

# Utjecaj ultrazvučne homogenizacije na uspješnost mikroinkapsulacije ekstrakta tropa grožđa s proteinima kozje sirutke

---

Nedić, Radenko

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:809607>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Radenko Nedić**

**UTJECAJ ULTRAZVUČNE HOMOGENIZACIJE NA USPJEŠNOST  
MIKROINKAPSULACIJE EKSTRAKTA TROPA GROŽĐA S PROTEINIMA  
KOZJE SIRUTKE**

**DIPLOMSKI RAD**

Osijek, rujan 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Katedra za mehaničke, toplinske i separacijske procese  
Franje Kuhača 18, Osijek 31000, Hrvatska

**Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo**

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Nastavni predmet:** Jedinične operacije u procesnom inženjerstvu

**Tema rada** je prihvaćena VIII. Redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2022./2023. održanoj 22. 5. 2023.

**Mentor:** prof. dr. sc. Mirela Planinić

**Pomoć pri izradi:** Gabriela Perković, mag. ing. techn. aliment.

**Utjecaj ultrazvučne homogenizacije na uspješnost mikroinkapsulacije ekstrakta tropa grožđa s proteinima  
kozje sirutke**

Radenko Nedić, 0113142506

**Sažetak:** Trop grožđa i kozja sirutka jesu nusproizvodi koji nastaju tijekom proizvodnje vina odnosno sira. U oba nusproizvoda zaostaje veća količina visokovrijednih komponenti. Kako bi se smanjile i spriječile moguće posljedice nedovoljnog iskorištenja i nepropisnog skladištenja ovih nusproizvoda u okoliš, pronalaze se nove mogućnosti primjene ovih sirovina. Jedna od takvih mogućnosti je i mikroinkapsulacija ekstrakta komete grožđa uz korištenje kozje sirutke kao omotača. Cilj ovog rada je bio ispitati utjecaj parametara homogenizacije pojne smjese u ultrazvučnoj kupelji na fizikalna svojstva mikrokapsula ekstrakta tropa grožđa dobivenih u procesu sušenja raspršivanjem. Prema Box-Bhenken eksperimentalnom planu provedeno je ukupno 15 eksperimenata s različitim kombinacijama ispitivanih parametara homogenizacije (temperature i vrijeme homogenizacije te vrijeme stabilizacije pojne smjese nakon homogenizacije). Metodom odzivnih površina utvrđen statistički značaja utjecaj ispitivanih parametara miješanja na sposobnost apsorpcije vode, sposobnost bubrenja i promjenu boje praha te su 40 °C, 17,5 min homogenizacije i 30 min stabilizacije mješavine određeni optimalni uvjeti homogenizacije pojne smjese s obzirom na maksimalnu efikasnost inkapsulacije i minimalni udio vode u proizvedenom prahu (mikrokapsulama).

*Ovaj diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Razvoj održivog integriranog procesa proizvodnje biološki aktivnih izolata iz proizvodnih ostataka prehrambene industrije“ (POPI-WinCEco) (IP 2018-01-1227).*

**Ključne riječi:** kozja sirutka, sušenje raspršivanjem, inkapsulacija, ultrazvučna homogenizacija

**Rad sadrži:** 55 stranica  
18 slika  
15 tablica  
82 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- |    |   |               |
|----|---|---------------|
| 1. | prof. dr. sc. Ana Bucić Kojić           | predsjednik   |
| 2. | prof. dr. sc. Mirela Planinić           | član - mentor |
| 3. | prof. dr. sc. Marina Tišma              | član          |
| 4. | prof. dr. sc. Daliborka Koceva Komlenić | zamjena člana |

**Datum obrane:** 28. rujna 2023.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**University Josip Juraj Strossmayer in Osijek**

**Faculty of Food Technology Osijek**

**Department of Process Engineering**

**Subdepartment of mechanical, thermal and separation processes**

Franje Kuhača 18, Osijek 31000, Croatia

**Graduate program Process Engineering**

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Unit Operations in Process Engineering

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. 8 held on May 22, 2023.

**Mentor:** Mirela Planinić, PhD, prof.

**Technical assistance:** Gabriela Perković, mag. Ing. techn. aliment.

### **The Influence of Ultrasonic Homogenization on the Success of Microencapsulation of Grape Pomace Extract with Goat Whey Protein**

Radenko Nedić, 0113143506

**Summary:** Grape pomace and goat whey are by-products obtained in the production of wine and cheese, respectively. In both by-products, a larger amount of high-value components remains. To reduce and avoid the possible consequences of inadequate utilization and improper storage of these by-products in the environment, new uses for these raw materials are being found. One of these possibilities is the microencapsulation of grape pomace extract using goat whey as a coating. The aim of this work was to investigate the influence of the homogenization parameters of the feed mixture in the ultrasonic bath on the physical properties of the microcapsules of grape pomace extract obtained by the spray drying process. According to the Box-Bhenken experimental design, a total of 15 experiments were carried out with different combinations of the tested homogenization parameters (temperatures and duration of homogenization and stabilization time of the feed mixture after homogenization). The response surface method was used to determine the statistical significance of the influence of the tested mixing parameters on the water adsorption index, swelling power and total color change of the powder, and 40 °C, 17.5 min of homogenization, and 30 min of mixture stabilization were determined as the optimum homogenization conditions of the feed mixture in terms of maximum encapsulation efficiency and minimum moisture in the produced powder (microcapsules).

*Graduate thesis was supported by the Croatian Science Foundation under the project "Development of a sustainable integrated process for the production of bioactive isolates from food industry residues" (POPI-WinCEco) (IP-2018-01-1227).*

**Key words:** goat whey, spray-drying, encapsulation, ultrasound homogenization

**Thesis contains:**  
55 pages  
18 figures  
15 tables  
82 references

**Original in:** Croatian

**Defense committee:**

- |  |            |
|--|------------|
| 1. Ana Bucić Kojić, PhD, prof.           | chairman   |
| 2. Mirela Planinić, PhD, prof.           | supervisor |
| 3. Marina Tišma, PhD, prof.              | member     |
| 4. Daliborka Koceva Komlenić, PhD, prof. | stand in   |

**Defense date:** september 28., 2023.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited** in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek

Veliko hvala mojim roditeljima na bezuslovnoj podršci i nemjerljivoj žrtvi koju su podnijeli radi mene. Želim se zahvaliti svojim prijateljima, naročito Mateju na svojoj pomoći i podršci koju mi je pružio, ne samo tijekom studiranja. Također hvala prof. dr. sc. Mireli Planinić i asistentici Gabrieli Perković na podijeljenom znanju, beskonačnom strpljenju i uloženom trudu.

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	4
2.1. Primjena ultrazvuka u procesnoj industriji.....	5
2.2. Mikroinkapsulacija.....	5
2.2.1. Inkapsulacija sušenjem raspršivanjem .....	7
2.2.2. Procesni parametri .....	8
2.2.3. Proizvodi.....	9
2.2.4. Omotači.....	10
2.3. Sirutka.....	11
2.3.1. Sastav i svojstva sirutke.....	11
2.3.2. Sirutka kao omotač.....	12
2.4. Trop grožđa.....	13
2.4.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva .....	16
2.4.2. Primjena fenolnih spojeva.....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	17
3.1. Zadatak rada.....	18
3.2. Materijali i metode .....	18
3.2.1. Box-Behnken plan pokusa.....	18
3.2.2. Ekstrakcija tropa grožđa .....	21
3.2.3. Homogenizacija smjese ekstrakta i omotača .....	21
3.2.4. Sušenje raspršivanjem.....	22
3.3. Analize .....	23
3.3.1. Određivanje udjela vlage.....	23
3.3.2. Određivanje ukupne promjene boje .....	24
3.3.3. Određivanje ukupnih fenolnih tvari (TPC).....	25
3.3.4. Određivanje površinskih fenolnih tvari .....	28
3.3.5. Efikasnost inkapsulacije.....	30
3.3.6. Prinos inkapsulacije.....	30

3.3.7. Gustoća praha .....	30
3.3.8. Kompresibilnost praha .....	31
3.3.9. Topivost.....	32
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	33
5. ZAKLJUČCI.....	48
6. LITERATURA.....	50

### **Popis oznaka, kratica i simbola**

TD	Gustoća praha nakon potresanja (eng. <i>tapped density</i> )
BD	Gustoća praha prije potresanja (eng. <i>bulk density</i> )
TPC	Ukupne fenolne tvari (eng. <i>total phenolic content</i> )
SPC	Površinske fenolne tvari (eng. <i>surface phenolic content</i> )
WSI	Indeks topivosti u vodi (eng. <i>water solubility indeks</i> )
WAI	Indeks apsorpcije vode (eng. <i>water adsorption indeks</i> )
SP	Sposobnost bubrenja (eng. <i>swelling power</i> )



## **1. UVOD**

Globalni razvoj i porast broja stanovnika uzrokuju brojne probleme povezane s potrebom za proizvodnjom veće količine hrane pri čemu nastaju sve veće količine otpada, koje ako se ne zbrinjavaju na pravi način, negativno djeluju na okoliš. Primjerice, povećanje proizvodnje sirutke se procjenjuje na otprilike 2 % godišnje, a njezino odlaganje u okoliš predstavlja dva potencijalna problema odjednom. Sirutka sadrži značajne količine proteina, lipida, laktoze i vitamina. Zbog relativno velikih količina hranjivih tvari, sirutka predstavlja značajno organsko opterećenje za okoliš. Ukoliko se odlaže na čvrsto tlo, značajno utječe na fizikalno-kemijske karakteristike tla i dovodi do smanjenja plodnosti tla. S druge strane, ukoliko se odlaže u različite vodene sustave, dolazi do smanjenja otopljenog kisika u vodi te može doći do uništenja ekosustava, opasnosti za biljke i životinje i opasnosti za ljudsko zdravlje. Sirutka je zbog svog sastava teško biorazgradiva te se ne može tretirati u postrojenjima za obradu otpadnih voda. Drugi problem predstavlja odlaganje tako bogatog resursa bez prethodnog iskorištenja (Yadav i sur., 2015).

Proizvodnja vina uvelike utječe na okoliš zbog složenosti procesa. Prilikom proizvodnje vina koriste se umjetna gnojiva, pesticidi, goriva i dr. Kako bi se proces proizvodnje vina učinio što održivijim, potrebno je iskoristiti sve nusprodukte. Poput sirutke, trop grožđa također sadrži vrijedne komponente koje mogu uzrokovati onečišćenje okoliša, ali se također mogu iskoristiti. „Najproblematičniji“ spojevi u tropu grožđa su fenolni spojevi. Procjenjuje se da u tropu zaostane otprilike 60 % ukupnih fenola u grožđu. Fenolni spojevi svojim prisustvom snižavaju pH tropa, vrlo su otporni na razgradnju, djeluju baktericidno i fitotoksično, te su zbog toga teško razgradivi. S druge strane, fenolni spojevi su izrazito vrijedni ukoliko se koriste na pravi način. Djeluju antioksidativno te zbog toga reduciraju oksidativni stres, moduliraju upalne procese i sprječavaju nastanak tromba. Isto tako štite nukleinske kiseline, proteine i lipide od oksidacijskih procesa koji uzrokuju različite bolesti poput raka i srčanih bolesti (Bustamante i sur., 2008; Ky i sur., 2014; Beres i sur., 2017).

Nit koja može povezati ova dva visokovrijedna nusprodukta je inkapsulacija kojoj prethodi ekstrakcija visokovrijednih (biološki aktivnih) spojevi iz tropa i dodavanje sirutke kao omotača nakon čega se pripremljena mješavina sušenjem raspršivanjem prevodi u mikrokapsule (prah). Na taj način se stabiliziraju i štite spojevi izolirani iz tropa grožđa te se istodobno smanjuje opterećenje okoliša uz iskorištenje visokovrijednih spojeva. Kako bi ovaj proces bio uspješan u smislu efikasnosti i proizvodnje kvalitetnog praha potrebno je optimirati cjelokupni proces,

uključujući i postupak miješanja/homogenizacije mješavine ekstrakta tropa grožđa i sirutke kao omotača. Stoga je zadatak ovog rad bio ispitati utjecaj uvjeta ultrazvučne homogenizacije pojne smjese (temperatura i vrijeme homogenizacije, vrijeme stabilizacije nakon homogenizacije) na uspješnost mikroinkapsulacije ekstrakta tropa grožđa s proteinima kozje sirutke uz primjenu sušenja raspršivanje.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## **2.1. Primjena ultrazvuka u procesnoj industriji**

U modernoj prehrambenoj industriji ultrazvuk ima široku primjenu. Ultrazvuk je zvuk iznad praga čujnosti ljudskog uha, odnosno zvuk čija je frekvencija iznad 18 kHz. Razlikujemo tri vrste ultrazvuka, ovisno o njihovoj frekvenciji. Ultrazvuk frekvencije od 1 MHz do 10 MHz se koristi kao dijagnostički, od 100 kHz do 1 MHz je visoko frekventni, a od 16 kHz do 100 kHz je ultrazvuk velike snage. Ultrazvuk je često primjenjivan za procesiranje hrane s ciljem homogenizacije, emulgiranja, kristalizacije (stvaranja kristala manjih dimenzija prilikom zamrzavanja), ekstrakcije, filtracije, separacije i ekstruzije (Jambrak i sur., 2010). Ultrazvuk se može primjenjivati za pospješivanje čišćenja procesne opreme, ali još je značajnija upotreba ultrazvuka u postupcima pripreme svježih hrane jer se na taj način može smanjiti ili eliminirati potreba za kemijskim sredstvima za čišćenje, što je značajno u današnje vrijeme (Ortega-Rivas 2012). Značajan učinak ultrazvuk ima na proteine. Zbog nastanka i implozije kavitacija dolazi do povećanja topivosti proteina. Također, dolazi do strukturnih i funkcionalnih promjena. Proteini izloženi ultrazvuku imaju gušću i ujednačeniju veličinu, odnosno dolazi da razbijanja nakupina proteina u otapalu djelovanjem ultrazvuka (Wu i sur., 2020). Prilikom prolaska ultrazvučnih valova kroz tekući medij, otopljeni plin u tekućini formira mjehuriće koji rastu sve dok ne postanu nestabilni i nakon toga dolazi do njihove implozije. Zbog toga je moguće koristiti ultrazvuk za homogenizaciju, emulgiranje i slično. Najčešće korištene frekvencije za nastanak kavitacija su u rasponu od 20 – 24 kHz (Abbas i sur., 2013).

### ***Homogenizacija ultrazvukom***

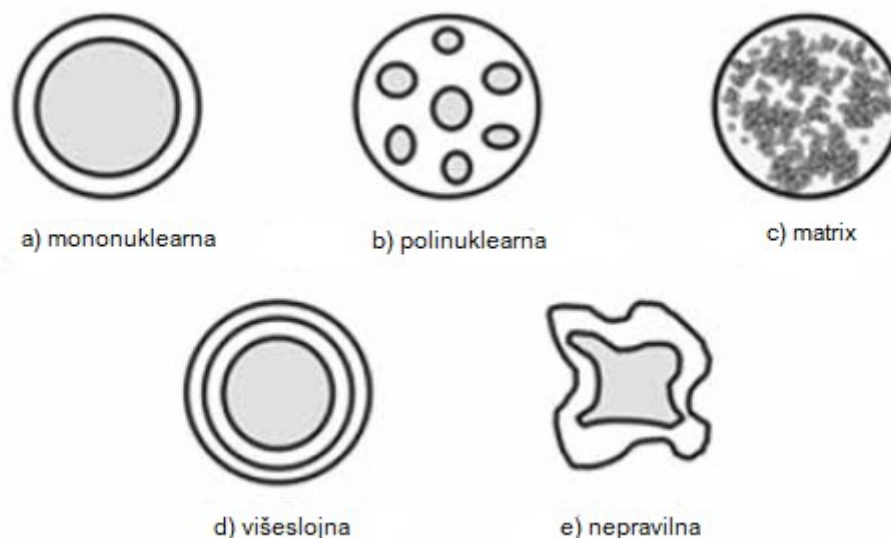
Prilikom izlaganja ultrazvuku smjese dviju tekućina koje se ne miješaju, dolazi do stvaranja kavitacija. Kavitacije koje su blizu granica slojeva implodiraju i dolazi miješanja dvaju slojeva (Soria i Villamiel 2010). Osim za formiranje emulzija, ultrazvuk se koristi za smanjenje veličine čestica postojećih emulzija. Najčešće primijenjene frekvencije za homogenizaciju su od 20 do 50 kHz (Chen i sur., 2018).

## **2.2. Mikroinkapsulacija**

Mikroinkapsulacija je tehnika široko primjenjivana u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji jer se njome osigurava stabilnost određenih spojeva, povećava se topivost te se osigurava kontrolirano otpuštanje spojeva. Mikroinkapsulacija je fizikalni proces u kojem se na sitne

čestice krutina ili sitne kapljice tekućina ili plinova, koji čine jezgru, nanose tanki filmovi, koji tvore omotač, kako bi nastale mikrokapsule (Peanparkdee i sur., 2016).

