prior et al., 2005). Originalna metoda je opisana u radu Singelton i Rossi (1965), a jedan od glavnih nedostataka metode je neselektivnost jer reagens može biti redukovan, osim fenolima, i drugim prisutnim jedinjenjima. Dobijeni rezultati mogu biti viši od vrednosti dobijenih HPLC analizom (za 4,5-24%) usled ometanja prisustvom drugih redukujućih supstanci kao što su redukujući šećeri, Cu(I), Fe(II), askrobinska kiselina (Tsao i Yang, 2003; Bessada et al., 2015).

### 2.5.1.2. *Određivanje antioksidativne aktivnosti (in vitro)*

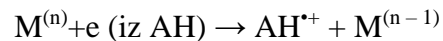
Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti mogu se prema mehanizmu reakcije klasifikovati u dve grupe (Prior et al., 2003):

- Metode koje se zasnivaju na reakcijama transfera vodonikovog atoma (engl. Hydrogen atom transfer, HAT). Vrši se prenos atoma vodonika slobodnom radikalu iz supstance koja deluje kao antioksidant uglavnom u nejonizujućim rastvaračima, odnosno dešava se konkurentna reakcija između antioksidanta i supstrata u odnosu na sintetički generisane slobodno radikalne čestice (Huang et al., 2005):



Ovoj grupi metoda pripadaju:

- ORAC (oxygen radical absorbance capacity) test: kapacitet absorpcije kiseoničnih radikala i
  - TRAP (total radical trapping antioxidant parameter) test – parametar koji definiše ukupnu sposobnost hvatanja radikala
- Metode koje se zasnivaju na reakcijama primopredaje elektrona (engl. Single Electron Transfer, SET). Određuje se kapacitet potencijalnog antioksidanta da otpusti elektron i redukuje prisutne oksidante (radikale, metale ili karbonilne vrste) pri čemu se pri redukciji menja boja oksidanta, a stepen promene boje funkcija je koncentracije antioksidanta iz ispitivanog uzorka (Huang et al., 2005):



Ovoj grupi metoda pripadaju:

- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) test
- FRAP (ferric ion reducing antioxidant parameter)-parametar koji određuje mogućnost antioksidanta da redukuje  $\text{Fe}^{3+}$  jon
- TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)-antioksidantni kapacitet izražen kao ekvivalent troloksa
- ABTS (2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) test
- FTC (gvožđe tiocijanat) test
- Metoda zasnovana na redukciji  $\text{Cu}^{2+}$  jona
- Metoda određivanja ukupnih fenola sa Folin-Ciocalteu reagensom

Generalno, druga grupa (SET) sastoji se od metoda kojima se meri kapacitet „hvatanja” slobodno radikalskih čestica, dok prva grupa metoda (HAT) sadrži one koje se baziraju na inhibiciji lipidne peroksidacije pa se pored navedenih ovde mogu naći (Sánchez-Moreno, 2002):

- Metoda zasnovana na izbeljivanju krocina
- Inhibicija oksidacije linolne kiseline
- Inhibicija oksidacije lipida male gustine (LDL)

Jonizacioni potencijal i energija disocijacije veze su osnovni faktori koji utiču na mehanizam reakcije (Prior et al., 2005).

Svaki od testova antioksidativne aktivnosti oslanja se na kolorimetrijsku ili fluorescentnu promenu usled neutralizacije radikala iz ispitivanog rastvora. Kolorimetrijska promena meri se spektrofotometrom na određenoj talasnoj dužini primenom DPPH, ABTS i FRAP metode, a pri realizaciji ORAC testa antioksidanti iz ispitivanog uzorka inhibiraju nestanak fluorescencije nastale reakcijom fluorescina sa peroksil radikalima. Rezultati antioksidativne aktivnosti mogu se izraziti u različitim jedinicama, tako da se DPPH vrednost obično izražava ili kao procenat inhibicije radikala (% neutralizovanih radikala u odnosu na njihovu ukupno raspoloživu vrednost) ili kao EC<sub>50</sub> (efficient concentration) što predstavlja koncentraciju antioksidanata supstrata dovoljnu da smanji početnu koncentraciju DPPH radikala za 50%. Niža vrednost EC<sub>50</sub> ukazuje na veću antioksidativnost. Rezultati ABTS i ORAC testova najčešće su dati kao μmol ili mmol Troloksa, odnosno Troloks ekvivalenata (TE) po dm<sup>3</sup>. Troloks je u vodi nerastvorni analog vitamina E koji se koristi kao referentni standardni „hvatač” radikala. FRAP test se bazira na mogućnosti elektron-donorskog antioksidanta da redukuje žuti feri kompleks (koji sadrži Fe<sup>3+</sup>) u plavi fero kompleks (koji sadrži Fe<sup>2+</sup>) a ekvivalenti Fe<sup>2+</sup> predstavljaju jedinicu izražavanja rezultata FRAP testa. U tabeli 2.6 dat je uporedni pregled karakteristika nekih od testova (Huang et al., 2005; MacDonald-Wicks et al., 2006; Denev et al., 2012; Hidalgo i Almajano, 2017).

Prilikom komparacije podataka za antioksidativnu aktivnost ekstrakata dobijenih u različitim istraživanjima treba uzeti u obzir koncentraciju ekstrakta pri kojoj je test izveden jer veća koncentracija ekstrakta uzrokuje i veće vrednosti antioksidativne aktivnosti. Takođe, za detaljno razumevanje principa delovanja neke antioksidantne supstance preporuka je primena više od jednog testa za određivanje antioksidativne aktivnosti jer upotrebljene metode obuhvataju različite aspekte antioksidativnog dejstva i pružaju širu sliku antioksidativog potencijala ispitivanog uzorka (Ciz et al., 2010).

FRAP test baziran je na potencijalu antioksidanta da redukuje Fe<sup>3+</sup> jone iz kompleksa sa TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinom) do Fe<sup>2+</sup>-TPTZ kompleksa koji je intenzivno obojen; maksimalna absorbance Fe<sup>2+</sup> kompleksa nastalog redukcijom prisutnim antioksidantom je 593 nm. Prednosti testa su što je jeftin i brz, a nedostak je nemogućnost primene u slučaju jedinjenja koja poseduju tiolnu grupu (Özyurek et al., 2011). Za odvijanje reakcije neophodna je kisela sredina. Rezultati ispitivanja ukazuju da ne postoji relacija između

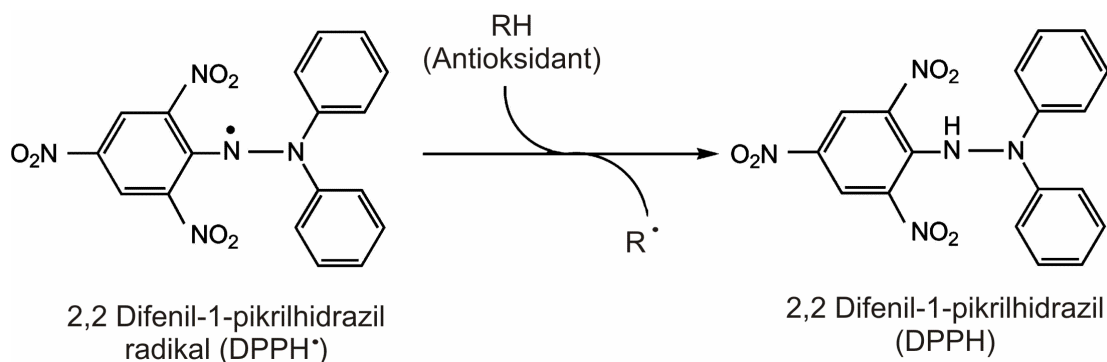
dobijene vrednosti FRAP testa i broja elektrona koje antioksidant može da donira (MacDonald et al., 2006).

Tabela 2.6 Prednosti i nedostaci antioksidativnih testova koji se najčešće primenjuju

Test	Prednosti	Nedostaci
<b>DPPH</b>	Jednostavana, stabilan i komercijalno dostupan; brz (20-60 min); relativno jeftin; pogodan za primenu pri ispitivanju ekstrakata i sokova voća i povrća; upotreba dostupnih instrumenata pri merenju;	Mogućnost ispitivanja samo lipofilnih antioksidanti; uski pH interval; DPPH radikal je relativno inertan i stabilan u odnosu na visoko reaktivne fiziološke radikale; često reaguje sporo sa peroksil radikalima u poređenju sa drugim antioksidantima; moguća je povratna reakcija sa nekim polifenolima što utiče na vrednost izmerene AOA; nije pogodan za merenje AOA plazme zbog deponovanja protein u metanol/etanolnom rastvoru;
<b>ABTS</b>	Vrlo brz (6 min); širok pH interval, mogu se ispitivati i hidrofilni i lipofilni molekuli antioksidanata	Ukoliko je neophodno duže reakciono vreme (više od 6 min) antioksidanta sa ABTS mogu se javiti netačni rezultate zbog kratkog trajanja samog testa; nedostatak sličnosti sa radikalima iz bioloških sistema;
<b>ORAC</b>	Uključuje varijaciju vrednosti u funkciji vremena; ponašanje radikala slično autentičnim fiziološkim radikalima; test je jednostavan, pouzdan i osetljiv;	Visoka varijabilnost rezultata; neophodnost upotrebe instrumenata koji nisu široko dostupni; pogodan za ispitivanje i hidrofilnih i lipofilnih antioksidanata;
<b>FRAP</b>	Pogodan za ispitivanje matriksa hrane koji sadrži gvožđe; jednostavan; upotreba dostupnih instrumenata pri merenju;	Nisu svi $Fe^{3+}$ redukcijenti antioksidanti, a neki antioksidanti nisu u mogućnosti da redukuju $Fe^{3+}$ ; može se realizovati samo u kiseloj sredini (pH=3,6); ako supstrat sadrži $Fe^{3+}$ jone koji se mogu helatno vezati za antioksidante iz matrice uzorka i onemogućiti njihovu reakciju sa FRAP; uticaj vrste rastvarača na redoks potencijal $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ sistema;

DPPH test može biti uključen u obe grupe metoda jer se zasniva na reakciji transfera elektrona ali se istovremeno odvija i transfer vodonika a kojim će se mahanizmom rakkija odvijati zavisi od prirode rastvarača i razlike redoks potencijla reagujućih komponenti. Tako je HAT mehanizam verovatniji u nepolarnim rastvaračima a u polarnim, kao što su etanol ili metanol, veća je verovatnoća odvijanja SET mehanizma (kao posledica stvaranaja jakih vodoničnih veza sa molekulima fenolnih jedinjenja) (Villano et al., 2007). DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

radikal je relativno stabilan i lako se identifikuje, apsorbuje u VIS oblasti spektra sa maksimumom na 517 nm; gubitak ljubičaste boje posledica je reakcije sa antioksidantima pri čemu se formira žuti hidrazin. Stabilizuje se delokalizacijom elektrona (Sanchez-Moreno, 2002). Na slici 2.6 prikazana je reakcija DPPH radikala sa antioksidantom.



Slika 2.6 Reakcija DPPH radikala sa antioksidantom (Karabegović, 2011)

Pri upotrebi DPPH radikala treba obratiti pažnju na pH ispitivanog rastvora, vrstu kao i koncentraciju rastvarača. Veće prisustvo vode (više od 60%) u vodeno-etanolnim smešama navodi na pogrešne rezultate odnosno manje vrednosti antioksidativne aktivnosti jer u tim uslovima deo DPPH radikala koaguliše (zbog slabe rastvorljivosti u vodi) pa sam tim biva onemogućen da reaguje sa antioksidantima (Staško et al., 2007). Ograničenje primene DPPH testa je i ta da često antioksidanti koji brzo raguju sa peroksil radikalom, veoma sporo reaguju sa DPPH radikalom, a utvrđeno je i da reverzibilno reaguje sa nekim polifenolima što utiče na rezultate merenja antioksidativne aktivnosti (Huang et al., 2005).

## 2.6. Aronija

### 2.6.1. Taksonomija i morfologija biljke

Aronija je biljka iz familije Rosacea i podfamilije Maloideae. Botaničko ime biljke je *Aronia melanocarpa*, a uobičajni naziv aronija, sibirska borovnica (engl. chokeberry). *Aronia melanocarpa* (*Aronia noir*, black chokeberry) odnosno crna aronija (crnoplodna aronija) i *Aronia arbutifolia* (*Aronia rouge*, red chokeberry) odnosno crvena aronija (crvenoplodna aronija) su dve

vrste, a hibrid nastao iz njih je treći varijetet: *Aronia prunifolia* (ljubičasta aronija). Taksonomija biljke data je u tabeli 2.7.

Tabela 2.7 Taksonomija aronije

Taksonomija						
Carstvo	Superdivizija	Divizija	Red	Familija	Rod	Vrsta
<i>Plantae</i>	<i>Angiosperme</i>	<i>Amygdaloideae</i>	<i>Rosales</i>	<i>Rosaceae</i>	<i>Aronia</i>	<i>Aronia Melanocarpa L.</i>

Aronija je višegodišnja žbunasta biljka, raste u vidu grma koji dostiže visinu do 2 m, ima oble i glatke listove (dužine do 7 cm). Listovi su široko-ovalni na ivicama dlakavi i nazubljeni, u proleće i leto svetlo (jarko) zelene boje, a u jesen crvene do tamno cvene boje (Seidemann, 1993; Strigl et al., 1995). Cvetovi, od po 10 do 35, sakupljeni su u guste štitolike cvasti. Krunica je od 5 čašičnih listića, bele ili ređe roze boje (Ara, 2002). Plodovi su okruglasti, prečnika 1-1,5 cm, crno-ljubičasti, vrlo sočni i oporog ukusa. Semena su mnogobrojna, sitna, tamno braon boje (Fan-Yung i Rechits, 1977). Aronija cveta krajem maja i početkom juna, a plodovi sazrevaju od početka avgusta do sredine septembra. U jesen je vrlo dekorativna jer listovi dobijaju jako purpurnu boju (Ara, 2002). Na slikama 2.7 i 2.8 prikazani su cvet i plod aronije.



Slika 2.7 Aronija u fazi cvetanja



Slika 2.8 Zreli plodovi aronije

Biljka je izrazito prilagodljiva različitim klimatskim uslovima i može se gajiti na temperaturama i do  $-45^{\circ}\text{C}$  (Kokotkiewicz et al., 2010). Plodovi aronije dobro se održavaju na grmu tako da se mogu brati i dva meseca nakon sazrevanja. Otporna je na bolesti i štetočine pa se može gajiti bez upotrebe pesticida (Kulling i Rawel, 2008),

Kultivisani varijeteti koji se koriste za uzgoj ploda potiču od vrste *Aronia melanocarpa*, a komercijalno najznačajniji u Evropi i Americi su “Aron”, “Nero”, “Viking”, “Hugin” i “Rubin”, a u Norveškoj “Moskva” (Wangesteen et al., 2014).

Aronija vodi poreklo iz istočnih oblasti Severne Amerike i Istočne Kanade odakle je početkom 20. veka preneti najpre u Nemačku, zatim u Rusiju i Skandinaviju. Danas se gaji kao kultivisana biljka u različitim oblastima Evrope (plantažno se gaji u Poljskoj, Češkoj, Slovačkoj, na severu Nemačke i Francuske).

Zbog svog pozitivnog uticaja na zdravlje u Evropi i Severnoj Americi koristi se u tradicionalnoj narodnoj medicini, u prevenciji nekih oboljenja i u lečenju skleroze i visokog krvnog pritiska, dok su je američki Indijanci plemena Potawatomi koristili u lečenju prehlade i poboljšanja imuniteta. Plod aronije se retko koristi svež zbog izvesnih negativnih senzornih osobina, kao što je gorak i opor ukus (Blaszczak et al., 2017) ali je zahvaljujući svojim višestruko pozitivnim zdravstvenim efektima dragocena sirovina u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Uglavnom



se konzumira kao sušeno voće ili prerađena u vidu sokova, sirupa, džema, čaja, likera, vina, a zahvaljujući svom izgledu često se koristi i kao dekorativna biljka (Kulling i Rawel, 2008; Kokotkiewicz et al., 2010). Kod nas se pojavila pre više od 50 godina, ali je zbog ispoljavanja pozitivnog efekta na zdravlje posebno aktualna i intenzivnije uzgajana zadnjih desetak godina.

### **2.6.2. Hemijski sastav**

Hemijski sastav ovog bobičastog voća, ekstrakta ili sveže ceđenog soka ukazuje da je aronija bogat izvor bioaktivnih jedinjenja zbog visokog sadržaja polifenola, uglavnom fenolnih kiselina, proantocijanidina, antocijana, flavonola i flavanonena (Kulling i Rawel, 2008; Hellström et al., 2010; Horszwald et al., 2013; Valcheva-Kuzmanova et al., 2004; Jakobek et al., 2012). Izuzetno visok sadržaj polifenola (ukupnih i individualnih fenolnih komponenti) u plodu aronije svrstava ovu biljku u red onih sa najvećom antioksidativnom aktivnošću među biljnim vrstama što je poslednjih godina povećalo interes naučne javnosti za ovom biljkom i iniciralo publikovanje velikog broja naučnih radova na ovu temu. Sadržaj ukupnih fenola ploda aronije je u intervalu od 690 do 2556 mg/100 g svežeg biljnog materijala i 3440-7849 mg/100 g suvog ostatka (Denev et al., 2012).

Aronija je bogat izvor antocijana, proantocijanidina i hidroksicimetne kiseline. Antocijani su biljni pigmenti koji bobičastom voću daju tamno crvenu, plavu, crnu i ljubičastu boju pa se ekstrakti ovih biljaka često koriste kao prirodni prehrambeni koloranti (Kulling i Rawel, 2008). Flavonoli (kvercetin-glikozid) i flavan-3-oli (epikatehin) takođe spadaju među značajne komponente polifenola aronije. Sadržaj ukupnih antocijana u svežem plodu aronije kreće se u intervalu od 357- 1790 mg/100 g svežeg biljnog materijala i u odnosu na ostalo bobičasto voće profil antocijana aronije je vrlo jednostavan. Čine ga skoro isključivo cijanidin-glikozidi i to cijanidin-3-arabinozid, cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-ksilozid (Sueiro et al., 2006; Denev et al., 2012; Taheri et al., 2013; Wang et al., 2016). Prema tvrđenju Oszmianski i Wojdylo (2005), plod aronije je jedan od najbogatijih biljnih izvora antocijana uglavnom cijanidin-glikozida i antocijanin-serpentina koji čine oko 25% ukupnog sadržaja fenola, dok fenolne kiseline, uglavnom hlorogena i neohlorogena predstavljaju 7,5% ukupnih polifenola aronije. Kvantitativno dominantni su cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-arabinozid koji predstavljaju više od 90% cijanidin glikozida (Espín et al., 2000; Jakobek et al., 2007;

Oszmianski i Wojdylo, 2005; Wangensteen et al., 2014). Rezultati novijeg datuma potvrđuju ove činjenice tako da po nalazima Szopa i saradnika (2017) plod sadrži značajne količine cijanidin-glikozida (0,3-323,2 mg/100 g suve materije) i dve fenolne kiseline: hlorogena (16,3-273,5 mg/100 g suve materije) i neohlorogena (92,3-212,6 mg/100 g suve materije). Oszmianski i Wojdylo (2005) takođe su identifikovali procijanidine kao osnovnu klasu polifenolnih jedinjenja u plodu aronije istovremeno tvrdeći da je sadržaj flavonola i (-)-epikatehina u ovom voću relativno nizak u poređenju sa sadržajem gorepomenutih fenolnih jedinjenja. Postoje i suprotna mišljenja koja se zasnivaju na tvrdnji da sadržaj flavonola u biljci veći od 200 mg/kg označava da je ona bogat izvor ovih jedinjenja tako da aronija (sa 267 mg/kg) pripada ovoj grupi biljaka što je potvrđeno i visokim sadržajem kvercetin-3-glukuronida, Q-3-robinobiosida, Q-3-vicianosida i Q-3-galaktozida. Među 28 divljih i kultivisanih vrsta bobičastog voća, rutin i miristin glukozid nađeni su samo kod aronije (Mikulić-Petkovšek et al., 2012b). Wu i saradnici (2004) su utvrdili prisustvo manjeg sadržaja pelargonidin-3-arabinozida i tragova pelargonidin-3-galaktozida. Sadržaj proantocijanidina svežeg ploda aronije nalazi se u opsegu od 664 do 2120 mg/100 g, a čine ga isključivo jedinice (-)-epikatehina (u kojima je vezano četiri ili osam ugljenikovih atoma) u vidu monomera, dimera, trimera, 4-6-mera, 7-10-mera i >10-mera, koji su zastupljeni u najvećem procentu: 81,72% (Wu et al., 2004; Sueiro et al., 2006). Različiti varijeteti aronije sadrže 80-95% ekstraktibilnih proantocijanidina od kojih su 97-99,55% >10-meri (Hellström et al., 2009). Prisustvo hidroksicimetnih kiselina potvrđeno je visokim sadržajem hlorogene kiseline u iznosu od 61-196 mg/100 g svežeg biljnog materijala i neohlorogene kiseline i to 85-123 mg/100 g svežeg biljnog materijala (Slimestead et al., 2005; Rop et al., 2010, Wang et al., 2016) kao i p-kumarinske kiseline (Wang et al., 2016) a nađeni su i derivati kafeinske kiseline (Espín et al., 2000; Lohachoompol et al., 2008). Sadržaj epikatehina nalazi se u intervalu od 47 do 84 mg/100 g svežeg biljnog materijala (Rop et al., 2010).

U poređenju sa ostalim bobičastim voćem aronija predstavlja i jedan od najbogatijih izvora karotenoida čiji sadržaj prosečno dostiže vrednost od 48,6 mg/kg svežeg biljnog materijala. Plod aronije sadrži likopen,  $\beta$ -karoten,  $\beta$ -kriptoksantin, lutein, 5,6-epoksilutein, cis- i trans-violaksantin i neoksantin (Lashbrooke et al. 2010).

Pri analizi šećera, organskih kiselina i ukupnih fenola kod 25 vrsta kultivisanog i divljeg bobičastog voća, potvrđeno je da je najveći nivo polifenola nađen u plodu aronije, pri čemu je sadržaj ovih jedinjenja veći kod divljih varijeteta u odnosu na kultivisane u okviru iste biljne

vrste ili roda. Glukoza i fruktoza su kvantitativno najdominantniji šećeri aronije sa sadržajem od 35,4 i 28,2 g/kg svežeg ploda, respektivno dok se sukuroza javlja u iznosu od 4,12g/kg. Iako je sorbitol alkoholni šećer karakterističan za “više” biljke, odnosno voće, u plodu aronije identifikovan je sa relativno visokom vrednošću od 46,2 g/kg svežeg ploda što verovatno doprinosi i visokom sadržaju ukupnih šećera ploda aronije od 618,19 g/kg svežeg ploda. Glavne organske kiseline prisutne u aroniji, čiji se značaj ogleda u formiranju ukusa voća, su jabučna (12,6 g/kg), limunska (1,3 g/kg) i šikimska (55,4 mg/kg) (Mikulic-Petkovsek et al., 2012a). Prisustvo sorbitola potvrdili su i Jeppsson i Johansson (2000).

Pored organskih bioaktivnih jedinjenja koje sadrži, plod aronije kao i ekstrakti dobijeni od njega su dobar dijetetski izvor kalcijuma, kalijuma i magnezijuma. Eventualni toksični elementi su prisutni u takvoj količini da konzumiranje bobica ili ekstrakata aronije ne predstavlja nikakav zdravstveni rizik (Juranović Cindrić et al., 2017). Plod aronije odlikuje se visokim sadržajem vitamina P, C, PP, B<sub>2</sub>, B<sub>9</sub>, E i provitamina A, kao i minerala uključujući mikroelemente (bor, fluor, gvožđe, bakar, cink, mangan, molibden i kobalt). Hudec i saradnici (2006) dokazali su prisustvo joda u količini i do 400 mg/kg.

Širok opseg dobijenih vrednosti sadržaja pojedinačnih fenolnih jedinjenja i ukupnih fenola posledica je primene različitih analitičkih tehnika određivanja kvalitativnog i kvantitativnog sastava (Kahkonen et al., 2001; Lohachoompol et al., 2008; Jakobek et al., 2011), različitih genetskih faktora i uticaja sredine u kojoj su biljke odgajane-klima, svetlost, temperatura, uticaj dodatka mineralnog đubriva (Skupien i Oszimianski, 2007), zrelost biljke pri berbi (Lee et al., 2014), način skladištenja i konzerviranja (Tiwari i Cummins, 2013). U radu Sadowske i saradnika (2017) ispitivan je uticaj načina konzerviranja na sadržaj antocijana i vitamina C u aroniji. Najveći sadržaj ovih komponenti održan je u plodovima podvrgnutim zamrzavanju, dok je niži nivo dokazan u liofilizovanim plodovima i plodovima sušenim na vazduhu. Bez obzira na način konzervisanja aronija je ostala najbogatiji izvor antocijana sa najvećom antioksidativnim kapacitetom među različitim vrstama bobičastog voća (Sadowska et al., 2017). Efikasnija zaštita molekula DNK od oksidativnog oštećenja dokazana je primenom soka aronije koji je sterilisan mikrotalasima u odnosu na sok kod koga je sterilizacija vršena zagrevanjem (Piasek et al., 2011). Pri ispitivanju uticaja termičkog tretmana na kvalitet bobičastog voća (između ostalih i aronije) zaključeno je da jedino kraći termički proces u trajanju od 10 do 20 minuta može očuvati njihovu

biološku aktivnost. Izloženost visokim temperaturama u dužem vremenskom trajanju negativno je uticala na nivo ovih parametara kod svih uzoraka (Arancibia-Avila et al., 2012)

### **2.6.3. Biološka aktivnost**

Doprinos fenolnih jedinjenja intenzivnoj antioksidativnoj aktivnosti potvrđen je u velikom broju istraživanja, odnosno znatan broj publikacija istakao je dobru korelaciju između antioksidativne aktivnosti i ukupnog sadržaja fenola ploda aronije (Zheng i Wang, 2003; Wu et al., 2004; Jakobek et al., 2007; Denev et al., 2010). Među polifenolima aronije, kvercetin ima strukturne karakteristike neophodne za ispoljavanje snažne antioksidativne aktivnosti i ovo jedinjenje, uz cijanidin-glikozid i hlorogenu kiselinu, poseduje najjaču antioksidativnu aktivnost u odnosu na ostale monomerne fenole aronije (Denev et al., 2012). Utvrđeno je da antocijani, flavonoli i hidroksicimetna kiselina doprinose sa oko 59,4% ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti aronije ne uzimajući u obzir moguće sinergijsko ili antagonističko dejstvo individualnih antioksidanata, odnosno 40% antioksidativne aktivnosti aronije može se pripisati delovanju proantocijanidina (Zheng i Wang, 2003). Veliki je značaj polifenolola aronije kao snažnih inhibitora lipidne peroksidacije jer su lipidi u *in vivo* sistemima veoma podložni ovom procesu (Denev et al., 2012).

Polifenoli su zbog velikog broja medicinskih i fizioloških efekata koje ispoljavaju označeni kao najvažniji hemijski sastojci ploda aronije (Lee et al., 2014). Za njih je dokazana i potvrđena antioksidativna i antiradikalska aktivnost (Kulling i Rawel, 2008; Jakobek et al., 2012; Malinowska et al., 2012), antimutagena (Gąsiorowski et al., 1997), antiinflamatorna aktivnost (Bijak et al., 2012; Naruszewicz et al., 2007), kao i sposobnosti snižavanja krvnog pritiska (Hellström et al., 2010), redukcije ukupnog holesterola, LDL holesterola i triglicerida (Kulling i Rawel, 2008). Sve ovo doprinosi značajnom kardioprotektivnom, antikancerogenom, antidijabetskom, vasoprotektivnom, radioprotektivnom, imunomodulatornom, antivirusnom i baktericidnom efektu aronije (Kulling i Rawel, 2008; Gąsiorowski et al., 1997; Kedzierska et al., 2012; Bermúdez-Soto et al., 2007; Valcheva-Kuzmanova i Belcheva, 2006). Aronija takođe ispoljava hepatoprotektivni (Valcheva-Kuzmanova et al., 2004) i gastroprotektivni efekat (Matsumoto et al., 2004). Istovremeno, nije objavljeno nijedno istraživanje koje bi ukazivalo na

toksičnost ili neželjene efekte uzrokovane konzumacijom plodova aronije, kao ni soka ili ekstrakta ove biljke (Kedzierska et al., 2012).

Ishrana koja podrazumeva svakodnevni unos bobičastog voća bogatog antocijanima posebno cijanidin-3-glukozidom može doprineti prevenciji oboljenja poznatog kao nealkoholičarska bolest masne jetre koja se vezuje uz sindrome poremećaja metabolizma i kardiovaskularne bolesti, a jedan je od najčešćih uzročnika hroničnog oboljenja jetre na Zapadu (povećan nivo triglicerida, nealkoholičarskog steatohepatitisa i ciroze jetre) koje je dijagnostikovano kod više od 20% odraslog stanovništava (Wang et al., 2016). Hemoprotektivni efekat ispoljen je i kod kultivisanog i kod divljeg genotipa aronije, ali sa različitim intenzitetom delovanja (Sueiro et al., 2006). U radu Valcheva-Kuzmanova i saradnika (2004) sok aronije ispoljio je zaštitni efekat od akutnog oštećenja jetre pacova ugljentetrahloridom što je verovatno posledica antioksidativnih svojstava aronije.

Ekstrakt aronije pokazao je snažno antimikrobno dejstvo na širok spektar mikroorganizama kao i visoku antimikotičnu aktivnost (Denev et al., 2014). U radu Bräunlich i saradnika (2013a) dokazano je preventivno dejstvo bioaktivnih jedinjenja ekstrakta aronije u sprečavanju formiranja biofilmova od *Escherichia coli* i *Bacillus cereus*.

Plod aronije takođe je bogat izvor bioaktivnih jedinjenja intenzivne antiradikalske aktivnosti i inhibitora peroksidativnih i prooksidativnih enzima, kao i  $\alpha$ -glukozidaze čime se smanjuje nivo glukoze u krvi i vrši prevencija pojave diabetesa, što je od posebnog značaja za prehrambenu industriju (Bräunlich et al., 2013b).

Mnoge epidemiološke studije ukazuju na činjenicu da ekstrakt aronije ima pozitivan uticaj na smanjenje faktora rizika kardiovaskularnih bolesti (Valcheva-Kuzmanova et al., 2006; Kulling i Rawel, 2008; Hellström et al., 2010; Malinowska et al., 2012; Varela et al., 2016). Pozitivni rezultati u okviru ispitivanja uticaja ekstrakta aronije na stvaranje tromba korišćenjem humane plazme i pročišćenog fibrinogena ukazuju da se ovaj ekstrakt može primeniti u prevenciji tromboze tokom patoloških stanja pri kojima se javlja aktivacija prokoagulacije plazme i oksidativni stres (Malinowska et al., 2012). *In vitro* eksperimenti pokazali su da ekstrakt ploda aronije smanjuje maksimalnu brzinu fibrinske polimerizacije u humanoj plazmi i dovodi do inhibicije amidolitičke aktivnosti enzima koji izaziva stvaranje trombina, što sve potvrđuje da ovaj prehrambeni suplement može sprečiti trombozu u patološkim stanjima (Bijak, 2011).

U radu Hellström i saradnika (2010) ispitivana je sposobnost smanjenja krvnog pritiska pomoću liofiliziranog soka aronije praćenjem *in vitro* inhibicije angiotenzin konvertujućeg enzima i *in vivo* ispitivanjima pacova sa spontanom hipertenzijom. Zaključeno je da ovaj proizvod ispoljava efekat snižavanja krvnog pritiska, uz pretpostavku da polifenoli aronije povećavaju produkciju endogenog azot-monoksida mehanizmom nezavisnim od delovanja navedenog enzima (Hellström et al., 2010). Upotrebom komercijalnog ekstrakta aronije istovremeno sa statinskom terapijom kod pacijenata koji su preživeli infarkt miokarda došlo je do značajnog smanjenja inflamacije, nivoa oksidovanog LDL i krvnog pritiska tako da se ovaj proizvod može koristiti za sekundarnu prevenciju ishemijskog oboljenja srca (Naruszewicz et al., 2007).

*In vitro* ispitivanja komercijalnog ekstrakta aronije pokazala su da ovaj proizvod zahvaljujući antioksidativnoj aktivnosti značajno smanjuje oksidativni/nitritivni stres u trombocitima izazvan operativnom intervencijom i hemoterapijom kod pacijenata sa invanzivnim karcinomom dojke (Kedzierska et al., 2012).

Antocijani znatno inhibiraju stvaranje i oslobađanje superoksidnih radikala kod humanih granulocita tako da se antimutageni uticaj antocijana uglavnom ispoljava putem njihove mogućnosti "hvatanja" slobodnih radikala, inhibicije enzima, aktiviranja promutagena i pretvaranja mutagena u derivate neaktivne u kontekstu sa DNK (Gąsiorowski et al., 1997).

Ispitivaja primene ekstrakta ploda aronije ukazala su na njegovu preventivnu aktivnost protiv raka debelog creva što je ilustrovano inhibicijom rasta ćelija ovog tipa karcinoma dejstvom antocijana aronije (Bermúdez-Soto et al., 2007; Zhao et al., 2004). Dokazano je da aronija ima i gastroprotektivni uticaj na hemoragične lezije želuca indukovane etanolom (Matsumoto et al., 2004). Inhibicija aktivnosti holinesteraze dejstvom proizvoda aronije (limunov sok sa dodatkom koncentrata aronije, 5%) od velikog je interesa za prevenciju neurodegenerativnih poremećaja kao što su Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest, ili senilna demencija (Gironés-Vilaplana et al., 2012).

U radu Park i saradnika (2013) dokazano je da plod aronije poseduje *in vitro* i *in vivo* efikasno dejstvo protiv različitih podtipova virusa gripa, pri čemu su ove antiviralne osobine pripisane bioaktivnim jedinjenjima aronije: elaginskoj kiselini i miricetinu (Park et al., 2013).

Studija, u trajanju od 90 dana, u kojoj je učestvovalo 29 žena starosti od 25-48 godina sa celulitom drugog stepena (prema Nurnberg-Muller-ovoj skali) sprovedena je u cilju ispitivanja potencijalnog pozitivnog efekta konzumiranja organskog soka aronije na tretman celulita.

Značajno smanjenje debljine potkožnog tkiva primećeno je kod svih učesnica sa prosečnim smanjenjem od 1,9 mm i potpuni gubitak edema (prisutnog na početku ispitivanja) (Šavkin et al., 2014).

## ***2.7. Funkcionalna hrana***

Izbalansirana ishrana i adekvatna količina unetih nutrijenata preduslov su dobrog zdravstvenog stanja i prevencija mnogih bolesti kao što su hipertenzija, kardiovaskularne bolesti, dijabetes, osteoporoza, maligna oboljenja. Hrana koja pored uobičajne hranljive vrednosti može pozitivno uticati na specifične biološke funkcije, unaprediti opšte stanje zdravlja i/ili smanjiti rizik od određenih bolesti može imati atribut funkcionalne hrane. Sastojci hrane koji poseduju određenu fiziološku i biološku aktivnost, čime doprinose pozitivnim efektima na zdravlje, predstavljaju funkcionalna jedinjenja (Sloan, 2004; Siro et al., 2008). Prema podacima IFICF-a (International Food Information Council Foundation Food & Health Survey, Washington, DC) (2009) grupi funkcionalnih jedinjenja pripadaju: polifenoli, prehrambena vlakna, masne kiseline, biljni steroli, karotenoidi, fitoestrogeni, vitamini, minerali, prebiotici i probiotici.

ILSI Europe (eng. The International Life Science Institute) konstatuje: “prehrambeni proizvod može se smatrati funkcionalnim ako je dokazano da pored konvencionalnih nutritivnih efekata ispoljava pozitivan efekat na jednu ili više fizioloških funkcija, poboljšava zdravlje ljudi i/ili smanjuje rizik oboljevanja od određenih bolesti.” (ILSI Europe, 1999). Američka agencija za hranu i lekove FDA (engl. Food and Drug Administration) definiše funkcionalnu hranu kao: hrana ili sastojci hrane koji mogu pružiti zdravstvenu dobrobit izvan njihovog nutritivnog sadržaja dok su jedinjenja koja ispoljavaju takav efekat, u smislu funkcionalnosti, prehrambena vlakna, fitohemikalije i antioksidanti (Reis et al., 2012).

Koncept funkcionalne hrane u smislu fortifikacije prehrambenih proizvoda prisutan je u praksi još početkom 19.veka kada je francuski lekar Boussingault dodavao jod u so zbog prevencije gušavosti, dok je u periodu između dva svetska rata vršeno dodavanje vitamina D u mleko, vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, gvožđa u brašno, a vitamina A i D u margarin. Obogaćivanje osnovne hrane određenim nutrijentima može biti delotvorno za suzbijanje nekih zdravstvenih nedostataka ili poremećaja na nivou celokupne populacije kao što ilustruje primer iskorenjivanja oboljenja poput pelagre, beri-beri, gušavosti i rahitisa, početkom 20. veka. Pored sposobnosti da obezbedi

blagotvorni efekat na određene biološke funkcije, funkcionalna hrana mora obezbediti hranljive materije neophodne ljudskom organizmu i to u količinama koje se obično konzumiraju u ishrani (Roberfroid, 2000). Novi trendovi u proizvodnji funkcionalne hrane uvode kombinacije više metoda uključivanja funkcionalnih jedinjenja u hranljivu matricu, a istovremeno se vrši eliminacija i/ili redukcija količine jedinjenja koja ispoljavaju negativan zdravstveni efekat.

Kriterijumi za podelu funkcionalnih proizvoda i načini postizanja funkcionalnosti proizvoda (Jašić, 2010; Šarić, 2016):

- **Poboljšan ili unapređen proizvod.** Proizvodu se dodaju nutrijenti koji u njemu nisu prirodno prisutni ili su dodati u količini koja nije adekvatna njihovoj količini u prirodnom izvoru. Proces je označen terminom fortifikacija hrane što je slučaj kod: dodavanja omega-3 kiseline u jaja, vitaminiziranja proizvoda, dodatka minerala (na primer Ca u sok od narandže), dodavanje prirodnih koloranata (na primer antocijana) sa svrhom održavanja boje proizvoda ili u cilju konzerviranja usled njihovog antioksidativnog dejstva koje usporava i/ili sprečava kvarenje hrane.
- **Obogaćen proizvod** (margarin sa estriima biljnih sterola)
- **Izmenjen proizvod.** Primer je dodavanje različitih zamena za masti u proizvodima prirodno bogatim masnoćama ili zamena za šećer u proizvodima sa visokim sadržajem šećera.
- **Proizvod povećane vrednosti.** Proizvodi su obogaćeni nutrijentima izgubljenim pri procesu obrade ili proizvodnje. Ovo se može ilustrovati procesom revitamizacije sokova vitaminom C, dodatak vitamina B belom brašnu kako bi se dostigao prirodni nivo sadržaja ovog nutrijenta u žitarici iz koje je brašno dobijeno ili se proizvodi obogaćuju nutrijentima inače prirodno prisutnim u njima ali ne u dovoljnim količinama (žitarice i brašna obogaćena gvožđem)

Spoznaja potrošača globalnog tržišta o povezanosti ishrane i zdravlja rezultirala je povećanjem opšte prihvaćenosti i potrošnje funkcionalnih proizvoda (Jones i Jew, 2007). Popularnost koncepta funkcionalne hrane ima sve veći uticaj na inovacije u prehrambenoj tehnologiji jer je opšti princip funkcionalne hrane upotreba znanja o ishrani u proizvodnji prehrambenih proizvoda u cilju poboljšanja zdravlja potrošača (Peressini i Sensidoni, 2009).



Uloga funkcionalnih proizvoda može se sagledati na osnovu sledećih kategorija (Jašić, 2010; Šarić, 2016):

- Proizvodi koji utiču na bolji kvalitet života: probiotici, starter kulture (*Lactobacillus*, *Bifidobacteria* itd.), prebiotici (oligosaharidi, fukto-glukani)
- Proizvodi posebno formulisani sa funkcijom smanjenja faktora zdravstvenog rizika: proizvodi obogaćeni vitaminima, omega-3-masnim kiselinama, biljnim sterolima, mineralima, antibioticima, antioksidantima (bioflavonoidi, beta-karoten, izoflavoni, likopen)
- Proizvodi za specijalne kategorije potrošača čiji je cilj olakšavanje njihovog života, odnosno posebna formulacija za potrošače sa različitim metaboličkim poremećajima (fenilketonurija, glutenska enteropatija, netolerancija na laktozu i fruktozu itd.), gde se iz proizvoda isključuju samo sastojci koji u određenom slučaju “smetaju”.

Interesovanje za hranu bogatu prehrambenim vlaknima i antioksidantima beleži rast poslednjih decenija što je doprinelo značajnom razvoju tržišta proizvoda i sastojaka koji sadrže ova bioaktivna jedinjenja. Unošenje prehrambenih vlakana i fitohemikalija kao što su polifenoli, karotenoidi, tokoferoli i askrobinska kiselina odražava se pozitivno na zdravlje i zaštitu od mnogih bolesti (Saura-Calixto, 2011). Prirodni antioksidanti uključeni u formulaciju prehrambenih proizvoda učestvuju u prevenciji bolesti kojima je glavni uzročnik oksidativni stres. Brz i aktivan način života ljudi povećao je tržište proizvoda takozvane „brze hrane“ i „gotovih jela“ pa unapređenje ovih proizvoda dodatkom funkcionalnih jedinjenja (kao što su prirodni antioksidanti) dodatno privlači pažnju potrošača (Chandrsekara i Shahidi, 2015).

Informacije o etiologiji bolesti koje proizilaze iz oksidativnog stresa doprinele su da fitohemikalije koje ispoljavaju antioksidativnu aktivnost postanu fokus interesovanja u proizvodnji hrane koja promovise zdravlje. Zato ove fitohemikalije bivaju u sve većoj meri uključene u proizvodnju raznih prehrambenih proizvoda, a posebna pažnja posvećena je polifenolima bobičastog voća. Iz tog razloga su biljni antioksidanti bobičastog voća, posebno polifenoli, obećavajući potencijal za industrijsku eksploataciju, kao sastojci zdrave i funkcionalne hrane (Piasek et al., 2011).

### 2.7.1. Keks kao proizvod unapredene vrednosti

Pekarski, testeničarski i fini pekarski proizvodi su generalno vrlo popularni u ishrani stanovništva Evrope, ali i celog sveta. Iako popularnost funkcionalne hrane sve više raste (najviše u domenu proizvodnje mlečnih proizvoda), u pekarstvu je još uvek nedovoljan broj komercijalno dostupnih funkcionalnih proizvoda. Razvoj funkcionalnih pekarskih proizvoda nameće potrebu za formulacijom proizvoda koji bi posedovali fiziološku efektivnost, ali istovremeno i prihvatljive senzorne osobine (ukus, tekstura, izgled) za konzumente (Balestra et al. 2011).

Žitaricama i proizvodima od žitarica (pekarski, testeničarski i fini pekarski proizvodi), posebno integralnim, pripisuje se značajna antioksidativna aktivnost zahvaljujući njihovim fenolnim jedinjenjima (Sedej et al., 2011). Fini pekarski proizvodi na bazi žita predstavljaju veliku grupu proizvoda različitih po sastavu, metodama proizvodnje i senzornim karakteristikama. Ovi proizvodi maju atribut koncentrisane hrane, zbog visokog sadržaja ugljenih hidrata i masti i niskog sadržaja vlage (visoko kalorijska hrana). Opšte su prihvaćeni od strane svih kategorija potrošača, a konzumiraju se i pre i posle glavnih obroka (Škrbić i Cvejanov, 2011). Keks zauzima važno mesto među takozvanim “grickalicama” ili “snek” (engl. snack) proizvodima zbog raznovrsnosti ukusa, hrskavosti, osobinama gotovog proizvoda-odmah spremnog za konzumiranje (ready-to-eat) i dugog roka trajanja (Bellur Nagarajaiah i Prakash, 2015).

Keks je kao široko prihvaćen fini pekarski proizvod i dobar energetski izvor koji se konzumira širom sveta, proizvod koji je vredan poboljšanja u nutritivnom smislu. Samo u SAD, industrija za proizvodnju keksa i krejera uključuje oko 300 kompanija sa godišnjim prihodom od približno 11 milijardi dolara (Zucco et al., 2011). Termin keks odnosi se na pečeni proizvod koji sadrži tri osnovna sastojka: brašno, šećer i masnoće koji se mešaju sa ostalim sastojcima prisutnim u manjim udelima, kako bi se formiralo testo (Pareyt i Delcour, 2008; Mamat et al., 2010). U sastav uglavom ulaze: 30-70% šećera, 30-60% masti i 7-20% vode u odnosu na masu upotrebljenog brašna. Uključivanjem velikog broja različitih sastojaka (vitamini, minerali, soja, pšenične klice, mleko u prahu, med) u osnovnu formulaciju može se unaprediti njihova nutritivna vrednost čime oni postaju dobar medijum za dobijanje proizvoda sa poboljšanim nutritivnim karakteristikama, a takođe, moguće je održati ili čak poboljšati senzorna svojstva čija prihvatljivost od strane potrošača i dalje ima ključnu ulogu pri plasiranju novorazvijenih

proizvoda (Škrbić i Cvejanov, 2011). Formulisanje keksa sa dodatom ili unapređenom vrednošću dodavanjem sirovina sa bioaktivnim osobinama svrstavaju finalni proizvod u red funkcionalne hrane (Larrea et al., 2005; Škrbić i Cvejanov, 2011; Sedej et al., 2011a; Zucco et al., 2011; Reis et al., 2012; Bellur Nagarajaiah i Prakash, 2015).

U skorije vreme sve više potrošača izbegava sintetičke aditive u hrani, uključujući i antioksidante, što je rezultiralo povećanju upotrebe prirodnih antioksidanata biljnog porekla (Davidović et al. 2010). Prirodni antioksidanti sprečavaju autooksidaciju masti i ulja sadržanih u prehrambenim proizvodima. Reddy i saradnici (2005) ispitivali su uticaj dodavanja biljnih ekstrakata dobijenih iz tri različite biljke (*Emblica officianalis*, *Moringa oleifera*, *Vitis vinifera*) na svojstva biskvita, pri čemu je rezultat ukazao na značajno poboljšanje antioksidativne aktivnosti ovakvih proizvoda u poređenju sa kontrolnim uzorkom (kome nisu dodati ekstrakti) pa čak i sa uzorkom kome je dodat BHA. Dodatak biljne smeše Vitalplant® u testu za keks doprineo je povećanju antioksidativne aktivnosti keksa kao i smanjenje lipidne peroksidacije (Mišan, 2010), dok su slični rezultati postignuti i obogaćivanjem formulacije bezglutenskog keksa tropom borovnice i maline (Šarić, 2016).

## **2.8. Izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz biljnih materijala**

### **2.8.1. Ekstrakcija čvrsto-tečno**

Prenos mase jedne ili više supstanci iz jedne u drugu fazu karakteristika je mnogih tehnoloških procesa pri kojima je neophodna separacija komponenti sistema (destilacija, ekstrakcija, heterogeni procesi gas-tečno, tečno-tečno, višefazni sistemi). Najpre se vrši prenos mase određene komponente iz jedne faze do granice faza, kroz granicu faza, a zatim prenos u drugu fazu (Dudaković, 1996). Transfer mase pri kojem se jedna ili više komponenti izdvaja iz čvrstog materijala (mineral ili biljni materijal) primenom odgovarajućeg rastvarača (voda, rastvori baza, mineralnih kiselina i soli, organski rastvarači) osnovni je princip ekstrakcije čvrsto-tečno (luženja) (Veljković i Milenović, 2002).

Celokupan proces najjednostavnije se može opisati kroz dve faze: ispiranje ili brza ekstrakcija odnosno rastvaranje ekstraktivnih supstanci sa površine čvrstog materijala i spora ekstrakcija odnosno difuzija ekstraktivnih supstanci iz unutrašnjosti ka spoljašnjoj površini čvrstog

materijala i njihov transfer u okolni rastvor (tečni ekstrakt) (Milenović, 2002). Na kraju sledi separacija dobijenog ekstrakta od nerastvornog ostatka čvrstog materijala, odnosno iscrpljenog materijala (ceđenjem ili presovanjem). Ekstrakcija čvrsto-tečno određena je osobinama polazne sirovine, fizičko-hemijskom kompatibilnošću rastvarača i bioaktivnih jedinjenja koja se ekstrahuju i opštim zakonima prenosa mase (Pekić i Miljković, 1980).

Prenos mase u najvećoj meri je posledica postojanja koncentracionog gradijenta rastvorenih supstanci u fazama koje ostvaruju međusobni kontakt. Molekuli supstance koja difunduje haotično se kreću iz dela sistema sa većom u deo sistema sa manjom koncentracijom što je uzrokovano težnjom sistema za uspostavljanjem termodinamičke ravnoteže. Brzina difuzije raste usled povećanja brzine kretanja molekula odnosno povećanja njihove kinetičke energije kao posledice povećanja temperature sistema. Debljina sloja kroz koji se vrši difuzija, veličina dodirne površine faza kao i molekulska masa supstance koja difunduje su takođe faktori koji utiču na brzinu difuzije (Tolić, 1996).

### **2.8.2. Faktori koji utiču na efikasnost ekstrakcije**

Ishod ekstrakcije uslovljen je sledećim grupama faktora: faktori koji su determinisani tehnološkim svojstvima biljnog materijala kao sirovine (sadržaj vlage, sadržaj bioaktivnih jedinjenja, stepen usitnjenosti, bubrenje i adsorpciona sposobnost, relativna gustina i zapreminska masa, mehaničke osobine) i faktori koji ispoljavaju uticaj na transfer mase unutar čestica biljnog materijala i u rastvoru (hidrodinamički uslovi, uloga rastvarača, način dovođenja rastvarača, uticaj temperature, vreme trajanja ekstrakcije) (Ponomarev, 1976).

#### **2.8.2.1. Tehnološka svojstva biljnog materijala**

Stepen usitnjenosti: Usitnjavanje biljnog materijala postiže se rezanjem, udarom, lomljenjem, struganjem, istiranjem, mlevenjem do optimalne usitnjenosti koja se uglavnom nalazi u intervalu od 0,5-2 mm. Usitnjavanje biljnog materijala uslovljava degradaciju ćelijske strukture čime se povećava površina kontakta za transfer mase (biljni materijal-rastvarač), a samim tim i prinos ekstrakcije (Milošević, 2011).

Bubrenje i apsorpciona sposobnost: Svrha bubrenja je uvećanje zapremine ćelija biljnog materijala i pojačano kretanje rastvarača u ćelijama. Bubrenjem i kvašenjem biljnog materijala već se ekstrahuje izvesna količina ciljanih jedinjenja pa je ovaj proces uključen u samu ekstrakciju. Brzina prodiranja i kretanja rastvarača kroz biljni materijal osim što zavisi od pritiska i temperature, limitirana je i prisustvom vazduha u kapilarama i ćelijama biljnog materijala tako da se može povećati njegovom zamenom lako rastvorljivim gasovima kao što su CO<sub>2</sub> ili NH<sub>3</sub>. Mogućnost apsorpcije rastvarača od strane biljnog materijala zavisi i od njegovog stepena usitnjenosti (Ponomarev, 1976).

Relativna gustina je odnos gustine biljnog materijala i gustine vode a zapreminska masa predstavlja odnos mase prosušenog biljnog materijala i njegove zapremine (Ponomarev, 1976).

Mehaničke osobine biljnog materijala su: elastičnost, unutrašnje trenje između čestica biljnog materijala (određuje mogućnost premeštanja čestica) i spoljašnje trenje (mogućnost biljnog materijala da klizi po površini unutar ekstrakcionih uređaja), početni otpor pomeranju, rezanju i ostalim oblicima usitnjavanja (Ponomarev, 1976).

### **2.8.2.2. Faktori koji utiču na prenos mase**

Hidrodinamički uslovi ispoljavaju uticaj na transfer mase kroz difuzioni granični sloj i kroz masu rastvora, a poboljšavaju se mešanjem, cirkulacijom ili vibracijom, jer povećanje brzine strujanja rastvora u okolini čestica biljnog materijala utiče na smanjenje debljine difuzionog graničnog sloja (Ponomarev, 1976).

Uloga rastvarača: Fizička i hemijska svojstva rastvarača imaju vrlo bitan uticaj na ishod procesa ekstrakcije. Rastvorljivost i brzina difuzije supstanci iz biljnog materijala uslovljeni su vrednostima dielektrične konstante, viskoznosti (čijim se povećanjem srazmerno smanjuje koeficijent difuzije) i površinskog napona rastvarača čijim se smanjenjem povećava brzina ekstrakcije (što se može postići dodatkom izvesnih površinski aktivnih supstranci). Hidrofilnost i polarnost ciljanih ekstraktivnih supstanci uslovljavaju hemijska svojstva biljnog rastvarača (Ponomarev, 1976). Bioaktivna jedinjenja koja se ekstrahuju mogu biti hidrofilna (rastvorna u polarnim rastvaračima), hidrofobna (rastvorna u nepolarnim rastvaračima) i slabo polarna (Ponomarev, 1976). Etanol, glicerol, petrol etar, etil acetat, propilenglikol su organski rastvarači

koji se najčešće primenjuju pri ekstrakciji (ostali se izbegavaju usled njihove toksičnosti) (Vinatoru et al., 1999).

Ispitivanjem efikasnosti različitih rastvarača pri ekstrakciji antioksidativnih jedinjenja utvrđeno je da su najbolji rezultati dobijeni etanolom u odnosu na metanol, vodu, etil acetat, aceton ili heksan (Benzie i Strain, 1996; D'Alessandro et al., 2012). Pri ekstrakciji fenolnih jedinjenja smeše alkohola i vode su efikasnije od odgovarajućih monokomponentnih sistema rastvarača. Optimalna koncentracija etanola u vodenim rastvorima za ekstrakciju kretala se u intervalu od 40-70% (D'Alessandro et al., 2012; Stoica et al., 2013; Ivanović et al., 2014; Demirdoven et al., 2015; Rodrigues et al., 2015; Wang et al., 2016) dok su smeše metanola (u nekim slučajevima acidifikovane) na drugom mestu po učestalosti primene (Canuto et al., 2016; Wang et al., 2016b). Vodeno-etanolne smeše su među najkorišćenijim ekstragensima ne samo zbog ekonomske pristupačnosti, već i zbog mogućnosti dobijanja etanola iz obnovljivih izvora (na primer iz šećerne trske) kao i njegove manje toksičnosti što mu sve daje atribut “bezbednog” rastvarača (engl. Generally Recognized As Safe, GRAS) u skladu sa trendom koncepta “zelene hemije” (Rodrigues et al., 2015). Vrsta rastvarača koji je korišćen pri ekstrakciji ima uticaja i na antioksidativnu aktivnost ekstrakata određenu DPPH testom (Paes et al., 2014).

Način dovođenja rastvarača: Perkolacija je u najvećoj meri uslovljena ovim faktorom pri čemu se pogodnijim smatra dovođenje rastvarača odozdo na gore zbog smanjenja brzine taloženja čestica i formiranja takozvanog lebdećeg sloja koji poseduje optimalne hidrodinamičke uslove. Takođe delovanjem gravitacije pojačano je mešanje mase perifernih delova rastvora, a formira se dodatni protivstrujni tok ekstrakta što intenzivira mešanje (Ponomarev, 1976).

#### Uticaj odnosa biljni materijal-rastvarač

Povećanjem odnosa biljni materijal-rastvarač smanjuje se utrošak rastvarača potrebnog za ekstrakciju uzorka čime se povećava koncentracija antioksidativnih jedinjenja u dobijenom ekstraktu. Međutim neophodna je ravnoteža između oba elementa ovog odnosa jer će prenos mase biti ometen ukoliko postoji nedostatak rastvarača (Hidalgo and Almajano, 2017). Kod većine tehnika ekstrakcije veća količina rastvarača generalno efikasnije može rastvoriti ciljane bioaktivne komponente iz biljnog materijala i povećati prinos ekstraktivnih supstanci (Wang et al., 2008; Zhang et al., 2009).

### Uticaj temperature i vremena ekstrakcije

Zagrevanjem rastvarača smanjuje se vreme penetracije rastvarača u biljne ćelije i vreme bubrenja, smanjuje se viskoznost rastvarača, ubrzava se difuzija bioaktivnih jedinjenja kroz rastvarač jer se povećanjem temperature postižu i bolji hidrodinamički uslovi (Ponomarev, 1976). Temperatura i ekstrakciono vreme su međusobno povezani jer povećanjem vremena trajanja ekstrakcije smanjuje se vrednost neophodne temperature, dok povećanje temperature smanjuje vreme potrebno za uspešnu ekstrakciju.

Tako je porast temperature od 25°C do 40°C uzrokovao povećanje prinosa ultrazvučne ekstrakcije antocijana kupine do 20% u toku istog ekstrakcionog vremena od 15 min. Ovom promenom ostvaren je i pozitivan efekat na antioksidativnu aktivnost ekstrakta određenu DPPH testom shodno povećanju sadržaja antocijana koji je takođe zabeležen (Ivanović et al., 2014).

Prinos ekstrakcije polifenola aronije je tri puta povećan porastom temperature ekstrakcije sa 20°C na 60°C što su autori objasnili povećanjem rastvorljivosti polifenola u rastvaraču na višoj temperaturi, boljom difuzijom i efikasnijim prenosom mase (D'Alessandro et al., 2012). Međutim rezultati novijih istraživanja istih autora ukazuju da je na višim temperaturama (70°C) smanjen prinos antocijana što ukazuje na njihovu termolabilnost i degradaciju u takvim uslovima (D'Alessandro et al., 2014). Isti zaključak proizilazi iz još jednog istraživanja kojim se tvrdi da izloženost visokim temperaturama i delovanju kiseonika potencijalno dovodi do degradacije nekih bioaktivnih jedinjenja kao što su antocijani koji imaju izraženu ulogu u antioksidativnom delovanju (Golmohamadi et al., 2013).

### **2.8.3. Ekstrakcija biljnog materijala**

Biljni ekstrakti predstavljaju bogate izvore bioaktivnih jedinjenja i nalaze široku primenu u savremenoj proizvodnji prehrambenih i farmaceutskih proizvoda. Fokus savremenih istraživanja usmeren je ka iznalaženju ekstrakcionih tehnika koje će dati maksimalni prinos prirodnih bioaktivnih supstanci uz istovremenu štednju energije, rastvarača i primenu najviših standarda u zaštiti životne sredine. Soxhlet-ova ekstrakcija koju je ustanovio i razvio Soxhlet još 1879. godine još uvek se koristi u laboratorijskim uslovima, kao i mnoge druge konvencionalne tehnike ekstrakcija rastvaračem (maceracija, perkolacija, ekstrakcija toplim i hladnim mastima i vodom, ključalom vodom, ceđenje i presovanje). Međutim, sve je više prisutna primena novijih i

savremenijih tehnika ekstrakcije (ekstrakcija superkritičnim fluidima, ultrazvučna i mikrotalasna ekstrakcija) koje se koriste za dobijanje ekstrakata iz različitog biljnog materijala (Karabegović, 2011). Ekstrakcione tehnike koje se mogu realizovati za kraće vreme, sa manjom potrošnjom rastvarača i koje se mogu automatizovati, postaju sve aktuelnije u savremenoj praksi jer se njihovom primenom smanjuju troškovi procesa i štetni efekti vezani za zagađenje životne sredine (Eskilsson i Björklund, 2000).

Izbor ekstrakcione tehnike zavisi od toga da li se ekstrakcija izvodi u preparativne (izolacija komponenti biljnog materijala) ili analitičke (kvalitativno i/ili kvantitativno određivanje komponenti biljnog materijala) svrhe i da li biljni materijal koji se tretira sadrži jedinjenja poznate ili nepoznate strukture. Preparativna ekstrakcija uključuje sve ekstrakcione tehnike čiji je cilj izolacija osnovnih bioaktivnih jedinjenja iz određenog biljnog materijala pri čemu je samo nekoliko miligrama bioaktivnog jedinjenja dovoljno za određivanje strukture i *in vitro* i/ili *in vivo* testove bioaktivnosti (Nyiredy, 2004). Takođe, izbor odgovarajuće tehnike uslovljen je faktorima kao što su: prinos, kinetika procesa, biološka aktivnost dobijenog ekstrakta, ekonomska i ekološka opravdanost procesa ekstrakcije. Određivanje ekstrakcionih uslova uključuje odabir optimalnog rastvarača, odnosa ekstrakcionog materijala i rastvarača, stepena usitnjenosti materijala i temperature (Milenović, 2002a). Postupkom se mora postići što bolja izolacija ciljanih jedinjenja pri čemu je važno izbeći njihove eventualne hemijske modifikacije (Robins, 2003; Vazques-Cruz et al., 2012).

Ukoliko se govori o ekstrakciji plodova bobičastog voća, efikasnost ekstrakcije je u funkciji: karakteristike biljnog materijala tj. bobičastog voća, izbora ekstrakcione tehnike i ekstrakcionih uslova (vreme trajanja ekstrakcije, temperatura, izbor rastvarača) (Hidalgo and Almajano, 2017). Glavni faktori koji određuju karakteristike ekstrakta dobijenih iz bobičastog voća su: faktori koji imaju uticaj pre same ekstrakcije (određuju količinu i vrstu bioaktivnih materija u bobičastom voću) i faktori same ekstrakcije (regulišu mogućnost ekstrakcije ovih molekula iz biljne matrice). Prvu grupu faktora je teško kontrolisati (geografska lokacija, klimatski uslovi, stepen izloženosti sunčevoj svetlosti, sezona berbe, odlike sorte, faza zrenja) pa je zato fokus većine ispitivanja na odabiru tehnike i optimizaciji uslova ekstrakcije (Hidalgo and Almajano, 2017).

Ekstrakcija čvrsto-tečno je jedna od najčešće primenjivanih tehnika za dobijanje komponenti iz biljnih materijala, ali i uklanjanja neželjenih fenolnih i ne-fenolnih ili isparljivih organskih jedinjenja. Veliki broj istraživanja bavi se različitim metodama ekstrakcije, prečišćavanja i



karakterizacije fenolnih jedinjenja iz bobičastog voća (Wu et al., 2004; Wang i Weller, 2006; Jakobek et al., 2007a; Pliszka et al., 2008; Adjé et al., 2010; Denev et al., 2010; Kahkonen et al., 2011; D'Alessandro et al., 2012; Bräunlich et al., 2013b; D'Alessandro et al., 2014; Golmohamadi et al., 2014; Paes et al., 2014; Barba et al., 2016; Čujić et al., 2016).

Konvencionalna ekstrakcija rastvaračima je ekstrakciona tehnika koja se uglavnom koristi za ekstrakciju antioksidativnih jedinjenja iz bobičastog voća, naročito u industrijskim uslovima iako zahteva veliku potrošnju energije i upotrebu velike količine rastvarača. Alternativu predstavljaju nove, nekonvencionalne metode koje su ekološki prihvatljive jer smanjuju potrebe za energijom i količinu rastvarača. Iako imaju značajne prednosti nad konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, potrebno je razmotriti i njihove nedostatke pri izboru optimalne ekstrakcione metode (Hidalgo and Almajano, 2017).

### **2.8.3.1. Ekstrakcione tehnike**

#### Fizička ekstrakcija

Hladno presovanje ili ceđenje je jedna od najstarijih tehnika ekstrakcije koja omogućava ekstrakciju tečnosti bogatih antioksidantima iz poloda bez upotrebe rastvarača ili zagrevanja. Koristi se u proizvodnji voćnih sokova, a često i kao prvi korak u izolovanju antioksidativnih jedinjenja iz bobičastog voća gde se nakon presovanja vrše sukcesivne ekstrakcije presovanog ostatka čime se povećava ukupan prinos ekstrakcije (Arimboor et al., 2006). Takođe, ulje iz semena uljarica i etarska ulja iz kore citrusa mogu se dobiti na ovaj način i to primenom klasičnih (poluga) i savremenih tehnika (hidraulična i pužna presa) (Karabegović, 2011).

#### Ekstrakcija rastvaračem (maceracija)

Rastvarači koji se pri ovim ekstrakcijama primenjuju su voda, methanol, etanol i aceton, samostalno ili kao smeše, uz mogućnost acidifikacije (obično 1% HCl ili sirćetnom kiselinom) u cilju poboljšanja efikasnosti ekstrakcije. Maceracija je često korišćena tehnika za ekstrakciju antioksidanata, koja uglavnom ne podrazumeva upotrebu toplote i izvodi se šaržno, tokom dužeg vremenskog perioda (Snoussi et al., 2012). Perkolacija funkcioniše na istom fenomenu prenosa mase, ali uz proticanje rastvarača i uz zagrevanje čime se postiže ekstrakcija ciljanih supstanci za kraći vremenski period. Ekstrakcija po Soxhlet-u je tehnika ekstrakcije rastvaračem koja je široko korišćena u laboratorijskim uslovima jer je relativno jeftina i ne zahteva naknadno

razdvajanje filtracijom, a veliki prinosi se postižu i zahvaljujući načinu izvođenja gde je biljni materijal uvek u kontaktu sa svežim rastvaračem (Wang i Weller, 2006). Prednost klasičnih tehnika ekstrakcije je što ne zahtevaju velike investicije (Nyireddy, 2004; Hidalgo i Almajano, 2017). Sa druge strane, nedostaci klasičnih ekstrakcija rastvaračima su: dugo vreme ekstrakcije (6-48 h), relativno velika potrošnja rastvarača, niska selektivnost prema ciljanim bioaktivnim jedinjenjima, negativni efekti koji se odnose na životnu sredinu (emisija isparljivih jedinjenja i supstanci koje izazivaju oštećenje ozonskog omotača) i zdravlje. Međutim pri ispitivanju aktivnosti vrsta *Artemisia sp.* nađeno je da je sadržaj bioaktivnih jedinjenja smanjen pri ultrazvučnoj ekstrakciji (iako je ultrazvuk imao pozitivan efekat na kinetiku ekstrakcije) verovatno usled njihove degradacije zbog interakcije sa jako reaktivnim hidrosil radikalima nastalim pod uticajem ultrazvuka. Zato se u ovom slučaju klasična ekstrakcija pokazala prihvatljivijom u odnosu na ultrazvučnu ekstrakciju (Karabegović et al., 2011a). Slična zapažanja javila su se i kod ispitivanja aktivnosti sušenog lista bokvice (*Plantago major L.*) u smislu smanjenja sadržaja fenolnih jedinjenja tokom ultrazvučne ekstrakcije (Stanisavljević et al., 2008). Komparativna studija antioksidativnog i antimikrobnog dejstva u ekstraktima dobijenim iz lista čuvarkuće (*Sempervivum marmoreum L.*) maceracijom, ultrazvučnom ekstrakcijom i ekstrakcijom po Soxhlet-u pokazala je da ekstrakt dobijen maceracijom sadrži više fenolnih i flavonidnih jedinjenja nego ekstrakti dobijeni ostalim tehnikama, dok svi nezavisno od primenjene tehnike pokazuju istu antimikrobnu aktivnost (Stojičević, 2008).

#### Ubrzana ekstrakcija rastvaračem

Ubrzana ekstrakcija rastvaračem (ekstrakcija tečnostima pod pritiskom odnosno klasična ekstrakcija sa pregrejanim rastvaračem) je jednako ili čak više efikasna u poređenju sa ultrazvučnom ekstrakcijom i ekstrakcijom po Soxhlet-u (Nyireddy, 2004). Ubrzano je prodiranje rastvarača u biljne ćelije i prenos mase zbog povećane rastvorljivosti bioaktivnih jedinjenja i smanjenja vizkoznosti rastvarača (jer povišen pritisak održava rastvarač u tečnom stanju čak i na temperaturama iznad njegove tačke ključanja) (Camel, 2001). Tokom ekstrakcije uzorak je zatvoren u ekstrakcionoj ćeliji ispunjenoj rastvaračem pod povišenim pritiskom i temperaturom, u trajanju od 5-10 minuta. Prednost ove tehnike je kratko ekstrakciono vreme (manje od 30 min) ali je investicija procesa (oprema) relativno velika (Nyireddy, 2004).

### Nadkritična ekstrakcija

Nadkritična ekstrakcija (NKE) je metoda visoke efikasnosti jer primenjena sveža tj. obnovljena superkritična tečnost kontinuirano protiče kroz uzorak. Sposobnost rastvaranja superkritičnih fluida se menja variranjem pritiska i/ili temperature čime može biti postignuta visoka selektivnost (Nyireddy, 2004). Ovo je takođe jedna od “zelenih” alternativnih metoda. Kada se nalaze pod pritiskom i na temperaturi koja je niža od kritične temperature gasovi prelaze u tečno stanje i dobijaju svojstva rastvarača, a ako se nalaze na temperaturi i pritisku iznad kritičnih vrednosti ovih parametara, gasovi prelaze u superkritično stanje u kome su fizičke osobine fluida između osobina gasa i tečnosti. Ekstrakcija superkritičnim fluidima je efikasnija od ekstrakcije tečnim gasovima jer im je gustina približna gustini tečnosti (povećava se stepen rastvaranja) a olakšano je i prodiranje u biljni materijal zbog povećane difuzivnosti superkritičnih fluida (približno difuzivnosti gasova) (Skala et al., 2002). Gasovi koji se kao rastvarači koriste pri superkritičnoj ekstrakciji su CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O (ređe, zbog eksplozivnosti), freon. Najčešće primenjivan je CO<sub>2</sub> zahvaljujući svojoj netoksičnosti, fiziološkoj inertnosti, dostupnosti i niskoj ceni, uz to ovaj gas nije zapaljiv i ima niske vrednosti kritičnih parametara (31°C i 7,38 MPa) tako da se ekstrakcija odvija na nižim temperaturama što je značajno za ekstrakciju termolabilnih jedinjenja (Skala et al., 2002; Gamse, 2005). Prednost ovog tipa ekstrakcije je i to što se može automatizovati i regulisati tako da je pogodna za brze, rutinske analize. Međutim, za primenu ove tehnike, neophodne su obimne investicije zbog relativno skupe opreme (Nyireddy, 2004). Prednost je takođe, dobijanje ekstrakata velike čistoće i bez tragova prisustva rastvarača (Babović i Petrović, 2011; Hidalgo i Almajano, 2017). Međutim, kako je CO<sub>2</sub> izrazito nepolaran molekul, neophodan je dodatak (obično do 5%) polarnog rastvarača zbog povećanja rastvorljivosti. Ova metoda predmet je ispitivanje mnogih radova (De Cássia Rodrigues Batista et al., 2015; Mackèla et al., 2015; Babova et al., 2016).

### Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija je metoda ekstrakcije koja ne zahteva zagrevanje (netermalna tehnika). Delovanje ultrazvuka indukuje kavitaciju kojom dolazi do formiranja mehurova pod pritiskom čijom se implozijom povećava temperatura i pritisak mikro sredine (Nyireddy, 2004; Zhang et al., 2009). Kao posledica stvara se poremećaj ćelijskog zida ćelija biljnog materijala zbog koga dolazi do propuštanja intracelularnih bioaktivnih jedinjenja i njihovog oslobađanja u okolni rastvor (Adjé et al., 2010). Pri ultrazvučnoj ekstrakciji antocijana koji predstavljaju pigmente

akumulirane u centralnoj ćelijskoj vakuoli, poremećaj ćelije izazvan kavitacijom nastalom delovanjem ultrazvučnih talasa povećava prenos mase iz čvrste matrice u rastvarač što ekstrakciju antocijana čini efikasnijom (Rodrigues et al., 2015). Prednost ove metode su jednostavnost i veća efikasnost u odnosu na klasičnu ekstrakciju sa rastvaračima, smanjeni troškovi opreme kao i manja potrošnja toplote i rastvarača (Ivanović et al., 2014; Barba et al., 2016) što je svrstava u kategoriju ekološki prihvatljivih metoda ekstrakcije. Međutim prema tvrđenjima nekih autora, zbog malog prinosa ekstrahovanih jedinjenja, ekstrakciju je potrebno izvoditi u tri stupnja pa je time i potrošnja rastvarača relativno visoka (Nyireddy, 2004). Publikovani su i pozitivni efekti primene ove metode u smislu povećanja prinosa ekstrakcije i polifenolnih jedinjenja (D'Alessandro et al., 2014), ali je primećeno da sa povećanjem frekvencije i vremena trajanja ekstrakcije, opada antioksidativna aktivnost (Golmohamadi et al., 2013). Neki autori su utvrdili smanjenje prinosa antocijana i askrobinske kiseline za čak 33% primenom ultrazvučne ekstrakcije (Medina-Meza et al., 2016).

#### Ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem

Mehanizam delovanja se bazira na primeni pulsirajućeg električnog polja koje uzrokuje oštećenje ćelijskih zidova tako da nastale pore omogućavaju otpuštanje intracelularnih bioaktivnih jedinjenja u tečnost (pojava je poznata kao "elektroporacija"). Amplituda impulsa ima vrednost od 100 V/cm do 80 kV/cm, a ekstrakciono vreme je manje od sekunde, u ponovljenim ciklusima. Kvalitet i kvantitet masnog ulja uljane repice poboljšani su primenom ove tehnike (Guderjan et al., 2007; Barba et al., 2016; Medina-Meza et al., 2016) dok je ukupan sadržaj antocijana ekstrakata borovnice (*Vaccinium myrtillus*) dobijen ovom tehnikom bio manji u poređenju sa ekstraktima dobijenim klasičnom i superkritičnom ekstrakcijom (Hidalgo and Almajano, 2017).

## **2.9. Mikrotalasna ekstrakcija**

Mikrotalasi predstavljaju elektromagnetno zračenje talasne dužine od 0,01 do 1m, sa frekvencijom od  $3 \times 10^{11}$  do  $3 \times 10^8$  Hz (Miljin i Petrović, 2009). Prolaskom mikrotalasa kroz neki medijum energija mikrotalasa može biti apsorbirana od strane medijuma i transformisana u toplotnu energiju. Za razliku od konduktivnog zagrevanja, delovanjem mikrotalasa celokupna zapremina se simultano i rapidno zagreva (Eskilsson i Björklund, 2000; Zhang i Liu, 2008).

Zagrevanje mikrotalasnom energijom bazirano je na direktnom delovanju mikrotalasa na molekule mehanizmima jonske kondukcije i dipolne rotacije koji u većini slučajeva deluju simultano (Eskilsson i Björklund, 2000). Jonska kondukcija predstavlja migraciju naelektrisanih čestica tj. jona i elektrona usled dejstva električnog polja generisanog mikrotalasima (Zhang et al., 2011). Dipolne rotacije nastaju kada dipolni molekuli polarnog rastvarača nastoje da se usklade sa dejstvom visokofrekventnog električnog polja mikrotalasa. Indukovana oscilacija dovodi do kolizije (sudara) između dipola i molekula koji ih okružuju što uzrokuje pojavu zagrevanja (odnosno prelazak apsorbovane energije molekula rastvarača u toplotu) (Hemwimon et al., 2007). Zapravo, dipolna rotacija predstavlja stalnu promenu rotacije dipolnih molekula ( $4,9 \times 10^9$  puta u sekundi) izazvanu promenama smera električnog polja na frekvenciji od 2450 MHz, koja se najčešće koristi u kućnim i komercijalnim sistemima (Wang i Weller, 2006). Jonska kondukcija i dipolna rotacija obično se javljaju istovremeno tako da se intenzivira molekularno kretanje i indukuje zagrevanje, odnosno energija mikrotalasa konvertuje se u toplotnu energiju (Eskilsson i Björklund, 2000).

Činjenica je da gasovite supstance (zbog prevelikog rastojanja među molekulima) i led (usled postojanja kristalne rešetke koja vezuje molekule vode) ne mogu biti zagrejani delovanjem mikrotalasa, kao i da jonska kondukcija ima veći uticaj u generisanju toplote od dipolne rotacije (zato se jonski rastvori brže zagrevaju od polarnih rastvarača) (Karabegović, 2011).

Sposobnost rastvarača da apsorbuje mikrotalasnu energiju i prenese je na molekule u vidu toplote delimično zavisi od disipacionog faktora uglavnom predstavljenog kao tangens gubitka ( $\tan \delta$ ) i izraženog pomoću jednačine 3.1. (Chan et al., 2011):

$$\tan \delta = \frac{\varepsilon''}{\varepsilon'} \quad (2.1)$$

U kojoj su:  $\varepsilon'$  - dielektrična konstanta ili relativna permitivnost (mera polarizabilnosti molekula delovanjem električnog polja) i  $\varepsilon''$  - faktor gubitaka (odnosno dielektrični gubitak koji predstavlja meru efikasnosti konverzije mikrotalasnog u toplotnu energiju).

Jonski rastvori i rastvori polarnih molekula jače apsorbuju mikrotalasnu energiju zbog prisustva permanentnog dipolnog momenta koji je izložen uticaju mikrotalasa za razliku od nepolarnih rastvarača koji se neće zagrejati pod dejstvom mikrotalasa. Metanol ima manju dielektričnu konstantu od vode (32,6 i 78,3 za metanol i vodu, respektivno), ali veći faktor gubitka što znači da metanol ima manju sposobnost opiranja prolasku mikrotalasa i veću mogućnost konverzije

mikrotalasne energije u toplotu (Eskilsson i Björklund, 2000). Vrednost dielektrične konstante acetona (20,7) približna je vrednosti ove konstante kod etanola (24,3) međutim, znatno veći tanges gubitka etanola uzrok je većeg temperaturnog rasta kod etanola u odnosu na aceton pri delovanju mikrotalasa (Mijin i Petrović, 2005).

### **2.9.1. Osnovni principi mikrotalasne ekstrakcije**

Mikrotalasna ekstrakcija je nekonvencionalna ekstrakciona tehnika pri kojoj se sistem izlaže dejstvu mikrotalasa, a za koju je karakteristična upotreba manje količine rastvarača (ponekad i odsustvo rastvarača jer se koristi voda prisutna u ćelijama biljnog materijala) i kraće vreme trajanja procesa (Périno-Issartier et al., 2011). U poređenju sa klasičnom ekstrakcijom uz refluks i Soxhlet ekstrakcijom, pored kraćeg ekstrakcionog vremena, ekstrakcija mikrotalasa ispoljava evidentne prednosti u pogledu većeg ekstrakcionog prinosa i selektivnosti kao i boljeg kvaliteta ekstrahovanih jedinjenja (Pan et al., 2003; Martino et al., 2006; Proestos i Komaitis, 2008; Mandal et al., 2008). Niža cena i jednostavnija operativna oprema su glavne prednosti u odnosu na ekstrakciju superkritičnim fluidima, dok je u poređenju sa ultrazvučnom ekstrakcijom odlučujući faktor kraće vreme izvođenja ekstrakcije (Zhang et al., 2011). Potencijalni negativni efekti koji se mogu pojaviti usled delovanja mikrotalasa su promene hemijske strukture ciljanih bioaktivnih komponenti i/ili njihova degradacija što uzrokuje smanjenje ekstrakcionog prinosa. Generalno, ekstrakcija mikrotalasa nije pogodna za ekstrahovanje termolabilnih jedinjenja (Zhang et al., 2011). Takođe, efikasnost mikrotalasne ekstrakcije može biti smanjena bilo da su rastvarač ili ciljane komponente nepolarne ili u slučaju izbora jako viskoznih rastvarača (Wang i Weller, 2006; Cravotto et al., 2008).

Tokom mikrotalasne ekstrakcije neke od supstanci iz samog biljnog materijala, posebno polarni molekuli kao što je voda, ubrzano absorbuju energiju koju obezbeđuje mikrotalasno zračenje što dovodi do drastičnog porasta temperature unutar biljnih ćelija. Ovo zagrevanje uzrokuje formiranje para unutar ćelija uz povećanje pritiska i pucanje ćelijskih zidova i/ili membrana plazme, a kako se sekundarni metaboliti biljaka nalaze u citoplazmi ili ćelijskim zidovima, ovakva destrukcija ćelija olakšava transfer mase rastvarača u biljni matriks i sekundarnih metabolita u rastvarač čime se povećava efikasnost ekstrakcije (Zhang et al., 2011). Ovakav mehanizam ekstrahovanja razlikuje se od onih kod klasičnih ekstrakcija rastvaračima čiji je

mehanizam baziran na nizu procesa prodiranja rastvarača u biljni materijal i ispiranja intracelularnih bioaktivnih komponenti iz njega (Gao et al., 2007). Zapaženo je da delovanjem mikrotalasa na biljni materijal može doći do oštećenja biljnog tkiva i/ili ćelija pa čak i ćelijskih organela što sve povećava efikasnost i prinos ove ekstrakcione tehnike (Zhang et al., 2011).

Jedan od vidova mikrotalasnog ekstrakcije bez upotrebe rastvarača korišćen je u radu Périno-Issartier i saradnika (2011) pri ekstrakciji bobica pasijeg trna (*Hippophae rhamnoides*). Direktna interakcija mikrotalasa sa vodom prisutnom u biljnom materijalu favorizuje oslobađanje bioaktivnih jedinjenja iz ćelija biljke. Primenom ove metode dobijeni su ekstrakti sa znatno većim sadržajem polifenola i većim EC<sub>50</sub> vrednostima u odnosu na ekstrakte dobijene konvencionalnom ekstrakcijom rastvaračem (Périno-Issartier et al., 2011).

Mikrotalasnog ekstrakcija je značajna metoda ekstrakcije dragocenih bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala, a može se prilagoditi manjem ili većem obimu rada, odnosno i u laboratorijskim i u industrijskim uslovima (Cravotto et al., 2008; Gujar et al., 2009; Hayat et al., 2009; Spigno i De Faveri, 2009; Pérez-Serradilla i Luque de Castro, 2011). Generalno, glavna prednost mikrotalasnog ekstrakcije je brzo zagrevanje i manji obim opreme (Barba et al., 2016), dok kraće ekstrakcionog vreme i manja potrošnja rastvarača ovu tehniku svrstava u ekološki prihvatljive, takozvane “zelene” metode (Lucchesi et al., 2004). U laboratorijskim uslovima za korišćenje mikrotalasa obično se primenjuju uređaji otvorenog i zatvorenog tipa (Eskilsson i Björklund, 2000).

### **2.9.1.1. Aparatura i oprema**

Najjednostavnija oprema za mikrotalasnog ekstrakciju bazirana je na klasičnim kuhinjskim pećnicama modifikovanim shodno potrebama i nameni istraživanja (Chan et al., 2011). Iako su kućne mikrotalasnog pećnice uspešno primenjene pri ekstrakciji većeg broja bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala, njihovu upotrebu bez ikakvih tehničkih promena bi trebalo izbegavati zbog nedovoljne sigurnosti i pouzdanosti u radu (Zhang et al., 2011). Savremeni sistemi za mikrotalasnog ekstrakciju u laboratorijskim uslovima projektovani su tako da obezbeđuju različite mogućnosti kontrole ekstrakcionog procesa i bezbednost u radu (Chan et al., 2011). Uređaji takozvanog zatvorenog tipa sastoje se iz magnetronske cevi, pećnice u kojoj se nalaze kade za

ekstrakciju postavljene na rotirajućoj platformi, uređaja za kontrolu pritiska i temperature, kao i niz drugih elektronskih komponenti različitih funkcija (Eskilsson i Björklund, 2000).

### ***2.9.1.2. Separacija ekstrakta od iscrpljenog biljnog materijala***

Nakon izvođenja mikrotalasne ekstrakcije nameće se potreba razdvajanja iscrpljenog biljnog materijala od ekstrahovanih supstanci u rastvaraču, a u nekim slučajevima i njihovo dodatno prečišćavanje pre finalnih faza analize. Razdvajanje se vrši filtracijom ili centrifugiranjem, a prečišćavanje ekstrakta korišćenjem jednokratnih ketridža (deluju na principu ekstrakcije na čvrstoj fazi) punjenih sa C<sub>18</sub>, silikonom ili jonoizmenjivačkim smolama za uklanjanje ometajućih komponenti tokom daljih faza analize (Eskilsson i Björklund, 2000).

### **2.9.2. Parametri koji utiču na mikrotalasnu ekstrakciju**

Efikasnost mikrotalasne ekstrakcije zasnovana je na izboru operativnih uslova i parametara koji utiču na prinos i mehanizam ekstrakcije (Chan et al., 2011). Faktori koji utiču na mikrotalasnu ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala su: frekvencija i snaga mikrotalasa, vreme trajanja dejstva mikrotalasa, sadržaj vlage biljnog materijala, vrsta i koncentracija rastvarača, odnos rastvarača i biljnog materijala, veličina čestica uzorka koji se ekstrahuje, temperatura i pritisak na kojima se ekstrakcija izvodi i broj ekstrakcionih ciklusa (Liyana-Pathirana i Shahidi, 2005; Wang i Weler, 2006; Hayat et al., 2009; Spigno i De Faveri, 2009).

#### **2.9.2.1. Izbor rastvarača**

Pravilan izbor rastvarača za mikrotalasnu ekstrakciju zavisi od (Eskilsson i Björklund, 2000; Chan et al., 2011):

- apsorcionih svojstava rastvarača prema mikrotalasima (ako molekuli rastvarača nemaju sposobnost apsorbovanja mikrotalasa izostaje zagrevanje) koja su uslovljena disipacionim faktorom rastvarača
- interakcije rastvarača sa matriksom, odnosno stepenu rastvorljivosti ciljanih komponenti u rastvaraču
- stepena selektivnosti rastvarača prema ekstrahovanim supstancama iz uzorka.



Rastvarač sa optimalnim svojstvima je izuzetno značajan za postizanje efikasnog ekstrakcionog procesa (Chen et al., 2008). Izabrani sistem rastvarača može pri mikrotalasnoj ekstrakciji delovati (izazivajući zagrevanje) u sledećim kombinacijama (Eskilsson i Björklund, 2000):

- uzorak može biti tretiran rastvaračem ili smešom rastvarača koji intenzivno apsorbuju mikrotalasnu energiju (voda, EtOH 95%, dihlormetan, tetrahidrofuran, acetonitril/MeOH (95:5), dihlormetan/MeOH (90:10), MeOH/voda (80:20)
- uzorak može biti ekstrahovan kombinacijom rastvarača, pomešanih u različitim odnosima, u kojoj jedan rastvarač ima visoku a drugi nisku vrednost dielektričnog gubitka: etil-acetat/cikloheksan (1:1); heksan/aceton (1:1), efikasnost se povećava sa porastom udela acetona;
- za ekstrakciju uzorka koji se odlikuje visokim dielektričnim gubitkom može se primeniti rastvarač koji je transparentan za mikrotalase; to je moguće zbog lokalnog zagrevanja vode iz samog uzorka (na primer interakcijom mikrotalasa sa slobodnim molekulima vode iz vaskularnog sistema pri mikrotalasnoj ekstrakciji etarskih ulja iz biljnog materijala); unutar takvog sistema dolazi do nagle ekspanzije vode u vidu pare praćene pucanjem strukture tkiva što omogućava oslobođenim etarskim uljima protok ka organskom rastvaraču.

Zahvaljujući dobroj apsorbcionoj sposobnosti mikrotalasa, etanol (koncentracije od 40% do 100%) i voda su često korišćeni rastvarači u mikrotalasnim ekstrakcijama bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala (Zhou i Liu, 2006; Chan et al., 2011). Od organskih rastvarača često se primenjuju metanol i acetone, ali zbog njihove toksičnosti i relativno visoke cene, etanol predstavlja bolji izbor za ekstrakciju vrednih prirodnih bioaktivnih jedinjenja koja se mogu dalje koristiti u prehrambenoj industriji (Pérez-Serradilla i Luque de Castro, 2011; Zhu et al., 2016). Rastvarači koji poseduju dobre performanse u konvencionalnim ekstrakcijama ne moraju biti pogodni za primenu pri mikrotalasnim ekstrakcijama (Chan et al., 2011). U cilju poboljšanja efikasnosti, rastvaraču se može dotati takozvani modifikator kao u slučaju dodavanja udela metanola (do 5%) radi povećanja apsorbcionog kapaciteta sistema pri mikrotalasnoj ekstrakciji kurkumina acetonom iz biljke *Curcuma longa* (Mandal et al., 2008).

Količina vode prisutna u rastvaraču, odnosno koncentracija vodenog rastvora rastvarača ima znatan uticaj na efikasnost mikrotalase ekstrakcije (Hemwimon et al., 2007). Vodeni rastvori određenih organskih rastvarača efikasniji su u nekim slučajevima jer prisustvo vode poboljšava

penetraciju rastvarača u matriks uzorka i na taj način povećava efikasnost zagrevanja (Chan et al., 2011). Pri mikrotalasnoj ekstrakciji fenola iz lišća slatkog krompira (batata) sa povećanjem koncentracije etanola do 70%, rastao je sadržaj fenola u ekstraktima ali se daljim povećanjem udela etanola ova vrednost smanjila (Song et al., 2011). Slični rezultati publikovani su u radu Zheng i saradnika (2009) pri ekstrakciji silbina i drugih flavonolignana iz semena *Silybum marianum* L.

### **2.9.2.2. Odnos biljni materijal-rastvarač**

Pored vrste i količina upotrebljenog rastvarača može biti veoma važna pri mikrotalasnoj ekstrakciji. Odabir zapremine rastvarača mora osigurati potpunu potopljenost uzorka u njemu posebno kod uzoraka koji imaju tendenciju plutanja u rastvaraču tokom ekstrakcije. Za razliku od konvencionalnih metoda ekstrakcije kod kojih veća zapremina rastvarača uzrokuje povećanje prinosa ekstrakcije, pri mikrotalasnoj ekstrakciji ovo povećanje može izazvati smanjenje prinosa (Eskilsson i Björklund, 2000). Optimalna efikasnost mikrotalasne ekstrakcije postiže se primenom od 10 do 50 cm<sup>3</sup>/g čvrstog uzorka (Chen et al., 2007; Gao et al., 2007; Xiao et al., 2008; Hayat et al., 2009).

Odnos biljni materijal-rastvarač vrlo je značajan faktor koji utiče na efikasnost mikrotalasne ekstrakcije, jer utiče na zagrevanje sistema kao i na vrednosti koncentracionog gradijenta kao pogonske sile procesa ekstrakcije (Spigno i De Faveri, 2009; Chan et al., 2011). Prema nekim autorima, slično kao u slučaju klasičnih ekstrakcionih tehnika, veća količina rastvarača povećava efikasnost ekstrakcije i prinos ekstraktivnih supstanci (Li et al., 2004; Gao et al., 2007; Chen et al., 2007; Zheng et al., 2009; ) dok u nekim slučajevima prekomerna zapremina rastvarača uzrokuje slabije zagrevanje sistema pa je potrebno angažovati veću snagu mikrotalasa (Chan et al., 2011). Tretiranjem suviše malih količina uzoraka (u odnosu na količinu upotrebljenog rastvarača i mogućnost njegovog prodiranja u matricu) stepen zagrejanosti može biti naglo drastično povećan što dovodi do takozvanog pregrevanja i smanjenja efikasnosti mikrotalasne ekstrakcije (Spigno i De Faveri, 2009). Prema nekim istraživanjima optimalan odnos biljnog materijala (čvrste faze) i rastvarača je 30%-34% a njegovim smanjenjem ili povećanjem smanjuje se efikasnost ekstrakcije (Mendes et al., 2016).

### 2.9.2.3. Mikrotalasna snaga, temperatura i ekstrakciono vreme

Generalno, porast snage mikrotalasa povećava prinos ekstrakcije i smanjuje ekstrakciono vreme. Međutim, pri mikrotalasnoj ekstrakciji biljnog materijala, visoke vrednosti snage mogu biti uzrok smanjenju prinosa ekstraktivnih supstanci usled degradacije termolabilnih jedinjenja (Chan, 2011). Zato, u većini slučajeva, sa povećanjem mikrotalasne snage proporcionalno raste prinos ekstrakcije do izvesnog nivoa nakon čega uticaj ovog parametra nije značajan ili dolazi do pada ekstraktivnog prinosa (Kwon et al., 2003; Xiao et al., 2008; Song et al., 2011; Ahmad i Langrish, 2012). Za ekstrakciju fenola iz biljnog materijala preporučuje se upotreba veće mikrotalasne snage u kraćem vremenskom periodu (Ballard et al., 2010; Song et al., 2011). Optimalna vrednosti mikrotalasne snage smanjuje vreme neophodno da se postigne potrebna temperatura sistema i doprinosi izbegavanju fenomena „udara“ tokom procesa ekstrakcije (Eskilsson i Björklund, 2000). Snaga potrebna da se obezbedi uticaj mikrotalasa na degradaciju ćelijskih zidova u biljnim tkivima obično je u opsegu od 100-500 W (Chan et al., 2011).

Korelacija temperature i mikrotalasne snage proizilazi iz činjenice da povećana snaga dovodi do porasta temperature sistema. Ovo povećanje temperature može povećati stepen desorpcije ciljanih komponenti iz matriksa i/ili povećati njihovu rastvorljivost u rastvaraču. Takođe, porast temperature uzrokuje smanjenje površinskog napona i viskoznosti rastvarača što kao posledicu ima povećavanje stepena vlaženja i nivoa prodiranja rastvarača kroz matriks (Eskilsson i Björklund, 2000; Mandal et al., 2007). Pri mikrotalasnoj ekstrakciji u uređajima zatvorenog tipa može biti postignuta temperatura iznad tačke kjučanja rastvarača. Međutim povećanje temperature pri mikrotalasnoj ekstrakciji nema uvek pozitivan efekat na efikasnost ekstrakcije. Ako su ekstraktivne supstance termolabilne, dolazi do njihove razgradnje pa je ekstrakcija na nižim temperaturama poželjnija u ovom slučaju. Utvrđeno je da viša temperatura i ekstrakciono vreme doprinose efikasnijoj ekstrakciji pod dejstvom mikrotalasa u slučaju fenolnih jedinjenja iz čaja (Spigno i De Faveri, 2009), paradajza (Li et al., 2012) i fenolnih kiselina iz kore mandarina (Ahmad i Langrish, 2012). Pri mikrotalasnoj ekstrakciji flavonoida iz korena biljke *Radix astragali* na 1000 W nađeno je da na temperaturi iznad 110°C prinos ekstrakcije opada usled nestabilnosti flavonoida na ovim temperaturama (Xiao et al., 2008). Dakle, izbor radne temperature mikrotalasne ekstrakcije zavisi od termostabilnosti ciljanih ekstraktivnih supstanci. Nađeno je da promena zapremine utrošenog rastvarača i temperature kao posledicu ima razliku u

sastavu ekstrahovanih fenolnih jedinjenja pa samim tim i razliku antioksidativne aktivnosti dobijenih ekstrakata (Karacabey i Mazza, 2010). Optimalna temperatura ekstrakcije termosenzitivnih jedinjenja nalazi se u opsegu od 50-100°C (Chan et al., 2011).

U poređenju sa konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, ekstrakciono vreme mikrotalasne ekstrakcije je vrlo kratko, od nekoliko minuta do pola sata osim pri mikrotalasnoj ekstrakciji bez upotrebe rastvarača i pri ekstrakciji etarskih ulja za koju je neophodno trajanje od jednog sata (Eskilsson i Björklund, 2000; Chen et al., 2009; Chan et al., 2011). Ekstrakciono vreme je u korelaciji sa operativnom snagom mikrotalasa i temperaturom. Mikrotalasnom ekstrakcijom ploda lovor višnje Karabegović i saradnici (2014) konstatovali su da je ekstrakciono vreme bilo najuticajniji faktor na prinos ekstraktivnih supstanci. Prilikom ekstrakcije fenolnih antioksidanata mikrotalasila sugerisana je kombinacija više temperature i kraćeg vremena ekstrakcije jer duže izlaganje dejstvu mikrotalasa uzrokuje povećanje temperature ekstrakcionog sistema i potencijalnu degradaciju fenola kao i veću potrošnju energije (Chen et al., 2007; Song et al., 2011; Li et al., 2012; Ahmad i Langrish, 2012). Prinos izoflavona pri ekstrakciji *Radix puerariae* rastao je sa povećanjem ekstrakcionog vremena do 8 minuta, nakon čega je daljim produženjem trajanja ekstrakcije porast prinosa izostao (Zhang et al., 2014). Takođe, zapažen je pad prinosa fenolnih jedinjenja produžavanjem trajanja mikrotalasne ekstrakcije izvedene angažovanjem većih vrednosti snage mikrotalasa (Song et al., 2011).

Ukoliko je neophodno da se mikrotalasna ekstrakcija izvede u dužem vremenskom trajanju, rizik od termalne degradacije termolabilnih ekstraktibilnih jedinjenja može se smanjiti izvođenjem ekstrakcije u više kraćih ciklusa. To se može postići dodavanjem svežeg rastvarača iscrpljenom biljnom ostatku nakon prvog ciklusa ekstrakcije uz potreban broj ponavljanja kako bi se osigurala potpuna ekstrakcija materijala. Ukupan broj ciklusa trebalo bi da je funkciji optimalne potrošnje rastvarača i izvođenja ekstrakcije (Chen et al., 2007).

#### **2.9.2.4. Osobine uzorka i predtretman**

Različite supstance apsorbuju mikrotalasnu energiju u različitom obimu tako da će stepen zagrejanosti sistema zavistiti od upotrebljenih supstanci. Kod nehomogenih uzoraka, u smislu hemijske strukture ili dielektričnih karakteristika (ili oni koji sadrže različite hemijske vrste), može se javiti selektivno zagrevanje nekih delova ili komponenti uzorka (ovaj fenomen poznat je

kao pregrevanje). Svojstva matrice (veličina čestica, sadržaj vlage) u kojoj su vezana ciljana bioaktivna jedinjenja koja se ekstrahuju mogu imati znatan uticaj na efikasnost mikrotalasne ekstrakcije (Eskilsson i Björklund, 2000). Moguće je da čestice suviše malih dimenzija mogu kasnije biti uzrok otežanoj separaciji ekstrakta od iscrpljenog biljnog materijala i zahtevnijeg prečišćavanja ekstrakta (Chan et al., 2011). U nekim slučajevima efikasnost mikrotalasne ekstrakcije zavisi od koncentracije ekstraktivnih supstanci u uzorku (Eskilsson i Björklund, 2000).

Predtretman uzoraka koji se ekstrahuje kao što su postupci sušenja (na vazduhu ili zamrzavanjem), homogenizacije, sitnjenja materijala (veličina čestica kreće se u opsegu od 100 nm do 2 mm) ili dodavanje absorbenta (na primer  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) tečnim uzorcima (sokovima) predstavlja u nekim slučajevima neophodan preduslov povećanja efikasnosti ekstrakcionog procesa (Eskilsson i Björklund, 2000). U mnogim slučajevima su postojanje vlage u matrici ili predtretman suvog biljnog materijala vodom povećali prinos mikrotalasne ekstrakcije (Wang i Weller, 2006). Osim što povećava polarnost rastvarača, dodata voda ili ona koja se prirodno već nalazi u matriksu, imaće uticaja i na absorbciona svojstva rastvarača prema mikrotalasima, a samim tim i na efikasnost zagrevanja. Prisutna voda takođe može poboljšati bubrenje materijala i/ili uticati na interakcije na liniji matriks- ekstraktivne supstance čineći ih dostupnijim delovanju rastvarača (Eskilsson i Björklund, 2000).

### **2.9.3. Primena mikrotalasne ekstrakcije**

Prvi put su Abu-Samra i saradnici (1975) koristili kućnu mikrotalasnu pećnicu za određivanje tragova metala u biološkim uzorcima, a tokom godina je zagrevanje mikrotalasima zamenilo u mnogim slučajevima konvencionalne tehnike zagrevanja. Tehnike koje koriste dejstvo mikrotalasa vremenom su našle primenu i u drugim laboratorijskim procesima (sušenje uzorka, merenje vlage, separacija rastvorenih uzoraka), a Ganzler i saradnici (1986) su publikovali rezultate mikrotalasne ekstrakcije masti iz hrane i pesticida iz uzoraka zemljišta. Oni su upotrebom konvencionalne kuhinjske mikrotalasne pećnice i rastvarača koji se inače koriste pri Soxhlet-ovoj ekstrakciji dobili rezultate prinosa ekstrakcije koji su bili uporedivi sa vrednostima dobijenim klasičnim ekstrakcionim metodama, ali za znatno kraće vreme. Godine 1991. prvi put

su postupkom mikrotalasne ekstrakcije industrijski ekstrahovana etarska ulja iz biljnog materijala (Eskilsson i Björklund, 2000).

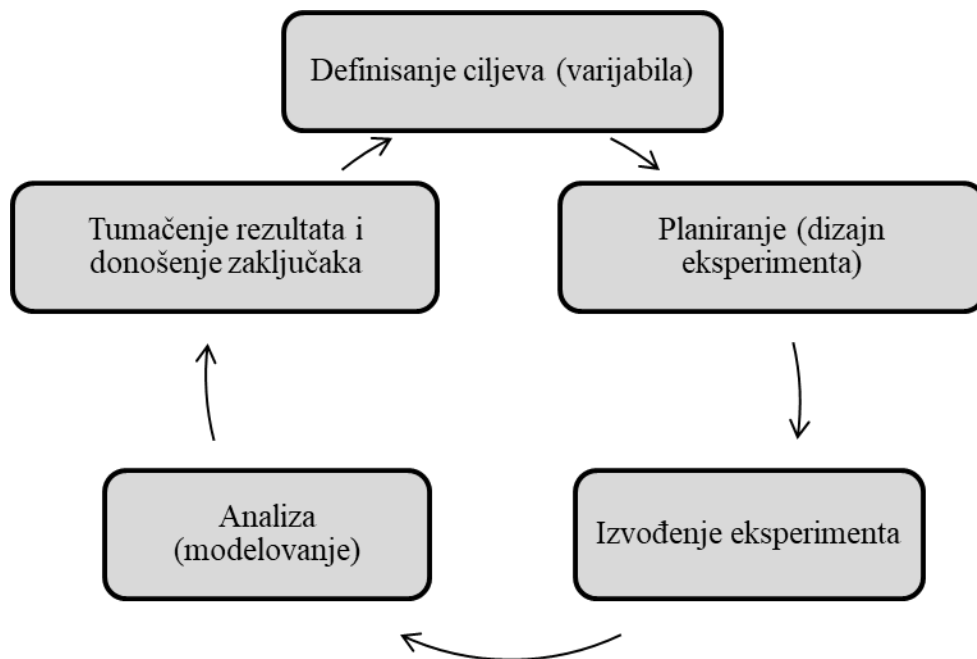
Američka agencija za zaštitu životne sredine (US Environmental Protection Agency, EPA) inicirala je primenu novih tehnika ispitivanja uzoraka zemljišta, vode i hrane. Tako su pod dejstvom mikrotalasa ekstrahovani organski zagađivači kao što su: policiklični aromatični ugljeni hidrati, polihlorovani bifenili, pesticidi, fenoli i metali iz različitih matriksa (zemljišta, sdimenata i atmosfernih čestica) (Eskilsson i Björklund, 2000).

U brojnim slučajevima mikrotalasi su uspešno primenjeni za ekstrakciju sekundarnih metabolita biljaka. U poređenju sa klasičnom ekstrakcijom sa refluksum, primenom mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz aromatičnog bilja (ruzmarina, origana, majorana) smanjeno je vreme trajanja ekstrakcije, potrošnja rastvarača i povećan prinos ekstraktivnih jedinjenja (Proestos i Komaitis, 2008). Takođe, veća antioksidativna aktivnost fenolnog ekstrakta ploda longana (*Dimocarpus longan*) (Pan et al., 2008), ekstrakta antioksidativnih jedinjenja iz ljuske kikirikija (Ballard et al., 2010) i paradajza (Li et al., 2012) su dobijena primenom mikrotalasne u odnosu na klasičnu ekstrakciju. Neuporedivo veći prinos ekstraktivnih supstanci i kraće ekstrakciono vreme u odnosu na Soxhlet ekstrakciju i maceraciju, postignut je mikrotalasnom ekstrakcijom kurkumina iz *Curcuma longa* (Mandal et al., 2008). Pri ispitivanju efikasnosti ekstrakcije antioksidativnih jedinjenja iz biljke *Potentilla atrosanguinea* Lodd. najveći prinos ekstraktivnih supstanci dobijen je primenom ekstrakcije po Soxhlet-u zatim, mikrotalasima, ultrazvukom, a najmanji prinos dobijen je maceracijom. Međutim, imajući u vidu potrošnju rastvarača (50% etanol u svim slučajevima) i vreme trajanja ekstrakcije, utvrđeno je da je mikrotalasna ekstrakcija najpraktičnija metoda za brzu i efikasnu ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja. Neznatno veći prinos kod Soxhlet ekstrakcije može se pripisati znatno dužem trajanju ekstrakcije u odnosu na druge tehnike (Kalia et al., 2008). Pri optimalnim uslovima mikrotalasna ekstrakcija vinskog sedimenta ispoljila je bolju efikasnost u znatno manjem vremenskom periodu (17 min) u odnosu na klasičnu maceraciju (24 h) (Pérez-Serradilla i Luque de Castro, 2011). Mikrotalasnom ekstrakcijom polifenola i kafeina iz čaja u trajanju od samo 4 minuta ostvaren je veći prinos i selektivnost ekstrakcije u poređenju sa maceracijom na sobnoj temperaturi (20 sati), ultrazvučnom ekstrakcijom (90 min) i ekstrakcijom sa refluksum (45 min) (Pan et al., 2003). Sa aspekta ekstrakcinog vremena i prinosa utvrđeno je da je mikrotalasna ekstrakcija predstavlja najbolju metodu za ekstrakciju kumarina i kumarinske kiseline iz biljke *Melilotus officinalis* u

odnosu na ultrazvučnu i ekstrakciju po Soxhlet-u (Martino et al., 2006). Za samo 2 min mikrotalasima je dobijen isti prinos ekstrakcije fenola iz lišća slatkog krompira kao i pri klasičnoj ekstrakciji rastvaračem u trajanju od 120 min (Song et al., 2011). Kerem i saradnici (2005) utvrdili su da su ekstrakti saponina iz leblebije dobijeni Soxhlet ekstrakcijom (3 h) i mikrotalasima (20 min) imali isti kvalitativni i kvantitativni profil.

## ***2.10. Optimizacija procesa ekstrakcije***

Optimizacija je metoda koja se koristi za poboljšanja performansi proizvodnog procesa i postizanje maksimalnog prinosa uz minimalne troškove (Bas i Boyaci, 2007). Termin optimizacija predstavlja postupak nalaženja uslova koji bi primenjeni na proces proizveli najbolji mogući učinak (Bezerra et al., 2008). Najefikasniji način optimizacije zasniva se na dobrom prvobitnom planiranju eksperimenta i razvijanju eksperimentalnog dizajna (engl. design of experiments, DOE) što je postupak odabira i kontrolisanja najvažnijih parametara koji utiču na proces uz korišćenje statističkih kompjuterskih programa i izvođenje eksperimenta prema unapred definisanom planu (Keskin Gündogdu et al., 2016). Statistički pristup planiranja procesa (eksperimenta) baziran je na sledećim segmentima: definisanje problematike eksperimenta, izbor zavisno promenljivih (izlazne varijable), izbor nezavisno promenljivih (ulazne varijable) odnosno faktora, izbor nivoa (vrednosti) i opsega, izbor eksperimentalnog dizajna, izvođenje eksperimenta, statistička analiza eksperimentanih podataka, zaključci i komentari (Marinković, 1994). Inicijalni pristup planiranju procesa šematski je prikazan na slici 2.9.



Sliak 2.9 Inicijalni pristup planiranju procesa (adaptirano prema Hanrahan i Lu, 2006)

Klasičnim tehnikama određivanje optimalnih uslova procesa vrši se praćenjem uticaja jednog parametra u određenom vremenu na izvesni eksperimentalni rezultat (odziv). Dok se varira nivo (tj. vrednost) samo jednog parametra, ostali se održavaju na konstantnom nivou pa je ovo takozvana jednovarijabilna (jednofaktorna) tehnika (“one variable at a time”) (Bezerra et al., 2008). Glavni nedostatak ovakvog pristupa je što ne uključuje interaktivne efekte među ispitivanim varijabilama tako da je onemogućeno potpuno sagledavanje efekata parametara na proces (Bas i Boyaci, 2007). Ove metode, zasnovane uglavnom na iskustvu i intuiciji, iziskuju povećan broj eksperimenata neophodnih za realizaciju ispitivanja kojima se produžava vreme trajanja procesa uz rast troškova kao i potrošnje reagenasa i materijala. U cilju prevazilaženja ovih nedostataka primenjuju se takozvane multivarijabilne (višefaktorne) statističke (regresione i disperzione) analize od kojih su neke od najčešće korišćenih: metoda odzivnih površina (engl. Response Surface methodology, RSM) (Czitrom, 1999; Bezerra et al., 2008) i metoda zasnovana na primeni veštačke neuronske mreže (engl. Artificial Neural Network, ANN).



### 2.10.1. Metoda odzivnih površina

Metoda odzivnih površina (RSM) je skup matematičkih i statističkih metoda zasnovanih na uklapanju polinomnih jednačina sa eksperimentalnim podacima dobijenih iz adekvatno planiranih eksperimenata, a koje moraju opisati ponašanje skupa podataka u cilju statističkog predviđanja. Ovu metodologiju razvili su Box i saradnici pedesetih godina prošlog veka (Bezerra et al., 2008). RSM definiše efekat nezavisnih varijabla, samostalno ili u kombinaciji, na proces i generiše matematički model koji ga opisuje. Istovremeno je moguće optimizovati i nivoe ovih varijabla kako bi se postigla najveća efikasnost sistema. Zato ova eksperimentalna metodologija ima važnu primenu u razvoju i formulaciji novih kao i usavršavanju postojećih proizvoda. Sam termin metoda odzivnih površina povezan je i sa grafičkim predstavljanjem matematičkog modela (Bas i Boyaci, 2007). Termini koji se najčešće koriste primenom RSM su (Bezerra et al., 2008):

- Domen eksperimenta je polje istraživanja u kome se eksperiment realizuje, a definisan je minimalnom i maksimalnom vrednošću eksperimentalnih varijabla.
- Eksperimentalni dizajn predstavlja skup eksperimenata koji je definisan matricom sastavljenom od različitih nivoa kombinacija ispitivanih varijabla (koje se moraju eksperimentalno primeniti u cilju dobijanja odgovora tj. odziva).
- Faktori ili nezavisno promenljive (nezavisne varijabile) su eksperimentalne varijabile koje se mogu menjati nezavisno jedna od druge (pH, temperatura, koncentracija reagensa, vreme trajanja procesa, mikrotalasna snaga, brzina protoka itd.)
- Nivoi varijabla, odnosno nezavisno promenljivih, su različite vrednosti varijabla na kojima se eksperimenti moraju realizovati.
- Odzivi ili zavisno promenljive (zavisne varijabile) predstavljaju praćene izlazne vrednosti sistema. Na primer, to mogu biti prinos ekstraktivnih materija, sadržaj željene komponente, neka karakteristika dobijenog proizvoda zavisna od ulaznih parametara sistema.
- Rezidual ili ostatak je razlika između izračunatog i eksperimentalnog rezultata za određeni skup uslova. Dobar matematički model koji odgovara eksperimentalnim podacima trebalo bi da ima nizak nivo reziduala.

Generalno, proces optimizacije primenom RSM sastoji se iz sledećih faza (Bezerra et al., 2008; Nwabueze, 2010):

1. izbor nezavisno promenljivih sa najvećim uticajem na sistem u odnosu na ciljeve eksperimenta, a na osnovu preliminarnih ispitivanja, literaturnih podataka i iskustva istraživača
2. izbor eksperimentalnog dizajna i izvođenje eksperimenta prema izabranoj eksperimentalnoj matrici
3. matematičko-statistička analiza dobijenih eksperimentalnih podataka i pregled matematičkog modela
4. provera adekvatnosti modela
5. predlaganje optimalnih uslova procesa odnosno dobijanje optimalnih vrednosti za svaku ispitivanu varijabilu

#### Izbor nezavisno promenljivih parametara i određivanje njihovih nivoa

Ispitivani proces (ili sistem) može biti izložen delovanju velikog broja parametara i praktično je nemoguće odrediti i kontrolisati uticaje svakog od njih. Zato je neophodno izabrati parametre sa najvećim efektom na ispitivani proces i odrediti njihove nivoe jer je efikasnost optimizacije upravo u funkciji pravilnog odabira nivoa parametara i njihovih opsega (Bezerra et al., 2008). Kako svi parametri nemaju iste jedinice ili se ne mogu testirati na istom nivou ili u istom opsegu, regresiona analiza se može izvršiti tek nakon takozvanog kodiranja parametara (odnosno njihovih realnih vrednosti). Standardna jednačina za kodiranje realnih vrednosti parametara je data sledećim izrazom (2.2) (Bas i Boyaci, 2007):

$$X = \frac{x - [x_{max} + x_{min}]/2}{[x_{max} - x_{min}]/2} \quad (2.2)$$

gde je  $x$  – realna vrednost promenljive,  $X$  – kodirana vrednost promenljive,  $x_{max}$  – maksimalna vrednost realne vrednosti promenljive i  $x_{min}$  – minimalna vrednost realne vrednosti promenljive.

## Izbor odgovarajućeg eksperimentalnog dizajna i matematičkog modela

Izbor odgovarajućeg eksperimentalnog dizajna zavisi od ciljeva eksperimenta i broja ispitivanih faktora, odnosno baziran je na početnom eksperimentalnom planiranju. Pomoću faktorijalnog dizajna mogu se definisati faktori koji su značajni i na kojim nivoima. U statistici, dizajn koji se sastoji od dva ili više faktora koji su u međusobnoj interakciji na različitim nivoima naziva se potpuni faktorijalni dizajn (Keskin Gündogdu et al., 2016). Obično se primenjuje potpuni faktorijalni dizajn na dva nivoa (opisan kao  $2^k$ -dizajn, definiše kvadrat u faktorijalnom prostoru) i potpuni faktorijalni dizajn na tri nivoa (opisan kao  $3^k$ -dizajn, definiše kub u faktorijalnom prostoru) kojim se realizuje veći broj eksperimenata što se može izračunati korišćenjem izraza 2.3 (Hanrahan i Lu, 2006):

$$N = 3^k \quad (2.3)$$

gde je  $N$  broj eksperimenata,  $k$  je broj faktora, a 3 predstavlja broj nivoa faktora.

Primena punog faktorijalnog dizajna publikovana je u mnogim istraživanjima (Karabegović et al., 2014; Karabegović et al., 2015; Arasi et al., 2016; Ćujić et al., 2016). Centralni kompozitni (CCD) i Box-Behnken (BBD) dizajn najčešće se koriste pri optimizaciji eksperimenta (Ballard et al., 2010; Kulshrestha et al., 2012; Li et al., 2012; Aybastier et al., 2013; Zhang et al., 2014; Lingzhu et al., 2015; Oliveira et al., 2016; Zhu et al., 2016). Kod centralnog kompozitnog dizajna (sa tri grupe tačaka: frakciono-faktorijalne, centralne i aksijalne tačke kojima se može vršiti procena kvadratnih efekata tj. zakrivljenost površine odziva) svi faktori variraju se na minimalno tri nivoa (procenjuju se koeficijenti kvadratnog modela aproksimativne funkcije čiji maksimum ili minimum određuju optimalne vrednosti faktora). Box-Behnken ne sadrži kombinacije parametara u kojima svi faktori imaju svoje maksimalne ili minimalne nivoe čime se izbegavaju ekstremni uslovi eksperimentisanja pri kojima može doći do znatnih odstupanja (Hanrahan i Lu, 2006, Bezerra et al., 2008).

Ređe korišćen ali u pojedinim slučajevima efikasniji je Doehlert-ov (DM) eksperimentalni dizajn (Hanrahan i Lu, 2006), a tu su još Plackett-Burmann-ov i Tagučijev eksperimentalni dizajn. Razlikuju se po odabiru eksperimentalnih tačaka, broju nivoa varijabila, broju ponavljanja i blokova (Bezerra et al., 2008).

Nalaženje adekvatne aproksimacije realne zavisnosti između faktora i odziva ispitivanog sistema (u najvećem broju slučajeva, korišćenjem polinomnih funkcija prvog ili drugog reda) je suština izbora odgovarajućeg matematičkog modela (Bezerra et al., 2008).

Najjednostavniji model koji se može primeniti u RSM baziran je na linearnoj funkciji pri čemu je neophodno da se dobijeni odzivi dobro uklapaju u jednačinu 2.4 (Bezerra et al., 2008):

$$y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (2.4)$$

gde je  $k$  broj promenljivih,  $\beta_0$  konstanta,  $\beta_i$  koeficijent linearnih promenljivih,  $x_i$  predstavlja promenljive i  $\varepsilon$  je ostatak (residual) koji se odnosi na eksperiment.

Sledeći nivo polinomnog modela trebalo bi da sadrži dodatne pojmove koji opisuju interakcije između različitih variranih procesnih parametara takozvanim interaktivnim modelima oblika datog izrazom 2.5 (Bezerra et al., 2008):

$$y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2.5)$$

gde je  $\beta_{ij}$  koeficijent interakcije parametara.

U cilju određivanja kritičnih tačaka (maksimum, minimum ili pregib), neophodno je da polinomne funkcije drugog reda uključuju i kvadratne efekte promenljivih (kvadratni model), a za procenu parametra eksperimentalnim dizajnom (u jednačini 2.6) je neophodno omogućiti da su sve ispitivane promenljive varirane na najmanje tri nivoa (Bezerra et al., 2008):

$$y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2.6)$$

gde je  $\beta_{ii}$  koeficijent kvadratnih parametara.

### Provera adekvatnosti matematičkog modela

Izabrani matematički model bi trebalo da na adekvatan način opisuje odnos između faktora i odziva, odnosno između nezavisno promenljivih i zavisno promenljivih tako da je neophodno izvršiti proveru njegove adekvatnosti, procenu tačnosti predviđanja kao i utvrđivanje značajnosti individualnih i kombinovanih uticaja ispitivanih faktora. Pouzdano rešenje ovog problema predstavlja primena analize varijanse (ANOVA) adekvatnosti primenjenog matematičkog modela na dobijene eksperimentalne podatke upotrebom multipne regresije. U upotrebi je više

kriterijuma. F-testom (koji primenjuje Fisher-ovu distribuciju) proverava se slaganje matematičkog modela sa eksperimentalnim podacima i analiza stepena značajnosti faktora. “Lack of fit” testom ispituje se da li eksperimentalna greška može predstavljati objašnjenje neusklađenosti odziva eksperimentom dobijenih i odziva predviđenih matematičkim modelom (Hanrahan i Lu, 2006; Bas i Boyaci, 2007; Bezerra et al., 2008). Procenat ukupnih varijacija koje je moguće objasniti predloženim matematičkim modelom sadržan je u koeficijentu determinacije  $R^2$  i korigovanom koeficijentu determinacije  $R^2_{adj}$ . Potrebno ih je odrediti zbog pojave varijacija u podacima bez obzira na statističku značajnost primenjenog modela. Navedeni koeficijenti imaju vrednost približno jedan ako je matematički model optimalno izabran (Nwabueze, 2010; Vera Candiotti et al., 2014).

Individualni i kombinovani efekti ispitivanih faktora analiziraju se na bazi apsolutnih vrednosti koeficijenata matematičkog modela (kodiranih vrednosti faktora). Studentov  $t$ -test, grafik verovatnoće normalne raspodele ili F-test uobičajna su sredstva procene statističke značajnosti. Pozitivni predznak koeficijenta implicira da pozitivna promena faktora izaziva povećanje vrednosti analiziranog odziva, a veća vrednost koeficijenta implicira veći efekat faktora na analizirani odziv (Bezerra et al., 2008).

#### Predlaganje optimalnih uslova procesa

Optimizacija procesa predstavlja pronalaženje uslova pod kojima se dobijaju maksimalne vrednosti praćenih zavisnih varijabla. Međutim, u složenim realnim sistemima najčešće postoji potreba istovremene optimizacije više praćenih zavisnih varijabla, gde optimalni uslovi za jedan odgovor sistema nisu ujedno optimalni i za druge (Castillo, 2007). Simultano definisanje jednog opšteg rešenja dobija se različitim tehnikama multikriterijalne optimizacije, a jedna od njih je primena Deringerove funkcije poželjnih odgovora (Derringer's desirability function). Ovim se i eksperimentalno dobijeni i predviđeni odzivi transformišu u vrednosti (engl. desirabilities,  $d_i$ ) koje se nalaze na istoj skali i kombinuju dajući jedinstven zajednički odziv sa maksimalnom vrednošću odzivne veličine. Skala ima vrednosti od 0 (neželjeni odziv) do 1 (željeni odziv). U zavisnosti da li je cilj da se određeni odgovor maksimizira, minimizira ili dostigne unapred definisanu vrednost koriste se različite transformacije, i to najčešće linearne. Ukupna funkcija poželjnih odziva-D formira se kombinovanjem pojedinačnih funkcija korišćenjem sledeće formule (2.7) (Derringer i Suich, 1980):

$$D = (d_1 * d_2 * d_3 * \dots * d_n)^{\frac{1}{n}} = (\prod_{i=1}^n d_i)^{\frac{1}{n}} \quad (2.7)$$

gde je  $d_i$  funkcija poželjnih odgovora pojedinačnih odziva, a  $i$  predstavlja broj praćenih odziva sistema.

Vrednost  $D$  ukazuje na stepen dostizanja optimalnog operativnog stanja sistema (približavljem vrednosti  $D$  jedinici) jer pri  $D=0$ , svi odzivi sistema imaju nepoželjnu vrednost, dok su pri  $D=1$ , svi odzivi sistema sa poželjnom vrednošću (Jeong i Kim, 2009).

### Grafičko predstavljanje jednačine modela

Grafičko predstavljanje jednačine modela predstavlja vizuelizaciju analize kombinovanih uticaja ispitivanih faktora na odzive sistema, a dato je u formi dvodimenzionalnog (2D) i trodimenzionalnog (3D) dijagrama (Nwabueze, 2010). 3D dijagram tj. odzivna površina predstavlja površinu odziva kojom se prikazuje tip interakcije dve ispitivane promenljive i odnosa između odziva i eksperimentalnih nivoa svake promenljive, pri čemu u nekim slučajevima omogućava određivanje optimalnih vrednosti. 2D dijagram je u formi konturnog dijagrama, a generiše se variranjem vrednosti jedne promenljive u odnosu na x-osu dok druge dve promenljive ostaju konstantne na nultom nivou. Različiti oblici konturnih ploča ovde označavaju različite interakcije između promenljivih. Centar kruga ili elipse kod kontur dijagrama predstavlja maksimalnu ili minimalnu vrednost odziva. Kontur dijagram u obliku hiperbole ili parabole ima fiksnu tačku u prevojnoj tački koja ne predstavlja ni minimum ni maksimum odziva. Fiksna tačka predstavlja tačku u kojoj je prvi izvod jednačine modela jednak nuli bez obzira da li je ona minimalna ili maksimalna (Bas i Boyaci, 2007; Zhang et al., 2014).

### **2.10.2. Veštačke neuronske mreže**

Veštačke neuronske mreže (ANN) pružaju mogućnost nelinearnog modelovanja odzivnih površina i optimizacije procesa u raznim naučnim disciplinama. Kao tehnika modelovanja veštačka neuronska mreža predstavlja alternativu metodi odzivnih površina i uspešno može zameniti metodu polinomne regresije (Bezerra et al., 2008). Kao i metoda odzivnih površina i veštačka neuronska mreža je uspešna matematička metoda pogodna za modelovanje i simulaciju

različitih procesa u realnim aplikacijama. I jedna i druga metoda ne zahtevaju eksplicitno izražavanje fizičkog značenja sistema ili procesa koji se ispituje i zato obe pripadaju tehnikama modelovanja koje se bave razvojem neparametarskih simulativnih modela (Marchitan et al., 2010). Ovim modelima prikazuju se funkcionalni odnosi između ulaznih varijabla i izlaza (odgovora) procesa upotrebom eksperimentalnih podataka. Takođe, modeli se koriste za procenu optimalnih vrednosti ulaznih varijabla u cilju maksimiziranja ili minimiziranja odziva (odgovora) (Marchitan et al., 2010).

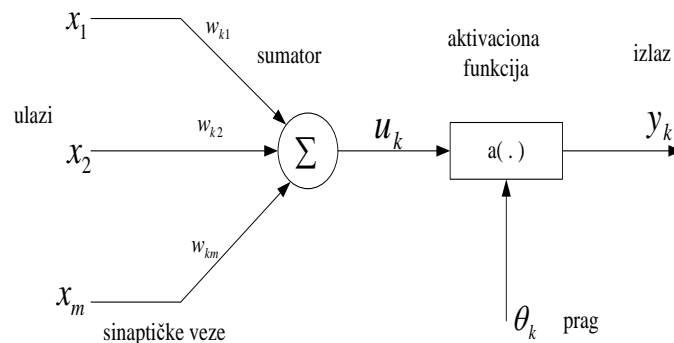
Polinomnu funkciju (kao što je linearna ili kvadratna) podvrgnutu regresiji neophodno je precizno definisati primenom klasične RSM. Takođe, broj članova (faktora) u polinomu je ograničen brojem tačaka eksperimentalnog dizajna, a izbor odgovarajuće jednačine polinoma može biti izuzetno opterećujući jer svaki od odgovora zahteva sopstvenu polinomnu jednačinu (Bezerra et al., 2008). ANN omogućava modelovanje složenih odnosa, posebno nelinearnih koji se mogu istražiti bez komplikovanih jednačina. ANN analiza je prilično fleksibilna po broju i formi eksperimentalnih podataka što omogućava korišćenje manje formalnih eksperimentalnih dizajna u odnosu na one sa statističkim pristupom. Takođe, modeli neuronskih mreža mogu imati bolju moć predviđanja od regresionih modela. Regresione analize zavise od unapred utvrđenih nivoa statističke značajnosti, a manje značajni članovi (faktori) obično nisu uključeni u model. Sa ANN metodom koriste se svi podaci što modelu obezbeđuje potencijalno veću tačnost (Bezerra et al., 2008). U nekim slučajevima, primenom ANN-GA (Genetski algoritam, GA) prevaziđena su ograničenja kvadrantnog polinomnog modela u rešavanju problema optimizacije.

ANN su inspirisane uređenjem cerebralnih mreža i sastavljene su od grupa međusobno povezanih procesnih elemenata koji se nazivaju neuroni (Bezerra et al., 2008). Naime, primena ANN za obradu podataka može se predstaviti pojednostavljenom analogijom sa biološkim neuronima. Svaki neuron je povezan sa određenim susedima sa različitim propusnim koeficijentima povezivanja koji predstavljaju težinu (jačinu) ovih veza sličnih sinapsama (Spanilá, et al., 2005). Mreža veštačkih neurona sastoji se od velikog broja jednostavnih, međusobno povezanih elemenata procesa (neurona) koji rade paralelno pružajući izlazni odgovor na ulazne podatke (Sarkar et al., 2009). Modelovanje primenom ANN može se realizovati pomoću računara koji uči iz primera putem iteracija, tako da nije neophodno prethodno poznavanje veza između procesnih parametara (Mohd et al., 2003).

## Model veštačkog neurona

Veštački neuroni ostvaruju svoje sinapse, odnosno veze, preko prilagodljivih težinskih koeficijenata tj. težina veza (weight). Telo neurona je čvor (jedinica), a ANN poseduje arhitekturu sa velikim brojem čvorova i veza. Funkcije neurona, relativno jednostavne (linearne) povezane u višeslojnoj mreži, imaju sposobnost obrade vrlo složenih (nelinearnih) funkcija. Najviše korišćen transfer funkcija za rešavanje linearnih i nelinearnih problema regresije je sigmoidna funkcija (lin, log, inv tan, gausova funkcija) (Hagan et al., 1996). Model veštačkog neurona prikazan je na slici 2.10.

Ulazne vrednosti označene su kao  $x_1, x_2, \dots, x_n$ , a  $n$  je ukupan broj ulaza u neuron.  $\{w_{ij}\}$  predstavlja skup sinaptičkih težina, a sumator (linearni kombajner) daje težinsku sumu ulaza. Amplituda izlaznog signala veštačkog neurona ograničena je aktivacionom funkcijom (za normalizaciju izlaza koristi se interval  $[0,1]$  ili  $[-1,1]$ ).



Slika 2.10 Model veštačkog neurona

Veličina  $u_k$  primenjuje se kao ulaz u nelinearnu funkciju  $a$ . Vrednost  $u_k$  predstavlja zbir vrednosti dobijenih tako što se ulazne vrednosti množe težinskim koeficijentom  $w_{ij}, j=1,2,\dots,n$  (gde je  $i$  redni broj neurona u ANN) što je predstavljeno u jednačini (2.8).

$$u_k = \sum_{j=1}^m w_{kj} x_j \quad (2.8)$$

Parametar  $\theta$  predstavlja prag aktivacije od koga zavisi nelinearna funkcija  $a$ . Ova zavisnost predstavljena je jednačinom (2.9) što je istovremeno vrednost izlaza ( $y_k$ )  $k$  - tog neurona:



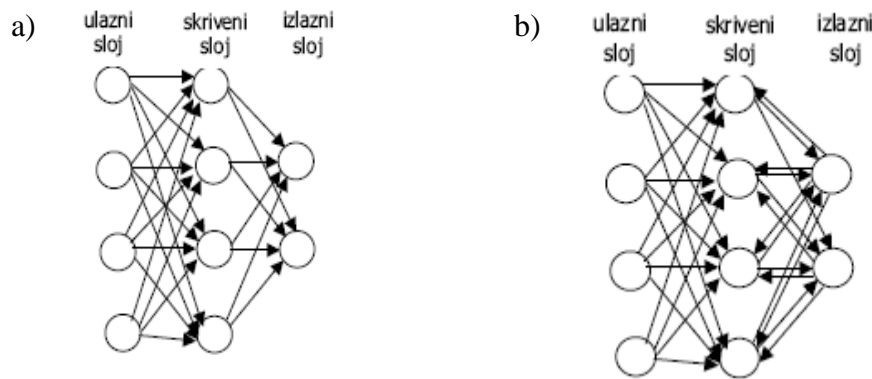
$$y_k = a \cdot (u_k - \theta_k) \quad (2.9)$$

Težinski faktori ( $w_{ij}$ ) mogu se menjat odnosno prilagođavati ulaznim i izlaznim podacima u cilju dobijanja minimalne greške koja se odnosi na zadati cilj ispitivanja. Ovo je takozvano obučavanje (treniranje) vestačke neuronske mreže (Izadifar i Abdolahi, 2006).

### Arhitektura ANN

Šema interkonekcije među neuronima zove se arhitektura mreže ili topologija (Marchitan et al., 2010). Neuron su uređeni u formi serije slojeva: ulazni sloj (koji predstavlja nezavisno promenljive), skriveni sloj (ili slojevi koji povezuju ulaze i izlaze) i izlazni sloj sa neuronima koji predstavljaju zavisno promenljive (Bezerra et al., 2008). Ulazni neuroni prihvataju ulazne podatke koji prilagođavaju uzorak za procesuiranje u mreži, izlazni neuroni pružaju predviđenu vrednost ili obrazac (šablon), a skriveni neuroni čiji su čvorovi skrivene jedinice, pružaju nelinearnost mreže (Spanilá, et al., 2005). Naime, aktivacione funkcije neurona skrivenih slojeva neophodne su da bi ANN bila sposobna da nauči nelinearne funkcije (inače bi potencijali neurona skrivenih slojeva bili svedeni na mogućnosti obične perceptronske mreže sačinjene samo od ulaza i izlaza). Struktura mreže okarakterisana je brojem nivoa i brojem čvorova po nivou. Svaki sloj prima izlazne podatke iz prethodnog sloja a svoje izlazne podatke šalje narednom sloju. Po topologiji ANN se razikuju prema broju neuronskih slojeva, a u praksi najčešće korišćena arhitektura neuronske mreže koja se koristi za rešavanje nelinearnih regresionih problema je neuronska mreža višeslojnog prenosa (Multi-Layer), poznata kao višeslojni perceptron, MLP (Marchitan et al., 2010).

Prema smeru prostiranja informacija kroz mrežu ANN može imati dva oblika. Prvi je ANN sa prostiranjem signala unapred-Feedforward (nepovratna) kod koje se propagacija (širenje signala) vrši samo u jednom smeru, od ulaza prema izlazu što je prikazano na slici 2.11a. Primer je višeslojni perceptron sa backpropagation algoritmom. Rekurentna ANN, prikazana na slici 2.11b okarakterisana je time da viši slojevi neurona vraćaju informacije odnosno izlaz u niže slojeve. Primer je Celularna neuronska mreža, dvostruka asocijativna neuronska mreža itd.



Slika 2.11 Višeslojna neuronska mreža sa prostiranjem signala unapred (a) i rekurntna neuronska mreža (b)

### Obučavanje neuronske mreže

Obučavanje (engl. training) mreže je važna faza metodologije modelovanja mreže. Podaci generisani eksperimentalnim dizajnom mogu se upotrebiti kao važeći ulazi (inputi) kao i izlazi (autputi) za obučavanje ANN. Treniranje se sprovodi prilagođavanjem snage veze između neurona sa ciljem da se izlazi (predviđeni odgovori tj. odzivi) celokupne mreže prilagode tako da budu bliži željenim izlazima (eksperimentalni odzivi) ili da se minimizira suma podataka za treniranje. Tokom faze treniranja svaki neuron prima ulazni signal  $x_j$  iz  $n$  neurona grupišući ih korišćenjem težina ( $w_{ij}$ ) veze (sinapse) i prenoseći rezultate nakon odgovarajuće transformacije u vidu izlaznog signala  $y_j$  kao funkciju sume, prema jednačini 2.10 (Bezerra et al., 2008):

$$y_i = f\left(\sum_{i=1}^n x_i w_{ij}\right) \quad (2.10)$$

gde je  $f$  fukcija transfera neophodna za transformaciju težine sume svih signala povezanih sa neuronom. Najčešćće primenjena funkcija transfera predstavljena je jednačinom 2.11 (Bezerra et al., 2008):

$$f=1/(1+e^{-cz}) \quad (2.11)$$

gde je  $c$  konstanta koja određuje nagib sigmoidne funkcije.

Naime, suma ulaza određenih vrednosti se transformiše funkcijom prenosa i ova funkcija se koristi za dobijanje nivoa izlaza. Proces obučavanja znači da su težine korigovane tako da proizvode predviđene (“tačne”) ciljane vrednosti. Treniranje zahteva setove parova ( $X_s, Y_s$ ) za

unos: stvarni ulaz u mrežu je vektor  $X_s$  a odgovarajući cilj, ili unapred definisani odgovor označen je kao  $Y_s$ . Cilj obučavanja je korigovati sinaptičke težine koje će dati tačne odgovore  $Y_s$  za svaki vektor  $X_s$  iz setova treninga (Spanilá et al., 2005). Faza obučavanja je završena kada je srednja kvadratna greška minimizirana u svim setovima treninga (odnosno kada se odgovor ANN na ulazni podatak u odnosu na očekivani izlaz nalazi u opsegu određene tolerancije greške). Shodno tome, očekuje se da će mreža dati tačna predviđanja za bilo koji novi objekat. Jednom kada je ANN uspešno obučena znači da poseduje dobru sposobnost predviđanja i sposobnost da precizno opisuje površinu odziva čak i bez ikavog znanja o fizičkoj i hemijskoj pozadini modelovanog sistema (Bezerra et al., 2008).

Najčešće korišćen algoritam tokom obučavanja višeslojne neuronske mreže je algoritam povratnog širenja tj. propagacije unazad (engl. back propagation BP) (Sadrzadeh et al., 2008). Obučavanja ANN upotrebom BP algoritma predstavlja optimizaciju procesa koji uključuje minimiziranje funkcija procesa. Obično se kao funkcija procesa uzima srednja kvadratna greška, MSE izražena kao (2.12) (engl. Middle Square Error) (Desai et al., 2008):

$$MSE \sim \sum_j (Z_j - Y_j)^2 \quad (2.12)$$

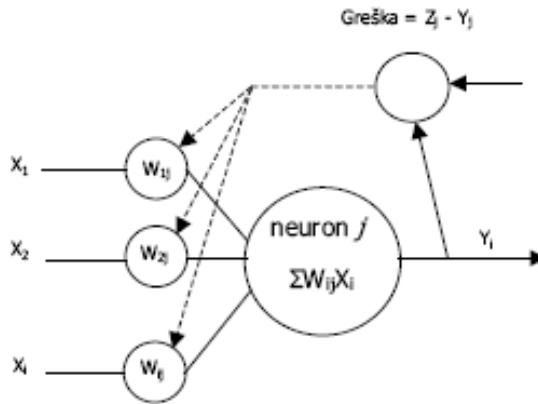
gde su  $Z_j$  i  $Y_j$  željeni i stvarni izlaz, respektivno.

Tokom obučavanja težine se ažuriraju u pravcu negativnog gradijenta. Generalno, pojedinačna iteracija BP algoritma može biti izražena kao (2.13) (Sarkar et al., 2008; Nunes da Silva i Flauzino, 2008):

$$W^{(k+1)} = W^{(k)} - \eta^{(k)} \text{grad}^{(k)}(MSE) \quad (2.13)$$

gde je  $W^{(k)}$  vektor trenutnih težina,  $\text{grad}^{(k)}(MSE)$  je trenutni gradijent procesne funkcije, a  $(k)$  je stopa (nivo) obučavanja.

Šematski prikaz BP dat je na slici 2.12 iz koje se vidi da se proces sastoji iz nekoliko faza: inicijacija (slučajna) težina; unošenje ulaznog vektora i željenog izlaza; propuštanje ulaznog vektora kroz ANN pri čemu se dobija vrednost izračunatog izlaza; izračunavanje greške; korigovanje težine u smeru od izlaznog ka skrivenim slojevima; ponavljanje procesa za ceo set ulaznih vektora do poklapanja vrednosti željenog i stvarnog ulaza, uzimajući u obzir toleranciju greške.



Slika 2.12 Šematski prikaz algoritama povratnog širenja tj. propagacije unazad

ANN je našla primenu u modelovanju i optimizaciji separacionih procesa koji se odnose na ekstrakciju jedinjenja iz raznih tečnih i čvrstih faza (Betiku i Taiwo, 2015; Chouai et al., 2000; Fullana et al., 2000; Mjalli, 2005; Olalere et al., 2017; Sahin et al., 2017; Tambourgi et al., 2006; Messikh et al., 2007; Marchitan et al., 2010)

### Genetički algoritam

Genetički algoritmi (GA) predstavljaju posebnu klasu evolucionih algoritama (EA) koji koriste stohastički pristup pretraživanja prilikom optimizacije procesa. Ovi algoritmi inspirisani su procesom evolucije u prirodi (npr. prirodna selekcija i genetika) (Shopova i Vaklieva-Bancheva, 2006; Reza Pasandideh i Akhavan Niaki, 2006; Marchitan et al., 2010).

Algoritam počinje inicijalnim setom nasumičnih rešenja koja predstavljaju trenutnu populaciju, odnosno:  $\{x_{1}^{(k)}; x_{2}^{(k)}; \dots x_{q}^{(k)}\}$ , gde je  $q$  broj individua (veličina populacije), a  $k$  je broj iteracija poznat kao generacija. Svaka individua u populaciji nazvana je hromozom  $x_j^{(k)}$  koji predstavlja pojedinačni skup ulaznih varijabila koji daje rešenje problema (jednačina 2.14), odnosno:

$$x_j^{(k)} = [x_{j,1}^{(k)} \ x_{j,2}^{(k)} \ \dots \ x_{j,n}^{(k)}]^T \quad (2.14)$$

gde je  $n$  broj ulaznih varijabila.

Komponente vektora predstavljaju vrednosti inputa (ulaznih varijabila) poznatih kao geni; na primer,  $x_{j,2}^{(k)}$  je jedan od gena. Obično su rešenja predstavljena u kodiranom obliku kao binarni nizovi ali su takođe moguća i druga kodiranja (Marchitan et al., 2010).

Svaka individua u trenutnoj populaciji se ocenjuje u smislu vrednosti funkcionalne pogodnosti. Shodno GA terminologiji (terminologiji matematičkog programiranja) funkcionalna pogodnost je identična objektivnoj funkciji (u linearnom programiranju to je funkcija koja teži maksimumu ili minimumu). Procena pogodnosti trenutne populacije može se predstaviti kao:  $\{f(x_1^{(k)}), f(x_2^{(k)}), \dots, f(x_q^{(k)})\}$

Kriterijum za zaustavljanje je verifikovan nakon izračunavanja svih pogodnih vrednosti za svako individualno rešenje (hromozom). Ako kriterijum za zaustavljanje nije zadovoljavajući, onda se neke individue izabrane od strane trenutne populacije (na osnovu rangiranja i sortiranja vrednosti pogodnosti) nazvane roditeljski hromozomi  $\{x_1^{(k)}; x_2^{(k)}; \dots, x_{q-s}^{(k)}\}$  koriste za generisanje generacija novih hromozoma (potomci) koji su zajedno skupljeni u sledećoj generaciji populacija:  $\{x_1^{(k+1)}; x_2^{(k+1)}; \dots, x_q^{(k+1)}\}$  (Marchitan et al., 2010).

U tom cilju, genetski operatori kao što su reprodukcija, krossover i mutacija upotrebljeni su da generišu novu populaciju (Shopova i Vaklieva-Bancheva, 2006; Reza Pasandideh i Akhavan Niaki, 2006; Marchitan et al., 2010). Nakon nekoliko generacija algoritam konvergira ka najboljem hromozomu tj. optimalnom rešenju (Reza Pasandideh i Akhavan Niaki, 2006).

## 3. EKSPERIMENTALNI DEO

### ***3.1. Biljni materijal***

Kao biljni material u ovom radu korišćen je plod aronije (*Aronia melanocarpa* L.) nabavljen kod D.O.O. „Fungo Jug“ Leskovac, Srbija, a poreklom iz Poljske (berba 2012.). Biljni material je nabavljen kao smrznut i za potrebe eksperimenata čuvan na temperaturi od  $-6^{\circ}\text{C}$ . Neposredno pre korišćenja zamrznuti biljni materijal je usitnjen univerzalnim električnim mlinom (Bosch, GmbH Germany).

#### **3.1.1. Određivanje sadržaja vlage**

Sadržaj vlage u korišćenom plodu aronije određen je po standardnom postupku koji propisuje Ph. Jug. V (2000). Odmerena količina usitnjenog ploda aronije (1 g) sušena je u čistoj i izmerenoj posudi u sušnici na  $105^{\circ}\text{C}$ , najpre 120 minuta, a zatim do konstantne mase. Razlika u masi pre i posle sušenja korišćena je za određivanje sadržaja vlage. Sadržaj vlage iznosio je  $75,9 \pm 3,2\%$ .

