



СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ

**ИНСТИТУТ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ И
РАЗВИТИЕ НА ХРАНИТЕ - ПЛОВДИВ**

Красимира Дечева Калчева - Караджова

**РАЗРАБОТВАНЕ НА ТЕХНОЛОГИИ ЗА
ФУНКЦИОНАЛНИ НАПИТКИ НА БАЗА
РАСТИТЕЛНИ ЕКСТРАКТИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**на дисертация за придобиване на образователна и научна
степен**

„ДОКТОР”

**по 5. Технически науки, 5.12 Хранителни технологии
(Технология на плодовете и зеленчуковите консерви)**

Научни ръководители: доц. д-р Данка Петева Луднева
доц. д-р Кирил Михалев Михалев

Пловдив, 2015



СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ

**ИНСТИТУТ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ И
РАЗВИТИЕ НА ХРАНИТЕ - ПЛОВДИВ**

Красимира Дечева Калчева - Караджова

**РАЗРАБОТВАНЕ НА ТЕХНОЛОГИИ ЗА
ФУНКЦИОНАЛНИ НАПИТКИ НА БАЗА
РАСТИТЕЛНИ ЕКСТРАКТИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за придобиване на образователна и научна степен
„ДОКТОР”

по 5. Технически науки, 5.12 Хранителни технологии
(Технология на плодовите и зеленчуковите консерви)

Научни ръководители: доц. д-р Данка Петева Луднева
доц. д-р Кирил Михалев Михалев

Научно жури: 1. проф. д-р Васил Петров Карагъзов
2. проф. д-р Димитър Георгиев Хаджикинов
3. доц. д-р Данка Петева Луднева
4. доц. д-р Николина Иванова Йончева
5. доц. д-р Тодорка Вълкова Петрова

Пловдив, 2015

Дисертационният труд е обсъден на заседание на разширен съвет на отдел "Иновативни продукти и технологии" при ИИРХ - Пловдив, проведено на 27.02.2015 г.

Дисертационният труд е написан на 137 стандартни машинописни страници и съдържа 23 таблици и 24 фигури. Цитирани са 300 литературни източника, от които 17 на кирилица и 283 на латиница.

Използваната номерация на таблиците и фигурите не съответства на номерацията в дисертацията.

Защитата на дисертационният труд ще се състои на 13. 05. 2015 г. от 11 часа в зала 11, ет 3 на ИИРХ -Пловдив, бул. "В. Априлов"154.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на ИИРХ - Пловдив и <http://www.agriacad.bg>.

Изследванията в настоящата дисертация са проведени в Институт за изследване и развитие на храните - Пловдив и Университет по хранителни технологии (УХТ) - Пловдив.

Изказвам най-сърдечна благодарност на:

Научните ми ръководители: доц. д-р Данка Луднева и доц. д-р Кирил Михалев, за ценните съвети, за безкрайното търпение и помощ, за активната ангажираност с организирането на изследователската работа, без чиято помощ настоящата дисертация нямаше да съществува.

На проф.д-р Николай Пенев, УХТ - Пловдив, за експертните съвети при планиране и провеждане на оптимизационните режими.

На гл. ас. д-р Васил Шиков и ас. д-р Рада Динкова за неocenимата помощ при разработване на експерименталната част от дисертацията.

Гл. ас. д-р Мария Кънева, УХТ- Пловдив, за оказаната компетентна помощ при планиране и провеждане на органолептичния анализ.

Изключително съм благодарна на колегите от ИИРХ - Пловдив, за подкрепата и компетентните съвети по време на работа по дисертацията.

Ас. Светослав Александров, ИИРХ - Пловдив, за помощта при провеждане на микробиологичните анализи.

Всички колеги от катедра “Консервиране и хладилна технология”, УХТ за топлия прием и подкрепа по време при провеждане на експерименталната част от дисертацията.

Огромни благодарности на семейството ми, което ме подкрепяше през цялото време, мотивираше ме и ми помогна да повярвам в себе си.

ВЪВЕДЕНИЕ

Съвременните концепции за функционални храни се разработват на основата на научно обосновани корелации между хранителните навици и здравословния статус на консуматорите.

Повишената консумация на растителни храни, в частност пресни и преработени плодове, зеленчуци и билки, се свързва с редуциране на риска от редица дегенеративни заболявания. Благоприятният ефект се обяснява предимно чрез антиоксидантния капацитет на вторичните растителни метаболити (напр. полифеноли). Значителни са различията в количествата, бионаличността и активността на полифенолните антиоксиданти в хранителния прием, което налага разработването на обогатени на полифеноли функционални продукти.

Успешното прилагане на концепцията за функционални храни изисква ефективен мониторинг по цялата хранителна верига от суровината, през преработката, до съхранението на готовите продукти, по отношение на биологичната активност на функционалните компоненти. От гледна точка на хранителната технология е необходимо оптимизиране на конвенционалните и прилагане на иновационни преработвателни методи, осигуряващи високо съдържание на биоактивни компоненти и повишаване на биологичната им достъпност и стабилност при съхранение.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационната работа е изследване технологичните възможности за получаване на обогатени на полифеноли растителни екстракти и приложението им при разработване на функционални напитки.

За реализиране на поставената цел са формулирани следните задачи

1. Оптимизиране екстракцията на полифеноли от листа на маточина (*Melissa officinalis* L.).
 - 1.1. Изследване влиянието на метода на съхранение на суровината и варианта на водна екстракция.
 - 1.2. Изследване влиянието на параметрите на процеса.
2. Оптимизиране екстракцията на полифеноли и антоциани от венчелистчета на маслодайна роза (*Rosa damascena* Mill.).
 - 2.1. Изследване влиянието на типа на ензимните препарати.
 - 2.2. Изследване влиянието на параметрите на процеса.
3. Влияние на ензимната екстракция върху стабилността на антоцианите на венчелистчета на маслодайна роза.
4. Разработване на технология на функционални напитки на база сокове от ягодоплодни и растителни екстракти.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ

1. Химикали

За аналитични цели са използвани следните реактиви: DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил), TPTZ (2,4,6-три(2-пиридил)2-триазин) и Trolox [(±)-6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина] (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany); реактив на Folin-Ciocalteu (FC-реактив) (Merck, Darmstadt, Germany); галова киселина монохидрат (Fluka, Buchs, Switzerland). Всички останали реактиви и разтворители са с аналитична чистота.

2. Ензимни препарати

Използвани са следните ензимни препарати: Pectinex Ultra Color (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark); Panzym Pro Color и Panzym BE XXL (E. Begerow GmbH & Co., Langenlonsheim, Germany). Rohament CL (AB Enzymes GmbH., Darmstadt, Germany); Xylanase AN (Biovet JSC., Peshtera, Bulgaria).

3. Растителни суровини

3.1. Маточина (*Melissa officinalis* L.)

Необходимото количество суровина, (реколта 2011 и 2012 г.) за експерименталната работа е доставено от фирма ЕТ "Валентин Русев"- гр. Казанлък до технологичната базата на ИИРХ - Пловдив. След отделяне на листата от стеблата и сортиране за отстраняване на некачествена суровина, свежата суровина е подготвена в следните варианти:

3.1.1. Сушени листа от маточина

Отделените листа са изсушени на тънък слой на сянка при температура (25 - 27°C). Сухата листна маса е съхранявана в книжни, добре затворени пликове на сухо място до времето за анализ.

3.1.2. Замразени листа от маточина

Отделените листа след сортиране са измити, подсушени, поставени в полиетиленови пликове и замразени в хладилен шкаф при температура -18°C до времето за анализ.

3.2. Маслодайна роза (*Rosa damascena* Mill.)

За експерименталната работа е използвана суровина, предоставена от фирма "Екомат" с. Мирково, реколта 2012 г, 2013 г. Суровината е доставена до технологичната базата на УХТ - Пловдив в свежо състояние .

Отделените венчелистчета са изсушени на тънък слой при температура 25-27°C в продължение на една седмица, преди окончателно сушене с горещ въздух при температура 50°C за 1 час. Сухите венчелистчета от маслодайна роза, са съхранявани в ексикатор до времето за анализ.

3.3. Плодове от черна боровинка и ягода

Замразените плодове на ягоди, сорт "Сиабелла" реколта 2014 г., са предоставени от фирма "Цима 99" (с. Стряма, обл. Пловдив) в полиетиленови пликове и съхранявани в хладилен шкаф при температура -18°C до времето за анализ.

Плодовете на диворастяща черна боровинка са закупени от търговската мрежа и са доставени до базата на ИИРХ - Пловдив в свежо състояние. Измитите, отсортирани плодове са поставени в полиетиленови пликове, замразени в хладилен шкаф при температура - 18°C и съхранявани в замразено състояние до времето за анализ.

4. Получаване на растителните екстракти

4.1. Получаване на екстракти от листа на маточина

Растителният сух материал е смлян на лабораторна мелница "Krups GVX2, Burr Grinder" - Germany и пресят през сито с размер на отворите $d = 0.8 \text{ mm}$.

Екстракцията на замразените листа е извършена след дефростиране и нарязване на частици с размер $\sim 3 \text{ mm}$.

Водните екстракти от листа на маточина са получени при следните технологични решения.

✓ *Воден екстракт вариант запарка*

10 g от сухата дрога или 32 g от замразената суровина (количеството е преизчислено на база сухата суровина) е залята с вряща дестилирана вода при хидромодул 1:20 в затворени йодни колби. Екстракцията е извършена при стайна температура в продължение на 30, 60, 90 и 120 min. След изтичане на зададеното време пробите са охладени в ледена водна баня до 25°C. Съдържанието на всяка колба е филтрувано през филтър KK5 вакуумно, с последващо филтруване през нагънат филтър.

За целите на пълния факторен експеримент 10 g от сухите листа на маточина са залети с вряща дестилирана вода при хидромодул 1:20 в затворени йодни колби. Екстракцията е извършена за време 10, 30 и 50 min и температура 45, 60 и 75°C. Получените екстракти са обработени по гореописания начин. В центъра на експеримента екстракцията е извършена трикратно.

✓ *Воден екстракт вариант отвара*

10 g суха дрога или 32 g от замразената суровина (количеството е преизчислено на база сухата суровина) е залята с вряща дестилирана вода при хидромодул 1:20 в облодънна колба, свързана с обратен хладник. Екстракцията е извършена на кипяща водна баня в продължение на 30, 60, 90 и 120 min. Получените екстракти са обработени по гореописания начин.

4.2. Получаване на екстрактите от венчелистчета на маслодайна роза

Растителният сух материал е смлян на лабораторна мелница (Krups GVX2, Burr Grinder, Germany) и пресят през сито с размер на отворите $d = 0.63 \text{ mm}$.

Смляната проба от сушени венчелистчета на роза е рехидратирана при хидромодул 1:12 с подкиселена до pH 3.0 (1M HCl) дестилирана вода в продължение на едно денонощие при 10°C. След коригиране киселинността

на суспензията до $\text{pH}=3.0$, 100 g от нея са поставени за temperиране при 50°C на водна баня за време 20 min, преди добавянето на 10 mL предварително приготвен разтвор с подкиселена вода на съответния ензимен препарат (и). В контролата е добавена само 10 mL подкиселена вода. След престояване при 50°C в продължение на 2 часа пробата е прехвърлена в кипяща водна баня за 10 min за инактивиране на ензимите, след което е охладена в ледена водна баня и центрофугирана за 15 min при 5500 min^{-1} (T52.1, MLW, Germany). Получената супернатанта е филтрувана през нагънат филтър, след което е анализирана.

При скрининга на пектолитичните ензимни препарати са използвани разтвори с концентрация 1% (v/v). Обработките са проведени двукратно.

За експеримента със симплекс центроидния план са използвани самостоятелно или в комбинация пектолитичен (Pectinex Ultra Color), целулитичен и хемицелулитичен ензимен препарат под формата на разтвор с концентрация 1.2%.

За експеримента с оптимален композиционен план е използван разтвор на предварително приготвена смес от пектолитичен (Pectinex Ultra Color), целулитичен и хемицелулитичен ензимен препарат в съотношение 1:1:1 (v:v:w).

5. Получаване на соковете от ягодоплодни и функционалните напитки

След размразяване плодовете са смлени на волф машина (размер на отворите $d = 4 \text{ mm}$) и пресувани на лабораторна кошова преса при максимално налягане 20 MPa (фиг. 4.1.).



Фигура 1. Технологична схема за получаване на пресов сок от ягодоплодни

Полученият пресов сок от ягодоплодни е използван за основа на функционални напитки, получени след смесване (3:1, w:w) с екстракт от маточина или маслодайна роза.

6. Тест за стабилност при съхранение

Проби (~50 mL) от екстракти от венчелистчета на маслодайна роза са поставени в стъклени епруветки за 0, 3, 6, 9 и 12 дни при 10°C. За съхранението е използвана термостатна камера (Printer of temperature and time, Hot - Cold, GL, Spain) с възможност за регулиране на светлината. Тестът е проведен в два варианта: при 12 KLux светлина, на светло и 0 KLux, на тъмно.

Проби (~50 mL) от соковете от ягодоплодни и функционалните напитки са съхранявани в епруветки за 0, 3, 6 и 9 дни при 10°C на тъмно.

7. Подготовка на пробите за химични анализи

5 g от всеки вариант на получените проби (екстракт / сок / напитка) са поставени в мерителна колба от 50 mL. Съдържанието на колбата е доведено до ~2/3 от обема с метанол (за екстрактите от маточина) и подкиселен (2300 μ L 37% HCl в 1L метанол) метанол (за останалите проби). След престой от една нощ при хладилни условия (10°C), съдържанието на колбата е доведено до марката. Получените метанолни екстракти са филтрувани през нагънат филтър и анализирани.

8. Химични анализи

Спектрометричните измервания са извършени с UV-Vis спектрофотометър Helios Omega (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA) с инсталиран софтуер VISIONlite, използвайки кювети с оптичен път 1 cm.

8.1. Определяне на общите полифеноли

Съдържанието на общи полифеноли е определено по метода на Singleton and Rossi (1965). Резултати са представени като еквиваленти на галовата киселина (GAE) в mg за 100 g проба (екстракт, сок, напитка).

8.2. Определяне на общите антоциани

Количеството на общите мономерни антоциани е определено чрез pH-диференциалния метод (Giusti and Wrolstad, 2001). Резултатите са изчислени чрез използване на коефициент на моларна абсорбция 26900 L/(mol cm) и молекулна маса 449.2 g/mol и са изразени като еквиваленти на цианидин-3-глюкозид (CGE) в mg на 100 g проба (екстракт, сок, напитка).