Postoji nekoliko metoda mikroinkapsulacije, prema tome mikrokapsule dobivene različitim metodama imaju i različita svojstva. Svojstva mikrokapsula ovise o punilu, načinu provođenja mikroinkapsulacije i omotaču. Razlikuje se nekoliko oblika kapsula (**slika 1**): mononuklearne, polinuklearne, višeslojne, nepravilne i matrix (Fang i Bhandari 2010; Peanparkdee i sur., 2016).



**Slika 1** Različita morfologija mikrokapsula (Peanparkdee i sur., 2016.)

Postupak mikroinkapsulacije se može provoditi na nekoliko načina, ovisno o svojstvima tvari koja se inkapsulira. Metode možemo podijeliti u tri skupine: fizikalne, kemijske i fizikalno-kemijske. Kemijske metode uključuje *in situ* polimerizaciju i primjenu liposoma. Sušenje raspršivanjem i inkapsulacija u fluidizirajućem sloju su fizikalne metode, dok su fizikalno-kemijske metode koacervacija i sol-gel inkapsulacija (Peanparkdee i sur., 2016).

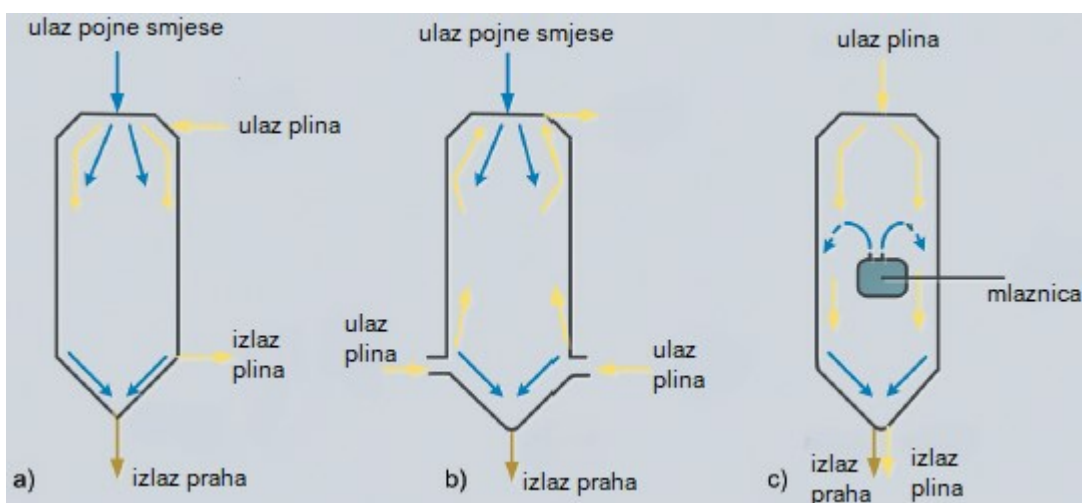
Glavna primjena mikroinkapsulacije u prehrambenoj industriji se svodi na produljenje roka uporabe proizvoda (Peanparkdee i sur., 2016). Mikroinkapsulacijom se štiti punjenje mikrokapsule od negativnog utjecaja okoline i od interakcija s drugim sastojcima hrane (Augustin i sur., 2001).

### 2.2.1. Inkapsulacija sušenjem raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem (*spray drying*) je najzastupljenija i najjeftinija tehnika koja se primjenjuje u prehrambenoj industriji za proizvodnju mikroinkapsuliranih prahova. Oprema potrebna za sušenje raspršivanjem je relativno dostupna i jeftina pa je sama operacija ekonomična. Glavni nedostatak su veliki energetske gubici jer je nemoguće iskoristiti svu toplinu potrebnu za sušenje (Gharsallaoui i sur., 2007).

Sušenje raspršivanjem je postupak u kojem se tekućina raspršuje u struji vrućeg plina pri čemu praktički trenutno nastaje prah. Plin koji se upotrebljava za sušenje može biti zrak ili inertni plin, najčešće dušik, koji se koristi u manjoj mjeri zbog visoke cijene. Pojna smjesa koja se raspršuje može biti otopina, suspenzija ili emulzija (Gharsallaoui i sur., 2007). Tekućina se raspršuje u sitne kapljice kako bi se osigurala velika površina i posljedično omjer površine i mase te time ubrao prijenos topline i prijenosa tvari. Time se osigurava brzo sušenje što smanjuje oštećenja termolabilnih tvari (Banožić i sur., 2023). Što je veći omjer površine kapljice i mase, brži je transfer energije te nastaju finije čestice, dok povećanje dotoka ulazne tekućine dovodi do povećanja veličine čestica (Gharsallaoui i sur., 2007).

Proces mikroinkapsulacije se sastoji od četiri koraka: pripreme uzorka, homogenizacije, atomizacije i sušenja. Priprema uzorka podrazumijeva hidrataciju polisaharida, proteina i lipida koji se koriste kao omotači. Zatim se homogeniziraju omotač i tvar koju treba inkapsulirati. Sušionik s raspršivanjem sastoji se od sustava za dovod pojne smjese, koji se sastoji od peristaltičke pumpe i rezervoara, komore za sušenje i mlaznice, koji čine glavni dio sustava te separacijskog dijela uređaja. Pojna smjesa se uvodi u sušionik s raspršivanjem kroz mlaznicu. Razlikujemo nekoliko vrsta mlaznica: hidraulične, pneumatske i ultrazvučne mlaznice te rotacione atomizere (Gharsallaoui i sur., 2007; Banožić i sur., 2023). Komora za sušenje može imati nekoliko različitih konfiguracija (**slika 2**). Razlikuju se komore s istosmjernim strujanjem pojne otopine i vrućeg plina, s protusmjernim strujanjem i mješovitim strujanjem. Komore s istosmjernim strujanjem se koriste za termolabilne spojeve jer se najviša temperatura sušenja postiže u dijelu gdje je raspršena otopina s najvećim udjelom vlage. Prilikom sušenja u protusmjernim komora dolazi do bržeg sušenja te su ove komore značajno efikasnije od istosmjernih. U mješovitim komorama se kombinira konfiguracija istosmjernih i protusmjernih komora (Banožić i sur., 2023). Separacija praha od plina se odvija u ciklonima, ali se koriste i elektrostatski filteri i vrećasti filter kao sekundarni (Selvamuthukumaran, 2019).



**Slika 2** Različite konfiguracije komora za sušenje: a) istosmjerna, b) protusmjerna i c) kombinirana (Banožić i sur., 2023.)

### 2.2.2. Procesni parametri

Izbor procesnih parametara ima veliki utjecaj na efikasnost procesa te fizikalna i kemijska svojstva. Najvažniji procesni parametri su: ulazna temperatura plina, protok pojne otopine te temperatura pojne otopine. Izlazna temperatura plina je također bitan parametar, ali je ovisna o ulaznoj temperaturi. Također su važni sljedeći parametri: količina i pritisak zraka za raspršivanje otopine, koncentracija otopine, promjer mlaznice, vrsta omotača te oblik komore za sušenje (Banožić i sur., 2023; Liu i sur., 2004). Optimiranje temperature ulaznog plina je jedan od najznačajnijih koraka u procesu sušenja raspršivanjem. Uobičajeno se koristi plin temperature od 100 do 200 °C, dok se u istosmjernim komorama koristi plin temperature 140 do 220 °C (Banožić i sur., 2023; Kandansamy i Somasundaram, 2012). Brzina sušenja i količina vode u osušenom produktu su u funkciji temperature ulaznog plina. U pravilu se temperatura sušenja odabire prema dva značajna faktora: osjetljivosti najtermolabilnijih spojeva u otopini i cijeni izvora energije koji se koriste za zagrijavanje, odnosno temperatura mora biti dovoljno visoka da sušenje bude efikasno, ali mora biti dovoljno niska da ne dođe do razgradnje sastojaka. Kada je temperatura previsoka dolazi do prevelikog isparavanja koje uzrokuje pucanja membrana što rezultira gubitkom vrijednih tvari. S druge strane, preniska temperatura uzrokuje formiranje predebelih membrana, previsok udio vode te samim time povećava se aglomeracija praha i smanjuje se mogućnost tečenja (Gharsallaoui i sur., 2007; Banožić i sur., 2023). S obzirom da se temperatura plina na izlasku ne može kontrolirati, ona uglavnom ovisi



o ulaznoj temperaturi plina. Istraživanja su pokazala da je idealan raspon temperatura za inkapsulaciju sastojaka hrane od 50 do 80 °C (Gharsallaoui i sur., 2007). Sljedeći vrlo važan parametar je temperatura pojne otopine. Temperatura pojne otopine utiče na svojstva otopine, odnosno njenu viskoznost i fluidnost. Odgovarajuća temperatura osigurava da otopina bude homogeno raspršena u komori za sušenje. Kada je otopina previsoke temperature, dolazi do pada viskoznosti i smanjenja veličina kapljica što dovodi do oštećenja termolabilnih spojeva (Gharsallaoui i sur., 2007). Za pojnu otopinu nam je također bitno da su odgovarajuće koncentracije i da je protok odgovarajući. Preveliki protok uzrokuje slab prinos praha, odnosno malo iskorištenje, što znači da se veliki dio sastojaka otopine ne osuši i loša svojstva praha. Ukoliko je protok premali, proces sušenja postaje izrazito energetski neučinkovit (Maskat i sur., 2014). Odgovarajuća koncentracija pojne otopine izrazito pozitivno utiče na svojstva praha. Zabilježeni su poboljšanje tecivosti praha i mogućnosti sabijanja, nizak Carr-ov indeks i odgovarajuća tvrdoća kada su niske sile kompresije prisutne (Gallo i sur., 2011). Još jedan parametar na koji se može utjecati je protok plina odnosno zraka. Zabilježeno je nekoliko benefita većeg protoka plina. Korištenjem veće količine zraka za sušenje, dolazi do smanjenja vremena kontakta otopine i zraka što dovodi do smanjenja gubitaka fenolnih tvari. Većim protokom plina dolazi do nastanka manjih kapljica što omogućuje manji sadržaj vode u prahu i veću energetsku efikasnost i prinos praha. Osim toga primijećena su bolja svojstva praha poput tecivosti (Borges i sur., 2017; Gallo i sur., 2011).

### **2.2.3. Proizvodi**

Sušenjem raspršivanjem se mogu dobiti čestice različite veličine. Veličina varira od nanodimenzija do veličine nekoliko milimetara, koje čine aglomeracije manjih čestica. Sušenjem raspršivanjem je potrebno dobiti prah poželjnih karakteristika poput udjela vode, veličine čestica, nasipne gustoće, sadržaja aktivnih komponenti te ostalih fizičkih i kemijskih svojstava. Udio vode treba biti ispod 5 % kako bi se smanjio aktivitet vode te spriječilo kvarenje uzrokovane kemijskim i mikrobiološkim reakcijama te samim time osigurala stabilnost praha te duga trajnost proizvoda. Nasipna gustoća je važna je omogućava uštedu u vidu troškova pakiranja te omogućava bolju tecivost praha (Gharsallaoui i sur., 2007; Sinija i Mishra 2008; Shishir i Chen, 2017).

Mikroinkapsulacija koja se provodi sušenjem raspršivanjem ima široku primjenu u prehrambenoj industriji. Najčešće se inkapsuliraju lipidi, karotenoidi, fenolnih tvari i tvari

arome. Većina tvari arome su jako hlapive komponente tokom sušenja raspršivanjem te ih je potrebno sačuvati. Lipidi su s druge strane spojevi osjetljivi na autooksidaciju te se inkapsulacijom oni stabiliziraju, usporava se autooksidacija, omogućava se kontrolirano otpuštanje tvari arome topivih u masti, sprječava se hidroliza tvari topivih u mastima te se maskira okus gorkih tvari topivih u mastima (Gharsallaoui i sur., 2007).

#### **2.2.4. Omotači**

Izbor omotača za mikroinkapsulaciju je baziran na velikom broju faktora: fizikalno-kemijskim svojstvima poput molekularne mase, topivosti, difuzibilnosti; mogućnosti da izdrži okolišne uvjete i mehanički stres. Omotači moraju osigurati stabilnost tvari i spriječiti interakciju tvari s okolinom, odnosno spriječiti gubitak lako hlapivih tvari. Također mora biti ekonomski prihvatljiv i osigurati odgovarajuću efikasnost (Coimbra i sur., 2021; Díaz-Montes, 2023; Gharsallaoui i sur., 2007).

U prehrambenoj industriji se uglavnom koriste vodene otopine, stoga omotač mora biti topiv u vodi. Osim toga mora biti dobar emulgator, mora imati mogućnost stvaranja filma i sušenja. Otopine u koje je dodan omotač trebaju imati nisku viskoznost (Gouin, 2004; Reineccius, 2004). Kao omotači se u prehrambenoj industriji najčešće koriste različiti biopolimeri poput: ugljikohidrata, različite gume, proteini (Kandansamy i Somasundaram, 2012).

Ugljikohidrati koji se primjenjuju za inkapsulaciju su ugljikohidrati velike molekularne mase, dok se jednostavni ugljikohidrati ne koriste zbog stvrdnjavanja i rekristalizacije. Škrob, maltodekstrini i saharoza se koriste za inkapsulaciju boja zbog dobre topivosti u vodi, niske viskoznosti i neutralnog okusa te su bezbojni su i lako probavljivi. Maltodekstrini su hidrolizati škroba kojima je dekstrozni ekvivalent manji od 20, oni štite inkapsuliranu tvar od oksidacije i stabiliziraju je (Zuidam i Nedović, 2010; Kandansamy i Somasundaram, 2012). Poboljšana svojstva inkapsuliranja se postižu uporabom modificiranih škrobova (Shaikh i sur., 2006). Pektin se također koristi kao omotač. U malim koncentracijama pektini tvore stabilne emulzije u koncentraciji od 1 – 2 % pri čemu proteini zaostali na lancu pektina djeluju kao emulgatori (Leroux i sur., 2003; Drusch, 2007)

Proteini su zbog svojih karakteristika najbolji izbor materijala za omotač. Imaju sposobnost vezati okuse, što je također benefit. Najčešće korišteni proteinski omotači su proteini mlijeka i želatina. Prilikom proizvodnje mlijeka u prahu, proteini mlijeka ostvaruju prinos od preko 90 %. Prinos prilikom inkapsulacije se može povećati dodatkom laktoze. Želatina je dobar emulgator

i stabilizator te ima dobra zaštitna svojstva zbog čega se koristi kao omotač. Funkcionalne sposobnosti su me se mogu poboljšati dodatkom manitola (Gharsallaoui i sur., 2007).

Najkorištenija od svih guma koje se koriste kao omotač je guma arabica. Guma arabica se koristi zbog svojih sposobnosti stvaranja filma i emulgatorskih svojstava, koja su posljedica prisutnih proteina. Guma u širokom rasponu pH tvori stabilne emulzije sa uljima te se zbog toga koristi za inkapsulaciju lipida i to u omjeru ulje/guma arabica 0,15 (Gharsallaoui i sur., 2007; Dickinson, 2003). Korištenjem glukoze kao djelomične zamjene, ostvaruju se poboljšanja efikasnosti mikroinkapsulacije. Nedostatak gume arabice u ulozi omotača je slaba zaštita od kisika i oksidacijskih procesa jer se ponaša kao semipermeabilna membrana (Gharsallaoui i sur., 2007).

### **2.3. Sirutka**

Sirutka je nusprodukt koji se dobiva uklanjanjem proteina iz mlijeka (Kilara i Vaghela, 2018). Kazein se može ukloniti iz mlijeka na nekoliko načina: zakiseljavanjem mlijeka do pH 4,6, korištenjem proteolitičkih enzima ili mikrofiltracijom. Zakiseljavanje mlijeka se može provoditi na nekoliko načina: dodavanjem kiselina u mlijeko, korištenjem mikroorganizama koji fermentiraju laktozu u kiselinu. Sirutka nastaje proizvodnjom sira ili proizvodnjom kazeina. Razlikuju se dvije vrste sirutke: slatka i kisela. Slatka sirutka je nusprodukt proizvodnje tvrdih i polutvrdih sireva ili kazeina koagulacijom mlijeka dodavanjem enzima, pri čemu pH iznosi 6 – 6,5. Kisela sirutka je nusprodukt proizvodnje (svježeg) sira fermentacijom pri čemu pH tada iznosi 4,6 – 5 (Fox, 2011; Tunick, 2009; Bansal i Bhandari, 2016).

#### **2.3.1. Sastav i svojstva sirutke**

Sastav sirutke je vrlo složen. Sirutka sadrži laktozu, proteine, mliječnu mast, glukozu, galaktozu te aminošećere (Herceg i Režek, 2006.).

Sirutka može nastati prilikom proizvodnje sira od različitih vrsta mlijeka. Najčešće korišteno mlijeko u proizvodnji sira je kravlje. Sirutka sadrži otprilike 55 % hranjivih tvari koje sadrži mlijeko (Yadav i sur., 2015). Sirutka se može sušiti kako bi se dobio prah sirutke. Također se može ukloniti laktoza kako bi se dobio prah sirutke bez laktoze. Elektrolizom se uklanjaju mineralne tvari pri čemu nastaje pročišćena sirutka. Sirutku se može i koncentrirati i koncentri obično sadrže 35 %, 55 % i 80 % proteina (**tablica 1**). Vrijednosti proteina sirutke

leži u činjenici da su dobro topivi u vodi, sadrže značajan udio esencijalnih aminokiselina i relativno su jeftini (Kilara i Vaghela, 2018).