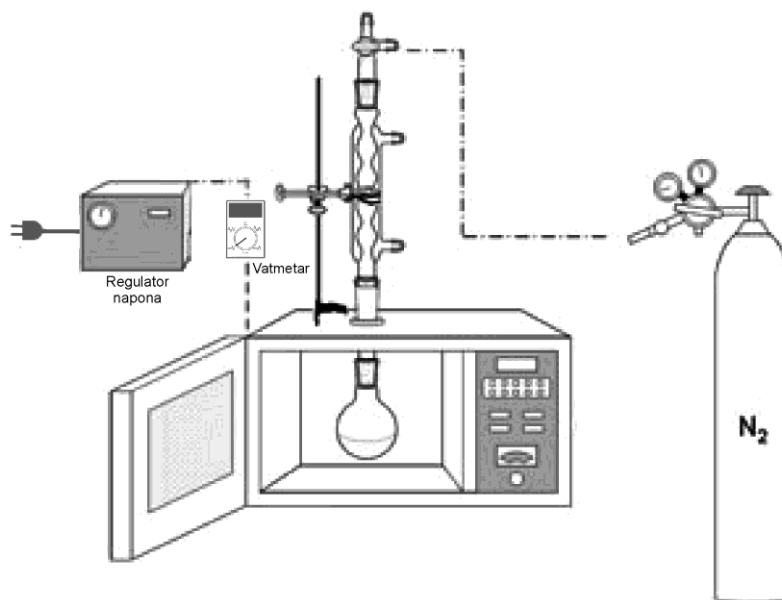
### ***3.2. Reagensi i hemikalije***

Natrijum karbonat, natrijum sulfat, kalijum acetat, aluminijum hlorid, orto-fosforna kiselina i etanol kupljeni su od Merck-Alkaloid (Skopje, BJR Makedonija) a 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), galna kiselina, rutin, troloks, Folin Ciocalteu reagens od Sige (St. Louis, MO).

### ***3.3. Mikrotalasna ekstrakcija***

Mikrotalasna ekstrakcija je izvođena u mikrotalasnoj pećnici (“SAMSUNG”, Tip M1712N, Malaysia) modifikovanoj prema šemi Karabegović i saradnika (2013). Cilj mehaničke i električne modifikacije mikrotalasne pećnice bio je konstruisanje otvorenog ekstrakcionog sistema pod atmosferskim pritiskom, mogućnost regulacije snage mikrotalasa, kao i

obezbeđivanje dejstva mikrotalasa konstantne snage tokom celokupnog trajanja procesa. Šematski prikaz sistema za mikrotalasnú ekstrakciju dat je na slici 3.1.



Slika 3.1 Šema sistema korišćenog za mikrotalasnú ekstrakciju

Usitnjeni biljni materijal (50 g) podvrgnut je mikrotalasnój ekstrakciji sa vodenim rastvorima etanola (250 cm<sup>3</sup>; 25, 50 i 75%) kao rastvaračem. Ekstrakcija je vršena u trajanju od 5, 10 i 15 minuta, pri različitim mikrotalasnim snagama (300, 450 i 600 W). Nakon završene ekstrakcije, tečni ekstrakt je odvajan od iscrpljenog biljnog materijala pod vakuumom na Büchner-ovom levku preko Whatman filter papira (No. 2) i uparavan do suva na rotacionom vakuum uparivaču (800 o/min) na 40°C. Upareni ekstrakt je zatim sušen u sušnici do konstantne mase na temperaturi od 105°C. Ukupan prinos ekstrakcije, izražen kao masa ekstraktivnih substanci (g) u 100 g biljnog materijala, je izračunavan iz mase izdvojenog ekstrakta i mase sveže biljne sirovine.

### ***3.4. Modelovanje i optimizacija procesnih parametara mikrotalasne ekstrakcije***

#### **3.4.1. Planiranje eksperimenta**

Izbor nezavisno promenljivih, odnosno procesnih parametara sa najvećim uticajem na efikasnost mikrotalasne ekstrakcije ploda aronije (koncentracija etanola, mikrotalasna snaga i ekstrakciono

vreme) i zavisno promenljivih (prinos ekstraktivnih supstanci, ukupni sadržaj fenolnih i flavonoidnih jedinjenja i antioksidativna aktivnost dobijenih ekstrakata) izvršen je na osnovu literaturnih podataka i preliminarnih istraživanja. Vrednosti nezavisno promenljivih ispitane su na 3 nivoa koji su odabrani prema rezultatima iz prethodnih istraživanja. Kodirane i nekodirane vrednosti nezavisno promenljivih date su u tabeli 3.1.

Tabela 3.1 Kodirane i nekodirane vrednosti nezavisno promenljivih

Oznaka Faktor	Faktor	Niži nivo (-1)	Srednji nivo (0)	Viši nivo (+1)
$X_1$	Koncentracija etanola, %	25	50	75
$X_2$	Mikrotalasna snaga, W	300	450	600
$X_3$	Vreme, min	5	10	15

Eksperimenti su izvršeni na osnovu usvojenog potpunog faktorijskog eksperimentalnog plana sa tri faktora na tri nivoa. Kao nezavisno promenljive veličine bile su varirane: koncentracija etanola ( $X_1$ ), mikrotalasna snaga ( $X_2$ ) i vreme trajanja ekstrakcije ( $X_3$ ), dok su kao odzivne veličine praćeni prinos ekstraktivnih supstanci, ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja, ukupan sadržaj flavonoida i antioksidativna aktivnost (određena DPPH i FRAP testom).

Matrica punog faktornog eksperimentalnog plana sa svim kodiranim i nekodiranim vrednostima faktora prikazana je u Tabeli 3.2.



Tabela 3.2 Matrica punog faktornog eksperimentalnog plana sa kodiranim i nekodiranim vrednostima faktora

Broj eksperimenta	Kodirane vrednosti faktora			Nekodirane vrednosti faktora		
	Faktor X <sub>1</sub>	Faktor X <sub>2</sub>	Faktor X <sub>3</sub>	Koncentracija etanola, % (X <sub>1</sub> )	Mikrotalasna snaga, W (X <sub>2</sub> )	Ekstrakciono vreme, min (X <sub>3</sub> )
1	0	0	0	50	450	10
2	0	-1	0	50	300	10
3	0	0	-1	50	450	5
4	+1	0	0	75	450	10
5	-1	-1	-1	25	300	5
6	0	+1	+1	50	600	15
7	-1	0	+1	25	450	15
8	+1	-1	+1	75	300	15
9	0	0	0	50	450	10
10	+1	+1	-1	75	600	5
11	-1	+1	0	25	600	10
12	0	0	0	50	450	10
13	0	-1	+1	50	300	15
14	+1	+1	0	75	600	10
15	-1	0	-1	25	450	5
16	-1	-1	0	25	300	10
17	+1	0	+1	75	450	15
18	-1	+1	+1	25	600	15
19	0	0	0	50	450	10
20	0	+1	-1	50	600	5
21	0	0	0	50	450	10
22	+1	-1	-1	75	300	5
23	+1	-1	0	75	300	10
24	+1	+1	+1	75	600	15
25	-1	+1	-1	25	600	5
26	+1	0	-1	75	450	5
27	0	-1	-1	50	300	5
28	0	0	+1	50	450	15
29	0	0	0	50	450	10
30	-1	-1	+1	25	300	15
31	0	+1	0	50	600	10
32	0	0	0	50	450	10
33	-1	0	0	25	450	10

### 3.4.2. Metoda odzivnih površina (RSM)

U cilju određivanja optimalne kombinacije i međusobne interakcije procesnih parametara mikrotalasne ekstrakcije na prinos ekstraktivnih supstanci, sadržaj fenolnih jedinjenja, sadržaj flavonoida i antioksidativnu aktivnost dobijenih ekstrakata, primenjena je metoda odzivne površine (RSM). Nezavisno promenljive, odnosno varirani procesni parametri bili su: koncentracija etanola ( $X_1$ , 25, 50 i 75%), mikrotalasna snaga ( $X_2$ , 300, 450 i 600 W) i ekstrakciono vreme ( $X_3$ , 5, 10 i 15 min). Srednje vrednosti zavisno promenljivih: ukupnog sadržaja fenola ( $Y_1$ ), flavonoida ( $Y_2$ ), antioksidativne aktivnosti ekstrakata određene DPPH ( $Y_3$ ) i FRAP ( $Y_4$ ) metodom statistički su analizirane pomoću kompjuterskog programskog paketa Expert Design (Trial version 7.0.0, STAT-EASE Inc., Minneapolis, MN, USA). Metodom odzivne površine formirani su modeli u obliku polinomskih jednačina drugog reda (jednačina 3.1) za sve odzivne veličine.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (3.1)$$

gde su:  $Y$ -zavisno promenljiva (odzivi),  $X$ -nezavisno promenljive (parametri),  $\beta_0$  odsečak (konstanta), a  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  i  $\beta_{ij}$  linearni, kvadratni i interakcioni regresioni koeficijenti.

Značajnost i adekvatnost modela, kao i utvrđivanje značajnosti individualnog i kombinovanog uticaja nezavisnih parametara procenjena je analizom varijanse (ANOVA). Slaganje matematičkog modela sa eksperimentalnim podacima i provera stepena značajnosti pojedinačnih parametara odnosno adekvatnost matematičkog modela izražena je koeficijentom determinacije  $R^2$ , prilagođenim koeficijentom determinacije  $\text{Adj}R^2$ , uz primenu  $F$ -testa i  $p$ -vrednosti. Poređenje eksperimentalnih vrednosti sa vrednostima koje predviđa izabrani matematički model dodatno je korišćeno za porveru predloženog modela. Uticaj faktora na praćene odzivne veličine vizuelno je predstavljen 3D graficima i 2D konturnim dijagramima.

### 3.4.3. Veštačke neuronske mreže (ANN)

Za optimizaciju i neparаметarsko modelovanje procesa mikrotalasne ekstrakcije ploda aronije korišćena je kombinacija metode veštačke neuronske mreže-Genetički algoritam (GA) (eng. Artificial Neural Network with Genetic Algorithm, ANN-GA). Ova kombinovana metoda je simulirana softverom Neural Network and Genetic Algorithm toolboxes (Demo version) realizovanim u programskom paketu MATLAB. Glavne karakteristike VNM i GA predstavljene su u tabeli 3.3.

Tabela 3.3 ANN-GA parametri

Model	Osobine	Vrednosti/ komentar
VNM	Algoritam	Levenberg-Marquardt povratni algoritam
	Minimalizovana greška funkcije	<i>MRPD</i>
	Učenje	Nadgledanje
	Ulazni sloj	Koristi se ne prenosna funkcija
	Skriveni sloj	Hiperbolička tangetna prenosna funkcija (tanh)
	Izlazni sloj	Hiperbolička tangetna funkcija (tanh)
	Broj podataka	33
	Bori triniranih iteracija	10
	Broj najboljih iteracija	6
	Broj ulaznih neurona	3 <sup>a</sup>
	Broj skrivenih neurona	8
	Broj izlaznih neurona	5 <sup>b</sup>
Genetički algoritam	Veličina populacije	10-600
	Generacije	1-600
	Funkcija	Uniforma
	Selekciona funkcija	Uniforma
	Opcija ukrštanja:	Tačkasto
	Brzina ukrštanja	0-1
	Verovatnoća utacije	0.01-1

<sup>a</sup>Koncentracija etanola, Mikrotalasna snaga, Ekstrakciono vreme. <sup>b</sup>Prinos ekstraktivnih supstanci, Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja, Ukupni sadržaj flavonoida, AOA određena DPPH testom i AOA određena FRAP testom

Za obučavanje mreže primenjen je Levenberg–Marquardt (LM) algoritam. Veštačke neuronske mreže sa više nivoa i sa povratnim širenjem (propagacijom) signala (eng. back propagation) uz

korišćenje nadglednog tipa učenja pri čemu mreža analizira ulazne-izlazne podatke i zavisnost svih izlaznih odziva (prinos ekstraktivnih supstanci, ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja, ukupni sadržaj flavonoida, AOA određena DPPH testom i AOA određena FRAP testom) od procesnih parametara ekstrakcije.

Tri sloja procesnih neurona (ulazni, skriveni i izlazni) sačinjavaju ANN primenjenu u razvoju modela. Tri nivoa ulaznih neurona predstavljali su: koncentracija etanola, mikrotalasna snaga i ekstrakciono vreme (tako da se ulazni sloj sastojao od tri neurona) dok je izlazni sloj bio sačinjen od pet neurona odnosno izlaznih veličina (prinos ekstraktivnih supstanci, ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja, ukupni sadržaj flavonoida, AOA određena DPPH testom i AOA određena FRAP testom).

Skriveni sloj sastojao se od 8 neurona zbog minimalne srednje greške (MS) dobijene izborom ove vrednosti. Primena ANN sa Levenberg–Marquardt (LM) algoritmom uključuje tri faze: obučavanje (70% ukupnih podataka), testiranje (15% ukupnih podataka) i potvrđivanje (15% ukupnih podataka). Neuroni u ulaznom sloju preuzimaju podatke o koncentraciji etanola, mikrotalasnoj snazi i ekstrakcionom vremenu, dok izlazni sloj generiše izlaz o prinosu ekstraktivnih supstanci, ukupnom sadržaj fenolnih jedinjenja i ukupnom sadržaj flavonoida iz ekstrakta kao i AOA ekstrakta određena DPPH testom i AOA ekstrakta određena FRAP testom. ANN primenjena za razvoj modela statistički je procenjena srednjom kvadratnom greškom (MSE), koeficijentom determinacije  $R^2$  i/ili značajnim relativnim procenatom devijacije (MRPD). Broj skrivenih neurona određen je postupkom ispitivanja koji se sastoji od testiranja različitog broja neurona sve dok se ne dobije minimalna srednja kvadratna greška (MSE) između eksperimentalno dobijenih vrednosti i vrednosti generisanih sa ANN. Interval ulaza ANN primenjene za razvoj modela pogodan je za optimizaciju procesnih parametara koji će doprineti najvećem prinosu ekstraktivnih supstanci, ukupnom sadržaj fenolnih jedinjenja i ukupnom sadržaj flavonoida iz ekstrakta kao i najvećoj vrednosti AOA ekstrakta određena DPPH testom i AOA ekstrakta određena FRAP testom) korišćenjem GA.

### **3.5. Dobijanje soka iz ploda aronije**

Usitnjeni plod aronije (100 g) ceđen je ručno, dobijeni sok ( $76,5 \pm 2,7 \text{ cm}^3$ ) je podvrgnut vakuum filtraciji na Büchner-ovom levku nakon čega je dalje analiziran i korišćen. Suvi ostatak ceđenog soka iz ploda aronije iznosio je  $0,1455 \text{ g suve mase/cm}^3$  soka, određeno prema standardnom postupku propisanom po Ph. Jug. V (2000).

### **3.6. Dobijanje keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde**

U cilju dobijanja keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde primenjena je osnovna receptura: 100 g belog pšeničnog brašna, 30 g šećera, 50 g hidrogenizovanog biljnog ulja (margarina) i potrebna količina vode (Mišan, 2009), modifikovana supstitucijom jednog dela pšeničnog brašna različitim količinama integralnog heljdnog brašna i ploda, ekstrakta ili soka ploda aronije.

Korišćeni su komercijalni proizvodi: „Fidelinka“ pšenično brašno T-500, proizvođač „Agroposlovi“ d.o.o. Beograd, kristal beli šećer koga proizvodi Fabrika šećera „Crvenka“, Srbija i stoni margarin „Dijamant“, proizvod Dijamant AD Zrenjanin, Srbija. Prilikom supstitucije dela belog pšeničnog brašna heljdnim brašnom upotrebljeno je integralno heljdino brašno proizvodnje „Bioheljda“ d.o.o., Skržuti-Užice. Sve sirovine nabavljene su u lokalnim marketima. Opšte karakteristike korišćenih vrsta brašna date su specifikacijom proizvođača prikazane u tabeli 3.4.

Tabela 3.4 Opšte karakteristike korišćenih vrsta brašna

	Belo pšenično brašno	Integralno heljdino brašno
Sadržaj vlage	max 15%	max 15%
Sadržaj pepela	min 0,46% max 0,55%	max 2,5%
Stepen kiselosti	max 3,00	max 4

Dodavanje biljnog materijala u vidu soka aronije, samlevenog ploda aronije i ekstrakta ploda aronije dobijenog mikrotalasnom ekstrakcijom pod predloženim optimalnim uslovima, kao i supstitucija belog brašna integralnim heljdnim brašnom sprovedena je prema centralno-kompozitnom eksperimentalnom dizajnu prikazanom u Tabeli 3.5.

Tabela 3.5 Formulacije keksa povećane nutritivne vrednostisa dodatkom aronije i heljde na osnovu eksperimentalnog dizajna

Broj eksperimenta	Udeo heljdinog brašna, %(X <sub>1</sub> )	Udeo biljnogmaterijala, %(X <sub>2</sub> )	Vrsta biljnogmaterijala, (X <sub>3</sub> )
1	30	30	plod
2	20	20	sok
3	10	30	ekstrakt
4	10	10	ekstrakt
5	20	20	plod
6	20	34,14	sok
7	20	20	plod
8	20	34,14	plod
9	20	20	plod
10	10	30	plod
11	20	20	ekstrakt
12	20	20	plod
13	20	20	ekstrakt
14	5,86	20	ekstrakt
15	20	20	sok
16	30	10	ekstrakt
17	20	20	ekstrakt
18	5,86	20	plod
19	20	5,86	ekstrakt
20	10	30	sok
21	20	20	sok
22	10	10	sok
23	20	34,14	ekstrakt
24	20	20	sok
25	20	5,86	sok
26	34,14	20	sok
27	20	5,86	plod
28	30	10	sok
29	20	20	sok
30	20	20	ekstrakt
31	34,14	20	ekstrakt
32	30	30	sok
33	20	20	plod
34	20	20	ekstrakt
35	30	30	ekstrakt
36	5,86	20	sok
37	30	10	plod
38	34,14	20	plod
39	10	10	plod

Napravljeno je 42 uzorka keksa (39 uzoraka sa formulacijom predviđenom eksperimentalnim dizajnom i 3 kontrolna uzorka) sa različitim kombinacijama navedenih supstituenata belog pšeničnog brašna. Detaljne recepture za pripremu svakog zamesa i slike gotovih keksova date su u Prilogu (Tabela PT10, Slike PS4- PS10). Kao kontrolni uzorci pripremljeni su uzorci keksa bez dodataka biljnog materijala, samo sa dodatkom integralnog heljdinog brašna (10-30%).

Zames keksa je napravljen ručno, mešenjem svih sastojaka odjednom, u jednoj fazi, u trajanju od 5 minuta (Šimurina et al., 2009). Umešeno testo istanjeno je do debljine od 5 mm i sečeno kružnim kalupom prečnika 45 mm. Kružni oblici isečenog testa stavljeni su na pek papir u aluminijumskom plehu i pečeni na 180°C u toku 10 min (u komercijalnoj kuhinjskoj pećnici Ariston). Nakon hlađenja u trajanju od 30 min do sobne temperature, keks je uvijen aluminijumskom folijom i čuvan na sobnoj temperaturi u narednih 24 časa, a nakon toga zamrznut na temperaturu od -6°C, u kratkom vremenskom trajanju, odnosno do početka izvođenja eksperimenta.

### **3.6.1. Priprema ekstrakata keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde**

Nakon odmrzavanja, keksovi su najpre sušeni u vakuum sušnici u trajanju od 2 sata, a zatim usitnjeni univerzalnim električnim mlinom (Bosch GmbH, Germany) do konzistencije praha. Na taj način dobijena su 42 uzorka keksa različitih formulacija. Etanolni ekstrakti keksa dobijeni su suspendovanjem po 5 g od svakog uzorka samlevenog keksa u 25 cm<sup>3</sup> etanola (50%). Ekstrakcija je vršena na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta uz povremeno mućkanje sadržaja. Tečni ekstrakti su odvajani od iscrpljenog materijala filtriranjem pod vakuumom na Büchner-ovom levku sa kvalitativnim filter papirom nakon čega su odmah analizirani.

### ***3.7. Formulacija recepture keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde***

U cilju formulacije recepture keksa sa dodatkom vrednošću sa optimalnom količinom i vrstom funkcionalnih sastojaka (integralnog heljdinog brašna, samlevenog ploda, soka ili ekstrakta) primenjena je funkcija poželjnosti (eng. desirability function) korišćenjem programskog paketa Expert Design (Trial version 7.0.0, STAT-EASE Inc., Minneapolis, MN, USA).

Kao nezavisne numeričke varijable u eksperimentalnom dizajnu varirani su udeli integralnog heljdinog brasna (10, 20 i 30%) i biljnog materijala (10, 20 i 30%), dok je kao nezavisna kategorička varijabla varirana vrsta biljnog materijala (samleveni plod, sok ili ekstrakt aronije dobijen pod predloženim optimalnim uslovima mikrotalasne ekstrakcije). Kao zavisne promenljive praćeni su ukupni sadržaj fenola, flavonoida i antioksidativna aktivnost u etanolim ekstraktima keksa kao finalnog proizvoda. Cilj optimizacije bio je definisanje recepture keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde sa najpovoljnijim funkcionalnim karakteristikama, odnosno maksimalnim sadržajem fenolnih, flavonoidnih jedinjenja i maksimalnom antioksidativnom aktivnošću. Kodirane i nekodirane vrednosti nezavisno promenljivih prikazane su u Tabeli 3.6.

Tabela 3.6 Kodirane i nekodirane vrednosti nezavisno promenljivih

Oznaka	Faktor	Niži nivo (-1)	Srednji nivo (0)	Viši nivo (+1)
$X_1$	Udeo integralnog heljdinog brasna, %	10	20	30
$X_2$	Udeo biljnog materijala, %	10	20	30
$X_3$	Vrsta biljnog materijala	Plod	Ekstrakt	Sok

### ***3.8. Karakterizacija bioaktivnih jedinjenja***

U okviru karakterizacije bioaktivnih jedinjenja određen je ukupan sadržaj fenolnih i flavonoidnih jedinjenja, kao i antioksidativna aktivnost, a analizirani su ekstrakti ploda aronije dobijeni pod različitim uslovima mikrotalasne ekstrakcije, sok ploda aronije dobijen ceđenjem i etanolni ekstrakti keksa sa dodatkom vrednošću na bazi aronije.

Za potrebe analiza u okviru karakterizacije bioaktivnih jedinjenja napravljeni su etanolni rastvori ekstrakta ploda aronije ( $5 \text{ mg/cm}^3$ ), dok su sok ploda aronije i etanolni ekstrakti keksa razblaženi 50%-tnim etanolom u odnosu 1:1.



### 3.8.1. Određivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja

Za određivanje ukupnog sadržaja fenola primenjena je spektrofotometrijska metoda sa Folin Ciocalteu reagensom (Singleton i Rossi, 1965). Smeša analiziranog uzorka (ekstrakt ploda, ekstrakt keksa ili sok; 0,2 cm<sup>3</sup>), Folin Ciocalteu reagensa (1 cm<sup>3</sup>) i vodenog rastvora Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,8 cm<sup>3</sup>, 7,5%), inkubirana je na sobnoj temperaturi i na tamnom mestu. Nakon inkubacije od 30 minuta, absorbanca reakcione smeše merena je na 765 nm na spektrofotometru (VARIAN Cary-100). Pravljenjem serija standardnih rastvora galne kiseline i snimanjem njihovih absorbanci konstruisana je kalibraciona kriva (Prilog, Slika PS1) sa jednačinom standardne prave (jednačina 3.2):

$$\text{Absorbanca na 765 nm} = 12,722 c_{\text{galna kiselina}} (\text{mg/cm}^3) + 0,0034, R^2 = 0,9994 \quad (3.2)$$

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja izražen je kao ekvivalent galne kiseline (GAE) u mg galne kiseline po g suvog ekstrakta ili keksa, odnosno po cm<sup>3</sup> soka. Sva merenja ponovljena su paralelno po tri puta, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

### 3.8.2. Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida

Za određivanje ukupnog sadržaja flavonoida primenjena je spektrofotometrijska metoda bazirana na upotrebi aluminijum-hlorida (Chang et. al., 2002). Analiziranom uzorku (ekstrakt ploda, ekstrakt keksa ili sok; 2 cm<sup>3</sup>) dodato je 0,1 cm<sup>3</sup> aluminijum hlorida (10%), 0,1 cm<sup>3</sup> kalijum acetata (1 mol/dm<sup>3</sup>) i 2,8 cm<sup>3</sup> destilovane vode, smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi i na tamnom mestu. Nakon isteklog vremena trajanja inkubacije od 30 minuta, absorbanca reakcione smeše merena je na 415 nm na spektrofotometru (VARIAN Cary-100). Pravljenjem serija standardnih rastvora rutina i snimanjem njihovih absorbanci konstruisana je kalibraciona kriva (Prilog, Slika PS2) sa jednačinom standardne prave (jednačina 3.3):

$$\text{Absorbanca na 415 nm} = 7,2328 c_{\text{rutin}} (\text{mg/cm}^3) - 0,2286, R^2 = 0,9919 \quad (3.3)$$

Sadržaj ukupnih flavonoida izražen je kao ekvivalent rutina (RE) u mg rutina po g suvog ekstrakta ili kekxa, odnosno po cm<sup>3</sup> soka. Sva merenja ponovljena su paralelno po tri puta, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost±standardna devijacija.

### 3.8.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti (AOA)

#### 3.8.3.1. DPPH test

Za određivanje antioksidativne aktivnosti uzoraka primenjen je DPPH test (Choi et al., 2002). Rastvori ekstrakata ploda aronije u etanolu pripremljeni su u šest različitih koncentracija: 0,0125; 0,05; 0,125; 0,25; 0,5 i 1 mg/cm<sup>3</sup>, dok su sok ploda aronije i etanolni ekstrakti kekxa razblaženi samo u odnosu 1:1 sa 50%-tnim etanolom i tako analizirani. U 2,5 cm<sup>3</sup> uzoraka za analizu određene koncentracije dodato je 1 cm<sup>3</sup> etanolnog rastvora DPPH radikala koncentracije 0,0003 mol/dm<sup>3</sup> i dobijena smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi i tamnom mestu u trajanju od 30 minuta. Spektrofotometrom (VARIAN Cary-100) merene su absorbance uzorka ( $A_u$ ), kontrole ( $A_k$ ) i „blank-a“ ( $A_b$ ) na talasnoj dužini od 517 nm. Formula za izračunavanje kapaciteta neutralisanja DPPH radikala data je jednačinom 3.4:

$$\text{Kapacitet neutralisanja DPPH radikala (\%)} = 100 - \left[ (A_u - A_b) \times \frac{100}{A_k} \right] \quad (3.4)$$

u kojoj su:

$A_u$  = Apsorbanca uzorka na 517 nm (2,5 cm<sup>3</sup> rastvora ekstrakata tretiranih sa 1 cm<sup>3</sup> rastvora DPPH radikala)

$A_b$  = Apsorbanca „blank-a“ na 517 nm (2,5 cm<sup>3</sup> rastvora ekstrakata u 1 cm<sup>3</sup> etanola)

$A_k$  = Apsorbanca kontrole na 517 nm (1 cm<sup>3</sup> rastvora DPPH radikala koncentracije 0,0003 mol/dm<sup>3</sup> u 2,5 cm<sup>3</sup> etanola)

Komercijalni antioksidant troloks (njegov etanolni rastvor koncentracija od 25 do 800 µg/cm<sup>3</sup>) primenjen je kao referentna supstanca sa vrednošću za EC<sub>50</sub> od 82,9±1,7 µg/cm<sup>3</sup> (Prilog, Slika PS3). Eksperimentalni podaci su uz primenu sigmoidne nelinearne metode korišćenjem

programa SigmaPlot 2000Trial upotrebljeni za izračunavanje vrednosti  $EC_{50}$ . Na osnovu izmerenih apsorbanci ispitivanih ekstrakata izračunat je procenat neutralizacije DPPH radikala pa je za tako dobijene vrednosti konstruisana kriva zavisnosti procenta neutralizacije DPPH radikala od koncentracije ekstrakta na osnovu koje je određena  $EC_{50}$  vrednost.

### 3.8.3.2. Određivanje redukcionog kapaciteta (Reducing power method) FRAP testom

FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power) test bazira se na mogućnosti fenolnih komponenti ekstrakta da redukuju  $Fe^{3+}$  jone u  $Fe^{2+}$  jone u rastvoru 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri nižim pH (Guo et al., 2003). FRAP reagens pripreman je tako što je  $2,5\text{ cm}^3$  rastvora TPTZ ( $10\text{ mmol/dm}^3$ ) dopunjeno (u normalnom sudu) do  $25\text{ cm}^3$  sa rastvorom HCl ( $40\text{ mmol/dm}^3$ ), pomešano sa  $25\text{ cm}^3$  acetatnog pufera (pH=3,6) i  $2,5\text{ cm}^3$  rastvora  $FeCl_3$  ( $20\text{ mmol/dm}^3$ ). U  $0,1\text{ cm}^3$  analiziranog uzorka (ekstrakt ploda, ekstrakt keksa ili sok) dodato je  $3\text{ cm}^3$  FRAP reagensa, smeša je inkubirana na  $37^\circ\text{C}$  u vodenom kupatilu u trajanju od 30 minuta, a potom je merena apsorbanca na  $593\text{ nm}$  (spektrofotometar, VARIAN Cary-100) u odnosu na slepu probu ( $3\text{ cm}^3$  FRAP reagensa +  $0,1\text{ cm}^3$  etanola). FRAP vrednosti za analizirane uzorke, izražene u  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$  ekstrakta ploda ili keksa, odnosno  $\text{cm}^3$  soka, dobijene su korišćenjem jednačine kalibracione krive koja je bazirana na absorbancama poznatih koncentracija rastvora  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (jednačina 3.5).

$$\text{Apsorbanca na } 593\text{ nm} = 0,000568\text{ c}(Fe^{2+})\text{ (mmol/cm}^3) + 0,0837, R^2 = 0,9876 \quad (3.5)$$

### 3.9. Statistička obrada podataka

Svi eksperimenti realizovani su u tri paralelna ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri ponavljanja  $\pm$  standardna devijacija. Programi Origin 8.0Trial, Excell 2003 i SigmaPlot 2000Trial primenjeni su za statističku obradu i grafičku analizu eksperimentalnih podataka dok je poređenje srednje vrednosti dobijenih rezultata vršeno primenom Studentovog  $t$ -testa sa nivoom značajnosti od 95% ( $p < 0,05$ ).

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### ***4.1. Mikrotalasna ekstrakcija***

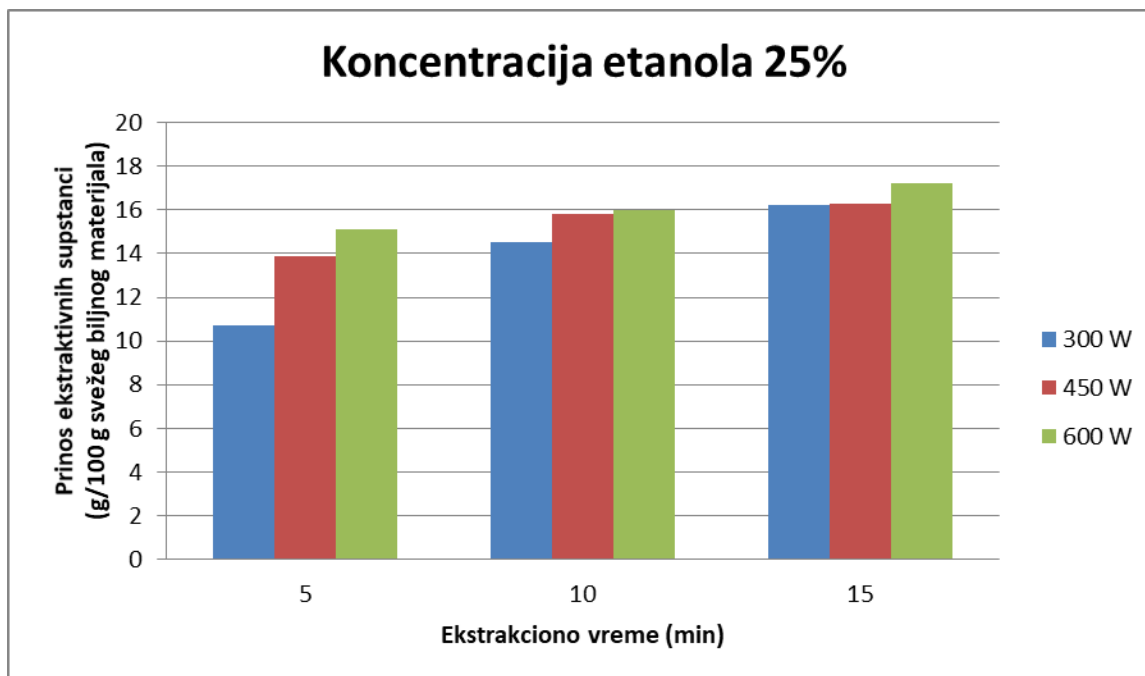
Sveži plodovi aronije podvrgnuti su ekstrakciji primenom mikrotalasa pri čemu je praćen uticaj snage mikrotalasa (300, 450 i 600 W), koncentracije etanola (25, 50 i 75%) i vremena trajanja ekstrakcije (5, 10 i 15 minuta) na prinos ekstraktivnih supstanci, antioksidativnu aktivnost i ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja i flavonoida u dobijenim ekstraktima.

Prednosti mikrotalasne ekstrakcije su brzo zagrevanje, kraće ekstrakciono vreme i manja potrošnja rastvarača, zbog čega je ova ekstrakciona tehnika dobila epitet “zelene” odnosno ekološki prihvatljive metode (Périno-Issartier et al., 2011; Lucchesi et al., 2004; Barba et al., 2016). Takođe, bolji kvalitet ekstrahovanih jedinjenja, veća selektivnost i prinos u odnosu na klasične metode, predstavljaju prednosti mikrotalasne nad klasičnim metodama ekstrakcije (Martino et al., 2006; Proestos i Komaitis, 2008; Mandal et al., 2008).

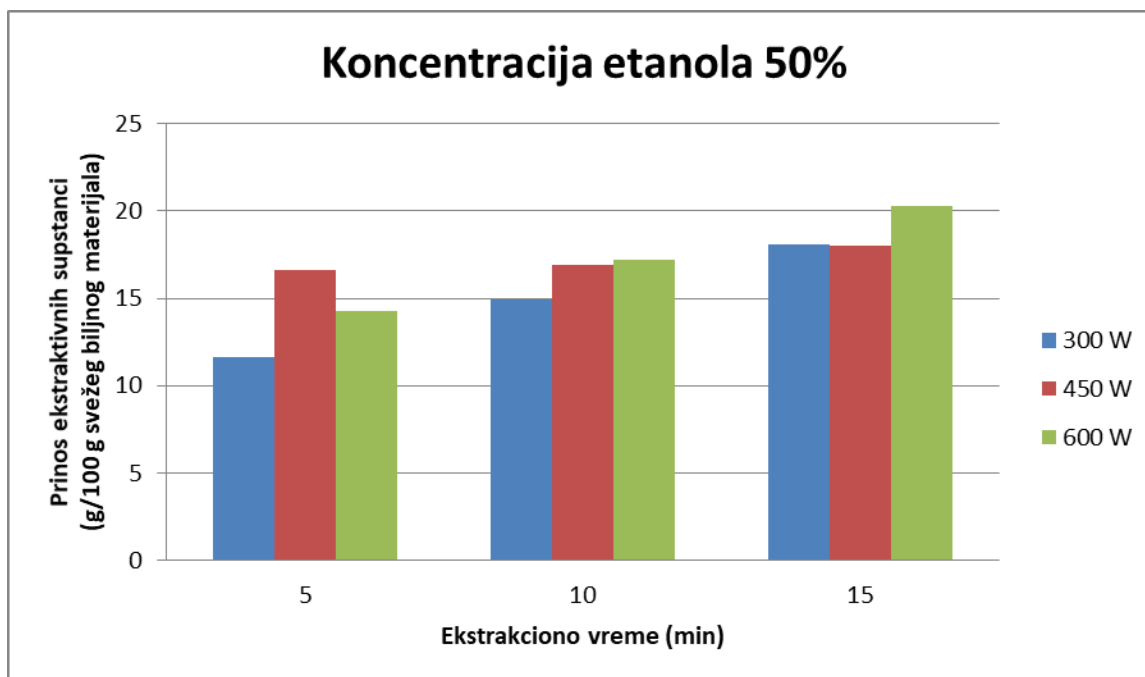
Vodeni rastvor etanola izabran je kao ekstragens zbog većeg prinosa i manje toksičnosti pa samim tim i mogućnosti naknadne primene dobijenih ekstrakata u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Dai i Mumper, 2010). Shodno svojoj pretežno polarnoj prirodi smeša etanol–voda koristi se za ekstrakciju polarnih supstanci (fenoli, flavonoidi, kumarini, stilbeni, antrahinoni i ostale bioaktivne substance) iz biljnog materijala. Upotrebom ovog ekstragensa, pogotovo onih sa većim sadržajem etanola, ekstrakti su hemijski kompletniji zbog mogućnosti ekstrahovanja i nepolarnih supstanci (etarska ulja) (Nađalin, 2013).

#### **4.1.1. Prinos ekstraktivnih supstanci iz ploda aronije**

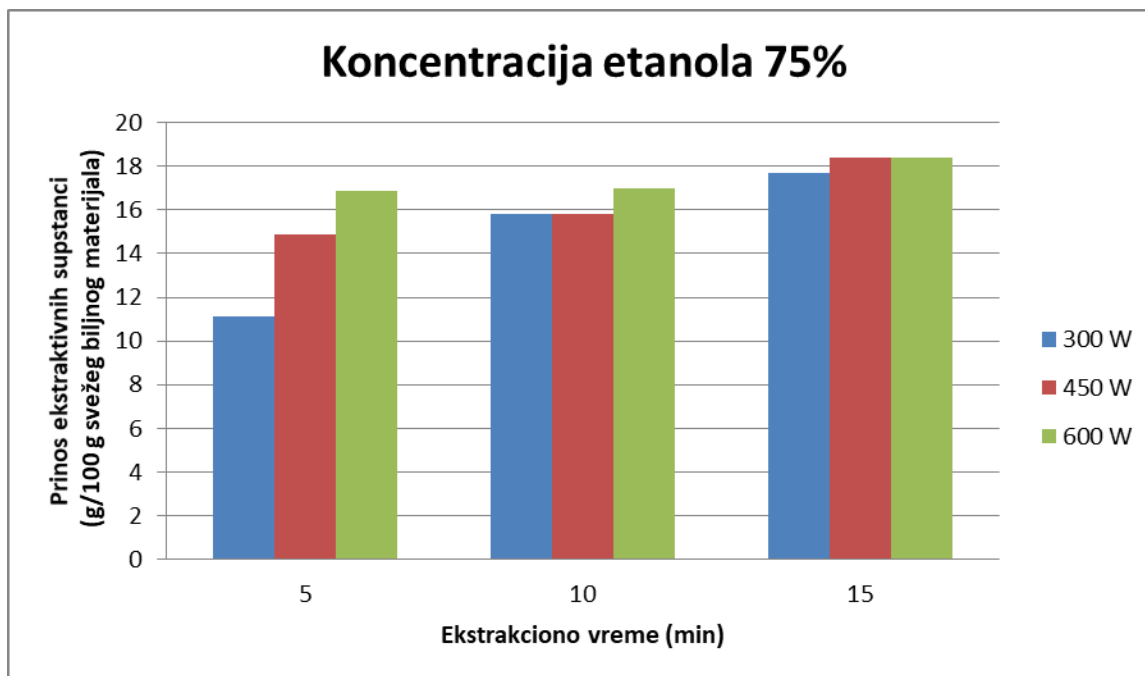
Prinos ekstraktivnih supstanci iz ploda aronije dobijenih mikrotalasnom ekstrakcijom u velikoj meri zavisi od uslova mikrotalasne ekstrakcije što je ilustrovano rezultatima prikazanim na slikama 4.1; 4.2 i 4.3 i tabelom PT1 u Prilogu. Povećanjem mikrotalasne snage, produžetkom vremena trajanja ekstrakcije, kao i promenama koncentracije etanola prinos ekstraktivnih supstanci varirao je od 11,1 do 20,3 g ekstraktivnih supstanci/100 g svežeg biljnog materijala, odnosno prinos ekstraktivnih supstanci kretao se u opsegu od 11,1% do 20,3%.



Slika 4.1 Prinos ekstraktivnih supstanci iz ploda aronije dobijenih pri koncentraciji etanola od 25% i različitim vrednostima mikrotalasne snage i ekstrakcionog vremena



Slika 4.2 Prinos ekstraktivnih supstanci iz ploda aronije dobijenih pri koncentraciji etanola od 50% i različitim vrednostima mikrotalasne snage i ekstrakcionog vremena



Slika 4.3 Prinos ekstraktivnih supstanci iz ploda aronije dobijenih pri koncentraciji etanola od 75% i različitim vrednostima mikrotalasne snage i ekstrakcionog vremena

Rezultati prinosa ekstrakcije u saglasnosti su sa ranije objavljenim rezultatima u kojima se navodi da se prinos ekstrakcije od 14,2% može dobiti korišćenjem 70% etanola, na temperaturi od 70°C, nakon 3 sata trajanja ekstrakcije i pri odnosu rastvarača i biljnog materijala 1:10 (Hwang et al., 2014). U radu Wangensteen i saradnika (2014) ispitivane su četiri različite kultivisane vrste aronije: “Moskva”, “Hugin”, “Nero” i *A. prunifolia* i prinos ekstrakcije 80%-tnim ključalim rastvorom etanola iznosio je od 9,4 do 19,7%.

#### 4.1.1.1. Uticaj koncentracije etanola na prinos ekstraktivnih supstanci

Nezavisno od vrednosti primenjene mikrotalasne snage i vremena trajanja ekstrakcije, sa porastom koncentracije etanola od 25% do 50% prinos ekstrakcije raste i dostiže najveću vrednost od 20,3 g/100 g svežeg biljnog materijala (600 W, 15 min). Dalje povećanje koncentracije etanola na 75% (v/v) izaziva smanjenje prinosa ekstraktivnih supstanci i to za manje od 2% kada je ekstrakciono vreme 5 ili 10 min, odnosno za više od 10% kada je ekstrakciono vreme 15 min. Tendencija rasta prinosa ekstraktivnih supstanci ekstrakcije povećanjem koncentracije etanola do izvesnog maksimuma i kasniji pad vrednosti prinosa

nastavkom povećanja etanolne koncentracije potvrđena je pri mikrotalasnoj ekstrakciji korena ginsenga (Kwon et al., 2003) i nadzemnog dela biljke *Limnophila aromatic* (Do et al., 2014).

Najizrazitiji efekat koncentracije etanola na prinos ekstraktivnih supstanci zapažen je u slučaju trajanja ekstrakcije od 15 min kada je postignuto povećanje prinosa od 18% porastom koncentracije etanola od 25 na 50%, dok dalje povećanje koncentracije na 75% uzrokuje smanjenje prinosa. Prilikom mikrotalasne ekstrakcije ploda kupine ispitan je uticaj koncentracije etanola na prinos ekstrakcije variranjem u opsegu od 0 do 100%. Dobijeni rezultati ukazuju da povećanje koncentracije etanola do 40% doprinosi povećanju prinosa ekstrakcije (koji pri ovoj vrednosti dotiže svoj maksimum), dok dalji porast koncentracije etanola kao posledicu ima smanjenje ekstrakcionog prinosa i to drastično nakon dostizanja vrednosti od 80% (Wen et al., 2015).

Prisustvo vode u ekstrakcionom sistemu obezbeđuje i efikasno bubrenje biljnog materijala čime se povećava površina za interakciju između rastvarača i supstanci koje se rastvaraju. Ali veći udeo vode u ovom binarnom sistemu za ekstrakciju može izazvati povećani termalni stres u smislu ubrzanog zagrevanja rastvarača usled efikasnije absorpcije mikrotalasa od strane vode (Dhobi et al., 2009).

#### **4.1.1.2. Uticaj mikrotalasne snage na prinos ekstraktivnih supstanci**

Pri mikrotalasnoj ekstrakciji, porast snage mikrotalasa sa 300 na 600 W vodi povećanju prinosa ekstraktivnih supstanci iz ploda aronije do maksimalne vrednosti od 20,3 g/100 g svežeg biljnog materijala (600 W, 15 minuta). Do istog zapažanja došli su Karabegović i saradnici (2014) prilikom mikrotalasne ekstrakcije ekstraktivnih supstanci iz ploda lovor višnje čiji je prinos rastao sa povećanjem vrednosti mikrotalasne snage (300-600 W) i vremena ekstrakcije (10-30 min). Povećanje snage sa 100 na 400 W (pri konstantnim vrednostima ostalih ekstrakcionih parametara) izazvalo je povećanje prinosa ekstraktivnih supstanci prilikom mikrotalasne ekstrakcije plodova kupine. Maksimalan prinos postignut je na nešto manje od 400 W, ali je dalje povećanje mikrotalasne snage uticalo na smanjenje ekstraktivnog prinosa (Wen et al., 2015).

Porast mikrotalasne snage sa 300 W na 600 W pokazuje najveći efekat na prinos ekstraktivnih supstanci pri kraćem vremenu trajanja ekstrakcije (5 min), u smislu njegovog povećanja od čak

1,52 puta, dok je ovaj efekat manje izražen kod dužeg ekstrakcionog vremena, pa je zabeležen porast prinosa od 7,6% i 3,9% za 10 i 15 min, respektivno.

Dhobi i sradnici (2009) su ispitivanjem uticaja snage mikrotalasa na prinos ekstraktivnih supstanci iz biljne vrste *Silybum marianum* ukazali da je efikasnost ekstrakcije u toku kraćeg ekstrakcionog vremena znatno poboljšana povećanjem snage mikrotalasa od 200 na 800 W. Ovakav uticaj mikrotalase snage na prinos ekstrakcije autori objašnjavaju činjenicom da se sa porastom snage mikrotalasa ubrzava ekstrakcija na račun povećanja neposrednih efekata mikrotalase energije na biomolekule (jonska kondukcija i rotacija dipola). Veća snaga uzrokuje intenzivnije molekularno kretanje molekula i zagrevanje unutar cele zapremine rastvarača i samog biljnog materijala. Generalno, većom snagom mikrotalasa brže i više elektromagnetne energije se prenosi na ekstrakcioni sistem što ekstrakciju čini efikasnijom (Dhobi et al., 2009).

#### **4.1.1.3. Uticaj ekstrakcionog vremena na prinos ekstraktivnih supstanci**

Sa povećanjem dužine trajanja ekstrakcionog procesa (od 5 do 15 min) raste prinos ekstraktivnih supstanci iz ploda aronije nezavisno od ostalih ekstrakcionih parametara. Produžetak ekstrakcionog vremena od 5-15 min ima najizrazitiji uticaj u slučaju ekstrakcija sa 50%-tnim rastvorom etanola i to u smislu povećanja prinosa ekstraktivnih supstanci od 22,9%, dok je ista promena doprinela povećanju prinosa od 13,9% u slučaju primene 25% rastvora etanola. Na efikasnost ekstrakcije, u smislu povećanja ekstrakcionog prinosa, porast ekstrakcionog vremena ima najmanji efekat (povećanje prinosa od 8,87%) upotrebom 75%-tnog etanolnog rastvora. Pri kraćoj izloženosti mikrotalasa zapažen je trend smanjenja prinosa povećanjem snage sa 450 W na 600 W i to za približno 14% (od 16,6 do 14,3 g/100 g svežeg biljnog materijala, respektivno). Sličan rezultat je primećen prilikom ispitivanja mikrotalase ekstrakcije antocijana iz ploda kupine, gde porast ekstrakcionog vremena najpre doprinosi povećanju prinosa mikrotalase ekstrakcije do izvesne maksimalne vrednosti (od 1 do 3 min) dok daljim trajanjem delovanja mikrotalasa (od 3 do 9 min) prinos opada (Wen et al., 2015). Prinos ekstraktivnih supstanci povećava se sa produžetkom mikrotalase ekstrakcije iz semena biljne vrste *Silybum marianum*, ali nakon dostizanja maksimuma dalji produžetak ekstrakcionog procesa nije imao efekta (Dhobi et al., 2009).



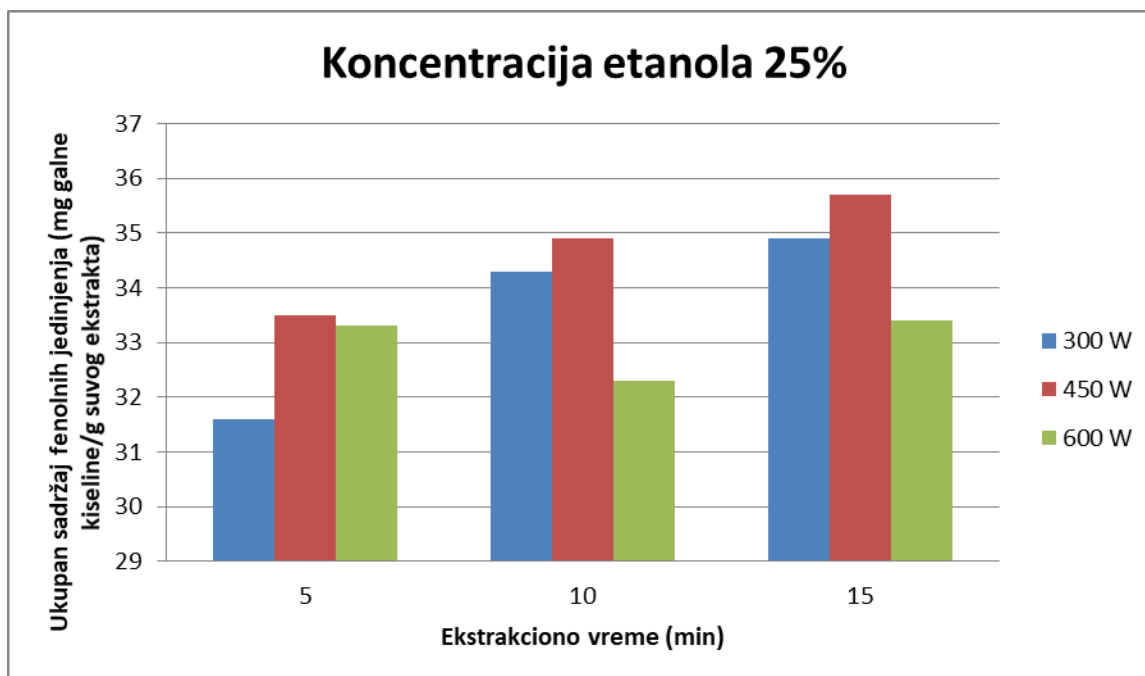
Generalno u ovom radu maksimalni prinos ekstraktivnih supstanci postignut je najdužim trajanjem ekstrakcije (15 min), pri najvećoj mikrotalasnoj snazi (600 W) i umerenoj koncentraciji etanola (50%) što je u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima koji potvrđuju pozitivan uticaj snage mikrotalasa i ekstrakcionog vremena na efikasnost ekstrakcije (Karabegović et al., 2013; Spigno i De Faveri., 2009). Međutim, veći prinos ekstrakcije ne mora istovremeno da znači i veći sadržaj željenih jedinjenja usled mogućeg većeg sadržaja balastnih supstanci (polisaharida, proteina, lipida) koje smanjuju udeo bioaktivnih komponenti u ukupnim ekstraktivnim materijama (Ranić et al., 2014).

#### **4.1.2. Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja i flavonoida u dobijenim ekstraktima ploda aronije**

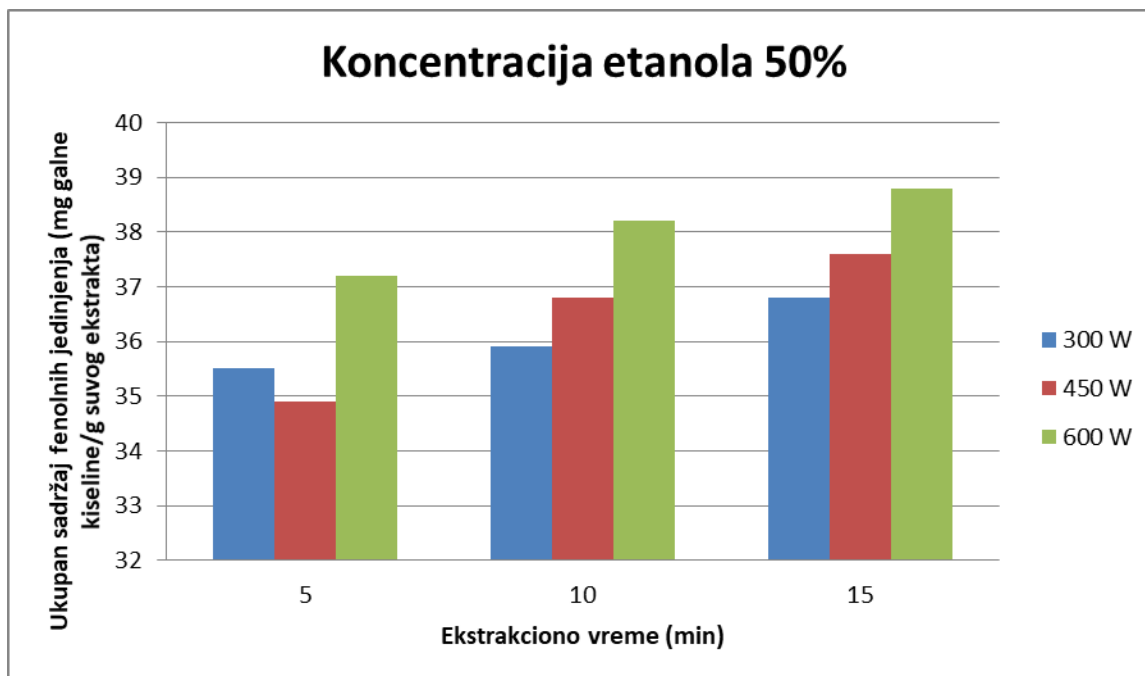
Primenom ekstragenta sa različitim udelom etanola (25, 50 i 75%), primenom različite mikrotalasne snage (300, 450 i 600 W) u ekstrakcionom sistemu kao i različitim trajanjem ekstrakcije od 5, 10 ili 15 minuta ispitivan je uticaj procesnih faktora na ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja i flavonoida u ekstraktima ploda aronije.

Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja (izražen kao mg galne kiseline/g suvog ostatka ekstrakta) u ekstraktima plodova aronije dobijenih pod različitim operativnim uslovima prikazan je na slikama 4.4; 4.5 i 4.6. i u Tabeli PT2 u Prilogu. Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja javlja se u opsegu od 31,6 do 38,8 mg galne kiseline/g suvog ostatka ekstrakta. U cilju lakšeg i efikasnijeg poređenja rezultata dobijenih u ovom radu sa rezultatima objavljenim od strane drugih autora ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja je preračunat na jedinicu mase svežeg biljnog materijala, kao i na jedinicu mase suvog ostatka ploda. Rezultati dobijeni u ovom radu, a preračunati na druge jedinice kretali su se od 373,4 do 458,4 mg galne kiseline/100 g svežeg biljnog materijala ili od 1555,7-1909,8 mg galne kiseline/100 g suvog ostatka.

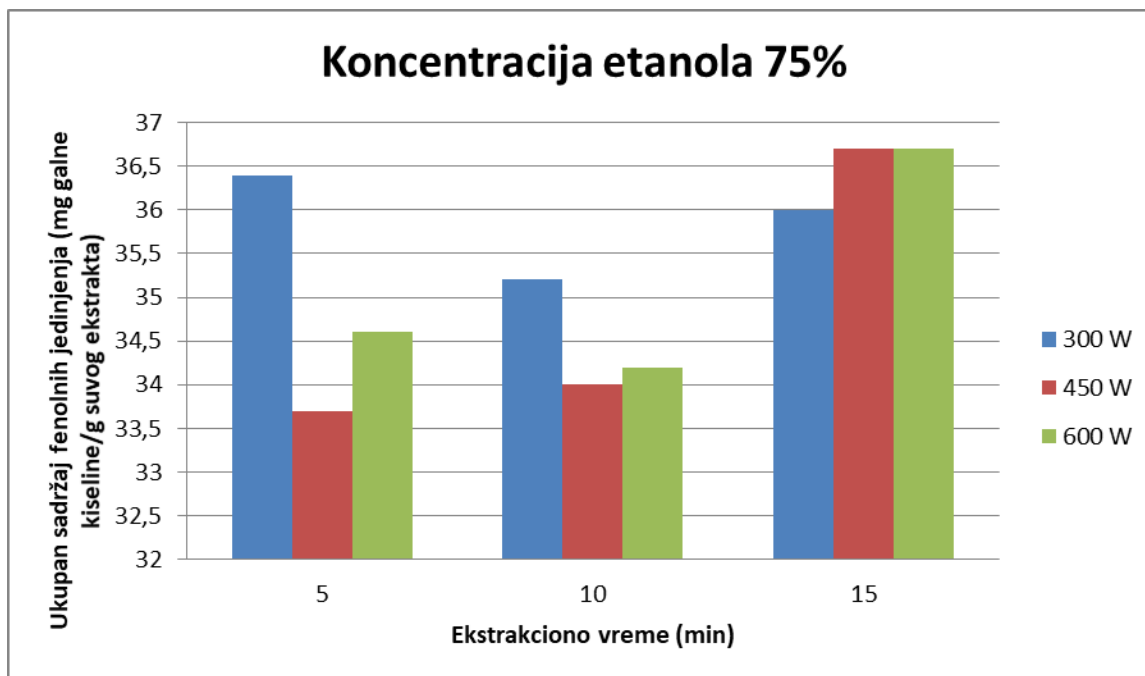
Ukupni sadržaj flavonoida u ekstraktima plodova aronije dobijenih pod različitim operativnim uslovima prikazan je na slikama 4.7; 4.8 i 4.9 i u Tabeli PT3 u Prilogu. Uočeno je da se ukupni sadržaj flavonoida u analiziranim ekstraktima u zavisnosti od operativnih uslova kretao u opsegu od 12,9 do 23,2 mg rutina/g suvog ostatka ekstrakta.



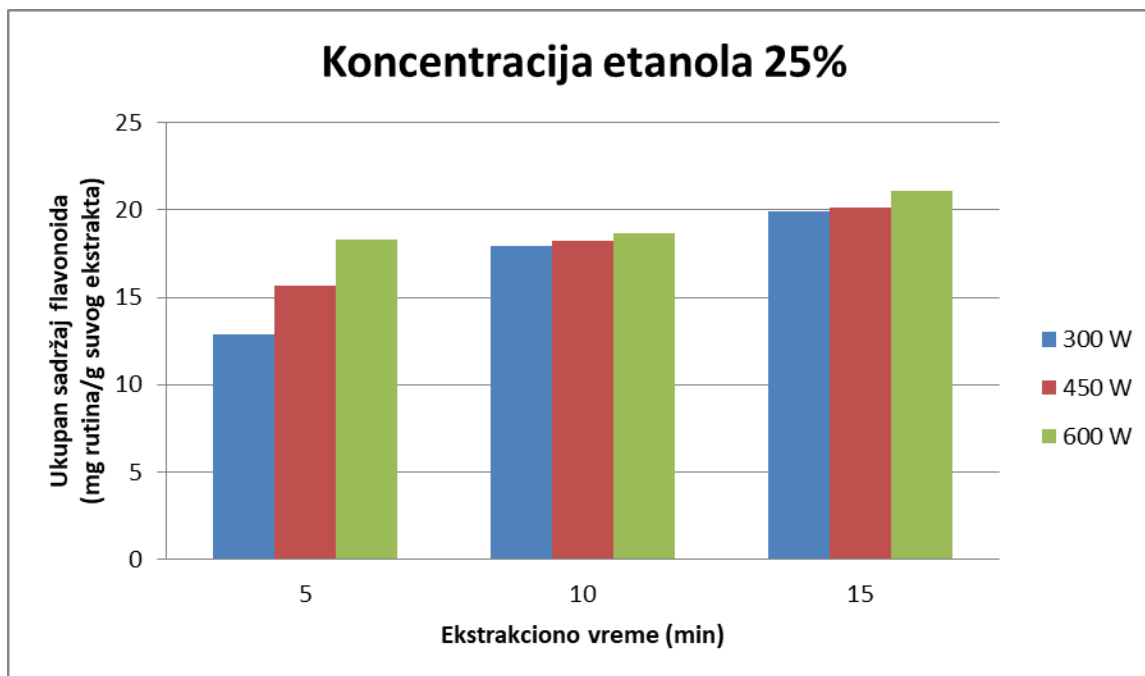
Slika 4.4 Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima plodova aronije dobijenih pri koncentraciji etanola od 25% i različitim vrednostima mikrotalasne snage i ekstrakcionog vremena



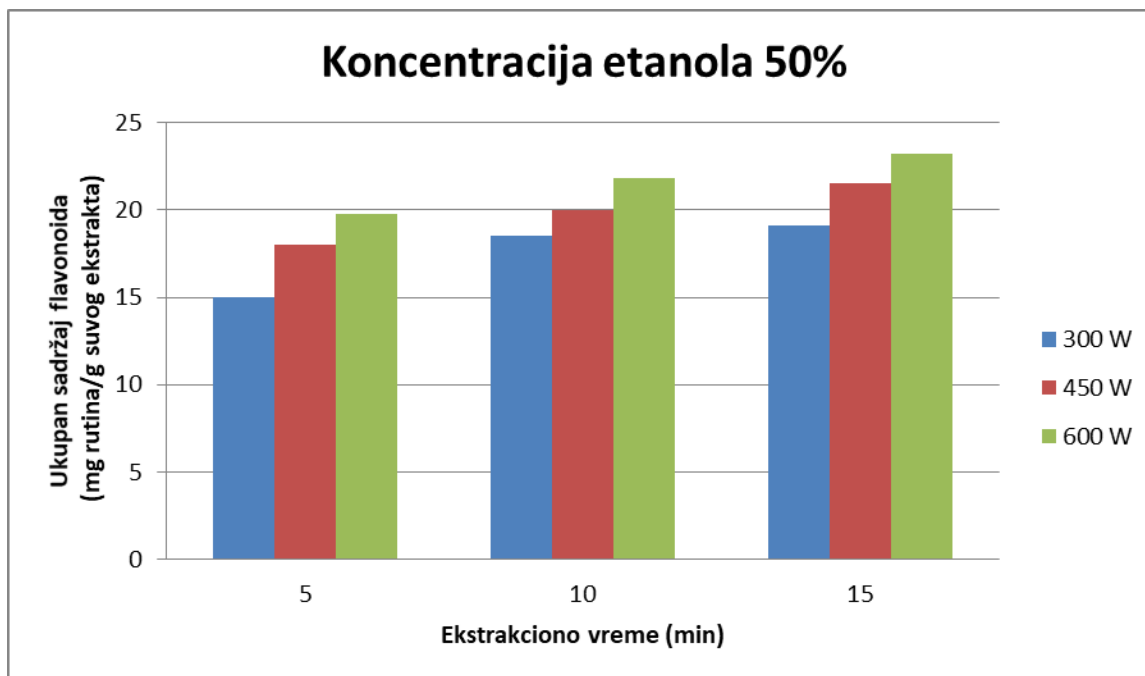
Slika 4.5 Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima plodova aronije dobijenih pri koncentraciji etanola od 50% i različitim vrednostima mikrotalasne snage i ekstrakcionog vremena



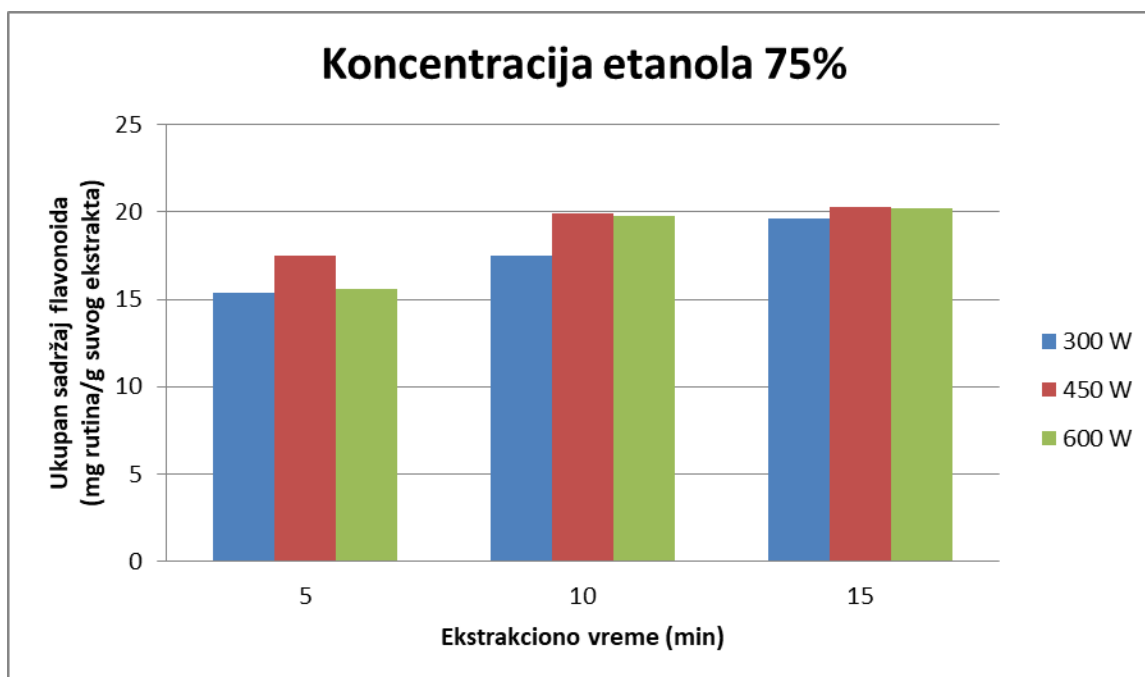
Slika 4.6 Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima plodova aronije dobijenih pri koncentraciji etanola od 75% i različitim vrednostima mikrotalasne snage i ekstrakcionog vremena



Slika 4.7 Ukupan sadržaj flavonoida u ekstraktima plodova aronije dobijenih pri koncentraciji etanola od 25% i različitim vrednostima mikrotalasne snage i ekstrakcionog vremena



Slika 4.8 Ukupan sadržaj flavonoida u ekstraktima plodova aronije dobijenih pri koncentraciji etanola od 50% i različitim vrednostima mikrotalasne snage i ekstrakcionog vremena



Slika 4.9 Ukupan sadržaj flavonoida u ekstraktima plodova aronije dobijenih pri koncentraciji etanola od 75% i različitim vrednostima mikrotalasne snage i ekstrakcionog vremena

Dobijeni rezultati potvrđuju već poznato stanovište da je plod aronije jedan od najbogatijih biljnih izvora polifenolnih jedinjenja (Denev et al., 2012). U tabeli 4.1 dat je pregled ukupnog sadržaja fenola (TPC) i flavonoida (TF) ekstrakata aronije dobijenih različitim ekstrakcionim metodama i objavljenih od strane drugih autora, a u cilju poredjenja sa rezultatima dobijenim u ovom radu. Prinos ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida dobijenih pri različitim uslovima mikrotalasne ekstrakcije plodova aronije u ovom radu može se porediti sa rezultatima koje su objavili Mayer-Miebach i saradnici (2012) i Kahkonen i saradnici (1999), ali je znatno veći u odnosu na ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja objavljenih od strane nekih autora (Ciocoiu et al., 2013; Ćujić et al., 2016; Konić-Ristić et al., 2013; Skupien i Oszmianski, 2007). Sadržaj flavonoida dobijen u ovom radu je primetno veći u odnosu na ukupan sadržaj flavonoida (5,3 mg RE/g suvog ekstrakta) kultivisane aronije dobijenog ekstrakcijom 70%-tnim etanolom, na temperaturi od 70°C, tokom tročasovnog ekstrahovanja (Hwang et al., 2014).

Različiti nivo ukupnog sadržaja fenola i flavonoida u ovom i drugim objavljenim radovima može se objasniti značajnim uticajem velikog broja različitih faktora (lokacija i tehnika gajenja biljke, njen genotip, zrelost biljke, uticaj spoljašnje sredine u vidu prisustva hranljivih materija uzgojnog zemljišta, klimatskih uslova, temperatura, svetlost) na sadržaj ovih supstanci u biljci jer utiču na fenilpropanoidne metaboličke puteve (Dixon i Paiva, 1995). Takođe primenjena tehnika, uslovi ekstrakcije i uslovi skladištenja biljnog materijala i dobijenih ekstrakata imaju veliki uticaj na prinos ekstrakcije, sadržaj bioaktivnih jedinjenja u ekstraktima i njihovu antioksidativnu aktivnost (Denev et al., 2012). Jakobek i saradnici (2012) su poredili genotip i zrelost biljke ispitivanjem sadržaja bioaktivnih jedinjenja tokom dve godine kod četiri različite sorte aronije. Rezultati su ukazali da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja kod divlje aronije i kultivisanih sorti "Viking" i "Nero" bio sličan (901,2–1080,4 mg/100 g svežeg biljnog materijala prve godini i 936,1–1205,5 mg/100 g svežeg biljnog materijala druge godine istraživanja) dok je kod sorte "Galicianka" ukupan sadržaj fenola (856,4 mg/ 100 g svežeg biljnog materijala prve godine i 860,0 mg/100 g svežeg biljnog materijala druge godine istraživanja) bio nešto niži. Statistički značajna razlika između sorti "Viking" (najviši sadržaj fenolnih jedinjenja) i "Galicianka" (najmanja količina) uočena je u prvoj godini istraživanja, dok u drugoj godini nema statistički značajne razlike u ukupnom sadržaju fenolnih jedinjenja između sorti.