8.3. Оценяване на общия антиоксидантен капацитет

Общият антиоксидантен капацитет е оценен чрез определяне на радикалоулавящата способност (DPPH - тест) и метало-редуциращата способност (FRAP - тест). Trolox, водоразтворим аналог на витамин E, е използван като стандарт и резултатите са изразени като еквиваленти на Trolox (TE) в μ mol за 100 g проба (екстракт, сок, напитка).

✓ **DPPH-тест**

Процедурата се основава на модификация на метода на Brand-Williams et al. (1995).

✓ **FRAP-тест**

Процедурата се основава на метода на Benzie и Strain (1996).

9. Определяне съдържанието на сухи вещества

Съдържанието на сухи вещества в екстракти от листа на маточина и венчелистчета от роза са определени тегловно на влагоанализатор "Kern" MLB-50-3, Kern & Sohn GmbH, Germany.

Водоразтворимите вещества по Brix °са определени с помощта на рефрактометър "OptiDuo Refractometer", Bellingham and Stanley.

10. Цветови измервания

Цветовите характеристики на екстрактите, получени от листа на маточина, венчелистчета от роза и напитките от ягодоплодни – черна боровинка и ягода са определени спектофотометрично с UV-Vis спектрофотометър UV-Vis спектрофотометър Helios Omega (Termo Scientific), оборудван със софтуер за цветови измервания (VL ColorCalc Basic).

Спектрите на цвета са регистрирани на пропускливост в областта 380 - 780 nm. Цветовите координати по CIELab и/ или CIELCh са определени при илюминант D65 и ъгъл на наблюдение 10°, използвайки кювети с дебелина 1 cm.

Преди анализа на екстрактите от листа на маточина пробите са филтрувани с използването на мембранен филтър 0.6 µm. Абсорбцията на пробите е измерена директно без предварително разреждане.

Преди анализа на екстрактите от венчелистчета на маслодайна роза, соковете и напитките, пробите са филтрувани с използването на мембранен филтър 0.8 µm. Абсорбцията на пробите е измерена след предварително разреждане с буфер на McIlvaine (0.1 M, pH 3.0), приготвен в съответствие с Elving et al. (1956), до максимална стойност на абсорбцията 0.8. След престой от 30 min. за уравновесяване, абсорбцията на пробите е измерена между 380 и 780 nm. Буфер на McIlvaine е използван като празна проба.

11. Микробиологични анализи

Броят на мезофилните аеробни и факултативно анаеробни микроорганизми (ММ), психротрофните (ПМ) микроорганизми и плесените и дрождите е определен, като е следвана методологията съгласно ISO 4833:1991 (1991), ISO 17410:2001 (2001), ISO 7954:1987 (1987).

12. Определяне активностите на ензимните препарати

✓ **Определяне на ендоксилазна активност**

Ендоксилазна активност е определена съгласно метода, описан от Dobrev et al. (2007). Една единица ендоксилазна активност се дефинира

като, количеството ензим под действие на което се получава 1 μmol ксилоза за 1 min при pH 5.0 и температура 50°C.

✓ **Определяне на полигалактурозна активност**

Полигалактурузна активност е определена съгласно метода на Miller, (1959). Една единица ензимна активност се изразява като μmol галактуронова киселина за 1 мин.

✓ **Определяне на β -ксилозидазна активност**

β -ксилозидазната активност е определена съгласно метода, описан от Ponprium et al. (2000). Една единица β -ксилозидазна активност се дефинира като количеството ензим под действие, на което се отделя 1 μmol р-нитрофенол за 1 min при pH 5.0 и температура 50°C.

✓ **Определяне на β -глюкозидазна активност**

β -глюкозидазна активност е определена съгласно метода описан от Ponprium et al. (2000). Една единица β -глюкозидазна активност се дефинира като количеството ензим под действие, на което се отделя 1 μmol р-нитрофенол за 1 min при pH 5.0 и температура 50°C.

✓ **Определяне на протеиназната активност**

Протеиназната активност е определена по метода на Kaverzneva, 1971. Една единица протеолитична активност се дефинира като, количеството ензим, под действието на което за 1 min при pH 3.5 и температура 50°C се разгражда до неутрализируема с трихлороцетна киселина такова количество казеин, което съдържа 1 μg тирозин

✓ **Определяне на ендоглюконазна (целулазна) активност**

Ендоглюконазната активност е определена по метода на Dobrev et al. (2012). Една единица (U) ендоглюканаза активност се определя като количеството ензим, образуващ 1 μmol редуциращи захари за една минута при условията на анализа.

13. Органолептичен анализ

За органолептичните анализи е използван ранговият метод за оценка. Пробите се оценяват по предпочитание. Най-харесваната проба получава първи ранг, а останалите - по-големи рангове (втори, трети и т.н.).

14. Статистическа обработка

Представените резултати са средноаритметични стойности от най-малко три паралелни определения, като коефициентите на вариация са по-малки от 5%. Линейният регресионен анализ, еднофакторният ANOVA извършени чрез използване на статистическия апарат на Microsoft Excel.

Статистическата обработка на резултатите от органолептичната оценка по ранговият метод е в съответствие с Analytica - European Brewery Convention (2005).

Математическата обработка на резултатите от факторните анализи и изчертаването на повърхнините на отражение и изолините са направени с помощта на специализиран софтуер за статистически анализ.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Оптимизиране екстракцията на полифеноли от листа на маточина (*Melissa officinalis* L.)

1.1. Влияние на обработката на суровината и методът на водна екстракция

Данните за съдържанието на общи полифеноли, антиоксидантния капацитет, добива (общите сухи вещества) на екстракти от сушени листа на маточина при различни варианти и продължителност на екстракцията са представени в таблица 1.

В изследваните екстракти съдържанието на общи полифеноли варира от 478.0 до 647.0 mg GAE/100 g. Количеството на общите полифеноли намалява с увеличаване продължителността на екстракцията, като е по-високо за вариант запарка. Резултатите са в съответствие с изследванията на други автори (Samuagam et al., 2013; Spigno et al., 2007; Thoo et al., 2010), които установяват, че екстракционното време е от решаващо значение при екстракцията на фенолни съединения, където достигането на равновесната концентрация изпреварва съпътващата значима деградация. Следователно, продължителното време на екстракция може да намали добивът на фенолни съединения.

Таблица 1. Съдържание на общи полифеноли (TPP), антиоксидантен капацитет (DPPH и FRAP), добива (общи сухи вещества) на екстракти от сушени листа на маточина

Време на екстракция, min	TPP ^a , (mgGAE/100g)	DPPH ^a , (μmol TE/100g)	FRAP ^a , (μmolTE/100g)	Добив ^a , %
Екстракт вариант запарка				
30	647 ± 29a	4526 ± 204a	3297 ± 148a	1.3 ± 0.1a
60	633 ± 29a	4217 ± 190a,b	3093 ± 139b	1.4 ± 0.1a,b
90	554 ± 25b	4163 ± 187a,b	3043 ± 137c	1.5 ± 0.1b,c
120	499 ± 23b	3790 ± 171b,c	2643 ± 119b,d	1.3 ± 0.1a
Екстракт вариант отвара				
30	597 ± 27a	4765 ± 214a	3977 ± 178a	1.6 ± 0.1a
60	551 ± 25a	4520 ± 203a	4013 ± 181a	1.6 ± 0.1a
90	480 ± 22b	3768 ± 170b,c	4153 ± 187a	1.8 ± 0.1b
120	478 ± 22b	4318 ± 194a	4007 ± 180a	1.7 ± 0.1a

^a Стойност ± SD. Различните букви след стойностите в рамките на една подколони (запарка / отвара) показват статистически значими разлики (Tukey's test, P < 0.05).

Разликите в извличането на полифенолите може да се дължат на различната степен на полифенолна полимеризация, разтворимост на фенолните съединения и взаимодействието на полифенолите с други съединения от растителната матрица (протеини, полизахариди и др.). Същите тенденции са наблюдавани и при етанолни екстракти от бял равнец (Кънева, 2011) и етанолни и ацетонови екстракти от сушен градински чай (Dent, 2012).

В таблица 2 е представено съдържанието на общи полифеноли, антиоксидантния капацитет, сухо вещество (добив) на екстракти от замразени листа на маточина при различни варианти и продължителност на водна екстракция.

Таблица 2. Съдържание на общи полифеноли (TPP), антиоксидантен капацитет (DPPH и FRAP), добива (общи сухи вещества) на водни екстракти от замразени листа от маточина.

Време на екстракция, min	TPP ^a , (mgGAE/100g)	DPPH ^a , (μmol TE/100g)	FRAP ^a , (μmolTE/100g)	Добив ^a , %
Екстракт вариант запарка				
30	345 ± 16a	934 ± 42a	1251 ± 56a	1.2 ± 0.1a
60	320 ± 14a	878 ± 40a,b	1122 ± 51a,b	1.4 ± 0.1b
90	315 ± 14a	845 ± 38a,b	1100 ± 50b	1.5 ± 0.1b
120	311 ± 14a	816 ± 37b	1086 ± 49b,c	1.5 ± 0.1b
Екстракт вариант отвара				
30	423 ± 19a	1444 ± 65a	1643 ± 74a	1.5 ± 0.1a
60	420 ± 19a	1483 ± 67a	2039 ± 92b	1.7 ± 0.1a
90	399 ± 18a	1467 ± 66a	1911 ± 86b	1.7 ± 0.1a
120	498 ± 22b	1355 ± 61a	2541 ± 114c,d	1.7 ± 0.1a

^a Стойност ± SD. Различните букви след стойностите в рамките на една подколони (запарка / отвара) показват статистически значими разлики (Tukey's test, $P < 0.05$).

Като цяло съдържанието на общи полифеноли на екстрактите от замразена суровина е между 38 - 49% за вариант запарка и между 17 - 29% за вариант отвара по - ниско в сравнение с това на екстрактите от сушени листа на маточина (таблица 1 и 2). При екстракти вариант запарка с увеличаване продължителността на екстракция радикалоулавяща способност намалява. При екстракти вариант отвара радикалоулавящата способност варира при различна продължителност на екстракция. Вероятната причина е едновременното разграждане на полифенолните съединения и образуването на нови съединения в резултат на топлинната обработка. Същите тенденции се наблюдават и при металоредуцираща способност на водните екстракти от сушени листа на маточина.

Използването на опростени методи за оценка на антиоксидантната активност е много важно при скринингови проучвания на храните. Докато DPPH - измерванията предоставят информация за радикалоулавящата способност, FRAP - тестът оценява общата концентрация на редокси активните съединения (Magalhães et al., 2008).

Стойностите на антиоксидантния капацитет на екстрактите вариант запарка от замразени листа са приблизително 5 и 3 пъти по-ниски, съответно за DPPH - и FRAP - теста, в сравнение с тези на екстрактите от сушени листа. Вероятното обяснение за това е действието на неинактивираната ензимна система в частност полифенолоксидазата в замразената суровина. По-слабо изразените промени, наблюдаващи се при екстракцията вариант отвара, подкрепят последното предположение.

Съдържанието на общи полифеноли на екстрактите корелира положително ($R = 0.84 - 0.94$) с техните антиоксидантни свойства оценени чрез DPPH - теста (таблица 3). При FRAP - теста положителна корелация е установена при екстрактите вариант запарка от сушени и замразени листа ($R = 0.92 - 0.99$) и вариант отвара от замразени листа ($R = 0.84$) (таблица 3).

Таблица.3. Корелационни коефициенти между съдържанието на общи полифеноли и антиоксидантния капацитет (DPPH-, FRAP-) на водни екстракти от сушени и замразени листа на маточина.

Тест за антиоксидантен капацитет	Вариант на екстракция			
	Запарка		Отвара	
	Сушени	Замразени	Сушени	Замразени
DPPH	0.91	0.94	0.84	- 0.95
FRAP	0.92	0.99	-0.64	0.84

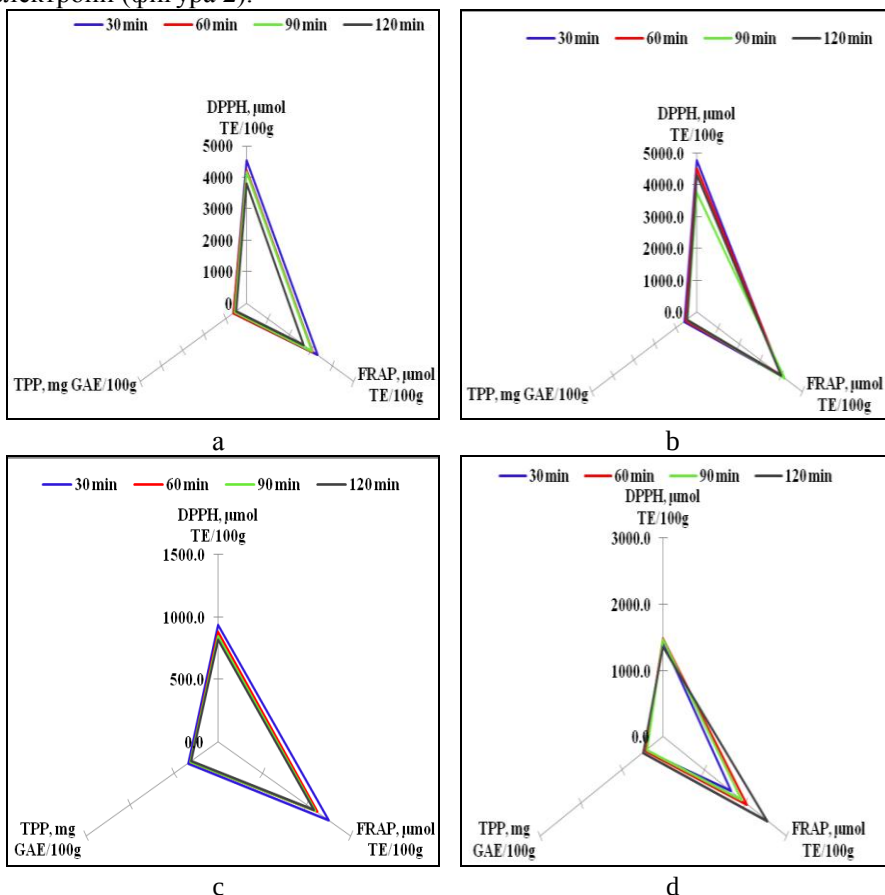
Високите стойности на корелационния коефициент ($R = 0.95-0.99$) между радикалоулавящата и металоредуциращата способност (таблица 4) показват надеждността на оценяване на антиоксидантната активност чрез използваните *in vitro* тестове.

