

# Utjecaj različitih omotača na učinkovitost enkapsulacije ukupnih fenolnih spojeva iz ekstrakta tropa grožđa sorte cabernet sauvignon

---

Jurić, Tanja

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:109:164561>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-05**

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**

Tanja Jurić

**UTJECAJ RAZLIČITIH OMOTAČA NA UČINKOVITOST ENKAPSULACIJE  
UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA IZ EKSTRAKTA TROPA GROŽĐA SORTE  
CABERNET SAUVIGNON**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, lipanj, 2022.

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

**Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo**

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Jedinичne operacije u procesnom inženjerstvu  
**Tema rada** je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2020./2021. održanoj 24. lipnja 2021.  
**Mentor:** prof. dr. sc. *Ana Bucić-Kojić*  
**Pomoć pri izradi:** *Josipa Martinović, mag. ing.*

**Utjecaj različitih omotača na učinkovitost enkapsulacije ukupnih fenolnih spojeva iz ekstrakta tropa grožđa sorte cabernet sauvignon  
Tanja Jurić, 0113143207**

**Sažetak:**

U radu je ispitan utjecaj otapala (voda i 50%-tna vodena otopina etanola) te omjer kruto-tekuće (0,025-1,667 g/mL) na prinos ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida, ukupnih proantocijanidina i pojedinačnih fenolnih spojeva iz ekstrakta tropa grožđa sorte cabernet sauvignon. Najbolji prinos većine ispitivanih spojeva ostvaren je u etanolnim ekstraktima pri omjeru kruto-tekuće 0,025 g/mL. Nadalje, ispitana je učinkovitost enkapsulacije ovisno o primjeni različitih omotača (natrij alginat, kitozan, arabic guma, maltodekstrin). Enkapsulacija je provedena ionskim geliranjem na uređaju za enkapsulaciju Buchi, B-390. Učinkovitost enkapsulacije izračunata je na osnovi masenog udjela enkapsuliranih i slobodnih ukupnih fenolnih spojeva. Učinkovitost enkapsulacije bila je veća od 50% za sve primijenjene omotače, ali najveća učinkovitost (75,47 %) ostvarena je u slučaju korištenja 0,5%-tnog kitozana u kalcijevom kloridu.

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

**Gljučne riječi:** trop grožđa, fenolni spojevi, ekstrakcija, učinkovitost enkapsulacije, ionsko geliranje

**Rad sadrži:** 44 stranica  
31 slika  
4 tablica  
37 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Datum obrane:** 13. lipnja 2022.

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

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**GRADUATE THESIS**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**Faculty of Food Technology Osijek**  
**Department of Process Engineering**  
**Sub-department of Mechanical, Thermal and Separation Processes**  
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, 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. IX held on June 24, 2021.

**Mentor:** Ana Bucić-Kojić, PhD, full prof.

**Technical assistance:** Josipa Martinović, mag. ing.

**Influence of Different Coatings on the Encapsulation Efficiency of Total Phenolic Compounds from Cabernet Sauvignon Grape Pomace Extract**  
**Tanja Jurić, 0113143207**

**Summary:**

The effect of solvents (water and 50% aqueous ethanol solution) and solid-liquid ratio (0.025-1.667 g/mL) on the yield of total phenolic compounds, total flavonoids, total proanthocyanidins and individual phenolic compounds from grape pomace extract variety Cabernet Sauvignon was examined. The best yield of most of the tested compounds was achieved in ethanol extracts at a solid-liquid ratio of 0.025 g/mL. Furthermore, the encapsulation efficiency depending on the application of different coatings (sodium alginate, chitosan, arabic gum, maltodextrin) was examined. Encapsulation was performed by ionic gelation on a Buchi encapsulation device, B-390. The encapsulation efficiency was calculated based on the mass fraction of encapsulated and free total phenolic compounds. The encapsulation efficiency was greater than 50% for all coatings used, but the highest efficiency (75.47%) was achieved when using 0.5% chitosan in calcium chloride.

*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:** grape pomace, phenolic compounds, extraction, encapsulation efficiency, *ionic gelation*

**Thesis contains:** 44 pages  
31 figures  
4 tables  
37 references

**Original in:** Croatian

**Defense committee:**

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

**Defense date:** 13<sup>th</sup> June 2022

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

*Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Ani Bucić-Kojić na posvećenom vremenu i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se i asistentici Josipi Martinović na pomoći, savjetima i strpljenju prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.*

*Zahvaljujem se roditeljima, sestrama i prijateljima na nesebičnoj podršci i savjetima tijekom mog studiranja. Posebno hvala dragim kolegama Hani Habschied i Matiji Hećimoviću uz koje su dani studiranja bili zabavniji i lakši.*

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. FENOLNE TVARI .....	2
2.2. EKSTRAKCIJA.....	3
2.2.1. Kruto tekuća ekstrakcija.....	3
2.2.2. Prijenos mase u operaciji kruto-tekuća ekstrakcija .....	5
2.3. ENKAPSULACIJA.....	6
2.3.1. Ionsko geliranje.....	6
2.3.2. Omotači za enkapsulaciju .....	7
2.3.3. Alginati .....	8
2.3.2. Kitozan.....	9
2.3.3. Guma arabika .....	10
2.3.4. Maltodekstrin .....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	13
3.1. ZADATAK.....	13
3.2. MATERIJALI I METODE .....	13
3.2.1. Kemikalije .....	13
3.2.2. Priprema ekstrakata.....	14
3.2.3. Enkapsulacija .....	16
3.3. ANALITIČKE METODE .....	17
3.3.1. Određivanje ukupnih fenolnih tvari.....	17
3.3.2. Određivanje ukupnih flavonoida .....	20
3.3.3. Određivanje ukupnih proantocijanidina .....	22
3.3.4. Određivanje pojedinačnih fenolnih spojeva.....	22
3.3.5. Izračun masenog udjela fenolnih tvari.....	23
3.3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom .....	24
3.3.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom.....	25
3.3.8. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom.....	26
3.4. UČINKOVITOST ENKAPSULACIJE.....	27
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	28
5. ZAKLJUČCI.....	40
6. LITERATURA.....	41