**Tablica 1** Sastav praha sirutke (Kilara i Vaghela, 2018.)

Vrsta praha sirutke	Proteini (%)	Laktoza (%)	Mast (%)	Pepeo (%)	Voda (%)
Prah sirutke	11 - 14,5	63 - 75	1 - 1,5	8,2 - 8,8	3,5 - 5,0
Prah sirutke s reduciranim sadržajem laktoze	18 - 24	52 - 58	1 - 4	11 - 22	3 - 4
Demineralizirani prah sirutke	11 - 15	70 - 80	0,5 - 1,8	1 - 7	3 - 4
Koncentrat proteina sirutke – 34	34 - 36	48 - 52	3 - 4,5	6,5 - 8,0	3 - 4,5
Koncentrat proteina sirutke – 50	50 - 52	33 - 37	5 - 6	7,5 - 8,5	3,5 - 4,5
Koncentrat proteina sirutke – 80	80 - 82	4 - 8	4 - 8	3 - 4	3,5 - 4,5
Izolat proteina sirutke	90 - 92	0,5 - 1,0	0,5 - 1,0	2 - 3	4,5

Proteini koji se nalaze u sirutki su sljedeći: globularni proteini (  $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktoglobulin i albumin seruma krvi goveda), imunoglobulini (Ig-G, Ig-A, Ig-M), laktoperoksidaze, lizosomi, lektoferin, polipeptidi i glikomakropeptidi (Huffman i De Barros Ferreira, 2011).

### 2.3.2. Sirutka kao omotač

Za provedbu mikroinkapsulacije se koriste izolat proteina sirutke i koncentrat proteina sirutke. Izolati imaju najmanje 90 % proteina i imaju izvrsna emulgirajuća i dehidrirajuća svojstva. Koncentratima sadržaj proteina varira od 35 % pa do peko 75 %. Stabilni su u širokom spektru pH i mogu od utjecajem topline stvarati gelove. Njihovim korištenjem se dobivaju mikrokapsule topive u vodi (Eraso i Aníbal 2014). Najčešće se koriste u prehrambenoj industriji zbog svojih svojstava. Mikrokapsule dobivene upotrebom proteina sirutke omogućuju kontrolirano otpuštanje aktivne tvari. Proteini sirutke su izvrsni emulgatori, omogućuju stvaranje filma i gela i pružaju vrlo visoku zaštitu tvari od oksidacije (Eraso i Aníbal 2014). Proteini sirutke pružaju izvrsnu zaštitu hlapivih i nehlapivih sastojaka i izvrsno štite od oksidacije masti u agresivnom mediju (Eraso i Aníbal, 2014).

$\beta$ -laktoglobulin je najzastupljeniji sastojak proteina sirutke. Odgovoran je za gelirajuća svojstva proteina sirutke, njegovim zagrijavanjem dolazi do stvaranja gela. Proteini sirutke sadrže 50 – 60 %  $\beta$ -laktoglobulina i oko 20 %  $\alpha$ -laktoglobulina.  $\alpha$ -laktoglobulin ima sinergističko djelovanje sa  $\beta$ -laktoglobulinom, što znači da se njegova svojstva poboljšavaju u prisustvu  $\alpha$ -laktoglobulina. Sposobnost stvaranja gela i karakteristike samog gela postaju bolje.  $\alpha$ -laktoglobulin sadrži kalcijev ion koji omogućuje vezanje za druge proteine (de la Cruz Pech-Canul i sur., 2020).

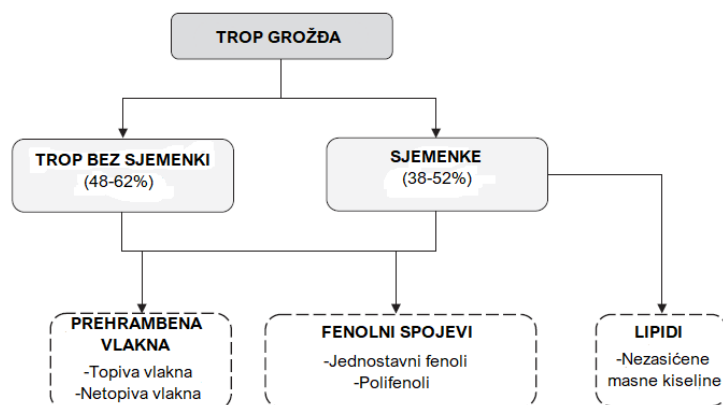
## **2.4. Trop grožđa**

Prilikom proizvodnje vina kao nusprodukt nastaje trop grožđa. Trop čine ostaci nakon prešanja grožđa, bilo ono fermentirano ili ne. Prilikom proizvodnje bijelog vina, prvo se preša grožđe te se samo sok izlaže fermentaciji, dok trop ne fermentira. Za proizvodnju crvenog vina potrebno je fermentirati zajedno sok i trop zbog određenih spojeva koji su bitni za crveno vino poput antocijanina i pigmenata (Mendes i sur., 2013; Amienyo i sur., 2015). Trop čini oko 20 – 25 % izvorne mase grožđa, a sastoji se od nekoliko sastavnica (**slika 3**): kožice grožđa, zaostale pulpe, sjemenki i peteljki (Balbinot i sur., 2020). Kožica grožđa štiti pulpu od vanjskih utjecaja, prekrivena je slojem voska i idealan je supstrat za kvasce i gljive (Putnik i sur., 2018). Sjemenka čini 25 – 35 % mase tropa bez peteljke i vrlo je bogata antioksidansima poput linolne kiseline i omega-6 esencijalnih masnih kiselina (Unusan, 2020). Sastav tropa ovisi o mnogo faktora, ali najbitniji su: sorta grožđa, zrelost, načinu branja i načinu proizvodnje vina. Prosječno trop grožđa sadrži: 50 – 70 % vode, 10 – 20 % celuloze, 6 – 8 % šećera, 2 – 4 % masti, 1 – 2 % organskih kiselina, minerala i tanina. Osim toga sadrži i manje količine proteina, pektina, boja, aromatičnih spojeva, vitamina i mikroorganizama. Najzastupljeniji minerali u tropu su magnezij, željezo, cink, kalij i kalcij (Kammerer i sur., 2004; Arnous i Meyer, 2009; Caponio i sur., 2023).



**Slika 3** Sastav tropa grožđa na 1000 kg

Sadržaj vlakana se razlikuje u tropu crvenog i bijelog grožđa. Trop crvenog grožđa sadrži velike količine prehrambenih vlakana i manje količine topivih šećera. S druge strane trop bijelog grožđa sadrži manje količine prehrambenih vlakana, ali sadrži velike količine topivih šećera (Deng i sur., 2011). Najveći udio prehrambenih vlakana čine celuloza i hemiceluloza. Neka vlakna tvore spojeve s fenolnim tvarima te se dobiju fenolna prehrambena vlakna. S obzirom da je kožica grožđa izgrađena od celuloze, hemiceluloze i lignina, ona je najbolji izvor prehrambenih vlakana (Bender i sur., 2017; Beres i sur., 2017; Deng i sur., 2011). Osim linolne i oleinske kiseline, sjemenka grožđa sadrži i značajne količine vitamina E i sterola koji posjeduju antioksidativna svojstva (Wen i sur., 2016; Messina i sur., 2021) (**slika 4**).



**Slika 4** Frakcije tropa grožđa i tvari dobivene iz svake frakcije

Crveno vino je namirnica koja je bogata fenolima. Tijekom proizvodnje vina se uspijeva ekstrahirati 30 – 40 %, ovisno o sorti grožđa, lokaciji vinograda i tehnologiji proizvodnje vina (Beres i sur., 2017). Fenole koji se nalaze u grožđu i vinu može podijeliti u tri glavne skupine: fenolne kiseline, flavonoide i tanine. U tropu grožđa su najprisutniji antocijanini, flavanoli, flavan-3-oli, hidroksicimetna kiselina i stilbene (Ky i sur., 2014).

Antocijanini su crveni pigmenti nastali tijekom zrenja voća. Osjetljivi su na svjetlost, povišenu temperaturu, kisik, pH, metalne ione i otapala. Sadržaj antocijanina ovisi o sorti grožđa, starosti nasada i klimi. Glavni predstavnici antocijanina u grožđu su: 3-O-glikozidi malvidina, cijanidina, delfinidina i peonidina (Beres i sur., 2017). Fenolne kiseline koje se nalaze u tropu grožđa se dijele na dvije glavne skupine: hidroksicimetne kiseline i hidroksibenzojeva kiseline (Yu i Ahmedna, 2013; Ignat i sur., 2011). Flavan-3-oli su vrlo značajni za senzorska svojstva vina, ali ih veliki dio zaostaje u tropu. Vrlo su česti u ljudskoj prehrani. Različiti je sadržaj flavan-3-ola u pojedinim dijelovima grožđa. U kožici se nalaze katehini, galokatehini i proantocijanidini, dok se u sjemenki nalaze katehini i procijadinini (González-Manzano i sur., 2004). Najvažniji stilben koji se nalazi grožđu i vinu je resveratrol, čija količina ovisi o sorti grožđa i zrelosti (Flamini i sur., 2013). Flavanoli nastaju istim biosintetskim putem kao antocijanini i kondenzirani tanini. Povezani su sa stabilnošću boje koju uzrokuju antocijani. U najznačajnije predstavnike se ubrajaju: kempferol, kvericetin, miricetin i isoramnetin (Makris i sur., 2006).

### **2.4.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva**

Konvencionalne metode ekstrakcije se provode uporabom mješavine vode i organskog otapala i postižu se visoka efikasnost. Najraširenija metoda ekstrakcije je ekstrakcija kruto-tekuće uz mehaničko miješanje. Mijenjanjem otpala, veličina čestice, vremena ekstrakcije i temperature se može povećati efikasnost ekstrakcije. Najčešće korišteno otapalo je mješavina etanola i vode, a u zadnje vrijeme su ispitivane metode ekstrakcije superkritičnim fluidima. Sadržaj i aktivnost fenola dobivena ekstrakcijom superkritičnim fluidima je manja nego kod konvencionalnih metoda (Beres i sur., 2017).

### **2.4.2. Primjena fenolnih spojeva**

Fenolni spojevi se koriste u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Prodanov i sur., 2005). U prehrambenoj industriji se koriste jer djeluju antibakterijski na sljedeće bakterije: *Bacillus cereus*, *Campylobacter coli*, *Esherichia coli* O157:H7, *Salmonella infantis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ATCC7644 i *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (Katalinić i sur., 2010; Xu i sur., 2016). Baktericidni učinak imaju na aerobne mezofilne bakterije, bakterije mliječno-kiselog vrenja i enterobakterije (García-Lomillo i sur., 2014). Koriste se pri zaštiti namirnica od oksidacijskog djelovanja te uspješno zamjenjuju sintetičke antioksidanse (Garrido i sur., 2011). Primjenu imaju i u redukciji nastanka akrilamida u Maillardovim reakcijama (Zhu i sur., 2009; Xu i sur., 2015).



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Zadatak rada

Cilj diplomskog rada bio je ispitati utjecaj parametara ultrazvučne homogenizacije smjese ekstrakta tropa grožđa i koncentrata proteina kozje sirutke na uspješnost mikroinkapsulacije polifenola tropa grožđa uz primjenu sušenja raspršivanjem.

Zadatak rada bio je:

- provesti kruto-tekuću ekstrakciju polifenola iz tropa grožđa
- provesti homogenizaciju tekuće smjese dobivenog ekstrakta i koncentrata proteina iz kozje sirutke (omotač) uz primjenu ultrazvuka (80 kHz) pri različitim procesnim uvjetima (temperatura homogenizacije, vrijeme homogenizacije, vrijeme stabilizacije smjese)
- sušenjem raspršivanjem proizvesti prah – mikroinkapsulirani ekstrakt tropa grožđa.

Utjecaj homogenizacije na uspješnost mikroinkapsulacije procjenjivana je se na temelju: prinosa produkta i efikasnosti mikroinkapsulacije te fizikalno-kemijskih svojstava dobivenog praha.

### 3.2. Materijali i metode

Tijekom eksperimentalnog dijela korištene su sljedeće kemikalije: apsolutni etanol (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska); Folin and Ciocaleu's phenol reagens (CPA chem); ledena octena kiselina 99,5 % (Macron Fine Chemicals, Gliwice, Poljska); metanol visoke čistoće (Macron Fine Chemicals, Gliwice, Poljska); natrij karbonat, bezvodni p.a. (T.T.T.); galna kiselina (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA); Teras goat whey protein (Carrington Farms Closter, NJ07624).

#### 3.2.1. Box-Behnken plan pokusa

Box-Benkhen-ov dizajn je vrlo često korišten u istraživanjima u području prehrambene industrije zato što je vrlo ekonomičan. Od nezavisnih varijabli zahtijeva samo tri razine: minimum, sredina i maksimum.

$$N = 2k(k - 1) + c_p \quad (1)$$

Prema jednadžbi (1) se računa broj eksperimenata koje je potrebno provesti, pri čemu je  $c_p$  broj centralnih točaka, a  $k$  označava broj nezavisnih varijabli. Ovaj plan predlaže kako odabrati točke eksperimenata kako bi se ispitaio utjecaj više faktora na tri razine. Dizajn može ispitivati 3 do 10 varijabli.

U ovom radu metoda odzivnih površina je korištena za procjenu utjecaja i optimiranje procesnih uvjeta pripreme pojne otopine u ultrazvučnoj kupelji. Za definiranje uvjeta pripreme pojne otopine i procjenu utjecaja procesnih parametara na pojedine karakteristike praha korišten je Box-Behnkenov plan pokusa s tri ponavljanja u centralnoj točki prikazan je u **tablici 2**.

**Tablica 2** Box-Behnken plan pokusa (eksperimentalna matrica)

PROBA	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3
	A: T (° C)	B: t (min)	C: t (min)
1	30	30,0	30
2	50	17,5	15
3	50	17,5	45
4	40	5,0	45
5	30	5,0	30
6	40	17,5	30
7	40	17,5	30
8	50	5,0	30
9	40	5,0	15
10	30	17,5	45
11	50	30,0	30
12	30	17,5	15
13	40	17,5	30
14	40	30,0	45
15	40	30,0	15

Za proces homogenizacije odabrane su tri nezavisne varijable: temperatura ( $X_1$ ), vrijeme homogenizacije ( $X_2$ ) i vrijeme mirovanja nakon homogenizacije ( $X_3$ ). **Tablica 3** prikazuje kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u ovom RSM dizajnu.

**Tablica 3** Faktori utjecaja i područje eksperimentalnog ispitivanja u tri razine za pripremu pojne otopine u ultrazvučnoj kupelji

FAKTOR / varijabla	SIMBOL	KODIRANA VARIJABLA		
		-1	0	+1
TEMPERATURA (°C)	$X_1$	30	40	50
VRIJEME HOMOGENIZACIJE (min)	$X_2$	5	17,5	30
VRIJEME STABILIZACIJE NAKON HOMOGENIZACIJE (min)	$X_3$	15	30	45

Za aproksimaciju eksperimentalnih podataka korišten je kvadratni polinom, jednačba (2):

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{j=1}^{k-1} \sum_{i=1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

gdje je:

- $Y$  - modelom predviđena odzivna funkcija;
- $\beta_0$  - konstanta jednačbe odzivnog polinoma;
- $\beta_j$  - koeficijent linearnog člana jednačbe odzivnog polinoma;
- $\beta_{jj}$  - koeficijent kvadratnog člana jednačbe odzivnog polinoma;
- $\beta_{ij}$  - koeficijent člana interakcije jednačbe odzivnog polinoma;
- $X_{i,j}$  - ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti);
- $k$  – broj varijabli.

Na temelju dobivenog matematičkog modela konstruirana je odzivna površina koja pruža vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara na promatrane modele. Odzivna površina je prikazana kao površina u 3D prostoru. Primjenom softvera Design Expert v.13 (Stat Ease, Minneapolis, USA) provedena je procjena koeficijenata modela nelinearnom regresijskom analizom, statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametara na promatrane parametre kao i numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametara.

Provjera uspješnosti optimiranja procesa pripreme pojne otopine provedena je usporedbom rezultata dobivenih metodom odzivnih površina i eksperimentalno dobivenih rezultata pri utvrđenim optimalnim uvjetima ekstrakcije.

### 3.2.2. Ekstrakcija tropa grožđa

Eksperimenti su provedeni na tropu grožđa sorte Cabernet Sauvignon, godina berbe 2017., a porijeklo uzorka je vinarija Erdut. Trop grožđa je najprije odmrznut i osušen na zraku do udjela suhe tvari većeg od 90 %. Neposredno prije ekstrakcije uzorak je samljeven na ultracentrifugalnom mlinu (Retsch ZM 200, Njemačka) na veličinu čestica  $\leq 1$  mm.