Таблица 4. Корелационни коефициенти между DPPH - и FRAP - стойностите на екстракти отсушени и замразени листа от маточина.

Вариант на екстракция			
Запарка,		Отвара	
Сушени листа	Замразени листа	Сушени листа	Замразени листа
0.99	0.95	- 0.95	- 0.74

За комплексно характеризиране на общия антиоксидантен капацитет е приложен подходът на Terashima et al. (2007). Радарните диаграми се използват за характеризиране на профила на активността на водоразтворими антиоксиданти в различни хранителни матрици. Антиоксидантния капацитет на екстрактите от сушени листа на маточина се дължи основно на наличието на полифеноли, действащи едновременно като донори на водород и електрони, докато при екстрактите от замразени листа на маточина

преобладава ролята на антиоксидантите, действащи като донори на електрони (фигура 2).



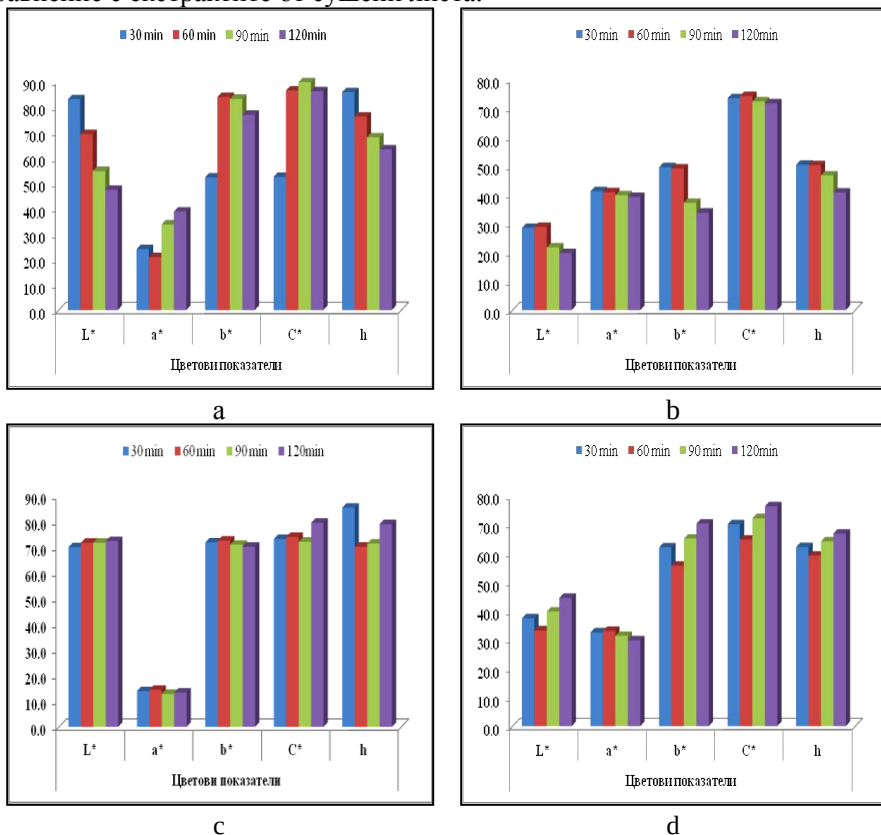
Фигура 2. Радарни диаграми на антиоксидантния капацитет на различни варианти водни екстракти от листа на маточина: а) вариант запарка сушена суровина; б) вариант отвара сушена суровина; в) вариант запарка замразена суровина; д) вариант отвара сушена суровина

Важен качествен показател при получаването на екстракт и влагането му в напитки, самостоятелно или в комбинация, е цветът. Цветовите показатели на екстракти от сушена и замразена суровина са представени на фигура 3.

При водните екстракти вариант запарка от сушени листа на маточина яркостта (L^*) на цвета намалява с увеличаване продължителността на екстракцията. Данните за червения компонент на цвета ($+a^*$) показват тенденция към нарастване при увеличение продължителността на

екстракцията. За екстрактите доминиращ е жълтият компонент ($+b^*$), чийто стойности са почти двойно по-високи в сравнение с червената фракция.

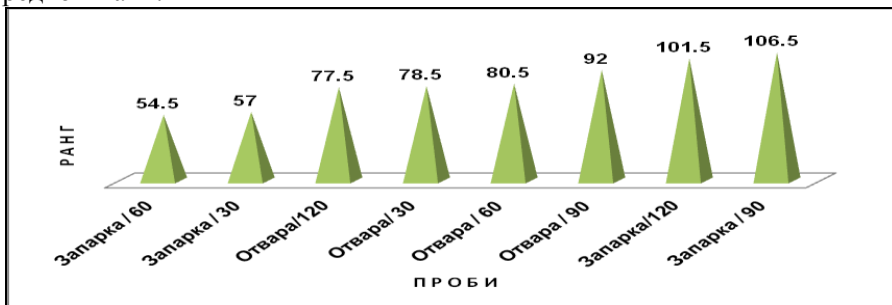
При екстрактите вариант запарка от замразена суровина се наблюдават подобни тенденции, като стойностите за яркостта са 2-3 пъти по-ниски в сравнение с екстрактите от сушени листа.



Фигура 3. Показатели на цвят по CIELab и CIELCh на различни варианти водни екстракти от листа на маточина: а) вариант запарка сушена суровина; б) вариант отвара сушена суровина; в) вариант запарка замразена суровина; д) вариант отвара замразена суровина.

Направена е сензорна оценка на екстрактите от сушени листа на маточина, като избора е съобразен с по-високото съдържание на биологично активни вещества в екстрактите (фигура 4). Пробите са ранжирани по степен на предпочитание. След математическа обработка на данните, при ниво на значимост 5%, е установено, че запарка 90 и 120 min и отвара 90 min се отличават статистически от останалите и са най-малко предпочитани (най-висок ранг). Останалите екстракти, запарка 30 и 60 min и отвара 30, 60 и 120

min са със статистически неразличими рангове, но запарките са по-предпочитани.



Фигура 4. Органолептична оценка на различни варианти водни екстракти от сушени листа на маточина: З - запарка; О - отвара; 30, 60, 90, 120 - продължителност на екстракцията (min.).

1.2. Влияние на параметрите на процеса

Изследвано е влиянието на температурата ($T, ^\circ\text{C}$) и продължителността (t, min) на водна екстракция от сушени листа на маточина върху съдържанието на общи полифеноли (TPP), антиоксидантния капацитет (DPPH и FRAP), сухото вещество (добив) и цветовите характеристики на екстрактите, като е приложен методът на повърхността на отражението (RSM).

Проведен е пълен факторен анализ (ПФА) от вида $2^n + n_0$, където: n - брой независими променливи, n_0 - брой повторения в центъра на плана ($n_0=3$).

Наименованията на независимите променливи и нивата им на вариране са представени в таблица 5, а план планът на експеримента в натурален и кодиран вид, в таблица 6.

Регресионният модел е от следния вид:

$$y = b_0 + b_i \cdot x_i + b_{ii} \cdot x_i^2 + b_{ij} \cdot x_i \cdot x_j \quad (1),$$

където: y е прогнозираната стойност на целевата функция (зависимата променлива), x_i са входните фактори, а b_0 , b_i , b_{ii} и b_{ij} са коефициентите на регресия.

Таблица 5. Нива и интервали на вариране на независимите променливи

Независими променливи	Долно ниво	Център на плана	Горно ниво
Време (t), min	10	30	50
Температура (T), $^\circ\text{C}$	45	60	75

В таблица 6 е представена схема на обработките и стойностите за съдържание на общи полифеноли (TPP), антиоксидантен капацитет (DPPH и

FRAP) и сухо вещество на екстракти от сушени листа на маточина след проведения пълен факторен анализ.

Таблица 6. Схема на обработките и резултати от пълен факторен анализ.

№	Температура		Време		TPP ^a	DPPH ^a	FRAP ^a	Добив ^a
	X ₁ (°C)		X ₂ (min)		(mg GAE/100 g)	(μmol TE/100 g)	(μmol TE/100 g)	(%)
	код. вид	натур. вид	код. вид	натур. вид	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
1	-	45	-	10	650 ± 9a	3213 ± 48a	2838 ± 28a	1.7 ± 0.1a
2	+	75	+	10	720 ± 9b	2555 ± 38a	2677 ± 27b	1.5 ± 0.1a
3	-	45	-	50	570 ± 7c	2848 ± 43a	3017 ± 30c	1.6 ± 0.1a
4	+	76	+	50	612 ± 8d	2705 ± 41a	3382 ± 34d	1.6 ± 0.1a
5	0	60	0	30	701 ± 9e	3010 ± 45a	2755 ± 28e	1.6 ± 0.1a
6	0	60	0	30	688 ± 9e	3071 ± 46a	2725 ± 27b,e	1.6 ± 0.1a
7	0	60	0	30	704 ± 9e	3100 ± 47a	2700 ± 27b,e	1.6 ± 0.1a

^a Стойност ± SD. Различните букви след стойностите в рамките на една колона показват статистически значими разлики (Tukey's test, P < 0.05).

С увеличаване продължителността на екстракция радикалоулавящата способност намалява (5 - 20%). При металоредуциращата способност (FRAP метода) се наблюдава вариране в стойностите - понижаване с последващо повишаване. Вероятна причина е едновременното разграждане на съществуващите и синтезирането на нови съединения в резултат на по-продължителната топлинна обработка (фигура 5 - b, c).

След обработка на резултатите от ПФА са получени следните регресионни уравнения за наблюдаваните величини (формули 2 - 5):

$$Y_1 = -245.15 + 30.73.T + 0.04.t - 0.24.T^2 - 0.02.t^2 + 0.02.T.t; \text{mg GAE/100 g}, R^2=0.99 \quad (2)$$

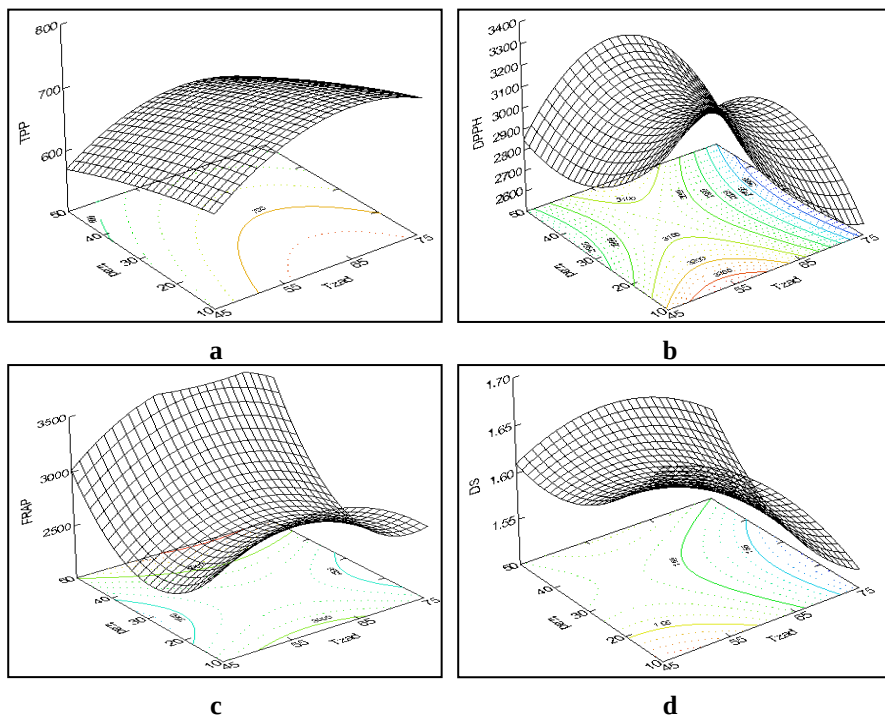
$$Y_2 = -1483.71 + 194.14.T - 55.94.t - 1.84.T^2 + 0.46.t^2 + 0.43.T.t; \mu\text{mol TE/100 g}, R^2=0.99 \quad (3)$$

$$Y_3 = -1125.03 + 171.49.T - 104.01.t - 1.51.T^2 + 1.48.t^2 + 0.44.T.t; \mu\text{mol TE/100g}, R^2=0.99 \quad (4)$$

$$Y_4 = 1.559 + 0.012.T - 0.015.t - 0.0001.T^2 + 0.0001.t^2 + 0.0001.T.t, \%, R^2=0.87 \quad (5)$$

Стойностите за коефициента на детерминация (R^2) показват, че получените модели описват изследвания процес с висока точност.

Повърхностите на отражение и изолиниите, показващи влиянието на температурата и времето на екстракция са представени на фигура 5.