## **1. UVOD**

Vinarije svake godine proizvode milijune tona tropa grožđa koji predstavlja proizvodni ostatak, a ne zbrinjava se planski, nego se većinom odlaže u polja i vinograde. Trop se uglavnom sastoji od zaostale kožice grožđa, pulpe i sjemenki te ponekad peteljki, a iz literature je poznato da je bogat bioaktivnim komponentama gdje se posebno ističu fenolni spojevi (Fontana i sur., 2013). Od fenolnih spojeva, u tropu grožđa su zastupljene fenolne kiseline, flavanoli, antocijani, proantocijanidini, flavonoli i stilbeni. Mnoga istraživanja pokazala su da, upravo fenolni spojevi, imaju iznimno veliki utjecaj na ljudsko zdravlje, a antioksidativni, protuupalni, antikancerogeni, antimikrobni utjecaj samo su neki od njih (Mohamed Ahmed i sur., 2020; Beres i sur., 2017). Upravo iz ovih razloga fenolni spojevi se sve više koriste u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji u svrhu proizvodnje visoko vrijednih proizvoda, od dodataka prehrani do lijekova koji se mogu upotrebljavati u razne svrhe poput liječenja te prevencije raznih kožnih bolesti, karcinoma i kardiovaskularnih bolesti (Drosou i sur., 2015; Dordoni i sur., 2021; Manca i sur., 2019). Ekstrakcija fenolnih spojeva je vrlo bitan korak kojim se izoliraju bioaktivne komponente, a značajno ovisi o mnogim procesnim parametrima poput temperature, vremena trajanja ekstrakcije i omjera kruto-tekuće. Optimiranjem navedenih parametara može se poboljšati izolacija bioaktivnih komponenti uz manje ekonomsko-energetske troškove te omogućiti njihovo daljnje korištenje. S obzirom na to da je trop grožđa bogat biološki aktivnim fenolnim spojevima koji su vrlo osjetljivi i skloni razgradnji prilikom izlaganja kisiku, svjetlu i visokoj temperaturi, jedan od načina za očuvanje njihove stabilnosti je enkapsulacija. Prilikom enkapsulacije bioaktivni spojevi se „pakiraju“ u mikro- ili nanokapsule u odabrani omotač. Način enkapsulacije kao i omotač koji se koristi nemože biti primjenjiv za sve aktivne komponente (Ray i sur., 2016). Kao i prilikom ekstrakcije, na učinkovitost enkapsulacije utječu različiti procesni faktori stoga kako bi proces bio najučinkovitiji potrebno je odabrati pogodan način enkapsulacije i omotač.

U ovom radu ispitan je utjecaj primjene različitih omotača na učinkovitost enkapsulacije ekstrakata tropa grožđa koja je provedena metodom ionskog geliranja. Prethodno su određeni optimalni uvjeti ekstrakcije (otapalo i omjer-kruto-tekuće), na osnovi postizanja najboljeg prinosa fenolnih tvari, pri kojima su pripremani ekstrakti za enkapsulaciju ekstrakata tropa grožđa.

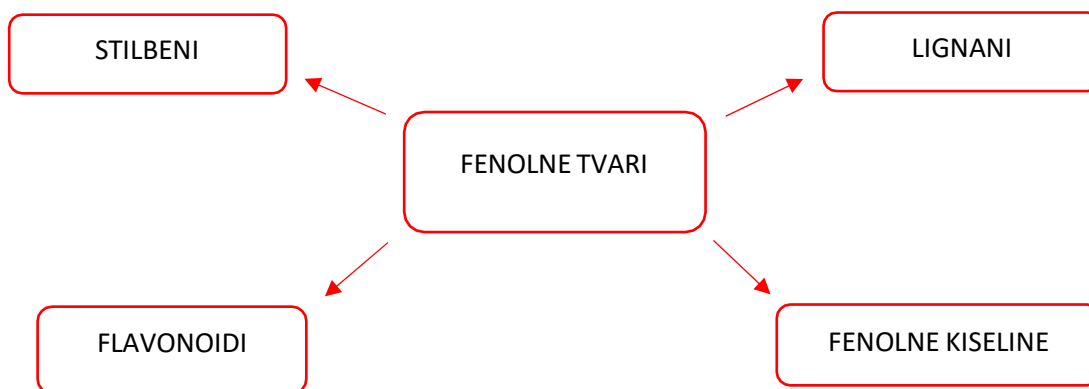


## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. FENOLNE TVARI

Fenolne tvari su spojevi koji u svojoj strukturi sadrže jedan ili više aromatskih prstenova na koje su vezane hidroksilne grupe (Dai i Mumper, 2010). Predstavljaju najraširenije sekundarne metabolite koji nastaju u biljkama tijekom njihovog rasta i razvoja ili kao odgovor na stres kojem su izložene (mikrobne infekcije, ozljede ili UV zračenje). Ovisno o vrsti biljke, uvjetima uzgoja, dozrijevanju, ali i uvjetima procesiranja i skladištenja njihov sadržaj u biljkama može varirati (Grgić i sur., 2020). Dokazano je da fenolne tvari pozitivno utječu kako na ljudski organizam pa tako i na samu biljku. Naime, zbog antioksidativne prirode fenolne tvari mogu djelovati antikancerogeno, protuupalno i antimutageno (Nawaz i sur., 2006). Nadalje, fenolne tvari utječu na organoleptička svojstva hrane - odgovorni su za boju, gorčinu i trpkost voća i voćnih sokova. Također, vrlo su bitni i u proizvodnji vina jer reagiraju s kisikom i utječu na okus i boju vina (Dai i Mumper, 2010).

Fenolne tvari možemo podijeliti u četiri skupine: fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane (**Slika 1**). Flavonoidi koji sadrže 2 aromatska prstena spojena sa 3 ugljikova prstena se mogu podijeliti na: flavonole, flavone, izoflavone, flavanone, antocijanidine i flavanole (Manach i sur., 2004).



**Slika 1** Podjela fenolnih tvari

Važan korak u izolaciji fenolnih tvari je ekstrakcija, no zbog njihove strukturne raznolikosti ne postoji univerzalna metoda ekstrakcije već je potrebno za svaki ekstrakcijski sustav materijal-otapalo odrediti optimalne uvjete ekstrakcije.

## **2.2. EKSTRAKCIJA**

Ekstrakcija je tehnološka operacija kojom se odjeljuju pojedine komponente iz smjese tvari s obzirom na različitu topivosti u nekom otapalu.

S obzirom na agregatno stanje dviju faza razlikujemo:

- ekstrakciju kruto-tekuće
- ekstrakciju tekuće-tekuće.