Za ekstrakciju fenola iz tropa grožđa je korišten 50 % etanol. Omjer tropa grožđa i etanola iznosio je 1 g : 40 mL, a ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji tijekom 2 sata pri 200 rpm i 80 °C. Po završetku ekstrakcije suspenzija je centrifugirana pri 11000 rcf tijekom 10 minuta. Odvojenom supernatantu je djelomično uklonjen etanol isparavanjem pod vakuumom (50 °C, 48 mbar, 10 min) na rotovaporu (R-210, Büchi, Švicarska, **slika 5**), a volumen uklonjenog otapala zamijenjen je redestiliranom vodom.



**Slika 5** Rotovapor R-210, Büchi , Švicarska

Na gore opisan način pripremljenom ekstraktu određen je sadržaj suhe tvari te sadržaj ukupnih fenolnih tvari.

### 3.2.3. Homogenizacija smjese ekstrakta i omotača

Prilikom pripreme ekstrakta za ekstrakciju potrebno je napraviti smjesu tekućeg ekstrakta i omotača. Omjer ekstrakta i omotača treba iznositi 1:2 (w/w). Smjesa se pravi od 200 mL ekstrakta dodaje se omotač i još 200 mL redestilirane vode.



**Slika 6** Ultrazvučna kupelj Elmasonic P 120 H, Elma

Homogenizacija smjese ekstrakta i omotača provedena je u ultrazvučnoj kupelji Elmasonic P 120 H, Elma (**Slika 6**) na normal načinu rada uz frekvencijom od 80 kHz. Provedeno je ukupno 15 eksperimenata homogenizacije uz primjenu različitih uvjeta (temperatura, vrijeme homogenizacije i vrijeme stabilizacije) prema Box-Bhenken dizajnu, kako slijedi:

- temperatura homogenizacije: 30 °C, 40 °C, 50 °C
- vrijeme homogenizacije: 5 min, 17,5 min, 30 min
- vrijeme stabilizacije: 15 min, 30 min, 45 min.

#### **3.2.4. Sušenje raspršivanjem**

Sušenje raspršivanjem je provedeno na Büchi Mini Spray Dryer B-290 (**slika 7**). Ulazna temperatura zraka (eng. *inlet temperature*) je iznosila 180 °C. Izlazna temperatura (eng. *outlet temperature*) ovisi o uvjetima sušenja te se bilježi. Protok pojne smjese (eng. *feed flow*) je iznosio 25 %, dok je protok zraka iznosio 600 L/h.



**Slika 7** Büchi Mini Spray Dryer B-290

Nakon završetka sušenja, dobiveni prah je pažljivo prikupljen, izvagan i skladišten na temperaturi 4 °C do analiziranja.

### **3.3. Analize**

#### **3.3.1. Određivanje udjela vlage**

Određivanje udjela vlage (udjela suhe tvari) ekstrakta i praha provedeno je na uređaju HR73 Halogen Moisture Analyzer, Mettler Toledo (**Slika 8**) prema radu Kelly i sur., (2016). Korišten je standard program sušenja pri temperaturi 105 °C uz korištenje kriterija završetka procesa 5 odnosno sve dok gubitak mase nije bio manji od 1 mg tijekom 140 sekundi.



**Slika 8** Analizator vlage Mettler Toledo HR73

Udio vlage je izračunat prema jednadžbi **(3)**, a za računanje udjela suhe tvari korištena je jednadžba **(4)**.

$$\text{udio vlage (\%)} = \frac{\text{masa uzorka prije sušenja} - \text{masa uzorka nakon sušenja}}{\text{masa uzorka prije sušenja}} \cdot 100 \quad (3)$$

$$\text{udio suhe tvari (\%)} = \frac{\text{masa uzorka nakon sušenja}}{\text{masa uzorka prije sušenja}} \cdot 100 \quad (4)$$

### 3.3.2. Određivanje ukupne promjene boje

Parametri boje mikrokapsula i samog omotača se mjere u CIEL\*a\*b\* sustavu pomoću kolorimetra Minolta Chroma Meter CR-400 (**Slika 9**). U CIEL\*a\*b\* sustavu boja, svaka boja je definirana mjestom u trodimenzionalnom prostoru kojeg predstavljaju tri međusobno okomite osi  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ .  $L^*$  koordinata predstavlja svjetlinu. Gradirana je od 0 do 100 te pritom 0 predstavlja crnu, a 100 bijelu boju.  $a^*$  koordinata obojenja s pozitivnim i negativnim smjerom.  $+a^*$  predstavlja vektor crvene boje, a  $-a^*$  predstavlja komplementarnu zelenu boju.  $b^*$  koordinata je također koordinata obojenja s pozitivnim i negativnim smjerom.  $+b^*$  je pozitivan smjer koji označava žutu boju,  $-b^*$  označava komplementarnu plavu boju (Lukinac Čačić, 2012).





**Slika 9** Konica Minolta, Chroma Meter CR-400

Prilikom određivanja boje kolorimetrom, koristi se mala staklena Petrijeva zdjelica. Ispunjava se do vrha prahom, potrebno je provjeriti da nema grudica. Očitavaju se mjerenja za  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ . Potrebno je za svaki uzorak napraviti minimalno tri mjerenja te prije svakog očitavanja rotirati zdjelicu. Vrijednosti dobivene mjerenjem kolorimetrom služe za izračun ukupne promjene boje ( $\Delta E_{ab}$ ) prema jednadžbi (5).

$$\Delta E_{ab} = \sqrt{(L_0^* - L^*)^2 + (a_0^* - a^*)^2 + (b_0^* - b^*)^2} \quad (5)$$

Usporedba instrumentalnog mjerenja boje u odnosu na percepciju prosječnog ljudskog oka prikazana je u **Tablici 4**:

**Tablica 4** Odnos instrumentalnog mjerenja boje i percepcije ljudskog oka

$\Delta E_{ab}$	Ljudsko oko
< 0,2	Nije uočljivo
0,2 – 1	Vrlo slabo uočljivo
1 - 3	Slabo uočljivo
3 - 6	Uočljivo
> 6	Vrlo uočljivo

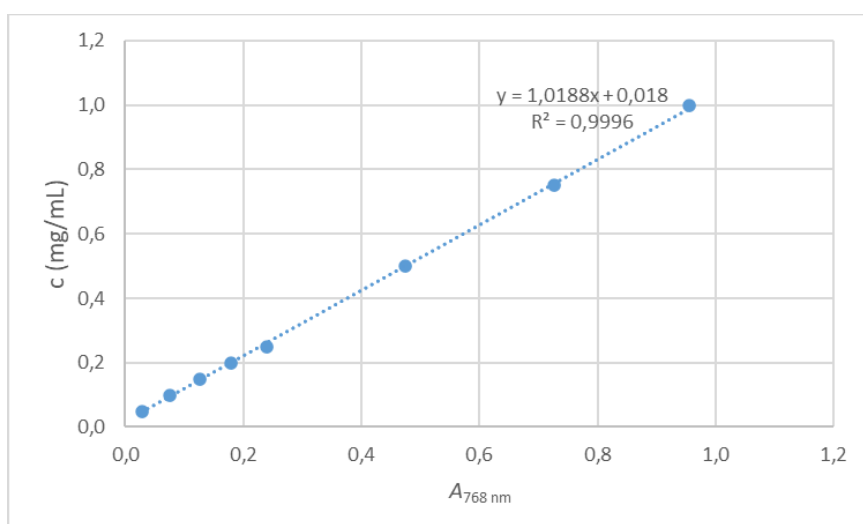
### 3.3.3. Određivanje ukupnih fenolnih tvari (TPC)

Ukupne fenolne tvari su određene prema Folin-Ciocalteu metodi. Folin-Ciocalteu metoda se temelji na reakcijama oksidacije i redukcije. Fenolni spojevi se u alkalnom mediju, uz prisutnost Folin-Ciocalteu reagensa oksidiraju te se potom reduciraju u okside pri čemu nastaje plavo

obojenje. Rezultati se određuju spektrofotometrijski, odnosno određuje se apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm (Dabić, 2019; Mihajlovski, 2018; Huang i Ou, 2005).

### **IZRADA KALIBRACIJSKE KRIVULJE**

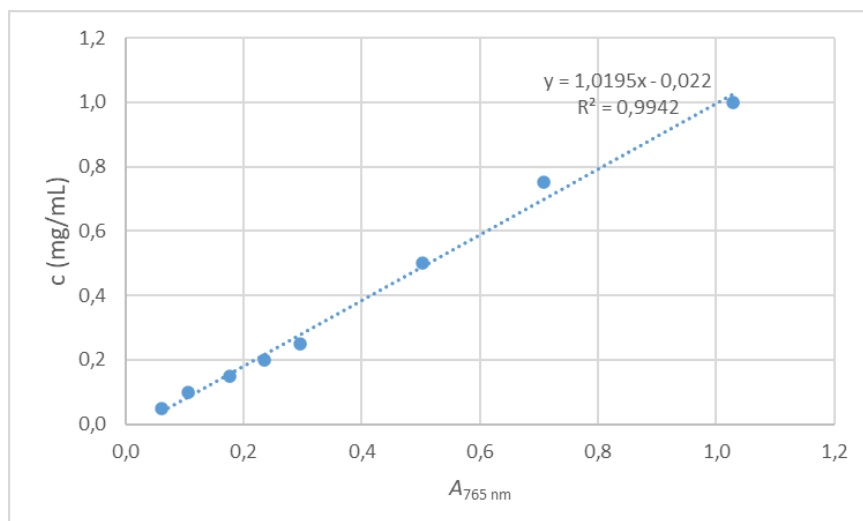
Kao standard za izradu kalibracijske krivulje je korištena galna kiselina. Napravljene su dvije kalibracijske krivulje - jedna za galnu kiselinu otoplenu u 50 %-tnoj vodenoj otopini etanola i druga za galnu kiselinu otoplenu u mješavini etanol : ledena octena kiselina : voda (50 : 8 : 42, v/v/v). Otopina galne kiseline u 50 %-tnoj vodenoj otopini etanola pripremljena je u rasponu koncentracija 0,05 - 1 mg/mL. Otopina galne kiseline u mješavini etanol: ledena octena kiselina: voda (50 : 8 : 42, v/v/v) je pripremljena u rasponu koncentracija 0,025 – 1 mg/mL. Na spektrofotometru (Shimadzu UV-1280, Japan) pri valnoj duljini od 765 nm su izmjerene apsorbancije pripadajućih koncentracija sukladno kojima su izrađene kalibracijske krivulje (slike 10 i 11).



**Slika 10** Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih fenolnih tvari koristeći 50%-tni etanol kao otapalo

Metodom linearne regresije dobivena je jednadžba **(6)**, koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije ukupnih fenolnih tvari ( $c_{\text{TPC}}$ ,  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$ ) u tekućem ekstraktu.

$$c_{\text{TPC}} = 1,0188 \cdot A + 0,0188 \quad (6)$$



**Slika 11** Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih fenolnih tvari koristeći otapalo etanol : ledena octena kiselina : voda (50 : 8 : 42, v/v/v)

Metodom linearne regresije je dobivena je jednadžba **(7)**, koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije ukupnih fenolnih tvari ( $c_{\text{TPC}}$ ,  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$ ) u dobivenom prahu.

$$c_{\text{TPC}} = 1,0195 \cdot A - 0,022 \quad (7)$$

### **PRIPREMA UZORKA**

Uzorak je pripremljen prema uputama Tolun i sur., (2016), u 15 mg praha je dodano 3 mL otopine etanol : ledena octena kiselina : voda (50: 8: 42, v/v/v). Smjesa je promiješana na vortex miješalici te potom profiltrira kroz 0,45  $\mu\text{m}$  PTFE filter.

### **PROVEDBA ANALIZE**

U epruvetu je otpipetirano 40  $\mu\text{L}$  pripremljenog uzorka (tekućeg ekstrakta ili pripremljenog praha), 3160  $\mu\text{L}$  redestilirane vode i 200  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalte reagensa. Nakon 8 min otpipetirano je 600  $\mu\text{L}$  20 %-tne vodene otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Uzorci su pomiješani na vorteks miješalici i ostavljeni u vodenoj kupelji na 40 °C tijekom 30 min. Po isteku vremena inkubacije, na UV/VIS spektrofotometru (Shimadzu, UV-1280, Japan), pri 765 nm je izmjerena apsorbanacija. Sva mjerenja su provedena u tri paralele. Slijepa proba je pripremljena na isti način, ali se umjesto uzorka u slijepu probu otpipetiralo 40  $\mu\text{L}$  ekstrakcijskog otapala.

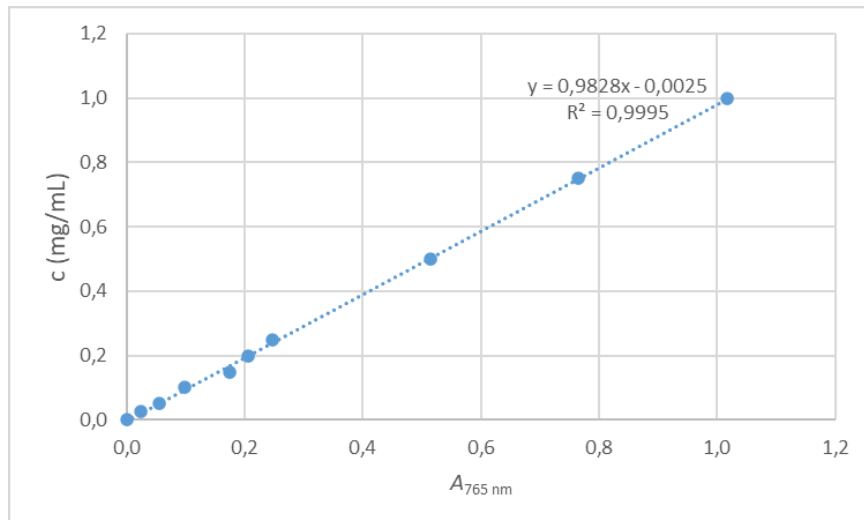
### 3.3.4. Određivanje površinskih fenolnih tvari

Za određivanje površinskih fenolnih tvari korištena je ista metoda kao i za određivanje ukupnih fenolnih tvari. Uzorak pripremljen prema Tolun i sur. (2016) uz modifikacije. U 24 mg praha dodano 3 mL otopine etanol: metanol (1:1 v/v). Po isteku 5 min uzorak profiltriran na 0,45  $\mu\text{m}$  PTFE filter, pri čemu je u dobivenom filtratu određen sadržaj ukupnih fenolnih tvari prema gore opisanoj Folin-Ciocalteu metodi.

Za izradu kalibracijske krivulje je korištena galna kiselina otopljena u mješavini etanola i metanola (1:1 v/v). Otopina galne kiseline u mješavini etanola i metanola je pripremljena u rasponu koncentracija 0,025 - 1 mg/mL. Pri valnoj dulji 765 nm na spektrofotometru (Shimadzu UV-1280, Japan, **slika 12**) su izmjerene apsorbancije odgovarajućih koncentracija galne kiseline otopljene u mješavini etanol: metanol (1:1 v/v) koje su korištene za izradu kalibracijske krivulje (**slika 13**).



**Slika 12** Spektrofotometar Shimadzu UV-1280



**Slika 13** Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih fenolnih tvari koristeći etanol : metanol (50 : 50, v/v) kao otapalo

Metodom linearne regresije je dobivena je jednadžba **(8)**, koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije površinskih fenolnih tvari ( $c_{\text{SPC}}$ ,  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$ ) u dobivenom prahu:

$$c_{\text{SPC}} = 0,9828 \cdot A - 0,0025 \quad (8)$$

### **IZRAČUN UDJELA FENOLNIH TVARI**

Prema jednadžbama **(6)**, **(7)** i **(8)** izračunate su masene koncentracije ukupnih fenolnih tvari ( $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$ ), a konačni rezultati izraženi su kao maseni udjeli navedenih fenolnih spojeva na suhu tvar uzorka, prema jednadžbi **(9)**:

$$C \text{ (mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}) = \frac{c \cdot V}{m_{\text{uzorka}} \cdot w_{\text{s.tv.}}} \quad (9)$$

gdje je:

- $C$  – maseni udio fenolnih tvari ( $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ )
- $c$  – masena koncentracija fenolnih tvari ( $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$ )
- $V$  – volumen otapala (mL)
- $m_{\text{uzorak}}$  – masa uzorka praha / ekstrakta korištenog za analizu (g)
- $w_{\text{s.tv.}}$  – udio suhe tvari (-).

### 3.3.5. Efikasnost inkapsulacije

Iz dobivenih vrijednosti masenih udjela ukupnih i površinskih fenolnih tvari izračunata je efikasnost inkapsulacije (eng. *encapsulation efficiency*, EE), prema Vu i sur., (2020), jednadžba (10):

$$EE (\%) = \frac{C_{TPC} - C_{SPC}}{C_{TPC}} \cdot 100 \quad (10)$$

gdje je:

- $C_{TPC}$  – maseni udio ukupnih fenolnih tvari u prahu ( $mg_{GAE}/g_{s.tv.}$ )
- $C_{SPC}$  – maseni udio površinskih fenolnih tvari u prahu ( $mg_{GAE}/g_{s.tv.}$ ).