Tabela 4.1 Pregled sadržaja polifenolnih jedinjenja ekstrakta aronije dobijenih različitim ekstrakcionim metodama

Uslovi ekstrakcije	Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja i flavonoida u ekstraktima	Referenca
<b>Klasična ekstrakcija</b>		
EtOH (80%), 1:25, 85°C, 2 h	TPC: 919,7 mg of GAE/g SP	Thi i Hwang, 2016
EtOH (80%), refluks, 2 h	TPC: 1079-2996 mg GAE/100 g SBM	Wangenstein et al., 2014
EtOH (zakišeljjen sa 1% HCl), 24 h	856,4-1250,5 mg GAE/100 g SBM	Jakobek et al., 2012
EtOH (70%), 1:10, 70°C, 3 h	TPC: 110 mg GAE/g SE TF: 5,3 mg RE/g SE	Hwang et al., 2014
Apsolutni MeOH (zakišeljjen sa 0.3% HCl)	TPC: 1713 mg GAE/100 g SP	Rugina et al., 2012
70% Aceton	TPC: 40,01 mg GAE/g SE	Kahkonen et al., 1999
Aceton:Voda:CH <sub>3</sub> COOH (70:29,5:0,5)	TPC: 20,1 mg GAE/g SE	Wu et al., 2004
MeOH (70%)	TPC: 23,77 mg GAE/g SBM	Skupien i Oszmianski, 2007
MeOH (70%)	TPC: 37,6 mg GAE/g SE	Hudec et al., 2006
Aceton (60%), 1:15, mešanje, 30 min	TPC: 15–17,9 mg GAE/g SP	Mayer-Miebach et al., 2012
EtOH (60%)	TPC: 1015 mg GAE/100 g SP	Konić-Ristić et al., 2013
EtOH (50-70%), 1:20, 60-90 min	27,8 mg GAE/g SE	Ćujić et al., 2016
EtOH, 1:21, mešanje, 9h	TPC: 19,64-24,87 mg GAE/g SE	Ciocoiu et al., 2013
<b>Ultrazvučna ekstrakcija</b>		
EtOH (50%), 1:20, 30.8 kHz, 100 W, 40°C, 15 min.	TPC: 1000 mg GAE/dm <sup>3</sup> SE (odnos 1:10) i 600 mg GAE/dm <sup>3</sup> SE (odnos 1:20)	D'Alessandro et al., 2012
Voda ili EtOH (25% ili 50%), 1:40, 30.8 kHz, 50 ili 100 W, 45°C, 240 min	TPC: >70 mg GAE/g SP	D'Alessandro et al., 2014
EtOH:Voda:HCl (70:29:1), 1:10, 30°C, 2 h	TPC: 600 mg GAE/g SP	Wang et al., 2016a
EtOH (50%), 90 min, 50°C	TPC: 122,5 mg GAE/g SP	Tao et al., 2017
MeOH (zakišeljjen sa 3% mravlje kiseline), 1h	TPC: 1013,2 mg galne kiseline/100 g SBM	Mikulic-Petkovsek et al., 2012b
<b>Mikrotalasna ekstrakcija</b>		
EtOH (25-75%), 300-600 W, 5-15 min	TPC: 31,6-38,8 mg GAE/g SE TF: 12,9-23,2 mg RE/g SE	Rezultati ovog rada

TPC: Ukupni sadržaj fenola; TF: Ukupni sadržaj flavonoida; GAE: Ekvivalenata galne kiseline; RE: Ekvivalenata rutina, MeOH – metanol, EtOH – etanol, SE – suvog ekstrakta, SBM – sveži biljni materijal, SP- suvi ostatak ploda

#### 4.1.2.1. Uticaj koncentracije etanolnog rastvora

Kako je biljni materijal vrlo kompleksna smeša različitih klasa bioaktivnih jedinjenja izbor pogodnog rastvarača primenjenog u ekstrakciji baziran je na hemijskom sastavu i polarnosti ciljanih ekstraktivnih jedinjenja. Rastvarač izabran za primenu u mikrotalasnoj ekstrakciji takođe mora imati mogućnost absorpcije mikrotalasne energije i njene konverzije u toplotnu energiju što zavisi od dielektričnih svojstava rastvarača (Zhang et al., 2011).

Za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja sa antioksidativnim svojstvima obično se kao rastvarači preporučuju voda, etanol, metanol, aceton, etil-acetat i njihovi vodeni rastvori (Hayat et al., 2009; Karacabey i Mazza, 2010; Kahkonen et al., 1999; Tabart et al., 2007). Voda predstavlja jeftin, netoksičan i veoma polaran rastvarač za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja, ali najveći nedostatak izbora vode kao rastvarača pri ekstrakciji je visok sadržaj primesa i nečistoća u dobijenim ekstraktima koji ometaju identifikaciju i kvantifikaciju ispitivanih bioaktivnih jedinjenja (Rafiee et al., 2011). Prednost etanola i etanolno vodenih rastvora kao ekstragenasa je u tome što obezbeđuju umereno polarnu sredinu za ekstrakciju i visok prinos ekstraktivnih materija. To je razlog što su ovo vrlo često korišćeni ekstragenasi u proizvodnji farmaceutskih i prehrambenih proizvoda, posebno zahvaljujući svom niskom nivou toksičnosti i minimalnom uticaju na zdravlje ljudi i životnu sredinu (Li et al., 2012; Pérez-Serradilla i Luque de Castro, 2011; Oszmianski i Wojdylo, 2005; Karacabey i Mazza, 2010; Denev et al., 2010). Etanol ima epitet takozvanog biorastvarača, jer se može proizvesti fermentacijom iz različitih bioresursa što doprinosi ekološkoj i ekonomskoj prihvatljivosti industrijskog procesa (Radojković et al., 2018).

U ovom radu je utvrđeno da nezavisno od primenjene mikrotalasne snage i vremena trajanja procesa ekstrakcije, najveći sadržaj fenola i flavonoida prisutan je u ekstraktima dobijenim ekstrakcijom 50%-tnim etanolom. Etanol u koncentraciji od 50% je uz primenu snage mikrotalasa od 600 W i u kombinaciji sa najdužim ekstrakcionim vremenom (15 min) bio najefikasniji u smislu dobijanja ekstrakta sa maksimalnim sadržajem fenolnih jedinjenja od 38,8 mg galne kiseline/g suvog ekstrakta, dok se daljim porastom udela etanola u ekstrakcionom sistemu (75%) sadržaj ovih jedinjenja smanjuje za 5,7%. Korišćenjem etanola u koncentraciji od 25% (300 W, 5 min) dobijen je najmanji prinos flavonoida i to 12,9 mg rutina/g suvog ekstrakta, što je 1,8 puta manje od maksimalnog prinosa dobijenog korišćenjem etanola u koncentraciji od 50%, pri snazi mikrotalasa od 600 W i 15 min.

Sadržaj flavonoida u ekstraktima najpre raste sa povećanjem koncentracije etanola do 50% nakon čega je zabeležen opadajući trend što se može objasniti na isti način kao i kod uticaja koncentracije etanola na sadržaj ukupnih fenola. U radu Gharekhani i saradnika (2012) zapažen je značajan porast sadržaja flavonoida sa povećanjem koncentracije etanola od 10-50% pri mikrotalasnoj ekstrakciji lišća eukaliptusa. Koncentracija etanola od 50% je doprinela maksimalnom sadržaju flavonoida dok je dalje povećanje udela etanola izazvalo smanjenje prinosa ovih jedinjenja u ekstraktu (Gharekhani et al., 2012). Ranija istraživanja su takođe pokazala da je 50%-tni vodeni rastvor etanola najpogodniji sistem za ultrazvučnu ekstrakciju polifenolnih jedinjenja aronije, kako iz ploda tako i iz ostataka nakon industrijske prerade (D'Alessandro et al., 2012, 2014). Cacao i Mazza (2003b) su pri ekstrakciji plodova crne ribizle pokazali da sa porastom koncentracije etanola do 60% raste količina ukupnih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima, ali zatim opada sa daljim povećanjem koncentracije etanola. Slična tendencija potvrđena je pri mikrotalasnoj ekstrakciji polifenolnih jedinjenja iz listova batata (Song et al., 2011), borovnice (Routray i Orsat, 2014), zelenog čaja (Pan et al., 2003), eukaliptusa (Gharekhani et al., 2012), kao i listova biljke *Myrtus communis* L. (Dahmoune et al., 2015). Ova pojava može se objasniti činjenicom da u početku povećanje koncentracije etanola dovodi do ubrzanog prodiranja kroz ćelijske membranabiljnog tkiva, ali sa daljim porastom etanolne koncentracije polarnost rastvarača se menja pa se ekstrakcija nečistoća i primesa iz biljnog materijala ubrzava što otežava proces difuzije, a javlja se i koagulacija proteina (Li et al., 2012; Yang et al., 2009). Takođe, različita dielektrična svojstva vode i etanola utiču na disipacioni faktor njihove smeše odnosno mogućnost absorpcije mikrotalasne energije, njenu konverziju u toplotnu energiju i distribuciju toplote u biljnom materijalu (Eskilsson i Björklund, 2000).

U radu Radojković i saradnika (2018) povećanjem koncentracije etanola do 50% rastao je sadržaj polifenola u ekstraktima lišća crnog duda pa je ova koncentracija etanola izabrana kao optimalna. Autori su ukazali da obe komponente ekstragensa (voda i etanol) lako prodiru u ćelije biljnog materijala i reaguju sa proteinima vezanim za polifenole, dok veća koncentracija etanola može izazvati denaturaciju proteina čime se onemogućava rastvaranje polifenola. Povećanjem udela vode polarnost binarne smeše vode i etanola raste, a kako su i sami fenoli polarna jedinjenja njihova koncentracija u dobijenim ekstraktima se takođe povećava (Radojković et al., 2018). Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima suvih plodova andske borovnice (Espinosa et



al.,2017), ploda masline (Li et al., 2004) i kineske dunje (Teng et al., 2009) dobijenih mikrotalasnom ekstrakcijom raste do koncentracije etanola u ekstrakcionom sistemu od 40 do 50% nakon čega dalji rast koncentracije etanola uzrokuje smanjenje prinosa fenolnih jedinjenja. Optimizacijom uslova mikrotalasne ekstrakcije flavonoida iz grančica biljke ljuskavac (*Physalis alkekengi*) utvrđeno je da porast koncentracije etanola uzrokuje povećanje sadržaja flavonoida u ekstraktima do maksimuma postignutog pri upotrebi 70%-tnog rastvora. Daljim povećanjem koncentracije etanolnog rastvora prinos flavonoida značajno opada (Xue-Gui et al., 2015). Porastom udela etanola u vodenom rastvoru 80% (v/v) rastao je i prinos flavonolignana silbinina dok je dalje povećanje koncentracije etanola uslovalo pad ekstrakcionog prinosa ovog jedinjenja pri mikrotalasnoj ekstrakciji sikavice (*Silybum marianum*) (Zheng et al., 2009).

#### **4.1.2.2. Uticaj snage mikrotalasa**

Rezultati ovog rada ukazuju da ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja raste sa povećanjem mikrotalasne snage i dostiže maksimalnu vrednost (38,8 mg GAE/g suvog ekstrakta) delovanjem snage mikrotalasa od 600 W (pri koncentraciji etanola od 50%).

Pozitivan uticaj porasta mikrotalasne snage na sadržaj fenolnih jedinjenjanaden je kod ekstrakcija polifenola iz suvog ploda andske borovnice (Espinosa et al., 2017), lista masline (Rafiee et al., 2011), crnog čaja (Spigno i De Faveri., 2009) i kore nara (Zheng et al., 2011) gde je porast mikrotalasne snage i vremena trajanja ekstrakcije povećao efikasnost ekstrakcije polifenolnih jedinjenja usled prisustva veće količine elektromagnetne energije koja se prenosi ekstrakcionom sistemu (Xiao et al., 2008). Sličan rezultat objavili su i Michel i saradnici (2011) za izolovanje polifenola iz bobica pasjeg trna primenom mikrotalasne ekstrakcije bez prisustva rastvarača što je takođe u saglasnosti sa zaključcima ovog rada.

Međutim, u ekstraktima listova manga i ostataka prerade jabuka uočeno je da se sa porastom snage mikrotalasa smanjuje koncentracija fenolnih jedinjenja, što je objašnjeno najverovatnijom degradacijomovih jedinjenja pod dejstvom mikrotalasa veće snage (Rezaei et al., 2013; Zou et al., 2013). Razlog ovakvog neslaganja može se objasniti i razlikama u stabilnosti i svojstvima fenolnih jedinjenja koja potiču iz različitih tipova biljnog materijala.

U ovom radu nađeno je da porast vrednosti mikrotalasne snage pozitivno utiče na prinos flavonoida u smislu povećanja nezavisno od vrednosti koncentracije etanola i ekstrakcionog

vremena. Efekat promene snage od 300 na 600 W najizraženiji je pri kraćem vremenu izlaganja mikrotalasima (5 min, 25% EtOH) gde je zabeležen porast sadržaja flavonoida u dobijenim ekstraktima od 41,9%, uticaj porasta snage mikrotalasa se dalje smanjuje sa produžetkom ekstrakcionog vremena. Neznatno smanjenje koncentracije flavonoida povećanjem mikrotalasne snage od 450 do 600 W zabeleženo je pri trajanju ekstrakcije od 10 i 15 min, kada je korišćen 75%-tni etanolni rastvor.

Ista zapažanje, da se porastom mikrotalasne snage i vremena trajanja ekstrakcionog procesa podstiče povećanje sadržaja polifenolnih jedinjenja u dobijenim ekstraktima objavljena su za mikrotalasnu ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz kljuka jabuke (Bai et al., 2010), ploda lovor višnje (Karabegović et al., 2013), listova biljne vrste *Diospyros kaki* L. (Liu et al., 2012) i biljne vrste *Buddleia officinalis* L. (Pan et al., 2010). Međutim, u radu Périno-Issartier i saradnika (2011) povećanje mikrotalasne snage (500-900 W) uticalo je na smanjenje udela fenolnih jedinjenja u ekstraktima tropa bobica pasjeg trna (*Hippophae rhamnoides*), dok su Xue-Gui i saradnici (2015), slično zapažanjima iz ovog rada, pokazali da porast mikrotalasne snage u opsegu od 80-440 W doprinosi porastu sadržaja flavonoida u ekstraktima grančica ljuskavca. Međutim, nalazi ovih autora ukazuju da dalji porast vrednosti ovog procesnog faktora dovodi do smanjenja sadržaja flavonoida. Ovakve razlike u uticaju promene snage mikrotalasa objašnjavaju se različitim polifenolnim profilom ekstrahovanih biljnih vrsta, odnosno različitom otpornošću prisutnih polifenolnih jedinjenja na dejstvo mikrotalasa i visoke temperature.

#### **4.1.2.3. Uticaj ekstrakcionog vremena**

Rezultati ovog rada ukazuju da se produžetkom vremena ekstrakcije sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima dobijem pri istim uslovima povećava. Porast ekstrakcionog vremena od 5 na 15 minuta, generalno i u proseku, rezultira povećanjem sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima za do 10%, pri čemu je uticaj produžetka vremena ekstrakcije veći pri većim koncentracijama etanola u ekstrakcionom sistemu. Ovo je u saglasnosti sa ranije publikovanim rezultatima. Sadržaj ukupnih fenola rastao je sa povećanjem vremena mikrotalasne ekstrakcije lišća eukaliptusa i dostigao najveću vrednost nakon ekstrakcionog vremena od 15 min (Gharekhani et al., 2012). Ekstrakciono vreme predstavljalo je najuticajniji faktor pri ekstrakciji fenolnih jedinjenja iz bobica pasjeg trna mikrotalasnom ekstrakcijom bez prisustva rastvarača, u smislu da

je povećanjem vrednosti ovog faktora rastao i sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktu (Michel et al., 2011). Povećanjem ekstrakcionog vremena u opsegu od 5-15 min ispitivan je uticaj ovog faktora na prinos fenolnih jedinjenja u ekstraktima suvog ploda andske borovnice, pri čemu je utvrđeno da se sadržaj praćenih jedinjenja povećava do 11,8 min nakon čega se smanjuje (Espinosa et al., 2017) što nije u saglasnosti sa zapažanjima iz ovog rada. Takođe, mikrotalasnom ekstrakcijom fenolnih jedinjenja iz lišća zelenog čaja ustanovljeno je da njihov sadržaj u ekstraktima raste sa povećanjem ekstrakcionog vremena (do 4 min), ali dalji produžetak vremena dovodi do smanjenja sadržaja fenola (Pan et al., 2003). Ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz opne kikirikija (Yu et al., 2008), fenola iz crnog čaja (Spigno i De Faveri., 2009), flavonoida iz korena biljne vrste *Astragalus mongolicus* (Xiao et al., 2008) realizovane primenom mikrotalasa različite snage rezultovale su sličnim zapažanjima uz zaključak da predugo izlaganje biljnog materijala dejstvu mikrotalalasa može dovesti do termalne degradacije ciljanih jedinjenja.

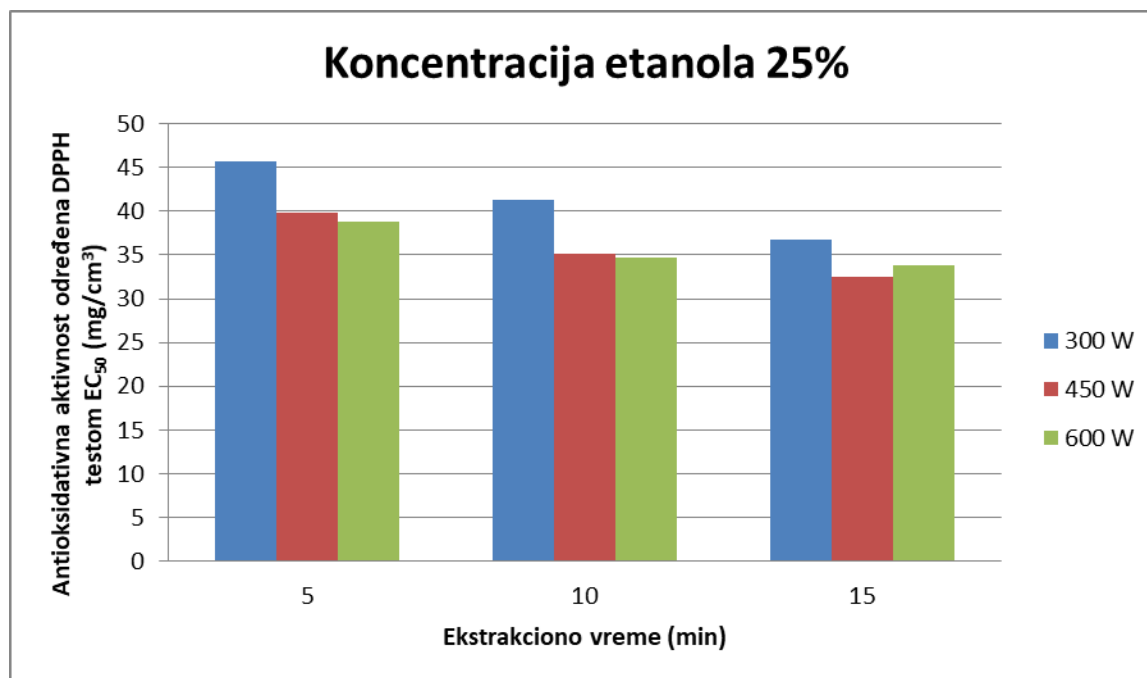
Takođe, u ovom radu, uočeno je da povećanjem ekstrakcionog vremena raste i sadržaj flavonoida u ekstraktima dobijenim pod istim uslovima. Uticaj promene vremena od 5 na 15 minuta veći je kod manjih snaga mikrotalasa (za oko 50%), dok je kod većih snaga mikrotalasa (450 i 600 W) isti produžetak trajanja ekstrakcije doveo do porasta sadržaja flavonoida od oko 20%. Maksimalan prinos flavonoida dobijen je primenom najveće snage mikrotalasa (600 W) i najdužeg ekstrakcionog vremena 15 min (50% etanol) koji je čak 1,78 puta veći u odnosu na prinos ostvaren tokom delovanja mikrotalasa snage 300 W tokom 5 min (50% etanola).

Zapažanjene slično onom iz ovog rada proisteklo je pri mikrotalasnoj ekstrakciji flavonoida iz lišća eukaliptusa gde je takođe dokazano da prinos flavonoida raste sa produžetkom vremena ekstrakcije i maksimalni prinos zabeležen je nakon 15 minuta (Gharekhani et al., 2012), dok nakon 12 min mikrotalase ekstrakcije, sadržaj flavonoida u ekstraktima grančica ljuskavca počinje neznatno da se smanjuje (Xue-Gui et al., 2015). Pri mikrotalasnoj ekstrakciji biljke *Buddleia officinalis* L. povećanje vremena trajanja ekstrakcije uzrokovalo je rast sadržaja flavnoida u etanolnim ekstraktima i to do dvadesetpetog minuta, a nakon tog vremena sadržaj flavnoida lagano počinje da opada (Pan et al., 2010). Ovi rezultati objašnjavaju se potpunijim iscrpljivanjem fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala tokom dužeg kontakta sa rastvaračem. Značajan produžetak vremena ekstrakcije može se negativno odraziti na sadržaj bioaktivnih

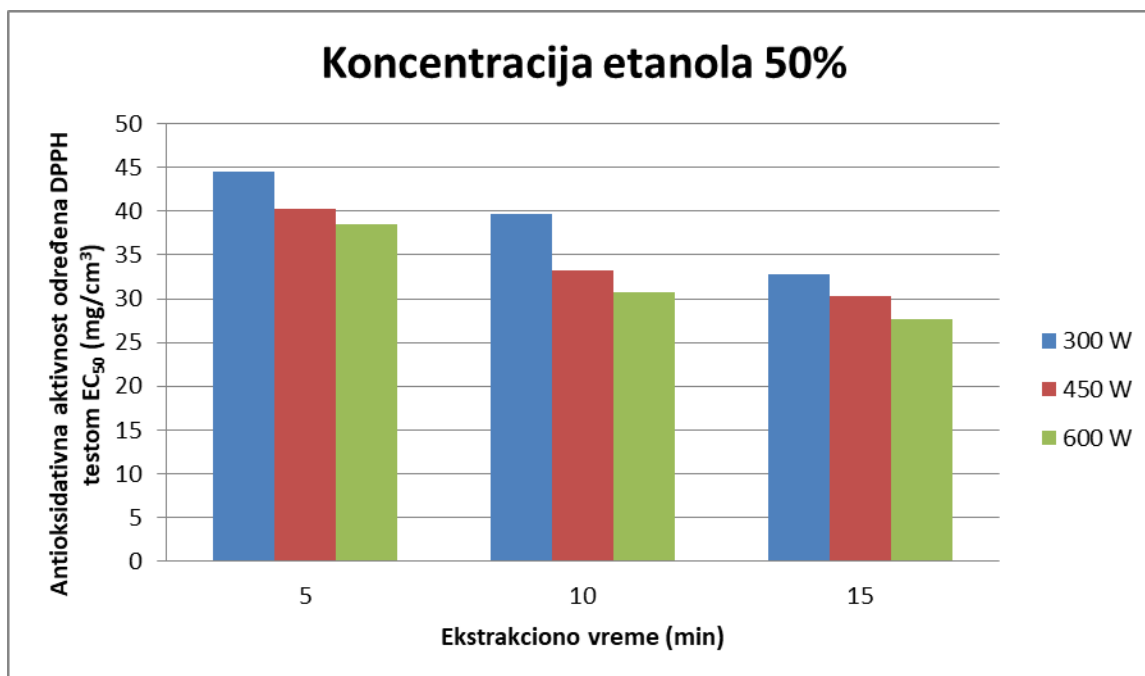
jedinjenja koja su podložna degradaciji, ali ima i negativan uticaj na ekonomičnost procesa ekstrakcije.

#### 4.1.3. Antioksidativna aktivnost dobijenih ekstrakata ploda aronije

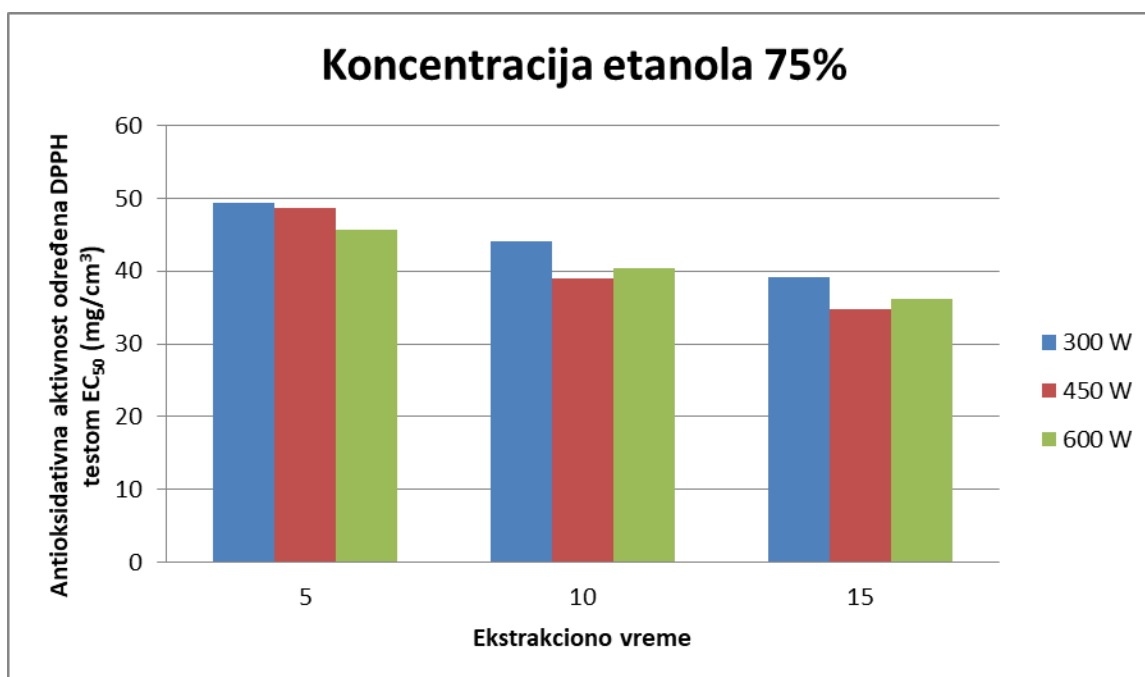
Antioksidativna aktivnost (AOA) ekstrakata dobijenih iz ploda aronije ekstrakcijom etanolnim rastvorom različitih koncentracija (25, 50 i 75%), upotrebom različite mikrotalasne snage (300, 450 i 600 W) i različitim vremenom trajanja ekstrakcije (5, 10 i 15 minuta) određena je korišćenjem DPPH i FRAP testa. Procenat neutralisanja DPPH radikala izražen je pomoću vrednosti  $EC_{50}$  koja predstavlja koncentraciju ekstrakta potrebnu za neutralizaciju 50% DPPH radikala (Villaño et al., 2007). Recipročna vrednost  $EC_{50}$  predstavlja antiradikalnu efikasnost  $A_{AE}$  pri čemu je veća vrednost  $A_{AE}$  pokazatelj veće antioksidativne aktivnosti (Maisuthisakul et al., 2007). Na slikama 4.10-4.12. predstavljen je uticaj ekstrakcionih parametara na AOA ekstrakata ploda aronije određenu primenom DPPH metode, dok slike 4.13-4.15 predstavljaju prikaz uticaja ekstrakcionih parametara na AOA ekstrakata aronije određenu primenom FRAP metode. Vrednosti AOA ekstrakata ploda aronije date su u Tabeli PT4 u Prilogu.



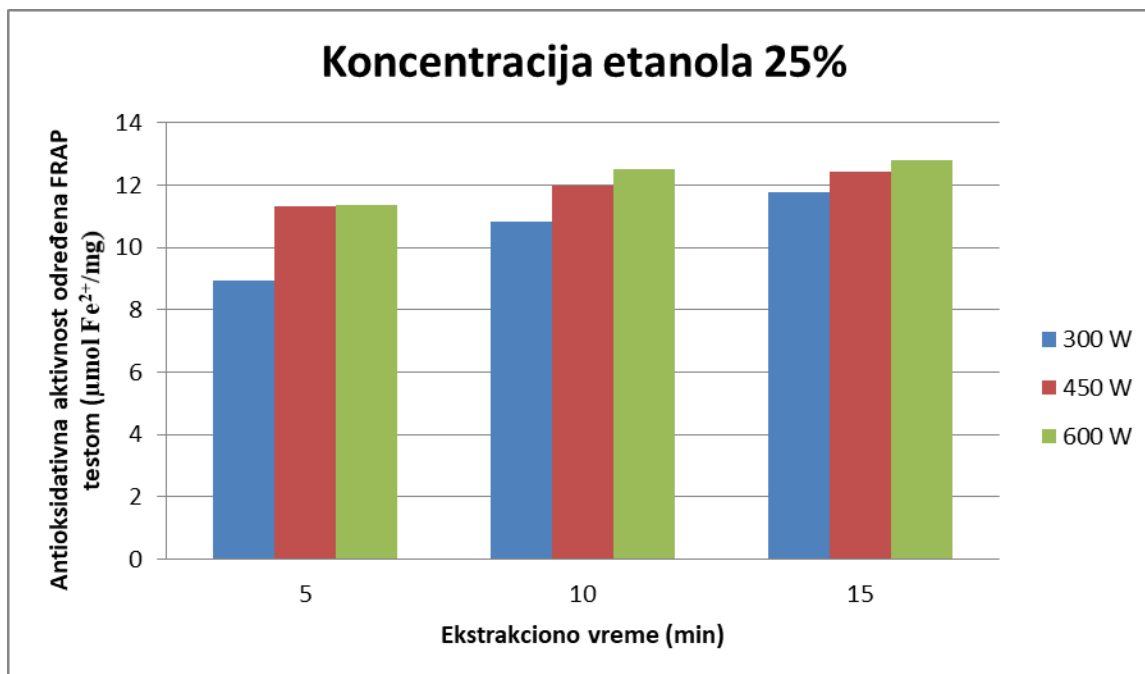
Slika 4.10 Uticaj ekstrakcionih parametara na antioksidativnu aktivnost ekstrakata aronije određenu primenom DPPH metode ( $EC_{50}$ ) pri koncentraciji etanola od 25%



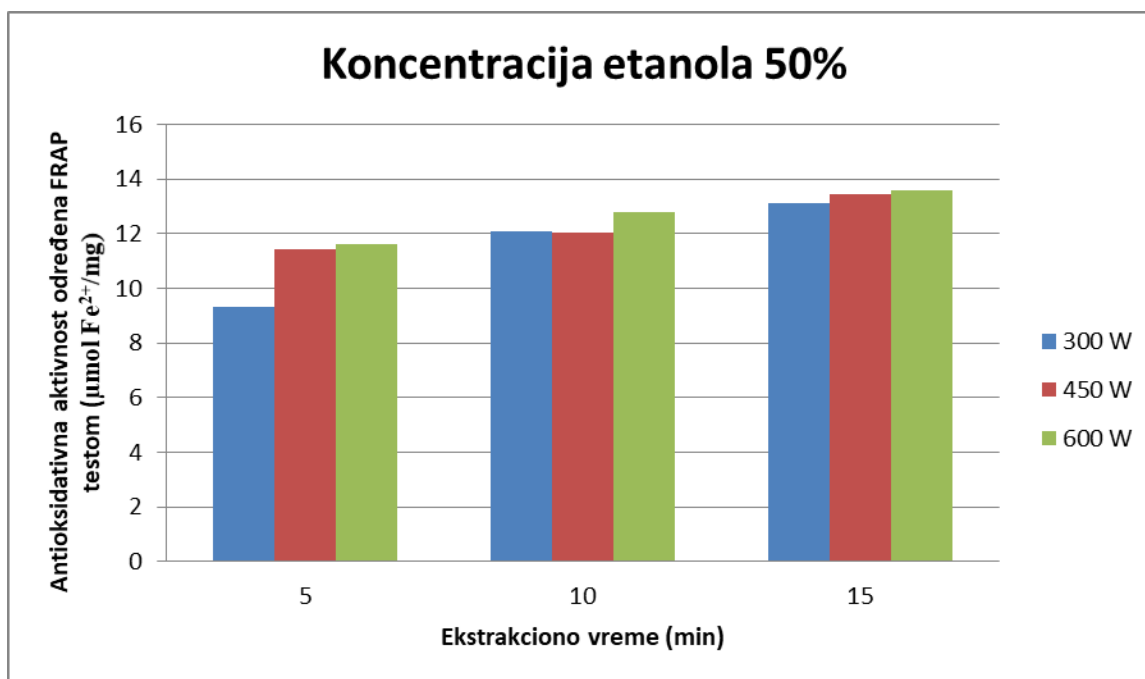
Slika 4.11 Uticaj ekstrakcionih parametara na antioksidativnu aktivnost ekstrakata aronije određenu primenom DPPH metode ( $EC_{50}$ ) pri koncentraciji etanola od 50%



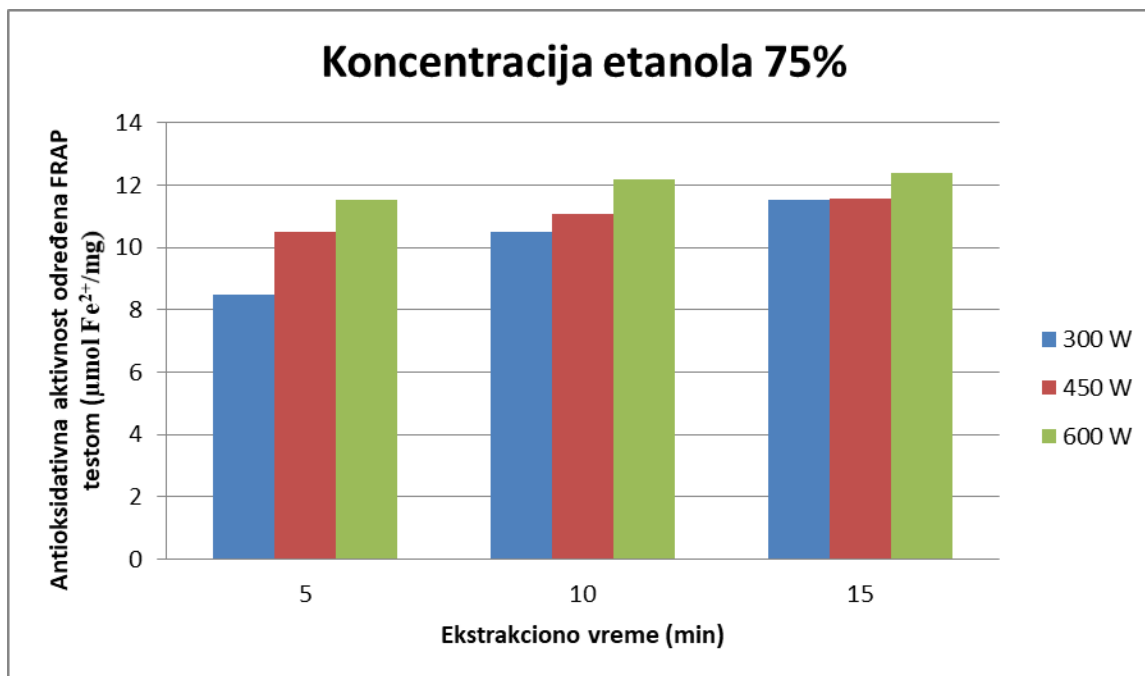
Slika 4.12 Uticaj ekstrakcionih parametara na antioksidativnu aktivnost ekstrakata aronije određenu primenom DPPH metode ( $EC_{50}$ ) pri koncentraciji etanola od 75%



Slika 4.13 Uticaj ekstrakcionih parametara na antioksidativnu aktivnost ekstrakata aronije određenu primenom FRAP metode pri koncentraciji etanola od 25%



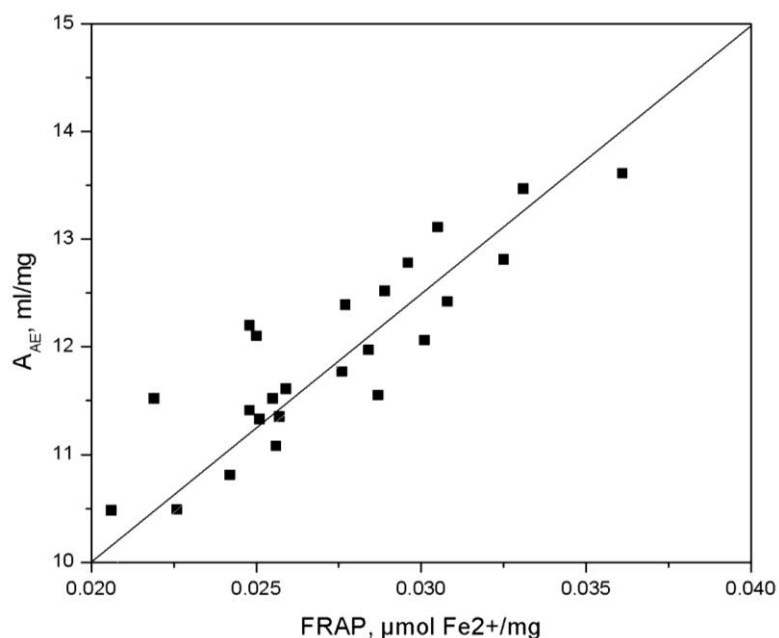
Slika 4.14 Uticaj ekstrakcionih parametara na antioksidativnu aktivnost ekstrakata aronije određenu primenom FRAP metode pri koncentraciji etanola od 50%



Slika 4.15 Uticaj ekstrakcionih parametara na antioksidativnu aktivnost ekstrakata aronije određenu primenom FRAP metode pri koncentraciji etanola od 75%

Prilikom određivanja antioksidativne aktivnosti obično se preporučuje korišćenje više od jedne metode zbog limitiranosti i slabe selektivnosti rutinskih spektrofotometrijskih metoda (Jakobek et al., 2012). Različite metode za određivanje antioksidativne aktivnosti pri ispitivanju istog uzorka mogu u nekim slučajevima dati kontradiktorne rezultate kao posledicu razlike u principu delovanja ovih metoda (način detekcije završne tačke, vreme trajanja reakcije, vrsta korišćenog radikala). Ponekad i metode koje su bazirane na istom principu mogu pokazati različite rezultate za isti uzorak (ometajući faktor za dobijanje realnih vrednosti u metodama zasnovanim na promeni boje je prisustvo obojenih jedinjenja u uzorku koji se ispituje) (Arnao, 2000).

Dobijeni rezultati ukazuju na visoku vrednost AOA ekstrakata ploda aronije, koji se nalaze u opsegu od  $45,6 \text{ mg/cm}^3$  do  $27,73 \text{ mg/cm}^3$  ( $EC_{50}$ ) odnosno od  $0,0219 \text{ cm}^3/\text{mg}$  do  $0,0361 \text{ cm}^3/\text{mg}$  ( $A_{AE}$ ). Rezultati dobijeni ispitivanjem FRAP metodom nalaze se u intervalu od  $8,92 \text{ µmol Fe}^{+2}/\text{mg}$  suvog ostatka ekstrakta do  $13,61 \text{ µmol Fe}^{+2}/\text{mg}$  suvog ostatka ekstrakta. Slika 4.16 ilustruje činjenicu da su rezultati dobijeni DPPH testom u relativno dobroj korelaciji sa rezultatima dobijenim FRAP testom (vrednost koeficijenta korelacije  $R^2 = 0,822$ ).



Slika 4.16 Korelacija rezultata dobijenih DPPH i FRAP testom

Rezultati dobijeni u ovom radu pokazuju nešto veću AOA ekstrakata ploda aronije od onih dobijenih u slučaju ekstrakcije ploda aronije metanolnim rastvorom zakišelenim sa 3% mravlje kiseline (1:4 w/v) na temperaturi od 4°C u toku 24 sata gde je DPPH metodom dobijen rezultat: 0.004-0.012 mg/cm<sup>3</sup> (Espín et al., 2000). Etanolni ekstrakt ploda aronije (50% etanol) dobijen ekstrakcijom po Soxhlet-u pokazao je visoku AOA, EC<sub>50</sub>=25,0±5,0 µg/mL (Braunlich et al., 2013), dok su Wangensteen i saradnici (2014) ispitivanjem AOA 80% etanolnih ekstrakta (ekstrakcija sa refluksum, 2 h) kultivisanih sorti aronije ‘Moskva’, ‘Hugin’, ‘Nero’ i *Aronia prunifolia* dobili EC<sub>50</sub> vrednosti u iznosu od 35,7±1,5; 16,2±0,4; 35,5±1,4; 21,2±0,7 µg/cm<sup>3</sup>, respektivno. Nađeno je da je prosečna EC<sub>50</sub> vrednost sorte *A. melanocarpa* Elliott (crna aronija) 1,8 mg (vrednost je definisana kao broj mg svežeg biljnog materijala potrebnog za 50% smanjenja početne koncentracije DPPH • radikala) (Benvenuti et al., 2004). Jakobek i saradnici (2014) su u periodu od dve godine ispitivali AOA ekstrakata plodova aronije sorte “Nero”, “Viking”, “Galicianka” i divlje aronije pri čemu je najveću AOA pokazao etanolni ekstrakt divlje aronije (0,54 i 1,06 g ploda aronije/g DPPH prve i druge godine ispitivanja respektivno), a najmanju, sorte “Galicianka” (2,53 i 1,66 g ploda aronije/g DPPH). Ovaj tim autora konstatovao je razliku AOA ne samo kada je u pitanju ispitivanje različitih varijeteta aronije, već i različitih



godina ubiranja (Jakobek et al., 2012). Istraživanja Hwangi saradnika (2014) pokazala su da je kapacitet inhibicije DPPH radikala (%), pri koncentracijama ekstrakta crne aronije od 10, 50 i 500 µg/ml iznosio 31,1%, 37,0% i 72,7%, respektivno. Voda, aceton i heksan kao ekstragensi rezultirali su različitim vrednostima AOA ploda aronije analizirane DPPH metodom: 87,2±3,1; 3,55±0,2; 1,19±0,05 µM trolox ekvivalent/g, i analizirane FRAP metodom: 57,4±2,3; 2,84±0,1; 0,89±0,04 µM trolox ekvivalent/g suvog ostatka i to za vodeni, ekstrakt sa acetonom i ekstrakt sa heksanom, respektivno (Arancibia-Avila et al., 2012).

Zakišeljani rastvor metanola upotrebljen je kao ekstragens pri ispitivanju AOA ekstrakta ploda *Aronia melanocarpa*, a nađene vrednosti više različitih uzoraka izražene u % inhibicije DPPH radikala iznosile su od 23,1-46,4%, odnosno 43,8-77,0 mmol Fe<sup>2+</sup>/mg suve mase određene FRAP metodom (Szopa et al., 2017). FRAP test ekstrakata ploda aronije (varijeteti Viking i Aron) uz zakišeljani (0,3% HCl) apsolutni methanol kao ekstragens, pokazali su vrednosti od 185 do 206,2 µmol Fe<sup>2+</sup>/g svežeg biljnog materijala (Rugina et al., 2012).

#### **4.1.3.1. Uticaj koncentracije etanola**

Etanol je jedan od najčešće korišćenih rastvarača za ekstrakciju supstanci sa izraženom antioksidativnom aktivnošću, međutim čisti organski rastvarači ne mogu se primeniti kao ekstragensi veoma polarnih fenolnih kiselina (benzeova, cimetna kiselina) pa se u tom slučaju uglavnom ekstrakcija vrši njihovim vodenim rastvorima različitih koncentracija (Dai i Mumper, 2010).

U odnosu na dobijene DPPH i FRAP vrednosti ekstrakata ploda aronije u ovom radu može se zaključiti da sa porastom koncentracije etanola (od 25% do 50%) raste i AOA, dok dalje povećanje koncentracije etanola do 75% prouzrokuje smanjenje AOA. Ova pojava je posledica promene polarosti rastvarača, što vodi koagulaciji proteina čime se povećava otpor difuziji polifenolnih komponenti koje su nosioci AOA (Li et al., 2012). Najmanje efikasan ekstragens komponenti koje ispoljavaju antioksidativno dejstvo bio je rastvor sa najvećom primenjenom koncentracijom etanola (75%). Povećanjem koncentracije etanola u ekstrakcionom sistemu sa 25 na 75% (15 min, 450 W), AOA dobijenih ekstrakata se smanjila za 25,8% (DPPH test) i 9,8% (FRAP test). Razlika u AOA ekstrakata dobijenih primenom različitih rastvarača, ili kao u ovom slučaju različitog udela etanola u ekstrakcionom sistemu, objašnjava se različitom efikasnošću

ovih rastvarača u rastvaranju i ekstrahovanju komponenti koje su nosioci AOA. Promenom udela organskog rastvarača u odnosu na vodu menja se polarnost ove binarne smeše što ima efekat ne samo na kvantitet ekstrahovanih fenolnih jedinjenja već i na vrstu ekstrahovanih fenola pa samim tim i na antioksidativni potencijal (Karacabey i Mazza, 2010). Naime, u mnogim istraživanjima dokazana je korelacija između sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ekstrakata ispitivanog biljnog materijala (Sharma et al., 2008; Karacabey i Mazza, 2010; Périno-Issartier et al., 2011; Wen et al., 2015; Duan et al., 2015; Thi i Hwang, 2016) što ukazuje da antioksidativna aktivnost ekstrakta uglavnom potiče od prisutnih fenolnih jedinjenja.

Pri mikrotalasnoj ekstrakciji goji (godži) bobica veća AOA (određena ABTS testom) je dobijena kod ekstrakata dobijenih ekstrakcijom pri većim koncentracijama metanola, dok je bolja AOA (određena ORAC testom) nađena za ekstrakte dobijene sa manjim koncentracijama metanola. Slaba korelacija rezultata ovih dveju korišćenih metoda objašnjena je različitim mehanizmom i kinetikom reakcija na kojima se zasnivaju metode određivanja prisutnih antioksidanata (Mendes et al., 2016).

Prisustvo vode u ekstrakcionom sistemu za mikrotalasnu ekstrakciju poboljšava penetraciju rastvarača u biljni matriks i povećava efekat zagrevanja, a samim tim i efikasnost ekstrakcije. Wen i saradnici (2015) ispitivali su uticaj koncentracije etanolnog rastvora na antioksidativnu aktivnost ekstrakata ploda kupine dobijenih mikrotalasnom ekstrakcijom. Povećanje koncentracije etanolnog rastvora (0-100%) uzrokovalo je rast AOA (određivanu ABTS i DPPH testom) i to do koncentracije etanola u ekstrakcionom sistemu od 60%. Pri ovoj vrednosti koncentracije etanola antioksidativna aktivnost ekstrakta dostigla je maksimum, te je pri daljem povećanju koncentracije etanolnog rastvora, AOA opadala i to rapidno nakon dostizanja vrednosti koncentracije rastvora etanola od 80% (Wen et al., 2015).

#### **4.1.3.2. Uticaj snage mikrotalasa**

Rezultati za AOA analiziranih extricate generalno ukazuju na rast AOA pri povećanju mikrotalasne snage i vremena trajanja ekstrakcije. Maksimalnu AOA pokazao je ekstrakt dobijen ekstrakcijom pri mikrotalasnoj snazi od 600 W u toku 15 minuta i pri koncentraciji etanola od 50%, 27,73 mg/cm<sup>3</sup>(EC<sub>50</sub>), odnosno od 0,0219 cm<sup>3</sup>/mg (A<sub>AE</sub>) i 13,61 μmol Fe<sup>+2</sup>/mg suvog ostatka ekstrakta-FRAP metoda. Ovo se može objasniti činjenicom da se angažovanjem veće

snage mikrotalasa i produžetkom procesa intenzivira zagrevanje sistema, dešava obimnije oštećenje ćelijskih zidova biljnog materijala i oslobađanje ekstraktivnih substanci (Ahmad i Langrish, 2012).

Povećanjem snage mikrotalasa, nezavisno od ostalih procesnih parametara, u svim slučajevima zapažen je rast AOA dobijenih ekstrakata aronije. Povećanje ovog procesnog parametra od 300 na 600 W izazvao je prosečan rast AOA od oko 24, odnosno 36% pri petominutnim ekstrakcijama, respektivno. Desetominutnom ekstrakcijom 50%-tnim etanolom i mikrotalasnog snagom od 600 W dobijen je ekstrakt sa 30% većom AOA u odnosu na ekstrakt dobijen pod istim uslovima ali angažovanjem snage od 300W. Porast mikrotalasnog petnaestominutnih ekstrakcija (25% i 75% etanolni rastvor) izazvao je najpre rast a zatim pad AOA (određene DPPH testom).

Wen i saradnici (2015) su utvrdili da maksimalnu AOA (određenu ABTS i DPPH metodom) pokazuju ekstrakti kupine dobijeni pri mikrotalasnog snazi od 400 W, dok je dalji rast snage mikrotalasa negativno uticao na AOA ekstrakata. Povećanje snage mikrotalasa od 40 do 80 W prilikom mikrotalasnog ekstrakcije ploda kineske dunje izazvalo je porast AOA dobijenih ekstrakta, ali je dalje povećanje mikrotalasnog snage (do 160 W) uticalo na smanjenje AOA što autori objašnjavaju destrukcijom termolabilnih ciljanih komponenti ekstrakta koje su nosioci AOA (Teng et al., 2015).

Variranje angažovane mikrotalasnog snage utiče na promenu temperature ekstrakcionog sistema (povećanjem snage mikrotalasa raste temperatura ekstrakcionog smeše) što uzrokuje razliku u profilu fenolnih jedinjenja u ekstraktima dobijenim pod različitim uslovima, pa samim tim i u njihovoj antioksidativnoj aktivnosti (Karacabey i Mazza, 2010).

#### **4.1.3.3. Uticaj ekstrakcionog vremena**

Produžetak ekstrakcionog vremena ispoljava pozitivan efekat u smislu povećanja AOA dobijenih ekstrakta. Najizraženiji efekat na AOA ekstrakata sa produžetkom vremena ekstrakcije uočen je pri ekstrakciji 50%-tnim rastvorom etanola. U proseku, korišćenjem ovog ekstrakcionog sistema i porastom ekstrakcionog vremena od 5-15 min, uočeno je povećanje AOA ekstrakta određene DPPH i FRAP testom za 39,4% i 17,2%, respektivno.

Generalno, veću AOA ispoljili su ekstrakti dobijeni ekstrakcijom pod dejstvom mikrotalasa veće snage i dužim vremenom ekstrakcije, ali je uticaj mikrotalasnog snage bio izraženiji za manje vreme trajanja ekstrakcije. Slične rezultate publikovali su Li i saradnici (2012) za mikrotalasnú ekstrakciju fenola iz paradajza. Autori ovu pojavu objašnjavaju činjenicom da promena angažovane mikrotalasnog snage utiče na promenu temperature ekstrakcionog sistema u smislu njenog povećanja. Pri ekstrakciji uz angažovanje manje mikrotalasnog snage povećanje temperature ekstrakcionog sistema je sporije, manja je brzina prenosa mase ekstraktivnih materija u rastvor, tako da je neophodno duže vreme za ekstrakciju ciljanih jedinjenja. Na višim temperaturama, odnosno angažovanjem veće mikrotalasnog snage, proces rastvaranja fenolnih jedinjenja dostiže dinamičku ravnotežu za kraće vreme tako da u ovom slučaju produžetak ekstrakcionog vremena ima manje izražen uticaj na proces (Li et al., 2012). Međutim, produženje ekstrakcionog vremena pri angažovanju veće snage mikrotalasa može dovesti do termičke razgradnje fenolnih jedinjenja, pa je preporuka nekih autora da je ekstrakcija antioksidativnih fenola efikasnija pri višim vrednostima mikrotalasnog snage i za kraće ekstrakciono vreme (Chen et al., 2007; Li et al., 2012).

Pri mikrotalasnoj ekstrakciji goji (godži) bobica metanolom AOA određena ORAC metodom bila je veća kod ekstrakata dobijenih pri dužem ekstrakcionom vremenu (Mendes et al., 2016). Razmatranjem uticaja vremena mikrotalasnog ekstrakcije na antioksidativnu aktivnost ekstrakta kupine bavili su se Wen i saradnici (2015) i utvrdili da je AOA (određena ABTS i DPPH metodom) rasla sa povećanjem ekstrakcionog vremena do 3 min nakon čega je produženje trajanja ekstrakcije do 9 min izazvalo smanjenje AOA ekstrakata. Međutim, ekstrakciono vreme (5-15 min) nije značajno uticalo na antioksidativnu aktivnost ekstrakata ploda kineske jagode (*Myrica rubra*) u smislu da dužim trajanjem mikrotalasnog ekstrakcije nije postignuto povećanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata određene DPPH metodom (Duan et al. 2015).

## ***4.2. Optimizacija operativnih uslova mikrotalasne ekstrakcije primenom metode odzivnih površina i metode veštačke neuronske mreže***

U postupku dobijanja bioaktivnih komponenti iz biljnih materijala, a u cilju ostvarivanja što većih prinosa na najekonomičniji način, poželjna je primena matematičko statističkih metoda i kompjuterskih softvera koji omogućavaju da se kroz relativno mali broj eksperimenata dobije veliki broj korisnih informacija.

### **4.2.1. Modelovanje i optimizacija procesa mikrotalasne ekstrakcije primenom metode odzivnih površina**

U cilju matematičkog modelovanja, određivanja uticaja međusobne interakcije procesnih parametara mikrotalasne ekstrakcije i optimalnih uslova ekstrakcionog procesa primenjena je metoda odzivnih površina.

Uticaj tri nezavisna parametra mikrotalasne ekstrakcije ploda aronije varirana na tri nivoa: koncentracija etanola ( $X_1$ , 25, 50 i 75%), mikrotalasna snaga ( $X_2$ , 300, 450 i 600 W) i ekstrakciono vreme ( $X_3$ , 5, 10 i 15 min) na na prinos ekstraktivnih supstanci, ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja, ukupan sadržaj flavonoida i antioksidativnu aktivnost ekstrakata određenu DPPH i FRAP metodom je statistički analiziran pomoću kompjuterskog softvera Design Expert.

U Tabeli 4.2 dat je pregled potpunog faktorijelnog eksperimentalnog plana sa eksperimentalno dobijenim vrednostima za sve praćene odzivne veličine.

Tabela 4.2 Matrica punog faktornog eksperimentalnog plana sa vrednostima svih praćenih odzivnih veličina

Broj eksperimenta	Nekodirane vrednosti faktora			Odzivne veličine				
	Koncentracija etanola, % ( $X_1$ )	Mikrotalasna snaga, W ( $X_2$ )	Vreme, min ( $X_3$ )	Prinos ekstraktivnih supstanci, g ES/100 g svežeg biljnog materijala	Ukupni sadržaj fenola, mg galne kiseline/g suvog ekstrakta	Ukupni flavonoidi, mg rutina/g suvog ekstrakta	Antioksidativna aktivnost	
							EC <sub>50</sub> , mg/cm <sup>3</sup>	μmol Fe <sup>2+</sup> /mg
1	50	450	10	16,9	36,80	20,25	38,56	12,02
2	50	300	10	14,9	35,93	18,53	39,96	12,10
3	50	450	5	16,6	34,94	18,01	40,25	11,41
4	75	450	10	15,8	34,06	19,94	38,98	11,08
5	25	300	5	10,7	31,64	12,85	45,66	8,92
6	50	600	15	20,3	38,85	23,25	27,73	13,61
7	25	450	15	16,3	35,70	20,11	32,49	12,42
8	75	300	15	17,7	36,07	19,56	39,22	11,52
9	50	450	10	19,4	36,47	17,67	34,65	12,68
10	75	600	5	16,9	34,58	15,61	45,62	11,52
11	25	600	10	16,0	32,35	18,67	34,57	12,52
12	50	450	10	15,9	36,08	19,78	32,10	12,15
13	50	300	15	18,1	36,80	19,12	32,82	13,11
14	75	600	10	17,0	34,23	19,81	40,35	12,20
15	25	450	5	13,9	33,15	15,67	39,85	11,33
16	25	300	10	14,5	34,32	17,89	41,37	10,81
17	75	450	15	18,4	36,67	20,31	34,82	11,55
18	25	600	15	17,2	33,40	21,09	33,80	12,78
19	50	450	10	15,4	37,30	20,09	32,36	11,87
20	50	600	5	14,3	37,16	19,75	38,54	11,61
21	50	450	10	14,9	37,12	20,57	34,68	12,40
22	75	300	5	11,1	34,63	15,37	49,39	8,47
23	75	300	10	15,8	35,23	17,50	44,15	10,49
24	75	600	15	18,4	36,72	20,17	36,15	12,39
25	25	600	5	15,1	33,31	18,30	38,87	11,35
26	75	450	5	14,9	33,75	17,50	48,66	10,48
27	50	300	5	11,6	35,48	14,98	44,53	9,34
28	50	450	15	18,0	37,57	21,46	30,25	13,47
29	50	450	10	17,7	36,98	22,03	33,30	12,06
30	25	300	15	16,2	34,95	19,92	36,69	11,77
31	50	600	10	17,2	38,25	21,84	30,80	12,81
32	50	450	10	18,1	36,70	19,38	30,88	12,43
33	25	450	10	15,8	34,95	18,17	35,21	11,97

#### 4.2.1.1. Modelovanje i optimizacija operativnih uslova u cilju postizanja maksimalnog prinosa ekstraktivnih supstanci

Primenom RSM analiziran je uticaj tri nezavisna procesna parametra ekstrakcije na prinos ekstraktivnih supstanci ploda aronije dobijenih mikrotalasnom ekstrakcijom. Eksperimentalno dobijene vrednosti prinosa ekstraktivnih supstanci (zavisno promenljiva tj. odziv) prikazane su u tabeli 4.2. RSM modelom predviđene vrednosti odziva i eksperimentalno dobijene vrednosti odziva prikazane su uporedno u Prilogu (Tabela PT5).

Primenom višestruke nelinearne regresione analize eksperimentalnih podataka dobijena je kvadratna polinomna jednačina kojom se opisuje uticaj nezavisno promenljivih na prinos ekstraktivnih supstanci:

$$Y_{\text{PRINOS}}=16,94+0,57X_1+1,21X_2+1,97X_3+0,067X_1X_2+0,13X_1X_3-0,75X_2X_3-0,81X_1^2-0,59X_2^2-0,14X_3^2 \quad (4.1)$$

Rezultati analize varijanse (ANOVA) za predloženi model, kao i parametri koji opisuju adekvatnost predloženog matematičkog modela: koeficijent determinacije  $R^2$ , prilagođeni koeficijent determinacije  $\text{Adj } R^2$ ,  $F$ -vrednosti (dobijene Fišerovim testom),  $p$ -vrednosti prikazani su u Tabeli 4.3.

Visoka vrednost  $F$  parametra sa veoma niskom verovatnoćom greške ( $p < 0,0001$ ) potvrđuje da je predloženi model statistički značajan. Kriterijum prihvatljivosti modela je zadovoljen kada je  $R^2 > 0,8$  (Joglekar i May, 1987). Vrednost koeficijenta determinacije  $R^2 = 0,9013$  sugeriše da je model adekvatan i da se 90,13% varijacija vrednosti odziva može objasniti modelom. Istovremeno, vrednosti za koeficijente  $\text{Adj } R^2 = 0,8409$  i  $\text{Predicted } R^2 = 0,7788$  imaju relativno visoke i dobro međusobno usklađene vrednosti. Poželjno je da ovi koeficijenti imaju vrednost veću od 0,75 što govori o dobroj uklopljenosti eksperimentalnih podataka u kvadratnu polinomnu jednačinu, kao i da se njihove vrednosti međusobno ne razlikuju za više od 0,2 (Alao i Konneh, 2009). Model je prihvatljiv ukoliko je koeficijent varijacije CV manji od 10% i u tom slučaju razlike između eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti odziva su male (Zhang et al., 2014). Koeficijent varijacije ovog modela ( $\text{CV} = 7,11\%$ ) ukazuje da je predloženi model pouzdan i reproduktivan.

Tabela 4.3 Analiza varijanse modela za predviđanje prinosa ekstraktivnih supstanci

Faktor/interakcija faktora	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	F-vrednost	p-vrednost <sup>a</sup>
Model	119,84	9	10,21	< <b>0,0001</b>
X <sub>1</sub> -Koncentracija etanola	5,89	1	4,52	<b>0,0461</b>
X <sub>2</sub> -Mikrotalasna snaga	26,40	1	20,25	<b>0,0002</b>
X <sub>3</sub> -Vreme	70,01	1	53,71	< <b>0,0001</b>
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,053	1	0,04	0,8417
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,21	1	0,16	0,6901
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	6,75	1	5,18	<b>0,0340</b>
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	4,66	1	3,57	0,0733
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	2,49	1	1,91	0,1820
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,14	1	0,11	0,7455
Ostatak	26,07	20		
Odstupanje od modela	2,49	17	1,30	0,0584
Greška	0,58	3	0,190	
CV = 7,11%	R <sup>2</sup> = 0,9013	Adj R <sup>2</sup> = 0,8409	Predicted R <sup>2</sup> = 0,7788	

<sup>a</sup>  $p < 0,01$  veoma značajno;  $0,01 \leq p < 0,05$  značajno;  $p \geq 0,05$  nije značajno

Procena značajnosti procesnih parametra i njihovih međusobnih interakcija proverena je kroz  $p$ -vrednosti, pri čemu vrednosti manje od 0,05 ukazuju na statističku značajnost. Svi razmatrani faktori bili su statistički značajni, kao i interakcija mikrotalasne snage i vremena ekstrakcije. Najznačajniji faktor, sa najmanjom  $p$  i najvećom  $F$  vrednošću, je vreme.

U cilju dobijanja jednostavnijeg modela, članovi koji nisu statistički značajni mogu se izostaviti iz polinomne jednačine, tako da pojednostavljena jednačina modela ima oblik:

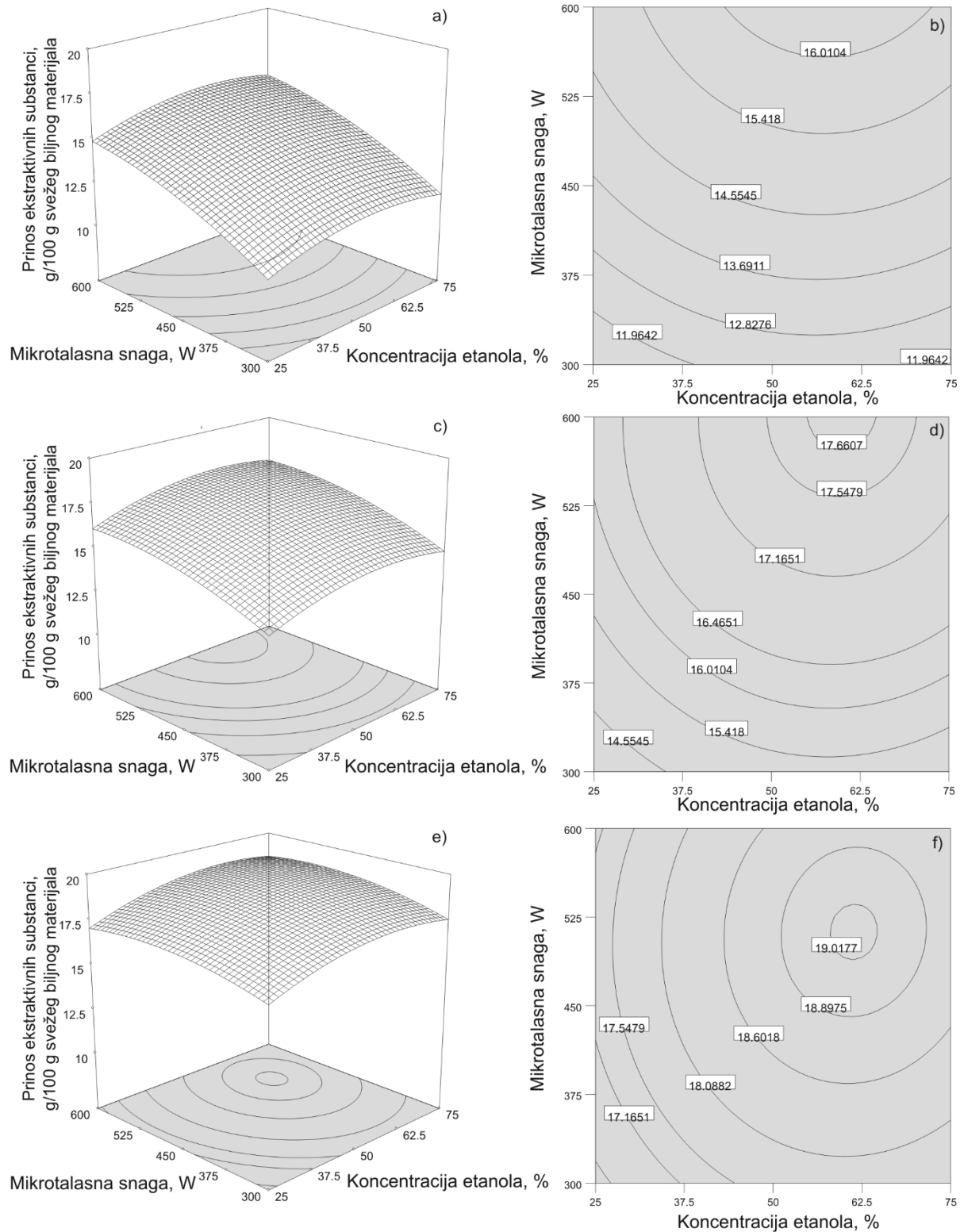
$$Y_{\text{PRINOS}} = 16,94 + 0,57X_1 + 1,21X_2 + 1,97X_3 - 0,75X_2X_3 \quad (4.2)$$



Apsolutna vrednost koeficijenta nekog od člana polinoma direktno ukazuje na veličinu uticaja tog člana na odziv, dok pozitivan ili negativan predznak koeficijenta govori o vrsti tog uticaja (Xu et al., 2017). Naime, što je vrednost koeficijenta člana polinoma veća to je i njegov uticaj na odziv veći, dok pozitivan predznak koeficijenta označava da se porastom vrednosti nezavisno promenljive tj. faktora, povećava i vrednost odziva. Mikrotalasna snaga ima veći uticaj na povećanje količine prinosa ekstraktivnih supstanci od koncentracije etanola, što je potvrđeno i vrednostima koeficijenata ovih faktora u regresionoj jednačini.

Regresiona jednačina, odnosno funkcija odziva (čiji je geometrijska interpretacija odzivna površina) grafički je predstavljena trodimenzionalnim prikazom odzivne površine i kao dvodimenzionalna konturna površina (korišćenjem statističkog softvera Design-Expert). Na ovaj način izvršena je vizuelizacija relacija između odziva i svake nezavisno promenljive (faktora). Ovakav pristup omogućava određivanje vrednosti nezavisno promenljivih na kojima će zavisno promenljiva imati maksimalni odziv (Karabegović et al., 2014). Uticaj ekstrakcionih parametara (koncentracije etanola, mikrotalasne snage i ekstrakcionog vremena) na prinos ekstraktivnih supstanci ploda aronije prikazan je na slici 4.17.

Analizom slike 4.17 može se zaključiti da nezavisno od mikrotalasne snage i koncentracije etanola prinos ekstraktivnih supstanci značajano raste sa porastom ekstrakcionog vremena od 5-15 min. Sa druge strane, nezavisno od ekstrakcionog vremena, povećanje koncentracije etanola i mikrotalasne snage takođe pozitivno utiče na prinos ekstraktivnih supstanci. Porast mikrotalasne snage ima izraženiji uticaj na ekstrakcioni prinos pri najmanjoj vrednosti ekstrakcionog vremena (5 min). Porastom koncentracije etanola u ekstrakcionom sistemu do oko 60% povećava se i prinos ekstraktivnih supstanci, nakon toga daljim porastom udela etanola u ekstrakcionom sistemu prinos ekstraktivnih supstanci se smanjuje. Ovaj efekat je izraženiji pri dužem ekstrakcionom vremenu.



Slika 4.17 Odzivna površina i kontur dijagram za prinos ekstraktivnih supstanci ploda aronije u funkciji koncentracije etanola i snage mikrotalasa u trajanju od 5 min (a, b), 10 min (c, d) i 15 minuta (e, f)

Numeričkom optimizacijom pomoću programa Design Expert predloženi su optimalni uslovi mikrotalasne ekstrakcije ekstraktivnih materija iz ploda aronije: mikrotalasna snaga od 525 W, koncentracija etanola od 62,5% i vreme trajanja ekstrakcije od 15 min. Korišćenjem predloženog modela izračunato je da se pri navedenim uslovima može ostvariti maksimalni prinos ekstraktivnih supstanci od 19,02 g/100 g svežeg biljnog materijala, dok je u laboratorijskim eksperimentima (pet uzastopnih nezavisnih ponavljanja) za iste uslove dobijen prinos ekstraktivnih materija od  $19,3 \pm 0,6$  g/100 g svežeg biljnog materijala.

#### **4.2.1.2. Modelovanje i optimizacija operativnih uslova u cilju postizanja maksimalnog ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja i flavonoida**

Analiza uticaja nezavisno promenljivih i njihovih interakcija na ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja i ukupan sadržaj flavonoida realizovana je primenom metode odzivnih površina. U Tabeli 4.2 dat je pregled potpunog faktorijskog eksperimentalnog plana sa vrednostima praćenih nezavisnih parametra ekstrakcije: koncentracija etanola ( $X_1$ , 25, 50 i 75%), mikrotalasna snaga ( $X_2$ , 300, 450 i 600 W) i ekstrakciono vreme ( $X_3$ , 5, 10 i 15 min) i eksperimentalno dobijenim vrednostima za odzivne veličine (ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja i ukupan sadržaj flavonoida). Modelom predviđene vrednosti i eksperimentalno dobijene vrednosti ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja i ukupnog sadržaja flavonoida (zavisno promenljiva tj. odziva) prikazane su u Prilogu u tabeli PT5

Primenom višestruke nelinearne regresione analize eksperimentalnih podataka dobijene su odgovarajuće jednačine odziva za matematičko opisivanje promene ukupnog sadraja fenolnih jedinjenja (jednacina 4.3) i ukupnog sadržaja flavonoida (4.4) u ekstraktima ploda aronije dobijenih pod dejstvom mikrotalasa.

$$Y_{\text{TPC}} = 36,75 + 0,68X_1 + 0,21X_2 + X_3 + 0,12X_1X_2 + 0,047X_1X_3 - 0,18X_2X_3 - 2,41X_1^2 - 0,05X_2^2 + 0,20X_3^2 \quad (4.3)$$

$$Y_{\text{TFC}} = 20,13 + 0,17X_1 + 1,26X_2 + 2,05X_3 - 0,35X_1X_2 - 0,23X_1X_3 - 0,38X_2X_3 - 1,30X_1^2 - 0,34X_2^2 - 0,54X_3^2 \quad (4.4)$$

Sumirani rezultati analize varijanse (ANOVA) za predložene kvadratne modele dati su u tabelama 4.4. i 4.5.

Tabela 4.4 Analiza varijanse modela za predviđanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja

<b>Faktor/interakcija faktora</b>	<b>Suma kvadrata</b>	<b>Broj stepeni slobode</b>	<b>F-vrednost</b>	<b>p-vrednost<sup>a</sup></b>
Model	72,48	9	9,79	< 0,0001
X <sub>1</sub> -Koncentracija etanola	8,20	1	9,98	<b>0,0049</b>
X <sub>2</sub> -Mikrotalasna snaga	0,80	1	0,97	0,3356
X <sub>3</sub> -Vreme	18,14	1	22,05	<b>0,0001</b>
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,18	1	0,22	0,6477
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,03	1	0,03	0,8605
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,38	1	0,47	0,5028
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	41,65	1	50,64	< <b>0,0001</b>
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,02	1	0,02	0,8847
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,27	1	0,33	0,5700
Ostatak	16,45	20		
Odstupanje od modela	5,54	17	3,02	0,1971
Greška	0,91	3	0,30	
CV = 2,56%	R <sup>2</sup> = 0,8650	Adj R <sup>2</sup> = 0,8118	Predicted R <sup>2</sup> = 0,7424	

<sup>a</sup>  $p < 0,01$  veoma značajno;  $0,01 \leq p < 0,05$  značajno;  $p \geq 0,05$  nije značajno

Predloženi modeli za oba odziva su statistički veoma značajni ( $p < 0,0001$ ) što je potvrđeno i relativno visokim  $F$ -vrednostima. Relativno visoke vrednosti koeficijenta determinacije  $R^2$  ( $R^2 > 0,8650$ ) i prilagođenih koeficijenata detrmnacije Adj  $R^2$  (Adj  $R^2 > 0,8045$ ) za oba modela ukazuju na adekvatnost predloženih modela za oba ispitivana odziva i ukazuju na relativno dobro fitovanje eksperimentalnih podataka predloženim modelima. Adekvatna reproduktibilnost i pouzdanost modela potvrđena je i niskim vrednostima koeficijenta varijacije, kao i statistički neznačajnim vrednostima za odstupanje od modela (*Lack of Fit* test) koji poredi rezidualnu grešku sa eksperimentalnom.