Ekstrakcija kruto-tekuće je najčešće korištena metoda izolacije fenolnih tvari iz biljnog materijala.

### **2.2.1. Kruto-tekuća ekstrakcija**

Kruto-tekuća ekstrakcija ili ekstrakcija otapalom je operacija prijenosa mase gdje se jedna ili više komponenti izdvaja iz čvrstog materijala (najčešće biljnog podrijetla) pomoću pogodnog otapala. Proces ekstrakcije sastoji se od nekoliko koraka: ulazak otapala u krutu tvar, otapanje komponenti, transport otapala s otopljenom tvari na površinu krute tvari, transport otopine s površine krute tvari u glavnu masu otopine, razdvajanje ekstrakta i krutog ostatka uzorka (Bucić-Kojić, 2008).

Kruto-tekuća ekstrakcija se može provoditi pri sobnoj temperaturi (maceracija, perkolacija) ili pri povišenoj temperaturi (Soxhlet ekstrakcija).

Efikasnost ekstrakcije ovisi o nekoliko faktora:

- vrsti otapala – izbor otapala ovisi o vrsti tvari koja se ekstrahira odnosno o njezinoj polarnosti te vrijedi pravilo „slično se otapa u sličnom“;
- temperaturi ekstrakcije – uslijed povećanja temperature, smanjuje se viskoznost otapala te se povećava brzina prijenosa tvari odnosno brzina ekstrakcije, ali postoje

ograničenja u pogledu povišenja temperature budući da su fenolni spojevi često termolabilni;

- miješanju – povećava se brzina ekstrakcije uslijed povećanja turbulencije i prijenosa tvari; dodatno, miješanjem se ostvaruje homogenost suspenzije materijala i otapala;
- vremenu ekstrakcije – kod kruto-tekuće ekstrakcije uglavnom je brzina ekstrakcije veća na početku procesa, a kasnije se uspostavlja ravnotežno stanje i brzina ekstrakcije opada, no ukoliko je masa tvari iz koje se provodi ekstrakcija veća, potrebno je produljiti vrijeme trajanja ekstrakcije;
- omjeru masa uzoraka : volumen otapalo – potrebno je odabrati odgovarajući omjer kruto-tekuće kako bi se ostvario maksimalan prijenos tvari iz materijala što nije moguće ako je otapalo zasićeno s tvari koja se ekstrahira;
- kemijskim i fizičkim svojstvima uzorka iz kojeg se ekstrahira željena komponenta ili više njih (Dai i Mumper, 2010; Drmić i Jambrak, 2010).

Jedan od najvažnijih koraka ekstrakcije je odabir odgovarajućeg otapala. Bilo da se radi o ekstrakciji iz krute ili tekuće faze, otapalo koje se koristi treba zadovoljiti sljedeće kriterije:

- otapalo ne smije kemijski djelovati na aktivne supstance niti korozivno na uređaj,
- otapalo treba biti selektivno,
- tvar koju ekstrahiramo mora imati što bolju topljivost u otapalu,
- otapalo treba imati nisko vrelište radi lakšeg uklanjanja nakon ekstrakcije,
- otapalo treba imati nisku viskoznost,
- otapalo bi trebalo biti nezapaljivo, netoksično, jeftino i dostupno na tržištu (Bucić-Kojić, 2008).

Otapala koja se najčešće primjenjuju u procesu ekstrakcije su heksan, metanol, etanol, aceton i etil acetat. Mogu se koristiti u koncentriranom obliku, ali i u obliku vodenih otopina različitih koncentracija (Dai i Mumper, 2010). Glavni nedostatak ovih otapala je njihov štetan utjecaj na ljudsko zdravlje i mogućnost njihovog zadržavanja u krajnjem proizvodu. Nadalje, za ekstrakciju vrlo polarnih tvari, poput fenolnih kiselina, preporuča se upotreba smjese alkohola i vode ili acetona i vode jer korištenjem čistih organskih otapala nije moguće u potpunosti ekstrahirati željenu tvar. Kod ekstrakcije nepolarnih spojeva, kao što su voskovi, ulja, steroli i klorofil, koriste se manje polarna otapala kao npr. kloroform, heksan, benzen, diklormetan

(Mojzer i sur., 2016). Nakon završene ekstrakcije otapalo je potrebno separirati primjerice ukloniti destilacijom ili uparavanjem.

### 2.2.2. Prijenos mase u jediničnoj operaciji kruto-tekuća ekstrakcija

Prijenos mase nastaje zbog razlike koncentracije između dvije faze koje su u kontaktu i odvija se u smjeru uspostavljanja ravnoteže. Granični sloj, odnosno sloj zasićene otopine na površini krute tvari, nastaje kada je kruta tvar u kontaktu s otapalom. Koncentracija otopine u tom sloju ima ravnotežnu vrijednost  $c_s$ , a kako ne bi došlo do prestanka otapanja potrebno je otopljenu tvar ukloniti iz graničnog sloja. Otopljena tvar se može ukloniti na dva načina: molekularnom difuzijom i konvekcijom. Difuzija je prijenos tvari u molekularnom razmjeru, a konvekcija je prijenos tvari u molarnom razmjeru gdje se skupine molekula gibaju s mjesta više na mjesto niže koncentracije.

Brzina prijenosa tvari, tj. količina tvari koja u jedinici vremena prolazi kroz granični sloj iz krute tvari u otapalo, proporcionalna je veličini dodirne površine između krute tvari i otapala ( $A$ ), razlici koncentracija u graničnom sloju otopine ( $c_s$ ) i u glavnoj masi otopine ( $c$ ), te se izražava **formulom (1)**:

$$\frac{dw}{dt} = K \cdot A \cdot (c_s - c) \quad (1)$$

gdje je:

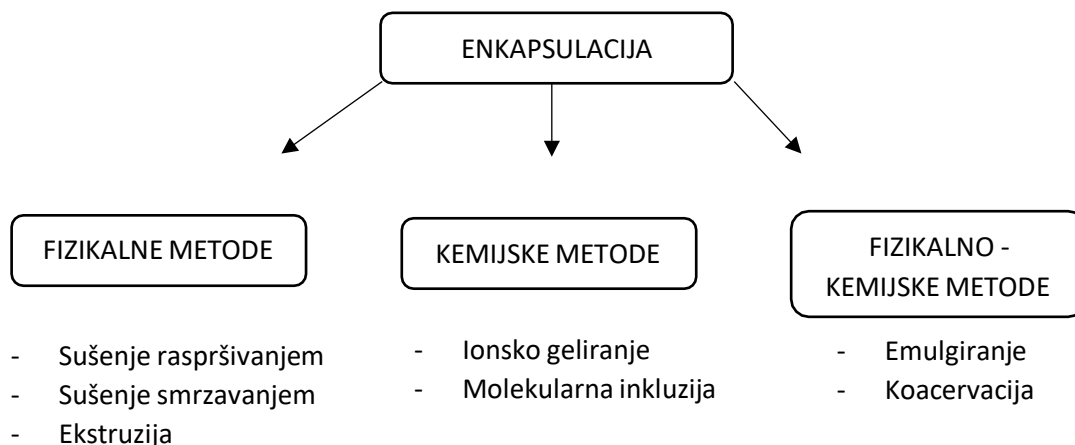
- $w/t$  – brzina prijenosa mase u otapalo [kg/s],
- $A$  – dodirna površina između krute tvari i otapala [ $m^2$ ],
- $c_s$  – masena koncentracija zasićene otopine u graničnom sloju [ $kg/m^3$ ],
- $c$  – masena koncentracija otopine u glavnoj masi otopine [ $kg/m^3$ ],
- $K$  – koeficijent prijenosa mase [m/s] (Tomas i sur., 2013).

## 2.3. ENKAPSULACIJA

Enkapsulacija je proces u kojem se aktivna tvar oblaže omotačem radi zaštite i povećanja stabilnosti. Tvar koja se enkapsulira naziva se još i jezgra, punjenje, aktivna tvar ili unutarnja faza dok se omotač s kojom se enkapsulira naziva membrana, ljuska, matriks, nosač ili kapsula te se uglavnom koriste prirodni ili modificirani polisaharidi, gume, proteini, lipidi ili sintetički polimeri (Saifullah i sur., 2019).

S obzirom na veličinu kapsula enkapsulaciju možemo podijeliti na: makroenkapsulaciju kojom se proizvode kapsule veličine 1 mm – 1 cm, zatim mikroenkapsulaciju gdje je veličina kapsula 1  $\mu\text{m}$  – 1 mm i nanoenkapsulaciju s kapsulama manjima od 1  $\mu\text{m}$  (Cardenas-Ramirez i sur., 2020).

Tehnike enkapsulacije bioaktivnih tvari mogu se podijeliti na fizikalne (sušenje raspršivanjem, sušenje smrzavanjem, ekstruzija), kemijske (ionsko geliranje, molekularna inkluzija) i fizikalno-kemijske (emulgiranje, koacervacija) (**Slika 2**). Izbor odgovarajuće metode enkapsulacije ovisi o vrsti i svojstvima aktivne tvari i omotača, željenoj brzini otpuštanja aktivne tvari, veličini kapsule i njezinoj daljnjoj primjeni (Grgić i sur., 2020; Saifullah i sur., 2019).

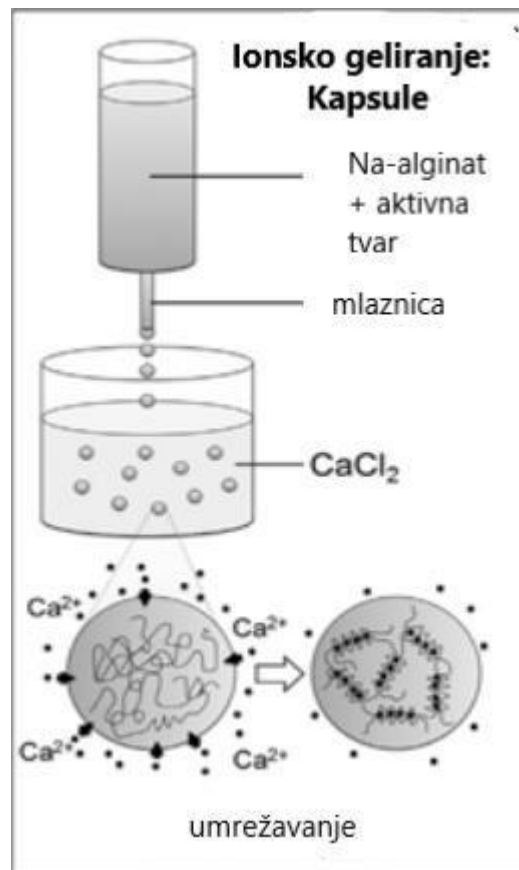


**Slika 2** Osnovna podjela metoda enkapsulacije

### 2.3.1. Ionsko geliranje

Ionsko geliranje je jedna od najjednostavnijih tehnika enkapsulacije gdje se tekuća otopina koja sadrži bioaktivnu tvar i enkapsulirajući materijal odnosno omotač (polimerni materijal) istiskuje kroz mlaznicu pri čemu se stvara kapljica koja u dodiru s gelirajućom otopinom prelazi u kapsulu (**Slika 3**). Kao materijali za enkapsulaciju uglavnom se koriste natrij alginat, hitin,

kitozan i pektin, a kao tvar za umrežavanje kalcijev klorid (Kurozawa i Hubinger, 2017). Veličina kapljice, a time i veličina i oblik kapsule ovisi o vrsti polimera, njegovoj koncentraciji, procesnim parametrima (promjer mlaznice, vibracijska frekvencija, protok, radni tlak, temperatura) i slično. Ovom metodom se uglavnom enkapsuliraju hidrofilne komponente.



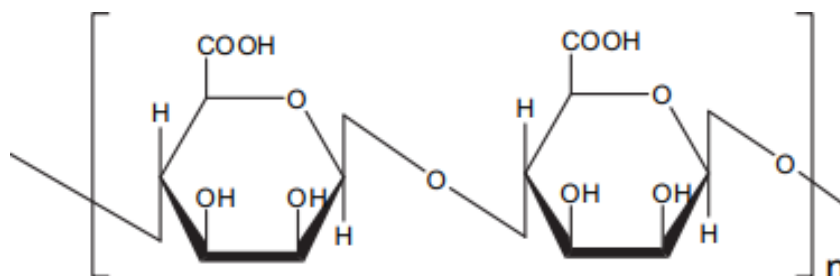
**Slika 3** Prikaz ionskog geliranja (Vemmer i Patel, 2013)

### 2.3.2. Omotači za enkapsulaciju

Na efikasnost enkapsulacije značajno utječe odabir odgovarajućeg omotača. Kriteriji na osnovu kojih se odabire vrsta omotača za enkapsulaciju su: koncentracija i vrsta aktivne tvari koja se želi enkapsulirati, način otpuštanja aktivne tvari, vrsta enkapsulacije i troškovi. Osim što je poželjno da omotači budu prirodnog porijekla, oni trebaju zaštititi enkapsuliranu aktivnu tvar od utjecaja okoline i ne smiju s njom reagirati te tijekom skladištenja enkapsulirana tvar ne smije izgubiti svoju aktivnost. Najčešće korišteni omotači za enkapsulaciju su polisaharidi različitog podrijetla (Nedović i sur., 2011).