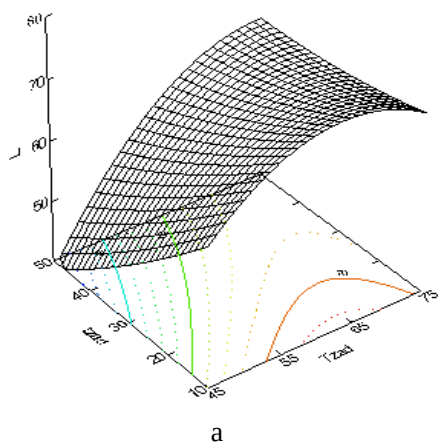
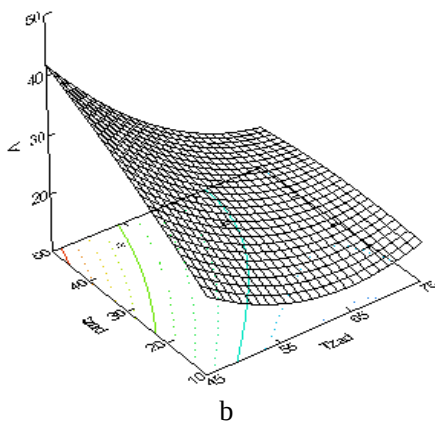
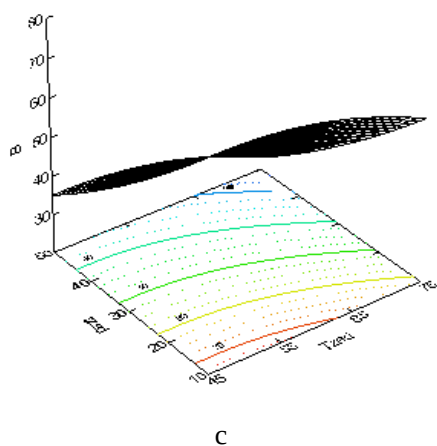
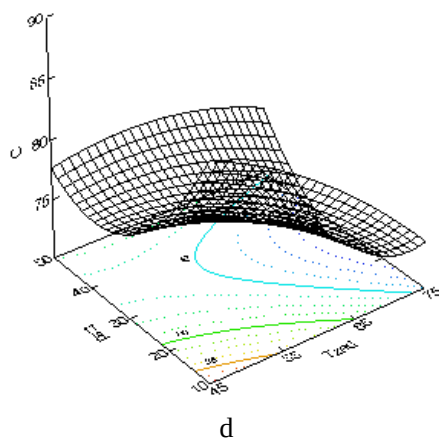
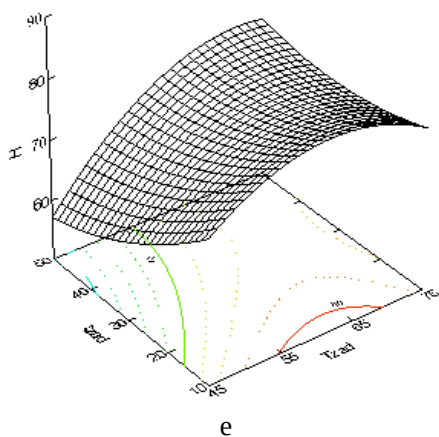


Фигура 5. Повърхности на отражението и изолинии, показващи влиянието на температурата (T , $^{\circ}\text{C}$) и времето (t , min) на екстракция върху TPP (a), DPPH (b), FRAP (c), добива (общи сухи вещества) (d) на водни екстракти от сушени листа на маточина.

В таблица 7 и на фигура 6 са представени резултатите за цветовите характеристики и повърхностите на отражение на екстрактите от маточина, където: L^* , яркост (светлост); $+a^*$, червен компонент; $+b^*$, жълт компонент; C^* , наситеност; h° , тоналност.

Таблица 7. Цветови характеристики на водни екстракти от сушени листа на маточина

№	L^*	$+a^*$	$+b^*$	C^*	h°
	Y_5	Y_6	Y_7	Y_8	Y_9
1	62.7	23.2	79.6	87.7	73.7
2	69.3	16.8	71.6	73.6	76.8
3	38.4	41.8	64.6	76.9	57.1
4	66.7	17.3	72.4	74.4	76.6
5	66.3	18.5	73.9	77.3	75.8
6	68.2	19.12	73.1	76.0	75.7
7	61.6	24.9	74.3	86.4	73.2



Фигура 6. Повърхности на отражението и изолинии, показващи влиянието на температурата (T , $^{\circ}\text{C}$) и времето (t , min) на екстракция върху L^* (a); $+a^*$ (b); $+b^*$ (c); C^* (d); h^* (e) на водни екстракти от сушени листа на маточина

Анализът на резултатите таблица 8 и фигура 6 показва, че показателя L^* намаля (10 до 70%) при по - продължително време на въздействие при дадена температура. Данните за червения компонент на цвета ($+a^*$) намаляват при увеличаване на температурата от 45 до 75°C. За екстрактите доминиращ е жълтият компонент $+b^*$, чийто стойности са по-високи в сравнение с червената фракция.

След обработка на резултатите са получени следните регресионни уравнения за наблюдаваните величини (формули 6 - 10):

$$Y_5 = -38.69 + 3.843611111.T - 1.58.t - 0.03.T^2 + 0.002.t^2 + 0.02.T.t, R^2 = 0.97 \quad (6)$$

$$Y_6 = 94.81 - 2.72T + 1.3.t + 0.022.T^2 - 0.003.t^2 - 0.02.T.t, R^2 = 0.95 \quad (7)$$

$$Y_7 = 50.46 + 1.49.T - 1.24.t - 0.02.T^2 + 0.005.t^2 + 0.01.T.t, R^2 = 0.99 \quad (8)$$

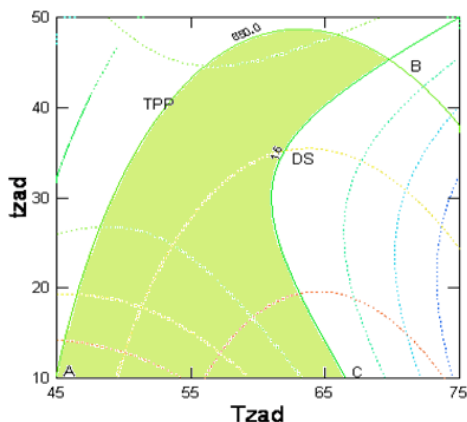
$$Y_8 = 99.37 + 0.28.T - 1.56.t - 0.01.T^2 + 0.01.t^2 + 0.01.T.t, R^2 = 0.99 \quad (9)$$

$$Y_9 = -10.63 + 3.27.T - 1.38.t - 0.028.T^2 + 0.01.t^2 + 0.01.T.t, R^2 = 0.99 \quad (10)$$

На база на получените резултати е извършена графична оптимизация на процеса екстракция от сушени листа на маточина (фигура 7), като е използвана системата от регресионни уравнения 2 и 5.

Таблица 8. Граници на целевите функции за оптимизация на процеса екстракция от сушени листа на маточина.

У-ние №	Целева функция	Граници на целевата функция
2	TPP, mg GAE/100 g	TPP > 650
5	Добив, %	D.S. > 1.6



Областта, ограничена от кривите АВ, ВС и СА, в температурния интервал 45 - 75°C и време 10 - 50 min. показва оптималната област за получаване на воден екстракт от листа на маточина с високо съдържание на полифенолни съединения (фигура 7).

Фигура 7. Графична оптимизация на процеса екстракция от сушени листа на маточина

Анализът на получените резултати позволява да се формулират следните по-важни изводи:

1. Съдържанието на общи полифеноли на екстрактите от сушени листа на маточина намалява с увеличаване на продължителността на екстракцията; съдържанието е по-високо при екстрактите вариант запарка в сравнение с вариант отвара.
2. Съдържанието на общи полифеноли на екстрактите от замразени листа на маточина е 38 - 41% (вариант запарка) и 17 - 29% (вариант отвара) по-ниско в сравнение с това на екстрактите от сушени листа.
3. Съдържанието на общи полифеноли на екстрактите от листа на маточина корелира положително ($R^2 = 0.84 - 0.94$) с антиоксидантния капацитет, оценен чрез DPPH - теста. При FRAP - теста положителна корелация е установена при екстрактите вариант запарка от сушени и замразени листа ($R^2 = 0.99 - 0.92$) и вариант отвара от замразени листа ($R^2 = 0.84$).
4. Яркостта на цвета (L^*) на екстрактите вариант запарка от листа на маточина намалява с увеличаване продължителността на екстракцията, като стойностите са 2 - 3 пъти по-високи при екстрактите от сушени листа в сравнение със замразената суровина.
5. Органолептичната оценка, изразена чрез степента на предпочитание, на екстрактите от сушени листа на маточина е по-висока при вариант запарка в сравнение с вариант отвара.
6. Получените математични модели описват с висока точност ($R^2 = 0.87 - 0.99$) влиянието на температурата и продължителността на екстракцията върху съдържанието на общи полифеноли, антиоксидантния капацитет, добива (общи сухи вещества) и цветовите характеристики на екстрактите от сушени листа на маточина.
7. Интервалите на вариране на температурата (55 – 65 °C) и продължителността (10 – 45 min) определят оптималната област за провеждане на процеса, позволяващ получаването на екстракти с високо полифенолно съдържание.

2.2. Оптимизиране екстракцията на полифеноли и антоциани от венчелистчета на маслодайна роза (*Rosa damascena* Mill.)

2.2.1. Влияние на типа на ензимните препарати

Пектинолитичните ензими се използват широко в хранителната промишленост за улесняване екстракцията на полифеноли чрез разрушаване на матрицата на клетъчната стена, водещо до повишаване съдържанието на фенолни съединения, особено антоциани.

За експерименталните изследвания са използвани сушени венчелистчета на маслодайна роза (реколта 2012 г.). Тествани са пектинолитичните ензимни препарати: Pectinex Ultra Color (PUC), Panzym Pro Color (PPC) и Panzym BE XXL (PBEXXL).

Резултатите за съдържанието на изследваните показатели в зависимост от обработката с различни пектинолитични ензимни препарати са представени в таблица 9.

Таблица 9. Съдържание на общи мономерни антоциани (TMA) и общи полифеноли (TPP), антиоксидантен капацитет (DPPH и FRAP), добив и общи сухи вещества на екстракти от венчелистчета на маслодайна роза в зависимост от обработката с различни пектинолитични ензимни препарати.

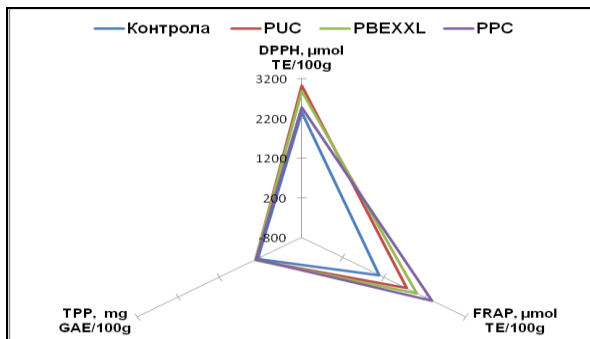
Показател \ Проба	Контрола (без ензимна обработка)	PUC	PBEXXL	PPC
TMA ^a , mg CGE/100 g	6.7 ± 0.3a	7.7 ± 0.3b	7.7 ± 0.4b	7.7 ± 0.3b
TPP ^a , mg GAE/100 g	271 ± 12a	320 ± 14b	320 ± 14b	318 ± 14b
DPPH ^a , μmol TE/ 100 g	2463 ± 111a	2720 ± 122b	2882 ± 130b	2865 ± 129b
FRAP ^a , μmol TE/ 100 g	1078 ± 49a	1750 ± 79b	2002 ± 90c	2368 ± 107d
Добив екстракт ^a , %	30.5 ± 1.0a	48.5 ± 2.0b	47.0 ± 2.0b	50.0 ± 2.0b
Общи сухи вещества ^a , %	3.2 ± 0.1a	4.0 ± 0.2b	4.1 ± 0.2b	4.3 ± 0.2b

^a Стойност ± SD. Различните букви след стойностите в рамките на един ред показват показват статистически значими разлики (Tukey's test, $P < 0.05$).

Резултатите показват, че използването на различни пектинолитични ензимни препарати не оказва влияние върху добива на полифенолни съединения и антоциани. В резултат на ензимната обработка съдържанието на общи полифеноли и общи антоциани нараства, съответно с 18% и 15%.

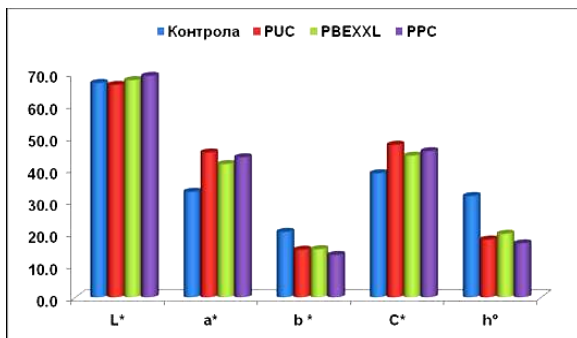
В унисон с повишеното полифенолно съдържание, стойностите на антиоксидантния капацитет на ензимно обработените проби са 1.1 - 1.2 пъти и 1.6 - 2.2 пъти по-високи, съответно за DPPH- и FRAP-теста, в сравнение с контролата.

На фигура 8 е показана радарна диаграма (Terashima et al., 2007), построена на база стойностите за съдържание на общи полифеноли (TPP), металоредуцираща (FRAP) и радикалоулавяща (DPPH) способност. Антиоксидантният капацитет на изследваните проби се дължи основно на наличието на полифеноли, действащи едновременно като донори на водород и електрони.



Фигура 8. Радарна диаграма на антиоксидантния капацитет на екстрактите от венчелистчета на маслодайна роза в зависимост от обработката с различни пектинолитични препарати.

Цветовите показатели на екстрактите от венчелистчета на маслодайна роза, са показани на фигура 9. Нарастването на стойностите на червения компонент (+ a^*) и намаляването на стойностите на ъгъла на отсѣнка (h°) предполагат засилване на червената тоналност на цвета на екстрактите. Тези резултати са в съответствие с повишаване на антоциановото съдържание в резултат на ензимната обработка (таблица 9).

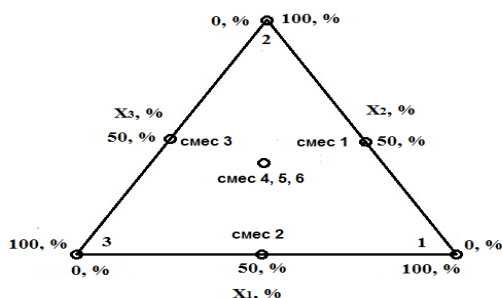


Фигура 9. Показатели за цвят по CIELab CIELCh на екстракти от венчелистчета на маслодайна роза в зависимост от обработката с различни пектинолитични ензимни препарати.

Изследвана е възможността за увеличаване добива на полифенолни съединения от венчелистчета на маслодайна роза чрез използване, самостоятелно или в комбинация, на пектинолитичен, целулозолитичен и хемицелулозолитичен ензимен препарат. Приложен е симплекс центроиден план на експеримента.

Ензимните препарати са използвани в съответствие със следния план на експеримента (фигура 10): 1 - 100% Pectinex Ultra Color (X1); 2 - 100%

Rohament CL (X₂); 3 - 100% Xylanase AN (X₃); смес 1 - X₁:X₂ = 1:1; смес 2 - X₁:X₃ = 1:1; смес 3 - X₂:X₃ = 1:1; смес 4, 5, 6 - X₁:X₂:X₃ = 1:1:1.



Фигура 10. Диаграма на симплекс центроидния план на експеримента.
X₁ - Pectinex Ultra Color;
X₂ – Rohament CL;
X₃ - Xylanase AN.

Наблюдават се значителни вариации в добива, съдържанието на общи полифеноли и общи антоцианини и антиоксидантния капацитет в резултат на ензимните обработки (таблица 10, фигура 11).