Tabela 4.5 Analiza varijanse modela za predviđanje ukupnog sadržaja flavonoida

Faktor/interakcija faktora	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	F-vrednost	p-vrednost <sup>a</sup>
Model	131,93	9	12,45	< <b>0,0001</b>
X <sub>1</sub> -Koncentracija etanola	0,53	1	0,45	0,5081
X <sub>2</sub> -Mikrotalasna snaga	28,80	1	24,46	< <b>0,0001</b>
X <sub>3</sub> -Vreme	75,85	1	64,40	< <b>0,0001</b>
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1,50	1	1,27	0,2721
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,63	1	0,53	0,4742
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1,73	1	1,46	0,2396
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	12,29	1	10,43	<b>0,0040</b>
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,83	1	0,71	0,4093
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	2,08	1	1,77	0,1977
Ostatak	24,73	20		
Odstupanje od modela	7,58	17	1,03	0,8103
Greška	7,16	3	1,79	
CV = 5,73%	R <sup>2</sup> = 0,8821	Adj R <sup>2</sup> = 0,8045	Predicted R <sup>2</sup> = 0,6910	

<sup>a</sup>  $p < 0,01$  veoma značajno;  $0,01 \leq p < 0,05$  značajno;  $p \geq 0,05$  nije značajno

Značajnost pojedinih faktora, njihovih kvadrata i interakcija ocenjeni su na osnovu  $F$  i  $p$ -vrednosti. Ove vrednosti za model predložen za opisivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja ukazuju da su koncentracija etanola, ekstrakciono vreme i kvadrat koncentracije etanola statistički značajni, dok je u slučaju modela predloženog za opisivanje ukupnog sadržaja flavonoida umesto koncentracije etanola statističku značajnost pokazala mikrotalasna snaga. Ostali analizirani procesni parametri nemaju statistički značaj ( $p > 0,05$ ). Statistički najznačajniji faktor je kvadrat koncentracije etanola, odnosno vreme ekstrakcije za model predložen za opisivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja i flavonoida, respektivno. Faktori, njihovi kvadrati i međusobne interakcije koje nemaju statističku značajnost mogu se zanemariti što

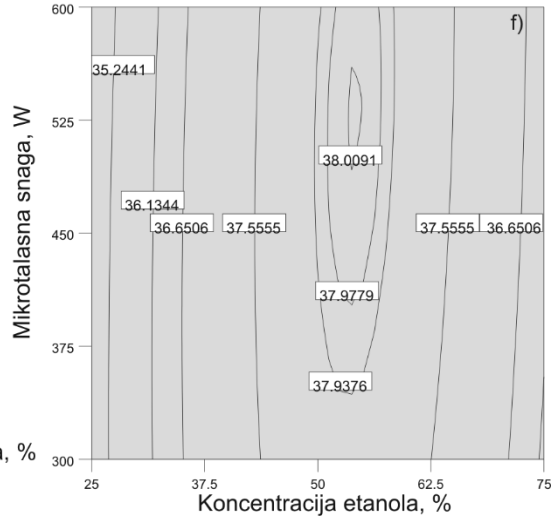
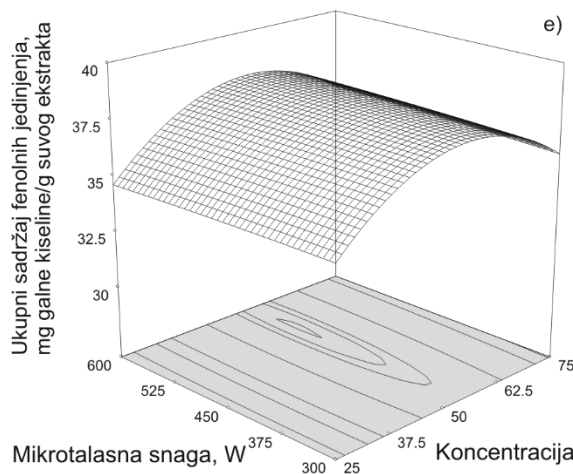
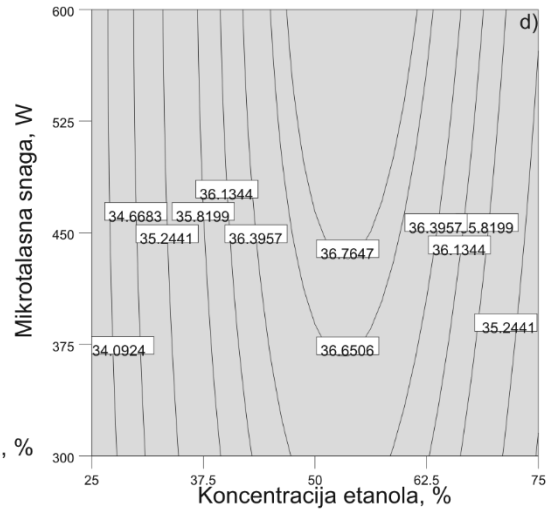
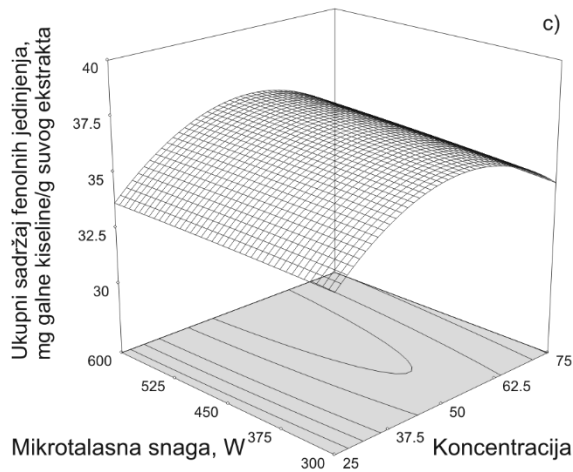
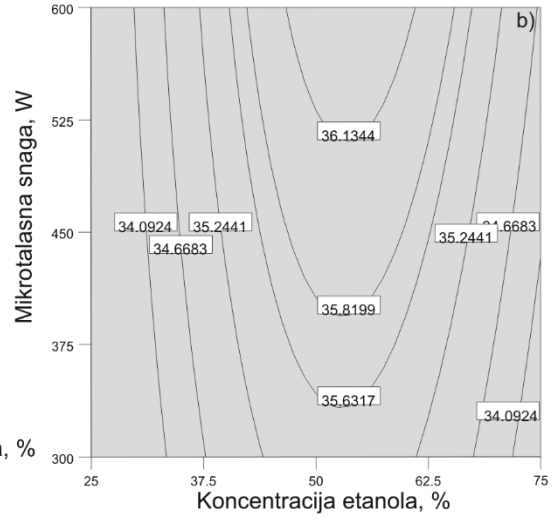
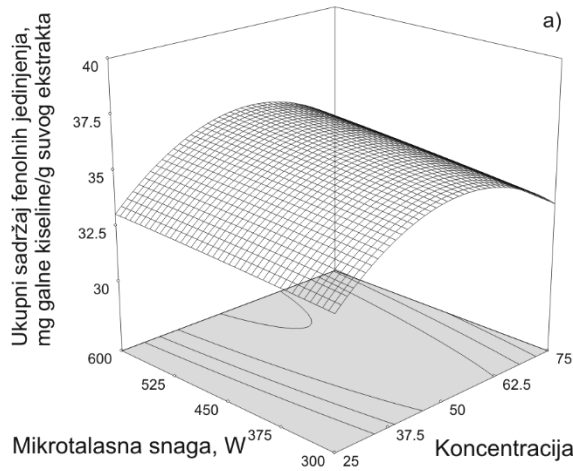
rezultira predlaganjem uprošćenih regresionih jednačina za predviđanje vrednosti ispitivanih odziva. Jednačine 4.5 i 4.6 predstavljaju uprošćene matematičke modele predložene za predviđanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja i ukupnog sadržaja flavonoida u ekstraktima ploda aronije dobijenih mikrotalasnom ekstrakcijom, respektivno:

$$Y_{\text{TPC}}=36,75+0,68X_1+X_3-2,41X_1^2 \quad (4.5)$$

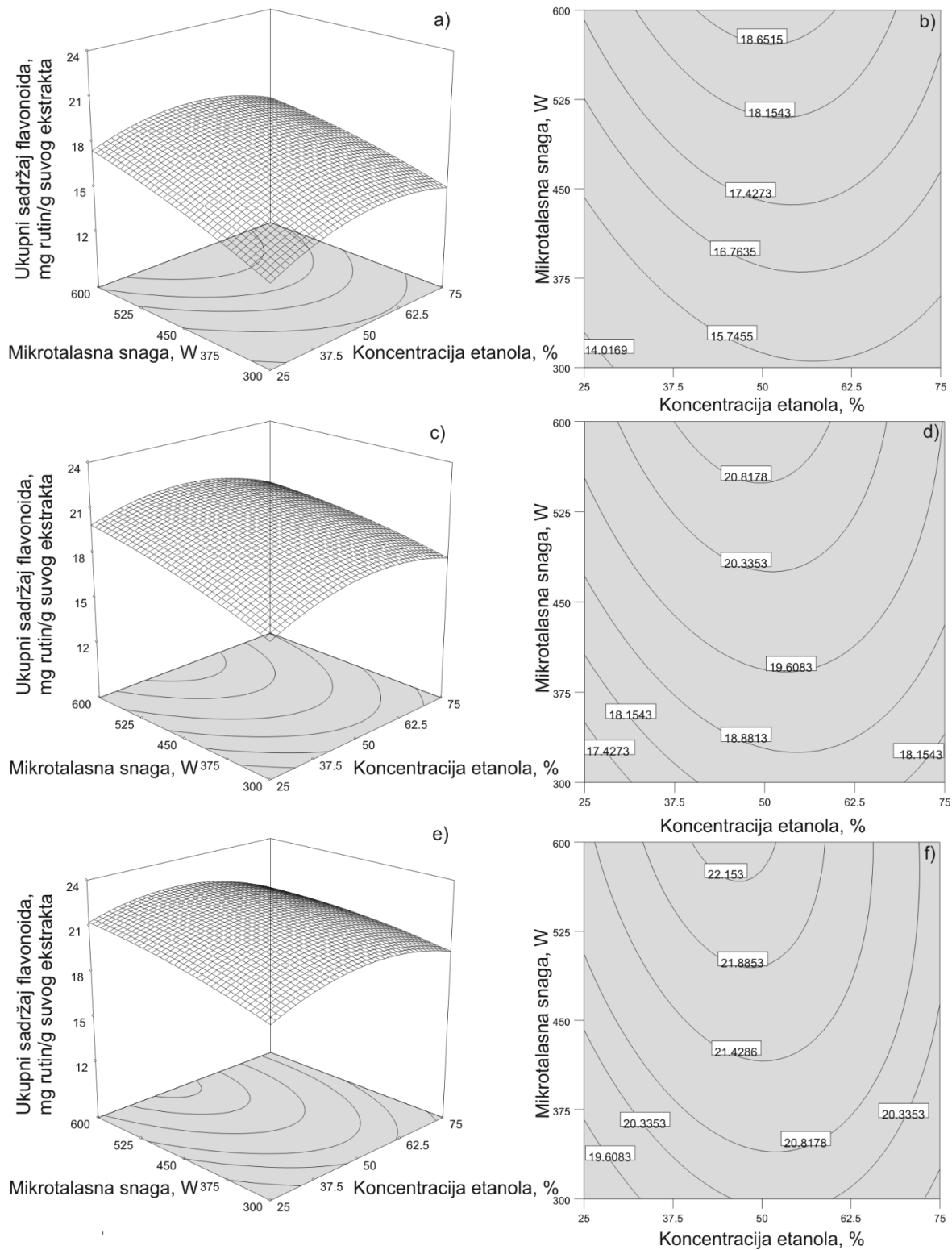
$$Y_{\text{TFC}}=20,13+1,26X_2+2,05X_3-1,30X_1^2 \quad (4.6)$$

Slike 4.18 i 4.19 predstavljaju odzivne površine i kontur dijagrame promene sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida u funkciji koncentracije etanola u ekstragensu i snage mikrotalasa, dok je vreme ekstrakcije održavano konstantnim (5, 10 i 15 minuta).

Analizom slika 4.18 i 4.19 može se konstatovati da porastom koncentracije etanola od 25% na 50% raste i ukupni sadržaj fenola i flavonoida u ispitivanim ekstraktima. Sadržaj fenola smanjuje se daljim povećanjem koncentracije etanola u ekstragensu, dok je ovakav trend manje izražen u slučaju sadržaja flavonoida. Uz istovremeni rast mikrotalasne snage, povećanje koncentracije etanola od 25 do 50% ima pozitivan uticaj na prinos fenola, ali se porastom udela etanola značajno smanjuje dielektrična konstanta ekstragensa tako da, iako snaga mikrotalasa raste, kapacitet absorpcije mikrotalasne energije se smanjuje. Naime ukupna toplotna energija preneti sa ekstragensa na uzorak biljnog materijala se smanjuje jer sam ekstragens povećanjem udela etanola ima manju mogućnost absorpcije mikrotalasne energije (Mendes et al., 2016). Slika 4.18 ilustruje relativno mali uticaj rasta mikrotalasne snage na prinos fenolnih jedinjenja. Umereni uticaj angažovane mikrotalasne snage na ukupni sadržaj fenola u saglasnosti je sa rezultatima koje su dobili Ahmad i Langrish pri mikrotalasnoj ekstrakciji ukupnih fenolnih kiselina iz kore ploda mandarine (Ahmad i Langrish, 2012) ili sa rezultatima Zhang i saradnika dobijenim mikrotalasnom ekstrakcijom ukupnih izoflavonoida iz korena biljke *Radix puerariae* (Zhang et al., 2014). Xie i saradnici (2014) su pokazali da je uticaj angažovane mikrotalasne snage mali u slučaju ekstrakcije dejstvom mikrotalasa alkaloida iz korena biljke *Stephania sinica* često korišćene u kineskoj tradicionalnoj medicini. Dok se sa slike 4.19 može videti da je pozitivan uticaj mikrotalasne snage na sadržaj flavonoida najizraženiji pri umerenim koncentracijama etanola u ekstrakcionom sistemu (oko 50%). Takođe, vreme kao procesni parametar ima izražen pozitivan uticaj na sadržaj flavonoida u ekstraktima ploda aronije.



Slika 4.18 Odzivna površina i kontur dijagram za ukupni sadržaj fenola u ekstraktima polda aronije u funkciji koncentracije etanola, snage mikrotalasa i u trajanju od 5 min (a, b), 10 min (c, d) i 15 minuta (e, f)



Slika 4.19 Odzivna površina i kontur dijagram za ukupni sadržaj flavonoida u ekstraktima polda aronije u funkciji koncentracije etanola, snage mikrotalasa i u trajanju od 5 min (a, b), 10 min (c, d) i 15 minuta (e, f)



Prema predloženim modelima, optimalni uslovi mikrotalasne ekstrakcije ploda aronije koji daju ekstrakt sa maksimalnim sadržajem fenolnih jedinjenja su: koncentracija etanola 52,5%, mikrotalasna snaga 525 W i vreme trajanja ekstrakcije 15 min. Pri ovim ekstrakcionim uslovima postiže se sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima od 38,01 mg galne kiseline/g suvog ekstrakta. Maksimalna vrednost ukupnog sadržaja flavonoida predviđena modelom od 22,15 mg rutina/g suvog ekstrakta dobija se primenom etanolnog rastvora koncentracije 47,5%, mikrotalasne snage od 600 W i ekstrakcionog vremena od 15 min.

Eksperimentalno dobijene vrednosti (pet uzastopnih nezavisnih ponavljanja) ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja i flavonoida pri predloženim optimalnim uslovima bile su 37,6 mg galne kiseline/g suvog ekstrakta 23,5 mg rutina/g suvog ekstrakta, respektivno. Dobro slaganje izračunatih i eksperimentalno dobijenih vrednostijuš jedna je od potvrda adekvatnosti predloženih modela.

#### **4.2.1.3. Modelovanje i optimizacija operativnih uslova u cilju postizanja maksimalne antioksidativne aktivnosti ekstrakata**

U cilju procene individualnog i kombinovanog uticaja tri nezavisna procesna parametra, koncentracije etanola ( $X_1$ , 25, 50 i 75%), mikrotalasne snage ( $X_2$ , 300, 450 i 600 W) i ekstrakcionog vremena ( $X_3$ , 5, 10 i 15 min), na AOA dobijenih ekstrakata ploda aronije, kao i modelovanja i optimizacije procesa mikrotalasne ekstrakcije primenjena je metoda odzivnih površina. U Tabeli 4.2 date su nekodirane vrednosti nezavisnih procesnih parametara, kao i eksperimentale vrednosti odzivnih veličina, odnosno AOA dobijenih ekstrakata određenih pomoću DPPH i FRAP testa. Modelom predviđene vrednosti i eksperimentalno dobijene vrednosti AOA određene DPPH i FRAP testom prikazane su uporedno u Prilogu u tabeli PT5. Jednačina odziva 4.7 za antioksidativnu aktivnost određenu DPPH testom ( $Y_{DPPH}$ ) i jednačina odziva 4.8 za antioksidativnu aktivnost određenu FRAP testom ( $Y_{FRAP}$ ) dobijene su regresionom analizom eksperimentalnih podataka:

$$Y_{DPPH}=33,72+2,16 X_1-2,63X_2-4,86X_3+0,49X_1X_2-1,01X_1X_3+0,46X_2X_3+4,31X_1^2+1,71X_2^2+0,90X_3^2 \quad (4.7)$$

$$Y_{FRAP}=12,36-0,23X_1+0,79X_2+1,01X_3+0,04X_1X_2-0,032X_1X_3-0,45X_2X_3-0,79X_1^2-0,17X_2^2-0,21X_3^2 \quad (4.8)$$

Značajnost modela određena je analizom varijanse (ANOVA). Rezultati analize varijanse za modelovanje antioksidativne aktivnosti određene DPPH metodom predstavljani su Tabelom 4.6, dok su rezultati analize varijanse za modelovanje antioksidativne aktivnosti određene FRAP metodom predstavljani Tabelom 4.7.

Tabela 4.6 Analiza varijanse za modelovanje antioksidativne aktivnosti određene DPPH testom

<b>Faktor/interakcija faktora</b>	<b>Suma kvadrata</b>	<b>Broj stepeni slobode</b>	<b>F-vrednost</b>	<b>p-vrednost<sup>a</sup></b>
Model	888,74	9	33,88	< <b>0,0001</b>
X <sub>1</sub> -Koncentracija etanola	83,76	1	28,74	< <b>0,0001</b>
X <sub>2</sub> -Mikrotalasna snaga	124,61	1	42,75	< <b>0,0001</b>
X <sub>3</sub> -Vreme	424,38	1	145,59	< <b>0,0001</b>
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	2,84	1	0,98	0,3347
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	12,16	1	4,17	0,0539
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	2,52	1	0,86	0,3630
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	135,18	1	46,37	< <b>0,0001</b>
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	21,22	1	7,28	<b>0,0135</b>
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	5,83	1	2,00	0,1720
Ostatak	61,21	20		
Odstupanje od modela	6,61	17	2,74	0,7016
Greška	4,61	3	3,65	
CV = 4,55%	R <sup>2</sup> = 0,9356	Adj R <sup>2</sup> = 0,9079	Predicted R <sup>2</sup> = 0,8487	

<sup>a</sup>  $p < 0,01$  veoma značajno;  $0,01 \leq p < 0,05$  značajno;  $p \geq 0,05$  nije značajno

Tabela 4.7 Analiza varijanse za modelovanje antioksidativne aktivnosti određene FRAP testom

<b>Faktor/interakcija faktora</b>	<b>Suma kvadrata</b>	<b>Broj stepeni slobode</b>	<b>F-vrednost</b>	<b>p-vrednost<sup>a</sup></b>
Model	40,31	9	25,94	<b>&lt; 0,0001</b>
X <sub>1</sub> -Koncentracija etanola	0,97	1	5,59	<b>0,0277</b>
X <sub>2</sub> -Mikrotalasna snaga	11,30	1	65,41	<b>&lt; 0,0001</b>
X <sub>3</sub> -Vreme	18,38	1	106,44	<b>&lt; 0,0001</b>
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,02	1	0,11	0,7421
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,01	1	0,07	0,7944
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	2,40	1	13,91	<b>0,0012</b>
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	4,57	1	26,47	<b>&lt; 0,0001</b>
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,21	1	1,19	0,2872
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,33	1	1,92	0,1809
Ostatak	3,63	20		
Odstupanje od modela	3,20	17	0,19	0,3100
Greška	0,43	3	0,11	
CV = 3,55%	R <sup>2</sup> = 0,9175	Adj R <sup>2</sup> = 0,8821	Predicted R <sup>2</sup> = 0,7929	

<sup>a</sup>  $p < 0,01$  veoma značajno;  $0,01 \leq p < 0,05$  značajno;  $p \geq 0,05$  nije značajno

Značajnost i adekvatnost modela potvrđena je na osnovu  $F$  i  $p$ -vrednosti ( $p < 0,0001$ ). Visoke vrednosti koeficijenta determinacije ( $R^2 > 0,9175$ ) i prilagođenog koeficijenta determinacije ( $AdjR^2 > 0,8821$ ) ukazuju na adekvatnost predloženih modela za oba ispitivana odziva i ukazuju na relativno dobro fitovanje modela sa eksperimentalnim podacima. Predviđeni koeficijent determinacije zadovoljava graničnu vrednost ( $Predicted R^2 > 0,80$ ) u slučaju AOA određene DPPH testom ( $Predicted R^2 = 0,8487$ ) dok je u slučaju AOA određene FRAP testom vrednost ovog koeficijenta neznatno manja ( $Predicted R^2 = 0,7929$ ) ali je ispunjen uslov da je razlika  $Adj R^2$  i  $Predicted R^2$  vrednosti manja od 0,2. Koeficijent varijacije ( $CV < 4,55\%$ ) i statistički neznčajne vrednosti *Lack of Fit* testa takođe potvrđuju pouzdanost i reproduktivnost modela.

Ocena značajnosti uticaja procesnih faktora potvrđena je upotrebom  $p$ -vrednosti (manje  $p$ -vrednosti predstavljaju veću značajnost odgovarajućeg koeficijenta). Kada su u pitanju obe odzivne veličine, analiza varijanse ukazuje na značajnost sva tri procesna faktora, odnosno njihovih linearnih koeficijenata. Veoma značajni su kvadratni efekti koncentracije etanola i mikrotalasne snage kod oba predložena modela, kao i efekat interakcije mikrotalasne snage i ekstrakcionog vremena u slučaju modela koji opisuje AOA određenu FRAP testom.

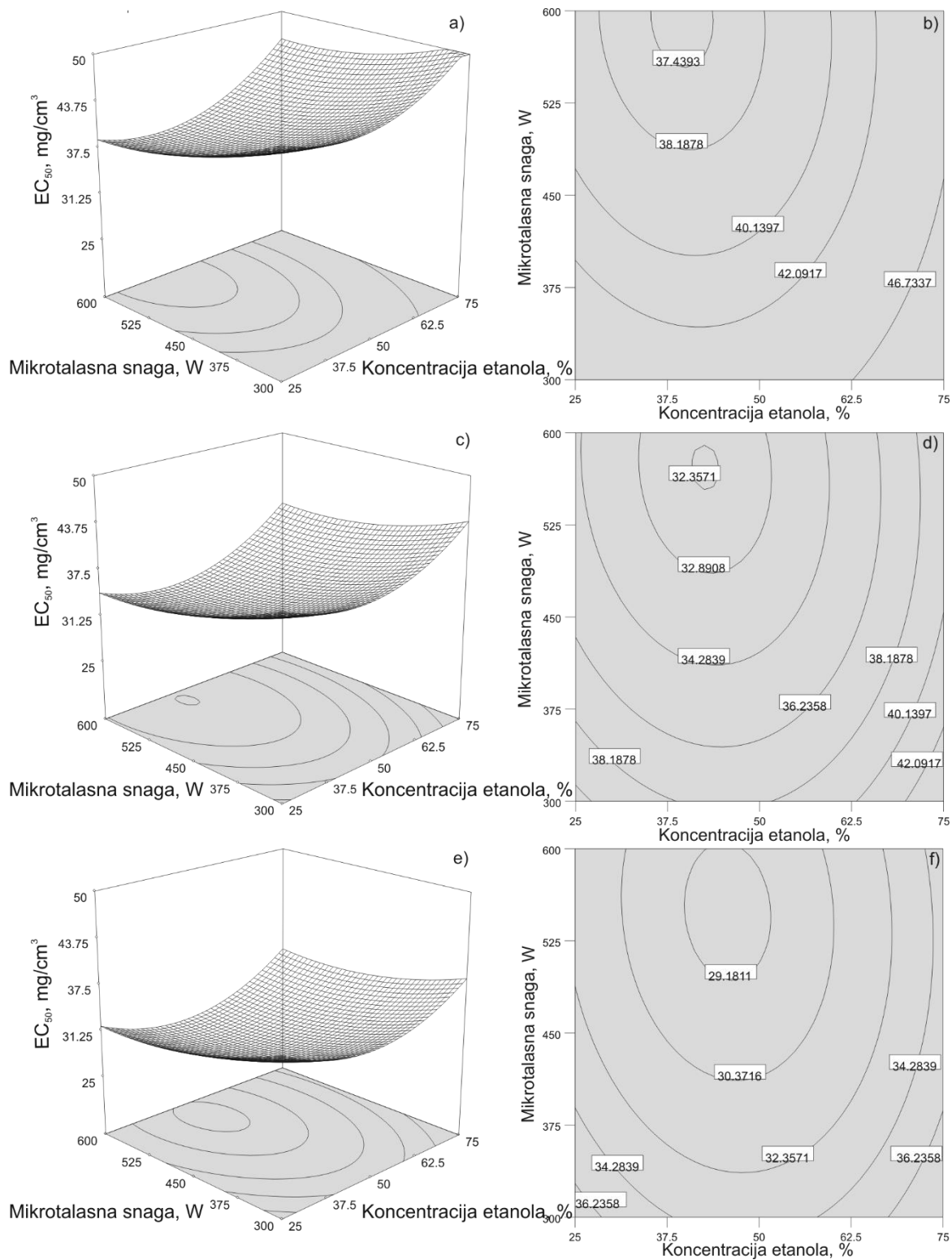
Ako se zanemare faktori, njihovi kvadrati i interakcije koje nemaju statističku važnost, proizilaze uprošćene finalne regresione jednačine:

$$Y_{DPPH}=33,72+2,16 X_1-2,63X_2-4,86X_3+4,31X_1^2+1,71X_2^2 \quad (4.9)$$

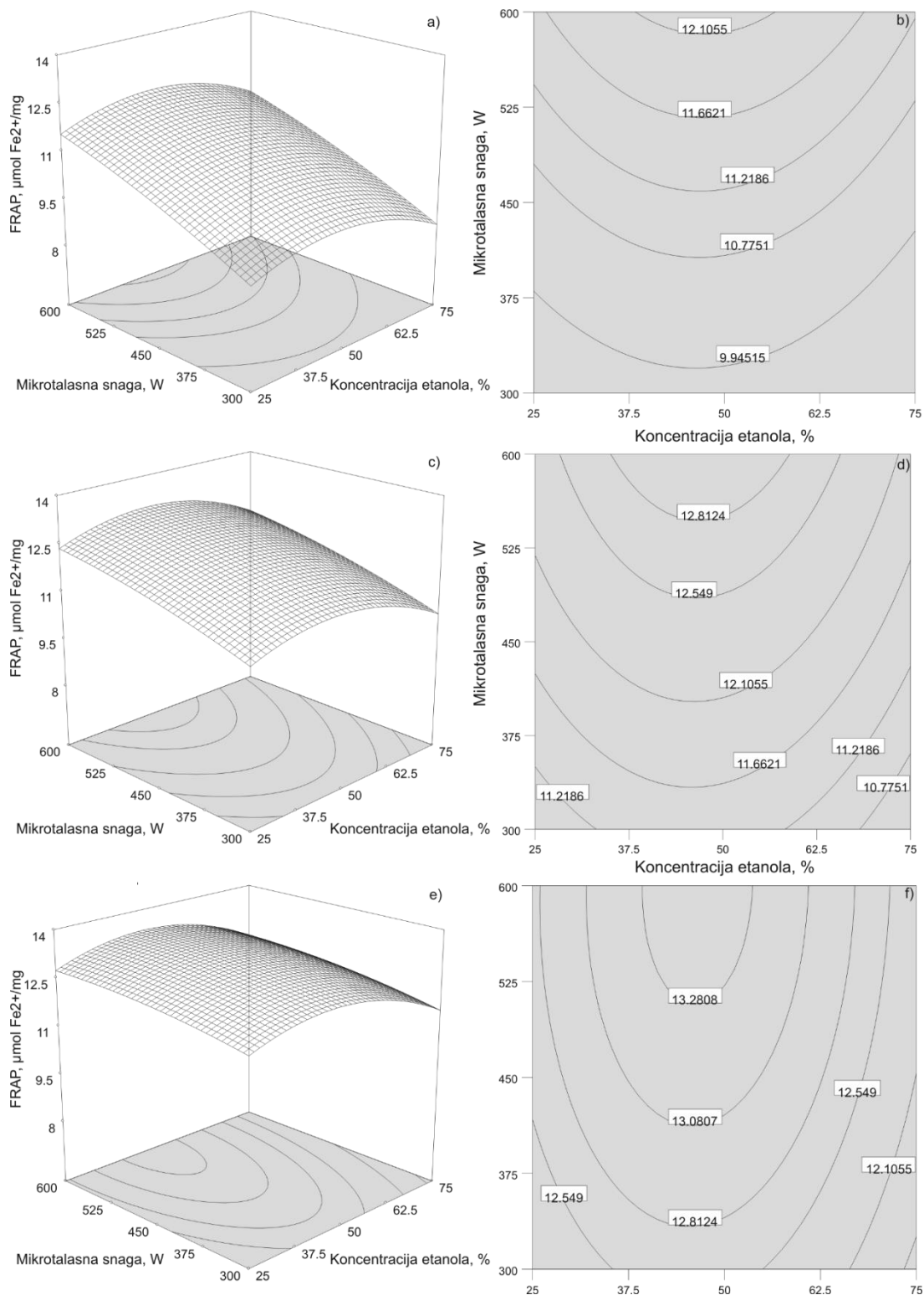
$$Y_{FRAP}=12,36-0,23X_1+0,79X_2+1,01X_3-0,45X_2X_3-0,79X_1^2 \quad (4.10)$$

Na slikama 4.20 i 4.21 prikazane su 3D odzivne površine i kontur dijagrami uticaja parametara procesa ekstrakcije na AOA ekstrakata određenu DPPH i FRAP testom.

Na osnovu slika može se konstatovati da se povećanjem koncentracije etanola od 25% do 50% povećava i AOA ekstrakata dobijenih mikrotalasnom ekstrakcijom ploda aronije. Međutim, daljim rastom koncentracije etanola AOA ekstrakata se smanjuje bez obzira na način njenog određivanja. Ovakav efekat izraženiji je kod AOA određene DPPH testom zbog većeg negativnog uticaja kvadratnog koeficijenta etanolne koncentracije. Ekstrakti koji ispoljavaju veću antioksidativnu aktivnost dobijaju se i povećanjem mikrotalasne snage i vremena trajanja ekstrakcije, a najveće vrednosti oba odziva dobijene su angažovanjem maksimalne mikrotalasne snage (600 W). Maksimalne vrednosti AOA za oba odziva postignuti su angažovanjem mikrotalasne snage od 600 W, pri koncentraciji etanola od 50% i za vreme trajanja ekstrakcije od 15 min.



Slika 4.20 Odzivna površina i kontur dijagram za antioksidativnu aktivnost ekstrakta određenu DPPH testom kao funkcija koncentracije etanola, snage mikrotalasa i u trajanju od 5 min (a, b), 10 min (c, d) i 15 minuta (e, f)



Slika 4.21 Odzivna površina i kontur dijagram za antioksidativnu aktivnost određenu FRAP testom kao funkcija koncentracije etanola, snage mikrotalasa i u trajanju od 5 min (a, b), 10 min (c, d) i 15 minuta (e, f)

Predloženi modeli predviđaju da se maksimalna vrednost AOA ekstrakta ploda aronije od 29,18 mg/cm<sup>3</sup> (DPPH), odnosno 13,28 μmol Fe<sup>2+</sup>/mg (FRAP) može postići korišćenjem iste koncentracije etanolnog rastvora (47,5%) i trajanja ekstrakcije od 15 minuta. Optimalna vrednost mikrotalasne snage za dobijanje ekstrakta ploda aronije sa maksimalnom AOA određenu DPPH i FRAP testom bila je 550 i 600 W, respektivno.

U pet uzastupnih nezavisnih ponavljanja pri predloženim optimalnim uslovima dobijene su eksperimentalne vrednosti AOA korišćenjem DPPH i FRAP testova, 28,27 mg/cm<sup>3</sup>, odnosno 14,19 μmol Fe<sup>2+</sup>/mg, respektivno. Dobro slaganje ovih vrednosti sa predviđenim, dodatno potvrđuju adekvatnost predloženih modela.

#### **4.2.1.4. Multikriterijumska optimizacija mikrotalasne ekstrakcije primenom funkcije poželjnosti**

U cilju racionalizacije, smanjenja troškova i komercijalizacije procesa mikrotalasne ekstrakcije ploda aronije izvršena je multikriterijumska optimizacija procesnih parametara ekstrakcije primenom ciljeva i kriterijuma prikazanih u tabeli 4.8. Optimalnim uslovima obeleženi su oni kojima se istovremeno dobijaju maksimalne vrednosti svih praćenih odzivnih veličina (prinos ekstraktivnih supstanci, ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja, ukupnog sadržaja flavonoida, antioksidativne aktivnost ekstrakta određene DPPH i FRAP metodom). Potrebu za ovakvim vidom optimizacije nameće činjenica da vrlo često u sistemima koji zavise od velikog broja faktora predloženi optimalni uslovi za jednu praćenu odzivnu veličinu sistema nisu ujedno optimalni i za druge. Uvođenjem kriterijuma veće ekonomičnosti procesa definišu se uslovi označeni kao ekonomski uslovi, koji će istovremeno sa maksimiziranjem vrednosti svih praćenih odzivnih veličina ispuniti uslov da se pri tome minimizira potrošnja energije, etanola i skрати vreme trajanja procesa.

Tabela 4.8 Kriterijumi i ciljevi multikriterijumske optimizacije mikrotalasne ekstrakcije ploda aronije

Faktor/odziv	Niži nivo	Viši nivo	Značajnost	Kriterijum	
				Optimalni uslovi <sup>a</sup>	Ekonomski uslovi <sup>b</sup>
Koncentracija etanola, %	25	75	3	U opsegu	Min
Mikrotalasna snaga, W	300	600	3	U opsegu	Min
Vreme, min	5	15	3	U opsegu	Min
Prinos ekstraktivnih supstanci, g/100 svežeg biljnog materijala	10,7	20,3		Max	Max
Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja, mg galne kiseline/g suvog ostatka ekstrakta	31,64	38,85	3	Max	Max
Ukupni sadržaj flavonoida, mg rutina/g suvog ostatka ekstrakta	12,85	23,25		Max	Max
EC <sub>50</sub> , mg/cm <sup>3</sup>	27,73	49,39		Min	Min
FRAP vrednost, μmol Fe <sup>2+</sup> /mg	8,47	13,61		Max	Max

Multikriterijumska optimizacija mikrotalasne ekstrakcije ploda aronije bazirana je na funkciji poželjnosti i izvedena je pomoću programskog paketa Design Expert. U Tabeli 4.9 date su predložene vrednosti procesnih parametara za optimalne i ekonomske uslove, kao i predviđene vrednosti svih praćenih odzivnih veličina (prinos ekstraktivnih supstanci, ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja i flavonoida, antioksidativna aktivnost ekstrakta određena DPPH i FRAP metodom) dobijenih pri oba seta ekstrakcionih uslova.



Tabela 4.9 Vrednosti procesnih parametara za optimalne i ekonomske uslove i predviđene vrednosti svih praćenih odzivnih veličina

Set uslova	Vrednost procesnog parametra			Vrednosti ispitivanih odziva					
	Konc. EtOH, %	Mikrotalasna snaga, W	Ekstarkciono vreme, min	Prinos ekstraktivnih supstanci, g/100 g svežeg biljnog materijala	Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja, mg galne kiseline/g suvog ekstrakta	Sadržaj flavonoida, mg rutina/g suvog ekstrakta	AOA-DPPH EC <sub>50</sub> mg/cm <sup>3</sup>	AOA-FRAP $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$	Faktor poželjnosti
Optimalni	50,84	556,5	15	18,83	37,97	22,09	29,13	13,31	0,897
Ekonomski	43,03	417,15	11,24	16,95	36,59	20,18	33,03	12,45	0,6365

Mikrotalasnom ekstrakcijom ploda aronije bi pri predloženim ekonomskim uslovima, a u odnosu na vrednosti dobijene za optimalne uslove, prinos ekstraktivnih materija bio manji za 10%, ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja i flavonoida za 3,6%, odnosno 8,6%, dok bi antioksidativna aktivnost dobijenog ekstrakta bila manja 13,4% ili 6,5% ako je određena DPPH ili FRAP testom. Međutim, primenom ekonomskih uslova pri mikrotalasnoj ekstrakciji ploda aronije ekstrakt sa nešto manjim sadržajem bioaktivnih komponenti bio bi dobijen uz potrošnju etanola manju za oko 15% i uštedu u količini energije i vremena za čak 25%. Na ovaj način cena koštanja finalnog proizvoda, odnosno ekstrakta bila bi znatno smanjena.

#### 4.2.2. Optimizacija operativnih uslova u cilju postizanja maksimalne vrednosti odzivnih veličina korišćenjem metode veštačke neuronske mreže sa genetičkim algoritmom

Procena zavisnosti odzivnih veličina (prinosa ekstraktivnih supstanci, ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja, ukupnog sadržaj flavonoida, AOA određena DPPH testom i AOA određena FRAP testom) u funkciji nezavisno promenljivih tj. ekstrakcionih parametara (koncentracije etanola, mikrotalasne snage i ekstrakcionog vremena) realizovano je primenom veštačke neuronske mreže (eng. Artificial Neural Network-ANN) sa Levenberg–Marquardt (LM) algoritmom.

Obučavanje odnosno treniranje ANN ostvaruje se slučajnim izborom 70% od početnog skupa podataka, a determinisanje težinskih parametara realizuje se nizom iteracija (epoha) neophodnih da bi se ostvarila minimalna srednja kvadratna greška MSE (engl. mean squared error) između

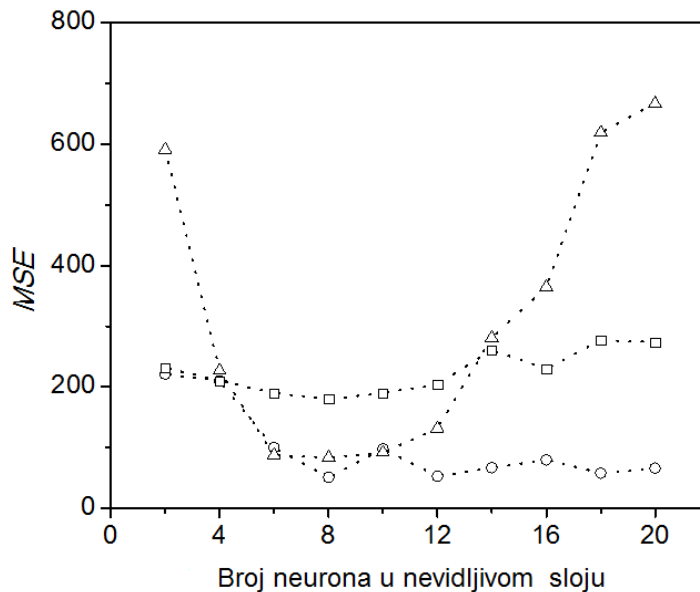
eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti odzivnih veličina. Tokom testiranja ANN upotrebljeno je još 15% od početnog skupa podataka, dok je tokom validacije tj. potvrđivanja vršena provera ANN korišćenjem ostalih 15% podataka.

Ekstakcioni parametri (koncentracija etanola, snaga mikrotalasa i vreme trajanja ekstrakcije) predstavljaju tri neurona i označeni su kao ulazni sloj neurona, dok izlazni sloj od pet neurona predstavljaju ispitivani odzivi (prinos ekstraktivnih supstanci, ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja, ukupni sadržaj flavonoida, AOA određena DPPH testom i AOA određena FRAP testom). Određivanje broja neurona u skrivenom sloju obavljeno je heurističkim postupkom, testiranjem neurona sa ciljem dobijanja minimalne srednje kvadratne greške MSE. Na slici 4.22 predstavljeno je heurističko određivanje optimalnog broja neurona skrivenog sloja. Sa slike se vidi zavisnost MSE u funkciji broja neurona skrivenog sloja, odnosno da se vrednosti MSE smanjuju sa porastom broja neurona do vrednosti 8, a onda počinju rapidno da se povećavaju. Minimalne MSE vrednosti za obuku (51,1), testiranje (180,3) i validaciju (84,6) ANN dobijene su za 8 neurona u skrivenom sloju. Zato je za korelaciju između ispitivanih odzivnih veličina i procesnih varijabla primenjena veštačka neuronska mreža sa 3-8-5 topologijom.

Dobra saglasnost predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti, reproduktivnost, pouzdanost i tačnost modela potvrđeni su visokim vrednostima koeficijenta deteminacije ( $R^2=0,910$ ) i niskim vrednostima srednjeg relativnog procenta devijacije (srednje relativno procentno odstupanje) MRPD (engl. mean relative percent deviation) koja iznosi  $\pm 6,2$  za prinos ekstraktivnih supstanci,  $\pm 2,4$  za ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja,  $\pm 8,6$  za ukupni sadržaj flavonoida,  $\pm 9,2$  za AOA određena DPPH testom i  $\pm 1,2$  za AOA određena FRAP testom. Na osnovu relativno malih i prihvatljivih vrednosti MRPD, model se može smatrati pouzdanim u okviru određenih nivoa i opsega ekstrakcionih parametara. Upporedni prikaz eksperimentalno dobijenih vrednosti, kao i vrednosti odzivnih veličina predviđenih ANN metodom date su u tabeli 4.10.

#### **4.2.2.1. Izbor optimalnih uslova u cilju dobijanja ekstrakata sa maksimalnim vrednostima odzivnih veličina korišćenjem metode veštačke neuronske mreže**

Optimalni uslovi mikrotalase ekstrakcije ploda aronije dobijeni su kombinovanjem genetičkog algoritma sa istreniranom i validinom ANN. Veštačka neuronska mreža nelinearno povezuje odzive i ekstrakcione parametre dajući objektivnu funkciju čiji se maksimum određuje.



Slika 4.22 Heurističko određivanje optimalnog broja neurona skrivenog sloja

(○ - obučavanje, Δ – testiranje, □ - potvrđivanje)

Metodom osetljivosti optimizovani su sledeći genetički parametri: veličina populacije, broj generacija, brzina ukrštanja i verovatnoća mutacije. Populacija predstavlja niz hromozoma (rešenja dobijena binarnim nizom koja sačinjavaju GA), a svaki od njih dobija određenu vrednost podobnosti (fitnesa). Zadovoljenje fitnes funkcije je smer u kojem se odvija evolucija populacije. Promenom operatora GA generiše novu populaciju u svakoj generaciji. Principom selekcije, članovi populacije koji pokazuju adekvatnije zadovoljenje fitnes funkcije poseduju veću verovatnoću opstanka, a samim tim i učešća u predstojećim ukrštanjima. Veći broj generacija generiše populaciju sa boljim zadovoljenjem fitnes funkcije odnosno posle više generacija, GA konvergira ka najboljem hromozomu odnosno, optimalnom rešenju čije je nalaženje u isto vreme ograničeno nivoima i opsegom ekstrakcionih parametara determinisanim dizajnom eksperimenta.

Tabela 4.10 Prikaz eksperimentalnih vrednosti praćenih odzivnih veličina i vrednosti odziva predviđenih ANN metodom

Broj eksperimenta	Konc. EtOH, %	Snaga mikrotalasa, W	Vreme, min	Prinos ES, g/100 g SBM.		TPC, mg GAE/g SE		TFC, mg RE/g SE		DPPH EC <sub>50</sub> , mg/cm <sup>3</sup>		FRAP, μmol Fe <sup>2+</sup> /mg	
				EXP	PRE	EXP	PRE	EXP	PRE	EXP	PRE	EXP	PRE
1	50	450	10	16,9	16,94	36,80	36,75	20,25	20,13	38,56	33,72	12,02	12,38
2	50	300	10	14,9	15,73	35,93	36,75	18,53	18,87	39,96	38,06	12,10	11,59
3	50	450	5	16,6	14,97	34,94	35,75	18,01	18,08	40,25	38,58	11,41	11,37
4	75	450	10	15,8	17,51	34,06	35,02	19,94	18,83	38,98	40,19	11,08	11,36
5	25	300	5	10,7	12,44	31,64	32,66	12,85	15,52	45,66	45,07	8,92	9,57
6	50	600	15	20,3	19,37	38,85	37,75	23,25	23,44	27,73	27,94	13,61	13,73
7	25	450	15	16,3	18,34	35,70	34,66	20,11	20,88	32,49	31,01	12,42	12,83
8	75	300	15	17,7	19,02	36,07	36,02	19,56	19,62	39,22	39,67	11,52	12,03
9	50	450	10	19,4	16,94	36,47	36,75	17,67	20,13	34,65	33,72	12,68	12,38
10	75	600	5	16,9	17,50	34,58	34,02	15,61	18,04	45,62	44,13	11,52	11,59
11	25	600	10	16,0	17,58	32,35	33,66	18,67	20,09	34,57	34,95	12,52	12,61
12	50	450	10	15,9	16,94	36,08	36,75	19,78	20,13	32,10	33,72	12,15	12,38
13	50	300	15	18,1	18,45	36,80	37,75	19,12	20,92	32,82	33,20	13,11	13,05
14	75	600	10	17,0	18,72	34,23	35,02	19,81	20,09	40,35	39,27	12,20	12,15
15	25	450	5	13,9	14,40	33,15	32,66	15,67	16,78	39,85	40,73	11,33	10,81
16	25	300	10	14,5	15,16	34,32	33,66	17,89	17,57	41,37	40,21	10,81	11,03
17	75	450	15	18,4	19,48	36,67	36,02	20,31	20,88	34,82	35,33	11,55	12,37
18	25	600	15	17,2	18,80	33,40	34,66	21,09	22,14	33,80	30,09	12,78	13,17
19	50	450	10	15,4	16,94	37,30	36,75	20,09	20,13	32,36	33,72	11,87	12,38
20	50	600	5	14,3	16,93	37,16	35,75	19,75	19,34	38,54	37,66	11,61	12,61
21	50	450	10	14,9	16,94	37,12	36,75	20,57	20,13	34,68	33,72	12,40	12,38
22	75	300	5	11,1	13,58	34,63	34,02	15,37	15,52	49,39	49,39	8,47	9,11
23	75	300	10	15,8	16,30	35,23	35,02	17,5	17,57	44,15	44,53	10,49	10,57
24	75	600	15	18,4	19,94	36,72	36,02	20,17	22,14	36,15	34,41	12,39	12,71
25	25	600	5	15,1	16,36	33,31	32,66	18,3	18,04	38,87	39,81	11,35	12,05
26	75	450	5	14,9	15,54	33,75	34,02	17,5	16,78	48,66	45,05	10,48	10,35
27	50	300	5	11,6	13,01	35,48	35,75	14,98	16,82	44,53	42,92	9,34	10,13
28	50	450	15	18,0	18,91	37,57	37,75	21,46	22,18	30,25	28,86	13,47	13,39
29	50	450	10	17,7	16,94	36,98	36,75	22,03	20,13	33,30	33,72	12,06	12,38
30	25	300	15	16,2	17,88	34,95	34,66	19,92	19,62	36,69	35,35	11,77	12,49
31	50	600	10	17,2	18,15	38,25	36,75	21,84	21,39	30,80	32,80	12,81	13,17
32	50	450	10	18,1	16,94	36,70	36,75	19,38	20,13	30,88	33,72	12,43	12,38
33	25	450	10	15,8	16,37	34,95	33,66	18,17	18,83	35,21	35,87	11,97	11,82

TPC - Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja, TFC - Ukupan sadržaj flavonoida, SBM - svežeg biljnog materijala, EXP-Eksperimentalno dobijene vrednosti odziva; PRE-Predviđene vrednosti odziva; SE-Suvog ekstrakta,

GA realizuje optimizaciju preko ponavljanja do konvergencije koja vodi postizanju optimalne odnosno maksimalne vrednosti prinosa ekstraktivnih supstanci, ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja, ukupnog sadržaj flavonoida, AOA određena DPPH testom i AOA određena FRAP testom. Koncentracija etanola, mikrotalasna snaga i ekstrakciono vreme su ulazne promenljive za GA. Nasumično, genetičkim algoritmom izabrani članovi aktuelne populacije predstavljaju “roditelje” koji generišu “decu” sledeće generacije (primenom ukrštanja, mutacije, selekcije). Prema izračunatim vrednostima fitnes funkcija od strane GA, vršena je selekcija najboljih rešenja kroz ponavljanje do konvergencije i provera kriterijum za zaustavljanje GA. Kriterijum za zaustavljanje je minimalna vrednost MFSE (srednje fitnes funkcije aktuelne populacije). Rad GA se završava, a dobijeno rešenje je optimalno u situaciji kada je postignut navedeni kriterijum. Parametri GA kao što su veličina populacije, broj generacija, stopa prelaza i verovatnoća mutacije najpre su optimizovani analizom osetljivosti (Rajendra et al., 2009) tako da su njihove vrednosti iznosile: 20, 50, 0,8 i 0,01, respektivno. Usledilo je određivanje optimalne kombinacije procesnih varijabla, odnosno koncentracija etanola, mikrotalasna snaga i ekstrakciono vreme, koja će doprineti dobijanju maksimalne vrednosti odzivnih veličina, primenom GA na model veštačke neuronske mreže. Može se konstatovati da je za GA dovoljno 50 generacija za utvrđivanje optimalnih uslova što je u saglasnosti sa objavljenim istraživanjima po kojima 50 generacija konvergiraju ka optimalnoj tački (Marchitan et al., 2010; Suresh et al., 2011). U tabeli 4.11 prikazani su rezultati optimizacije ispitivanih praćenih odzivnih veličina mikrotalasne ekstrakcije ploda aronije primenom ANN-GA.

ANN-GA model predviđa po jedan set optimalnih uslova za svaku praćenu odzivnu veličinu. Za sve ispitivane odzive optimalna vrednost ekstrakcionog vremena iznosila je oko 15 min, koncentracija etanola bila je u opsegu od 51-55% dok se optimalna vrednost mikrotalasne snage najviše razlikovala za pojedinačne slučajeve odzivnih veličina. Najveća vrednost mikrotalasne snage, kao optimalne, preporučena je kod optimizacije ukupnog sadržaja fenola (600 W), a najmanja (441 W), u slučaju optimizacije prinosa ekstrakcije. Relativno male razlike između predviđenih optimalnih vrednosti odziva (pri predviđenim optimalnim uslovima) i eksperimentalno dobijenih vrednosti na sličnim uslovima (osim u slučaju optimalne mikrotalasne snage za prinos ekstrakcije i AOA-DPPH) iznosile su: 6,26% za prinos ekstraktivnih supstanci; 5,66% za ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja; 1,38% za ukupan sadržaj flavonoida i samo 0,15% za AOA određenu FRAP testom. Manja saglasnost postignuta je između eksperimentalne i

predviđene optimalne vrednosti (razlika od 19%) antioksidativne aktivnosti određene DPPH metodom. Saglasnost ovih vrednosti (eksperimentalnih i predviđenih) predstavlja potvrdu adekvatnosti i validnosti izabranog modela (Olalere et al., 2017).

Tabela 4.11 Prinoc ekstrakcije, ukupni sadržaj fenola i flavonoida i antioksidativna aktivnost ekstrakta (određena DPPH i FRAP metodom) dobijenih pri optimalnim i ekonomskim uslovima

Konc. EtOH (%)	Ekstrakciona Snaga, W	Ekstarkciono vreme, min	Prinoc ekstrakcije, g/100 g SBM	Ukupni sadržaj fenola, mgGAE/g CF	Sadržaj flavonoida, mgRE/g SE	AOA-DPPH EC <sub>50</sub> mg/cm <sup>3</sup>	AOA-FRAP μmol Fe <sup>2+</sup> /mg
Optimalni uslovi							
55	441	14,7	19,03				
55,1	600	15		36,65			
54,4	571	14,4			22,93		
51	470	15				30,28	
51,7	525	14,8					13,63

#### 4.2.3. Komparacija RSM i ANN-GA metode za optimizaciju mikrotalasne ekstrakcije ploda aronije

U cilju komparacije RSM i ANN-GA metode kao statistički indikatori uzeti su: koeficijent determinacije ( $R^2$ ) i vrednost srednjeg relativnog procenta devijacije (srednje relativno procentno odstupanje) MRPD (engl. mean relative percent deviation) čije su vrednosti date u Tabeli 4.12. Visoke vrednosti koeficijenta determinacije ukazuje da se dobra preciznost i sposobnost predviđanja mogu pripisati i RSM i ANN modelu. Relativno male i prihvatljive vrednosti MRPD oba modela ukazuju na njihovu adekvatnost za predviđanje ispitivanih odzivnih veličina. Međutim, na osnovu vrednosti MRPD veća je adekvatnost RSM za predviđanje rezultata ukupnog sadržaja fenola i flavonoida i AOA-DPPH, dok je za ostale odzive bolju adekvatnost ispoljila primena ANN-GA modela.

Tabela 4.12 Kriterijumi za komparaciju RSM i ANN metode

Odzivna veličina	RSM		ANN	
	R <sup>2</sup>	MRPD	R <sup>2</sup>	MRPD
Prinos ekstraktivnih supstanci	0,9013	±8,22	0,910	±6,2
Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja	0,8650	±1,89	0,910	±2,4
Ukupan sadržaj flavonoida	0,8821	±4,75	0,910	±8,6
Antioksidativna aktivnost (DPPH)	0,9356	±3,67	0,910	±9,2
Antioksidativna aktivnost (FRAP)	0,9175	±3,12	0,910	±1,2

Razlike između optimalnih uslova predloženih primenom RSM i ANN modela su relativno male uz izvesno odstupanje koje se javlja u slučaju optimalne vrednosti mikrotalasne snage. Naime, ANN-GM model predviđa kao optimalnu nešto nižu vrednost snage mikrotalasa u slučaju prinosa ekstrakcije i AOA-DPPH, u odnosu na optimalnu vrednost ovog ekstrakcionog parametra predviđenu RSM modelom. Za validaciju modela vrši se i komparacija aktuelnih vrednosti odziva sa vrednostima koje predviđaju modeli. Generalno, kod oba modela uočeno je dobro slaganje ovih vrednosti.

Superiornost ANN-GA modela nad RSM modelom za fitovanje eksperimentalnih podataka i optimizaciju procesa konstatovana je nekim u ranijim istraživanjima (Sahin et al., 2017; Rajković et al., 2013; Betiku i Ajala, 2014; Stamenković et al., 2013; Basri et al., 2007). Ovo nije u saglasnosti sa našom generalnom konstatacijom da se za optimizaciju uslova mikrotalasne ekstrakcije ploda aronoje mogu koristiti oba modela, jer rezultati korišćenih kriterijuma (R<sup>2</sup> i MRPD) ukazuju da obe metodologije obezbeđuju dobru predvidljivost i adekvatnost. Obe tehnike multikriterijumske optimizacije mogu biti primenjene pri određivanju optimalnih uslova ekstrakcionog procesa za ispitivane odzive, a njihova prednost predstavlja mogućnost da istovremeno predlažu uslove koji maksimiziraju sve odzive. Ovakva konstatacija je u saglasnosti sa nalazima Sajjadi i saradnika (2017) prilikom alkalne ultrazvučne transesterifikacije palminog ulja. Sahin i saradnici (2017) su prilikom ispitivanja mikrotalasne ekstrakcije polifenola iz lista masline zaključili da su oba modela (RSM i ANN) pokazala izuzetno slaganje eksperimentalnih i predviđenih vrednosti, ali se ANN metoda pokazala pouzdanijom. RSM metoda pruža bolji uvid u analizi međusobnih interakcija procesnih faktora, dok je ANN imala prednost u kontekstu predviđanja i procene (Sahin et al., 2017). Primenom RSM i ANN za predviđanje prinosa

klasične i ultrazvučne ekstrakcije rezinoida i mineralnih materija iz belog ivanjskog cveća zaključeno je da su oba modela prihvatljiva za predviđanje prinosa i mogu se primeniti za optimizaciju procesnih parametara. Model ANN ispoljio je veći  $R^2$  i manju vrednost MRPD, ali je RSM model bio pouzdaniji u kontekstu predviđanja prinosa u okviru ispitivanog temperaturnog opsega (Milić, 2014).

RSM multikriterijumskom optimizacijom mikrotalasne ekstrakcije ploda aronijepre dložene su vrednosti ekstrakcionih parametara u cilju racionalizacije, ekonomske isplativosti i ekološke prihvatljivosti procesa, odnosno ekonomski uslovi: koncentracija etanola od 43,03%, mikrotalasna snaga od 417,15 W i ekstrakciono vreme od 11,24 min. Ovi uslovi su prihvaćeni kao optimalni u daljem toku rada, odnosno za potrebe dobijanja keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde apliciranjem ekstrakta dobijenog primenom ovih uslova. Prednost predloženih ekonomskih uslova RSM tehnikom nad predloženim optimalnim uslovima ANN-GA metodom ogleda se u mogućnosti predlaganja jedinstvenog seta uslova kojim bi se postigle optimalne vrednosti svih praćenih odzivnih veličina ali uz minimiziranje troškova “proizvodnje”. U slučaju optimizacije ANN-GA metodom, optimalna vrednost svake od praćenih odzivnih veličina praćena je pojedinačnim, različitim setom optimalnih uslova.

### ***4.3. Formulacija sastava keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde***

U novije vreme, sve prisutniji su pokušaji povećanja nutritivne vrednosti pekarskih proizvoda dodavanjem voća i povrća njihovom osnovnom sastavu (Cvetković et al., 2009). Osim toga, veoma važan aspekt funkcionalnosti hrane je njen antioksidativni kapacitet, jer postoji mnogo naučnih dokaza koji ukazuju na veliku ulogu antioksidanata u sprečavanju različitih hroničnih bolesti. Keks je popularan fini pekarski proizvod prihvaćen i konzumiran od velikog dela potrošača svih uzrasta tako da bi dodavanje sastojaka sa funkcionalnim svojstvima ovom proizvodu najverovatnije povećalo njegovu potražnju na tržištu (Karnopp et al., 2015).

Obogađivanjem osnovne formulacije keksa dodavanjem voća unapređuju se nutritivna i funkcionalna svojstva ovog proizvoda. To bi istovremeno zadovoljilo rastuće zahteve potrošača za nutritivno vrednom i prirodnom hranom kroz koju se obezbeđuje unos polifenolnih antioksidanata iz voća.



Uzimajući u obzir činjenicu da poseduju visok sadržaj vrednih bioaktivnih jedinjenja, dodatak ploda aronije i heljde u prehrambeni proizvod kao što je keks, značajno bi unapredio njegovu funkcionalnost u smislu povećanja antioksidativnog potencijala ovog proizvoda i svrstalo ovako dobijeni keks u kategoriju proizvoda sa dodatom vrednošću. Kako osnovna formulacija ovog finog pekarskog proizvoda podrazumeva prilično veliki sadržaj masnoća (do 30% m/m), prisustvo heljde i voća u keksu, odnosno prirodnih antioksidativnih sastojaka može uticati na sprečavanje lipidne peroksidacije, te ovakav proizvod pored unapređenih nutritivnih svojstava može imati i produženi rok trajanja (Sedej et al., 2011a)

U radu Yoon i saradnika (2014) ispitivan je kvalitet hleba pripremanog zamenom udela brašna različitim udelima (0, 1, 3, 5 i 10%) spršenog ploda aronije (komercijalni proizvod). Uočeno je da porastom sadržaja aronije raste sadržaj polifenola i AOA hleba. Pri ispitivanju roka trajanja proizvoda, razvoj plesni počeo je nakon četvrtog dana u slučaju uzoraka sa dodatkom aronije, dok su se kod kontrolnog uzorka (bez dodatka aronije) plesni razvile već nakon drugog dana.

U ovom radu, u cilju dobijanja kekasa sa dodatom vrednošću, kao izvori bioaktivnih jedinjenja aplicirani su integralno heljdino brašno i aronija. Deo belog pšeničnog brašna supstituisan je integralnim heljdinim brašnom uz dodatak biljnog materijala u vidu ploda, ekstrakta ili soka aronije. Keks sa dodatom vrednošću pripremljen je učešćem od 5,86% do 34,14% integralnog heljdinog brašna u odnosu na masu belog pšeničnog brašna i/ili aronije (ploda, ekstrakta ili soka) sa udelom od 5,86% do 34,14%, pri čemu je ukupna masa brašna smanjivana za udeo biljnog materijala. Analizirana su 42 uzorka kekasa različitih formulacija (Tabela 3.5), a za svaki od njih određeni su: ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja, ukupan sadržaj flavonoida i antioksidativna aktivnost primenom DPPH i FRAP testa.

#### **4.3.1. Uticaj dodatka integralnog heljdinog brašna na karakteristike kekasa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde**

Pšenica, kao žitarica široko rasprostranjena u ishrani, obezbeđuje unos velike količine skroba i dijetalnih vlakana, manju količinu masti, a takođe je i dobar izvor vitamina grupe B i minerala (uglavnom kalcijuma, magnezijuma i gvožđa). Većina ovih sastojaka biva izgubljeno tokom procesa prerade žita i postupka dobijanja proizvoda od brašna, tako da na kraju proizvodi od belog pšeničnog brašna imaju relativno nisku nutritivnu vrednost (Škrbić i Filipčev, 2007).

U cilju dobijanja vrednijih proizvoda često se koristi integralno brašno, dobijeno iz celog zrna žitarica. Veći sadržaj polifenola i AOA u integralnom heljdinom i pšeničnom brašnu (u odnosu na ostale frakcije mlevenja) može se pripisati prisustvu ovih jedinjenja u perikarpu i aleuronskom sloju zrna, jer se pri mlevenju, za proizvodnju belog tipa brašna, uklanjaju spoljašnji slojevi, a ostaje endosperm zrna koji se odlikuje manjim sadržajem polifenola (Sakač et al., 2011). Heljdino brašno ispoljava znatno veću AOA u odnosu na frakcije mlevenja pšenice tako da je upotreba heljde u proizvodnji funkcionalnih proizvoda sve prisutnija (Sedej et al., 2011). U mnogim objavljenim naučnim istraživanjima dokazano je da heljdino brašno, belo ili integralno, ima dobra antioksidativna svojstva zahvaljujući prisustvu polifenolnih jedinjenja kao što su rutin i kvercetin (Bonafaccia et al., 2003; Sakač et al., 2011; Sedej et al., 2010; Sedej et al., 2011b; Alvarez-Jubete et al., 2010; Nikolić et al., 2011; Shahidi i Ambigaipalan, 2015). Zamena dela belog pšeničnog brašna dodavanjem izvesne količine integralnog brašna u ovom radu realizovana je upotrebom integralnog heljdinog brašna. Uzorci keksa sa udelom integralnog heljdinog brašna u iznosu od 10, 20 i 30% (bez dodatka biljnog materijala) predstavljali su kontrolne uzorke korišćene za komparaciju sa uzorcima kojima je pored integralnog heljdinog dodat određeni udeo biljnog materijala u vidu ploda, ekstrakta ili soka aronije. Rezultati ispitivanih parametara keksa sa dodatkom različitih udela integralnog heljdinog brašna prikazani su u tabeli 4.13.

Tabela 4.13 Vrednosti ispitivanih parametara keksa u kome je udeo belog pšeničnog brašna supstituisan integralnim heljdinim brašnom

Udeo integralnog heljdinog brašna	Ispitivani parametra keksa			
	Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja, mg GAE/g keksa	Ukupni sadržaj flavonoida, mgRE/g keksa	AOA (DPPH), % neutralizacije DPPH	AOA (FRAP), mmol Fe <sup>2+</sup> /g keksa
10	2,09	1,02	66,3	27,75
20	2,24	1,43	73,3	50,05
30	2,67	1,64	83,3	75,99

Dodatak heljdinog brašna znatno je uticao na praćene parametre u analiziranim uzorcima keksa. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u keksu raste za 21,7%, a ukupan sadržaj flavonoida za 61,3% sa porastom masenog udela integralnog heljdinog brašna od 10% do 30%. Rad Sadej i saradnika (2011a) daje formulaciju bezglutenskog krekeru baziranog na dva tipa heljdinog brašna, rafinisanog i integralnog koja je omogućila značajno povećanje, od 2-3 puta, sadržaja ukupnih fenola u odnosu na krekeru od pšeničnog brašna (84 i 292 mg galne kiseline/100 g krekeru za belo pšenično brašno i integralno heljdino brašno, respektivno). U cilju dobijanja biskvita sa đumbirom sa povećanim funkcionalnim i nutritivnim svojstvima pšenično brašno supstituisano je heljdinim brašnom i to u iznosu 30, 40 i 50% pri čemu se ukupan sadržaj fenola biskvita povećao od 157,06 mg galne kiseline/100 g biskvita, bez heljdinog brašna, na 238,92 mg galne kiseline/100 g biskvita koji je sadržao 50% heljdinog brašna (Filipčev et al., 2011). Zamenom pirinčanog brašna udelom belog heljdinog brašna (10-30%) povećan je ukupni sadržaj fenola od 0,955 na 1,39 mg GAE/g uzorka bezglutenskog keksa na bazi pirinčanog i heljdinog brašna pri maksimalnoj supstituciji (30%) u odnosu na uzorak napravljen samo od pirinčanog brašna (Sakač et al., 2015).

U ovom radu, antioksidativna aktivnost etanolnih ekstrakata keksa iznosilaje 66,3-83,3% neutralizacije DPPH i 27,75-75,99 mmol Fe<sup>2+</sup>/g keksa za AOA odedeđenu DPPH i FRAP metodom, respektivno. Sa porastom udela integralnog heljdinog brašna (od 10 do 30%) zanačajno raste i antioksidativna vrednost etanolnih ekstrakata keksova nezavisno od metode određivanja. Ukupan rast od 25,6% nađen je određivanjem AOA DPPH testom. Vrednost AOA ekstrakta keksa (određena FRAP testom) sa najvećim udelom integralnog heljdinog brašna bila je skoro tri puta veća od vrednosti sa najmanjim procentom supstitucije. Poboļjšana antioksidativna svojstva posledica su unosa fenolnih jedinjenja heljde, uglavnom rutina i kvercetina za koje je utvrđeno da poseduju visoku antioksidativnu aktivnost (Lin et al., 2009).

U radu Filipčev i saradnika (2011) prema dobijenim EC<sub>50</sub> vrednostima, etanolni (80%) ekstrakti krekeru od heljdinog brašna ispoljili su znatno veću sposobnost neutralizacije DPPH radikala (0,95 i 28,2 mg/cm<sup>3</sup> za krekeru od belog pšeničnog i integralnog heljdinog brašna, respektivno). Pirinčano brašno zamenjeno je različitim udelima (10, 20 i 30%) belog heljdinog brašna u cilju unapređenja nutritivnog i funkcionalnog kvaliteta bezglutenskog keksa. Ispitivana je AOA kontrolnog keksa (bez dodatka heljdinog brašna) i poređena sa uzorcima svih nivoa supstitucije,

a najveću AOA ispoljio je keks sa najvećim učešćem heljdinog brašna čime se opravdava atribut heljdinog brašna kao dobrog izvora antioksidanata (Nedeljković et al., 2013).

Povećanje udela belog heljdinog brašna u formulaciji bezglutenskog keksa na bazi pirinčanog i heljdinog brašna izazvalo je pozitivnu promenu ( $EC_{50}=23,2-14,7$  mg/cm<sup>3</sup> DPPH) antioksidativne aktivnosti ekstrakta keksa sa ukupnim povećanjem od 58%, pri najvećem udelu heljdinog brašna od 30% u odnosu na kontrolni uzorak koji je sadržao samo pirinčano brašno. Sposobnost neutralizacije DPPH radikala ekstrakta keksa sa najvećim učešćem heljdinog brašna uglavnom je posledica njegovog visokog sadržaja rutina koji poseduje značajni neutralizacioni potencijal u odnosu na DPPH (Sakač et al., 2015).

Substitucijom 10, 20, 30 i 40% mase kukuruznog skroba (osnova u pripremanju bezglutenskog hleba) heljdinim brašnom dobijen je unapređeni bezglutenski hleb. Primećeno je da sadržaj polifenola i antioksidativna aktivnost hleba raste sa povećanjem masenog udela heljdinog brašna i dostiže maksimalnu vrednost pri supstituciji od 40%, istovremeno ovaj uzorak imao je i najbolje ocenjene senzorne osobine (Wronkowska et al., 2010). Takođe, veća AOA primećena je kod hleba pripremljenog supstitucijom 15% pšeničnog brašna heljdinim brašnom (belim i integralnim) u poređenju sa pšeničnim hlebom pri čemu je najveća AOA ispoljena kod uzorka sa integralnim heljdinim brašnom (Lin et al., 2009).

Uključivanje heljdinog brašna u proizvodnju instant nudli obezbeđuje ovom proizvodu atribut funkcionalne hrane prema rezultatima nađenim tokom ispitivanja uticaja variranog sadržaja heljdinog brašna (0-40%) na kvalitet instant nudli. Kod nudli kojima su dodate obe vrste heljdinog brašna (belo i integralno) identifikovan je povećan sadržaj rutina i kvercetina što je uticalo i na povećanje antioksidativne aktivnosti u poređenju sa kontrolnim uzorkom (bez dodatog heljdinog brašna) (Choy et al., 2013).

#### **4.3.2. Uticaj dodatka ploda aronije i heljdinog brašna na karakteristike keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde**

U cilju dobijanja keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde, tradicionalna receptura je, osim supstitucije dela belog pšeničnog brašna integralnim heljdinim brašnom, modifikovana i dodavanjem različitih količina (5,86-34,14%) biljnog materijala u obliku usitnjenog ploda, ekstrakta ili soka aronije (Tabela 3.5.). Detaljne recepture za pripremu keksa

povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde prema predloženom eksperimentalno dizajnu date su u Prilogu (Tabela PT10). Ekstrakt ploda aronije koji je korišćen pri dobijanju keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde u ovom radu dobijen je mikrotalasnom ekstrakcijom ploda aronije pod uslovima predloženim kao optimalni uslovi: 43,03%-tni rastvor etanola, mikrotalasna snaga od 417,15 W i ekstrakciono vreme od 11,24 min. Karakterizacija ekstrakta i soka aronije, u smislu određivanja ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja, sadržaja flavonoida i antioksidativne aktivnosti (određene DPPH i FRAP testom) korišćenih pri izradi keksa prikazane su Tabeli 4.14.