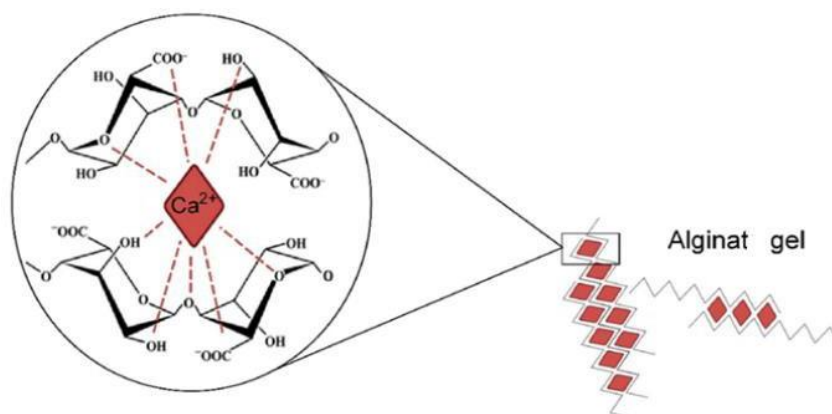
### 2.3.3. Alginati

Alginati su hidrofilni polisaharidi izolirani iz morske smeđe alge koja pripada *Phaeophyta* porodici (Azevedo i sur., 2014). To su linearni polimeri građeni od  $\beta$ -D-manuronske kiseline i  $\alpha$ -L-guluronske kiseline povezane 1 $\rightarrow$ 4 vezom (**Slika 4**).



**Slika 4** Struktura alginata (De Vos i sur., 2010)

Omjer ovih kiselina u polimeru se može mijenjati što utječe na mehaničku stabilnost kapsule. Alginat se može primjenjivati u gotovo svim metodama enkapsulacije, ali najviše se koristi za sušenje raspršivanjem i ionsko geliranje. Topljivost alginata u vodi ovisi o prisutnim dvovalentnim ili trovalentnim kationima, npr. natrij alginat ima dobru topljivost u vodi dok otopina s prisutnim kalcijevim ionima uzrokuje stvaranje gel strukture jer se kalcijevi ioni vežu za karboksilnu skupinu alginata (Azevedo i sur., 2014; De Vos i sur., 2010). Osim kalcijevih kationa, za stvaranje gelova mogu se koristiti i vodene otopine drugih kationa poput  $Mg^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  i  $Al^{3+}$ . Geliranje se može opisati tzv. „egg box“ modelom gdje se dva antiparalelna lanca poliuronata vežu  $Ca^{2+}$  ionima (**Slika 5**).



**Slika 5** „Egg box“ model (Bennacef i sur., 2021)



Faktori koji utječu na geliranje i formiranje kapsula:

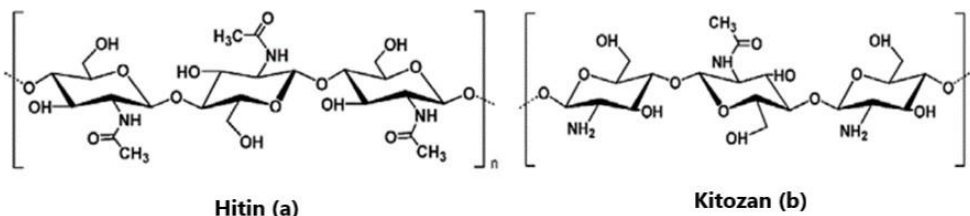
- molekulska masa alginata – alginate velike molekulske mase karakteriziraju dugački polimerni lanci koji omogućavaju veliki broj mjesta za vezanje kalcija, a samim time i jače umrežavanje u gelu što rezultira nastankom gela visoke viskoznosti. Također, povećanjem molekulske mase alginata dolazi do bržeg formiranja gela;
- omjer manuronske i guluronske kiseline – gelovi koji sadrže više manuronske kiseline su mekani i elastični za razliku od gelova s većim sadržajem guluronske kiseline koji su kompaktniji i kruti. Najveće i najčvršće kapsule za enkapsulaciju probiotika se dobiju upotrebom alginata male molekulske mase s većim sadržajem guluronske kiseline;
- koncentracija alginata – veće koncentracije alginata 1% - 4% (w/v) induciraju veću viskoznost, elastičnost i čvrstoću gela. Veće koncentracije povećavaju broj interakcija s kalcijevim ionima i jačaju strukturu gela. Međutim, prevelike koncentracije alginata dovode do slabijeg povezivanja zbog smanjene difuzije kalcijevih iona kroz matriks;
- koncentracija kalcijevih iona – veća koncentracija kalcijevih iona dovodi do jačeg umrežavanja. Zbog brže difuzije kalcijevih iona povećava se viskoznost, stabilnost i elastičnost gela;
- temperatura – visoka temperatura poboljšava i olakšava prodiranje kalcijevih iona kroz alginatnu mrežu, dok niska temperatura usporava difuziju i sam proces geliranja;
- pH – kod visokog pH (pH < 10,5) glikozidne veze alginat gela slabe i pucaju te dolazi do narušavanja strukture. Međutim, gel koji je dobiven pri pH = 3,8 ima gušću strukturu zbog jačih interakcija unutar lanca što uzrokuje skupljanje gela i smanjuje pojavu sinereze (Bennacef i sur., 2021).

Alginati se mogu primjenjivati samostalno ili u kombinaciji s drugim polimerima kao npr. kitozanom (De Vos i sur., 2010).