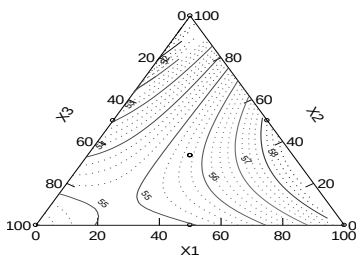
Таблица 10. Добив, съдържание на общи полифеноли (TPP) и общи антоцианини (TMA), антиоксидантен капацитет (DPPH, FRAP тест) на екстрактите от венчелистчета на маслодайана роза.

Опитен вариант	Добив (%)	TPP (mg GAE ^a / 100 g)	DPPH (μmol TE ^a / 100 g)	FRAP (μmol TE ^a / 100 g)	TMA (mg CGE ^a / 100 g)
Контрола без ензимна обработка)	34 ± 1a	308 ± 4a	2163 ± 45a	1114 ± 15a	12.6 ± 0.1a
1	46 ± 1b	389 ± 5b	2733 ± 56b	1864 ± 25b	15.1 ± 0.1b
2	41 ± 1c	325 ± 4c	1714 ± 35c	1445 ± 19c	13.8 ± 0.1c
3	50 ± 1d	359 ± 4d	2786 ± 57bd	1745 ± 23bd	14.4 ± 0.1d
Смес 1	50 ± 1d	358 ± 4d	2692 ± 55bd	1835 ± 24bd	15.6 ± 0.1e
Смес 2	50 ± 1d	352 ± 4d	2537 ± 52e	1855 ± 25e	14.6 ± 0.1df
Смес 3	50 ± 1d	368 ± 4de	2405 ± 50e	1774 ± 24f	13.7 ± 0.1cg
Смес 4, 5, 6	51 ± 1d	441 ± 5f	2767 ± 57bdf	1784 ± 24bdg	15.7 ± 0.1eh

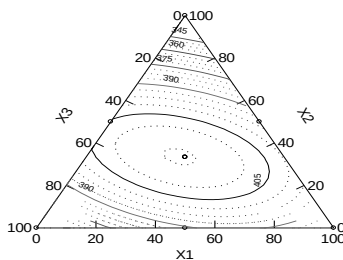
^a Стойност ± SD. Различните букви след стойностите в рамките на една колона показват статистически значими разлики (Tukey's test, P < 0.05).

Трикомпонентните смеси от ензими, в отношение 1:1:1, са с най-високо съдържание на общи полифеноли, достигайки 43% по-висока средна стойност (смес 4, 5, 6) (таблица 10) в сравнение с неензимно третираната проба (контрола).

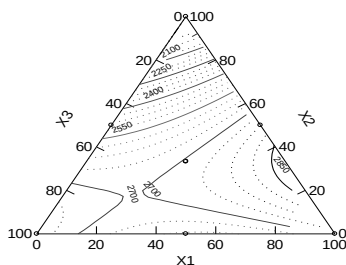
Ензимната обработка повишава (9 - 25%) екстрахируемостта на общите антоцианини (таблица 10, фигура 11 - е). Въпреки това при увеличаване на дялът на целулозолитичния (X₂) и/или хемицелулозолитичния (X₃) препарат, добивът на общи антоциани намалява, което може да се дължи на профилите на вторични активности на ензимните препарати (таблица 11).



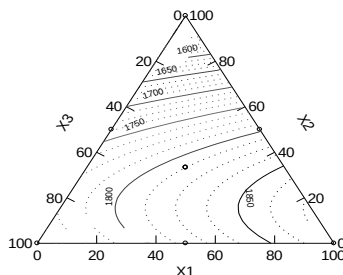
a



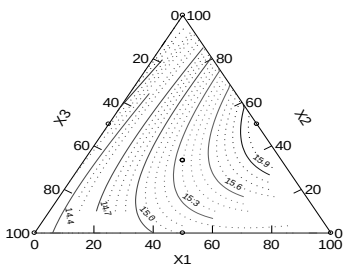
b



c



d



e

Фигура 11. Диаграми на симплексните изолинии за добива на екстрактите (a), TRP (b), DPPH (c), FRAP (d) и TMA (e) на екстракти от венчелистчета на маслодайна роза. вариантите на ензимна обработка са същите, като в таблица 10.

Присъствието на β -гликозидазни активности причинява дегликозилиране на антоцианидиновите гликозиди, което от своя страна води до нестабилни антоцианови агликони и последващо намаляване концентрацията на общите антоциани.

Таблица 11. Профил на активностите на използваните ензимни препарати.

Ензимна активност	Ензимен препарат		
	X_1^a	X_2^a	X_3^b
Ксиланазна	1790.4	2086.1	6286.8
Полигалактураназа	706.5	290.4	411.7
β -Ксилозидазна	7.2	49.3	20.0
β -Глюкозидазна	9.6	80.9	-
Протеиназна	12.7	-	36.4
Ендоглюконазна	437.5	2333.1	619.7

^a Резултатите са представени за U/mL.

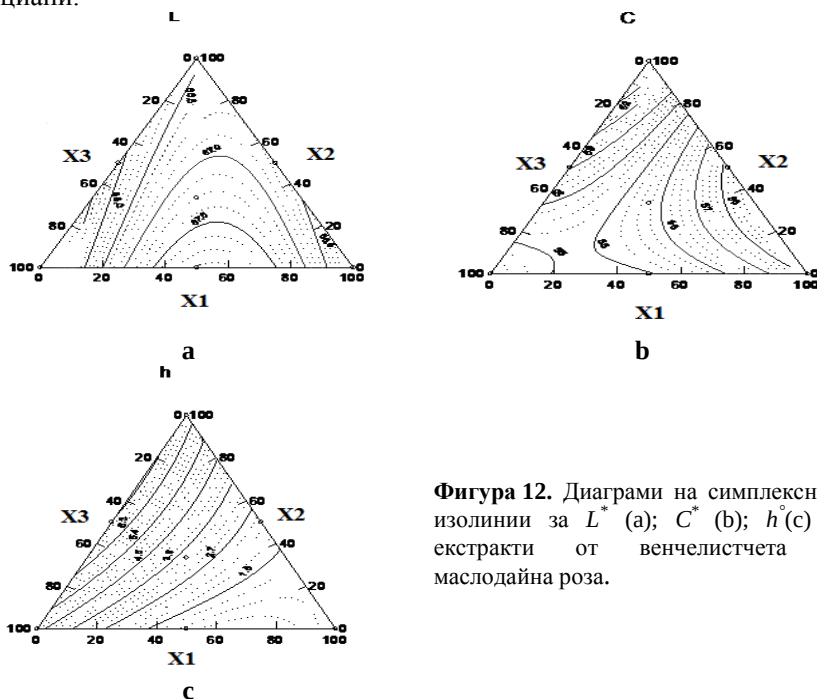
^b Резултатите са представени за U/g.

Резултатите за цветовите показатели на екстрактите са представени в таблица 12 и фигура 12.

Таблица 12. Показатели за цвят по CIELab и CIELCh на екстракти от венчелистчета на маслодайна роза.

Опитен вариант	L^*	$+a^*$	$+b^*$	C^*	h°
Контрола (без ензимна обработка)	66.9	40.9	15.9	40.4	17.7
1	66.1	58.1	1.3	58.1	1.3
2	66.8	49.3	5.6	49.6	6.5
3	64.8	55.6	4.4	55.8	4.5
Смес 1	65.3	58.2	3.5	58.3	3.4
Смес 2	66.5	55.0	2.2	55.0	2.3
Смес 3	64.5	52.5	7.5	53.0	8.2
Смес 4,5,6	68.3	55.0	4.7	55.6	2.5

Увеличението в стойностите на червеният компонент ($+a^*$) и понижение в стойностите на жълтия компонент ($+b^*$) и ъгъла на оттенъка (h°) са указания за засилването на червената тоналност на цвета в резултат на ензимната обработка, което е в положителна корелация с добива на общи антоциани.



Фигура 12. Диаграми на симплексните изолинии за L^* (a); C^* (b); h° (c) на екстракти от венчелистчета на маслодайна роза.

2.2.2. Влияние на параметрите на процеса

За изследване влиянето на дозата на трикомпонентната ензимна смес (X_1 , %E/S) и продължителността на ензимната обработка (X_2 , min) върху добива, съдържанието на общи полифеноли (TPP) и общи антоциани (TMA), антиоксидантния капацитет (DPPH и FRAP тест) и цветовете характеристики на екстрактите от венчелистчета на маслодайна роза е проведен експеримент в съответствие с оптимален композиционен план (ОКП) от вида $2^n + 2n + 3n_0$ (Божанов и Вучков, 1973; Ламбрев, 1994).

Наименованията на независимите променливи и нивата им на вариране са представени в таблица 13.

Таблица 13 Нива и интервали на вариране на независимите променливи.

Независими променливи	Долно ниво	Център на плана	Горно ниво	Звездно рамо, α
Доза на ензимната смес (%E/S ^a) – X_1	0.02	0.1	0.18	$-\alpha = -1$; $+\alpha = +1$
Продължителност на обработката (min) – X_2	30	120	210	$-\alpha = -1$; $+\alpha = +1$

^a ml ензимна смес за 100 g субстрат

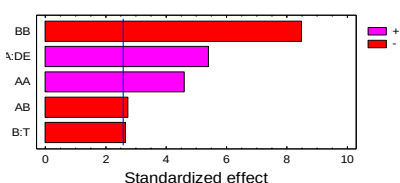
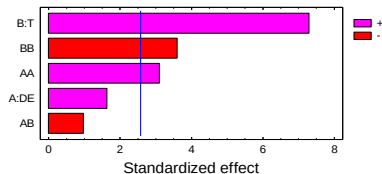
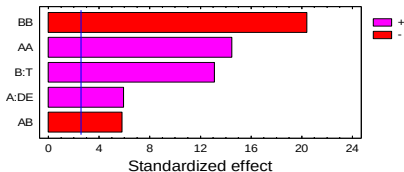
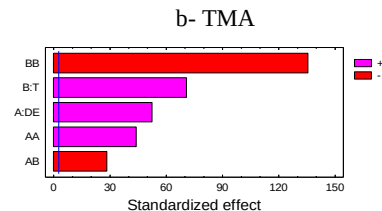
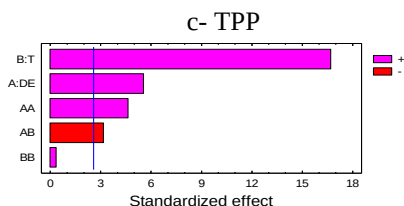
В таблица 14 е представена схемата на обработките и получените стойности на зависимите променливи на наблюдаваните параметри.

Таблица 14. Схема на обработките и резултати от оптималния композиционен план.

№	Доза на ензима		Време		TMA	TPP	DPPH	FRAP	Добив
	X_1 (%E/S ^a)		X_2 (min)		(mg CGE/100 g)	(mg GAE/100 g)	(μ mol TE/100 g)	(μ mol TE/100 g)	(%)
	код.	натур.	код.	натур.	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5
1	-	0.02	-	30	14.4	302.5	1880.0	1493.0	34.0
2	+	0.18	-	30	15.7	424.5	2637.0	1808.0	45.5
3	-	0.02	+	210	18.3	494.2	2796.0	2180.0	34.5
4	+	0.18	+	210	18.5	481.3	2950.0	2237.0	37.0
5	-	0.02	0	120	17.6	561.1	3242.0	1830.0	42.6
6	+	0.18	0	120	18.4	615.6	3697.0	2012.0	49.1
7	0	0.1	-	30	14.0	245.3	1965.0	1538.0	32.2
8	0	0.1	+	210	17.3	369.5	2579.0	2085.0	29.5
9	0	0.1	0	120	17.6	473.6	3187.0	1740.0	42.0
10	0	0.1	0	120	17.2	458.2	3157.0	1798.0	42.0
11	0	0.1	0	120	15.9	478.6	3185.0	1868.0	42.0

^a ml ензимна смес за 100 g субстрат

Основните ефекти - линейни, квадратични и междуфакторни, са обобщени и оценките им са представени на диаграма на Парето. От диаграмите на Парето (фигура 13) се вижда, че най-голямо влияние върху избраните зависими променливи оказва времето на ензимната обработка, като за добива, съдържанието на общи полифеноли и DPPH теста ефектът е квадратичен, а за съдържанието на общи антоциани и FRAP теста - линеен.



d- DPPH

Фигура 13. Диаграми на Парето за коефициентите на регресионния модел.

e- FRAP

На база резултатите от ОКП са получени следните регресионни уравнения за наблюдаваните величини (уравнения 12-16).

$$Y_1 = 13.19 - 25.03.X_1 + 0.06.X_2 + 171.51.X_1^2 - 0.04.X_1.X_2 - 0.0002.X_2^2, \text{ mg CGE/100 g};$$

$$R^2 = 0.937 \quad (12)$$

$$Y_2 = 190.88 - 2390.52.X_1 + 5.57.X_2 + 16525.5.X_1^2 - 4.68.X_1.X_2 - 0.02.X_2^2, \text{ mg GAE/100 g}; R^2 = 0.99 \quad (13)$$

$$Y_3 = 1082.22 - 3812.72.X_1 + 32.29.X_2 + 45855.3.X_1^2 - 20.94.X_1.X_2 - 0.11.X_2^2, \mu\text{mol TE/100 g};$$

$$R^2 = 0.999 \quad (14)$$

$$Y_4 = 1410.81 - 1473.14.X_1 + 3.71.X_2 + 18511.5.X_1^2 - 8.96.X_1.X_2 + 0.001.X_2^2, \mu\text{mol TE/100 g};$$

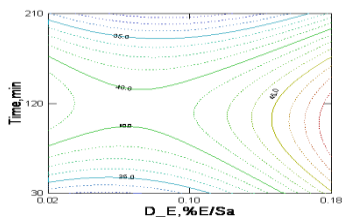
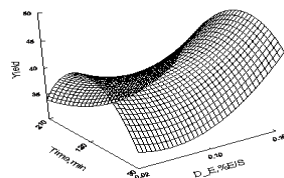
$$R^2 = 0.986 \quad (15)$$

$$Y_5 = 26.98 - 66.1.X_1 + 0.27.X_2 + 745.07.X_1^2 - 0.31.X_1.X_2 - 0.001.X_2^2, \%;$$

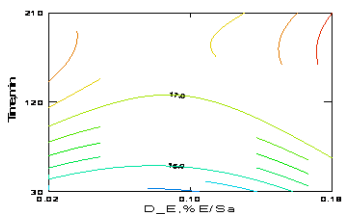
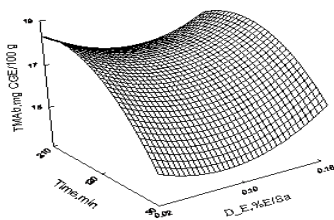
$$R^2 = 0.961 \quad (16)$$

На фигура 14 са показани повърхностите на отражение на изследваните величини от ОКП.