Tabela 4.14 Karakterizacija ekstrakta i soka ploda aronije korišćenih pri izradi keksa

	Ekstrakt (5 mg/cm <sup>3</sup> )	Sok (sok:voda, 1:1 v/v)
Sadržaj ukupnih fenola	36,75 mg GA/g suvog ekstrakta	7,75 mg GAE/cm <sup>3</sup> soka
Sadržaj flavonoida	28,7 mg RE/g suvog ekstrakta	3,4 mg RE/cm <sup>3</sup> soka
Antioksidativna aktivnost određena DPPH testom	86,12%	72,3% neutralizacije DPPH radikala
Antioksidativna aktivnost određena FRAP testom	96,72 mmol Fe <sup>2+</sup> /cm <sup>3</sup>	51,75 mmol Fe <sup>2+</sup> /cm <sup>3</sup> soka

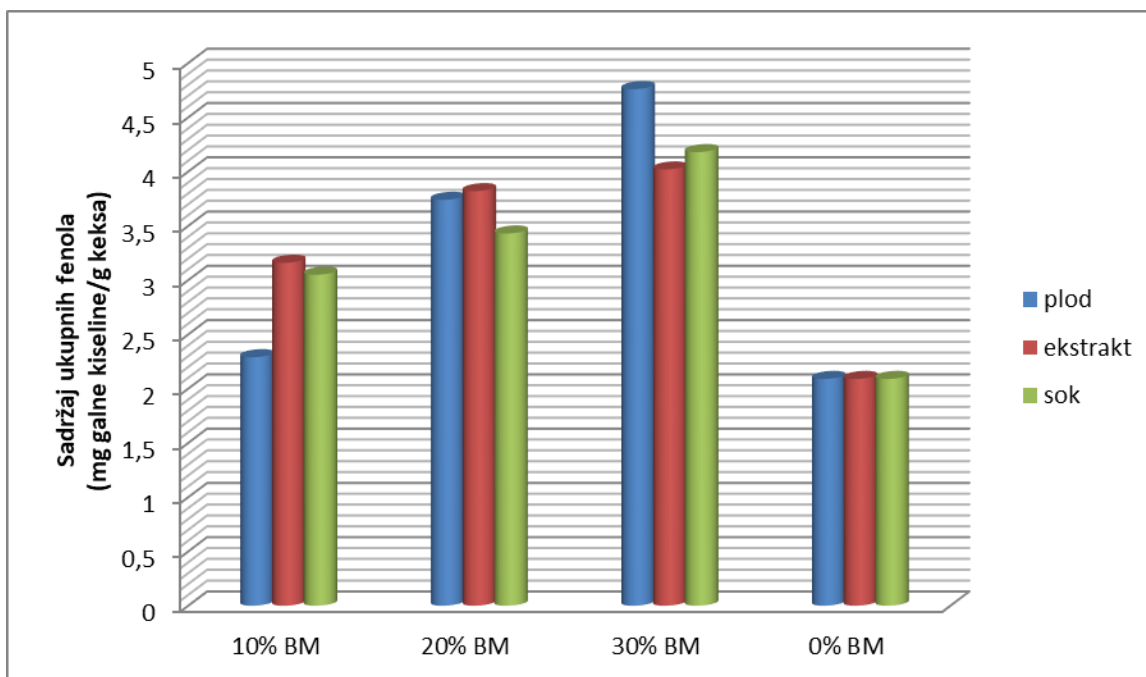
GA-Galne kiseline; RE-Rutina; SBM-Svežeg biljnog materijala

Dobijeni rezultati su u saglasnosti i nešto veći sa ranije objavljenim u radu Konić-Ristić i saradnika (2013) za svež, koncentrovan sok dobijen ceđenjem plodova aronije čiji je ukupni sadržaj fenola 5,93 mg galne kiseline/cm<sup>3</sup> soka. Antioksidativna aktivnost (EC<sub>50</sub>) soka u tom radu određena DPPH testom iznosila je 0,52 µl/ml (Konić-Ristić et al., 2013). U radu Blaszcak i saradnika (2017) analizirani hladno ceđeni sok aronije, bez dodatka šećera, vode i konzervansa pokazao je AOA (FRAP test) od 134,61 µmol Fe<sup>2+</sup>/cm<sup>3</sup> soka, što je znatno manja vrednost od dobijene u ovom radu. Nešto veća vrednost sadržaja ukupnih fenola u iznosu od 18,53 mg galne kiseline/cm<sup>3</sup> soka nađena je pri proizvodnji soka aronije bez upotrebe pektinolitičkih enzima i bez dodatka šećera (Graversen et al., 2008).

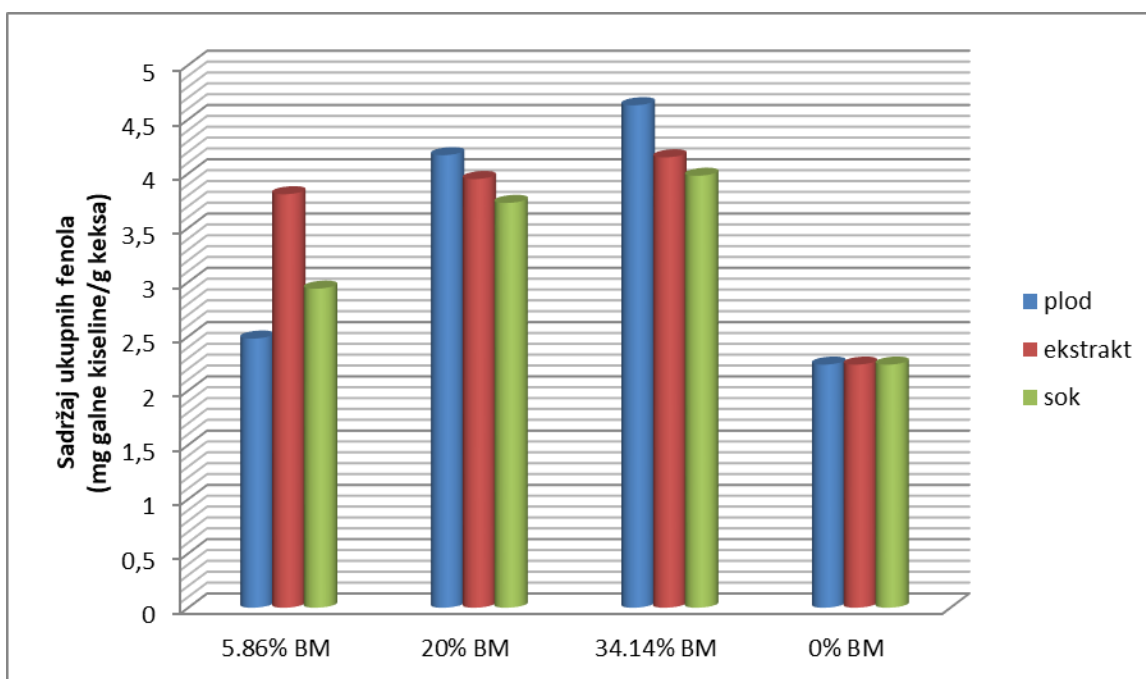
#### 4.3.2.1. Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja u keksu povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde pripremljenih zamenom dela belog pšeničnog brašna integralnim

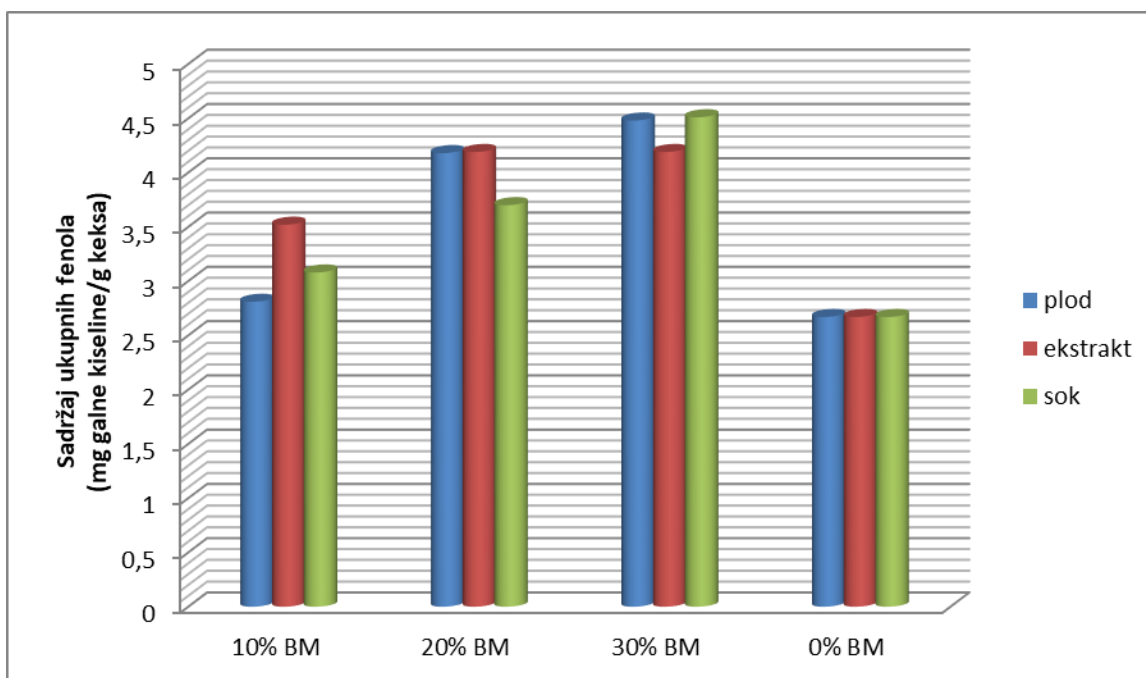
heljdinim brašnom i/ili različitim vrstama i količinama biljnog materijala koji potiče od aronije prikazan je na slikama 4.23, 4.24 i 4.25 i u Prilogu u Tabeli PT6.



Slika 4.23 Uticaj dodatka biljnog materijala (BM) na ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja u keksu pri udelu integralnog heljdinog brašna od 10% (odnosno 5,86% za 20% BM)



Slika 4.24 Uticaj dodatka biljnog materijala (BM) na ukupan sadržaj fenolnih jedinjenje u keksu pri udelu integralnog heljdinog brašna od 20%



Slika 4.25 Uticaj dodatka biljnog materijala (BM) na ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja u keksu pri udelu integralnog heljdinog brašna od 30% (odnosno 34,14% za 20% BM)

Analizom rezultata utvrđeno je da se ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja u zavisnosti od recepture keksa kreće u granicama od 2,29 do 4,76 mg galne kiseline/g keksa, kao i da količina ovih bioaktivnih materija u keksu raste sa porastom udela biljnog materijala. Maksimalni sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja detektovan je kod uzorka koji sadrži 30% usitnjenog ploda i 10% heljdinog brašna, što je više od dva puta veća vrednost u odnosu na kontrolni uzorak sa sadržajem integralnog heljdinog brašna od 10%. Ovakva konstatacija potvrđuje činjenicu da je aronija dobar izvor polifenolnih jedinjenja i da zadržava to svojstvo kada se aplicira u neki od prehrambenih proizvoda. Generalno, sa porastom udela biljnog materijala, nezavisno od njegove vrste (plod, ekstrakt, sok) raste i sadržaj fenolnih jedinjenja u dobijenom keksu.

Ovakvi rezultai su donekle očekivani i u skladu sa rezultaima objavljenim u drugim radovima koji se bave dobijanjem i ispitivanjem novih funkcionalno unapređenih proizvoda sa dodatkom biljnih materijala bogatih fenolnim jedinjenjima. Tako se pokazalo da je sadržaj ukupnih fenola, antocijana i antioksidativna aktivnost najveća pri maksimalno dodatoj količini spraćenog tropa aronije u pripremi hraljnih pirinčanih pločica. Sadržaj ukupnih fenola u kontrolnom uzorku (sa 0% tropa aronije) iznosio je 23,41 mg galne kiseline/100 g, a pri supstituciji spraćenim tropom aronije od 2-6%, vrednost se povećala 3-6 puta odnosno iznosila je od 66,75-144,48 mg galne

kiseline/100 g (Ryu et al., 2015). Substitucijom pšeničnog brašna aronijom u prahu (komercijalni proizvod) u nivoima od 0, 5, 10 i 15% predložena je receptura za pripremanje mafina koji bi u pogledu povećane antioksidativne aktivnosti dobili atribut funkcionalne hrane i kod kojih je sa porastom udela biljnog materijala od 5-15%, ukupni sadržaj fenola povećan 2,5-6,3 puta (Park i Chung, 2014). Uključivanje tropa grožđa sorte bordo (20, 25 i 30%) i integralnog pšeničnog brašna (30, 40 i 50%) u formulaciju keksa uzrokovalo je značajni porast sadržaja fenolnih jedinjenja koji je postigao najveću vrednost (48,08 mg galne kiseline/100 g keksa) učešćem maksimalnog udela tropa grožđa i minimalnog udela integralnog pšeničnog brašna (Karnopp et al., 2015). Šarić i saradnici (2016) primenili su suvi i sprášeni trop maline i borovnice u formulaciju bezglutenskog keksa sa dodatkom vrednošću. Variranje udela ova dva izvora fenolnih jedinjenja (0; 7,5; 15; 22,5 i 30%) utiće na promenu vrednosti sadržaja fenola. Uzorak u kome je detektovan najveći sadržaj fenola u vrednosti od 489,1 mg galne kiseline/100 g keksa, dobijen je dodatkom samo tropa borovnice (30%). U radu Sudha i saradnika (2007) za pripremu keksa korišćeno je belo pšenično brašno kome je dodat fino isitnjen trop jabuke (dobijen nakon ceđenja soka) u opsegu od 0-25%, a koji je doprineo povećanju ukupnog sadržaja fenola u keksu u iznosu od 2,07-3,15 mg galne kiseline/g uzorka. Iako je sadržaj ukupnih fenola u tropu jabuke šest puta veći od sadržaja fenola u pšeničnom brašnu, dodatak 25% tropa jabuke uzrokuje povećanje sadržaja fenola u finalnom proizvodu za oko 50% u odnosu na sadržaj fenola u uzorku bez biljnog materijala (Sudha et al., 2007). Predpostavka je da procesi sušenja i pečenja iznad 60°C dovode do oksidativne kondenzacije ili razgradnje termolabilnih jedinjenja kao što su fenoli. Međutim, postoje dokazi i da termičkom obradom testa može doći do povećanja sadržaja fenolnih jedinjenja usled potencijalnog formiranja novih, intermedijarnih jedinjenja (kao što su enedioli) iz jedinjenja koja potiču iz tropa jabuke (Sudha et al., 2007). Analizom keksa sa različitim udelima sprášene kore manga (0-20%) utvrđeno je da se sadržaj ukupnih fenola povećava u granicama od 0,54 do 4,5 mg galne kiseline/g keksa (Ajila et al., 2008). Hleb sa unapređenim antioksidativnim svojstvima dobijen je dodatkom sprášenog đumbira (do 4%) (Balestra et al., 2011) kao i cimeta u prahu (do 6%) (Dhillon i Amarjeet, 2013).

Povećanje sadržaja ukupnih fenola u keksevima u kojima je dodato 10% integralnog heljdnog brašna i 10% biljnog materijala najizrazitije je u slučaju dodatka ekstrakta i iznosi 51,2% u odnosu na keks napravljen bez dodatka biljnog materijala, odnosno samo supstitucijom heljdnim



integralnim brašnom (10%). Pri istom udelu integralnog heljdinog brašna, prisustvo 30% biljnog materijala, nezavisno od njegove vrste, uzrokuje najveće povećanje ukupnog sadržaja fenola od 2,28 puta dodatkom ploda u odnosu na keks supstituisan samo integralnim heljdinim brašnom.

Pri supstituciji belog pšeničnog brašna integralnim heljdinim brašnom u iznosu od 20% ukupni sadržaj fenola značajno raste sa povećanjem udela biljnog materijala i to ukupno 86,16% (prisustvom 20% biljnog materijala), odnosno za više od dva puta pri maksimalnom učešću biljnog materijala u odnosu na keks pripreman bez aronije. U oba slučaja najveći doprinos povećanju vrednosti merenog parametra potiče od ploda aronije. Zapaža se da je pri istom ili bliskom sadržaju integralnog heljdinog brašna (30% odnosno 34,14%), sadržaj ukupnih fenola znatno povećan rastom udela biljnog materijala, ali ovde nije toliko izrazit uticaj vrste upotrebljenog biljnog materijala. Najveće povećanje sadržaja fenolnih jedinjenja, u odnosu na keks bez biljnog materijala, od skoro 70% postiže se dodatkom soka ili ploda (30%).

Treba imati u vidu da se različitim formulacijama keksa pored ploda aronije unosi i integralno heljdino brašno kao još jedna komponenta koja je dobar izvor polifenolnih jedinjenja, tako da je izvesno prisustvo sinergije bioaktivnih komponenti unešenih putem oba izvora. Sun-Waterhouse i saradnici (2010) unapređivali su kvalitet voćnog kolača na bazi jabuke. Obogaćivanje finalnog proizvoda samo prehrambenim vlaknima jabuke neznatno utiče na povećanje ukupnog sadržaja fenola, dok se značajan pozitivan efekat javlja, kada je u finalnom proizvodu pored prehrambenih vlakana prisutan fenolni ekstrakt jabuke. Objašnjenje autora je da prehrambena vlakna koja sadrže vezane fenole tek u sinergiji sa fenolima ekstrakta značajno doprinose povećanju sadržaja fenolnih jedinjenja u finalnom proizvodu (Sun-Waterhouse et al., 2010). Tokom eksperimenta u ovom radu, sa povećanjem udela ploda aronije (bilo koja forma) prisutan je stalni rast sadržaja ukupnih fenola, bez obzira na procenat dodatog heljdinog brašna, što znači da dodatak ploda aronije ima dominantan uticaj na vrednost ovog ispitivanog parametra.

Pri dodavanju ploda u iznosu od 30%, sadržaj fenola kod uzorka sa 10% heljdinog brašna nešto je veći u odnosu na uzorak sa 30% heljdinog brašna (4,76 odnosno 4,48 mg galne kiseline/g keksa). Predpostavka je da je sa većim udelom oba polifenolna izvora veća mogućnost različitih interakcija među fenolnim jedinjenjima i stvaranje kompleksnih kopolimera čija je kvantifikacija otežana. U nekim istraživanjima pokazalo se da je mogućnost pojave polimerizacionih reakcija u složenim sistemima tri puta veća u koncentrovanijim rastvorima jer veća koncentracija omogućava efikasniju koliziju (veći broj efikasnih sudara) između individualnih molekula fenola

(Pinelo et al., 2004). Fenolni antioksidanti su mnogo efikasniji i imaju produženo dejstvo ako se primene pre nego što je proces peroksidacije lipida postao intezivan pa bi ih trebalo dodati u određeni prehrambeni proizvod što je moguće ranije tokom procesa proizvodnje ili skladištenja kako bi ispoljili maksimalno antioksidativno dejstvo (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

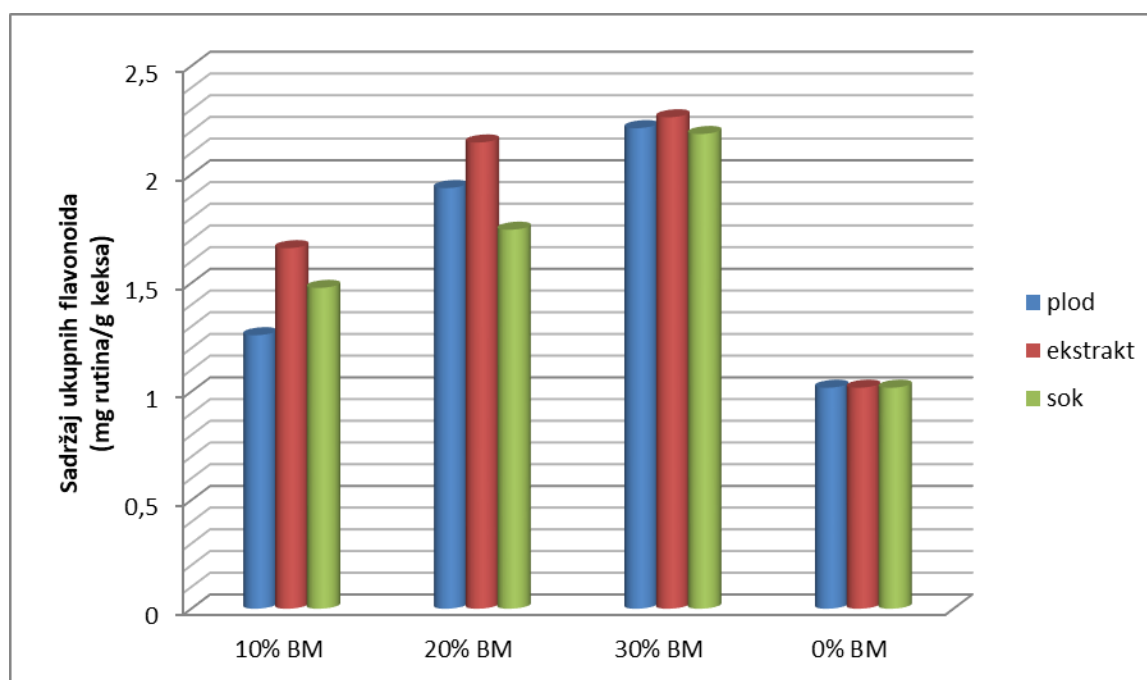
Pored variranja masenog udela, značajan efekat na dobijene rezultate potiče usled razlike u hemijskom sastavu upotrebljenih vrsta biljnog materijala (plod, ekstrakt i sok). Usitnjeni plod aronije predstavlja heterogenu biomasu koja se sastoji od semenki, kože, mesa ploda i nerastvorne pulpe. Semenke obično sadrže veću količinu lipida, dok je u koži prisutno više prehrambenih vlakana i polifenola koji mogu biti snažno vezani za strukture ugljenih hidrata (Grunovaite, 2016). U ovom radu, dodatak ekstrakta ne rezultira nekim značajnim porastom sadržaja fenola nakon postizanja maksimalne vrednosti od 4,19 mg galne kiseline/g keksa pri 20% dodatog ekstrakta aronije i 34,14% supstitucije integralnim heljedinim brašnom. Doprinos supstitucije sokom aronije dostiže svoj maksimum od 4,19 mg galne kiseline/g keksa na 30% dodatog soka u kombinaciji sa 30% dodatog heljedinog brašna. Pri manjim udelima biljnog materijala do 20%, najznačajniji doprinos sadržaju polifenola u keksu potiče od ekstrakta koji se onda okvirno izjednačava sa uticajem dodatog ploda aronije, da bi pri učešću 30% biljnog materijala ekstrakt pokazao najmanji doprinos. Pri maksimalnoj supstituciji biljnim materijalom u iznosu od 34,14% doprinos ploda aronije je najizraženiji.

Na ukupan sadržaj fenola, kao i ostalih ispitivanih veličina, značajan je uticaj povećanja temperature usled pečenja keksa, što ne mora nužno da znači i smanjenje vrednosti ovih veličina. Naime, utvrđena je mogućnost stvaranja različitih kompleksa preko višestrukih vodoničnih veza između hidroksilnih grupa polifenolnih jedinjenja i karboksilnih grupa iz pektinskih polisaharida prehrambenih vlakana ili proteinskih peptida. Duže izlaganje proizvoda visokoj temperaturi tokom pečenja može uništiti komplekse formirane između vezanih fenola i komponenti koje potiču iz drugih dodatih sastojaka što potencijalno izaziva i povećanje sadržaja ekstrahovanih fenola kod nekih uzoraka (Reis et al., 2012). Međutim termolabilni antioksidanti izloženi dužem uticaju povišene temperature skloni su termičkoj razgradnji što se odražava na ukupni antioksidativni potencijal. Trop jabuke dobijen kao sporedni proizvod u procesu proizvodnje fermentisanog napitka od soka jabuke, uključen je kao biljni material u formulaciju ekstrudiranog flipsa i kolača. Biljni material je dodavan sa masenim udelima (0-30%) što je doprinelo povećanju sadržaja fenola i antioksidativne aktivnosti i to u većoj meri kod

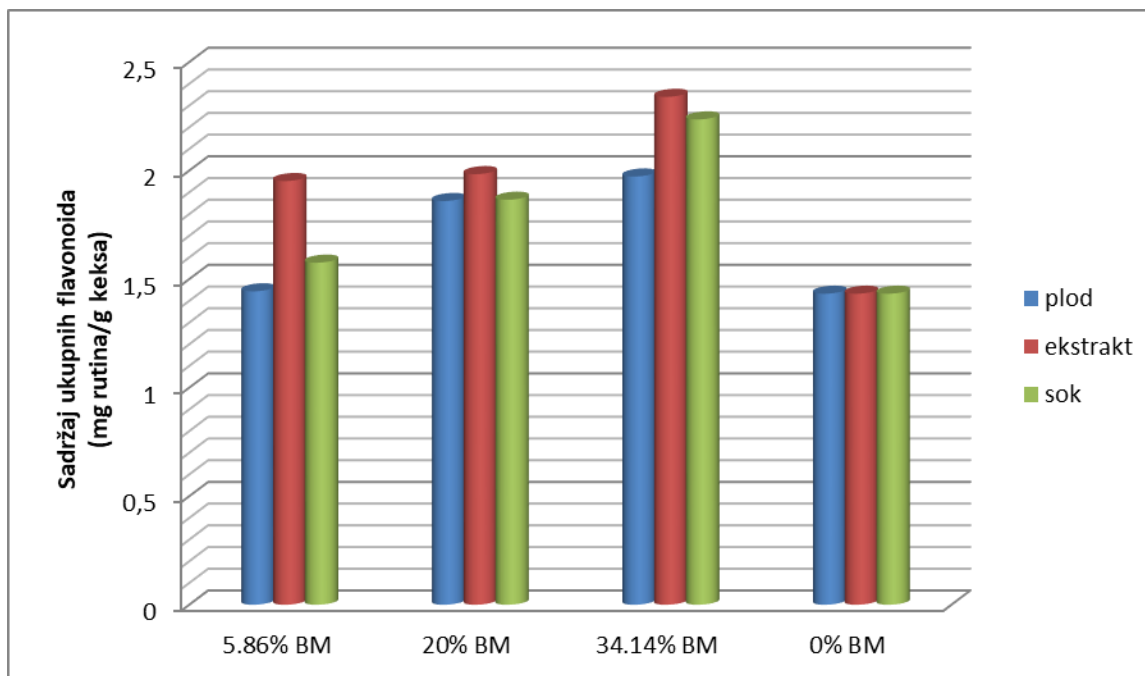
ekstrudiranih u odnosu na pečene proizvode. Međutim, sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja bio je manji od očekivanog što autori smatraju posledicom procesa pečenja (Reis et al., 2012).

#### 4.3.2.2. Ukupni sadržaj flavonoida u keksu povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde

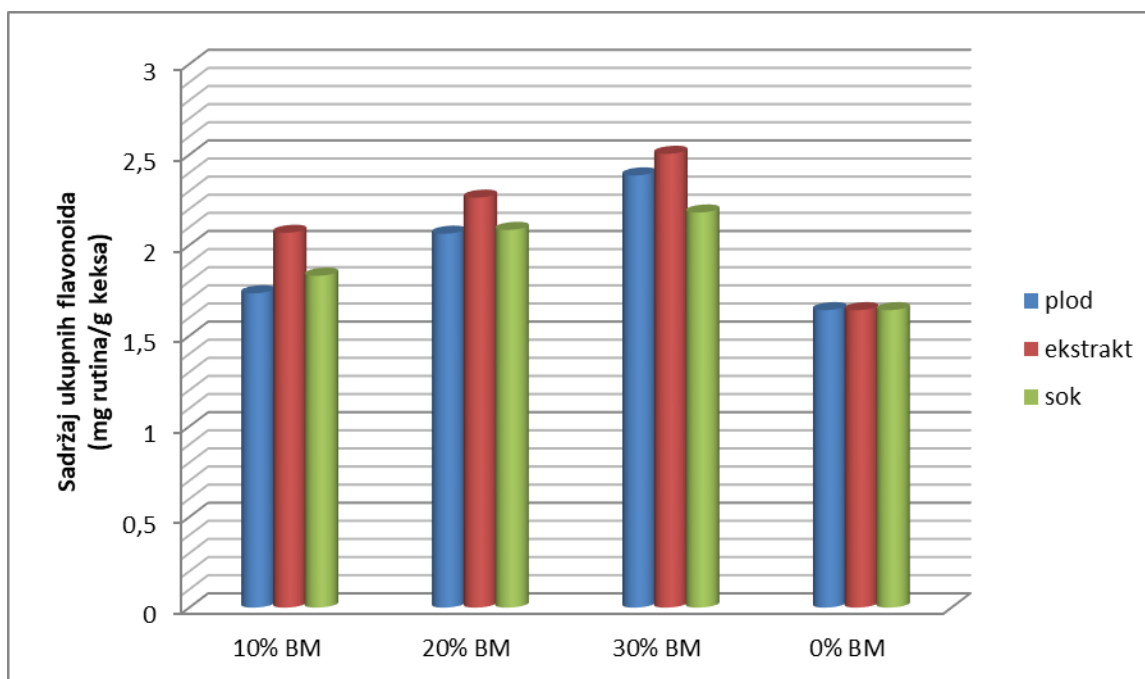
Grafički prikaz uticaja supstitucije belog pšeničnog brašna integralnim heljdinim brašnom i/ili različitim vrstama biljnog materijala u vidu ploda, ekstrakta i soka aronije na sadržaj ukupnih flavonoida ekstraktata keksa prikazani su na slikama 4.26, 4.27 i 4.28 a dobijene vrednosti ove ispitivane veličine u Prilogu u Tabeli PT7.



Slika 4.26 Uticaj dodatka biljnog materijala (BM) na ukupan sadržaj flavonoida u keksu pri udelu integralnog heljdnog brašna od 10% (odnosno 5,86% za 20% BM)



Slika 4.27 Uticaj dodatka biljnog materijala (BM) na ukupan sadržaj flavonoida u keksu pri udelu integralnog heljdinog brašna od 20%



Slika 4.28 Uticaj dodatka biljnog materijala (BM) na ukupan sadržaj flavonoida u keksu pri udelu integralnog heljdinog brašna od 30% (odnosno 34,14% za 20% BM)

Sadržaj flavonoida u keksu povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde kretao se u granicama od 1,26-2,51 mg rutina/g keksa. Generalno, nezavisno od vrste biljnog materijala, sa povećanjem udela biljnog materijala raste sadržaj ovih bioaktivnih jedinjenja u uzorcima keksa i to od 1,5 do 2,2 puta u odnosu na uzorak pripremljen bez učešća biljnog materijala. U radu Park i Chung (2014), substitucijom pšeničnog brašna aronijom u prahu (komercijalni proizvod) u nivoima od 0,5, 10 i 15%, predložena je receptura za pripremanje mafina gde je sa porastom udela biljnog materijala od 5-15% sadržaj flavonoida povećan 1,5-2,8 puta.

Pri supstituciji belog pšeničnog brašna sa 5,86% integralnog heljdinog brašna i dodatkom 20% biljnog materijala sadržaj flavonoida se povećava za najviše 20%, zavisno od vrste biljnog materijala, pri čemu najveći doprinos potiče od dodatog ekstrakta, a najmanji od soka.

Uzorcima keksa u kojima je prisutno 10% integralnog heljdinog brašna, povećanje sadržaja flavonoida od preko 60% postignuto je dodatkom ekstrakta, a najmanje (23,8%), dotakom ploda kada je udeo biljnog materijala iznosio 10%. Pri istom udelu integralnog heljdinog brašna, sadržaj flavonoida u analiziranim uzorcima keksa sa dodatih 30% biljnog materijala znatno je povećan u odnosu na kontrolni uzorak, nezavisno od vrste biljnog materijala prosečno 2,2 puta. Poređenjem rezultata pri supstituciji belog pšeničnog brašna integralnim heljdinim brašnom u iznosu od 20%, nezavisno od vrste biljnog materijala, zapaženo je prosečno povećanje sadržaja flavonoida od 34% u odnosu na keks pripremljen bez biljnog materijala (kontrolni keks sa istim udelom integralnog heljdinog brašna). U ovom slučaju, maksimalni udeo biljnog materijala (34,14%) dovodi do značajnog povećanja za 63,29%, 56,04% i 37,68% vrednosti sadržaja ukupnih flavonoida (u odnosu na keks bez aronije) sa opadanjem vrednosti prema redosledu supstitucije: ekstrakt>sok>plod.

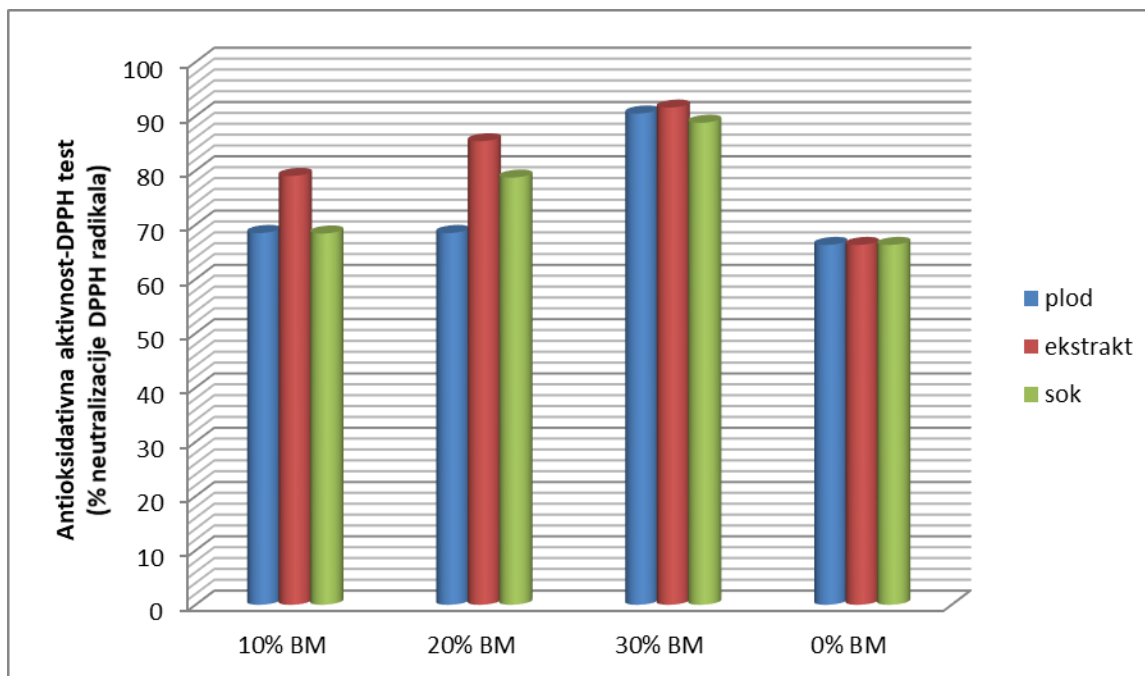
Kada je udeo integralnog heljdinog brašna iznosio 30% i biljnog materijala 10% komparacijom sa kontrolnim uzorkom, povećanje sadržaja flavonoida u opsegu od 5,66-26% postignuto je dodatkom ploda i ekstrakta, respektivno. Pri istom udelu integralnog heljdinog brašna dalje povećanje udela biljnog materijala na 30% uzrokovalo je i znatniji porast sadržaja flavonoida u odnosu na vrednost kontrolnog uzorka od 32,8% do 52,6% učešćem soka i ekstrakta, respektivno. Zamenom belog pšeničnog brašna sa 34,14% integralnim heljdinim brašnom i dodatkom 20% biljnog materijala, najveći ukupan sadržaj flavonoida ostvaren je dodatkom ekstrakta. Rezultati ukazuju da se ukupan sadržaj flavonoida kod uzoraka koji ne sadrže biljni materijal kreće u opsegu od 1,02 do 1,64 mg rutina/g keksa i da raste sa povećanjem udela

integralnog heljdinog brašna od 10-30%. U uzorcima u kojima je uključeno prisustvo biljnog materijala, maksimalni rezultat je postignut supstitucijom sa 30% biljnog materijala u obliku ekstrakta i 30% heljdinog brašna, sadržaj flavonoida je približno 1,5 puta veći u odnosu na kontrolni uzorak sa 30% heljdinog brašna. Ovakve činjenice u saglasnosti su sa tvrdnjama o aroniji kao dobrom izvoru flavonoida, a naročito je značajno za njenu primenu u poboljšanju kvaliteta prehrambenih proizvoda. Porastom udela aronije u formulaciji keksa, uglavnom je postignuto konstantno povećanje sadržaja flavonoida, bez obzira na variranje udela prisutnog heljdinog brašna iz čega proizilazi da aronija obezbeđuje dominantan doprinos povećanju vrednosti sadržaja flavonoida. Pri svim vrednostima udela biljnog materijala, najznačajniji doprinos sadržaju flavonoida u keksu potiče od ekstrakta.

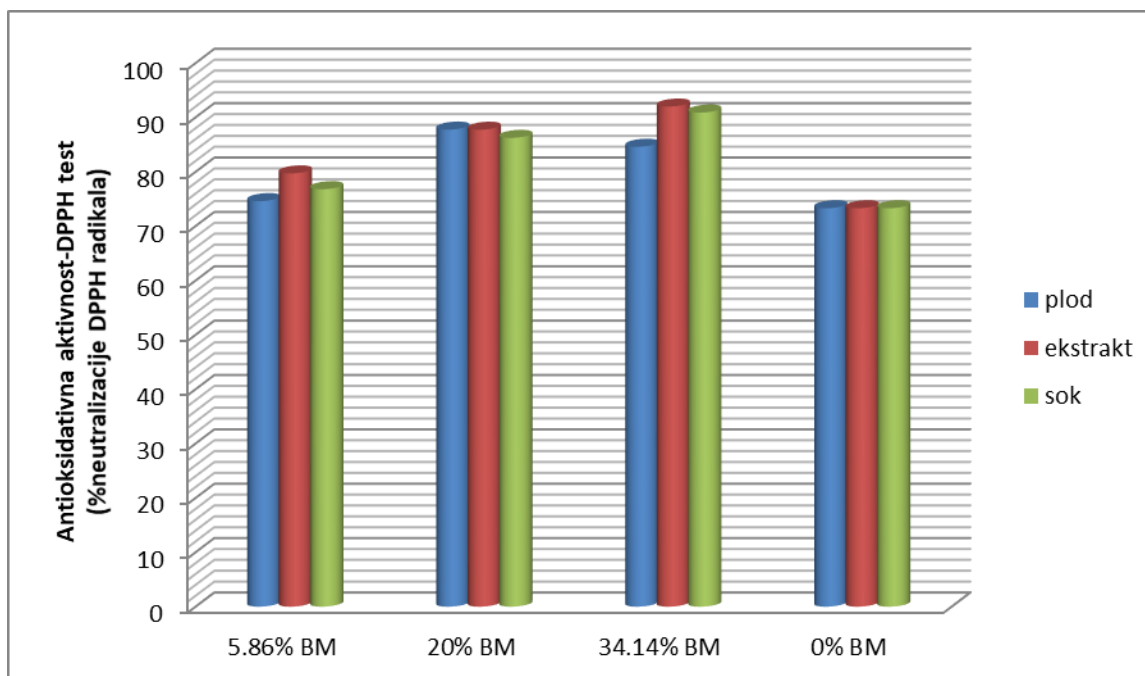
#### **4.3.2.3. Antioksidativna aktivnost keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde određena DPPH metodom**

Uticaj dodatka različitih količina integralnog heljdinog brašna i/ili ploda aronije na AOA ekstrakata keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde prikazani su na slikama 4.29, 4.30 i 4.31. Rezultati dobijeni DPPH testom izraženi su kao procenat neutralizacije DPPH radikala.

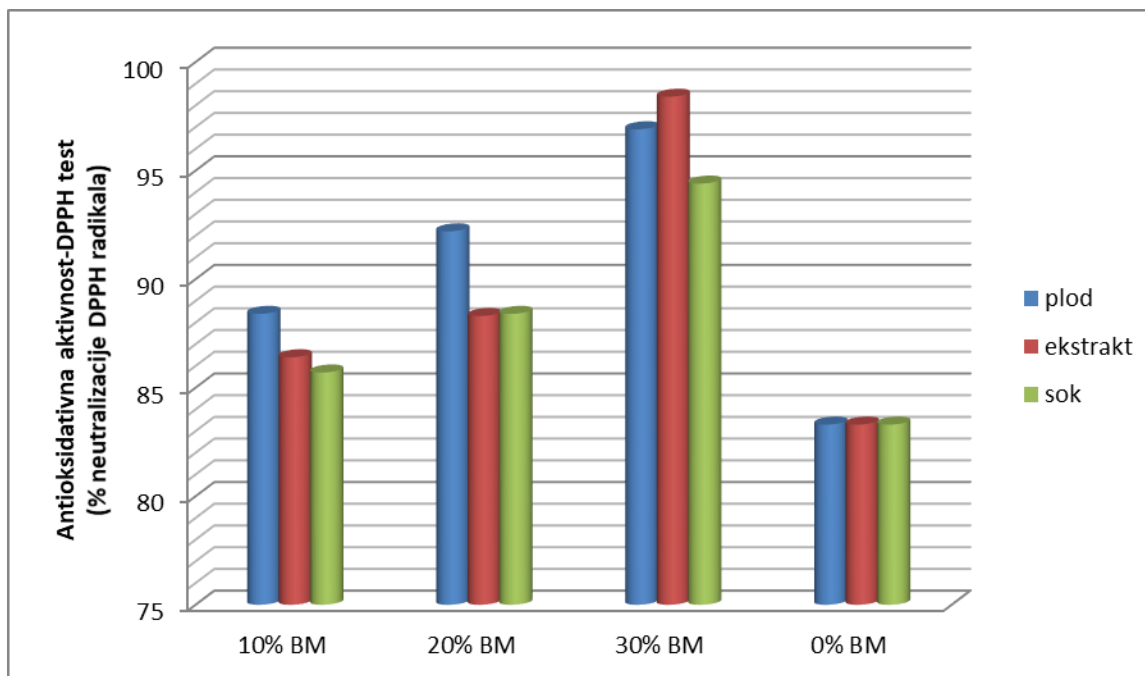
Vrednosti AOA nalaze se u opsegu od 68,4% do 98,4% i generalno, sa povećanjem udela biljnog materijala raste AOA ekstrakata analiziranih keksova. Najveća AOA zabeležena je kod keksa sa učešćem ekstrakta u količini od 30% i u kombinaciji sa udelom integralnog heljdinog brašna u količini od 30%. Ovakvi rezultati u saglasnosti su sa nalazima iz drugih istraživanja. Procenat neutralizacije DPPH radikala ekstrakta kontrolnog uzorka pirinčanih pločica (bez aronije) bio je 12,5% dok se dodavanjem od 2-6% tropa aronije ova vrednost povećala u intervalu od 37,33-71,77% (Ryu et al., 2015). Substitucijom pšeničnog brašna aronijom u prahu (komercijalni proizvod) u nivoima od 0, 5, 10 i 15%, kreirana je receptura za pipremanje mafina gde je sa porastom udela biljnog materijala od 5 do 15% uočeno povećanje antioksidativne aktivnosti određene DPPH od 3,5-5,8 puta (Park i Chung, 2014).



Slika 4.29 Uticaj dodatka BM (biljnog materijala) na antioksidativnu aktivnost ekstrakata keksa određenu DPPH testom pri udelu integralnog heljdinog brašna od 10% (odnosno 5,86% za 20% BM)



Slika 4.30 Uticaj dodatka BM (biljnog materijala) na antioksidativnu aktivnost ekstrakata keksa određenu DPPH testom pri udelu integralnog heljdinog brašna od 20%



Slika 4.31 Uticaj dodatka BM (biljnog materijala) na antioksidativnu aktivnost ekstrakata keksa određenu DPPH testom pri udelu integralnog heljdinog brašna od 30% (odnosno 34,14% za 20% BM)

Uključivanje tropa maline i borovnice (0; 7,5; 15; 22,5 i 30%) u formulaciju keksa uzrokovalo je značajni porast antioksidativne aktivnosti (određene DPPH metodom) koji je postigao najveću vrednost učešćem maksimalnog udela tropa borovnice, čak 38,7 puta veću u odnosu na kontrolni uzorak bez biljnog materijala (Šarić et al., 2015). Karnopp i saradnici (2015) ispitivali su efekte uključivanja tropa grožđa sorte bordo (20,25 i 30%) i integralnog pšeničnog brašna (30,40 i 50%) u formulaciju keksa, na antioksidativnu aktivnost određenu DPPH metodom. Formulacija keksa sa maksimalnim učešćem oba izvora fenolnih jedinjenja ispoljila je najveću antioksidativnu aktivnost, čak 2,27 puta veću od one postignute od strane keksa sa minimalnim udelima. Prilikom ispitivanja biskvita sa dodatkom spršene kore manga (0-20%) ustanovljeno je da porastom masenog udela spršene kore manga, raste antioksidativna aktivnost (određivana DPPH testom) biskvita. Za neutralizaciju 50% DPPH radikala bilo potrebno 250 mg kontrolnog uzorka i samo 4,3 mg uzorka sa 20% spršene kore manga (Ajila et al., 2008). Dodavanje brašna od sirovih, samlevenih leguminoza (dve vrste pasulja, zelenog sočiva i žutog graška) u formulaciju keksa (25, 50, 75 i 100 g/100 g pšeničnog brašna) značajno je uticalo na fizičke i hemijske osobine ovog proizvoda u smislu poboljšanja funkcionalnosti i nutritivnog profila, dok



se antioksidativna aktivnost povećala do dva puta u odnosu na kontrolni uzorak (Zucco et al., 2011). Lipolizovani ekstrakt gljive *Auricularia auricular* (drveno uho) je u vidu brašna dodat pšeničnom brašnu pri dobijanju hleba koji bi mogao biti označen kao potencijalna funkcionalna, zdrava hrana. Analizirana je antioksidativna aktivnost uzoraka hleba sa različitim nivoima supstitucije pšeničnog brašna od 0,3; 6,9 i 12%, pri čemu je uočeno da povećanje procenta liofilizovanog ekstrakta značajno utiče na porast antioksidativne aktivnosti (određivane DPPH testom) (Fan et al., 2006). Cimet u prahu značajno je doprineo povećanju antioksidativne aktivnosti hleba prilikom zamene pšeničnog brašna udelom cimeta u prahu (0-4%) za koga je inače potvrđena visoka antioksidativna aktivnost i visok sadržaj fenola (Dhillon i Amarjeet, 2013).

U ovom radu, prilikom supstitucije belog pšeničnog brašna sa 5,86% integralnog heljdinog brašna i sa 20% biljnog materijala, najveći procenat neutralizacije DPPH radikala postignut je dodatkom ekstrakta i iznosio je 85,4% a najmanji dodatkom ploda (68,5%).

Kada je pšenično brašno supstituisano sa 10% integralnog heljdinog brašna, u slučaju AOA keksa određene DPPH testom, doprinos 10% dodatog biljnog materijala ispoljava se kao 19,5% povećanja pri dodatku ekstrakta i samo oko 3% pri dodatku ploda i soka (u odnosu na uzorke koji ne sadrže aroniju). U uzorcima keksa sa istim nivoom supstitucije integralnim heljdinim brašnom (10%) ali sa povećanim udelom aronije na 30%, neutralizacija DPPH radikala povećana je približno 1,4 puta nezavisno od vrste upotrebljenog biljnog materijala.

Poređenjem AOA keksa pri zameni belog pšeničnog brašna integralnim heljdinim brašnom u iznosu od 20% i nezavisno od vrste biljnog materijala, najmanje vrednosti ispitivanog parametra javile su se pri minimalnom dodatku od 5,86% biljnog materijala i to prosečno 77% neutralizacije DPPH radikala. Daljim rastom udela biljnog materijala na 20% (sve tri forme), ostvareno je povećanje AOA za prosečno 19,73% u odnosu na keks koji nije sadržao biljni materijal. U okviru ove grupacije uzoraka keksa (sa 20% učešća integralnog heljdinog brašna) pri maksimalnom udelu biljnog materijala (34,14%), ekstrakt ispoljava najveći doprinos povećanju antioksidativne aktivnosti od 25,5% povećanja, u odnosu na kontrolni uzorak.

Supstitucijom belog pšeničnog brašna sa 30% integralnog heljdinog brašna, doprinos 10% dodatog biljnog materijala je relativno mali u odnosu na kontrolni uzorak. Nezavisno od vrste biljnog materijala, AOA raste daljim rastom udela aronije na 30%, a maksimalnom povećanju u iznosu od 18,13% doprinelo je učešće ekstrakta u formulaciji keksa.

Supstitucijom belog pšeničnog brašna sa 34,14% integralnog heljdinog brašna i zamenom ukupne mase brašna sa 20% biljnog materijala, najveći procenat neutralizacije DPPH radikala postignut je učešćem ploda aronije.

Zamenom dela mase pšeničnog brašna ekstraktom aronije pri masenom udelu od 30% uz prisustvo heljdinog brašna (30%), izazvalo je povećanje antioksidativne aktivnosti od 18,13% u odnosu na uzorak u kome se nalazi isti procenat heljdinog brašna (bez aronije). To je istovremeno i maksimalno povećanje ovog parametra postignuto dodavanjem biljnog materijala a rezultat je iznosio 98,4% neutralizacije DPPH radikala.

Na osnovu rezultata prikazanih na Slikama 4.29, 4.30 i 4.31 i u Prilogu u Tabeli PT8, može se zaključiti da dodatak ekstrakta, nezavisno od udela heljdinog brašna uglavnom ima najveći uticaj na porast AOA. Doprinos dodatog soka na povećanje antioksidativne aktivnosti uglavnom je u svim kombinacijama najmanji i postiže maksimalnu vrednost pri udelu od 30% (u kombinaciji sa 30% heljdinog brašna) koja iznosi 94,4% neutralizacije DPPH radikala. Ovakvi rezultati najverovatnije su posledica kompleksnosti sastava analiziranih kekseva povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde, čija formulacija uključuje dva različita izvora bioaktivnih jedinjenja uz variranje njihovih masenih udela. Istovremeno se, pored masenog udela, varira i forma upotrebljenog ploda aronije, u vidu samlevenog ploda, ekstrakta i soka. Na antioksidativnu aktivnost kompleksnih sistema mogu uticati različiti faktori (antioksidanti prisutni u sistemu, njihova struktura, priroda slobodnih radikala, specifični mehanizmi reakcija) i posebno međusobna interakcija antioksidanata, na primer međusobna interakcija flavonoida delimično smanjuje ukupnu antioksidativnu aktivnost iz matrice hrane (Hudalگو et al., 2010). Naime, Hidalgo i saradnici (2010) ispitivali su antioksidativnu aktivnost 11 flavonoidnih jedinjenja (DPPH testom i FRAP testom), međusobne interakcije flavonoida i njihov uticaj na antioksidativnu aktivnost, pri čemu je potvrđeno da većina kombinacija flavonoida u njihovim međusobnim interakcijama izaziva antagonizam, odnosno smanjenje antioksidativne aktivnosti (Hidalگو et al., 2010). Takođe, značajna količina antioksidativnih jedinjenja potencijalno zaostaje u ekstrahovanom materijalu (keksu) nakon ekstrakcije zbog mogućih jakih veza sa nerastvornom matricom (Grunovaite, 2016).

Težnja fenolnih jedinjenja da se međusobno kombinuju putem reakcija polimerizacije može dovesti do povećanja složenosti molekula i smanjenja mogućnosti hidroksilnih grupa da dođu u kontakt sa slobodno radikalskim česticama (Pinelo et al., 2004). Naime, potencijalno formiranje

vodoničnih veza između fenolnih jedinjenja može umanjiti dostupnost hidroksilnih grupa, što u konačnom ishodu rezultira smanjenom AOA (Hidalgo et al., 2010). U istraživanju Jakobek i saradnika (2007), iz aronije su izolovane tri frakcije sa različitim sadržajem fenolnih jedinjenja, prva frakcija sadržala je veći deo fenolnih kiselina i flavonola, druga antocijane i treća nerastvorljive fenole i proantocijanidine. Pri ispitivanju međusobnih interakcija fenolnih jedinjenja rezultati su ukazali na smanjenu AOA smeše frakcija (u poređenju sa vrednostima svake smostalne frakcije), odnosno odsustvo očekivane sinergije u delovanju. Razlika između izračunate sumirane vrednosti i merenih antioksidativnih aktivnosti individualnih frakcija bila je veća kada su fenol imali veću koncentraciju što znači da su međusobne interakcije fenolnih jedinjenja izvesnije u koncentrovanijim rastvorima (Jakobek et al., 2007).

Rezultati merenja iz rada Jakobek i saradnika ukazuju da antocijani ispoljavaju najveću vrednost i daju najveći doprinos ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti aronije (56%), doprinos proantocijanidina i nerastvorljivih fenola je 35% a fenolnih kiselina i flavonola samo 9% (Jakobek et al., 2007). Nažalost, antocijani pripadaju grupi najnestabilnijih fitohemikalija, a na njihovu degradaciju i smanjenje sadržaja u hrani mogu uticati razni faktori kao što su temperatura, pH, prisustvo svetlosti ili metalnih jona, metaboličke modifikacije antocijana, posebno, visoka temperatura u procesima proizvodnje proizvoda od aronije (Piasek et al., 2011). Produživanjem vremena izlaganja soka aronije temperaturi od 100,8°C izazvan je znatan pad antioksidativnog potencijala. Sadržaj antocijana nakon jednočasovnog zagrevanja na ovoj temperaturi smanjio se dva puta, a nakon tri sata antocijani su skoro potpuno razgrađeni. Termički tretman je imao manji uticaj na fenolne kiseline (Piasek et al., 2011).

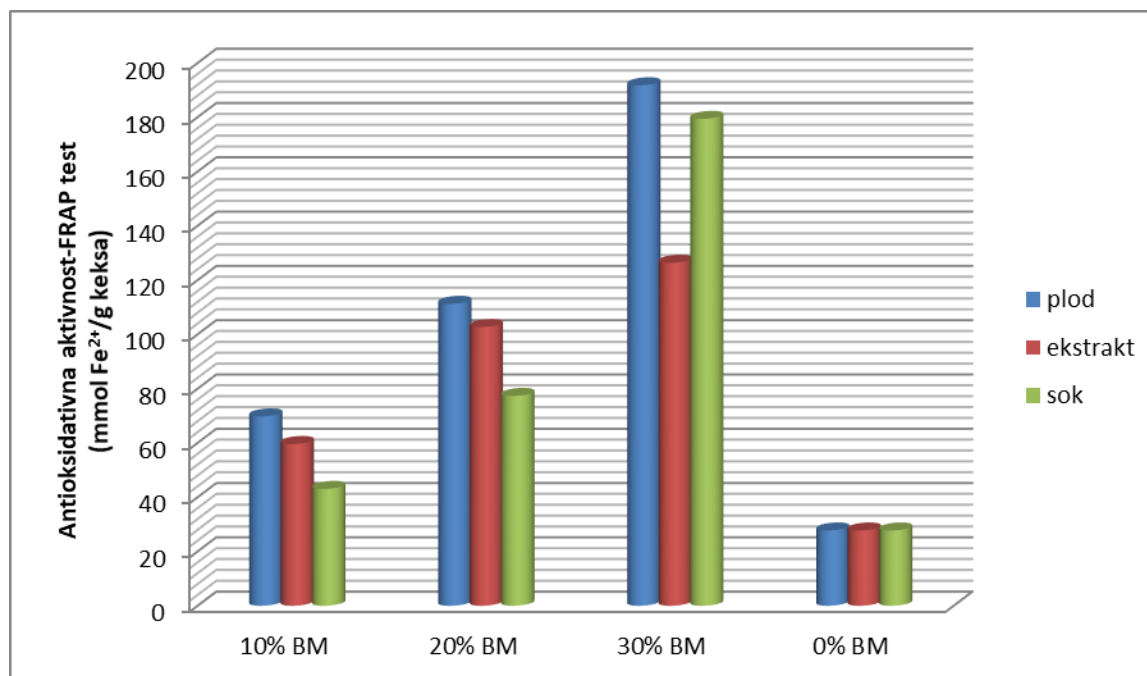
Dok su antocijani i proantocijanidini pretežno smešteni u koži ploda i zaostaju u tropu nakon ceđenja, fenolne kiseline predstavljaju oko 7,2% sadržaja ukupnih fenola i nalaze se u različitim morfološkim delovima ploda odnosno, u mesu i koži ploda (Oszmianski i Lachowicz, 2016). Veći stepen oksidacije fenolnih kiselina tokom sitnjenja odnosno gnječenja ploda pre ceđenja soka ili ekstrakcije verovatno je odgovoran za njihov gubitak, a zna se da su fenolne kiseline pogodan supstrat za delovanje enzima fenoloksidaza i da se lako oksiduju u enzimskim reakcijama (Oszmianski i Lachowicz, 2016).

Dakle, pri dodavanju aronije u vidu ploda, ekstrakta ili soka u formulaciju keksa, mogući su razni ishodi u smislu uticaja na AOA finalnog proizvoda. Očigledno je da će unos ploda

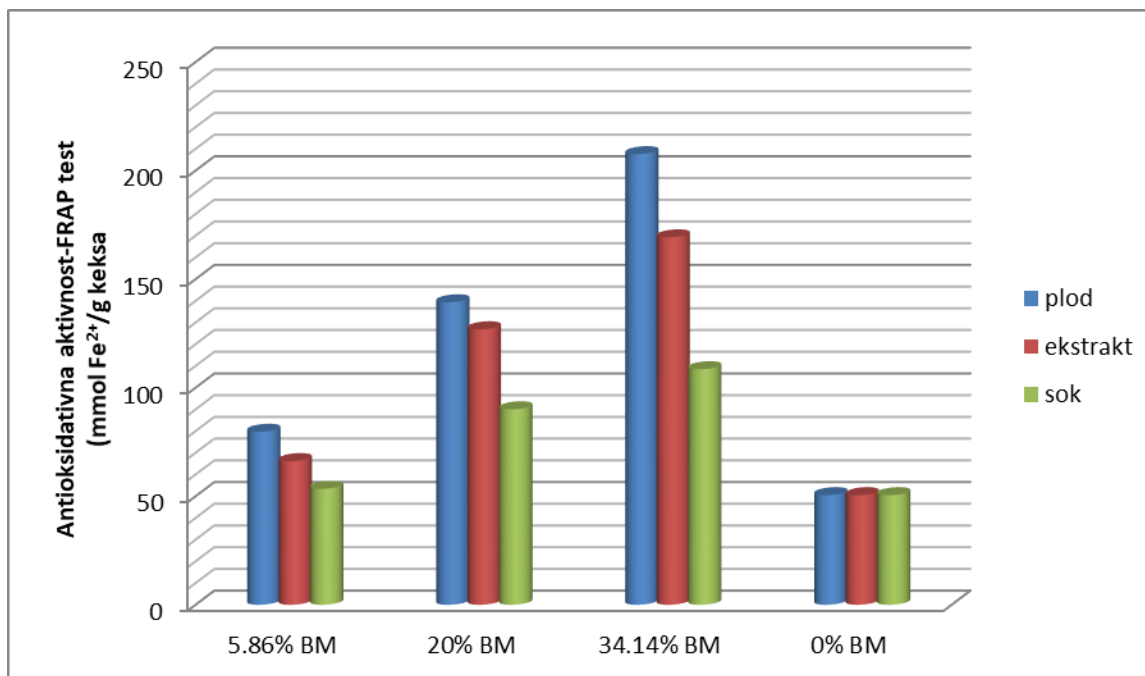
obezbediti veći sadržaj bioaktivnih jedinjenja u odnosu na sok, dok je kod ekstrakta presudan kvantitet bioaktivnih jedinjenja.

#### 4.3.2.4. Antioksidativna aktivnost keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde određena FRAP metodom

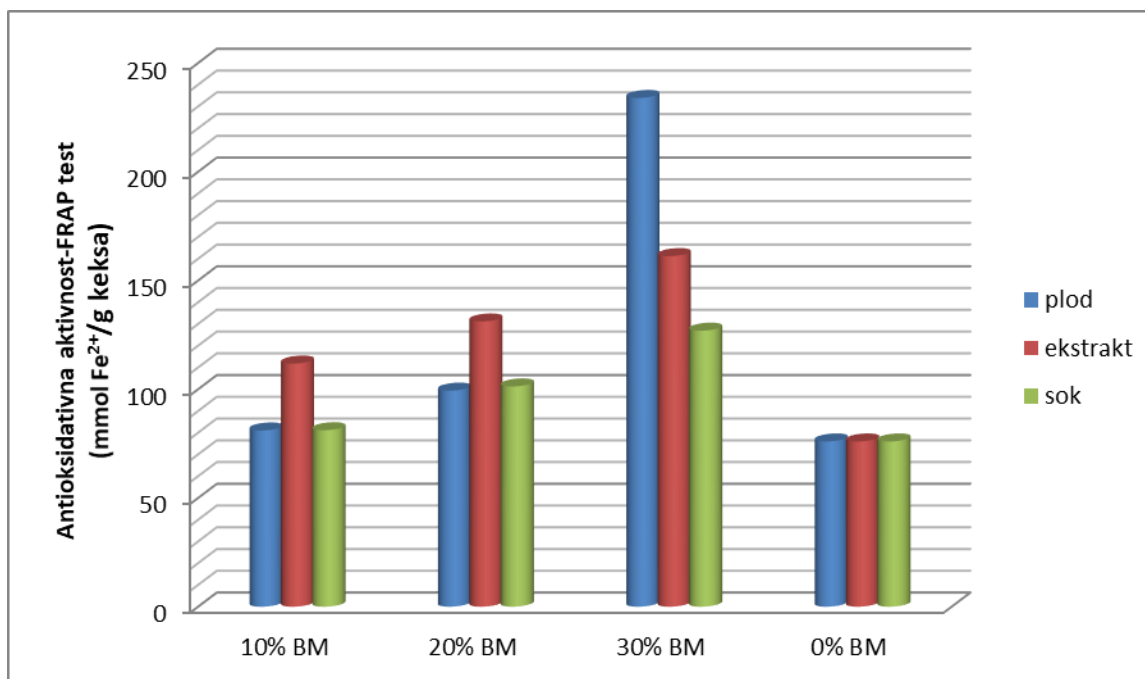
Antioksidativna aktivnost keksa sa dodatkom vrednošću na bazi aronije, određena FRAP metodom, nalazi se u intervalu od 43,07 do 223,94 mmol Fe<sup>2+</sup>/g keksa i raste sa povećanjem udela biljnog materijala. Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti (FRAP) ekstrakata keksa pripremljenih supstitucijom dela belog pšeničnog brašna variranim udelima integralnog heljdinog brašna i/ili različitim vrstama biljnog materijala koji potiče od aronije (u takođe variranim udelima) prikazani su u Prilogu u Tabeli PT9 i na slikama 4.32, 4.33 i 4.34.



Slika 4.32 Uticaj dodatka BM (biljnog materijala) na antioksidativnu aktivnost ekstrakata keksa određenu FRAP testom pri udelu integralnog heljdinog brašna od 10% (odnosno 5,86% za 20% BM)



Slika 4.33 Uticaj dodatka BM (biljnog materijala) na antioksidativnu aktivnost ekstrakata keksa određenu FRAP testom pri udelu integralnog heljdinog brašna od 20%



Slika 4.34 Uticaj dodatka BM (biljnog materijala) na antioksidativnu aktivnost ekstrakata keksa određenu FRAP testom pri udelima integralnog heljdinog brašna od 30% (odnosno 34,14% za 20% BM)

Zamenom udela belog pšeničnog brašna sa 5,86% integralnog heljdinog brašna i zamenom udela ukupne mase brašna sa 20% biljnog materijala AOA određivane FRAP testom zavisi od vrste biljnog materijala koji je korišćen, a redosled rasta vrednosti je plod>ekstrakt>sok. Najmanja vrednost izmerena je u slučaju soka, a manja je za 30,5% od vrednosti koju daje učešće ploda u formulaciji keksa.

Zamenom belog pšeničnog brašna sa 10% integralnog heljdinog brašna i učešćem biljnog materijala sa udelom od 10%, AOA određena FRAP testom znatno se povećava, čak približno 2,5 puta u odnosu na uzorak bez prisustva biljnog materijala i to po redosledu doprinosa povećanju: plod>ekstrakt>sok. Najmanji doprinos povećanju (1,55 puta) potiče od supstitucije sokom aronije. Prisustvom istog udela integralnog heljdinog brašna (10%) i porastom udela biljnog materijala na 30% znatno je povećana redukciona sposobnost keksa određena FRAP testom i to od 4,5-6,5 puta za ekstrakt i plod, respektivno.

Vrednosti AOA određene FRAP testom kada je supstitucija belog pšeničnog brašna integralnim heljdinim brašnom iznosila 20% a varirani udeo biljnog materijala imao najveći opseg vrednosti (5,86%, 20% i 34,14%) omogućile su kompletniju komparaciju. Uključivanje minimalnog udela biljnog materijala uzrokovalo je povećanje od 59,2%, 32,2% i 6,7% u odnosu na uzorak bez aronije za plod, ekstrakt i sok, respektivno. Pozitivan efekat povećanja udela biljnog materijala na rast AOA potvrđen je daljim povećanjem udela aronije na 20%. U ovom slučaju evidentan je značajan porast vrednosti dobijenih FRAP testom od čak 2,7; 2,5 i 1,8 puta, u odnosu na kontrolni uzorak, za plod, ekstrakt, respektivno. Najveće povećanje rezultata FRAP metode u okviru ove grupacije uzoraka keksa (sa 20% učešća integralnog heljdinog brašna), javlja se pri maksimalnom dodatnom udelu biljnog materijala u iznosu od 34,14%. Postignuto je povećanje od 4,1 (plod), 3,4 (ekstrakt) i 2,2 puta (sok) u poređenju sa kontrolnim uzorkom (bez biljnog materijala a sa istim sadržajem integralnog heljdinog brašna).

Supstitucija pšeničnog brašna sa 30% integralnog heljdinog brašna i variranje udela biljnog materijala u iznosu od 10% i 30% još jednom je ukazala da povećanjem udela aronije raste antioksidativna aktivnost. Učešće ekstrakta (10%) u formulaciji keksa doprinelo je povećanju antioksidativne aktivnosti za 47% dok se udelom aronije od 30%, vrednost ispitivane veličine povećala se približno 1,7-3 puta uključivanjem ploda odnosno soka u zames keksa.

Primenom kombinacije od 34,14% integralnog heljdinog brašna i 20% biljnog materijala rezultati AOA određene FRAP testom ukazuju da se najveći doprinos dobija dodatkom ekstrakta koji obezbeđuje za oko 24% veće FRAP vrednosti u odnosu na dodatak soka ili ploda.

Aplikacija biljnog materijala u obliku ploda aronije (30%) daje najveći rezultat AOA merene FRAP testom: 223,94 mmol Fe<sup>2+</sup>/g keksa, što je tri puta veća vrednost od one nađene kod uzorka keksa sa istim udelom heljdinog brašna (30%) ali bez prisustva aronije. Dobijeni rezultati ukazuju da nezavisno od udela heljdinog brašna uglavnom dodatak usitnjenog ploda ima najveći uticaj na porast redukcione sposobnosti ekstrakta keksa. Doprinos dodatog soka na povećanje antioksidativne aktivnosti je najmanji, u poređenju sa plodom i ekstraktom, postiže maksimalnu vrednost pri udelu od 30% (u kombinaciji sa 10% heljdinog brašna) i iznosi 179,4 mmol Fe<sup>2+</sup>/g keksa. Generalno, povećanje učešća biljnog materijala aronije utiče na porast redukcione sposobnosti ekstrakata keksa i to sa najvećim doprinosom ploda, zatim u većem broju slučajeva ekstrakta i u najmanjoj meri soka ploda aronije.

Ovo se uglavnom može pripisati činjenici da se antocijani nalaze pretežno u pokožici ploda gde im je koncentracija najveća u odnosu na ostale morfološke delove ploda aronije. Prelazak antocijana iz pokožice ploda u sok uslovljen je u najvećoj meri oštećenjem pokožice jer usitnjavanje biljnog materijala pre ceđenja soka dovodi do oštećenja ćelijskih zidova čime se olakšava migracija biokomponenti iz ploda u iscedeni sok. Kao i antocijani, polimeri procijanidina (predstavljaju oko 49% sadržaja ukupnih fenola) smešteni su pretežno u pokožici ploda tako da, ako ceo plod nije adekvatno tertian, odnosno zgnječen, nakon ceđenja ova jedinjenja ostaju uglavnom u tropu (Oszmianski i Lachowicz, 2016). Kako plod aplikacijom u keks nosi sa sobom sve svoje morfološke delove i njihove sastojke, a tokom ceđenja soka ili ekstrakcije izvestan deo ovih jedinjenja zaostaje u tropu ili iscrpljenom materijalu, jasno je zašto je doprinos dodatka samlevenog ploda povećanju AOA keksa najveći. Kapci i saradnici (2013) ispitivali su sadržaj polifenolnih jedinjenja i antioksidativnu aktivnost ploda aronije i nekoliko različitih komercijalnih i tradicionalno pripremljenih proizvoda od svežih plodova aronije. Najveći sadržaj fenola nađen je kod tropa aronije koji je sadržao kožu i semenke aronije.

Treba imati u vidu da su u ovom radu, aplikacijom ekstrakta aronije u keks, polifenolna jedinjenja iz ekstrakta bila izložena dvostrukom termičkom tretmanu, prvi put tokom mikrotalasne ekstrakcije, a zatim pri pečenju keksa. Međutim, postoje dokazi prema kojima termička obrada tokom prerade voća ne uzrokuje bitnije promene u sadržaju fenola, a prema

nekima se njihova koncentracija čak i povećava (Skapska et al., 2016). Povećanje sadržaja može se objasniti činjenicom da razaranje sastavnih delova ćelija, do koga dolazi tokom tretmana plodova, dovodi do oslobađanja vezanih fenolnih jedinjenja. Takođe može doći do pojave novih jedinjenja koja poseduju antioksidativnu aktivnost što je slučaj sa melanoidinima visoke molekulske mase nastalim Maillard-ovom reakcijom pri toplotnoj obradi ili tokom skladištenja. Neznatno povećanje sadržaja fenola u uzorcima soka aronije konzervisanim termičkom pasterizacijom može biti posledica formiranja proizvoda Maillard-ove reakcije koji utiču na rezultat Folin-Ciocalteu reakcije (Skapska et al., 2016).

Sa druge strane, razaranje delova ćelija i ćelijskih zidova može dovesti i do oslobađanja oksidativnih i hidrolizirajućih enzima koji imaju mogućnost razgradnje antioksidativnih jedinjenja iz plodova biljke (Kapci et al., 2013). Tako, tehnika konzervisanja nije uticala na promenu sadržaja fenola ili antioksidativnu aktivnost pri izradi soka aronije, ali je konzervisanjem napitka sa CO<sub>2</sub> pod povišenim pritiskom degradacija antocijana bila 2-3 puta manja u poređenju sa termičkom pasterizacijom. Takođe ovim procesom se neznatno smanjuje pH uzorka što dodatno dovodi do stabilizacije antocijana (Skapska et al., 2016). Različite vrednosti sadržaja fenola za sredinu i koru hleba (0,48 i 0,71 mg galne kiseline/g suvog ostatka za sredinu i koru hleba, respektivno) obogaćenog dodatkom sprasjenog đumbira, mogu se objasniti činjenicom da je kora tokom pečenja bila više izložena dejstvu visoke temperature. U takvim uslovima u kori hleba su bile intenzivnije Maillard-ove reakcije čiji su proizvodi, takođe antioksidanti, reagovali sa Folin-Ciocalteu reagensom i uvećali sadržaj (Balestra et al., 2011). Polifenoli aronije mogu se iskoristiti za unapređenje funkcionalnosti proizvoda kao što su flaps i musli od žitarica, međutim kako njihova proizvodnja uključuje kratkotrajno ekstrudiranje i visokotemperaturni termički proces neophodan za postizanje hrskave strukture, autori su predložili da može doći do gubitka bioaktivnih jedinjenja. Zapravo, utvrđeno je da sadržaj procijanidina aronije linearno opada sa povećanjem temperature topljenja (Hirth et al., 2015). Sa druge strane, antioksidativna aktivnost biskvita sa dodatkom biljnih ekstrakata koji su u procesu pečenja bili izloženi temperaturi od 160-180°C nije umanjena pod uticajem visoke temperature što je potvrđeno ispitivanjem određenim testovima (Reddy et al., 2005).