#### **2.3.4. Kitozan**

Hitin je drugi najrašireniji polisaharid u prirodi nakon celuloze te izgrađuje skelet mnogih beskralješnjaka. On predstavlja izvornu supstancu za dobivanje kitozana. Kitozan (poli [ $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoksi-*D*-glukopiranoza]) je naziv za deacetilirane oblike hitina koji se međusobno razlikuju s obzirom na stupanj deacetilacije te molarnu masu (**Slika 6**). Na

funkcionalna svojstva kitozana utječe duljina polimernog lanca, gustoća i raspodjela naboja. Kitozan s niskim stupnjem deacetilacije (40%) dobro je topljiv u kiselom, neutralnom i alkalnom mediju za razliku od kitozana sa visokim stupnjem deacetilacije (oko 85%) koji je topljiv samo u kiselom mediju ( $\text{pH} < 6,5$ ) (Martinac i Filipović-Grčić, 2002).



**Slika 6** Kemijska struktura hitina i kitozana (Kumar i sur., 2020)

Viskoznost kitozan gela raste povećanjem pH. Uslijed ionizacije amino skupina kitozana pri niskom pH, on postaje topiv u vodi i pozitivno nabijen što omogućuje reakcije kitozana s drugim negativno nabijenim makromolekulama (guma arabika, karboksimetil celuloza, alginat i heparin) pri čemu nastaju složene nanočestice (Rajabi i sur., 2019).

### 2.3.5. Guma arabika

Guma arabika je prirodni eksudat kojeg luči drvo bagrema naročito vrsta *Acacia senegal* (**Slika 7**). Ova vrsta drveta je rasprostranjena u Africi, Australiji, Indiji i Americi.



**Slika 7** Arabic guma (Musa i sur., 2018)

Na kemijski sastav ove gume utječe vrsta i starost drveta, klima, godišnja doba, količina kiše i drugi faktori. Uglavnom se sastoji od galaktoze, arabinoze, ramnoze, glukuronske kiseline i male količine kovalentno vezanog proteina koji joj daje određena funkcionalna svojstva (**Tablica 1**) (Williams i Phillips, 2009).

**Tablica 1** Kemijski sastav *Acacia senegal* i *Acacia seyal* gume

	<i>Acacia senegal</i>	<i>Acacia seyal</i>
% galaktoza	44	38
% arabinoza	27	46
% ramnoza	13	4
% glukuronska kiselina	14,5	6,5
4-O-metil glukuronska kiselina	1,5	5,5
% dušik	0,36	0,15
Prosječna molekularna masa	380	850

Gumu arabiku karakterizira visok stupanj topljivosti u vodi i niska viskoznost u odnosu na druge gume. Ne mijenja boju, okus i miris sustava kojem se dodaje. Također, stvara zaštitni sloj oko aktivne tvari i djeluje kao emulgator za kapljice ulja jer dolazi do adsorpcije komponenti, koje su bogate proteinima, na površinu kapljice. Zahvaljujući odličnim emulgirajućim svojstvima, guma arabika se najviše koristi kod enkapsulacije okusa i bojila. Nadalje, prilikom enkapsulacije praha sprječava karamelizaciju zaostalog šećera prisutnog u ekstraktu (Muhamad i sur., 2018; Williams i Phillips, 2009).

Guma arabika se koristi u mnogim industrijama (tekstilna, prehrambena, kozmetička) kao stabilizator, zgušnjivač, flokulant i emulgator (Musa i sur., 2018). Međutim, glavni nedostatak je njezina visoka cijena i slaba zaštita od oksidacije.

### 2.3.6. Maltodekstrin

Maltodekstrin se dobiva djelomičnom hidrolizom škroba djelovanjem kiselina ili enzima pri čemu je dekstrozni ekvivalent (DE) maltodekstrina manji od 20. DE ukazuje na stupanj hidrolize škroba i značajno utječe na svojstva i zaštitu produkta. Maltodekstrin sa visokom vrijednošću DE ima manju molekularnu masu i bolju topljivost, ali konačan produkt sadrži veću količinu vlage zbog povećanog broja hidrofilnih grupa. Maltodekstrin karakterizira nizak stupanj viskoznosti i dobra topljivost, nema okusa ni mirisa, vrlo lako se probavlja te je dostupan i jeftin. Zbog toplinske stabilnosti često se koristi kao omotač za tvari koje se enkapsuliraju sušenjem raspršivanjem i ekstruzijom. Također, povećava stabilnost enkapsulirane tvari i pruža dobru zaštitu od oksidacije zbog čega se koristi za enkapsulaciju ulja (Grgić i sur., 2020; Mohammed i sur., 2020; Muhamad i sur., 2018). Prilikom enkapsulacije bioaktivnih spojeva, maltodekstrin se može kombinirati sa drugim materijalima (guma, pektin, alginat) kako bi se

smanjila propusnost kisika, poboljšala emulgirajuća svojstva te bolje kontroliralo otpuštanje enkapsulirane tvari (Shishir i sur., 2018)

### **3.EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj različitih omotača (natrij alginat, kitozan, guma arabika, maltodekstrin) na učinkovitost enkapsulacije ukupnih fenolnih spojeva iz ekstrakta tropa grožđa sorte cabernet sauvignon. Enkapsulacija je provedena ionskim geliranjem. Ekstrakt za potrebe enkapsulacije pripreman je pri utvrđenim optimalnim uvjetima kruto-tekuće ekstrakcije određenim na osnovi najvećeg prinosa fenolnih spojeva (ukupnih i individualnih). Optimalni uvjeti ekstrakcije određeni su na osnovi ispitivanja utjecaja otapala (voda i 50%-tna vodena otopina etanola) i različitih omjera kruto-tekuće (6-40 mL/g) na ekstraktibilnost fenolnih spojeva iz tropa grožđa.

### 3.2. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno na tropu grožđa sorte cabernet sauvignon porijeklom iz vinarije Erdut, godina berbe 2018. Uzorci su osušeni na zraku i tako skladišteni do upotrebe. Prije ekstrakcije uzorci su samljeveni na ultracentrifugalnom mlinu (Retsch ZM 200) na veličinu čestica od  $\leq 1$  mm.