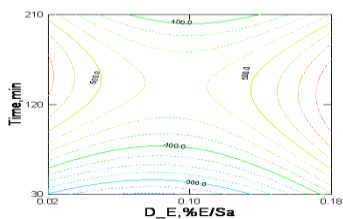
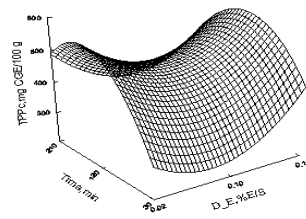
Резултатите, получени за показателите за цвета по системата CIELab и CIELCh на екстрактите от венчелистчета на маслодайна роза са представени в таблица 15 и фигура 15.



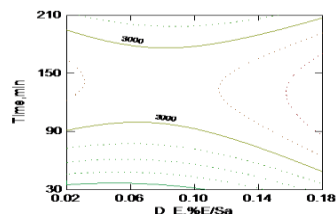
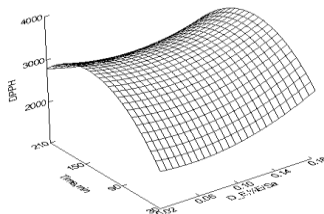
а- добив



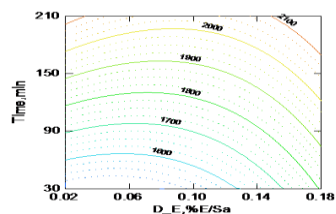
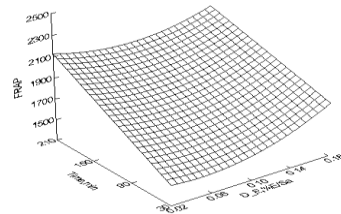
б- TMA



с- TPP



д- DPPH

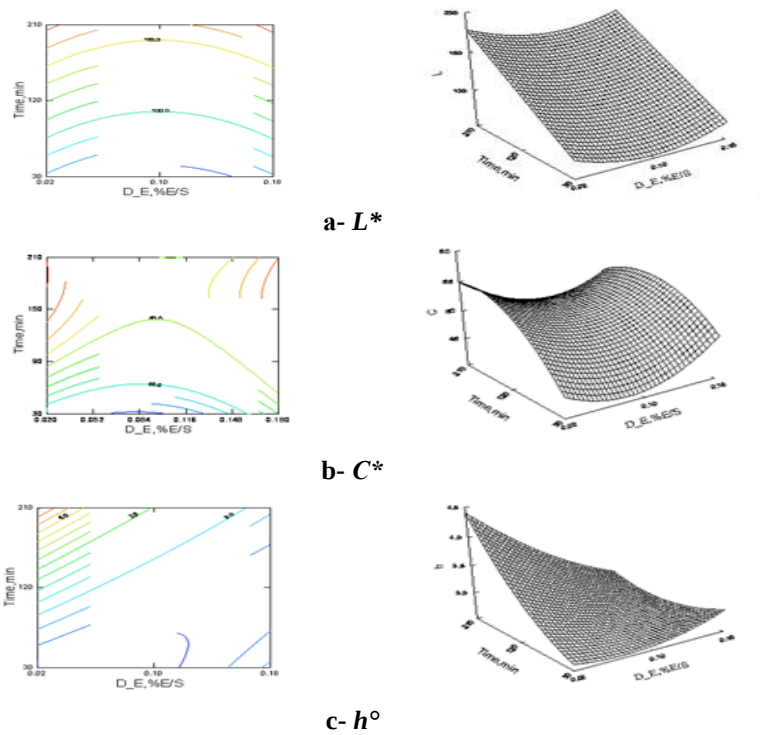


е- FRAP

Фигура 14. Повърхности на отражение и изолинии, показващи влиянието на дозата на ензимната смес (E/S, %) и времето на обработка (t, min) върху добива (а), TMA (б), TPP (с), DPPH (д) и FRAP (е) на екстрактите от венчелистчета на маслодайна роза.

Таблица 15. Показатели за цвят по CIELCh на екстрактите от венчелистчета на маслодайна роза.

№	Доза на ензима		Време		L^*	C^*	h°
	X_1 (%E/S ^a)		X_2 (min)				
	код.	натур.	код.	натур.	Y_6	Y_7	Y_8
1	-	0.02	-	30	70.9	43.5	2.6
2	+	0.18	-	30	71.5	47.6	2.9
3	-	0.02	+	210	66.7	54.9	4.4
4	+	0.18	+	210	68.0	53.7	2.9
5	-	0.02	0	120	89.2	52.9	3.3
6	+	0.18	0	120	90.5	54.3	2.7
7	0	0.1	-	30	52.2	41.2	2.6
8	0	0.1	+	210	48.4	50.0	3.5
9	0	0.1	0	120	68.4	53.7	2.9
10	0	0.1	0	120	71.5	47.5	2.9
11	0	0.1	0	120	73.2	46.6	2.6



Фигура 15. Повърхности на отражение и изолинии за цветовите показатели на екстракти от венчелистчета на маслодайна роза.

Стойностите на яркостта (L^*) и наситеността (C^*) на екстрактите нарастват с увеличаване на времето от 30 до 210 min (фигура 15 - а, б). Повишение се наблюдава и в стойностите на оттенъка (h°), което е по-силно изразено при по-ниските дози на ензимната смес (фигура 15 - с).

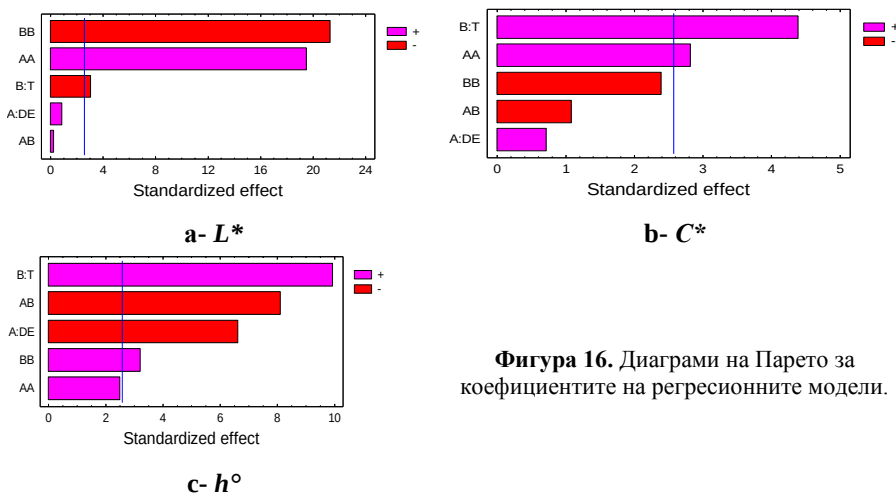
Получени са следните регресионни уравнения, описващи с висока точност ($R^2 = 0.864 - 0.993$) наблюдаваните показатели (уравнения 17-19).

$$Y_6 = 66.01 - 586.88.X_1 + 0.59.X_2 + 2953.13.X_1^2 + 0.02.X_1.X_2 - 0.00254938.X_2^2; R^2 = 0.99 \quad (17)$$

$$Y_7 = 40.56 - 104.24.X_1 + 0.18.X_2 + 676.40.X_1^2 - 0.18.X_1.X_2 - 0.0005.X_2^2; R^2 = 0.87 \quad (18)$$

$$Y_8 = 2.50 - 1.68.X_1 + 0.005.X_2 + 27.14.X_1^2 - 0.06.X_1.X_2 + 0.00003.X_2^2; R^2 = 0.98 \quad (19)$$

На фигура 16 са представени диаграмите на Парето за коефициентите на регресионните модели.



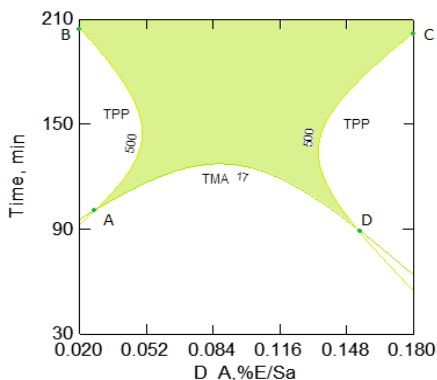
Фигура 16. Диаграми на Парето за коефициентите на регресионните модели.

От диаграмите на Парето се вижда, че времето на ензимната обработка (линеен или квадратичен ефект) оказва най-голямо влияние върху цветовете характеристики на екстрактите, следвано от квадратичния ефект на дозата ензимна смес (за светлостта и наситеността). Междофакторното взаимодействие на дозата на ензимната смес и времето на обработката оказва влияние само върху стойностите на ъгъла на оттенъка (h°).

Проведена е графична оптимизация (фигура 17) на ензимната екстракция на венчелистчета на маслодайна роза, при условията, представени в таблица 16.

Таблица 16. Граници на целевите функции за оптимизация на ензимната екстракция на венчелистчета на маслодайна роза.

У-ние №	Целева функция	Граници на целевата функция
12	TMA, mg CGE/100 g	TMA > 17.0
13	TPP, mg GAE/100 g	TPP > 500.0



Интервалите на вариране на дозата на трикомпонентната смес (0.052 - 0.132%) и продължителността на обработката (125 - 205 min) определят оптималната област за провеждане на процеса, позволяващ получаването на екстракти с високо полифенолно и антоцианово съдържание.

Фигура 17. Графична оптимизация на ензимната екстракция от венчелистчета на маслодайна роза

Анализът на получените резултати позволява да се формулират следните по-важни изводи:

1. В резултат на ензимната обработка съдържанието на общи полифеноли и общи антоциани в екстрактите от венчелистчета на маслодайна роза нараства в сравнение с контролата (без ензимна обработка), съответно с 18% и 15%, независимо от типа на пектинолитичния препарат.
2. Обработката с трикомпонентната ензимна смес, включваща пектинолитичен, целулозолитичен и хемицелулозолитичен препарат (1:1:1), допълнително повишава екстрахируемостта на общите полифеноли и общите антоциани, като съдържанието им достига съответно 43% и 25% високи стойности в сравнение с контролата (без ензимна обработка).
3. В резултат на ензимната обработка се засилва червената тоналност на цвета на екстрактите, което се отчита чрез повишаването на стойностите на червения компонент ($+a^*$) и понижаването на ъгъла на оттенъка (h°).
4. Получените математични модели описват с висока точност ($R^2 = 0.94 - 0.99$) влиянието на дозата на трикомпонентната ензимна смес и продължителността на екстракцията върху съдържанието на общи полифеноли и общи антоциани и антиоксидантния капацитет (DPPH- и FRAP-тест) на екстрактите.
5. Интервалите на вариране на дозата на трикомпонентната смес (0.052 - 0.132%) и продължителността на обработката (125 - 205 min) определят оптималната област за провеждане на процеса, позволяващ получаването на екстракти с високо полифенолно и антоцианово съдържание.

3. Влияние на ензимната екстракция върху стабилността на антоцианите на венчелистчетата на маслодайна роза

С оглед на възприетия в настоящата дисертация принцип на минимална преработка, като основа за технологията на разработване на функционални напитки, съхранението на екстрактите е проведено при 10°C. Тази температура се използва за ускорено тестване на стабилността при съхранение на непастьоризирани плодови сокове (Patrignani et al., 2013). Съдържанието на общите антоциани на екстрактите, намалява по време на съхранението (10°C) (таблица 17).

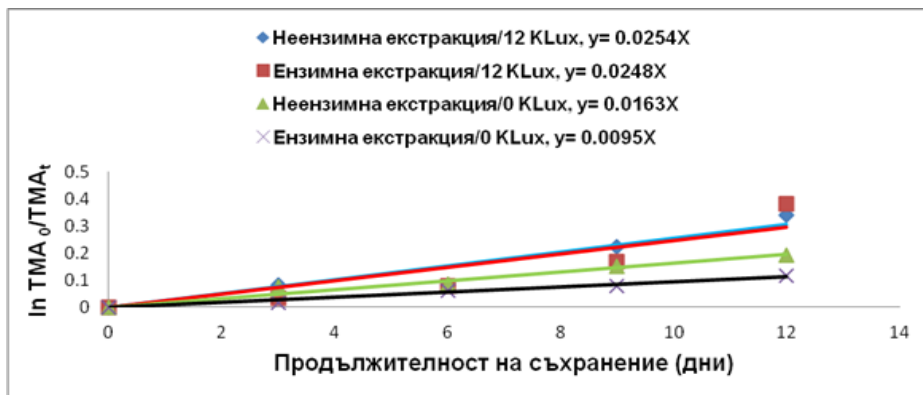
Времето на полуразпад ($T_{1/2}$) е определено чрез изчисляване съотношението на съдържанието на антоциани в нулевия ден (TMA_0) и съдържанието им TMA_t съответно при 3, 6 и 9 и 12 дни на съхранение. Натуралният логаритъм на съотношението TMA_0/TMA_t е представен графично (фигура 18) в зависимост от продължителността на съхранение. Наклонът (k) на правата, преминаваща през началото на координатната система, е използван за изчисляване на времето на полуразпад ($T_{1/2} = \ln 2/k$). Антоциановата деградация (фигура 18) протича като реакция от първи порядък, което се потвърждава от високите стойности на коефициента на детерминация (R^2) (таблица 17). Подобен кинетичен модел на деградацията на антоциани е установен от Динкова (2014) при изследване стабилността на антоцианите при съхранение (10°C) на екстракти от кожици на черни боровинки.

Таблица 17. Съдържание (mg CGE/100 g) и време на полуразпад ($T_{1/2}$) на общите антоцианите при съхранение (10°C) на екстрактите от венчелистчетата на роза.