### 3.3.6. Prinos inkapsulacije

Prinos inkapsulacije (eng. *encapsulation yield*, Y) je izračunat dijeljenjem ukupne mase suhe tvari dobivenog praha s masom ukupne suhe tvari u pojnoj smjesi (Gallo i sur., 2011; Mihajlović i sur., 2011), prema jednadžbi (11):

$$Y (\%) = \frac{\text{ukupna masa suhe tvari praha}}{\text{ukupna masa suhe tvari u pojnoj otopini}} \cdot 100 \quad (11)$$

### 3.3.7. Gustoća praha

#### Naspina gustoća

Naspina gustoća praha (*bulk density*, BD) ili gustoća praha prije potresanja određena je prema Boyano-Orozco i sur., (2020) uz modifikacije. 1 g praha prenesen je u menzuru od 25 ml te je očitani volumen kojega je prah zauzeo u menzuri. Gustoća prije potresanja izračunata prema jednadžbi (12):

$$BD (g/cm^3) = \frac{\text{masa praha}}{\text{volumen praha}} \quad (12)$$

#### Gustoća praha nakon potresanja

Za određivanje gustoće praha nakon potresanja (*tapped density*, TD) menzura s prahom je postavljena na postolje uređaja za mjerenje gustoće (AutoTap, Anton Paar, Francuska), **slika**

**14**, te je uređaj namješten na 1250 lupkanja, nakon čega je očitana volumena koji je prah zauzeo u menzuri. Gustoća praha nakon potresanja izračunata prema jednadžbi **(13)**:

$$TD \text{ (g/cm}^3\text{)} = \frac{\text{masa praha}}{\text{volumen praha nakon tapkanja}} \quad (13)$$



**Slika 14** Anton Paar, uređaj za mjerenje gustoće praha

### 3.3.8. Kompresibilnost praha

Iz određene gustoće praha prije i nakon potresanja prema Boyano-Orozco i sur., (2020) izračunati su Hausner ratio (jednadžba **(14)**) i Carr indeks (jednadžba **(15)**), parametri koji definiraju svojstvo tecivosti praha (**Tablica 5**).

$$HR = \frac{BD}{TD} = \frac{\text{početni volumen praha}}{\text{volumen praha nakon tapkanja}} \quad (14)$$

$$CI \text{ (\%)} = \frac{BD - TD}{BD} \cdot 100 = \frac{\text{početni volumen} - \text{volumen nakon tapkanja}}{\text{početni volumen}} \cdot 100 \quad (15)$$

Prema *European Pharmacopea* prahovi se mogu klasificirati prema kvazifluidnosti odnosno tecivosti:

**Tablica 5** Svojstva tecivosti praha

CARR INDEKS (%)	SVOJSTVA TECIVOSTI	HAUSNER RATIO
≤10	Izvrсна	1,00-1,11
11-15	Dobra	1,12-1,18
16-20	Osrednja	1,19-1,25
21-25	Prolazna	1,26-1,34
26-31	Loša	1,35-1,45
32-37	Vrlo loša	1,46-1,59
>38	Vrlo, vrlo loša	>1,60

### 3.3.9. Topivost

Za određivanje topivosti mikrokapsula korištene su Petrijeve zdjelice, koje su oprane, potom osušene u sušioniku (UFE 500, Memmert, Njemačka) na 105 °C 1 h te su nakon hlađenja izvagane zajedno s poklopcem. Također, izvagane su prazne Falcon epruvete od 50 mL bez čepa. U svaku Falcon epruvetu odvagano 0,1 g praha te je dodano 10 mL redestilirane vode. Sadržaj epruvete je promiješan na vorteks miješalici (DLAB MX-S, Kina) te je epruveta stavljena u vodenu kupelj (Witeg WSB-30, Njemačka) na 60 °C 30 min. Po završetku inkubacije uslijedilo je hlađenje Falcon epruveta s uzorcima u hladnoj vodi te potom centrifugiranje na centrifugi (Hermle Z 326 K, Njemačka) 10 min pri 11 000 rpm. Supernatant je dekantiran u Petrijevu zdjelicu u kojoj se sušio 3 h na 105 °C u sušioniku (Memmert UFE 500, Njemačka). Nakon završetka procesa sušenja, Petrijeve zdjelice s uzorcima su stavljene u eksikator na hlađenje u trajanju od 1 h. Po isteku vremena hlađenja Petrijeva zdjelica je izvagana radi određivanja mase otopljenog praha. Osim toga izvagana je i Falcon epruveta s talogom kako bi se odredila masa zaostalog (nabubrenog) taloga (Chung-Woo i sur., 2012).

Iz očitanih masa izračunati su: indeks topivosti (eng. *water solubility indeks*, WSI) prema jednadžbi (16), indeks adsorpcije vode (eng. *water adsorbtion indeks*, WAI) prema jednadžbi (17) i sposobnost bubrenja (eng. *swelling power*, SP) prema jednadžbi (18).

$$\text{WSI (\%)} = \frac{\text{masa supernatanta nakon sušenja}}{\text{masa suhe tvari uzorka}} \cdot 100 \quad (16)$$

$$\text{WAI} = \frac{\text{masa taloga zaostalog nakon centrifugiranja}}{\text{masa suhe tvari uzorka}} \quad (17)$$

$$\text{SP} = \frac{\text{masa taloga zaostalog nakon centrifugiranja}}{\text{masa suhe tvari uzorka} \cdot \left(1 - \frac{\text{WSI \%}}{100}\right)} \quad (18)$$



## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

## Suha tvar praha, prinos i efikasnost inkapsulacije

Tablica 6 prikazuje udio vlage, prinos, maseni udio ukupnih polifenola, maseni udio površinskih polifenola i učinkovitost inkapsulacije za svaku probu. Osim toga sadrži i parametre homogeniziranja svake pojedine probe.

Masa suhe tvari se određuje prema uputama datih u poglavlju (3.2.6) na uređaju (slika 8) i izračunava se prema jednadžbi (4), odnosno masa nakon sušenja se dijeli sa masom prije sušenja i množi 100. Prema Ji i sur., (2016) konačni sadržaj vlage u prahu bi trebao biti između 2 – 3 % jer u suprotnom može imati utjecaj na adsorpciju vode kao i na karakter tecivosti praha.

Kako bi se odredila uspješnost inkapsulacije, potrebno je odrediti TPC i SPC. Metode određivanja TPC su opisane u poglavlju 3.3.3., a metode određivanja SPC u poglavlju 3.3.4. Uspješnost inkapsulacije je obrnuto proporcionalna udjelu površinskih polifenolnih spojeva, a određena je prema jednadžbi (10).

Poželjna karakteristika svakog proizvodnog procesa je ostvarenje što većeg prinosa odnosno što manje gubitaka. Tijekom procesa sušenja raspršivanjem, na prinos negativno utječu lijepljenje i taloženje čestica praha na stijenke uređaja. Kako bi proces sušenja raspršivanjem bio što uspješniji potrebno je odabrati adekvatan omotač i procesne parametre (Yousefi i sur., 2011). Prinos je izračunat iz omjera mase suhe tvari praha i ukupne mase suhe tvari u pojnoj otopini, odnosno prema jednadžbi (11).

**Tablica 6** Udio vlage ( $w_v$ ), prinos inkapsulacije (Y), maseni udio ukupnih fenolnih tvari ( $C_{TPC}$ ), maseni udio površinskih fenolnih tvari ( $C_{SPC}$ ) i efikasnost inkapsulacije (EE) proizvedenih prahova

PROBA	A: T (° C)	B: $t_h$ (min)	C: $t_s$ (min)	$w_v$ (%)	Y (%)	$C_{TPC}$ (mg <sub>GAE</sub> /m <sub>s.tv.</sub> )	$C_{SPC}$ (mg <sub>GAE</sub> /m <sub>s.tv.</sub> )	EE (%)
1	30	30,0	30	5,90	79,98	119,07	13,29	88,84
2	50	17,5	15	6,02	87,32	106,49	7,82	92,66
3	50	17,5	45	6,04	90,28	113,46	9,43	91,69
4	40	5,0	45	5,98	85,01	115,12	11,86	89,70
5	30	5,0	30	5,92	91,63	114,47	9,98	91,28
6	40	17,5	30	6,02	93,20	159,29	7,86	95,07
7	40	17,5	30	5,92	94,48	155,93	7,28	95,33
8	50	5,0	30	6,02	97,36	137,01	8,56	93,76
9	40	5,0	15	5,99	84,99	169,21	9,25	94,53
10	30	17,5	45	5,98	86,18	157,06	9,25	94,11
11	50	30,0	30	5,93	84,66	115,50	7,11	93,84
12	30	17,5	15	5,92	79,97	119,53	8,11	93,21

<b>13</b>	40	17,5	30	5,97	93,64	147,63	7,20	95,12
<b>14</b>	40	30,0	45	6,03	84,20	122,13	7,34	93,99
<b>15</b>	40	30,0	15	6,06	93,94	115,66	12,00	89,62

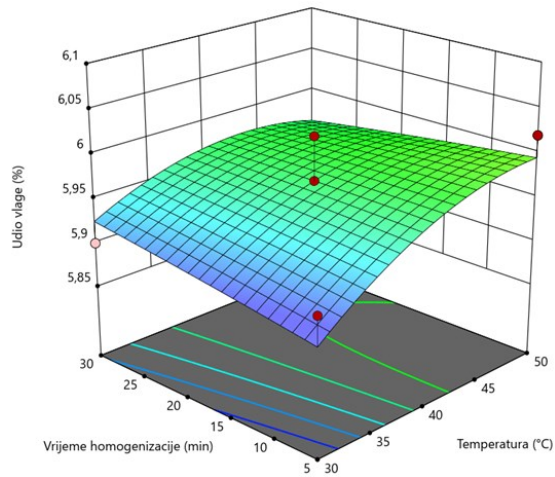
A: temperatura,  $T$   
B: vrijeme homogenizacije,  $t_h$   
C: vrijeme stabilizacije,  $t_s$

**Tablica 7** Statistički pokazatelji značajnosti utjecaja parametra homogenizacije na udio vlage ( $w_v$ ), prinos inkapsulacije (Y), maseni udio ukupnih fenolnih tvari ( $C_{TPC}$ ), maseni udio površinskih fenolnih tvari ( $C_{SPC}$ ) i efikasnost inkapsulacije (EE) praha

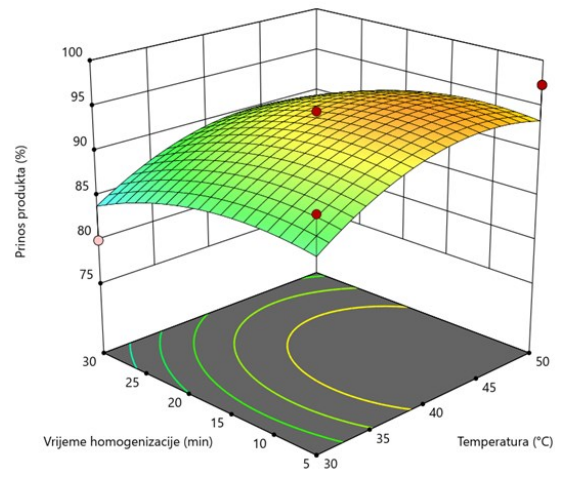
	<i>Intercept</i>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>AB</b>	<b>AC</b>	<b>BC</b>	<b>A<sup>2</sup></b>	<b>B<sup>2</sup></b>	<b>C<sup>2</sup></b>
$w_v$ (%)	5,970	0,0363	0,0013	0,0050	-0,0175	-0,0100	-0,0050	-0,0263	-0,0013	0,0463
<i>p</i> -vrijednost		0,1057	0,9484	0,7966	0,5308	0,7164	0,8551	0,3767	0,9650	0,1482
Y (%)	93,773	2,7325	-2,0263	-0,0688	-0,2625	-0,8125	-2,4400	-3,2317	-2,1342	-4,6042
<i>p</i> -vrijednost		0,2512	0,3803	0,9752	0,9332	0,7960	0,4501	0,3451	0,5219	0,1977
$C_{TPC}$ ( $mg_{GAE}/g_{s.tv.}$ )	154,283	-4,7088	-7,9313	-0,3900	-6,5275	-7,6400	15,1400	-19,583	-13,188	-10,565
<i>p</i> -vrijednost		0,5307	0,3083	0,9577	0,5385	0,4748	0,1865	0,1156	0,2564	0,3519
$C_{SPC}$ ( $mg_{GAE}/g_{s.tv.}$ )	7,447	-0,9638	0,0113	0,0875	-1,1900	0,1175	-1,8175	0,4142	1,8742	0,7917
<i>p</i> -vrijednost		0,1362	0,9843	0,8783	0,1820	0,8844	0,0642	0,6265	0,0660	0,3675
EE (%)	95,173	0,5638	-0,3725	-0,0663	0,6300	-0,4675	2,3000	-1,1429	-2,1004	-1,1129
<i>p</i> -vrijednost		0,3857	0,5577	0,9155	0,4866	0,6015	0,0408	0,2476	0,0613	0,2586

A: temperatura,  $T$   
B: vrijeme homogenizacije,  $t_h$   
C: vrijeme stabilizacije,  $t_s$

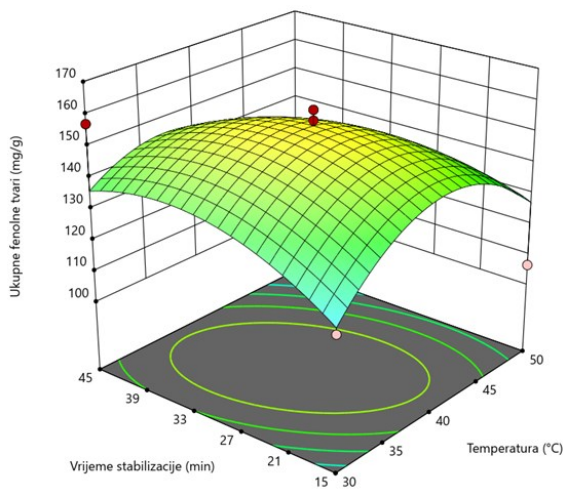
*p*-vrijednost:  $p < 0,05$   $0,05 \leq p < 0,1$   $p \geq 0,1$



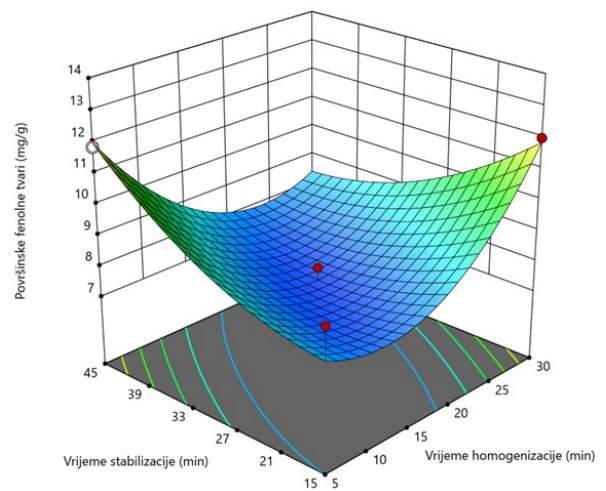
(a)



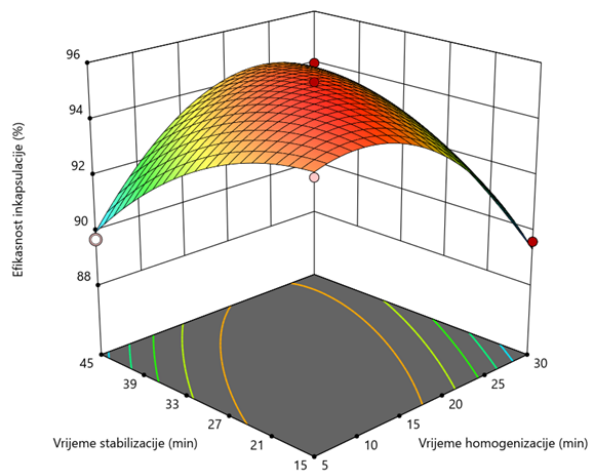
(b)



(c)



(d)



(e)

**Slika 15 3D** prikaz utjecaja temperature homogenizacije, vremena homogenizacije i vremena stabilizacije na udio vlage u prahu (a), prinos produkta (b), koncentraciju ukupnih fenolnih tvari (c), koncentraciju površinskih fenolnih tvari (d) i efikasnost inkapsulacije (e) praha

U **tablici 6.** su vidljivi podaci za udio suhe tvari. Prilikom izrade eksperimenta najveći udio suhe tvari imala je prva proba. Udio suhe tvari je iznosio 94,10 %. Uzorak je homogeniziran 30 minuta, na 30 °C i mirovao je nakon homogenizacije 30 minuta. Najmanji udio suhe tvari u iznosu od 93,94 % imala je proba 15 koja je homogenizirana na 40 °C, 30 minuta, a vrijeme mirovanja je iznosilo 15 minuta.