#### 3.2.1. Kemikalije

Tijekom provedbe eksperimentalnog dijela rada korištene su sljedeće kemikalije: apsolutni etanol (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska); acetonitril HPLC čistoće (Fisher Chemical, Loughborough, UK); metanol visoke čistoće (J.T. Baker, Arnhem, Nizozemska); ledena octena kiselina (Macron Fine Chemicals, Gliwice, Poljska); DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhidrazil); katehin; epikatehin; gallokatehin galat; epikatehin galat; galna kiselina; elaginska kiselina; siringinska kiselina; *p*-kumarinska kiselina; 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina; *p*-hidroksibenzojeva kiselina, (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) i vanilinska kiselina (Acros Organics, Geel, Belgija); Folin and Ciocalcu's phenol reagens (CPA chem); natrij karbonat, bezvodni p.a. (Kemika); natrij nitrit p.a. (Gram Mol); aluminij klorid heksahidrat, purum p.a. kristaliziran,  $\geq 99,0\%$  (Fluka Analytical); natrij hidroksid p.a. (Gram Mol); željezo (II) sulfat heptahidrat p.a. (Kemika); vodikov klorid ~ 37% (Fischer); 1-butanol, za analizu (Carlo Erba); ABTS (Sigma Aldrich); Trolox 97% (Acros Organics); natrij acetat, bezvodni p.a. (Gram Mol);

natrijev alginat iz smeđih algi, niske viskoznosti (Sigma Aldrich); kitozan, srednje molekulske mase (Sigma Aldrich); guma arabika (Sigma Aldrich); kalcij klorid, bezvodni u prahu p.a. (Gram Mol).

### 3.2.2. Priprema ekstrakata

U prvom dijelu eksperimentalnog rada provedeno je preliminarno istraživanje s ciljem izbora ekstrakcijskog otapala i optimalnog omjera kruto-tekuće odnosno omjera mase uzorka-volumena otapala. Uzorak tropa grožđa ekstrahiran je kruto-tekućom ekstrakcijom u vodenoj kupelji s trešnjom (Julabo SW-23, Njemačka) (**Slika 8**) primjenom dva različita otapala – 50%-tnom vodenom otopinom etanola i destiliranom vodom. U staklene bočice odvagane su različite mase uzorka tropa grožđa (1,5 g; 3 g; 5 g; 6 g; 7,5 g; 10 g) i dodano je 60 ml ekstrakcijskog otapala te je ekstrakcija provedena u vodenoj kupelji s trešnjom (200 rpm) pri temperaturi 80 °C tijekom 120 minuta.



**Slika 8** Vodena kupelj s trešnjom (Julabo SW-23, Njemačka)

Nakon ekstrakcije, suspenzija uzorka i otapala s ekstrahiranom tvari je centrifugirana na centrifugi (Hermle Z 326 K, Njemačka) (**Slika 9**) pri 11 000 x g 10 minuta. Nakon centrifugiranja supernatant (tekući ekstrakt) je odvojen od taloga. U dobivenom tekućem ekstraktu određene su ukupne fenolne tvari, ukupni ekstraktibilni proantocijanidini, ukupni flavonoidi, te antioksidacijska aktivnost.



**Slika 9** Centrifuga (Hermle Z 326 K, Njemačka)

Nakon što su određeni optimalni uvjeti ekstrakcije (50%-tni etanol, omjer kruto-tekuće 0,025 g/mL, temperatura 80 °C, vrijeme 120 min) pri kojima je ostvaren maksimalni prinos fenolnih tvari, dalje su se svi tekući ekstrakti pripremali pri navedenim uvjetima. Za potrebe enkapsulacije tekući ekstrakti su koncentrirani do suhog praha na rotavaporu (Büchi R-210, Švicarska) (Slika 10) pri temperaturi 50 °C i tlaku 48 mbara.



**Slika 10** Rotavapor (Büchi R-210, Švicarska)



### 3.2.3. Enkapsulacija

U Erlenmayerovu čašu odvagano je 0,52 g suhog ekstrakta tropa grožđa i dodano 10,4 mL 30%-tne vodene otopine etanola, a potom i 39,6 ml destilirane vode te je koncentracija ekstrakta iznosila 10,4 mg/mL. Ekstrakt se miješao 1 sat na magnetnoj miješalici nakon čega je centrifugiran pri 11 000 x g 5 minuta. Supernatant je korišten za pripremu 3%-tne otopine natrij alginata (**Slika 11**). Otopina natrij alginata prije enkapsulacije miješana je na magnetnoj miješalici 24 sata kako bi se dobila homogena otopina.



**Slika 11** Natrij alginat iz smeđih algi niske viskoznosti

Prilikom enkapsulacije sa gumom Arabicom (1,6%) i maltodekstrinom (1,2%), ovi omotači miješali su se sa natrij alginatom. Enkapsulacija se provodila na enkapsulatoru Büchi B-390 (**Slika 12**) pri frekvenciji 140 Hz, naponu elektrode 750 V, promjeru mlaznice 300 µm i tlaku 206 mbar. Kao tvar za umrežavanje korištena je 0,25 M otopina CaCl<sub>2</sub>. Nakon enkapsulacije kapsule su filtrirane, a potom dvaput isprane s destiliranom vodom.



**Slika 12** Enkapsulator (Büchi B-390, Švicarska)

Prilikom enkapsulacije sa kitozonom, kao omotač koristio se samo 3%-tni natrij alginat, a u otopinu kalcij klorida dodan je kitozan u tri koncentracije (0,5%; 1%; 1,5%). Najprije je otopljen kalcij klorid u 1%-tnoj octenoj kiselini te je zatim dodan kitozan u određenoj koncentraciji i ostavljen da se miješa na magnetnoj miješalici 30 minuta do sat vremena. Također je napravljen zaseban eksperiment enkapsulacije gdje su alginatne kapsule uranjane u kitozan. Enkapsulacija je napravljena prema prethodno opisanom postupku sa natrij alginatom i kalcij kloridom, a zatim su kapsule profiltrirane i uronjene u 0,5%-tni kitozan i miješane 10 minuta te profiltrirane i isprane destiliranom vodom dva puta.

### 3.3. ANALITIČKE METODE

#### 3.3.1. Određivanje ukupnih fenolnih tvari

Ukupne fenolne tvari u tekućem ekstraktu tropa grožđa određene su Folin-Ciocalteuovom metodom (Waterhouse, 2001) koja pripada skupini kolorimetrijskih metoda. Fenolne tvari prisutne u ekstraktu reagiraju sa Folin-Ciocalteuovim reagensom pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks koji se može kvantificirati spektrofotometrom pri vidljivom svjetlosnom zračenju. Metoda se temelji na oksidaciji fenolnih spojeva i redukciji Folin-Ciocalteuova reagensa (smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline) u volfram i molibden oksid u alkalnoj sredini (Pavel i sur., 2006) .