Продължителност на съхранение, (дни)	Съхранение на светло (12 KLux)		Съхранение на тъмно (0 KLux)	
	Неензимна екстракция	Ензимна екстракция	Неензимна екстракция	Ензимна екстракция
0	10.8	12.1	10.8	12.1
3	9.9	11.7	10.0	11.9
6	9.9	11.2	9.9	11.4
9	8.6	10.2	9.3	11.2
12	7.7	8.3	8.9	10.8
$T_{1/2} (R^2)^a$, (дни)	27.0 (0.913)	27.9 (0.821)	42.5 (0.959)	73.0 (0.975)

^a R^2 – коефициент на детерминация

Светлината влияе на антоцианите по два различни начина. От една страна тя е необходима за синтезирането им, а от друга е свързана с тяхното разрушаване (Markakis, 1982).



Фигура 18. Кинетика на деградацията на общите антоциани при съхранение (10 °C) на екстрактите от венчелистчета на маслодайна роза: TMA_0 – обща концентрация на антоцианите в нулевия ден; TMA_t – концентрация на общите антоциани съответно след 3, 6, 9 и 12 дни съхранение.

Времето на полуразпад нараства 1.6 - 2.6 пъти при пробите, съхранявани на тъмно в сравнение с тези, съхранявани на светло (таблица 17). Изследване (Maier et al., 2009) върху стабилността на антоцианите при съхранение до 24 седмици при неонова светлина и на тъмно показва, че светлината значително намалява съдържанието на полифеноли и антоциани.

Нарастването с 1.7 пъти на времето за полуразпад на антоцианите при съхранение на тъмно на екстракта, получени чрез ензимна обработка, е указание за повишаване на стабилността на пигментите, което е в съответствие с резултатите, представени от Динкова (2014). Възможно обяснение на стабилизиращия ефект е, че наред с антоцианите, при ензимната обработка се освобождават и други полифеноли например фенолни киселини, водещи до стабилизиране по механизма на междумолекулната копигментация.

Резултатите, получени за цветовите показатели на екстрактите от венчелистчета на масодайна роза, подложени на съхранение (10 C) по CIELab и CIELCh са представени в таблица 18.

Резултатите от таблица 18 показват слабо покачване в стойностите на яркостта (L^*). Пробите изсветляват вероятно, в резултат на деграция на антоцианите. Наблюдава се понижение в стойностите на червения цвят ($+a^*$) при неензимно обработената проба, съхранявана на светло, докато при ензимно обработената проба има покачване. При пробите, съхраняване на тъмно се запазва същата тенденция. Данните корелират със съдържанието на антоциани в изследваните проби (таблица 17).

Таблица 18. Показатели за цвят по CIELab и CIELCh и обща цвetoва разлика (ΔE) при съхранение (10°C) на екстрактите от венчелистчета на роза.

Продължителност на съхранение, дни	L^*	$+a^*$	$+b^*$	C^*	h	ΔE (LCh)
Неензимна екстракция/съхранение на светло (12 KLux)						
0	69.2	39.9	10.9	41.4	15.2	
3	68.6	39.2	10.6	40.7	15.2	0.92
6	72.0	38.3	9.5	39.4	14.0	3.64
9	70.6	37.4	11.2	39.1	16.6	3.03
12	70.7	36.1	13.2	38.5	20.1	5.89
Ензимна екстракция/съхранение на светло (12 KLux)						
0	72.2	31.9	5.7	45.9	7.1	
3	72.1	47.2	4.3	47.3	5.3	2.28
6	72.6	46.1	6.4	46.5	7.9	1.08
9	74.3	43.5	5.2	43.8	6.8	2.98
12	75.0	39.0	7.8	39.8	6.2	6.77
Неензимна екстракция/съхранение на тъмно (0 KLux)						
0	69.2	39.9	10.9	41.4	15.2	
3	71.5	40.7	9.7	41.8	13.4	2.95
6	71.9	40.7	11.2	42.2	15.4	2.85
9	71.3	40.2	10.2	41.4	14.3	2.28
12	70.8	38.9	12.5	40.9	17.8	3.09
Ензимна екстракция/съхранение на тъмно (0 KLux)						
0	72.2	31.9	5.7	45.9	7.1	
3	72.0	46.4	5.2	46.7	6.4	1.08
6	73.3	47.1	6.1	47.5	7.4	1.96
9	73.1	46.4	5.2	46.8	6.4	1.45
12	73.1	45.7	6.8	46.2	8.4	1.61

Анализът на получените резултати ни позволява да направим следните по-важни изводи:

1. Стойностите на времето на полуразпад на общите антоциани са 1.6 - 2.6 пъти по-ниски при съхранение на светло (12 KLux) на екстрактите от венчелистчета на роза.
2. В резултат на ензимната екстракция на венчелистчета на роза времето на полуразпад на общите антоциани при съхранение (10°C) на тъмно (0 KLux) нараства 1.7 пъти.

4. Разработване на технология на функционални напитки на база сокове от ягодоплодни и растителни екстракти

Разработена е технология за получаване на функционални напитки на база сокове от ягодоплодни и обогатени на полифеноли растителни екстракти. Соковете са извлечени от замразени плодове - диворастящи черни боровинки и култивирани ягоди. В предварителни проучвания, на база сензорна оценка, е определен относителният дял на вложения екстракт. Установено е, че 25% (v/v) екстракт от маслодайна роза или екстракт от сушени листа на маточина може да се вложи без компромис в консуматорската приемливост.

Добавянето на екстракт от сушени листа на маточина и венчелистчета от маслодайна роза води до повишение съдържанието на полифенолите съответно 63 - 89% за напитка от ягода и между 23 - 34% повишение при напитка от боровинки (таблица 19).

Таблица 19. Съдържание на общите полифеноли (TPP), антиоксидантния капацитет (DPPH и FRAP) при съхранение (10°C) на функционалните напитки.

Продължителност на съхранение, (дни)	Напитка ягода (контрола)	Напитка ягода и екстракт от маточина	Напитка ягода и екстракт от роза	Напитка черна боровинка (контрола)	Напитка черна боровинка и екстракт от маточина	Напитка от черна боровинка и екстракт от роза
TPP (mg GAE/100 g)						
0	170.8	321.0	277.8	383.4	514.8	473.1
3	144.3	318.1	265.7	342.2	493.9	449.5
6	139.0	299.3	244.2	334.3	472.8	448.7
9	138.7	289.7	239.0	330.6	470.6	430.0
DPPH (μmol TE/100 g)						
0	572.0	1545.5	1251.5	1677.5	2317.5	2381.3
3	546.6	1419.5	1238.5	1600.0	2117.5	2281.3
6	516.2	1266.5	1144.0	1573.5	2104.4	2118.8
9	512.6	1259.5	1127.5	1516.5	1956.3	1656.3
FRAP (μmol TE/100 g)						
0	459.6	1271.5	1030.0	1677.5	2339.4	2307.5
3	452.0	1270.5	966.0	1545.0	2179.4	2225.6
6	452.0	1147.5	957.5	1515.5	2161.3	2180.0
9	442.0	1141.5	939.5	1502.0	1937.5	2127.5

Паралелно се наблюдава повишение на антиоксидантния капацитет с добавянето на екстракт, като ефекта е по- силно изразен при напитки на основа ягода. Наблюдват се сходни загуби в съдържанието на полифеноли и

антоциани и при двете групи сокове след хладилно съхранение - загуби съответно в границите 6 - 19% в полифенолното съдържание и 6 - 13% в мономерните антоциани.

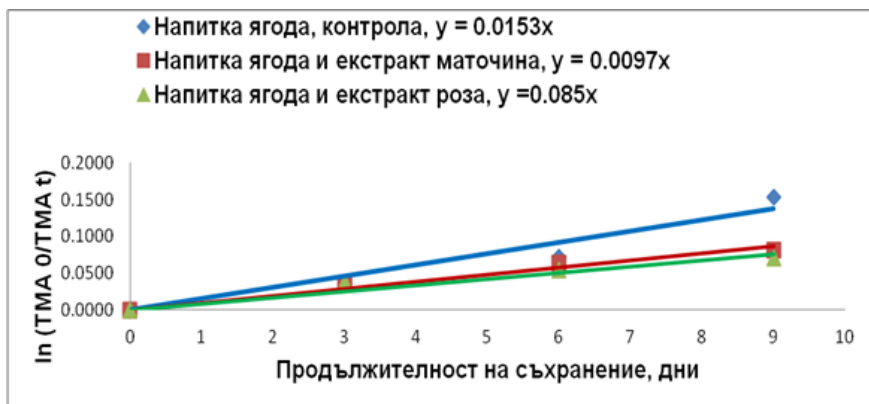
Данните за съдържанието и времето на полуразпад (таблица 20) и кинетика на деградацията на общите антоциани при съхранение (10°C) на функционалните напитки фигура 19 - а; б показва увеличение на времето на полуразпад на общите антоциани при добавяне на екстрактите. Повишението е по-ясно изразено при напитки с добавка на екстракт от маслодайна роза - повишение от 81% за напитка на основа сок ягода и 74% за напитка на основа сок черна боровинка.

Нарастването, на времето за полуразпад на антоцианите 1.6 до 1.8 пъти в напитките на основа сок ягода и 1.2 - 1.7 пъти в напитки основа сок черни боровинки е указание за повишаване на стабилността на пигментите. Възможното обяснение на стабилизиращият ефект е междумолекулната копигментация, дължаща се на повишената концентрация на полифенолни съединения в резултат от добавянето на екстрактите (маточина и маслодайна роза). Добавянето на полифеноли, действащи като копигменти, например флавоноли и фенолни киселини, е доказано (Михалев и др., 2006; Шиков, 2011; Shikov et al., 2012), като надежден технологичен подход за подобряване на антоциановата стабилност.

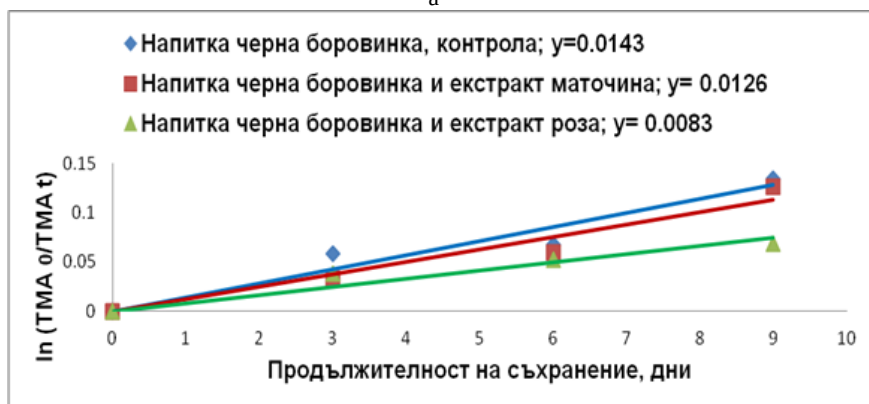
Таблица 20. Съдържание (mg CGE/100 g) и време на полуразпад ($T_{1/2}$) на общите антоцианите при съхранение (10°C) на функционалните напитки.

Продължителност на съхранение, (дни)	Напитка ягода (контрола)	Напитка ягода и екстракт от маточина	Напитка ягода и екстракт от роза	Напитка черна боровинка (контрола)	Напитка черна боровинка и екстракт от маточина	Напитка от черна боровинка и екстракт от роза
0	23.1	22.9	26.6	204.6	203.7	211.2
3	22.3	22.1	25.6	192.9	197.0	203.3
6	21.5	21.5	25.2	191.2	192.0	200.4
9	19.8	21.1	24.8	178.8	179.5	197.1
$T_{1/2}$	45.0	71.5	81.5	48.0	55.0	83.5
R^{2a}	0.940	0.975	0.920	0.932	0.947	0.918

^a R^2 – коефициент на детерминация



a



b

Фигура 19. Кинетика на деградацията на общите антоциани при съхранение (10°C) на функционалните напитки
а) база сок ягода и б) база сок черна боровинка

TMA₀ –концентрация на общите антоциани в нулевия ден;

TMA_t –концентрация на общите антоциани съответно след 3, 6 и 9 дни съхранение.

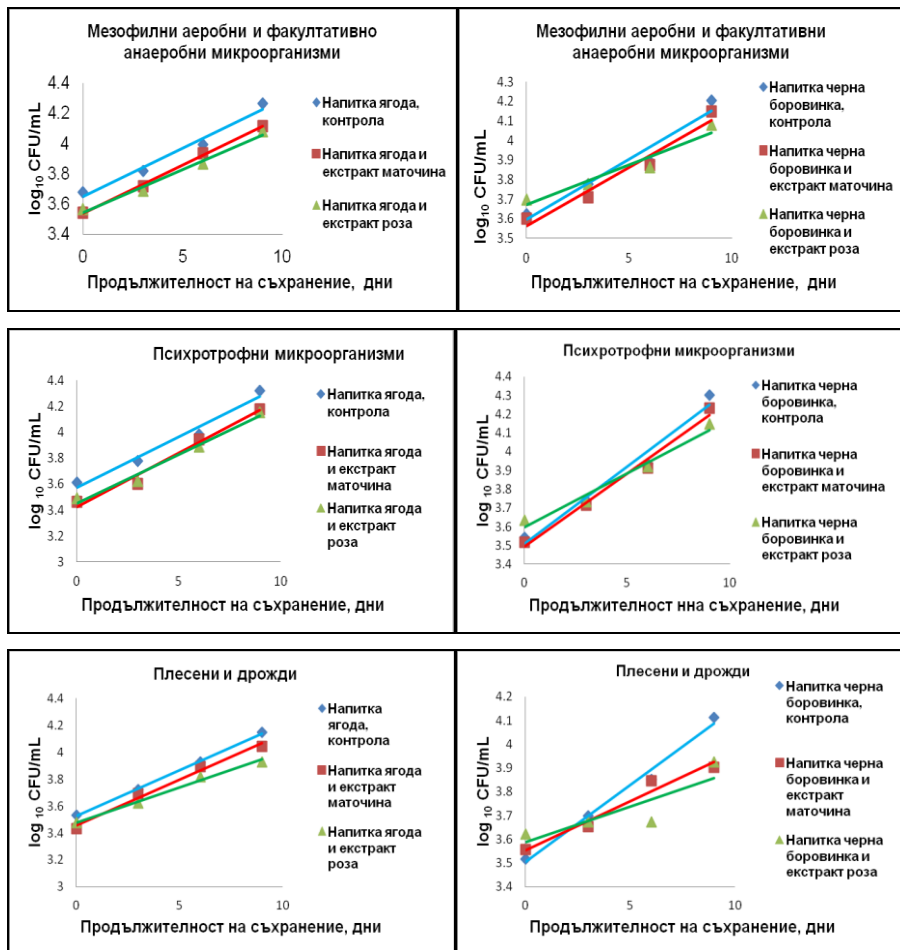
В таблица 21 са показани промените в цвета на напитките на основа ягодоплодни с добавка на екстракти от маточина и маслодайна роза при хладилно съхранение.