Izračunate vrijednosti ukupnih i površinskih polifenolnih spojeva su prikazane u **Tablici 6.** Iz **Tablice 6.** je vidljivo da se najveća uspješnost ostvaruje kada su uvjeti homogenizacije sljedeći: vrijeme homogeniziranja 17,5 minuta, vrijeme mirovanja 30 minuta, a temperatura homogeniziranja 40 °C. To su uvjeti pod kojima je proba broj 7 homogenizirana. Najmanja uspješnost je ostvarena prilikom inkapsulacije probe broj 1. Vrijeme homogeniziranja za probu broj 1 je bilo 30 minuta, vrijeme mirovanja također 30 minuta, a temperatura je također iznosila 30 °C.

Prema podacima vidljivim na tablici 6., najbolji prinos je ostvaren prilikom sušenja 8. probe, a najlošiji prilikom sušenja 1. probe. Uvjeti homogenizacije 8. probe su: 50 °C, vrijeme homogenizacije iznosi je 5 minuta, a vrijeme mirovanja je 15 minuta. 1. proba je homogenizirana 30 minuta pri 30 °C, a zatim je mirovala 30 minuta prije sušenja raspršivanjem. Prema Lacerda i sur. (2016), proces sušenja raspršivanjem se smatra uspješnim ukoliko je prinos produkta veći od 50 %. Iz toga se zaključuje da su sva sušenja raspršivanjem napravljena u ovom eksperimentu bila uspješna.

Prema podacima iz tablice 7., vidljivo je da parametri homogenizacije nemaju statistički značajan utjecaj na udio vlage, TPC i SPC. *p*-vrijednost pokazuje da statistički značajan utjecaj na učinkovitost inkapsulacije ima interakcije vremena homogenizacije i vremena stabilizacije, što je također vidljivo na slici 15.

### **Ukupna promjena boje**

U prahovima ekstrakta tropa grožđa i kozje sirukte, napravljenim u ovom eksperimentu, određeni su parametri boje  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  primjenom CIE  $L^*a^*b^*$  sustava boja. Vrijednost  $L^*$  (eng. *Lightness*) predstavlja svjetlinu boje. Što je vrijednost  $L^*$  koordinate veća to je obojenje slabije odnosno svjetlije, a što je vrijednost  $L^*$  koordinate manje to je obojenje jače odnosno tamnije.

$a^*$  koordinata ima negativan i pozitivan smjer, odnosno vektor crvene boje predstavlja pozitivan, a vektor zelene boje negativan smjer.  $b^*$  koordinata također ima dva smjera, pri čemu je pozitivan smjer vektor žute boje, a negativan smjer vektor plave boje.

**Tablica 8** Parametri boje praha ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) i ukupna promjena boje ( $\Delta E_{ab}$ ) proizvedenih prahova u odnosu na omotač

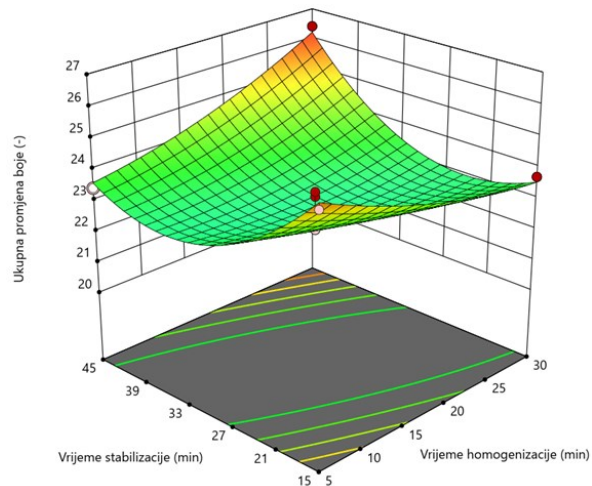
PROBA	A: T (° C)	B: t <sub>h</sub> (min)	C: t <sub>m</sub>	L*	a*	b*	$\Delta E_{ab}$
			(min)				
1	30	30,0	30	64,96	7,86	3,51	22,23
				64,64	7,83	3,59	22,39
				68,34	8,33	3,75	20,15
2	50	17,5	15	68,98	8,05	3,73	19,65
				67,81	8,22	3,79	20,39
				65,21	8,44	3,39	22,39
3	50	17,5	45	69,28	7,81	3,56	19,47
				62,67	7,41	3,37	23,75
				70,45	8,07	3,79	18,82
4	40	5,0	45	64,27	7,87	3,30	22,83
				63,92	7,81	3,32	23,04
				61,90	7,54	3,23	24,44
5	30	5,0	30	66,86	8,40	3,37	21,32
				67,28	8,35	3,35	21,05
				65,64	8,25	3,28	22,08
6	40	17,5	30	62,91	8,68	3,66	23,95
				61,42	8,46	3,61	24,98
				67,39	8,37	3,49	20,90
7	40	17,5	30	63,67	8,40	3,38	23,44
				67,58	8,32	3,56	20,72
				61,38	8,53	3,30	25,20
8	50	5,0	30	65,99	7,47	3,16	21,57
				68,32	7,67	3,29	20,13
				66,12	7,40	3,20	21,43
9	40	5,0	15	61,33	7,36	2,96	24,95
				60,05	7,46	2,88	26,01
				60,59	7,39	2,79	25,61
10	30	17,5	45	64,12	7,87	3,29	22,94
				57,18	8,56	3,87	28,22
				66,02	9,39	3,90	22,04
11	50	30,0	30	68,78	7,21	3,63	19,41
				66,34	7,02	3,73	20,80
				65,10	6,93	3,67	21,64
12	30	17,5	15	62,65	7,09	3,46	23,59
				61,61	7,01	3,38	24,38
				62,97	7,10	3,42	23,37
13	40	17,5	30	67,57	6,61	3,34	20,07
				64,61	7,03	3,47	22,14
				62,22	7,06	3,42	23,92
14	40	30,0	45	57,75	6,72	3,27	27,39
				57,72	6,67	3,20	27,43

				61,57	6,79	3,25	24,40
<b>15</b>	40	30,0	15	60,53	8,10	4,16	25,24
				64,86	8,47	4,45	22,05
				62,27	8,19	4,31	23,87
<b>A:</b> temperatura, $T$ <b>B:</b> vrijeme homogenizacije, $t_h$ <b>C:</b> vrijeme stabilizacije, $t_s$							

**Tablica 9** Statistički pokazatelji značajnosti utjecaja parametara homogenizacije na ukupnu promjenu boje ( $\Delta E_{ab}$ ) praha

	<i>Intercept</i>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>AB</b>	<b>AC</b>	<b>BC</b>	<b>A<sup>2</sup></b>	<b>B<sup>2</sup></b>	<b>C<sup>2</sup></b>
$\Delta E_{ab}$ (-)	22,813	<b>-1,0125</b>	0,1075	0,1375	-0,1325	-0,1875	1,1925	<b>-1,9929</b>	0,3621	<b>1,5971</b>
<i>p</i> -vrijednost		<b>0,0314</b>	0,7658	0,7040	0,7949	0,7140	0,0567	<b>0,0107</b>	0,5038	<b>0,0247</b>
<b>A:</b> temperatura, $T$ <b>B:</b> vrijeme homogenizacije, $t_h$ <b>C:</b> vrijeme stabilizacije, $t_s$										
<i>p</i> -vrijednost: <b><math>p &lt; 0,05</math></b> $0,05 \leq p < 0,1$ $p \geq 0,1$										

Vrijednosti svih koordinata CIEL<sup>\*</sup>*a*<sup>\*</sup>*b*<sup>\*</sup> sustava boja dobivenih mjerenjem proba iz ovog eksperimenta su prikazane u **Tablici 8**. Vidljivo je da kod svih proba dolazi do razvoja crvene boje jer je *a*<sup>\*</sup> koordinata pozitivna. Također dolazi do razvoja žute boje, ali u manjoj mjeri, jer je *b*<sup>\*</sup> koordinata također pozitivna. Najveće vrijednosti *a*<sup>\*</sup> koordinate pokazuje proba 10, a najmanje proba 14. Žuta boja najviše dolazi do izražaja u probi 15, a najmanje u probi 9. Prema jednadžbi (5) je izračunata ukupna promjena boje. Iz **tablice 8** vidimo da je ukupna promjena boje kod svih uzoraka vrlo uočljiva. Najznačajnija promjena boje je zabilježena u probi broj 14, a najmanja ukupna promjena boje u probi broj 11. U **tablici 9** su prikazani statistički pokazatelji značajnosti utjecaja parametara homogenizacije na ukupnu promjenu boje. Vidljivo je da statistički značajan utjecaj na ukupnu promjenu boje imaju temperatura homogenizacije i vrijeme stabilizacije. Na **slici 16** je vidljivo da porastom vremena stabilizacije i vremena homogenizacije dolazi do povećanja promjena boje, kao i da pri kratkom vremenu stabilizacije i homogenizacije dolazi do povećane promjene boje.



**Slika 16** 3D prikaz utjecaja temperature homogenizacije, vremena homogenizacije i vremena stabilizacije na ukupnu promjenu boje praha

### Topivost, adsorpcija vode i bubrenje

Indeks topivosti u vodi, indeks adsorpcije vode i sposobnost bubrenja su važne karakteristike svakog praha. Krajnjim potrošačima je bitna brza i potpuna rekonstitucija praha stoga je ovo jedan od glavnih pokazatelja kvalitete praha. Utjecaj na topljivost praha imaju različiti parametri poput vrste početne sirovine, odabir omotača i parametri sušenja raspršivanjem – protok zraka i pojne smjese (Jafari i sur., 2017). Kako navodi Vidović i sur. (2014) svaki kvalitetni prah bi trebao imati što veće vrijednosti indeksa topivosti u vodi, te što niže vrijednosti indeksa adsorpcije vode.

**Tablica 10** Vrijednosti indeksa topivosti u vodi (WSI), indeksa adsorpcije vode (WAI) i sposobnost bubrenja (SP) proizvedenih prahova

PROBA	A: T (° C)	B: t <sub>h</sub> (min)	C: t <sub>m</sub> (min)	WSI (%)	WAI (-)	SP (-)
1	30	30,0	30	54,80	8,55	18,95
2	50	17,5	15	52,78	9,15	19,39
3	50	17,5	45	53,16	8,01	17,06
4	40	5,0	45	52,20	10,98	22,96
5	30	5,0	30	55,38	11,00	24,63
6	40	17,5	30	59,15	10,14	24,82
7	40	17,5	30	61,44	10,18	26,41
8	50	5,0	30	61,89	11,22	29,54
9	40	5,0	15	58,32	9,62	23,08
10	30	17,5	45	55,30	9,36	20,95



<b>11</b>	50	30,0	30	51,80	7,29	15,13
<b>12</b>	30	17,5	15	57,74	6,05	14,31
<b>13</b>	40	17,5	30	57,02	10,18	23,70
<b>14</b>	40	30,0	45	58,60	5,65	13,65
<b>15</b>	40	30,0	15	55,88	5,64	12,76

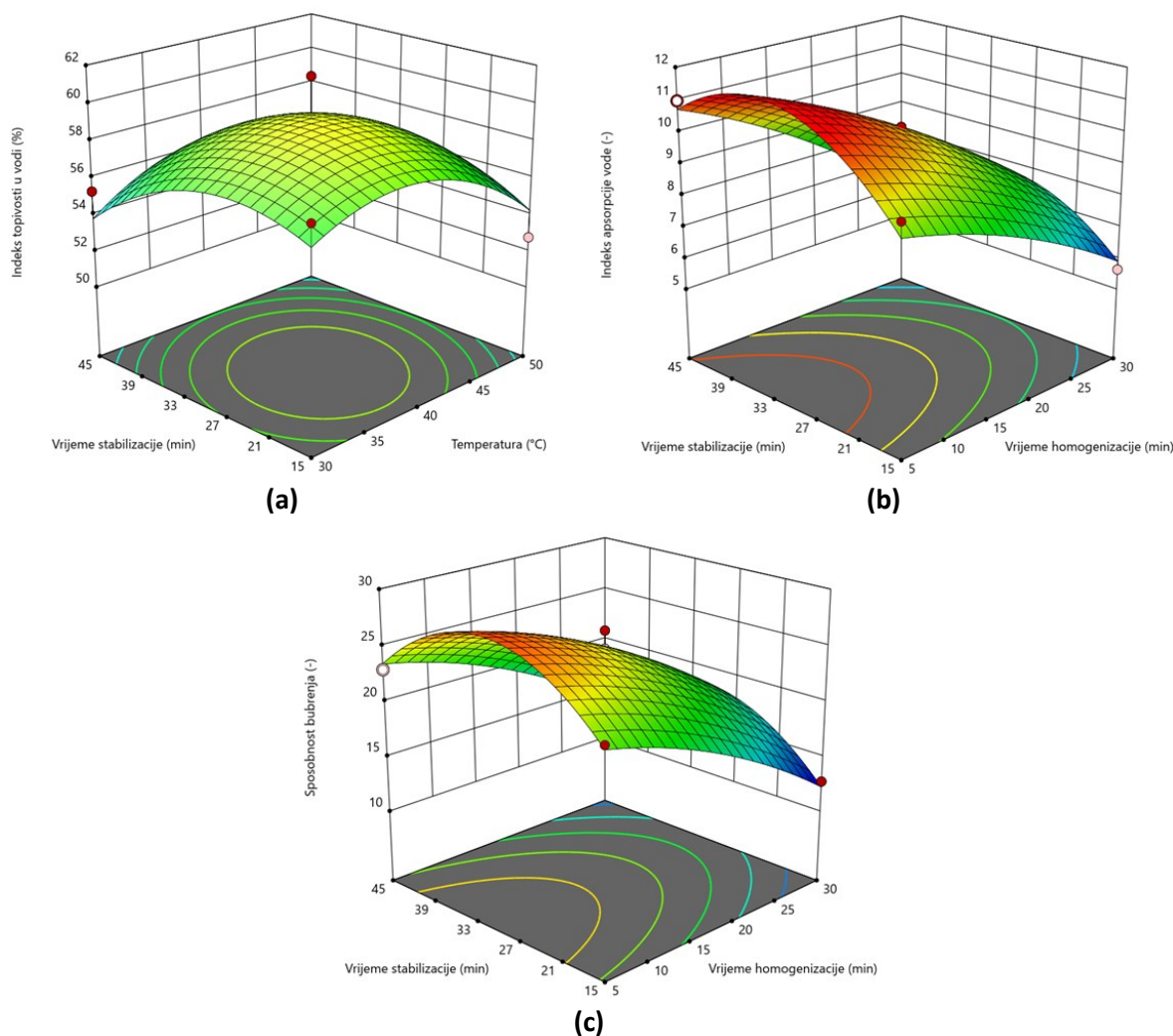
A: temperatura,  $T$   
B: vrijeme homogenizacije,  $t_h$   
C: vrijeme stabilizacije,  $t_s$

**Tablica 11** Statistički pokazatelji značajnosti utjecaja parametra homogenizacije na indeks topivosti u vodi (WSI), indeksa adsorpcije vode (WAI) i sposobnost bubrenja (SP) praha

	<i>Intercept</i>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>AB</b>	<b>AC</b>	<b>BC</b>	<b>A<sup>2</sup></b>	<b>B<sup>2</sup></b>	<b>C<sup>2</sup></b>
<b>WSI (%)</b>	59,203	-0,4488	<b>-0,8388</b>	-0,6825	-2,3775	0,7050	2,2100	-2,3704	-0,8654	-2,0879
<i>p</i> -vrijednost		0,7070	<b>0,4903</b>	0,5713	0,1960	0,6768	0,2243	0,2125	0,6242	0,2638
<b>WAI (-)</b>	10,167	0,0888	<b>-1,9613</b>	0,4425	-0,3700	<b>-1,1125</b>	-0,3375	-0,2408	-0,4108	<b>-1,7833</b>
<i>p</i> -vrijednost		0,7162	<b>0,0004</b>	0,1131	0,3080	<b>0,0190</b>	0,3482	0,5097	0,2802	<b>0,0033</b>
<b>SP (-)</b>	24,977	0,2850	<b>-4,9650</b>	0,6350	<b>-2,1825</b>	<b>-2,2425</b>	0,2525	<b>-1,5496</b>	-1,3646	<b>-5,4996</b>
<i>p</i> -vrijednost		0,4692	<b>&lt; 0,0001</b>	0,1416	<b>0,0082</b>	<b>0,0073</b>	0,6446	<b>0,0341</b>	0,0515	<b>0,0002</b>

A: temperatura,  $T$   
B: vrijeme homogenizacije,  $t_h$   
C: vrijeme stabilizacije,  $t_s$

*p*-vrijednost:  **$p < 0,05$**   $0,05 \leq p < 0,1$   $p \geq 0,1$



**Slika 17** 3D prikaz utjecaja temperature homogenizacije, vremena homogenizacije i vremena stabilizacije na indeks topivosti u vodi **(a)**, indeks adsorpcije vode **(b)** i sposobnost bubrenja **(c)** praha

Topivost praha se izračunava prema jednadžbi (16). Na temelju **tablice 10** vidljivo je da najbolju topivost u vodi pokazuje proba broj 8, koja je homogenizirana na 50 °C tijekom 5 minuta i vremena mirovanja od 30 minuta. Najlošija svojstva topivosti ima proba broj 11, koja se homogenizirala tijekom 30 minuta, na 50 °C i nakon toga je mirovala 30 minuta.