Nalaženje realnih vrednosti antioksidativne aktivnosti može biti ometeno prisustvom ostalih sastojaka iz matrice hrane koja predstavlja heterogenu i kompleksnu smešu jedinjenja, a koje takođe utiču, pored uslova ekstrakcije, na efikasnost ekstrakcije (Michiels et al., 2012). Skapska i



saradnici objavili su formulacije novih napitaka baziranih na aroniji koji sadrže 80% mutnog soka aronije i ekstrakata citrusa, zelenog čaja i koprive, a pripremani su tradicionalno (sa šećerom) i dijetalno sa ekstraktom stevije i 30% manje energetske vrednosti. Antioksidativna aktivnost merena DPPH i ORAC testom bila je za 14%, odnosno za 20% veća (tradicionalna priprema) i za oko 16% veća (dijetalna priprema) od antioksidativnih vrednosti individualnih komponenti što ukazuje na sinergijsko delovanje aronije i dodatih ekstrakata (Skapska et al., 2016). Obogaćivanje soka aronije ekstraktima znatno povećava antioksidativnu aktivnost novog napitka ali zamena šećera u dijetalnoj verziji napitka smanjuje mu antioksidativni potencijal i dovodi do veće degradacije antocijanina tokom procesa pripreme i konzervisanja napitka. Ovo se može objasniti „zaštitnim efektom“ šećera u odnosu na degradaciju antocijana tokom tehnoloških procesa, jer je uočeno da supstance kao što je šećer reaguju sa peroksid radikalima koji bi u suprotnom reagovali sa antocijanima (Skapska et al., 2016)

#### **4.3.3. Optimizacija formulacije keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde primenom metode odzivnih površina**

Uptreba eksperimentalnog dizajna prilikom razvoja novih proizvoda sa dodatkom vrednošću sve je prisutnija u savremenoj proizvodnji. Primena metode odzivnih površina (RSM) pri formulaciji sastava proizvoda olakšava ispitivanje efekata ne samo pojedinačnih procesnih parametara već i njihovih interakcija na kvalitet finalnog proizvoda (Karnopp et al., 2015). Pored toga, na ovaj način značajno se smanjuju vreme i troškovi proizvodnog procesa.

Karnopp i saradnici (2015) ispitivali su uticaj dodatka integralnog heljdinog brašna i tropa organski gajenog grožđa sorte Bordo na senzorna, fizičko-hemijska i funkcionalna svojstva keksa primenom metode odzivnih površina. Ova statistička tehnika primenjiva je i prilikom razvoja formulacije bezglutenskog keksa na bazi kinoe uz optimizaciju sastava smeše kukuruznog skroba, brašna i ljuspisca kinoe (Brito et al., 2015). Šarić i saradnici (2016) su koristili suvi i sprášeni trop maline i borovnice u formulaciji bezglutenskog keksa sa dodatkom vrednošću, a upotreba Simplex-lattice mixture eksperimentalnog dizajna omogućila im je dobijanje proizvoda sa optimalnim senzornim osobinama, nutritivnim profilom i antioksidativnom aktivnošću. Ovakav pristup primenjen je i u razvoju formulacije keksa na bazi brašna sa dodatkom kore guave (Bertagnolli, et al., 2014) i optimizaciji proizvodnog procesa

bezglutenskog hleba sa dodatkom tropa pomorandže (O'Shea, et al., 2015). Metoda odzivnih površina primenjena je i pri optimizaciji formulacije i procesnih parametra u proizvodnji bezglutenskog hleba od sorguma (kineska šećerna trska) (Emire i Tiruneh, 2012), kao i pri optimizaciji formulacije kod dobijanja niskokaloričnih voćnih pločica od papaje (Kulshrestha et al., 2012).

U ovom radu, višekriterijumski pristup optimizaciji primenom metode odzivnih površina i funkcije poželjnosti, omogućio je formulaciju keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde. Cilj optimizacije bio je definisanje količine i vrste funkcionalnih dodataka, heljdinog brašna i biljnog materijala u vidu ploda, ekstrakta i soka aronije, radi dobijanja proizvoda sa maksimalnim sadržajem bioaktivnih jedinjenja.

Kao nezavisne numeričke varijable u eksperimentalnom dizajnu varirani su udeli integralnog heljdinog brašna (10, 20 i 30%) i biljnog materijala (10, 20 i 30%), dok je kao nezavisna kategorička varijabla varirana vrsta biljnog materijala (samleveni plod, sok ili ekstrakt aronije dobijen pod predloženim optimalnim uslovima mikrotalasne ekstrakcije). Kao zavisne promenljive praćene su veličine koje ukazuju na potencijalna funkcionalna svojstva proizvoda: ukupni sadržaj fenola, flavonoida i antioksidativna aktivnost u etanolim ekstraktima uzoraka keksa kao finalnog proizvoda. Variranjem udela integralnog heljdinog brašna na tri nivoa bez dodataka biljnog materijala dobijeni su kontrolni uzorci. Optimalna količina i vrsta funkcionalnih sastojaka (integralnog heljdinog brašna, količine samlevenog ploda, soka ili ekstrakta aronije) određena je primenom funkcije poželjnosti (eng. desirability function). Uticaj formulacije keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde na praćena potencijalna funkcionalna svojstva prikazani su u Tabeli 4.15, kojoj su priključeni i rezultati za kontrolne uzorke. Kako eksperimentalni dizajn predviđa realizaciju pojedinih eksperimenata u pet ponavljanja (kombinacija sa 20% heljdinog brašna i 20% aronije u obliku ploda, ekstrakta ili soka) dobijeni rezultati dati su kao srednja vrednost ovih pet vrednosti.

Generalno, keksovi supstituisani različitom vrstom i masenim udelom biljnog materijala znatno se razlikuju po vrednostima ispitivanih parametara u odnosu na one kod kojih je izvršena samo supstitucija belog pšeničnog brašna različitim udelima integralnog heljdinog brašna. Dakle, prisutan je značajan uticaj aronije na svojstva keksa, što je očekivano obzirom da ova biljka poseduje visok sadržaj fenolnih jedinjenja i veoma visoku antioksidativnu aktivnost.

Tabela 4.15 Uticaj formulacije keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde na potencijalna funkcionalna svojstva keksa

Redni br.	Udeo heljadinog brašna, % (X <sub>1</sub> )	Udeo biljnog materijala, % (X <sub>2</sub> )	Vrsta biljnog materijala, (X <sub>3</sub> )	Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja, mg GAE/g keksa	Ukupan sadržaj flavonoida, mg RE/g keksa	AOA, % neutralizacije DPPH	AOA FRAP, μmol Fe <sup>2+</sup> /mg
1	30	30	plod	4,48±0,02	2,39±0,08	96,9±0,67	223,94±0,7
2	20	20	sok	3,40±0,03	1,71±0,01	87,4±0,61	85,04±0,8
3	10	30	ekstrakt	4,02±0,10	2,26±0,03	91,6±0,82	126,40±1,0
4	10	10	ekstrakt	3,16±0,09	1,66±0,01	79,0±3,14	59,62±1,9
5	20	20	plod	4,26±0,03	1,81±0,01	91,8±1,66	146,30±1,2
6	20	34,14	sok	3,98±0,04	2,24±0,01	90,9±0,96	108,50±1,3
7	20	20	plod	3,85±0,05	1,75±0,08	82,1±0,39	121,06±3,8
8	20	34,14	plod	4,63±0,15	1,97±0,07	84,6±0,80	207,56±0,6
9	20	20	plod	3,89±0,02	1,92±0,06	89,1±0,95	148,76±1,2
10	10	30	plod	4,76±0,01	2,21±0,01	90,5±2,12	191,78±1,6
11	20	20	ekstrakt	3,77±0,03	1,83±0,02	87,0±0,22	125,58±0,6
12	20	20	plod	4,58±0,01	1,90±0,07	89,9±0,32	134,33±1,2
13	20	20	ekstrakt	3,92±0,01	2,04±0,01	91,0±0,99	127,63±0,4
14	5,86	20	ekstrakt	3,82±0,01	2,15±0,02	85,4±0,67	102,75±1,5
15	20	20	sok	4,10±0,01	1,99±0,07	84,6±0,64	91,25±0,9
16	30	10	ekstrakt	3,52±0,01	2,07±0,03	86,4±0,73	111,79±1,2
17	20	20	ekstrakt	3,78±0,04	1,91±0,03	86,2±1,45	129,98±1,1
18	5,86	20	plod	3,74±0,05	1,94±0,03	68,5±1,28	111,26±0,8
19	20	5,86	ekstrakt	3,81±0,02	1,95±0,06	79,7±0,54	66,17±1,5
20	10	30	sok	4,18±0,01	2,19±0,01	88,8±0,49	179,40±1,1
21	20	20	sok	3,27±0,06	1,88±0,09	84,1±1,62	89,16±2,2
22	10	10	sok	3,05±0,06	1,48±0,02	68,4±1,91	43,07±1,0
23	20	34,14	ekstrakt	4,15±0,02	2,34±0,03	92,0±1,51	169,24±0,3
24	20	20	sok	3,76±0,01	1,88±0,00	87,8±1,66	92,54±0,4
25	20	5,86	sok	2,94±0,06	1,58±0,02	76,8±0,88	53,40±1,5
26	34,14	20	sok	3,70±0,02	2,08±0,03	88,4±1,69	101,29±0,8
27	20	5,86	plod	2,48±0,00	1,44±0,01	74,6±0,19	79,69±1,3
28	30	10	sok	3,08±0,09	1,83±0,03	85,7±0,98	81,16±1,4
29	20	20	sok	4,12±0,02	1,86±0,09	87,3±0,86	92,19±1,0
30	20	20	ekstrakt	4,23±0,02	2,09±0,04	88,9±1,21	120,06±3,4
31	34,14	20	ekstrakt	4,19±0,01	2,26±0,01	88,3±0,84	131,16±1,4
32	30	30	sok	4,51±0,01	2,18±0,03	94,4±0,67	126,93±0,9
33	20	20	plod	4,26±0,05	1,92±0,02	85,9±0,73	146,15±2,1
34	20	20	ekstrakt	4,04±0,02	2,05±0,04	85,6±0,30	131,16±1,4
35	30	30	ekstrakt	4,19±0,02	2,51±0,03	98,4±0,87	161,20±1,4
36	5,86	20	sok	3,43±0,09	1,75±0,06	78,7±1,18	77,34±0,5
37	30	10	plod	2,81±0,01	1,74±0,05	88,4±0,43	81,04±0,8
38	34,14	20	plod	4,18±0,12	2,06±0,07	92,2±1,15	99,35±2,0
39	10	10	plod	2,29±0,05	1,26±0,03	68,5±1,28	69,77±1,3
40	10	/	/	2,09±0,05	1,02±0,01	66,3±0,45	27,75±0,4
41	20	/	/	2,24±0,05	1,43±0,01	73,3±1,39	50,05±1,7
42	30	/	/	2,67±0,03	1,64±0,03	83,3±1,77	75,99±0,7

Primenom višestruke nelinearne regresione analize eksperimentalnih podataka dobijene su odgovarajuće jednačine odziva za praćenje uticaja nezavisnih varijabli na ukupan sadržaj fenola, ukupan sadržaj flavonoida i antioksidativnu aktivnost određenu DPPH i FRAP metodom u dobijenom keksu povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde. Kvadratni model primenjen je za predviđanje i opisivanje rezultata svih ispitivanih odziva. U Tabeli 4.16 date su regresione jednačine modela za praćene odzivne veličine.

Statistička značajnost i adekvatnost predloženih modela procenjena je primenom analize varijanse (ANOVA), a sumirani rezultati analize za sve kvadratne modele predstavljeni su u Tabeli 4.17.

Relativno visoke vrednosti koeficijenta determinacije  $R^2$  ( $R^2 > 0,8$ ) i prilagođenih koeficijenata detrmnacije  $Adj R^2$  ( $Adj R^2 > 0,75$ ) za sve ispitivane odzivne veličine ukazuju na adekvatnost predloženih modela za sve odzive, odnosno na relativno dobro fitovanje modela sa eksperimentalnim podacima. Predviđeni koeficijenti determinacije  $Predict R^2$  usklađeni su sa prilagođenim koeficijentima determinacije  $Adj R^2$  (međusobno razlika nije veća od 0,2) kod svih odzivnih veličina što ilustruje dobro fitovanje eksperimentalnih podataka u kvadratne polinomne jednačine. Statistički neznačajne vrednosti za odstupanje od modela (*Lack of Fit*) ukazuju da su u slučaju predloženih kvadratnih jednačina za modelovanjesvih odziva, eksperimentalni podaci adekvatno uklopljeni i minimalno odstupaju od izračunatih podataka. Značajnost i adekvatnost modela, ocenjeni su i upotrebom  $F$ -vrednosti i  $p$ -vrednosti. Predloženi modeli za sve odzive ispoljili su veliku statističku značajnost ( $p < 0,0001$ ) i relativno visoke  $F$ -vrednosti.

Statistička značajnost i adekvatnost predloženih modela procenjena je primenom analize varijanse (ANOVA), a sumirani rezultati analize za sve kvadratne modele predstavljeni su u Tabeli 4.18.

Tabela 4.16 Jednačine modela za praćene odzivne veličine

Odzivna veličina	Jednačina modela
Plod	
Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja	$Y_{\text{TPC}}=0,82+0,05X_1+0,17X_2-6,99 \cdot 10^{-4}X_1X_2-7,92 \cdot 10^{-4}X_1^2-1,56 \cdot 10^{-3}X_2^2$
Ukupni sadržaj flavonoida	$Y_{\text{TFC}}=1,06-3,41 \cdot 10^{-3}X_1+0,04X_2-6,91 \cdot 10^{-4}X_1X_2+6,88 \cdot 10^{-4}X_1^2+8,58 \cdot 10^{-5}X_2^2$
Antioksidativna aktivnost (DPPH)	$Y_{\text{DPPH}}=50,08+1,18X_1+0,99X_2-0,02X_1X_2$
Antioksidativna aktivnost (FRAP)	$Y_{\text{FRAP}}=18,37+0,28X_1+5,52X_2+2,47 \cdot 10^{-3}X_1X_2$
Ekstrakt	
Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja	$Y_{\text{TPC}}=1,92+0,06X_1+0,11X_2-6,99 \cdot 10^{-4}X_1X_2-7,92 \cdot 10^{-4}X_1^2-1,56 \cdot 10^{-3}X_2^2$
Ukupni sadržaj flavonoida	$Y_{\text{TFC}}=1,47-3,55 \cdot 10^{-3}X_1+0,03X_2-6,91 \cdot 10^{-4}X_1X_2+6,88 \cdot 10^{-4}X_1^2+8,58 \cdot 10^{-5}X_2^2$
Antioksidativna aktivnost (DPPH)	$Y_{\text{DPPH}}=64,03+0,66X_1+0,95X_2-0,02X_1X_2$
Antioksidativna aktivnost (FRAP)	$Y_{\text{FRAP}}=11,23+1,91X_1+3,60X_2+2,47 \cdot 10^{-3}X_1X_2$
Sok	
Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja	$Y_{\text{TPC}}=1,52+0,05X_1+0,12X_2-6,99 \cdot 10^{-4}X_1X_2-7,92 \cdot 10^{-4}X_1^2-1,56 \cdot 10^{-3}X_2^2$
Ukupni sadržaj flavonoida	$Y_{\text{TFC}}=1,18-3,38 \cdot 10^{-3}X_1+0,03X_2-6,91 \cdot 10^{-4}X_1X_2+6,88 \cdot 10^{-4}X_1^2+8,58 \cdot 10^{-5}X_2^2$
Antioksidativna aktivnost (DPPH)	$Y_{\text{DPPH}}=54,83+0,89X_1+1,04X_2-0,02X_1X_2$
Antioksidativna aktivnost (FRAP)	$Y_{\text{FRAP}}=20,44+0,94X_1+2,45X_2+2,47 \cdot 10^{-3}X_1X_2$

Tabela 4.17 Analiza varijanse

Model odzivne veličine	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	F-vrednost	p-vrednost <sup>a</sup>	R <sup>2</sup>	Adj R <sup>2</sup>	Predicted R <sup>2</sup>
TPC							
Model	10,47	11	11,11	< 0,0001	0,8191	0,7454	0,6379
Total	12,78	38					
Ostatak	2,31	27					
Odstupanje od modela (Lack of Fit)	1,19	15	0,85	0,6265			
TFC							
Model	2,27	11	14,12	< 0,0001	0,8519	0,7916	0,6709
Total	2,67	38					
Ostatak	0,40	27					
Odstupanje od modela (Lack of Fit)	0,28	15	1,95	0,1250			
DPPH							
Model	1554,12	9	13,61	< 0,0001	0,8086	0,7492	0,6623
Total	1922,03	38					
Ostatak	367,91	29					
Odstupanje od modela (Lack of Fit)	278,44	17	2,20	0,0851			
FRAP							
Model	59180,60	9	32,08	< 0,0001	0,9087	0,8804	0,7983
Total	65124,97	38					
Ostatak	5944,37	29					
Odstupanje od modela (Lack of Fit)	5286,88	17	5,68	0,0620			

<sup>a</sup>  $p < 0,01$  veoma značajno;  $0,01 \leq p < 0,05$  značajno;  $p \geq 0,05$  nije značajno

U cilju unapređenja funkcionalnosti keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde, sa aspekta postizanja većeg antioksidativnog potencijala i maksimiziranja sadržaja bioaktivnih jedinjenja, primenjena je optimizacija formulacije ovog proizvoda primenom funkcije poželjnosti. Definisani su ciljevi i kriterijumi optimizacije kao i njihove značajnosti. Pored nivoa značajnosti faktora, definisani su i nivoi značajnosti odzivnih veličina shodno postavljenim kriterijumima optimizacije.

Tabela 4.18 Kriterijumi i ciljevi za svaki faktor i odziv

Faktori i odzivne veličine	Niži nivo	Viši nivo	Značajnost	Kriterijum		Softverski predviđene vrednosti		Dobijene vrednosti	
				Optimalna formulacija	Ekonomski opravdana formulacija <sup>a</sup>	Optimalna formulacija	Ekonomski opravdana formulacija <sup>a</sup>	Optimalna formulacija	Ekonomski opravdana formulacija <sup>a</sup>
Udeo integralnog heljdnog brasna, %	10	30	3	U opsegu	Min	30	13,98	\	\
Udeo biljnog materijala, %	10	30	3	U opsegu	Min	30	24,07	\	\
Vrsta biljnog materijala	plod	ekstrakt	3	U opsegu	U opsegu	plod	ekstrakt	\	\
Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja, mg galne kiseline/g keksa	2,29	4,76	3	Max	Max	4,66	4,07	4,38	4,15
Ukupni sadržaj flavonoida, mg rutina/g keksa	1,26	2,51	3	Max	Max	2,23	2,01	2,35	2,15
Neutralizacija DPPH radikala, %	68,38	98,39	5	Min	Min	95,79	88,95	96,18	89,35
FRAP vrednost, $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$	43,07	223,94	5	Max	Max	194,75	125,49	217,60	123,54

<sup>a</sup>Maksimiziranje sadržaja fenolnih i flavonoidnih jedinjenja i antioksidativna aktivnost uz istovremeno minimiziranje udela integralnog heljdnog brašna i biljnog materijala

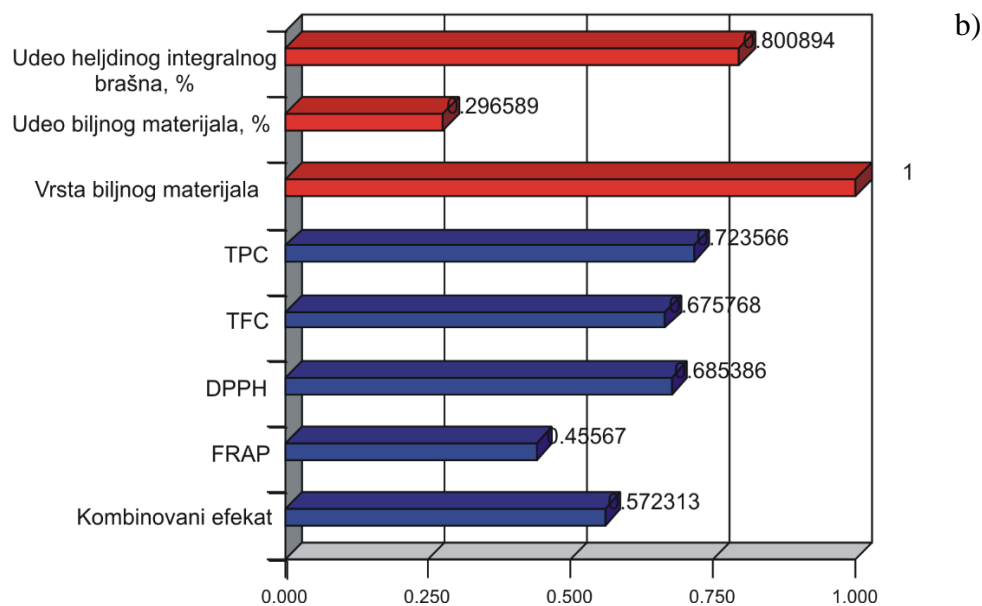
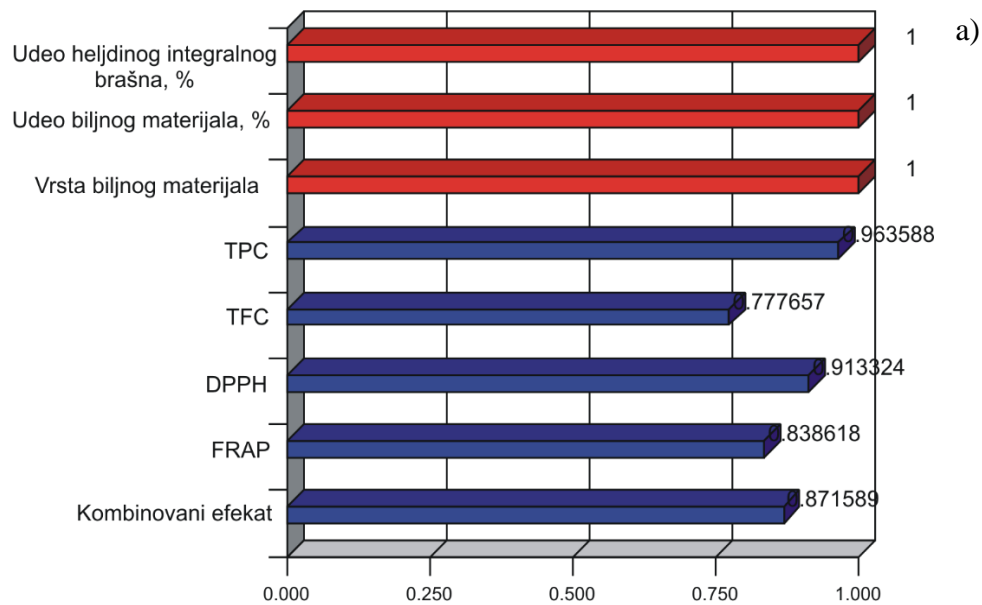
Funkcija poželjnosti predstavlja tehniku višekriterijumskog odlučivanja kojom se ispitivane odzivne veličine transformišu u individualne funkcije poželjnosti (sa vrednostima između 0 i 1). Kombinacija faktora kojom se ostvaruje najveća vrednost ukupne funkcije poželjnosti  $D$  (geometrijska sredina pojedinačnih funkcija) predstavlja optimalno rešenje (Šarić, 2016a).

U tabeli 4.18 prikazani su kriterijumi i ciljevi za svaki faktor i odziv, kao i rezultati optimizacije, odnosno vrednosti ispitivanih odziva pri predloženim uslovima. Cilj optimizacije bio je definisanje recepture keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde sa najpovoljnijim funkcionalnim karakteristikama u smislu maksimalne antioksidativne aktivnosti, ali i što većeg sadržaja polifenolnih bioaktivnih jedinjenja. Iz tog razloga je odzivima koji se odnose na antioksidativnu aktivnost dodeljen najveći nivo značajnosti (5). Vrednosti numeričkih nezavisnih varijabli (udeo integralnog heljdinog brašna i udeo biljnog materijala) održavane su u ispitivanom opsegu (prilikom određivanja optimalne recepture) ili minimizirane (prilikom određivanja ekonomski prihvatljive recepture). Vrsta biljnog materijala kao nezavisna kategorična varijabla postavljena je u opsegu pri dobijanju i optimalnih i ekonomskih uslova.

Kao optimalno rešenje ( $D=0,8716$ ) predložena je formulacija keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde sa 30% integralnog heljdinog brašna i 30% ploda aronije. Promenom zadatih parametara optimizacije u cilju predlaganja formulacije za dobijanje keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde kojom bi bilo moguće dobiti keks sa što većim sadržajem fenolnih i flavonoidnih jedinjenja i AOA, ali uz istovremeno minimiziranje udela integralnog heljdinog brašna i biljnog materijala predložena je ekonomski opravdana formulacija za dobijanje keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde. Ova formulacija predviđa da bi se keks zadovoljavajućih funkcionalnih karakteristika mogao dobiti korišćenjem 13,98% integralnog heljdinog brašna i 24,07% biljnog materijala u obliku ekstrakta ploda aronije. Ovo znači da bi se keks sa samo 14,5% manje ukupnog sadržaja fenola i 10,9% manje ukupnog sadržaja flavonoida mogao proizvesti upotrebom 2,15 puta manje količine integralnog heljdinog brašna i 1,25 puta manje biljnog materijala. Istovremeno bi AOA tako dobijenog proizvoda bila smanjena za 7,7% (DPPH test), odnosno 55,2% (FRAP test).

Na slici 4.35 dat je grafički prikaz pojedinačnih i kombinovanih funkcija poželjnosti za optimalno i ekonomski najprihvatljivije rešenje





Slika 4.35 Grafički prikaz pojedinačnih i kombinovanih funkcija poželjnosti za predloženu optimalnu (a) i ekonomski najprihvatljiviju (b) formulaciju keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde

## 5. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom radu može se zaključiti sledeće:

- Ispitivanjem uticaja procesnih parametara mikrotalasne ekstrakcije ploda aronije na prinos ekstraktivnih supstanci, ukupan sadržaj fenola, ukupan sadržaj flavonoida kao i na AOA dobijenih ekstrakata variranjem mikrotalasne snage (300, 450 i 600 W), koncentracije etanola (25, 50 i 75%) i vremena trajanja ekstrakcije (5,10 i 15 min) vrednosti ispitivanih veličina u velikoj meri zavise od uslova ekstrakcije i nalaze se u sledećim intervalima: prinos ekstraktivnih supstanci: 11,1-20,3 g ekstraktivnih supstanci/100 g svežeg biljnog materijala; ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja: 31,6-38,8 mg galne kiseline/g suvog ostatka ekstrakta; uupni sadržaj flavonoida: 12,9-23,2 mg rutina/g suvog ostatka ekstrakta; AOA (DPPH metoda): 45,6-27,73 DPPH mg/cm<sup>3</sup> (EC<sub>50</sub>) odnosno, 0,0219-0,0361 A<sub>AE</sub>, cm<sup>3</sup>/mg; AOA (FRAP metoda): 8,92-13,61 μmol Fe<sup>+2</sup>/mg suvog ostatka ekstrakta.
- Nezavisno od vrednosti primenjene mikrotalasne snage i vremena trajanja ekstrakcije, sa porastom koncentracije etanolnog rastvora od 25% do 50% rastu i vrednosti ispitivanih veličina i dostižu najveću vrednost primenom 50%-tnog etanolnog rastvora (dok se rastvor sa najmanjim udelom etanola pokazao kao najmanje efikasan za mikrotalasnu ekstrakciju ploda aronije). Dalje povećanje koncentracije etanolnog rastvora na 75% (v/v) izaziva smanjenje vrednosti ispitivanih veličina. Ova pojava je posledica promene polarnosti rastvarača čime se indukuje otpor difuziji uzrokovanoj koagulacijom proteina usled povećane temperature sistema.
- Rezultati takođe ukazuju da porast vrednosti mikrotalasne snage pozitivno utiče na vrednosti ispitivanih veličina, u smislu povećanja, nezavisno od vrednosti koncentracije etanola i ekstrakcionog vremena i dostižu maksimalnu vrednost delovanjem snage mikrotalasa od 600 W.
- Sa povećanjem trajanja ekstrakcionog procesa (od 5 do 15 min) raste vrednost ispitivanih veličina nezavisno od vrednosti ostalih ekstrakcionih parametara sa maksimalnom vrednošću nakon ekstrakcionog vremena od 15 minuta. Ovo se može objasniti činjenicom da se angažovanjem veće snage mikrotalasa i njihovim dužim uticajem na biljni materijal intezivira zagrevanje rastvarača, a substrat dobija više energije čime se izaziva pucanje ćelijskih zidova biljnog materijala i oslobađanje ekstraktivnih supstanci.

- Ustanovljena je dobra korelacija rezultata AOA dobijenih DPPH i FRAP testom ( $R^2 = 0,822$ ). Generalno, veću antioksidativnu aktivnost ispoljili su ekstrakti dobijeni ekstrakcijom mikrotalasima veće snage i dužim vremenom ekstrakcije.
- Primenom višestruke nelinearne regresione analize eksperimentalnih podataka dobijenih  $3^3$  faktorijalnim dizajnom eksperimenta dobijene su kvadratne polinomne jednačine kojima se opisuje uticaj nezavisno promenljivih na ispitivane odzivne veličine.
- Svi predloženi modeli su statistički značajni, sa vrednostima statističkih parametara ( $R^2$ , Adj  $R^2$  i Predicted $R^2$ , CV) koji ukazuju na adekvatnost predloženih modela i relativno dobro fitovanje modela sa eksperimentalnim podacima.
- Ekstrakciono vreme predstavlja faktor sa najvećom značajnošću kod svih ispitivanih odziva.
- U cilju racionalizacije i smanjenja troškova procesa mikrotalasne ekstrakcije ploda aronije izvršena je simultana, multikriterijumska numerička optimizacija pri čemu su predložena dva seta uslova, optimalni (50,84%, 556,5 W i 15 min) i ekonomski najisplativiji (43,03%, 417,5 W i 11,24 min).
- Optimizacija procesa ekstrakcije bazirana na ekonomičnosti i isplativosti procesa obezbedila bi smanjenje cene koštanja finalnog proizvoda (ekstrakta) koji sadrži i dalje relativno visoku količinu ciljanih bioaktivnih jedinjenja (redukovanjem potrošnje energije i rastvarača).
- Dobra saglasnost predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti, reproduktivnost, pouzdanost i tačnost modela ANN potvrđeni su visokim vrednostima koeficijenta deteminacije ( $R^2=0,910$ ) i niskim vrednostima MRPD za praćene odzive, a model se može smatrati pouzdanim u okviru određenih nivoa i opsega ekstrakcionih parametara.
- ANN-GA model predviđa po jedan set optimalnih uslova za svaku praćenu odzivnu veličinu. Za sve ispitivane odzive optimalna vrednost ekstrakcionog vremena iznosila je oko 15 min, koncentracija etanola bila je u opsegu od 51-55% dok se optimalna vrednost mikrotalasne snage najviše razlikovala za pojedinačne slučajevne odzivnih veličina (441-600 W).
- Na osnovu statističkih indikatora koeficijenta deteminacije  $R^2$  i vrednost srednjeg relativnog procenta devijacije (MRPD) potvrđeno je da se za optimizaciju uslova mikrotalasne ekstrakcije ploda aronije mogu koristiti obe metodologije (RSM i ANN-GA).
- Ekonomski uslovi predloženi optimizacijom RSM (43,03%, 417,15 W, 11,24 min) prihvaćeni su kao optimalni u daljem toku rada. Prednost predloženih ekonomskih uslova RSM

metodom oglada se u mogućnosti primene jedinstvenog seta uslova kojim bi se istovremeno postigle maksimalne moguće vrednosti svih praćenih odzivnih veličina.

- Primena RSM prilikom dizajna ekperimenta omogućila je formulaciju keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde, pri čemu su kao nezavisne numeričke varijable varirani udeli integralnog heljdinog brašna i biljnog materijala (5,86; 10; 20; 30 i 34,14%), dok je kao nezavisna kategorička varijabla varirana vrsta biljnog materijala (samleveni plod, sok ili ekstrakt aronije dobijen pod predloženim optimalnim uslovima mikrotalasne ekstrakcije iz prvog dela rada). Kao zavisne promenljive praćene su veličine koje ukazuju na potencijalna funkcionalna svojstva: ukupni sadržaj fenola, flavonoida i antioksidativna aktivnost u etanolim ekstraktima keksa kao finalnog proizvoda.

- Porastom udela integralnog heljdinog brašna u kontrolnim uzorcima keksa (uzorcima bez aronije) značajno rastu vrednosti svih ispitivanih veličina uzoraka keksa.

- Aronija je dobar izvor polifenolnih jedinjenja i zadržava to svojstvo kada se aplicira u neki od prehrambenih proizvoda. Pored variranja masenog udela, značajan efekat na dobijene rezultate potiče usled razlike u hemijskom sastavu upotrebljenih vrsta biljnog materijala (plod, ekstrakt i sok).

- Ukupan sadržaj fenola kod uzoraka koji sadrže biljni materijal kreće se u intervalu od 2,29 do 4,76 mg galne kiseline/g keksa i raste sa porastom udela biljnog materijala, nezavisno od vrste upotrebljenog biljnog materijala. Maksimalna vrednost sadržaja ukupnih fenola postignuta je pri 30% udela ploda što je približno 2,3 puta veća vrednost (u odnosu na kontrolni uzorak bez biljnog materijala).

- Sadržaj flavonoida u keksu povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde kretao se u granicama od 1,26 do 2,51 mg rutina/g keksa. Porastom udela aronije u formulaciji keksa uglavnom je postignuto konstantno povećanje sadržaja flavonoida, bez obzira na variranje udela prisutnog heljdinog brašna iz čega proizilazi da aronija obezbeđuje dominantan doprinos povećanju vrednosti sadržaja flavonoida u finalnom proizvodu. Sadržaj flavonoida povećan je ukupno 1,52 puta u odnosu na kontrolni uzorak. Pri svim vrednostima udela biljnog materijala, najznačajniji doprinos sadržaju flavonoida u keksu potiče od ekstrakta (30%).

- AOA keksa kretala se u opsegu od 68,4 do 98,4% neutralizacije DPPH radikala, odnosno od 27,75 do 75,99 mmol Fe<sup>2+</sup>/g keksa određeno FRAP metodom. Pokazano je da porast učešća

biljnog materijala aronije utiče na povećanje vrednosti AOA. Najveći doprinos AOA keksa daje najveći udeo dodatog ekstrakta, odnosno ploda, određeno DPPH i FRAP metodama, respektivno.

- Generalno, zavisno od formulacije AOA se povećavai do skoro tri puta u odnosu na kontrolni uzorak.

- Primenom RSM pri analizi eksperimentalnih podataka dobijene su odgovarajuće jednačine odziva za praćenje uticaja recepture na ispitivane odzivne veličine u dobijenom keksu povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde. Kvadratni model primenjen je za predviđanje i opisivanje rezultata svih ispitivanih odziva ( $p < 0,0001$ ), pri čemu su svi statistički parametri ukazali na adekvatnost predloženih modela za sve odzive.

- Potencijalna funkcionalnost keksa povećane nutritivne vrednosti sa dodatkom aronije i heljde, sa aspekta postizanja većeg antioksidativnog potencijala i maksimiziranja sadržaja bioaktivnih jedinjenja postignuta je optimizacijom formulacije ovog proizvoda primenom RSM. Optimalna količina i vrsta funkcionalnih sastojaka (integralnog heljdinog brašna, samlevenog ploda, soka ili ekstrakta) utvrđeni su primenom funkcije poželjnosti.

- Optimalna formulacija ( $D=0,8716$ ) je kombinacija 30% integralnog heljdinog brašna i 30% biljnog materijala (optimalna formulacija) u obliku samlevenog ploda aronije. Sa aspekta ekonomske prihvatljivosti (ekonomski najprihvatljivija formulacija) softverski predviđene vrednosti ulaznih varijabli su kombinacija 13,98% integralnog heljdinog brašna i 24,07% biljnog materijala u obliku ekstrakta aronije.

- Ekonomski najprihvatljivija formulacija bi dala keks zadovoljavajućih karakteristika koji se može proizvesti po značajno nižoj ceni koštanja.

- Predložena formulacija keksa daje proizvod sa visokim sadržajem vrednih bioaktivnih jedinjenja, zahvaljujući dodatku ploda aronije i heljde, što omogućava svrstavanje ovog proizvoda u kategoriju proizvoda sa dodatom vrednošću.

## 6. LITERATURA

Abu-Samra, A. Morris, J. S., Koirtyohann, S. R. (1975), Wet ashing of some biological samples in microwave oven, *Analytical Chemistry*, 47 (8), 1475-7.

Adjé F., Lozano Y.F., Lozano P., Adima A., Chemat F., Gaydou E.M. (2010), Optimization of anthocyanin, flavonol and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound-assisted water extraction, *Industrial Crops and Products*, 32, 439–444.

Ahmad, J., Langrish, T.A.G. (2012), Optimisation of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy: The importance of the Maillard reaction, *Journal of Food Engineering*, 109 (1), 162 -174.

Ajila, C.M., Leelavathi, K., Prasada Rao, U.J.S. (2008), Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder, *Journal of Cereal Science*, 48, 319-326.

Alamed, J., Chaiyasit, W., McClements, D.J., Decker, E.A. (2009), Relationship between free radical scavenging and antioxidant activity in foods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2969–2976.

Alao, A.R., Konneh, M. (2009), A response surface methodology based approach to machining processes: modelling and quality of the models, *International Journal of Experimental Design and Process Optimisation*, 1 (2-3), 240-261.

Alvarez-Jubete, L., Arendt, E.K., Gallagher, E. (2010a), Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as gluten-free ingredients, *Trends in Food Science & Technology*, 21 (2), 106-113.

Alvarez-Jubete, L., Wijngaard, H., Arendt, E.K., Gallagher, E. (2010), Polyphenol composition and *in vitro* antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking, *Food Chemistry*, 119 (2), 770-778.

Ara, V. (2002), Schwarzfruchtige Aronia: Gesund – und bald “in aller Munde”. Flüssiges Obst, 10, 653–8.

- Arancibia-Avila, P., Namiesnik, J., Toledo, F., Werner, E., Martinez-Ayala, A.L., Rocha-Guzmán, N.E., Gallegos-Infante, J.A., Gorinstein, S. (2012), The influence of different time durations of thermal processing on berries quality, *Food Control*, 26, 587-593.
- Arasi M.A.S.A.G., Gopal Rao M., Bagyalakshmi J. (2016), Optimization of microwave-assisted extraction of polysaccharide from *Psidium guajava* L. fruits, *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 227-232.
- Arimboor R., Venugopalan V., Sarinkumar K., Arumughan C., Sawhney R.C. (2006), Integrated processing of fresh Indian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries and chemical evaluation of products, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2345–2353.
- Arnao, M. B. (2000), Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 419–421.
- Aybastier, O., Isik, E., Sahin, S., Demir, C. (2013), Optimisation of ultrasonis-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology, *Industrial Crops and Products*, 44, 558-565.
- Babova O., Occhipinti A., Capuzzo A., Maffei M.E. (2016), Extraction of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) antioxidants using supercritical/subcritical CO<sub>2</sub> and ethanol as co-solvent, *Journal of Supercritical Fluids*, 107, 358–363.
- Babović, N., Petrović, S. (2011), Izolovanje antioksidanasa postupkom nadkritične ekstrakcije, *Hemijska Industrija*, 65 (1), 79-86.
- Bai, X.-L., Yue, T.-L., Yuan, Y.-H., Zhang, H.-W. (2010), Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from apple pomace using response surface methodology and HPLC analysis, *Journal of Separation Science*, 33, 3751–3758.
- Balestra, F., Cocci, E., Pinnavaia, G., Romani, S. (2011), Evaluation of antioxidant, rheological and sensorial properties of wheat flour dough and bread containing ginger powder, *LWT - Food Science and Technology*, 44, 700-705.

Ballard, T. S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., O’Keefe, S. (2010), Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins, *Food Chemistry*, 120 (4), 1185-1192.

Barba, F.J., Galanakis, C.M., Esteve, M.J., Frigola, A., Vorobiev, E. (2015), Potential use of pulsed electric technologies and ultrasounds to improve the recovery of high-added value compounds from blackberries, *Journal of Food Engineering*, 167 (Part A), 38-44.

Barba, F.J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant’Ana, A.S., Orlien, V. (2016), Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review, *Trends in Food Science and Technology*, 49, 96–109.

Bas, D., Boyaci, I.H. (2007), Modeling and optimization I: usability of response surface methodology, *Journal of Food Engineering*, 78, 836-45.

Basri, M., Rahman, R.N.Z.R.A., Ebrahimpour, A., Salleh, A.B., Gunawan, E.R., Rahman, M.B.A. (2007), Comparison of estimation capabilities of response surface methodology (RSM) with artificial neural network (ANN) in lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax ester, *BMC Biotechnol*, 7, 53-63.

Bellur Nagarajaiah, S., Prakash, J. (2015), Nutritional composition, acceptability, and shelf stability of carrot pomace-incorporated cookies with special reference to total and  $\beta$ -carotene retention, *Cogent Food & Agriculture*, 1: 1039886.

Benvenuti, S., Pellati, F., Melegari, M., Bertelli, D., (2004), Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of rubus, ribes, and aronia, *Journal of Food Science*, 69, 164–169.

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, 70–76.

Berliner, J.A, Navab, M., Fogelman, A.M., Frank, J.S., Demer, L.L., Edwards, P.A., Watson, A.D., Lusis, A.J. (1995), Atherosclerosis: Basic mechanisms oxidation, inflammation, and genetics, *Circulation*, 91, 2488–96.

Bermúdez-Soto, M.J., Larrosa, M., Garcia-Cantalejo, Espín, J.C., Tomás-Barberan, F.A., García-Conesa, M.T. (2007), Up-regulation of tumor suppressor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in human colon cancer Caco-2 cells following repetitive exposure to dietary



levels of a polyphenol-rich chokeberry juice, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 259-271.

Bernal, J., Mendiola, J.A., Ibáñez, E., Cifuentes, A. (2011), Advanced analysis of nutraceuticals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55, 758–774.

Bertagnolli, S.M.M., Silveira, M.L.R., Fogaça, A.O., Umann, L., Penna, N.G. (2014), Bioactive compounds and acceptance of cookies made with guava peel flour, *Food Science and Technology (Campinas.)*, 34 (2), 303-308.

Bessada, S.M.F., Barreira, J.C.M., Oliveira, M.B.P.P. (2015), Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review, *Industrial Crops and Products*, 76, 604–615.

Betiku, E., Ajala, S.O. (2014), Modeling and optimization of *Thevetia peruviana* (yellow oleander) oil biodiesel synthesis via *Musa paradisiacal* (plantain) peels as heterogeneous base catalyst: a case of artificial neural network vs. response surface methodology, *Industrial Crops and Products*, 53, 314–322.

Betiku, E., Taiwo, A.E. (2015), Modeling and optimization of bioethanol production from breadfruit starch hydrolyzate, *Renewable Energy*, 74, 87–94.

Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escaleira, L.A. (2008), Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*, 76 (5), 965–977.

Bijak, M., Bobrowski, M., Borowiecka, M., Podsedek, A., Golanski, J., Nowak, P. (2011), Anticoagulant effect of polyphenols-rich extracts from black chokeberry and grape seeds, *Fitoterapia*, 82 (6), 811-817.

Bijak, M., Saluk, J., Antosik, A., Ponczek, M. B., Żbikowska, H. M., Borowiecka, M., Nowak, P. (2013), *Aronia melanocarpa* as a protector of nitration of fibrinogen, *International Journal of Biological Macromolecules*, 55, 264-268.

Blaszczak, W., Amarowicz, R., Górecki, A. (2017), Antioxidant capacity, phenolic composition and microbial stability of aronia juice subjected to high hydrostatic pressure processing, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 39, 141–147.

Bloch, A., Thomson, C.A. (1995), Position of the American Dietetic Association: phytochemicals and functional foods, *Journal of The American Dietetic Association*, 95, 493-496.

Bonafaccia, G., Gambelli, L., Fabjan, N., Kreft, I. (2003b), Trace elements in flour and bran from common and tartary buckwheat, *Food Chemistry*, 83, 1-5.

Bonafaccia, G., Marocchini, M., Kreft, I. (2003a), Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat, *Food Chemistry*, 80, 9-15.

Bräunlich, M., Økstad, O.A., Slimestad, R., Wangensteen, H., Malterud, K.E., Barsett, H. (2013a), Effects of *Aronia melanocarpa* Constituents on Biofilm Formation of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*, *Molecules*, 18, 14989-14999.

Braunlich, M., Slimestad, R., Wangensteen, H., Brede, C., Malterud, K., Barsett, H. (2013b), Extracts, Anthocyanins and Procyanidins from *Aronia melanocarpa* as radical scavengers and enzyme inhibitors, *Nutrients*, 5, 663–678

Brito, I.L., De Souza, E.L., Felex, S.S., Madruga, M.S., Yamashita, F., Magnani, M. (2015), Nutritional and sensory characteristic of gluten-free quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*)-based cookies development using an experimental mixture design, *Journal of Food Science and Technology*, 52 (9), 5866-73.

Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M.E.J., Crozier, A. (2002), Plant foods and herbal sources of resveratrol, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3337–3340.

Cacace, J., Mazza, G. (2003a), Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries, *Journal of Food Engineering*, 59 (4), 379-389.

Cacace, J.E., Mazza, G. (2003b), Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol, *Journal of Food Science*, 68, 240–248.

Camel, V. (2001), Recent extraction techniques for solid matrices - Supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: Their potential and pitfalls, *Analyst*, 126 (7), 1182-1193.

Canuto G.A.B., Oliveira D.R., Da Conceição L.S.M., Farah J.P.S., Tavares M.F.M. (2016), Development and validation of a liquid chromatography method for anthocyanins in strawberry (*Fragaria* spp.) and complementary studies on stability, kinetics and antioxidant power, *Food Chemistry*, 192, 566–574.

Chan, C.-H., Yusoff, R., Ngoh, G.-C., Kung, F.W.-L. (2011), Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants, *Journal of Chromatography A*, 1218, 6213– 6225.

Chandrasekara, A., Shahidi, F. (2015), The use of antioxidants in ready-to-eat (RTE) and cook-chill food products, *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, Volume null, Issue null, 433-446.

Chang C., Yang, M, Wen, H., Chern, J. (2002), Estimation of Total Flavonoid Content in propolis by two complementary colorimetric methods, *Journal of Food and Drugs Analysis*, 10 (3), 178-182.

Chen, L., Jin, H., Ding, L., Zhang, H., Li, J., Qu, C., et al. (2008), Dynamic microwave-assisted extraction of flavonoids from *Herba Epimedii*, *Separation and Purification Technology*, 59, 50-57.

Chen, Y., Xie, M.Y., Gong, X.F. (2007), Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*, *Journal of Food Engineering*, 81, 162-170.

Chitarrini, G., Nobili, C., Pinzari, F., Antonini, A., De Rossi, P., Del Fiore, A., Procacci, S., Tolaini, V., Scala, V., Scarpari, M., Reverberi, M. (2014), Buckwheat achenes antioxidant profile modulates *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production, *International Journal of Food Microbiology*, 189, 1–10.

Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K. (2002), Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparasion, *Plant Science*, 163, 1161-1168.

Chouai, A., Cabassud, M., Le Lann, M.V., Gourdon, C., Casamatta, G. (2000), Use of neural networks for liquid–liquid extraction column modelling: an experimental study, *Chemical Engineering and Processing*, 39 (2), 171–180.

Choy, A.-L., Morrison, P., Hughes, J., Marriott, P., Small, D. (2013), Quality and antioxidant properties of instant noodles enhanced with common buckwheat flour, *Journal of Cereal Science*, 57, 281-287

Ciociu, M., Badescu, L., Miron, A., Badescu, M. (2013), The involvement of a polyphenolrich extract of black chokeberry in oxidative stress on experimental arterial hypertension, *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–8, 912769.

Ciz, M., Cizova, H., Denev, P., Kratchanova, M., Slavov, A., Lojek, A. (2010), Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables, *Food Control*, 21, 518–23.

Clifford, M.N. (1999), Chlorogenic acids and other cinnamates –Nature, occurrence, and dietary burden, *Journal of Science and Food Agriculture*, 79, 362–372.

Côté, J., Caillet, S., Doyon, G., Sylvain, J.F., Lacroix, M. (2010), Analyzing cranberry bioactive compounds, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 872–888.

Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., Cintas, P. (2008), Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves, *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 898-902.

Czitrom V. (1999), One factor at a time versus designed experiments, *The American Statistician*, 53, 126–131.

Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., Ibrić, S. (2016), Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique, *Food Chemistry*, 194, 135–142.

Dahmoune, F., Navak, B., Moussi, K., Remini, H., Madani, K. (2015), Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtuscommunis* L. leaves, *Food Chemistry*, 166, 585–595.

Dai, J., Mumper, R.J. (2010), Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties, *Molecules*, 15, 7313-7352.

Davidović, D., Dodić, S., Mastilović, J., Dodić, J., Popov, S., Lazić, M. (2010), The application of natural organic compounds in bakery industry, *Hemijska industrija*, 64 (5), 411–421.

Davies, K.M., Schwinn, K.E. (2006), *Molecular Biology and Biotechnology of Flavonoid Biosynthesis*, u “*Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications*”, urednici Andersen O.M., Markham K.R, CRC Press Taylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton.

De Cássia Rodrigues Batista, C., De Oliveira, M.S., Araújo, M.E., Rodrigues, A.M.C., Botelho, J.R.S., Da Silva Souza Filho, A.P., Machado, N.T., Carvalho, R.N. (2015), Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of açai (*Euterpe oleracea*) berry oil: Global yield, fatty acids, allelopathic activities, and determination of phenolic and anthocyanins total compounds in the residual pulp, *Journal of Supercritical Fluids*, 107, 364–369.

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Tognolini, M., Borges, G. and Crozier, A. (2012), Dietary (poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects against Chronic Diseases, *Antioxidants & Redox Signaling*, 18, 1-73

Demirdoven, A., Karabiyikli, S., Tokatli, K., Oncul, N. (2015), Inhibitory effects of red cabbage and sour cherry pomace anthocyanin extracts on food borne pathogens and their antioxidant properties, *LWT - Food Science and Technology*, 63, 8–13.

Denev, P., Ciz, M., Ambrozova, G., Lojek, A., Yanakieva, I., Kratchanova, M. (2010), Solidphaseextraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties, *Food Chemistry*, 123 (4), 1055–1061.

Denev, P., Kratchanov, C., Ciz, M., Lojek, A., Kratchanova M. (2012), Bioavailability and Antioxidant Activity of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Polyphenols: in vitro and in vivo Evidences and Possible Mechanisms of Action: A Review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 471-489.

Denev, P., Kratchanova, M., Ciz, M., Lojek, M., Vasicek., O., Nedelcheva, P., Blazheva, D., Toshkova, R., Gardeva, E., Yossifova, L., HyrsI, P., Vojtek, L. (2014), Biological activities of selected polyphenol-rich related immunity and gastrointestinal health, *Food Chemistry*, 157, 37-44.

Derringer, G., Suich, R. (1980), Simultaneous optimization of several response variables, *Journal of Quality Technology*, 12, 214–219.

Desai, K.M., Survase, S.A., Saudagar, P.S., Lele, S.S., Singhal, R.S. (2008), Comparison of artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) in fermentation media optimization: case study of fermentative production of scleroglucan, *Biochemical Engineering Journal*, 41, 266–273.

Dhillon, G. K., Amarjeet, K. (2013), Quality Evaluation of bread Incorporated With Different Levels of Cinnamon Powder, *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics (IJFS)*, 2 (7), 70-74.

Dhobi, M., Mandal, V., Hemalatha, S. (2009), Optimization of microwave assisted extraction of bioactive flavonolignan – silybinin *Journal of Chemical Metrology*, 3:1, 13-23.

Dietrych-Szostak, D., Oleszek, W. (1999), Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) grain, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4384–4387.

Dixon, R. A., Paiva, N. L. (1995), Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *Plant Cell*, 7, 1085-1097.

Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Lien Huong Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S., Ju, Y.-H. (2014), Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*, *Journal of Food and Drug Analysis*, 22, 296–302.

Duan, W., Jin, S., Zhad, G., Sun, P. (2015), Microwave-assisted extraction of anthocyanin from Chinese bayberry and its effects on anthocyanin stability, *Food Science and Technology*, 35 (3), 524-530.

Dudaković, A. (1996), Osnovi prenosa mase; IV Međufazni prenos mase, Hemijska industrija, 50 (4), 164-169.

Dorđević, T.M., Šiler-Marinković, S.S., Dimitrijević-Branković, S.I. (2010), Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals, Food Chemistry, 119, 957–963.

Emire, S.A., Tiruneh, D.D. (2012), Optimization of Formulation and Process Conditions of Gluten-Free Bread from Sorghum using Response Surface Methodology, Journal of Food Processing and Technology, 3 (5), 155-166.

Eskilsson, C.S., Björklund, E. (2000), Analytical-scale microwave-assisted extraction, Journal of Chromatography A, 902(1), 227-250.

Espín, J.C., García-Conesa, M.T., Tomás-Barberán, F.A. (2007), Nutraceuticals: facts and fiction, Phytochemistry, 68, 2986–3008.

Espín, J.C., Soler-Rivas, C., Wichers, H.J., García-Viguera, C. (2000), Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. J Agric Food Chem, 48, 1588–92.

Espinosa, W.E., Garzón, L.C. A., Oscar Julio Medina, O.J. (2017), Microwave-assisted extraction in dry fruit of andean species *Vaccinium meridionale*: Experimental conditions on the recovery of total polyphenols, Ciência e Agrotecnologia, 41(6), 701-712.

Fan, L., Zhang, S., Yu, L., Ma, L. (2006), Evaluation of antioxidant property and quality of breads containing, *Auricularia auricula* polysaccharide flour, Food Chemistry, 101, 1158–1163.

Fan-Yung, A.F., Rechits, M.A. (1977), Veränderungen der chemischen Zusammensetzung von Apfelbeeren während der Lagerung und Verarbeitung; Nachrichten höhere Lehranstalten Krasnodar. Izv Vyssh Uchebn Zaved, Pishchen Technologie, 1, 76-8.

Filipčev, B. (2009), Nutritivni profil, antioksidativni potencijal i senzorni kvalitet specijalnih vrsta hlebova sa dodatkom melase šećerne repe, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet u Novom Sadu, Univerzitet u Novom Sadu.

Filipčev, B., Šimurina, O., Sakač, M., Sedej, I., Jovanov, P., Pestorić, M., Bodroža-Solarov, M. (2011), Feasibility of use of buckwheat flour as an ingredient in ginger nut biscuit formulation, *Food Chemistry* 125, 164–170.

Fullana, M., Trabelsi, F., Recasens, F. (2000), Use of neural net computing for statistical and kinetic modelling and simulation of supercritical fluid extractors, *Chemical Engineering Science*, 55, 79-95.

Galanakis, C.M. (2012), Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications, *Trends in Food Science and Technology*, 26 (2), 68-87.

D'Alessandro, L.G., Dimitrov, K., Vauchel, P., Nikov, I. (2014), Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes, *Chemical Engineering Research and Design*, 92 (10), 1818–1826.

D'Alessandro, L.G., Kriaa, K., Nikov, I., Dimitrov, K. (2012), Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry, *Separation and Purification Technology*, 93, 42–47.

Gamse, T. (2005), Industrial Applications and Current Trends in Supercritical Fluid Technologies, *Hemijska Industrija*, 59 (9-10), 207-212.

Ganzler, K., Salgo, A., Valko, K. (1986), Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography, *Journal of Chromatography*, 371, 299-306.

García-Alonso, M., Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C. (2004), Evaluation of the antioxidant properties of fruits, *Food Chemistry*, 84, 13–18.

Gąsiorowski, K., Szyba, K., Brokos, B., Kozłaczyńska, B., Jankowiak-Wzłłodarczyk, M., Oszmiański, J. (1997), Antimutageni activity of anthocyanins isolated from *Aronia melanocarpa* fruits, *Cancer Letters*, 119, 37-46.

Gharekhani, M., Ghorbani, M., Rasoulnejad, M.N. (2012), Microwave-assisted extraction of phenolic and flavonoid compounds from *Eucalyptus camaldulensis* Dehn leaves as compared with ultrasound-assisted extraction, *Latin American applied research*, 42 (3), 305-310.



Gironés-Vilaplana, A., Valentão, P., Andrade, P.B., Ferreres, F., Moreno, D.A., García-Viguera, C. (2012), Phytochemical profile of a blend of black chokeberry and lemon juice with cholinesterase inhibitory effect and antioxidant potential, *Food Chemistry*, 134 (4) 2090–2096.

Golmohamadi, A., Möller, G., Powers, J., Nindo, C. (2013), Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree, *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1316–1323.

González-Centeno M.R., Knoerzer K., Sabarez H., Simal S., Rosselló C., Femenia A. (2014), Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.), A response surface approach, *Ultrasonics Sonochemistry*, 21 (6), 2176-2184.

Graversen, H., Miquel Becker, E., Skibsted, L., Andersen, M. (2008), Antioxidant synergism between fruit juice and a-tocopherol. A comparison between high phenolic black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and high ascorbic blackcurrant (*Ribes nigrum*), *European Food Research Technology*, 226, 737–743.

Grunovaite, L., Pukalskiene, M., Pukalskas, A., Venskutonis, P.R. (2016), Fractionation of black chokeberry pomace into functional ingredients using high pressure extraction methods and evaluation of their antioxidant capacity and chemical composition, *Journal of Functional Foods*, 24, 85–96.

Guderjan, M., Elez-Martínez, P., Knorr, D. (2007), Application of pulsed electric fields at oil yield and content of functional food ingredients at the production of rapeseed oil, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(1), 55-62.

Gujar, J.G., Wagh, S.J., Gaikar, V.G. (2009), Experimental and modeling studies on microwave assisted extraction of thymol from seeds of *Trachyspermum ammi* (TA), *Separation and Purification Technology*, 70, 257-264.

Guo, C. Yang, J., Wei, J., Li, Y., Yu, J., Jiang, Y. (2003), Antioxidant activities of peel, pulp and seeds fraction of common fruits as determined by FRAP assay, *Nutrition Research* 23, 1719-1476.

Guo, X.D., Wu, C.S., Ma, Y.J., Parry, J., Xu, Y.Y., Liu, H., Wang, M. (2012), Comparison of milling fractions of tartary buckwheat for their phenolics and antioxidant properties, *Food Research International*, 49, 53–59.

Guo, Z., Jin, Q., Fan, G., Duan, Y., Qin, C., Wen, M. (2001), Microwave-assisted extraction of effective constituents from a Chinese herbal medicine *Radix puerariae*, *Analytica Chimica Acta*, 436, 41-47.

Hagan, M.T., Demuth, H.B., Beale, M. (1996), *Neural Network Design*, PWS Publishing Co, Boston, 1996.

Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliker, J., Aruoma, O.I. (1995), The characterization of antioxidants, *Food and Chemical Toxicology*, 33 (7), 601-607.

Halvorsen, B.L., Holte, K., Myhrstad, M.C.W., Barikmo, I., Hvattum, E., Remberg, S.F., Wold, A.B., Haffner, K., Baugerad, H., Andersen, L.F., Moskaug, O., Jacobs, D.R., Jr., Blomhoff, R.A. (2002), Systematic screening of total antioxidants in dietary plants, *Journal of Nutrition*, 132, 461–471.

Hanrahan, G., Lu, K. (2006), Application of factorial and responsesurface methodology in modern experimental design and optimization, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36 (3–4), 141–151.

Harbone, J.B., Williams, C. (2000), *Advances in Flavonoid Research Since 1992*, *Phytochemistry*, 55, 481-504.

Harborne, J.B., Baxter, H., Moss, G.P. (1999), *Phytochemical Dictionary-A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*, Taylor & Francis, London, 1999.

Hartmann, T. (2007), From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism, *Phytochemistry*, 68, 2831-2846.

Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, D., Xia, S., Jia, C., Zhang, X., Xia, W. (2009), Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro, *Separation and Purification Technology*, 70 (1), 63–70.

- Hayouni, E.A., Abedrabba, M., Bouix, Hamdi, M. (2007), The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts, *Food Chemistry*, 105, 1126-1134.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002), Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13 (10), 572–584.
- Hellström, J.K., Shikov, A.N., Makarova, M.N., Pihlanto, A.M., Pozharitskaya, O.N., Ryhänen, E., Kivijärvi, P., Makarov, V.G., Mattila, P.H. (2010), Blood pressure-lowering properties of chokeberry (*Aronia mitchurinii*, var. Viking), *Journal of Functional Foods*, 2, 163-169.
- Hellström, J.K., Torronen, A.R., Mattila, P.H. (2009), Proanthocyanidins in common food products of plant origin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7899-906.
- Hemwimon, S., Pavasant, P., Shotipruk, A. (2007), Microwaveassisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*, *Separation and Purification Technology*, 54, 44-50.
- Hidalgo, G-I., Almajano, M. P. (2017), Red Fruits: Extraction of Antioxidants, Phenolic Content, and Radical Scavenging Determination: A Review, *Antioxidants*, 6, 7, 1-27.
- Hidalgo, M., Sanchez-Moreno, C., de Pascual-Teresa, S. (2010), Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity, *Food Chem*, 121, 691–696.
- Hirth, M., Preiß, R., Mayer-Miebach, E., Schuchmann, H.P. (2015), Influence of HTST extrusion cooking process parameters on the stability of anthocyanins, procyanidins and hydroxycinnamic acids as the main bioactive chokeberry polyphenols, *LWT-Food Science and Technology*, 62 (1), 511-516.
- Holosava, M., Fiedlerova, V., Smrcinova, H., Orsak, M., Lachman, L., Vavreinova, S. (2002), Buckwheat-the source of antioxidant activity in functional foods, *Food Research International*, 35, 207–211.
- Horszwald, A., Julien, H., Andlauer, W. (2013), Characterisation of Aroniapowders obtained by different drying processes, *Food Chemistry*, 141, 2858-2863.

Hsieh, Y-H.P., Ofori, J.A. (2007), Innovations in food technology for health, *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16, 65-73.

Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005), The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841–56.

Hudec, J., Bakos, D., Mravec, D., Kobida, L., Burdova, M., Turianica, I., Hlušek, J. (2006), Content of phenolic compounds and free polyamines in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) after application of polyamine biosynthesis regulators, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3625-3628.

Hwang, S.J., Yoon, W.B., Lee, O.H., Cha, S.J., Kim, J.D. (2014), Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea, *Food Chemistry*, 146 (1), 71-77.

IFICF (2009), International Food Information Council Foundation Food & Health Survey, Washington, [http://www.foodinsight.org/Resources/Detail.aspx?topic=2009\\_Food\\_Health\\_Survey\\_Consumer\\_Attitudes\\_toward\\_Food\\_Nutrition\\_and\\_Health](http://www.foodinsight.org/Resources/Detail.aspx?topic=2009_Food_Health_Survey_Consumer_Attitudes_toward_Food_Nutrition_and_Health)

Ikeda, K. (2002), Buckwheat composition, chemistry, and processing, *Advances in Food and Nutrition Research*, 44, 395-434.

International Life Science Institute-ILSI Europe (1999), Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document, *British Journal of Nutrition*, 81:S1–S27.

Ivanovic, J., Tadic, V., Dimitrijevic, S., Stamenic, M., Petrovic, S., Zizovic, I. (2014), Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonic extract from blackberry cultivar “Čačanska Bestrna”, *Industrial Crops and Products*, 53, 274–281.

Izadifar, M., Abdolahi, F. (2006), Comparison between neural network and mathematical modeling of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of black pepper essential oil, *Journal of Supercritical Fluids*, 38, 37-43.

Jakobek, L., Šeruga, M., Medvidović-Kosanović, M., Novak, I. (2007), Antioxidant activity and polyphenols of *Aronia* in comparison to other berry species, *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 72 (4), 301–306.

Jakobek, L., Šeruga, M., Krivak, P. (2011), The influence of interactions among phenolic compounds on the antiradical activity of chokeberries (*Aronia melanocarpa*), *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62 (4), 345–352

Jakobek, L., Drenjančević, M., Jukić, V., Šeruga, M. (2012), Phenolic acids, flavonols, anthocyanins and antiradical activity of “Nero”, “Viking”, “Galicianka” and wild chokeberries, *Scientia Horticulturae*, 147, 56-63.

Jašić, M. (2010), *Biološki aktivni sastojci hrane, dodaci prehrani, funkcionalna hrana i fortifikacija hrane-Materijal uz predavanja, Tehnološki fakultet Tuzla.*

[https://www.prirodnamedicina.org/.../M.Jasic.Uvid\\_u\\_aktivne\\_bioloski\\_aktivne\\_komponente\\_hrane](https://www.prirodnamedicina.org/.../M.Jasic.Uvid_u_aktivne_bioloski_aktivne_komponente_hrane)

Jensen, J.S., Wertz, C.F., O’Neill, V.A. (2010), Preformulation stability of trans-resveratrol and trans-resveratrol glucoside (piceid), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1685–1690.

Jeong, I.J., Kim, K.J., (2009), An interactive desirability function method to multiresponse optimization, *European Journal of Operational Research*, 195, 412-426.

Jeppsson, N., Johansson, R. (2000), Changes in fruit quality in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) during maturation, *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75, 340-345.

Jimenez-Garcia, S.N., Guevara-Gonzalez, R.G., Miranda-Lopez, R., Feregrino-Perez, A.A., Torres-Pacheco, I., Vazquez-Cruz, A.M. (2013), Functional properties and quality characteristics of bioactive compounds in berries: Biochemistry, biotechnology, and genomics, *Food Research International*, 54 (1), 1195-1207.

Joglekar, A.M., May, A.T. (1987), Product excellence through design of experiments, *Cereal Foods World*, 32 (12), 857.

Jones, P., Jew, S. (2007), Functional food development: concept to reality, *Trends in Food Science and Technology*, 18, 387-390.

Juranović Cindrić, I., Zeiner, M., Mihajlov-Konanov, D., Stingeder, G. (2017), Inorganic Macro- and Micronutrients in “Superberries” Black Chokeberries (*Aronia melanocarpa*) and Related Teas, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14, 539.

Kahkonen, M., Hopia, A., Heinonen, M. (2001), Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (8), 4076-4082.

Kahkonen, M., Hopia, A., Vuorela, H., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T., Heinonen, M. (1999), Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962.

Kalpana, K., Sharma, K., Singh, H.P., Singh, B. (2008), Effects of Extraction Methods on Phenolic Contents and Antioxidant Activity in Aerial Parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and Quantification of Its Phenolic Constituents by RP-HPLC, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10129–10134.

Kapci, B., Neradova, E., Čížkova, H., Voldrich, M., Rajchl, A., Capanoglu, E. (2013), Investigating the antioxidant potential of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) products, *Journal of Food and Nutrition Research*, 52 (4), 219–229.

Karabegović, I.T., Nikolić, N.Č., Simić, V.M., Mančić, D.M., Lazić, M.L. (2015), Optimization of the extraction of total flavonoids from *Solanum retroflexum* Dun. fruit using the response surface methodology, *The 19 th International Congress Phytopharm, Abstracts book*, 39, *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии (Reviews of clinical pharmacology and drug therapy) TOM 13 Supplement*, 21-24. July 2015., Bonn, Germany.

Karabegović, I.T., Stojičević, S.S., Veličković, D.T., Nikolić, N.C., Lazić, M.L. (2014), Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Cherry Laurel Fruit, *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 49 (3), 416-423.

Karabegović, I. (2011), Kinetika mikrotalasne ekstrakcije i karakterizacija bioaktivnih komponenti iz lovor višnje (*Prunus laurocerasus* L.), *Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu*.

Karabegović, I., Nikolova, M., Veličković, D., Stojičević, S., Veljković, V., Lazić, M. (2011a), Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanolic Extracts of the *Artemisia sp.* Recovered by Different Extraction Techniques. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19 (3), 504-511.

Karabegović, I., Stojičević, S., Veličković, D., Nikolić, N., Lazić, M. (2013), Optimization of microwave-assisted extraction and characterization of phenolic compounds in cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaves, *Separation and Purification Technology*, 120, 429-436.

Karacabey, E., Mazza, G. (2010), Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology, *Food Chemistry*, 119 (1) 343–348.

Karnopp A.R., Figureoa, A.M., Los, P.R., Teles, J.C., Simoes, D.R.S., Barana, A.C., Kubiaki, F.T., de Oliveira, J.G.B., Granato, D. (2015), Effects of whole-wheat flour and Bordeaux grape pomace (*Vitis labrusca* L.) on the sensory, physicochemical and functional properties of cookies, *Food Science and Technology (Campinas)*, 35 (4), 750-756.

Kedzierska, M., Olas, B., Wachowicz, B., Glowacki, R., Bald, E., Czernek, U., Szydłowska-Pazera, K., Potemski, P., Piekarski, J., Jeziorski, A. (2012), Effects of the commercial extract of aronia on oxidative stress in blood platelets isolated from breast cancer patients after the surgery and various phases of the chemotherapy, *Fitoterapia*, 83, 310-317.

Kerem, Z., German-Shashoua, H., Yarden, O. (2005), Microwave-assisted extraction of bioactive saponins from chickpea *Cicer arietinum* L., *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 406–412.

Keskin Gündođdu, T., Deniz, I., Çalışkan, G., Şahin, E.S., Azbar, N. (2016), Experimental design methods for bioengineering applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 368-388.

Khanbabaee, K., van Ree, T. (2001), Tannins: Classification and definition. *Natural Product Report*, 18, 641–649.

Kiokias, S., Varzakas, T., Oreopoulou, V. (2008), In vitro activity of vitamins, flavanoids, and natural phenolic antioxidants against the oxidative deterioration of oil-based systems, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 78–93.

Kirsch, M. (2003), The autoxidation of THB revisited, *J Biol Chem*, 278, 24481–90.

Kokotkiewicz, A., Jaremicz, Z., Luczkiewicz, M. (2010), Aronia plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine, *Journal of Medicinal Food*, 13 (2), 255–26.

Konić-Ristić, A., Srđić-Rajić, T., Kardum, N., Glibetić, M. (2013), Biological activity of *Aronia melanocarpa* antioxidants pre-screening in an intervention study design, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 78 (3), 429–443.

Kulling, S.E., Rawel, H.M. (2008), Chokeberry (*Aroniamelanocarpa*) – A Review on the Characteristic Components and Potential Health Effects, *Planta Medica*, 74, 1625–1634.

Kulshrestha, N., Jha, Y. K., Admassu, S. (2012), Optimization of Ingredients Level in Low Calorie-High Protein Papaya Fruit Bar using Response Surface Methodology, *Journal of Food Processing and Technology*, 3 (12), 193-198.

Kwon, J.-H., Lee, G.-D., Bélanger, J., Paré, J.R.J. (2003), Effect of ethanol concentration on the efficiency of extraction of ginseng saponins when using a microwave assisted process (MAP TM), *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 615–622.

Larrea, M.A., Chang, Y.K., Martinez-Bustos F. (2005), Some functional properties of extruded orange pulp and its effect on the quality of cookies, *LWT - Food Science and Technology*, 38, 213–220.