Наблюдава се повишение в стойностите на светлостта (L^*) на пробите. Резултатите корелират с понижаването на стойностите на наситеността (C^*), което е индикация за загуба на чистотата на цвета. Понижаването на стойностите на общата цветова разлика при съхранението, особено при напитките на база сок от ягода, е указание за повишаване стабилността на цвета.

Таблица 21. Показатели за цвят по CIELab и CIELCh и обща цвetoва разлика (ΔE) на функционалните напитки на база ягода.

Продължителност на съхранение, (дни)	L^*	a^*	b^*	C^*	h	ΔE (LCh)
<i>Сок от ягода</i>						
0	82.9	32.5	29.6	44.0	42.3	
3	84.1	29.6	24.2	38.3	39.3	6.6
6	87.2	19.2	17.3	25.8	42.0	18.7
9	86.6	23.0	17.6	29.0	37.4	16.2
<i>Сок от ягода и екстракт от маточина</i>						
0	83.1	30.2	27.1	40.7	41.9	
3	75.3	42.3	36.3	55.8	40.7	17.0
6	80.3	33.7	28.3	44.0	40.1	4.7
9	85.9	27.4	20.1	34.0	36.3	9.2
<i>Сок от ягода и екстракт от маслодайна роза</i>						
0	82.7	32.7	25.6	41.7	38.3	
3	85.3	27.8	21.3	25.0	37.4	16.9
6	81.4	35.8	28.3	44.4	40.2	3.5
9	85.4	27.8	19.9	34.2	35.6	8.4
<i>Сок от черна боровинка</i>						
0	77.6	45.7	7.5	46.3	9.3	
3	85.7	31.1	3.5	31.3	6.4	17.3
6	77.7	44.0	7.5	42.8	10.6	3.7
9	83.5	34.4	3.5	34.5	5.9	13.6
<i>Сок от черна боровинка и екстракт от маточина</i>						
0	75.0	45.0	6.4	45.9	7.9	
3	80.5	37.9	3.5	38.1	5.4	9.9
6	76.2	46.6	7.2	45.1	9.8	2.4
9	82.8	34.0	2.6	34.1	4.4	14.6
<i>Сок от черна боровинка и екстракт от маслодайна роза</i>						
0	77.2	42.6	6.4	43.7	8.5	
3	74.1	48.8	6.9	49.3	8.0	6.4
6	69.1	57.3	11.8	56.3	12.6	15.5
9	69.4	56.8	10.2	57.6	10.1	16.0

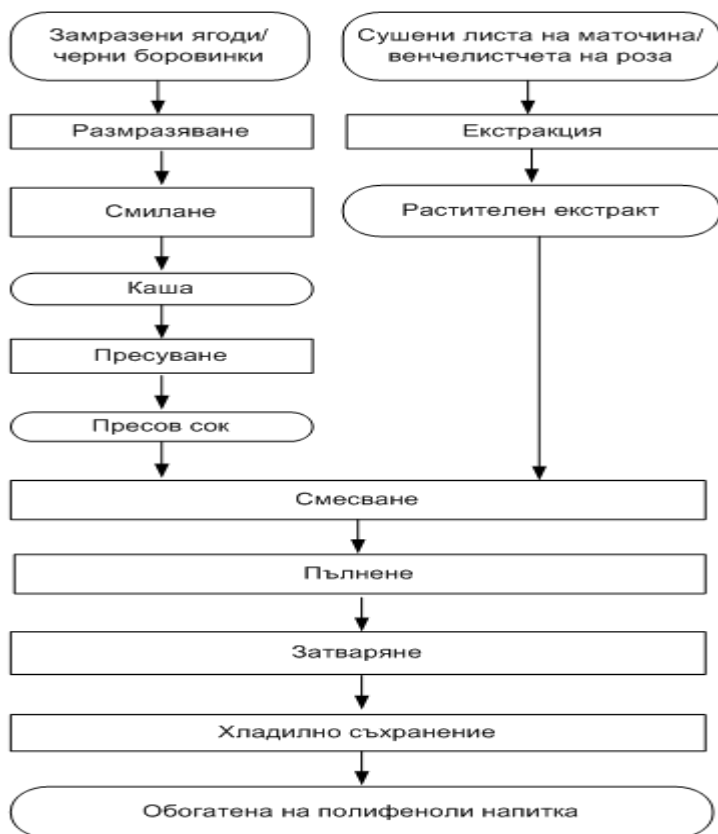
На фигура 20. са представени промените в микробиологичните показатели при съхранение (10°C) на функционалните напитки



Фигура 20. Микробиологични показатели при съхранение (10°C) на функционалните напитки.

От резултатите се вижда, че са получени микробиологично стабилни готови напитки, като стабилността им се запазва в изследвания период на съхранение (10°C).

На фигура 21 е представена принципна технологична схема за производството на обогатени на полифеноли напитки на база прясно изпресувани сокове от ягодоплодни и растителни екстракти.



Фигура 21. Технологична блок схема за производствата на функционални напитки на база сокове от ягодоплодни и растителни екстракти.

Анализът на получените резултати позволява да се формулират следните по-важни изводи:

1. Добавянето на растителните екстракти води до увеличаване съдържанието на общи полифеноли с 63 - 88% и 23 - 34% съответно при напитките на база сок от ягоди и напитките на база сок от черни боровинки.
2. В резултат на добавянето на растителните екстракти времето на полуразпад на общите антоциани при съхранение (10 °C) на тъмно (0 KLux) нараства 1.6 - 1.8 пъти при напитките на база сок от ягоди и 1.2 - 1.7 пъти при напитките на база сок от черни боровинки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщени изводи

1. Съдържанието на общи полифеноли на екстрактите от сушени листа на маточина намалява с увеличаване на продължителността на екстракцията; съдържанието е по-високо при екстрактите вариант запарка в сравнение с вариант отвара. Съдържанието на общи полифеноли на екстрактите от замразени листа е 38 - 41% (вариант запарка) и 17 - 29% (вариант отвара) по-ниско в сравнение с това на екстрактите от сушени листа.

2. Яркостта на цвета (L^*) на екстрактите вариант запарка от листа на маточина намалява с увеличаване продължителността на екстракцията, като стойностите са 2 - 3 пъти по-високи при екстрактите от сушени листа в сравнение със замразената суровина. Органолептичната оценка, изразена чрез степента на предпочитание, на екстрактите от сушени листа на маточина е по-висока при вариант запарка в сравнение с вариант отвара.

3. Получените математични модели описват с висока точност ($R^2 = 0.87 - 0.99$) влиянието на температурата и продължителността на екстракцията върху съдържанието на общи полифеноли, антиоксидантния капацитет (DPPH- и FRAP-тест), добива (общи сухи вещества) и цветовете характеристики на екстрактите от сушени листа на маточина. Интервалите на вариране на температурата (55 – 65°C) и продължителността (10 – 45 min) определят оптималната област за провеждане на процеса, позволяващ получаването на екстракти с високо полифенолно съдържание.

4. В резултат на ензимната обработка съдържанието на общи полифеноли и общи антоциани в екстрактите от венчелистчета на маслодайна роза нараства в сравнение с контролата (без ензимна обработка), съответно с 18% и 15%, независимо от типа на пектинолитичния препарат. Обработката с трикомпонентната ензимна смес, включваща пектинолитичен, целулозолитичен и хемицелулозолитичен препарат (1:1:1), допълнително повишава екстрахируемостта на общите полифеноли и общите антоциани, като съдържанието им достига съответно 43% и 25% по-високи стойности в сравнение с контролата.

5. Получените математични модели описват с висока точност ($R^2 = 0.94 - 0.99$) влиянието на дозата на трикомпонентната ензимна смес и продължителността на екстракцията върху съдържанието на общи полифеноли и общи антоциани и антиоксидантния капацитет (DPPH- и FRAP-тест) на екстрактите. Интервалите на вариране на дозата на трикомпонентната смес (0.052 - 0.132%) и продължителността на обработката (125 - 205 min) определят оптималната област за провеждане на процеса, позволяващ получаването на екстракти с високо полифенолно и антоцианово съдържание.

6. Стойностите на времето на полуразпад на общите антоциани са 1.6 - 2.6 пъти по-ниски при съхранение (10°C) на светло (12 KLux) на екстрактите от венчелистчета на роза. В резултат на ензимната екстракция времето на полуразпад на общите антоциани при съхранението на тъмно (0 KLux) нараства 1.7 пъти.

7. Добавянето на растителните екстракти води до увеличаване съдържанието на общи полифеноли с 63 - 88% и 23 - 34% съответно при напитките на база сок от ягоди и напитките на база сок от черни боровинки; времето на полуразпад на общите антоциани при съхранение (10°C) на тъмно (0 KLux) нараства 1.6 - 1.8 пъти при напитките на база сок от ягоди и 1.2 - 1.7 пъти при напитките на база сок от черни боровинки.

Приноси

1. Установени са зависимостите на съдържанието на общи полифеноли, антиоксидантния капацитет и цветовите характеристики на екстрактите от листа на маточина от метода на съхранение на суровината и варианта на екстракция.

2. Получени са математични модели, описващи влиянието на температурата и продължителността на екстракцията върху съдържанието на общи полифеноли, антиоксидантния капацитет и цветовите характеристики на екстрактите от сушени листа на маточина.

3. Установени са зависимостите на съдържанието на общи полифеноли и общи антоциани, антиоксидантния капацитет и цветовите характеристики на екстрактите от венчелистчета на роза от типа на ензимните препарати и е оптимизиран съставът на трикомпонентната ензимна смес, включваща пектинолитичен, целулозолитичен и хемицелулозолитичен препарат.

4. Получени са математични модели, описващи влиянието на дозата на трикомпонентната ензимна смес и продължителността на екстракцията върху съдържанието на общи полифеноли и общи антоциани и антиоксидантния капацитет на екстрактите от венчелистчета на роза.

5. Оптимизирани са процесите на екстракция на листа на маточина и венчелистчета на роза, позволяващи получаването на обогатени на полифеноли растителни екстракти.

6. Разработена е технология на функционални напитки на база сокове от ягодоплодни и растителни екстракти.

7. Доказано е технологичното значение на добавянето на растителните екстракти – подобряване стабилността на общите антоциани и цвета при съхранение на тъмно на напитките на база сокове от ягодоплодни.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. 1. **Калчева – Караджова, К.**, Луднева, Д., Михалев, К., Кънева, М. (2012). Антиоксидантен капацитет на водни екстракти от листа на маточина (*Melissa officinalis* L.). Сборник доклади от Международна научно-практическа конференция "Храни, технологии и здраве", 08.11.2012, Пловдив, 27 - 32 (ISSN 2367-6213).
2. **Калчева – Караджова, К.**, Луднева, Д., Михалев, К., Кънева, М. (2013). Органолептична оценка на водни екстракти от сушени листа на маточина (*Melissa officinalis* L.). Научни трудове на УХТ - Пловдив, LX, 398 - 401 (ISSN 1314-7102).
3. **Калчева – Караджова, К.**, Луднева, Д., Михалев, К., Пенев, Н. Кънева М., Шиков, В., (2013). Влияние на условията на водна екстракция върху антиоксидантната активност на екстракти от листа на маточина (*Melissa officinalis* L.). Сборник доклади от Международна научно-практическа конференция "Храни, технологии и здраве", 7-8.11.2013, 127-132 (ISBN 978-954-24-0229-9).

ABSTRACT

The main objective of this study was to develop technologies for polyphenol-enriched plant extracts and their applications as ingredients of functional beverages.

The contents of total polyphenols in water extracts from dried leaves of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) decreased with increasing extraction time. The contents of total polyphenols in extracts from frozen lemon balm leaves were 38 - 41% (infusion) and 17 - 29% (decoction) lower than that of the dried raw material extracts. Using response surface methodology, the optimized extraction conditions for dried lemon balm leaves were established - temperature (55 - 65°C) and extraction time (10 - 45 min).

The efficiency of enzyme-assisted extraction for the recovery of polyphenols from rose (*Rosa damascena* Mill.) petals was evaluated performing a simplex centroid experimental design for mixture with three components (pectinolytic, cellulolytic and hemicellulolytic preparation). The ternary enzyme combination (1:1:1) led to the highest contents of total polyphenols, reaching 43% higher average value as compared to the control (without enzymatic treatment) sample. Enzymatic treatments also enhanced (9 - 25%) the extractability of total anthocyanins. Using response surface methodology, the optimized extraction conditions (at 50°C) were established - enzyme mixture dosage (0.52 - 0.132%) and maceration time (125 - 205 min).

The stability of total anthocyanins was monitored during storage (10°C) of rose petal extracts. The half-life values increased 1.7 times due to the enzyme-assisted extraction, when extracts were stored in dark.

Following a minimal processing strategy, to reduce the number of unit operations and to keep the sensory profile as natural as possible, freshly pressed strawberry and bilberry juices were obtained for preparing functional beverages. The contents of total polyphenols increased 63 - 88% and 23 - 34% due to the addition of plant extracts to the strawberry and bilberry juice, respectively.

LIST OF PUBLICATIONS

This thesis is based on the following original publications:

1. **Kalcheva – Karadzhova, K.**, Ludneva, D., Mihalev, K., Kaneva, M. (2012). Antioxidant capacity of aqueous extracts from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. 50 years FoodRDI International Scientific-Practical Conference "Food, Technologies & Health" Proceedings Book, 08.11.2012, Plovdiv, 27 - 32 (ISSN 2367-6213).
2. **Kalcheva – Karadzhova, K.**, Ludneva, D., Mihalev, K., Kaneva, M. (2013). Sensory evaluation of aqueous extracts from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. Scientific works Volume LX. "Food science, engineering and technologies - 2013", 18 - 19 October 2013, Plovdiv. 398 - 401 (ISSN 1314-7102).
3. **Kalcheva – Karadzhova, K.**, Ludneva, D., Mihalev, K., Penov, N. Kaneva M., Shikov, V. (2013). Effect of aqueous extraction conditions on antioxidant activity of extracts from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. FoodRDI International Scientific-Practical Conference "Food, Technologies & Health" Proceedings Book, 7-8.11.2013, 127-132 (ISBN 978-954-24-0229-9).