Najveći indeks adsorpcije vode ima proba broj 8 (50 °C, 5minuta, 30 minuta mirovanja), a najmanji proba broj 15 (40 °C, 30 minuta, mirovanje 15 minuta). Indeks adsorpcije vode se izračunava prema jednadžbi (17), a podatci su vidljivi na tablici 10.

Sposobnost bubrenja se također očitava iz **tablice 10**, a računa se prema jednadžbi (18). Kao i kod indeksa topivosti u vodi te kod indeksa adsorpcije vode, najveće vrijednosti sposobnosti

bubrenja ima proba osam, a najmanje proba 15. Sukladno tome može se zaključiti da je najviša temperatura homogenizacije (50 °C) u ultrazvučnoj kupelji, najkraće vrijeme homogenizacije (5 min) te vrijeme stabilizacije nakon homogenizacije od 30 min daju probu praha s najvećim vrijednostima parametara topivosti.

U **tablici 11 i slici 17** je vidljiv utjecaj pojedinih parametara homogenizacije na indeks topivosti u vodi, indeks adsorpcije vode i sposobnost bubrenja. Na indeks topivosti u vodi niti jedan parametar homogenizacije nema statistički značajan utjecaj. Na indeks adsorpcije vode statistički značajan utjecaj imaju vrijeme homogenizacije, interakcije temperature homogenizacije i vremena stabilizacije i vrijeme stabilizacije. Na sposobnost bubrenja statistički značajan utjecaj ima temperatura homogenizacije, vrijeme stabilizacije kao i interakcija temperature i vremena stabilizacije te interakcija temperature i vremena homogenizacije.

### **Gustoća praha prije i nakon potresanja, Hausner omjer i Carr indeks**

Gustoća praha prije potresanja je izračunata kao omjer mase i volumena kojeg je prah zauzeo u menzuri. Ova karakteristika praha je uvelike povezana s veličinom i raspodjelom čestica praha. Što su čestice praha manje, povećava se kontaktna površina s okolinom, smanjuju se pore između čestica te dolazi do povećanja gustoće prije potresanja. Osim toga na ovu karakteristiku praha utjecaj može i imati i sadržaj vlage u uzorku. Veći sadržaj vlage će uzrokovati povećanje ljepljivosti čestica, a samim time stvara se više slobodnog prostora između čestica što ponovno može biti uzrok povećane gustoće prije potresanja (Phisut, 2012).

Tecivost praha se definira kao relativno kretanje mase čestica među susjednim česticama ili duž površine stijenke spremnika (Juliano i Barbosa-Canovas, 2010). Kako bi odredili karakter tecivosti praha na temelju gustoće praha prije i nakon potresanja, određeni su Hausner omjer i Carr indeks. Hausner omjer je vrijednost koja se dobiva iz omjera početnog volumena kojeg prah zauzima u menzuri i volumena kojeg prah zauzima nakon 1250 potresanja, odnosno izračunava se prema jednadžbi (14). Carr indeks izračunavamo prema jednadžbi (15) te zajedno s Hausner omjerom služi za klasifikaciju tecivosti prahova.

**Tablica 12** Gustoća praha prije (BD) i nakon potresanja (TD), Hasuner omjer (HR) i Carr indeks (CI) proizvedenih prahova

PROBA	A: $T$ (° C)	B: $t_h$ (min)	C: $t_m$ (min)	BD (g/cm <sup>3</sup> )	TD (g/cm <sup>3</sup> )	HR (-)	CI (%)
1	30	30,0	30	0,106	0,155	1,46	31,58
2	50	17,5	15	0,083	0,125	1,50	33,33
3	50	17,5	45	0,077	0,111	1,44	30,77
4	40	5,0	45	0,077	0,111	1,44	30,77
5	30	5,0	30	0,077	0,112	1,44	30,77
6	40	17,5	30	0,077	0,118	1,53	34,62
7	40	17,5	30	0,074	0,111	1,50	33,33
8	50	5,0	30	0,074	0,112	1,50	33,33
9	40	5,0	15	0,080	0,105	1,32	24,00
10	30	17,5	45	0,067	0,112	1,67	40,00
11	50	30,0	30	0,083	0,125	1,50	33,33
12	30	17,5	15	0,065	0,098	1,51	33,91
13	40	17,5	30	0,077	0,111	1,44	30,77
14	40	30,0	45	0,073	0,107	1,47	32,14
15	40	30,0	15	0,069	0,111	1,61	37,93

A: temperatura,  $T$   
 B: vrijeme homogenizacije,  $t_h$   
 C: vrijeme stabilizacije,  $t_s$

**Tablica 13** Statistički pokazatelji značajnosti utjecaja parametra homogenizacije na gustoću praha prije (BD) i nakon potresanja (TD), Hasuner omjer (HR) i Carr indeks (CI) praha

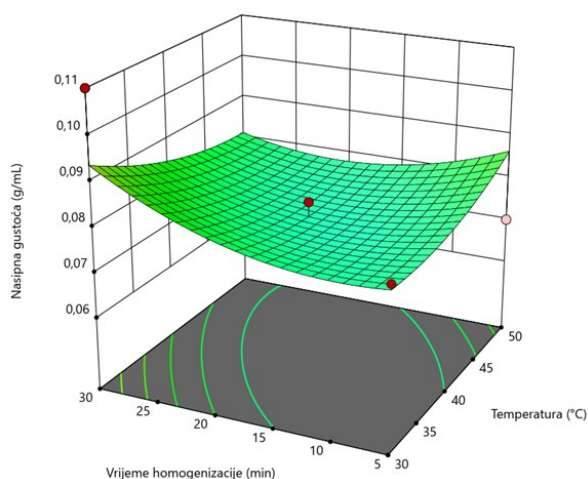
	Intercept	A	B	C	AB	AC	BC	A <sup>2</sup>	B <sup>2</sup>	C <sup>2</sup>
BD	0,077	-0,0013	0,0025	0,0013	-0,0050	-0,0025	0,0000	0,0029	0,0054	-0,0071
$p$ -vrijednost		0,8243	0,6595	0,8243	0,5374	0,7541	10000,0	0,7259	0,5216	0,4090
TD	0,113	0,0000	0,0088	-0,0013	-0,0075	-0,0075	0,0000	0,0083	0,0058	-0,0092
$p$ -vrijednost		1,0000	0,1624	0,8243	0,3664	0,3664	10000,0	0,3378	0,4916	0,2963
HR (-)	1,490	-0,0175	0,0425	0,0100	-0,0050	-0,0550	-0,0650	0,0275	-0,0425	0,0125
$p$ -vrijednost		0,5614	0,1915	0,7369	0,9049	0,2257	0,1635	0,5363	0,3521	0,7751
CI (%)	32,907	-0,6875	2,0138	0,5638	-0,2025	-2,1625	-3,1400	1,3192	-1,9733	0,2767
$p$ -vrijednost		0,5978	0,1601	0,6637	0,9112	0,2659	0,1287	0,4960	0,3224	0,8837

A: temperatura,  $T$   
 B: vrijeme homogenizacije,  $t_h$   
 C: vrijeme stabilizacije,  $t_m$

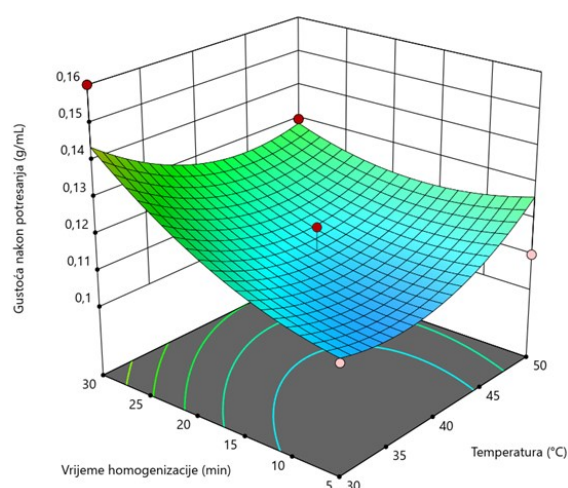
$p$ -vrijednost:  $p < 0,05$   $0,05 \leq p < 0,1$   $p \geq 0,1$

Prema podacima vidljivima na tablici (12) najveću gustoću prije potresanja ima proba 1. koja je homogenizirana na 30 °C, vremena mirovanja i homogenizacije su identična, 30 minuta. Najmanju gustoću prije potresanja pokazuje proba 12, koja je homogeniziran na 30 °C tijekom 17,5 minuta, a mirovala je 15 minuta.

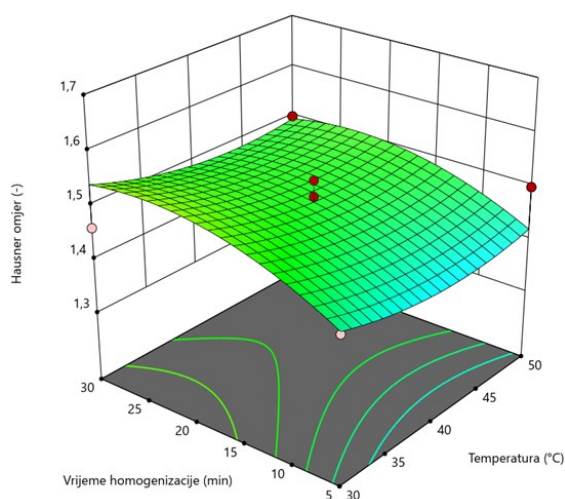
Gustoća praha nakon potresanja je izračunata kao omjer mase i volumena kojeg je prah zauzeo u menzuri nakon 1250 potresanja (lupkanja). Jednako kao i kod gustoće prije potresanja, proba 1 je pokazala najveću vrijednost, a proba 12 najmanju vrijednost gustoće nakon potresanja.



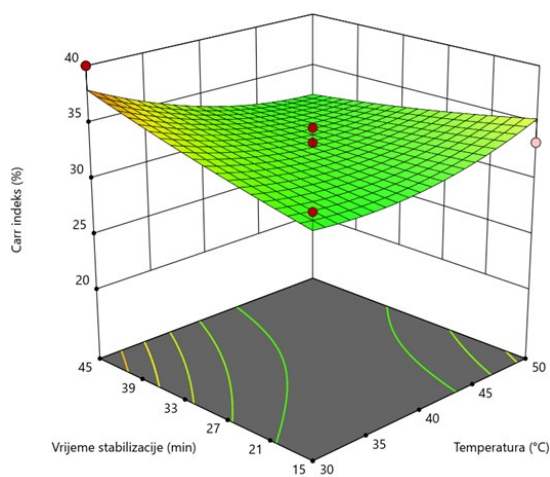
(a)



(b)



(c)



(d)

**Slika 18** 3D prikaz utjecaja temperature homogenizacije, vremena homogenizacije i vremena stabilizacije na nasipnu gustoću **(a)**, gustoću poslije potresanja **(b)**, Hausner omjer **(c)** i Carr index **(d)** praha

U tablici **(12)** se može vidjeti da proba 10 (30 °C, 17,5 minuta, 45 minuta mirovanja) ima najveću vrijednost Hausner omjera. Najnižu vrijednost ima proba 9 (40 °C, 5 minuta, 15 minuta mirovanja). Sukladno **Tablici 4**, proba broj 10 se može klasificirati kao prah sa vrlo, vrlo lošim svojstvima tecivosti, dok se proba 9 klasificira kao prah s prolaznim svojstva tecivosti. Većina proba iz ovog eksperimenta ima loša ili vrlo loša svojstva tecivosti.

Kao i za Hausner omjer, najvišu vrijednost Carr indeksa ima uzorak 10, a najmanju vrijednost ima uzorak 9, što se može vidjeti u tablici **(12)**.

Iz  $p$ -vrijednosti vidljivih iz tablice **13**. se može zaključiti da niti jedan parametar homogenizacije (temperatura, vrijeme homogenizacije i vrijeme stabilizacije) nemaju statistički značajan utjecaj na gustoću praha prije potresanja, gustoću praha poslije potresanja, Carr indeks i Hausner omjer, što je također vidljivo na slici **18**.

## Numerička optimizacija procesa homogenizacije

Provedena je numerička optimizacija parametara homogenizacije u ispitivanim rasponima s obzirom na odzive udjela vlage u prahu (minimalna vrijednost) i efikasnosti inkapsulacije (maksimalna vrijednosti). Optimizacija je provedena obradom eksperimentalnih podataka u softveru Design Expert v.13 (Stat Ease, Minneapolis, USA), a optimalni uvjeti homogenizacije u ultrazvučnoj kupelji prikazani su u **Tablici 14**.

**Tablica 14** Optimalni uvjeti homogenizacije pojne smjese na ultrazvučnoj kupelji

UVJET HOMOGENIZACIJE	OPTIMALNA VRIJEDNOST
TEMPERATURA (°C)	40
VRIJEME HOMOGENIZACIJE (min)	17,5
VRIJEME STABILIZACIJE (min)	30

Radi verifikacije optimizacije procesa proveden je pokus inkapsulacije sušenjem raspršivanjem uz ultrazvučnu homogenizaciju pojne smjese pri određenim optimalne uvijete (**Tablica 15**). Dobiveni prah je analiziran te su uspoređene procijenjene i eksperimentalno određene vrijednosti svojstava proizvedenog praha (mikrokapsula).

**Tablica 15** Usporedba vrijednosti predviđenih modelom i dobivenih eksperimentalno

PARAMETAR	PROCIJENJENA VRIJEDNOST	ODREĐENA VRIJEDNOST	ODSTUPANJE (%)
$w_v$ (%)	5,97	5,88	1,51
$Y$ (%)	93,77	91,9	1,99
$EE$ (%)	95,17	93,88	1,36
$HR$ (-)	1,49	1,48	0,67
$CI$ (%)	32,91	32,35	1,70
$WSI$ (%)	59,2	55,77	5,79
$WAI$ (-)	10,17	9,32	8,36
$SP$ (-)	24,98	21,06	15,69
$\Delta E_{ab}$ (-)	22,81	22,88	0,31

Usporedbom procijenjenih i eksperimentalno određenih vrijednosti svojstava praha može se uočiti da su odstupanja manja od 10 %, osim za vrijednost bubrenja praha gdje je zabilježeno odstupanje od 15,69 %.

## **5. ZAKLJUČCI**



Nakon provedenog ispitivanja utjecaj parametara homogenizacije u ultrazvučnoj kupelji na uspješnost mikroinkapsulacije ekstrakta tropa grožđa s proteinima kozje sirutke metodom sušenja raspršivanjem, moguće je donijeti sljedeće zaključke:

- primjenom metode odzivni površina i Box-Bhenkhen plana pokusa utvrđeno je da temperatura i vrijeme homogenizacije ultrazvukom te vrijeme stabilizacije nakon homogenizacije imaju statistički značajan utjecaj na indeks adsorpcije vode i sposobnost bubrenja dobivenog praha te na promjenu boje praha u odnosu na čisti omotač (kozju sirutku u prahu)
- inkapsulacija ekstrakta grožđa sušenjem raspršivanjem uz primjenu kozje sirutke kao omotača može se smatrati uspješnom s obzirom na visok prinos (79,97 – 97,36 %) i visok postotak efikasnosti inkapsulacije (88,84 – 95,07 %), bez obzira na primijenjene uvijete homogenizacije
- udio vlage u proizvedenim prahovima kretao se u rasponu 5,90 – 6,06 % te je za pretpostaviti da je to jedan od faktora koji su rezultirali nezadovoljavajućim svojstvom tecivosti (kvazifluidnost) prahova koje je izražena s Hausner omjerom i Carr indeksom
- ukupna promjena boje svakog uzorka praha bila je veća od 20, što znači da je ukupna promjene boja praha vrlo uočljive ljudskim okom u odnosu na kozju sirutku
- optimalni uvjeti homogenizacije pojne smjese u ultrazvučnoj kupelji određeni su numeričkom optimizacijom uz postavljen uvjet postizanja maksimalne inkapsulacijske efikasnosti i minimalnog udjela vlage u prahu, a to su: temperatura homogenizacije 40 °C, vrijeme homogenizacije 17,5 min te 30 min stabilizacije nakon homogenizacije.