Lashbrooke, J.G., Young, P.R., Strever, A.E., Stander, C., Vivier, M.A. (2010), The development of a method for the extraction of carotenoids and chlorophylls from grapevine leaves and berries for HPLC profiling, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16 (2) 349-360.

Lee, J.E., Kim, G.-S., Park, S., Kim, Y.H., Kim, M.B., Lee, W.S., Jeong, S.W., Lee, S.J., Jim, J.S., S.C. Shin, S.C. (2014), Determination of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenol



components using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: overall contribution to antioxidant activity, *Food Chemistry*, 146, 1–5.

Lee, K-W., Lee, H-J. (2006), The roles of polyphenols in cancer chemoprevention, *Bio Factors* 26, 105–121.

Leonelli, C., Mason, T.J. (2010), Microwave and ultrasonic processing: now a realistic option for industry, *Chemical Engineering and Processing*, 49, 885–900.

Li, H., Chen, B., Zhang, Z., Yao, S. (2004), Focused microwave-assisted solvent extraction and HPLC determination of effective constituents in *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*), *Talanta*, 63, 659-665.

Li, H., Deng, Z., Wu, T., Liu, R., Loewen, S., Tsao, R. (2012), Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes, *Food Chemistry*, 130, 928-936.

Li, J., Zu, Y.G., Fu, Y.J., Yang, Y.C., Li, S.M., Li, Z.N., et al. (2010), Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 637-643.

Lim, Y.Y., Lim, T.T., Tee, J.J. (2007), Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study, *Food Chemistry*, 103, 1003–1008.

Lin, L-Y., Liu, H-M., Yu, Y-W., Lin, S-D., Mau, J-L. (2009), Quality and antioxidant property of buckwheat enhanced wheat bread, *Food Chemistry*, 112, 987–991.

Lingzhu, L., Lu, W., Dongyan, C., Jingbo, L., Songyi, L., Haiqing, Y., Yuan, Y. (2015), Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from maize filaments by response surface methodology and its identification, *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 88, 152 – 163.

Liu, L., Liu, R.-L., Zhang, J., Zhang, Z.-Q. (2012), Study on the PEG-based microwave-assisted extraction of flavonoid compounds from persimmon leaves. *Journal of Separation Science*, 35, 3412–3420.

Liyana-Pathirana, C.M., Shahidi, F. (2005a), Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by gastric pH conditions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2433–2440.

Liyana-Pathirana, C. M., Shahidi, F. (2005b), Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology, *Food Chemistry*, 93, 47-56.

Liyana-Pathirana, C. M., Shahidi, F. (2006), Antioxidant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 477–485.

Lohachoompol, V., Mulholland, M., Szrednicki, G., Craske, J. (2008), Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries, *Food Chemistry*, 111, 249–254.

Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J. (2004), Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation, *Journal of Chromatography A*, 1043, 323–327.

Luo, A., Peng, P., Fei, W., Yang, L., Fan, Y. (2014), Isolation and antioxidant activity (in vitro and in vivo) of the flavonoid from Tartarian-buckwheat, *Journal of Scientific and Innovative Research*, 3, 168–172.

MacDonald-Wicks, L., Wood, L., Garg, M. (2006), Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2046-2056.

Mackèla, I., Kraujalis, P., Baranauskienė, R., Venskutonis, P.R. (2015), Biorefining of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) buds into high value aroma and antioxidant fractions by supercritical carbon dioxide and pressurized liquid extraction, *Journal of Supercritical Fluids*, 104, 291–300.

Maisuthisakul, P., Pongsawatmanit, R., Gordon, M.H. (2007), Assessment of phenolic content and free-radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants, *Food Chemistry*, 100, 1409–1418.

Malinowska, J., Babicz, K., Olas, B., Stochmal, A., Oleszek, W. (2012), Aronia melanocarpa extract suppresses the biotoxicity of homocysteine and its metabolite on the hemostatic activity of fibrinogen and plasma, *Nutrition*, 28, 793-798.

Mamat, H., Abu-Hardan, M.O., Hill, S.E. (2010), Physicochemical properties of commercial semi-sweet biscuit, *Food Chemistry*, 121 (4), 1029-1038.

Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2008), Microwave assisted extraction of curcumin by sample-solvent dual heating mechanism using Taguchi L 9 orthogonal design, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46, 322-327.

Marchitan, N., Cojocaru, C., Mereuta, A., Duca, G., Cretescu, I., Gonta, M. (2010), Modeling and optimization of tartaric acid reactive extraction from aqueous solutions: a comparison between response surface methodology and artificial neural network. *Separation and Purification Technology*, 75, 273–285.

Marinković, V. (1994), Application of some non-linear mathematical models to the theory of experimental design, *Facta Universitatis, Series: Mechanical Engineering*, 1 (1), 103-117.

Markom, M., Hasan, M., Ramli, W., Daud, W., Singh, S., Jahim, J.M. (2007), Extraction of hydrosable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn. Effect of solvents and extraction methods, *Separation and Purification Technology*, 52, 487-496.

Martinez-Cauyela, M. (1995), Oxygen free radicals and human disease, *Biochimie*, 77, 147-161.

Martino, E., Ramaiola, I., Urbano, M., Bracco, F., Collina, S. (2006), Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction, *Journal of Chromatography A*, 1125, 147-151.

Matsumoto, H., Inaba, H., Kishi, M., Tominaga, S., Hirayama, M., Tsuda, T. (2001), Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1546–51.

Matsumoto, M., Hara, H., Chiji, H., Kasai, H.T. (2004), Gastroprotective effect of red pigments in black chokeberry fruit (*Aroniamelanocarpa Elliot*) on acute gastric hemorrhagic lesions in rats, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2226–2229.

Mayer-Miebach, E., Adamiuk, M., Behsnilian, D. (2012), Stability of chokeberry bioactive polyphenols during juice processing and stabilization of a polyphenol-rich material from the by-product, *Agriculture*, 2, 244–258.

Medina-Meza, I.G., Boioli, P., Barbosa-Cánovas, G.V. (2016), Assessment of the Effects of Ultrasonics and Pulsed Electric Fields on Nutritional and Rheological Properties of Raspberry and Blueberry Purees, *Food and Bioprocess Technology*, 9, 520–531.

Mendes, M., Carvalho, A.P., Magalhães, J.M.C.S., Moreira, M., Guido, L., Gomes, A.M., Delerue-Matos, C. (2016), Response surface evaluation of microwave-assisted extraction conditions for *Lycium barbarum* bioactive compounds, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 319–326.

Messikh, N., Samar, M. H., Messikh, L. (2007), Neural network analysis of liquid–liquid extraction of phenol from wastewater using TBP solvent, *Desalination*, 208 (1–3), 42–48.

Michel, T., Destandau, E., Elfakir, C. (2011), Evaluation of a simple and promising method for extraction from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries: Pressurised solvent-free microwave assisted extraction, *Food Chemistry*, 126, 1380–1386.

Michiels, J.A., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Dommès, J. (2012), Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices, *Food Chemistry*, 130, 986–993.

Mijin, D.Ž., Petrović, S.D. (2005), Microwaves in organic chemistry and organic chemical technology, *Hemijska industrija*, 59(9-10), 224–229.

Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Stampar, F., Veberić, R. (2012a), Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species, *Journal of Food Science*, 77 (10), 1064–1070.

Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., Stampar, F., Veberić, R. (2012b), HPLC–MS<sup>n</sup> identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species, *Food Chemistry*, 135, 2138-2146.

Milenović, D. (2002a), Analiza procesa ekstrakcije čvrsto-tečno, Magistarski rad, Tehnološko fakultet Leskovac.

Milenović, D., Veljković, V., Todorović, B., Stanković, M. (2002), Analiza ekstrakcije rezinoida kantariona (*Hypericum perforatum* L.) I. Efikasnost i optimizacija ekstrakcije. *Hem. Ind.*, 56, 54-59.

Milić, P. (2014), Optimizacija i modelovanje kinetike ekstrakcije rezinoida i mineralnih materija iz belog ivanjskog cveća (*Galium mollugo* L.), Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu.

Milošević, S. (2011), Ekstrakcija ginka (*Ginko biloba* L.) ugljenik(IV)-oksidom pod pritiskom, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.

Mišan, A. (2009), Antioksidantna svojstva lekovitog bilja u hrani, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Department za hemiju, Novi Sad.

Mjalli, F.S. (2005), Neural network model-based predictive control of liquid–liquid extraction contactors, *Chemical Engineering Science*, 60 (1), 239–253.

Mohd, K., Idris, A., Jet Siong, L., Mun, W.H., Morad, N.A. (2003), Artificial Neural Network Modelling of Steady State Chemical Engineering Systems, Invited paper for Malaysia-Japan Seminar on Artificial Intelligence Applications in Industry.

Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Manuel, Dominguez, J., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.J., Carlos Parajo J. (2001), Natural antioxidants from residual sources, *Food Chemistry*, 72 (2), 145-171.

Nađalin, V. (2013), Ispitivanje ekstrakcije i ekstrakata gajene lavande (*Lavandula officinalis* L.), Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.

Naruszewicz, M., Łaniewska, I., Millo, B., M. Dłużniewski, M. (2007), Combination therapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruits enhanced reduction in cardiovascular risk markers in patients after myocardial infraction (MI), *Atherosclerosis*, 194, 179-184.

Nikolić, N., Sakač, S., Mastilović, J. (2011), Effect of buckwheat flour addition to wheat flour on acylglycerols and fatty acids composition and rheology properties, *LWT - Food Science and Technology*, 44, 650-655.

NRC (National Research Council) (2004) *Recommended Dietary Allowances*. 10th edn, National Academy Press, Washington, DC

Nunes da Silva, I., Flauzino, R.A. (2008), An approach based on neural networks for estimation and generalization of crossflow filtration processes, *Applied Soft Computing*, 8, 590–598.

Nwabueze, T.U. (2010), Basic steps in adapting response surface methodology as mathematical modelling for bioprocess optimisation in the food systems, *International Journal of Food Science and Technology*, 45 (9), 1768–1776.

Nyiredy, S. (2004), Separation strategies of plant constituents—current status, *Journal of Chromatography B*, 812, 35–51

O’Shea, N., Röβle, C., Arendt, E., Gallagher, E. (2015), Modelling the effects of orange pomace using response surface design for glutenfree bread baking, *Food Chemistry*, 166, 223-230.

Olalere, O.A., Abdurahman, N.H., Yunus, R.M., Alara, O.R. (2017), Multi-response optimization and neural network modeling for parameter precision in heat reflux extraction of spice oleoresins from two pepper cultivars (*Piper nigrum*), *Journal of King Saud University – Science*, Article in Press

Oliveira, G.D.A.R., De Oliveira, A.E., Da Conceição, E.C., Leles, M.I.G. (2016), Multiresponse optimization of an extraction procedure of carnosol and rosmarinic and carnosic acids from rosemary, *Food Chemistry*, 211, 465-473.

Oomah, B. D., Mazza, G. (1996), Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1746–1750.

Oszmianski, J., Wojdylo, A. (2005), *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity, *European Food Research Technology*, 221, 809-813.

Oszmianski, J., Lachowicz, S. (2016), Effect of the Production of Dried Fruits and Juice from Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) on the Content and Antioxidative Activity of Bioactive Compounds, *Molecules*, 21, 1098

Otten, J., Hellwing, J.P., Meyers, L.D. (2006), *Dietary reference intakes: The essential guide to nutrient requirements*, National Academies Press.

Özyurek, M., Guclu, K., Apak, R. (2011), The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement, *Trends in analytical chemistry*, 30 (4), 652-664.

Paes J., Dotta R., Barbero G.F., Martínez J. (2014), Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO<sub>2</sub> and pressurized liquids, *Journal of Supercritical Fluids*, 95, 8–16.

Pan, Y., He, C., Wang, H., Ji, X., Wang, K., Liu, P. (2010), Antioxidant activity of microwave-assisted extract of *Buddleia officinalis* and its major active component, *Food Chemistry*, 121, 497-502.

Pan, X., Niu, G., Liu., H. (2003), Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves, *Chemical Engineering and Processing*, 42, 129-133.

Pan, Y., Wang, K., Huang, S., Wang, H., Mu, X., He, C., et al. (2008), Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan Lour.*) peel, *Food Chemistry*, 106,1264-1270.

Pareyt, B., Delcour, J. A. (2008), The role of wheat flour constituents, sugar and fat in low moisture cereal based products: a review on sugar-snap cookies, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 1-16.

Parimita, E., Puneet Arora, E. (2015), Development of Fruit Bar by Using Apple and Banana Pulp Supplemented with Omega-3 Fatty Acid, *International Journaj of Engineering Studies and Technical Approch*, 1 (2), 27-35.

- Park, H.J., Chung, H.J. (2014), Influence of the addition of aronia powder on the quality and antioxidant activity of muffins, *Korean Journal of Food Preservation*, 21 (5), 668-675
- Park, S., Kim, J.I., Lee, I., Lee, S., Hwang, M.W., Bae, J.Y., Heo, J., Kim, D., Han, S.Z., Park, M.S. (2013), *Aronia melanocarpa* and its components demonstrate antiviral activity against influenza viruses, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440 (1), 14-9.
- Pedro, A.C., Granato, D., Rosso, N.D. (2015), Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability, *Food Chemistry*, 191, 12-20.
- Pekić, B., Miljković, D. (1980), *Hemija i tehnologija kardiotoničnih glikozida*, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Peressini, D., Sensidoni, A. (2009), Effect of soluble dietary fibre addition on rheological and breadmaking properties of wheat doughs, *Journal of Cereal Science*, 49 (2), 190-201.
- Pérez-Serradilla, J.A., Luque de Castro, M.D. (2011), Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract, *Food Chemistry*, 124 (4), 1652–1659.
- Périno-Issartier, S., Zill-e-Huma, Abert-Vian, M., Chemat, F. (2011), Solvent Free Microwave-Assisted Extraction of Antioxidants from Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Food By-Products, *Food and Bioprocess Technology*, 4, 1020–1028.
- Ph. Jug. V (2000), *Savezni zavod za zaštitu i unapređenje zdravlja*, Beograd.
- Piasek, A., Kuszniereicz, B., Grzybowska, I., Malinowska-Panczyk, E., Piekarska, A., Azqueta, A., Collins, A.R., Namiesnik, J., Bartoszek, A. (2011), The influence of sterilization with EnbioJet Microwave Flow Pasteurizer on composition and bioactivity of aronia and blue-berried honeysuckle juices, *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 880–888
- Pinelo, M., Manzocco, L., Nunez, M.J., Nicoli, M.C. (2004), Interaction among phenols in food fortification: Negative synergism on antioxidant capacity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1177–1180.



Pinelo, M., Sineiro, J., Nunez, M.J. (2006), Mass transfer during continuous solid–liquid extraction of antioxidants from grape byproducts, *Journal of Food Engineering*, 77, 57–63.

Пономарев, В. Д. (1976), Экстрагирование лекарственного сырья, Медицина, Москва.

Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Vacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R. (2003), Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL)) of plasma and other biological and food samples, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3273–3279.

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005), Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (10), 4290-4302.

Proestos, C., Komaitis, M. (2008), Application of microwaveassisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds, *LWT-Food Science and Technology*, 41, 652-659.

Radojković, M., Moreira, M. M., Soares, C., Barroso, M. F., Cvetanovic, A., Švarc-Gajic, J., Morais, S., Delerue-Matos, C. (2018), Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Morus nigra* leaves: optimization and characterization of the antioxidant activity and phenolic composition, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, In Press, doi:10.1002/jctb.5541.

Rafiee, Z., Jafari, S.M., Alami, M., Khomeiri, M. (2011), Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration, *Journal of Animal and Plant Science*, 21 (4), 738–745.

Rajendra, M., Jena, P.C., Raheman, H. (2009), Prediction of optimized pretreatment process parameters for biodiesel production using ANN and GA. *Fuel*, 88, 868–875.

Rajković, K., Avramović, J., Milić, P., Stamenković, O., Veljković, V. (2013), Optimization of ultrasound-assisted base-catalyzed methanolysis of sunflower oil using response surface and artificial neural network methodologies. *Chemical Engineering Journal*, 215-216, 82-89.

Ranić, M., Nikolić, M., Pavlović, M., Buntić, A., Siler-Marinković, S., Dimitrijević- Branković, S. (2014), Optimization of microwave-assisted extraction of natural antioxidants from spent

espresso coffee grounds by response surface methodology, *Journal of Cleaner Production*, 80, 69–79.

Reddy, V., Urooj, A., Kumar, A. (2005), Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application in biscuits, *Food Chemistry*, 90, 317–321.

Reis, S.F., Rai, D.K., Abu-Ghannam, N. (2012), Apple pomace as a potential ingredient for the development of new functional foods, *International Conference on Food Safety, Quality and Nutrition (ICFSQN)*, Manchester, UK, 61-66, 11-13 April 2012.

Ren, S.C., Sun, J.T. (2014), Changes in phenolic content, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, and antioxidant capacity of two buckwheat sprouts in relation to germination, *Journal of Functional Foods*, 7, 298–304.

Reza Pasandideh, S.H., Akhavan Niaki, S.T. (2006), Multi-response simulation optimization using genetic algorithm within desirability function framework, *Applied Mathematics and Computation*, 175, 366–382.

Rezaei, S., Rezaei, K., Haghghi, M., Labbafi, M (2013), Solvent and solvent to sample ratio as main parameters in the microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from apple pomace, *Food Science and Biotechnology*, 22 (5), 1–6.

Rice-Evans, C., Miller, N.J., Paganga, G. (1996), Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.

Robbins, R.J. (2003), Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866–2887.

Roberfroid, M.B. (2000), Concepts and strategy of functional food science: The European perspective, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1660S–1664S.

Rodrigues, S., Fernandes, F.A.N., de Brito, E.S., Sousa, A.D., Narain, N. (2015), Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jabuticaba peel, *Industrial Crops Products*, 69, 400–407.

Roginky, V., Lissi, A.E. (2005), Review of method to determine chain-breaking antioxidant activity in food, *Food Chemistry*, 92, 235-254.

Rommel, A., Wrolstad, R.E. (1993), Ellagic Acid Content of Red Raspberry Juice as Influenced by Cultivar, Processing, and Environmental Factors., *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 41, 1951-1960.

Rop, O., Mlcek, J., Jurikova, T., Valsikova, M., Sochor, J., Reznicek, V., Kramarova, D. (2010), Phenolic content, antioxidant capacity, radical oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibiting activities of extracts of five black chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) cultivars, *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (22), 2431–7.

Roselló-Soto, E., Galanakis, C.M., Brncaice, M., Orlie, V., Trujillo, F.J., Mawson, R., Knoerzer, K., Tiwari, B.K., Barba, F.J. (2015), Clean recovery of antioxidant compounds from plant foods, by-products and algae assisted by ultrasounds processing. Modeling approaches to optimize processing conditions, *Trends in Food Science and Technology*, 42 (2), 134-149.

Routray, W., Orsat, V. (2014), MAE of phenolic compounds from blueberry leaves and comparison with other extraction methods, *Industrial Crops and Products*, 58, 36–45.

Rugina, D., Sconta, Z., Leopold, L., Pintea, A., Bunea, A., Socaciu, C. (2012), Antioxidant Activities of Chokeberry Extracts and the Cytotoxic Action of Their Anthocyanin Fraction on HeLa Human Cervical Tumor C, *Journal of Medicinal Food*, 15 (8), 700-706.

Rupasinghe, V.H.P., Wang, L., Huber, G.M., Pitts, N.L. (2008), Effect of baking on dietary fibre and phenolics of muffin incorporated with apple skin powder, *Food Chemistry*, 107, 1217–1224.

Ryu, H.-S., Choi, H.-Y., Joo, S.-Y. (2015), Quality Characteristics of Rice Nutritional Bar added with Aronia Byproducts Powder, *Korean Journal of Food and Nutrition*, 28(6), 947-955.

Saad, B., Sing, Y.Y., Nawi, M.A., Hashim, N.H., Ali, A.S.M., Saleh, M.I., Sulaiman, S.F., Talib, K.M., Ahmad, K. (2007), Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC, *Food Chemistry*, 105, 389–394.

Sajjadi, B., Davoody, M., Aziz, A.R.A., Ibrahim, S. (2017), Analysis and Optimization of Ultrasound-Assisted Alkaline Palm Oil Transesterification by RSM and ANN-GA Chemical Engineering Communications, 204, 365–381.

Sadowska, K., Andrzejewska, J., Kloska, L.(2017), Influence of freezing, lyophilisation and air-drying on the total monomeric anthocyanins, vitamin C and antioxidant capacity of selected berries, International Journal of Food Science and Technology, 52, 1246–1251.

Sadrzadeh, M., Mohammadi, T., Ivakpour, J., Kasiri, N. (2008), Separation of lead ions from wastewater using electro dialysis: comparing mathematical and neural network modeling, Chemical Engineering Journal, 144, 431–441.

Sahin, S., Aybastier, O., Isik, E. (2013), Optimisation of ultrasonis-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology, Food Chemistry, 141 (2), 1361-1368.

Sahin, S., Samli, R. (2013), Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology, Ultrasonic Sonochemistry, 20, 595-602.

Sahin, S., Samli, R., Tan, A.S.B., Barba, F.J., Chemat, F., Cravotto, G., Lorenzo, J.M. (2017), Solvent-free microwave-assisted extraction of polyphenols from olive tree leaves: antioxidant and antimicrobial properties, Molecules, 22, 1056.

Sakač, M., Pestorić, M., Mišan, A., Nedeljković, N., Jambrec, D., Jovanov, P., Banjac, V., Torbica, A., Hadnađev, M., Mandić, A. (2015), Antioxidant Capacity, Mineral Content and Sensory Properties of Gluten Free Rice and Buckwheat Cookies, Food Technology and Biotechnology, 53 (1), 38-47.

Sakač, M., Sedej, I., Mandić, A., Mišan, A. (2011), Wheat and buckwheat milling fractions- Insight in their functional characteristics, Journal on Processing and Energy in Agriculture, 15, 3

Sanchez-Moreno, C. (2002), Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, Food Science and Technology International, 8 (3), 121-137.

- Sang, S., Lapsley, K., Jeong, W.S., Lachance, P.A., Ho, C.T., Rosen, R.T.J. (2002), Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus* Batsch), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2459–2463.
- Santos-Buelga, C., Sacalbert, A. (2000), Proanthocyanidins and Tannin-Like Compounds-Nature, Occurrence, Dietary Intake and Effects on Nutrition and Health, *Journal of the Science and Food Agriculture*, 80, 1094-1117.
- Sarkar, B., Sengupta, A., De, S., DasGupta, S. (2009), Prediction of permeate flux during electric field enhanced cross-flow ultrafiltration-A neural network approach, *Separation and Purification Technology*, 65 (3), 260–268.
- Saura-Calixto, F. (2011), Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: An essential physiological function, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 43–49.
- Schijlen, E.G.W.M., Ric de Vos, C.H., van Tunen, A.J., Bovy, A.G. (2004), Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants, *Phytochemistry*, 65, 2631-2648.
- Sedaj, I., Mandić, A., Sakač, M., Mišan, A., Tumbas, V. (2010), Comparison components and activity of buckwheat and wheat flours, *Cereal Chemistry*, 87, 387-392.
- Sedaj, I., Sakač, M., Mandić, A., Mišan, A., Pestorić, M., Šimurina, O., Čanadanović-Brunet, J. (2011a), Quality assessment of gluten-free crackers based on buckwheat flour, *LWT - Food Science and Technology*, 44, 694-699.
- Sedaj, I., Sakač, M., Mandić, A., Mišan, A., Tumbas, V., Hadnađev, M. (2011b), Assessment of antioxidant activity and rheological properties of wheat and buckwheat milling fractions, *Journal of Cereal Science*, 54, 347-353.
- Seidemann, J. (1993), Chokeberries a fruit little-known till now, *Dtsch Lebensmitt Rundsch*, 89, 149-151.
- Sensoy, I., Rosen, R.T., Ho, C.-T., Karwe, M.V. (2006), Effect of processing on buckwheat phenolics and antioxidant activity, *Food Chemistry*, 99, 388–393.

Serrano, J., Puupponen-Pimi, R., Dauer, A., Aura, A. M., Saura-Calixto, F. (2009), Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects, *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, 310–329.

Shahidi, F. (1998), Indicators for evaluation of lipid oxidation and off-flavor development in food, *Developments in Food Science*, 40, 55–68.

Shahidi, F., Ambigaipalan, P. (2015), Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects-A review, *Journal of functional foods*, 18, 820–897.

Sharma, U.-K., Sharma, K., Sharma, N., Singh, H.-P., Sinha, A.-K. (2008), Microwave-assisted efficient extraction of different parts of *Hippophae rhamnoides* for the comparative evaluation of antioxidant activity and qualification of its phenolic constituents by reverse-phase high performance liquid chromatography, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 374-379.

Shopova, E.G., Vaklieva-Bancheva, N.G. (2006), BASIC – A genetic algorithm for engineering problems solution, *Computers and Chemical Engineering*, 30 (8), 1293–1309.

Silva, E.M., Rogez, H., Larondelle, Y. (2007), Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology, *Separation and Purification Technology*, 55, 381–387.

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.

Siro, I., Kapolna, E., Ka'polna, B., Andrea Lugasi, A. (2008), Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review, *Appetite*, 51, 456–467.

Skala, D., Žižović, I., Gavrančić, S. (2002), Primena nadkritične ekstrakcije u prehrambenoj industriji, *Hemijska industrija*, 58 (5), 179-190.

Skapska, S., Marszaek, K., Wozniak, L., Zawada, K., Wawer, I. (2016), Aronia dietary drinks fortified with selected herbal extracts preserved by thermal pasteurization and high pressure carbon dioxide, *LWT - Food Science and Technology*, In Press, Corrected Proof, 1-4

- Skrabanja, V., Kreft, I., Golob, T., Modic, M., Ikeda, S., Ikeda, K. (2004), Nutrient content in buckwheat milling fractions, *Cereal Chemistry*, 81, 172-176.
- Skupien, K., Oszmianski, J. (2007), The effect of mineral fertilization on nutritive value and biological activity of chokeberry fruit, *Agricultural and Food Science*, 16, 46–55.
- Slimestead, R., Torskangerpoll, K., Nateland, H.S., Johannessen, T., Giske, N.H. (2005), Flavonols from black chokeberry, *Aronia melanocarpa*, *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 61-8.
- Sloan, E. (2004), The top ten functional food trends, *Food Technology*, 58, 28-51.
- Snoussi, A., Haj, B., Hayet, K., Essaidi, I., Zgoulli, S., Moncef, C.M., Thonart, P., Bouzouita, N. (2012), Improvement of the Composition of Tunisian Myrtle Berries (*Myrtus communis* L.) Alcohol Extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 608–614.
- Song, J., Li, D., Liu, C., Zhang, Y. (2011), Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from *Ipomoea batatas* leaves and its antioxidant activity, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 282–287.
- Spanilá, M., Pazourek, J., Farková, M., Havel, J. (2005), Optimization of solid-phase extraction using artificial neural networks in combination with experimental design for determination of resveratrol by capillary zone electrophoresis in wines, *Journal of Chromatography A*, 1084, 1-2, 180-185.
- Spigno, G., De Faveri, D.M. (2009), Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study, *Journal of Food Engineering*, 93, 210-217.
- Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D.M. (2007), Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics, *Journal of Food Engineering*, 81 (1), 200-208.
- Stamenković, O., Rajković K., Veličković, A., Milić P., Veljković, V. (2013), Optimization of base-catalyzed ethanolysis of sunflower oil by regression and artificial neural network models. *Fuel Processing Technology*, 114, 101–108.

Stanisavljević, I., Stojičević, S., Veličković, D., Lazić, M., Veljković, V. (2008), Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the extracts from plantain (*Plantago major L.*) leaves, *Separation Science and Technology*, 43 (14), 3652-3662.

Staško, A., Brezová, V., Biskupič, S., Mišić, V. (2007), The potential pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents, *Free Radical Research*, 41 (4), 379-390.

Steadman, K.J., Burgoon, M.S., Lewis, B.A., Edwardson, S.E., Obendorf, R.L. (2001), Minerals, phytic acid, tannin and rutin in buckwheat seed milling fractions, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 1094-1100.

Stibilj, V., Kreft, I., Smrkolj, P., Osvald, J. (2004), Enhanced selenium content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) and pumpkin (*Cucurbita pepo L.*) seeds by foliar fertilization, *European Food Research and Technology*, 219, 142-144.

Stoica R., Senin R.M., Ion R. (2013), Ethanol Concentration Effect on the Extraction of Phenolic Compounds from *Ribes nigrum* Assessed by Spectrophotometric and HPLC-DAD Methods, *Revista de Chimie*, 64, 620–624.

Stojičević, S. (2012), Kinetika ultrazvučne ekstrakcije i karakterizacija bioaktivnih jedinjenja čuvarkuće (*Sempervivum marmoreum L.*), Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu.

Stojičević, S., Stanisavljević, I., Veličković, D., Veljković, V., Lazić, M. (2008), Comparative screening of the anti-oxidant and antimicrobial activities of *Sempervivum marmoreum L.* extracts obtained by various extraction techniques, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 73 (6), 597-607.

Strigl, A.W, Leitner, E., Pfannhauser, W. (1995), Die schwarze Apfelbeere (*Aronia melanocarpa*) als natürliche Farbstoffquelle, *Dtsch Lebensmitt Rundsch*, 91, 177–80.

Sudha, M.L., Baskaran, V., Leelavathi, K. (2007), Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making, *Food Chemistry*, 104, 686–692.



- Sueiro, L., Yousef, G.G., Seigler, D., De Mejia, E.G., Grace, M.H., Lila, M.A. (2006), Chemopreventive Potential of Flavonoid Extracts from Plantation-Bred and Wild *Aronia melanocarpa* (Black Chokeberry) Fruits, *Journal of Food Science*, 71 (8), 480-488.
- Sun, J., Chu, Y.F., Wu, X., Liu, R.H. (2002), Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7449–7454.
- Sun-Waterhouse, D., Teoh, A., Massarotto, C., Wibisono, R., Wadhwa, S. (2010), Comparative analysis of fruit-based functional snack bars, *Food Chemistry*, 119, 1369–1379.
- Suresh, M.V.J.J., Reddy, K.S., Kumar, A.K. (2011), ANN-GA based optimization of a high ash coal-fired supercritical power plant, *Applied Energy*, 88, 4867–4873.
- Szopa, A., Kokotkiewicz, A., Kubica, K., Banaszczak, P., Wojtanowska-Krośniak, A., Krośniak, M., Marzec-Wróblewska, U., Badura, A., Zagrodzki, P., Bucinski, A., Luczkiewicz, M., Ekiert, H. (2017), Comparative analysis of different groups of phenolic compounds in fruit and leaf extracts of *Aronia* sp.: *A. melanocarpa*, *A. arbutifolia*, and *A. prunifolia* and their antioxidant activities, *European Food Research and Technology*, 243 (9), 1645-1657.
- Šarić, B., Mišan, A., Mandić, A., Nedeljković, N., Pojić, M., Pestorić, M., Đilas, S. (2016), Valorisation of raspberry and blueberry pomace through the formulation of value-added gluten-free cookies, *Journal of Food Science and Technology*, 53 (2), 1140-1150.
- Šarić, B. (2016a), Iskorišćenje troška borovnice i maline u formulaciji bezglutenskog keksa sa dodatkom vrednošću, *Doktorska disertacija*, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Šavikin, K., Menković, N., Zdunić, G., Pljevljakušić, D., Spasić, S., Kardum, N., Konić-Ristić, A. (2014), Dietary Supplementation with Polyphenol-Rich Chokeberry Juice Improves Skin Morphology in Cellulite, *Journal of Medicinal Food*, 17 (5), 582-587.
- Šimurina, O., Sedej, I., Sakač, M., Hadnađev, M., Filipčev, B., Pestorić, M., Pribus, V. (2009), Buckwheat in the wholegrain cracker production, *Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi PTEP*, 13 (2), 153-156.

Škrbić, B., Cvejanov, J. (2011), The enrichment of wheat cookies with high-oleic sunflower seed and hull-less barley flour: Impact on nutritional composition, content of heavy elements and physical properties, *Food Chemistry*, 124, 1416–1422.

Škrbic, B., Filipcev, B. (2007), Element intakes through the consumption of different types of bread by Serbian population, *Acta Alimentaria*, 36 (2), 217-229.

Tabart, J., Kevers, C., Sipel, A., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Dommes, J. (2007), Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage, *Food Chemistry*, 105 (3), 1268–1275.

Taheri, R., Connolly, B.A., Brand, M.H., Bolling, B.W. (2013), Underutilized Chokeberry (*Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia*, *Aronia prunifolia*) Accessions Are Rich Sources of Anthocyanins, Flavonoids, Hydroxycinnamic Acids, and Proanthocyanidins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 8581-8588.

Tambourgi, E.B., Fischer, G.A., Frattini Fileti, A.M. (2006), Neural modeling for cytochrome b5 extraction, *Process Biochemistry*, 41 (6), 1272–1275.

Tao, Y., Wang, Y., Pan, M., Zhong, S., Wu, Y., Yang, R., Han, Y. (2017), Combined ANFIS and numerical methods to simulate ultrasoundassisted extraction of phenolics from chokeberry cultivated in China and analysis of phenolic composition, *Separation and Purification Technology*, 178, 178–188.

Teng, H., Ghafoor, K., Choi, Y.H. (2009), Optimization of Microwave-assisted Extraction of Active Components from Chinese Quince using Response Surface Methodology, *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52 (6), 694-701.

Thi, N.D., Hwang, E.S. (2016), Effects of drying methods on contents of bioactive compounds and antioxidant activities of black chokeberries (*Aronia melanocarpa*), *Food Science and Biotechnology*, 25, 55–61.

Tiwari, U., Cummins, E. (2013), Factors influencing levels of phytochemicals in selected fruit and vegetables during pre- and post-harvest food processing operations, *Food Research International*, 50 (2), 497-506.

- Tolić, A. (1996), Operacija ekstrakcije tečno-tečno, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Torbica, A., Hadnadev, M., Dapčević Hadnadev, T. (2012), Rice and buckwheat flour characterisation and its relation to cookie quality, *Food Research International*, 48, 277–283.
- Torres, P., Poveda, A., Jimenez-Barbero, J., Ballesteros, A., Plou, F.J. (2010), Regioselective lipase-catalyzed synthesis of 3-O-acyl derivatives of resveratrol and study of their antioxidant properties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 807–813.
- Tsao, R., Yang, R. (2003), Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1018 (1), 29-40.
- Urquiaga, I., Leighton, F. (2000): Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biological research*, 33 (2), 55-64.
- Valcheva-Kuzmanova, S., Belcheva, A. (2006), Current knowledge of *Aronia melanocarpa* as a medicinal plant, *Folia Medica*, 48 (2), 11–17.
- Valcheva-Kuzmanova, S., Borisova, P., Galunska, B., Krasnaliev, I., Belcheva, A. (2004), Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from *Aronia melanocarpa* on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 56, 195-201.
- Varela, C.E., Fromentin, E., Roller, M., Villarreal, F., Ramirez-Sanchez, I. (2016), Effects of a natural extract of *Aronia melanocarpa* berry on endothelial cell oxide production, *Journal of Food Biochemistry*, 40, 404-410.
- Vazques-Cruz, M.A., Jiménez-García, S.N., Torres-Pacheco, I., Guzman-Maldonado, S.H., Guevara-Gonzalez, R.G., Miranda-Lopez, R. (2012), Effect of maturity stage and storage on flavor compounds and sensory description of berrycactus (*Myrtillocactus geometrizans*), *Journal of Food Science*, 77 (4), 366–373.
- Veljković, V., Milenović, D. (2002), Analiza ekstrakcije rezinoida kantariona (*Hypericum perforatum* L.) II. Poređenje modela kinetike ekstrakcije, *Hemijska industrija*, 56, 60-67.

Vera Candioti, L., De Zan, M.M., Cámara, M.S., Goicoechea, H.C. (2014), Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development, *Talanta*, 124, 123-138.

Villaño, D., Fernandez-Pachon, M.S., Moya, M.L., Troncoso, A.M., Garcia-Parrilla, M.C. (2007), Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical, *Talanta*, 71 (1), 230-235.

Vinatoru, M., Maricela, T., Mason T.J. (1999), Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from plants and their constituents, *Advances in Sonochemistry*, 5, 209-248.

Vinson, J.A., Su, X., Zubik, L., Bose, P. (2001), Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5315–5321.

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

Wang, Y., Zhu, J., Meng, X., Liu, S., Mu, J., Ning, C. (2016b), Comparison of polyphenol, anthocyanin and antioxidant capacity in four varieties of *Lonicera caerulea* berry extracts, *Food Chemistry*, 197, 522–529.

Wang, L., Li, D., Bao, C., You, J., Wang, Z., Shi, Y. (2008), Ultrasonic extraction and separation of anthraquinones from *Rheum palmatum* L., *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 738-746.

Wang, Y., Zhao, L., Wang, D., Huo, Y., Ji, B. (2016a), Anthocyanin-rich extracts from blackberry, wild blueberry, strawberry, and chokeberry: antioxidant activity and inhibitory effect on oleic acid-induced hepatic steatosis in vitro, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 2494–2503.

Wangensteen, H., Bräunlich, M., Nikolić, V., Malterud, K.-E., Slimestad, R., Barsett, H. (2014), Anthocyanins, proanthocyanidins and total phenolics in four cultivars of aronia: antioxidant and enzyme inhibitory effects, *Journal of Functional Foods*, 7, 746–752.

Watanabe, M. (1998), Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) groats, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (3), 839-845.

Watanabe, M., Ohshita, Y., Tsushida, T. (1997), Antioxidant compounds from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Mönch) hulls, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1039–1044.

Wen, Y., Chen, H., Zhou, X., Deng, Q., Zhao, Y., Zhao, C., Gong, X. (2015), Optimization of the microwave-assisted extraction and antioxidant activities of anthocyanins from blackberry using a response surface methodology, *Royal Society of Chemistry Advances*, 5 (25), 19686-19695.

Wink, M. (2003), Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective, *Phytochemistry*, 64, 3-19.

Wolfe, K.L., Kang, X., He, X., Dong, M., Zhang, Q., Liu, R.H. (2008), Cellular antioxidant activity of common fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8418–8426.

Wong, W.H., Lee, W.X., Ramanan, R.N., Tee, L.H., Kong, K.W., Galanakis, C.M., Sun, J., Prasad, K.N. (2015), Two level half factorial design for the extraction of phenolics, flavonoids and antioxidants recovery from palm kernel byproduct, *Industrial Crops Products*, 63, 238-248.

World Health Organization (2002a), *World health report 2002-Reducing risk, promoting healthy life* Geneva, Suiza: OMS. Available from:[http://www.who.int/entity/whr/2002/en/whr02\\_en..pdf](http://www.who.int/entity/whr/2002/en/whr02_en..pdf)

World Health Organization (2002b), *Food safety and food borne illness*. Geneva, Suiza: OMS. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>.

Wronkowska, M., Zielinska, D., Szawara-Nowak, D., Troszynska, A., Maria Soral-Smietana, M. (2010), Antioxidative and reducing capacity, macroelements content and sensorial properties of buckwheat-enhanced gluten-free bread, *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1993–2000.

Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L. (2006), Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4069–4075.

Wu, X., Gu, L., Prior, R.L., McKay, S. (2004), Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and Their Antioxidant Capacity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7846-785.

Xiao W., Han L., Shi B. (2008), Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix Astragali*, Separation and Purification Technology, 62, 614-618.

Xie, D.-T., Wang, Y.-Q., Kang, Y., Hu, Q.-F., Su, N.-Y., Huang, J.-M., Che, C.-T., Guo, J.-X. (2014), Microwave-assisted extraction of bioactive alkaloids from *Stephania sinica*, Separation and Purification Technology, 130, 173–181.

Xu, M., Shao, Q., Ye, S., Li, S., Wu, M., Ding, M., Li, Y. (2017), Simultaneous Extraction and Identification of Phenolic Compounds in *Anoectochilus roxburghii* Using Microwave-Assisted Extraction Combined with UPLC-Q-TOF-MS/MS and Their Antioxidant Activities, Frontiers in Plant Science, 8, 1-11.

Xue-Gui, L., Fu-yu, J., Pin-yi, G., Mei, J., Di, Y., Zhong-feng, N., Zhen-xue, Z. (2015), Optimization of Extraction Conditions for Flavonoids of *Physalis alkekengi* var. *franchetii* Stems by Response Surface Methodology and Inhibition of Acetylcholinesterase Activity, Journal of Mexican Chemical Society, 59 (1), 59-66.

Yang, L., Jiang, J.-G., Li, W.-F., Chen, J., Wang, D.-Y., Zhu, L. (2009), Optimum extraction process of polyphenols from the bark of *Phyllanthus emblica* L. based on the response surface methodology, Journal of Separation Science, 32 (9), 1437–1444.

Yoon, H.S., Kim, J.W., Kim, S.H., Kim, Y.G., Eom, H.J. (2014), Quality characteristics of bread added with aronia powder (*Aronia melanocarpa*), Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 43, 273-280.

Yu, S., Xu, L., Wei, P., Qin, Z., Li, J., Peng, H. (2008), Study on analgesic effect of traditional Chinese medicine, Chinese Journal of Integrative Medicine, 14, 151-156.

Zhang, H.F., Yang, X.H., Zhao, L.D., Wang, Y. (2009), Ultrasonic assisted extraction of epimedin C from fresh leaves of Epimedium and extraction mechanism, Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10, 54-60.

Zhang, H.-F., Yang, X.-H., Wang, Y. (2011), Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions, Trends in Food Science and Technology, 22, 672–688.

Zhang, L., Liu, Z. (2008), Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes, *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 731-737.

Zhang, Y., Liu, Z., Li Y., Chi R. (2014). Optimization of ionic liquid-based microwave-assisted extraction of isoflavones from *Radix puerariae* by response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 129, 71–79.

Zhang, Z.S., Li, D., Wang, L.J., Ozkan, N., Chen, X.D., Mao, Z.H., et al. (2007), Optimisation of ethanol–water extraction of lignins from flaxseed, *Separation and Purification Technology*, 57, 17–24.

Zhao, C., Giusti, M.M., Malik, M., Moyer, M.P., Magnuson, B.A. (2004), Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6122-8.

Zhao, L.Y., Chen, G.T., Zhao, G.H., Hu, X.S. (2009), Optimization of microwave-assisted extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* by response surface methodology and antioxidant activities of the extracts, *Separation Science and Technology*, 44, 243–262.

Zhao, W., Yu, Z., Liu, J., Yu, Y., Yin, Y., Lin, S., Chen, F. (2011), Optimized extraction of polysaccharides from corn silk by pulsed electric field and response surface quadratic design, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 2201-2209.

Zheng, W., Wang, S.Y. (2003), Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), 502–509.

Zheng, W., Wang, X., Lan, Y., Shi, J., Jun Xue, S., Liu, C. (2009), Application of response surface methodology to optimize microwave-assisted extraction of silymarin from milk thistle seeds, *Separation and Purification Technology*, 70, 34–40.

Zheng, X., Liu, B., Li, L., Zhu, X. (2011), Microwave-assisted extraction and antioxidant activity of total phenolic compounds from pomegranate peel, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (6), 1004–1011.

Zhou, H., Liu, C. (2006), Microwave-assisted extraction of solanesol from tobacco leaves, *Journal of Chromatography A*, 1129, 135-139.

Zhu, Z., Guan, Q., Guo, Y., He, J., Liu, G., Li, S., Barba, F.J., Michel, Y. Jaffrin, M.Y. (2016), Green ultrasound-assisted extraction of anthocyanin and phenolic compounds from purple sweet potato using response surface methodology, *International Agrophysics*, 30, 113-122.

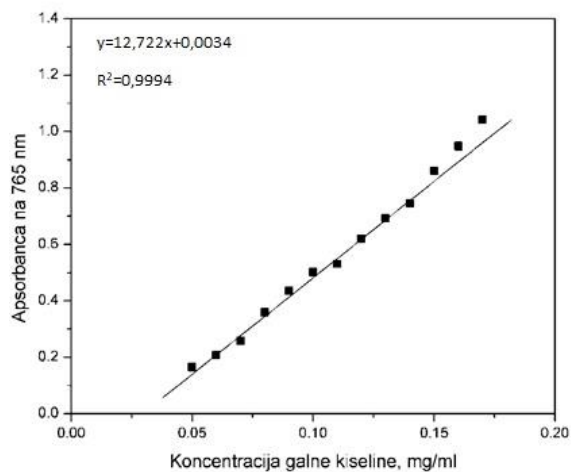
Zill-E-Huma, Vian, M.A., Maingonnat, J.F., Chemat, F. (2009), Clean recovery of antioxidant flavonoids from onions: optimising solvent free microwave extraction method, *Journal of Chromatography A*, 1216 (45), 7700–7707.

Zou, T., Wu, H., Li, H., Jia, Q., Song, G. (2013), Comparison of microwave-assisted and conventional extraction of mangiferin from mango (*Mangifera indica* L.) leaves, *Journal of Separation Science*, 36 (20), 3457–3462.

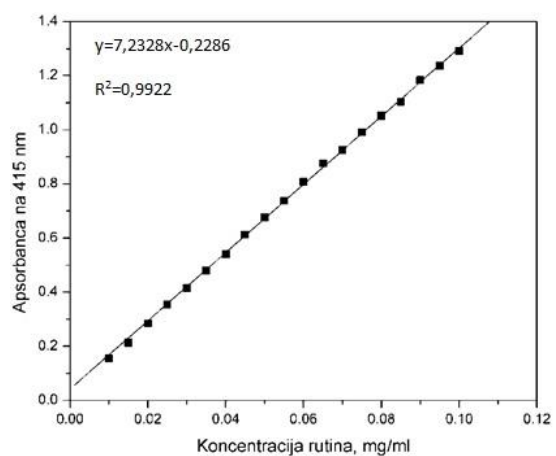
Zucco, F., Borsuk, Y., Arntfield, S.D. (2011), Physical and nutritional evaluation of wheat cookies supplemented with pulse flours of different particle sizes, *LWT - Food Science and Technology*, 44, 2070-2076.



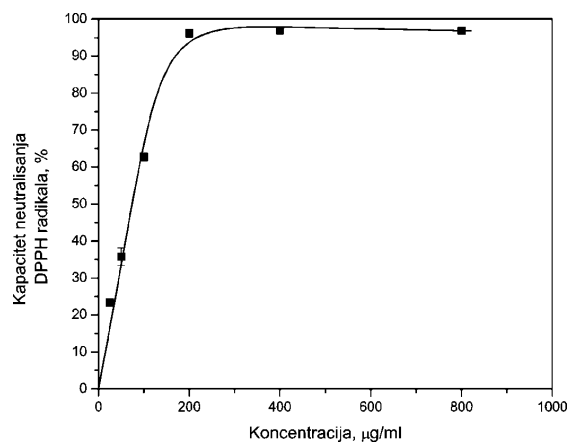
## 7. PRILOG



Slika PS1 Kalibraciona prava standardnog rastvora galne kiseline



Slika PS2 Kalibraciona prava standardnog rastvora rutina



Slika PS3 Antioksidativna aktivnost troloksa (referentnog standarda)



Slika PS4 Izgled kontrolnih uzoraka keksa sa 10% (uzorak 40), 20% (uzorak 41) i 30% (uzorak 42) integralnog heljdinog brašna



Slika PS5 Izgled uzoraka keksa sa 20% integralnog heljdinog brašna i 20 % samlevenog ploda (uzorak 39), soka (uzorak 22) ili ekstrakta (uzorak 4)



Slika PS6 Izgled uzoraka keksa sa 10% integralnog heljdinog brašna i 10 % samlevenog ploda (uzorak 39), soka (uzorak 22) ili ekstrakta (uzorak 4)





Slika PS7 Izgled uzoraka keksa sa 30% integralnog heljdinog brašna i 30 % samlevenog ploda (uzorak 1), soka (uzorak 32) ili ekstrakta (uzorak 35)

Tabela PT1 Prinos ekstraktivnih supstanci (g ekstraktivnih supstanci/100 g svežeg biljnog materijala) u ekstraktima plodova aronije dobijenih pod različitim operativnim uslovima

Koncentracija etanolnog rastvora, %	300 W			450 W			600 W		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
25	10,7±1,70	14,5±0,23	16,2±0,55	13,9±0,17	15,8±0,26	16,3±0,26	15,1±0,43	16,0±1,32	17,2±0,22
50	11,6±0,25	14,9±0,28	18,1±0,19	16,6±0,48	16,9±0,37	18,0±0,43	14,3±0,23	17,2±0,21	20,3±0,23
75	11,1±0,55	15,8±1,21	17,7±0,26	14,9±0,65	15,8±0,10	18,4±0,23	16,9±0,03	17,0±0,40	18,4±0,26

Tabela PT2 Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja (mg galne kiseline/g suvog ekstrakta) u ekstraktima plodova aronije dobijenih pod različitim operativnim uslovima

Koncentracija etanolnog rastvora, %	300 W			450 W			600 W		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
25	31,6±0,29	34,3±0,88	34,9±0,29	33,51±0,68	34,9±0,35	35,7±0,42	33,3±0,96	32,3±0,48	33,4±0,71
50	35,5±0,49	35,9±0,63	36,8±0,21	34,9±0,64	36,8±0,60	37,6±0,50	37,2±0,37	38,2±1,23	38,8±0,52
75	34,6±0,69	35,2±0,44	36,0±0,55	33,7±0,49	34,0±0,32	36,7±1,13	34,6±0,58	34,2±0,50	36,7±0,14

Tabela PT3 Ukupni sadržaj flavonoida (mg rutina/g suvog ekstrakta) u ekstraktima plodova aronije dobijenih pod različitim operativnim uslovima

Koncentracija etanolnog rastvora, %	300 W			450 W			600 W		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
25	12,9±0,44	17,9±0,27	19,9±0,91	15,7±0,22	18,2±0,41	20,1±0,27	18,3±0,37	18,7±0,91	21,1±0,34
50	15,0±0,51	18,5±0,08	19,1±0,30	18,0±0,25	20,0±0,29	21,5±0,61	19,8±0,7	21,8±0,28	23,2±0,13
75	15,4±0,58	17,5±0,43	19,6±0,33	17,5±0,33	19,9±0,27	20,3±0,14	15,6±0,40	19,8±0,27	20,2±0,11

Tabela PT4 Antioksidativna aktivnost ekstrakata aronije određivana primenom DPPH i FRAP metode

		<b>25% EtOH</b>								
		300 W			450 W			600 W		
		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
DPPH	EC <sub>50</sub> , mg/cm <sup>3</sup>	45,66	41,37	36,69	39,85	35,21	32,49	38,87	34,57	33,8
	A <sub>AE</sub> , cm <sup>3</sup> /mg	0,0219	0,0242	0,0276	0,0251	0,0284	0,0308	0,0257	0,0289	0,0296
FRAP	μmol Fe <sup>2+</sup> /mg	8,92	10,81	11,77	11,33	11,97	12,42	11,35	12,52	12,78
		<b>50% EtOH</b>								
		300 W			450 W			600 W		
		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
DPPH	EC <sub>50</sub> , mg/cm <sup>3</sup>	44,53	39,96	32,82	40,25	33,3	30,25	38,54	30,8	27,73
	A <sub>AE</sub> , cm <sup>3</sup> /mg	0,0224	0,0250	0,0305	0,0248	0,0301	0,0331	0,0259	0,0325	0,0361
FRAP	μmol Fe <sup>2+</sup> /mg	9,34	12,1	13,11	11,41	12,06	13,47	11,61	12,81	13,61
		<b>75% EtOH</b>								
		300 W			450 W			600 W		
		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
DPPH	EC <sub>50</sub> , mg/cm <sup>3</sup>	49,39	44,15	39,22	48,66	38,98	34,82	45,62	40,35	36,15
	A <sub>AE</sub> , cm <sup>3</sup> /mg	0,0202	0,0226	0,0255	0,0206	0,0256	0,0287	0,0219	0,0248	0,0277
FRAP	μmol Fe <sup>2+</sup> /mg	8,47	10,49	11,52	10,48	11,08	11,55	11,52	12,2	12,39

Tabela PT5 Prikaz eksperimentalnih vrednosti praćenih odzivnih veličina i vrednosti odziva predviđenih RSM metodom

Redni broj	Konc. EtOH %	Mikrotalasna snaga ,W	Ekstrakc. vreme, min	Prinos ES g/100 g svežeg bilj,mat,		Ukupan sdaržaj fenolnih jedinjenja, mg GAE/g SE		Ukupan sadržaj flavonoida mg RE/g SE		AOA, DPPH EC <sub>50</sub> mg/cm <sup>3</sup>		AOA, FRAP µmol Fe <sup>2+</sup> /mg	
				EXP	PRE	EXP	PRE	EXP	PRE	EXP	PRE	EXP	PRE
1	50	450	10	16,9	16,94	36,80	36,75	20,25	20,13	38,56	33,72	12,02	12,38
2	50	300	10	14,9	15,73	35,93	36,75	18,53	18,87	39,96	38,06	12,10	11,59
3	50	450	5	16,6	14,97	34,94	35,75	18,01	18,08	40,25	38,58	11,41	11,37
4	75	450	10	15,8	17,51	34,06	35,02	19,94	18,83	38,98	40,19	11,08	11,36
5	25	300	5	10,7	12,44	31,64	32,66	12,85	15,52	45,66	45,07	8,92	9,57
6	50	600	15	20,3	19,37	38,85	37,75	23,25	23,44	27,73	27,94	13,61	13,73
7	25	450	15	16,3	18,34	35,70	34,66	20,11	20,88	32,49	31,01	12,42	12,83
8	75	300	15	17,7	19,02	36,07	36,02	19,56	19,62	39,22	39,67	11,52	12,03
9	50	450	10	19,4	16,94	36,47	36,75	17,67	20,13	34,65	33,72	12,68	12,38
10	75	600	5	16,9	17,50	34,58	34,02	15,61	18,04	45,62	44,13	11,52	11,59
11	25	600	10	16,0	17,58	32,35	33,66	18,67	20,09	34,57	34,95	12,52	12,61
12	50	450	10	15,9	16,94	36,08	36,75	19,78	20,13	32,10	33,72	12,15	12,38
13	50	300	15	18,1	18,45	36,80	37,75	19,12	20,92	32,82	33,20	13,11	13,05
14	75	600	10	17,0	18,72	34,23	35,02	19,81	20,09	40,35	39,27	12,20	12,15
15	25	450	5	13,9	14,40	33,15	32,66	15,67	16,78	39,85	40,73	11,33	10,81
16	25	300	10	14,5	15,16	34,32	33,66	17,89	17,57	41,37	40,21	10,81	11,03
17	75	450	15	18,4	19,48	36,67	36,02	20,31	20,88	34,82	35,33	11,55	12,37
18	25	600	15	17,2	18,80	33,40	34,66	21,09	22,14	33,80	30,09	12,78	13,17
19	50	450	10	15,4	16,94	37,30	36,75	20,09	20,13	32,36	33,72	11,87	12,38
20	50	600	5	14,3	16,93	37,16	35,75	19,75	19,34	38,54	37,66	11,61	12,61
21	50	450	10	14,9	16,94	37,12	36,75	20,57	20,13	34,68	33,72	12,40	12,38
22	75	300	5	11,1	13,58	34,63	34,02	15,37	15,52	49,39	49,39	8,47	9,11
23	75	300	10	15,8	16,30	35,23	35,02	17,5	17,57	44,15	44,53	10,49	10,57
24	75	600	15	18,4	19,94	36,72	36,02	20,17	22,14	36,15	34,41	12,39	12,71
25	25	600	5	15,1	16,36	33,31	32,66	18,3	18,04	38,87	39,81	11,35	12,05
26	75	450	5	14,9	15,54	33,75	34,02	17,5	16,78	48,66	45,05	10,48	10,35
27	50	300	5	11,6	13,01	35,48	35,75	14,98	16,82	44,53	42,92	9,34	10,13
28	50	450	15	18,0	18,91	37,57	37,75	21,46	22,18	30,25	28,86	13,47	13,39
29	50	450	10	17,7	16,94	36,98	36,75	22,03	20,13	33,30	33,72	12,06	12,38
30	25	300	15	16,2	17,88	34,95	34,66	19,92	19,62	36,69	35,35	11,77	12,49
31	50	600	10	17,2	18,15	38,25	36,75	21,84	21,39	30,80	32,80	12,81	13,17
32	50	450	10	18,1	16,94	36,70	36,75	19,38	20,13	30,88	33,72	12,43	12,38
33	25	450	10	15,8	16,37	34,95	33,66	18,17	18,83	35,21	35,87	11,97	11,82

EXP -Eksperimentalno dobijene vrednosti odziva PRE - Predviđene vrednosti odziva, SE - suvog ekstrakta



Tabela PT6 Sadržaj ukupnih fenola (mg galne kiseline/g keksa) u ekstraktima keksa

Vrsta biljnog materijala	10% heljdinog brašna			20% heljdinog brašna			30% heljdinog brašna		
	10% biljnog materijala	20% biljnog materijala	30% biljnog materijala	10% biljnog materijala	20% biljnog materijala	30% biljnog materijala	10% biljnog materijala	20% biljnog materijala	30% biljnog materijala
PLOD					4,26±0,03				
					3,85±0,05				
	2,29±0,05	3,74±0,05	4,76±0,01	2,48±0,00	3,89±0,02	4,63±0,15	2,81±0,01	4,18±0,12	4,48±0,02
					4,58±0,01				
					4,26±0,05				
EKSTRAKT					3,77±0,03				
					3,92±0,01				
	3,16±0,09	3,82±0,01	4,02±0,09	3,81±0,02	3,78±0,04	4,15±0,02	3,52±0,01	4,19±0,01	4,19±0,02
					4,23±0,02				
					4,04±0,02				
SOK					3,40±0,03				
					4,10±0,01				
	3,05±0,06	3,43±0,09	4,18±0,01	2,94±0,06	3,27±0,06	3,98±0,04	3,08±0,09	3,70±0,02	4,51±0,01
					3,76±0,01				
					4,12±0,02				

Tabela PT7 Sadržaj ukupnih flavonoida (mg rutina/g keksa) u ekstraktima keksa

Vrsta biljnog materijala	10% heljdinog brašna			20% heljdinog brašna			30% heljdinog brašna			
	10% biljnog materijala	20% biljnog materijala	30% biljnog materijala	10% biljnog materijala	20% biljnog materijala	30% biljnog materijala	10% biljnog materijala	20% biljnog materijala	30% biljnog materijala	
PLOD					1,807±0,01					
					1,746±0,08					
		1,260±0,03	1,938±0,03	2,214±0,01	1,444±0,01	1,919±0,06	1,973±0,07	1,735±0,05	2,064±0,07	2,386±0,08
						1,902±0,07				
						1,924±0,02				
EKSTRAKT					1,829±0,02					
					2,042±0,01					
		1,661±0,01	2,148±0,02	2,264±0,03	1,952±0,06	1,910±0,03	2,340±0,03	2,069±0,03	2,263±0,01	2,505±0,03
						2,093±0,04				
						2,047±0,04				
SOK					1,714±0,01					
					1,997±0,07					
		1,478±0,02	1,746±0,06	2,187±0,01	1,576±0,02	1,877±0,09	2,236±0,01	1,832±0,03	2,085±0,03	2,181±0,03
						1,885±0,00				
						1,856±0,09				

Tabela PT8 Antioksidativna aktivnost ekstrakata keksa (% neutralizacije DPPH radikala) određena DPPH testom

Vrsta biljnog materijala	10% heljdinog brašna			20% heljdinog brašna			30% heljdinog brašna		
	10% biljnog materijala	20% biljnog materijala	30% biljnog materijala	10% biljnog materijala	20% biljnog materijala	30% biljnog materijala	10% biljnog materijala	20% biljnog materijala	30% biljnog materijala
PLOD					91,8±1,66				
					82,1±0,39				
	68,5±1,28	68,5±1,28	90,5±2,12	74,6±0,19	89,1±0,95	84,6±0,80	88,4±0,43	92,2±1,15	96,9±0,67
					89,9±0,32				
					85,9±0,73				
EKSTRAKT					87,0±0,22				
					91,0±0,99				
	79,0±3,14	85,4±0,67	91,6±0,82	79,7±0,54	86,2±1,45	92,0±1,51	86,4±0,73	88,3±0,84	98,4±0,87
					88,9±1,21				
					85,6±0,30				
SOK					87,4±0,61				
					84,6±0,64				
	68,4±1,91	78,7±1,18	88,8±0,49	76,8±0,88	84,1±1,62	90,9±0,96	85,7±0,98	88,4±1,69	94,4±0,67
					87,8±1,66				
					87,3±0,86				

Tabela PT9 Antioksidativna aktivnost ekstrakata keksa (izraženi kao mmol Fe<sup>2+</sup>/g keksa) određena FRAP testom

Vrsta biljnog materijala	10% heljdinogbrašna			20% heljdinogbrašna			30% heljdinogbrašna		
	10% biljnogmaterijala	20% biljnogmaterijala	30% biljnogmaterijala	10% biljnogmaterijala	20% biljnogmaterijala	30% biljnogmaterijala	10% biljnogmaterijala	20% biljnogmaterijala	30% biljnogmaterijala
PLOD					146,3±1,2				
					121,06±3,8				
	69,77±1,3	111,26±0,8	191,78±1,6	79,69±1,3	148,76±1,2	207,56±0,6	81,04±0,8	99,35±2,0	223,94±0,7
					134,33±1,2				
					146,15±2,1				
EKSTRAKT					125,58±0,6				
					127,63±0,4				
	59,62±1,9	102,75±15,	126,4±1,0	66,17±1,5	129,98±1,1	169,24±0,3	111,79±1,2	131,16±1,4	161,20±1,4
					120,06±3,4				
					131,16±1,4				
SOK					85,04±0,8				
					91,25±0,9				
	43,07±1,0	77,34±0,5	179,40±1,1	53,40±1,5	89,16±2,2	108,5±1,3	81,16±1,4	101,29±0,8	126,93±0,9
					92,54±0,4				
					92,19±1,0				

Tabela PT10 Detaljne recepture za izradu keksa povećane nutritivne vrednostisa dodatkom aronije i heljde

Broj eksperimenta	BM (%)	Vrsta BM	BM (g) Preračunato na suhu masu BM	Uzeto BM za pripremu	Ukupno brašna (g)	IHB (%)	IHB (g)	Pšenično brašno T-500 (g)
1	30	plod	7,20	30 g	92,80	30	27,84	64,96
2	20	sok	2,15	14,8 ml	97,85	20	19,57	72,28
3	30	ekstrakt	3,12	53,2 ml	96,88	10	9,69	87,19
4	10	ekstrakt	1,04	17,7 ml	98,84	10	9,88	88,96
5	20	plod	4,80	20 g	95,20	20	19,04	76,16
6	34,14	sok	3,68	25,3 ml	96,32	20	19,26	77,06
7	20	plod	4,80	20 g	95,20	20	19,04	76,16
8	34,14	plod	8,19	34,14 g	91,80	20	18,36	73,44
9	20	plod	4,80	20 g	95,20	20	19,04	76,16
10	30	plod	7,20	30 g	92,80	10	9,28	83,52
11	20	ekstrakt	2,08	35,5 ml	97,92	20	19,58	78,34
12	20	plod	4,80	20 g	95,20	20	19,04	76,16
13	20	ekstrakt	2,08	35,5 ml	97,92	20	19,58	78,34
14	20	ekstrakt	2,08	35,5 ml	97,92	5,86	5,74	92,18
15	20	sok	2,15	14,8 ml	97,85	20	19,57	78,28
16	10	ekstrakt	1,04	17,7 ml	98,86	30	29,69	69,27
17	20	ekstrakt	2,08	35,5 ml	97,92	20	19,58	78,34
18	20	plod	4,80	20 g	95,20	5,86	5,58	89,62
19	5,86	ekstrakt	0,61	10,4 ml	99,39	20	19,88	79,51
20	30	sok	3,23	22,2 ml	96,77	10	9,68	87,09
21	20	sok	2,15	14,8 ml	97,85	20	19,57	78,28
22	10	sok	1,08	7,4 ml	98,92	10	9,89	89,03
23	34,14	ekstrakt	3,55	60,5 ml	96,45	20	19,29	77,16
24	20	sok	2,15	14,8 ml	97,85	20	19,57	78,28
25	5,86	sok	0,63	4,3 ml	99,37	20	19,87	79,50
26	20	sok	2,15	14,8 ml	97,85	34,14	33,40	64,45
27	5,86	plod	1,40	5,86 g	98,59	20	19,72	78,87
28	10	sok	1,08	7,4 ml	98,92	30	29,68	69,24
29	20	sok	2,15	14,8 ml	97,85	20	19,57	78,28
30	20	ekstrakt	2,08	35,5 ml	97,92	20	19,58	78,34
31	20	ekstrakt	2,08	35,5 ml	97,92	34,14	33,43	64,49
32	30	sok	3,23	22,2 ml	96,77	30	29,03	67,74
33	20	plod	4,80	20 g	95,20	20	19,04	76,16
34	20	ekstrakt	2,08	35,5 ml	97,92	20	19,58	78,34
35	30	ekstrakt	3,12	53,2 ml	96,88	30	29,06	67,82
36	20	sok	2,15	14,8 ml	97,85	5,86	5,73	92,12
37	10	plod	2,40	10 g	97,60	30	29,28	68,32
38	20	plod	4,80	20 g	95,20	34,14	32,50	62,70
39	10	plod	2,40	10 g	97,60	10	9,76	87,84
40	/	/	/	/	100	10	10	90
41	/	/	/	/	100	20	20	80
42	/	/	/	/	100	30	30	70

BM – biljni materijal, IHB – integralno heljdino brašno

## BIOGRAFIJA

Валентина М. Симић рођена је 18. марта 1970. године у Крушевцу где је завршила основну и средњу школу. Вишу технолошко-техничку школу у Крушевцу, смер хемијска технологија, уписала је 1994. године и дипломирала на истој 1997, године са просечном оценом у току студирања 9,25. Основне студије на Природно-математичком факултету Универзитета у Приштини уписала је 1999. године на студијском програму хемија и на истом дипломирала 2003. године са просечном оценом 9,09 у току студирања и добила звање дипломирани хемичар. Докторске студије на Технолошком факултету у Лесковцу, студијски програм Технолошко инжењерство, уписала је школске 2011. године, где је положила све испите предвиђене планом и програмом са просечном оценом 9,70. У оквиру докторских студија бавила се научним истраживањима у области примене савремених техника екстракције и карактеризације биоактивних једињења из биљака, као и њихове примене у добијању нутритивно вредних прехранбених производа. У Високој техничко-технолошкој школи струковних студија у Крушевцу ради од 1997. године најпре на месту стручног сарадника у настави, а од новембра 2012. године (у оквиру два reizборна периода) у истој установи добија избор у звање асистента за научне области хемије и технологије и ради на реализацији експерименталне наставе на следећим предметима: Технологија прехранбених производа, Сировине у технологији биљних и анималних производа, Прерада животних намирница, Микробиологија и Општа и неорганска хемија. На наведеном радном месту је и тренутно ангажована. Коаутор је Практикума за општу и неорганску хемију (Практикум за општу и неорганску хемију, С. Белобрковић, Б. Вукановић, М. Вукановић, В. Симић, Крушевац, 2000). Коаутор је једног рада објављеног у међународном часопису (категорије М21), једног рада у часопису од националног значаја (М52), више радова објављених на скуповима међународног и националног значаја (категорије М34 и М64).

## BIBLIOGRAFIJA

### **Rad objavljen u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21)**

1. Valentina M. Simić, Katarina M. Rajković, Saša S. Stojičević, Dragan T. Veličković, Nada Č. Nikolić, Miodrag M. Lazić, Ivana T. Karabegović, Optimization of microwave-assisted extraction of total polyphenolic compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network, Separation and Purification Technology, 2016, 160, 89-97.

### **Rad objavljen u časopisu od nacionalnog značaja (M52)**

1. Valentina M. Simić, Saša S. Stojičević, Dragan T. Veličković, Nada Č. Nikolić, Miodrag M. Lazić, Ivana T. Karabegović, RSM approach for modeling and optimization of microwave-assisted extraction of chokeberry, Advanced Technologies, 2018, IN PRESS

### **Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini (M33)**

1. Valentina M. Simić, Ivana T. Karabegović, Marijana Gavrilović, Nutritive quality monitoring of cookies containing buckwheat flour, V International Scientific Conference, Quality system conditions for successful business and competitiveness, Kopaonik, 29.11.-01.12. 2017, Proceedings, 77-84

### **Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34)**

1. Valentina M. Simić, Ivana T. Karabegović, Saša S. Stojičević, Dragan T. Veličković, Nada Č. Nikolić, Miodrag L. Lazić, Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) berries, Belgrade Food International Conference: Food, Health and Well Being, Book of Abstracts, pp. 52, November 26-28, 2012, Belgrade, Serbia.

2. Ivana Karabegović, Nada Nikolić, Valentina Simić, Danijela Mančić, Miodrag Lazić (2015), Optimization of the extraction of total flavonoids from *Solanum retroflexum* Dun. fruit using the response surface methodology, The 19<sup>th</sup> International Congress Phytopharm 2015, Abstracts book, pp. 39, 21-24. July 2015, Bonn, Germany.

3. Saša Stojičević, Ivana Karabegović, Dragan Veličković, Valentina Simić, Nada Nikolić, Miodrag Lazić, Kinetics of direct ultrasound-assisted extraction of houseleek (*Sempervivum*

*marmoreum*L.), XXIII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia with International Participation, Book of Abstracts, BF 013, 8-11 October 2014, Ohrid, Macedonia.

4. Ivana Karabegović, Saša Stojičević, Dragan Veličković, Valentina Simić, Nada Nikolić, Miodrag Lazić, Optimization of microwave-assisted extraction of extractive substances from cherry laurel fruit, Third international conference: Sustainable postharvest and food technologist-INOPTEP 2013 and XXV National conference processing and energy in agriculture PTEP 2013, Proceedings pp. 307-308, April 21st-26th 2013, Vrnjačka Banja, Serbia.



## ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

### **ОПТИМИЗАЦИЈА МИКРОТАЛАСНЕ ЕКСТРАКЦИЈЕ ПОЛИФЕНОЛНИХ ЈЕДИЊЕЊА ИЗ ПЛОДА АРОНИЈЕ (*Aronia melanocarpa* L.)**

која је одбрањена на Технолошком факултету Универзитета у Нишу:

- ✓ резултат сопственог истраживачког рада;
- ✓ да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивала на другим факултетима, нити универзитетима;
- ✓ да нисам повредила ауторска права, нити злоупотребила интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, \_\_\_\_\_

Потпис аутора дисертације:

\_\_\_\_\_  
Валентина М. Симић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ  
ОБЛИКА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**ОПТИМИЗАЦИЈА МИКРОТАЛАСНЕ ЕКСТРАКЦИЈЕ  
ПОЛИФЕНОЛНИХ ЈЕДИЊЕЊА ИЗ ПЛОДА АРОНИЈЕ  
(*Aronia melanocarpa* L.)**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предала за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, \_\_\_\_\_

Потпис аутора дисертације:

\_\_\_\_\_  
Валентина М. Симић

## ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

### ОПТИМИЗАЦИЈА МИКРОТАЛАСНЕ ЕКСТРАКЦИЈЕ ПОЛИФЕНОЛНИХ ЈЕДИЊЕЊА ИЗ ПЛОДА АРОНИЈЕ (*Aronia melanocarpa* L.)

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

**3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)**

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, \_\_\_\_\_

Потпис аутора дисертације:

\_\_\_\_\_  
Валентина М. Симић