## **6. LITERATURA**

1. Abbas S, Hayat K, Karangwa E, Bashari M, and Zhang X : "An Overview of Ultrasound-Assisted Food-Grade Nanoemulsions." *Food Engineering Reviews* 5 (3): 139–57, 2013.
2. Amienyo D., Camilleri C, and Azapagi A: "Environmental Impacts of Consumption of Australian Red Wine in The Uk." In *Toward a Sustainable Wine Industry: Green Enology Research*, 25–51, 2015.
3. Arnous A, and Meyer AS: "Quantitative Prediction of Cell Wall Polysaccharide Composition in Grape (*Vitis Vinifera* L.) and Apple (*Malus Domestica*) Skins from Acid Hydrolysis Monosaccharide Profiles." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (9): 3611–19, 2009.
4. Augustin MA, Sanguansri L, Margetts C, and Young B: "Microencapsulation of Food Ingredients." *Food Australia* 53 (6): 220–23, 2001.
5. Balbinoti TCV, Stafussa AP, Haminiuk CWI, Maciel GM, Sasaki GL, Jorge LMDM, and Jorge RMM: "Addition of Grape Pomace in the Hydration Step of Parboiling Increases the Antioxidant Properties of Rice." *International Journal of Food Science and Technology* 55 (6): 2370–80, 2020.
6. Banožić, M, Vladić J, Banjari I, Velić D, Aladić K, and Jokić S: "Spray Drying as a Method of Choice for Obtaining High Quality Products from Food Wastes– A Review." *Food Reviews International* 39 (4): 1953–85, 2023.
7. Bansal N, and Bhandari B: "Functional Milk Proteins: Production and Utilization-Whey-Based Ingredients." In *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects: Fourth Edition*, 67–98, 2016.
8. Bender ABB, Speroni CS, Salvador PR, Loureiro BB, Lovatto NM, Goulart FR, Lovatto MT, Miranda MZ, Silva LP, Penna NG: " Grape Pomace Skins and the Effects of Its Inclusion in the Technological Properties of Muffins", *Journal of Culinary Science and Technology* 15:143-157, 2017.
9. Barbosa-Canovas GV, Juliano P:" Food powders flowability characterization: Theory, methods, and applications", *Annual Review of Food Science and Technology* 1: 211-239, 2010.
10. Beres C, Costa GNS,. Cabezudo I, da Silva-James NK, Teles ASC, Cruz APG, Mellinger-Silva C, Tonon RV, Cabral LMC, I Freitas SP: "Towards Integral Utilization of Grape Pomace from Winemaking Process: A Review." *Waste Management* 68: 581–94, 2017.
11. Borges LL, Martins FS, Conceição EC, and Silveira D: "Optimization of the Spray-Drying Process for Developing Jabuticaba Waste Powder Employing Response Surface Methodology." *Journal of Food Process Engineering* 40 (1), 2017.
12. Boyano-Orozco L, Gallardo-Velazquez T, Meza-Marquez OG, Osorio-Revilla G: "Microencapsulation of rambutan peel extract by spray drying", *Foods* 9, 2020.
13. Bustamante MA, Moral R, Paredes C , Pérez-Espinosa A, Moreno-Caselles J, i. Pérez-Murcia MD: "Agrochemical Characterisation of the Solid By-Products and Residues from the Winery and Distillery Industry." *Waste Management* 28 (2): 372–80, 2008.
14. Caponio GR, Minervini F, Tamma G, Gambacorta G, i De Angelis M: "Promising Application of Grape Pomace and Its Agri-Food Valorization: Source of Bioactive Molecules with Beneficial Effects." *Sustainability (Switzerland)* 15 (11), 2023.
15. Chen T, Zhang M,. Bhandari B, i Yang Z: "Micronization and Nanosizing of Particles for an Enhanced Quality of Food: A Review." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58 (6): 993–1001, 2018.

16. Chung-Woo L, Hyun-Jung O, Sang-Heon H, Sang-Bin L: "Effects of hot air and freeze drying methods on physicochemical properties of citrus 'hallabong' powders", *Food Science and Biotechnology* 21: 1633-1639
17. Coimbra PPS, Cardoso FDSN, i Gonçalves ECBDA: "Spray-Drying Wall Materials: Relationship with Bioactive Compounds." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 61 (17): 2809–26, 2021.
18. Cruz Pech-Canul A. de la, Ortega D, García-Triana A , González-Silva N, and Solis-Oviedo RL: "A Brief Review of Edible Coating Materials for the Microencapsulation of Probiotics." *Coatings* 10 (3), 2020.
19. Dabić D. Predikcija fizikalno-kemijskih parametara vodenih ekstrakata samoniklog bilja primjenom blisko infracrvene spektroskopije u kombinaciji s kemometrijskim metodama. *Magistarski rad*, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambenobiotehnoški fakultet; 2019.
20. Deng Q, Penner MH, i Zhao Y: "Chemical Composition of Dietary Fiber and Polyphenols of Five Different Varieties of Wine Grape Pomace Skins." *Food Research International* 44 (9): 2712–20, 2011.
21. Díaz-Montes E: "Wall Materials for Encapsulating Bioactive Compounds via Spray-Drying: A Review." *Polymers* 15 (12), 2023.
22. Dickinson E: "Hydrocolloids at Interfaces and the Influence on the Properties of Dispersed Systems." *Food Hydrocolloids* 17 (1): 25–39, 2023.
23. Drusch S.: "Sugar Beet Pectin: A Novel Emulsifying Wall Component for Microencapsulation of Lipophilic Food Ingredients by Spray-Drying." *Food Hydrocolloids* 21 (7): 1223–28, 2007.
24. Eraso MO i Aníbal H: "Use of Starches and Milk Proteins in Microencapsulation." *International Journal of Vegetable Science* 20 (4): 289–304, 2014.
25. Fang Z, i Bhandari B: "Encapsulation of Polyphenols - A Review." *Trends in Food Science and Technology* 21 (10): 510–23, 2010.
26. Flamini R, Mattiv F, De Rosso M, Arapitsas P, and Bavaresco L: "Advanced Knowledge of Three Important Classes of Grape Phenolics: Anthocyanins, Stilbenes and Flavonols." *International Journal of Molecular Sciences* 14 (10): 19651–69, 2013.
27. Fox PF: "Milk: Introduction." In *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition*, 458–66, 2011.
28. Gallo L, Llabot JM, Allemandi D, Bucalá V, Piña J: "Influence of Spray-Drying Operating Conditions on Rhamnus Purshiana (Cáscara Sagrada) Extract Powder Physical Properties." *Powder Technology* 208 (1): 205–14, 2011.
29. García-Lomillo J, González-SanJosé ML, Del Pino-García R, Rivero-Pérez MD, Muñiz-Rodríguez P: "Antioxidant and Antimicrobial Properties of Wine Byproducts and Their Potential Uses in the Food Industry." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (52): 12595–60, 2014.
30. Garrido MD, Auqui M, Martí N, Linares MB: "Effect of Two Different Red Grape Pomace Extracts Obtained under Different Extraction Systems on Meat Quality of Pork Burgers." *LWT* 44 (10): 2238–43, 2011.
31. Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, and Saurel R: "Applications of Spray-Drying in Microencapsulation of Food Ingredients: An Overview." *Food Research International* 40 (9): 1107–21, 2007.

32. González-Manzano S, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C: "Extraction of Flavan-3-Ols from Grape Seed and Skin into Wine Using Simulated Maceration." *Analytica Chimica Acta* 513 (1): 283–89, 2004.
33. Gouin S: "Microencapsulation: Industrial Appraisal of Existing Technologies and Trends." *Trends in Food Science and Technology* 15 (7–8): 330–47, 2004.
34. Huang D, Ou B, Prior RL: "The chemistry behind antioxidant capacity assays", *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005
35. Herceg Z, Režek A: Prehrambena i funkcionalna svojstva koncentrata i izolata proteina
36. sirutke. *Mljekarstvo* 56:379-396, 2006.
37. Huffman LM., De Barros Ferreira L: "Whey-Based Ingredients." In *Dairy Ingredients for Food Processing*, 179–98, 2011.
38. Ignat I, Volf I, Popa VI: "A Critical Review of Methods for Characterisation of Polyphenolic Compounds in Fruits and Vegetables." *Food Chemistry* 126 (4): 1821–35, 2011.
39. Jafari SM, Esfanjani AF: " Instrumental analysis and characterization of nanocapsules", *Instrumental analysis and characterization of nanocapsules*:524-544, 2017.
40. Jambrak AR, Herceg Z, Šubarić D, Babić J, Brnčić M, Brnčić SR, Bosiljkov T, Čvek D, Tripalo B, Gelo J: "Ultrasound Effect on Physical Properties of Corn Starch." *Carbohydrate Polymers* 79 (1): 91–100, 2010.
41. Ji J, Fitzpatrick J, Cronin K, Fenelon MA, Miao S: " The effects of fluidized bed and high shear mixer granulation processes on water adsorption and flow properties of milk protein isolate powder", *Journal of Food Engineering*, 2016.
42. Juliano P, Barbosa-Cánovas GV: "Food powders flowability characterization: Theory, methods, and applications", *Annual Review of Food Science and Technology* 1: 211-239, 2010.
43. Kammerer D, Claus A, Carle R, and Schieber A: "Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis Vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (14): 4360–67, 2004.
44. Kandansamy K, Somasundaram PD: "Microencapsulation of Colors by Spray Drying-A Review." *International Journal of Food Engineering* 8 (2), 2012.
45. Katalinić, V, Možina SS, Skroza D, Generalić I, Abramović H, Miloš M, Ljubenkov I, i sur.,: "Polyphenolic Profile, Antioxidant Properties and Antimicrobial Activity of Grape Skin Extracts of 14 *Vitis Vinifera* Varieties Grown in Dalmatia (Croatia)." *Food Chemistry* 119 (2): 715–23, 2010.
46. Kelly GM, O'Mahony JA, Kelly AL, O'Callaghan DJ: "Effect of hydrolyzed whey protein on surface morphology, water sorption, and glass transition temperature of a model infant jednadžba", *Journal of Dairy Science*, 2016.
47. Kilara A, Vaghela MN: "Whey Proteins." In *Proteins in Food Processing: Second Edition*, 93–126, 2018.
48. Ky I, Lorrain B, Kolbas N, Crozier A, Teissedre PL: "Wine By-Products: Phenolic Characterization and Antioxidant Activity Evaluation of Grapes and Grape Pomaces from Six Different French Grape Varieties." *Molecules* 19 (1): 482–506, 2014.
49. Lacerda ECQ, Calardo VMDA, Monteiro M, Finotelli PV, Torres AG, Perrone D: "Starch, inulin and maltodextrin as encapsulating agents affect the quality and stability of jussara pulp microparticles", *Carbohydrate Polymers* 151:500-510, 2016.

50. Leroux J, Langendorff V, Schick G, Vaishnav V, Mazoyer J: "Emulsion Stabilizing Properties of Pectin." *Food Hydrocolloids* 17 (4): 455–62, 2003.
51. Liu ZQ, Zhou JH, Zeng YL, Ouyang XL: "The Enhancement and Encapsulation of Agaricus Bisporus Flavor." *Journal of Food Engineering* 65 (3): 391–96, 2004.
52. Lukinac Čačić J: "Matematičko modeliranje i optimiranje kinetike promjene boje kruha tijekom pečenja." *Disertacijski rad*. Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. FPrehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2012.
53. Makris DP, Kallithraka D, Kefalas P: "Flavonols in Grapes, Grape Products and Wines: Burden, Profile and Influential Parameters." *Journal of Food Composition and Analysis* 19 (5): 396–404, 2006.
54. Maskat MY, Lung CK, Momeny E, Khan MJ, Siddiqui SA: "Temperature and Feed Rate Effects Properties of Spray Dried Hibiscus Sabdariffa Powder." *International Journal of Drug Development and Research* 6 (4): 28–34, 2014.
55. Mendes JAS, Xavier AMRB, Evtuguin DV, Lopes LPC: "Integrated Utilization of Grape Skins from White Grape Pomaces." *Industrial Crops and Products* 49: 286–91, 2013.
56. Messina CM, Manuguerra S, Catalano G, Arena R, Cocchi M, Morghese M, Montenegro L, Santulli A: "Green Biotechnology for Valorisation of Residual Biomasses in Nutraceutical Sector: Characterization and Extraction of Bioactive Compounds from Grape Pomace and Evaluation of the Protective Effects in Vitro." *Natural Product Research* 35 (2): 331–36, 2021.
57. Mihajlović T, Ibrić S, Mladenović A: "Application of design of experiments and multilayer perceptron neural network in optimization of the spray-drying process", *Drying Technology* 29:1638-1647, 2011.
58. Mihajlovski M. Primjena mikrovalne ekstrakcije za izolaciju bioaktivnih spojeva iz smeđe alge *Dictyota Dichotoma* Var. *Intricate, Magistarski rad*. Split: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet; 2018.
59. Ortega-Rivas E: "Ultrasound in food preservation", *Food Engineering Series*, 251-262, 2012.
60. Peanparkdee M, Iwamoto S, Yamauchi R: "Microencapsulation: A Review of Applications in the Food and Pharmaceutical Industries," 2016.
61. Phisut N: " Spray drying technique of fruit juice powder: some factors influencing the properties of product", *International Food Research Journal*, 2012.
62. Prodanov MP, Domínguez JA, Blázquez J, Salinas MR, Alonso GL: "Some Aspects of the Quantitative/Qualitative Assessment of Commercial Anthocyanin-Rich Extracts." *Food Chemistry* 90 (4): 585–96, 2005.
63. Putnik P, Bursać Kovačević D, Ježek D, Šustić I, Zorić Z, Dragović-Uzelac V: "High-Pressure Recovery of Anthocyanins from Grape Skin Pomace (*Vitis Vinifera* Cv. Teran) at Moderate Temperature." *Journal of Food Processing and Preservation* 42 (1), 2018.
64. Reineccius GA: " The spray drying of food flavors", *Drying Technology* 22,6, 1289-1324, 2004.
65. Selvamuthukumar M: " Handbook on Spray Drying Applications for Food Industries Boca Raton CRC PRESS", 2019
66. Shaikh J, Bhosale R, Singhal R: "Microencapsulation of Black Pepper Oleoresin." *Food Chemistry* 94 (1): 105–10, 2006.
67. Shishir MRI, Chen W: "Trends of Spray Drying: A Critical Review on Drying of Fruit and Vegetable Juices." *Trends in Food Science and Technology* 65: 49–67, 2017

68. Sinija VR, Mishra HN: "Moisture Sorption Isotherms and Heat of Sorption of Instant (Soluble) Green Tea Powder and Green Tea Granules." *Journal of Food Engineering* 86 (4): 494–500, 2008.
69. Soria AC, Villamie M: "Effect of Ultrasound on the Technological Properties and Bioactivity of Food: A Review." *Trends in Food Science and Technology* 21 (7): 323–31, 2010
70. Tolun A, Altintas Z, Artik N: " Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization", *Journal of Biotechnology* 239: 23-33, 2016.
71. Tunick MH: "Whey Protein Production and Utilization: A Brief History." In *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*, 1–13, 2009.
72. Unusan N: "Proanthocyanidins in Grape Seeds: An Updated Review of Their Health Benefits and Potential Uses in the Food Industry." *Journal of Functional Foods* 67, 2020.
73. Vidović SS, Vladić JZ, Vaštag ZG, Zeković ZP, Popović LM: " Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in Satureja montana dry powder extract obtained by spray drying technique", *Powder Technology*, 2014.
74. Wen X, Zhu M, Hu R, Zhao J, Chen Z, Li J , Ni Y: "Characterisation of Seed Oils from Different Grape Cultivars Grown in China." *Journal of Food Science and Technology* 53 (7): 3129–36, 2016.
75. Wu D, Tu M, Wang Z, Wu C, Yu C, Battino M , El-Seedi HR, Du M: "Biological and Conventional Food Processing Modifications on Food Proteins: Structure, Functionality, and Bioactivity." *Biotechnology Advances* 40, 2020.
76. Xu C, Yagiz Y, Marshall S, Li Z, Simonne A, Lu J, Marshall MR: "Application of Muscadine Grape (*Vitis Rotundifolia* Michx.) Pomace Extract to Reduce Carcinogenic Acrylamide." *Food Chemistry* 182: 200–208., 2015.
77. Xu Y, Burton S, Kim C, Sismour E: "Phenolic Compounds, Antioxidant, and Antibacterial Properties of Pomace Extracts from Four Virginia-Grown Grape Varieties." *Food Science and Nutrition* 4 (1): 125–33.. 2016.
78. Yadav JSS, Yan S, Pilli S, Kumar L, Tyagi RD, Surampalli RY: "Cheese Whey: A Potential Resource to Transform into Bioprotein, Functional/Nutritional Proteins and Bioactive Peptides." *Biotechnology Advances* 33 (6): 756–74., 2015.
79. Yousefi S, Emam-Djomeh Z, Mousavi SM: " Effect of carrier type and spray drying on the physicochemical properties of powdered and reconstituted pomegranate juice (*Punica Granatum* L.)", *Journal of Food Science and Technology* 48:677-684, 2011.
80. Yu J, Ahmedna M: "Functional Components of Grape Pomace: Their Composition, Biological Properties and Potential Applications." *International Journal of Food Science and Technology* 48 (2): 221–37., 2013.
81. Zhu F, Cai YZ, Ke J , Corke H: "Evaluation of the Effect of Plant Extracts and Phenolic Compounds on Reduction of Acrylamide in an Asparagine/Glucose Model System by RP-HPLC-DAD." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89 (10): 1674–81., 2009.
82. Zuidam NJ, Nedović VA: *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing, 2010.