##### *Izrada kalibracijske krivulje*

Galna kiselina korištena je kao standard za izradu kalibracijske krivulje. Pripremljene su dvije kalibracijske krivulje, jedna za galnu kiselinu otoplenu u 50%-tnoj vodenoj otopini etanola (**Tablica 2, Slika 14**), a druga za galnu kiselinu otoplenu u destiliranoj vodi (**Tablica 3, Slika 15**). Otopine galne kiseline pripremljene su u rasponu koncentracija 0,05-1 mg/mL te su korištene kao uzorci u protokolu za određivanje ukupnih fenolnih tvari. Apsorbancije su izmjerene na spektrofotometru (Shimadzu UV-1280, Japan) (**Slika 13**) pri valnoj duljini 765 nm za pripadajuće koncentracije iz kojih su izrađene krivulje ovisnosti vrijednosti apsorbancija o koncentraciji galne kiseline (kalibracijska krivulja).



**Slika 13** Spektrofotometar (Shimadzu UV-1280, Japan)

**Tablica 2** Vrijednosti apsorbancija za pripadajuće koncentracije galne kiseline (GAE) otopljene u 50%-tnom etanolu

$c_{\text{GAE}}[\text{mg/mL}]$	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,5	0,75	1
$A_{765\text{nm}}$	0,057	0,116	0,152	0,231	0,268	0,530	0,805	1,023

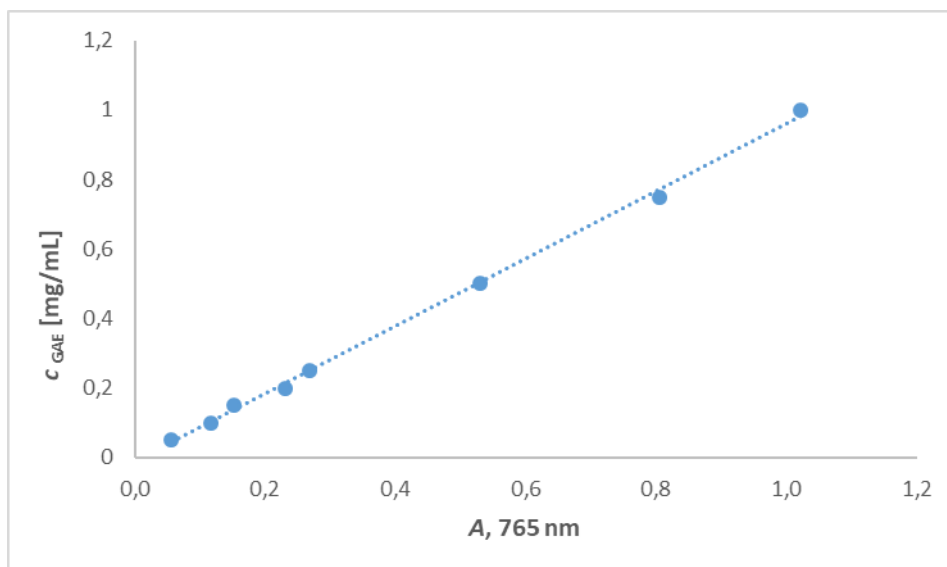
Metodom linearne regresije dobivena je **jednadžba (2)**:

$$y = 0,9705x - 0,011 \quad (2)$$

odnosno:

$$c \text{ (ukupne fenolne tvari)} = 0,9705 \cdot A - 0,011 \quad (3)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima [mg/mL].



**Slika 14** Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih fenolnih tvari koristeći 50%-tni etanol kao otapalo

**Tablica 3** Vrijednosti apsorbanca za pripadajuće koncentracije galne kiseline (GAE) otopljene u vodi

$c_{\text{GAE}} [\text{mg/mL}]$	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,5	0,75	1
$A_{765\text{nm}}$	0,054	0,124	0,170	0,220	0,280	0,519	0,783	1,065

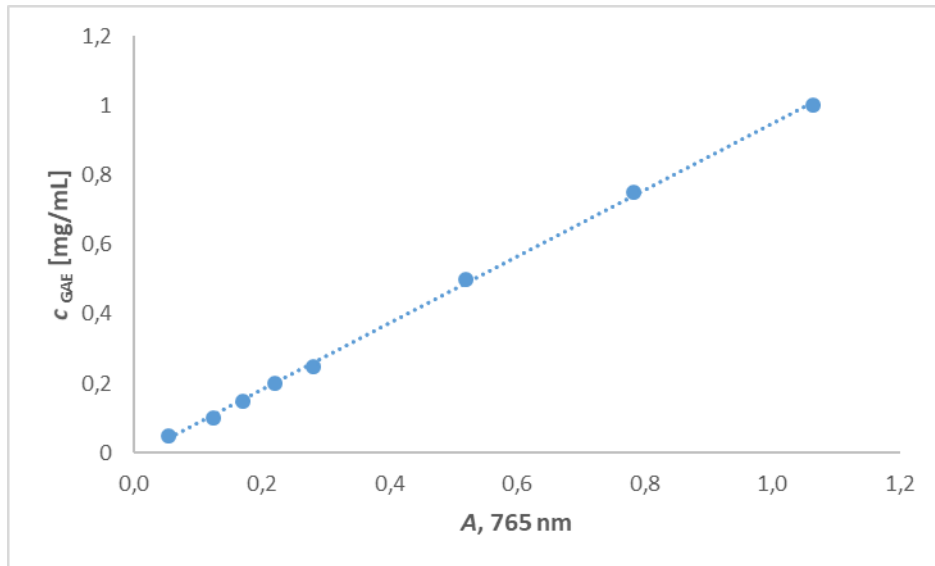
Metodom linearne regresije dobivena je **jednadžba (4)**:

$$y = 0,9575x - 0,0098 \quad (4)$$

odnosno:

$$c \text{ (ukupne fenolne tvari)} = 0,9575 \cdot A - 0,0098 \quad (5)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima [mg/mL].



**Slika 15** Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih fenolnih tvari koristeći vodu kao otapalo

#### *Postupak*

U epruvetu je otpipetirano 40  $\mu\text{L}$  ekstrakta tropa grožđa, 3160  $\mu\text{L}$  destilirane vode i 200  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon stajanja između 30 sekundi i 8 minuta dodano je 600  $\mu\text{L}$  20 %-tne vodene otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Slijepa proba je pripremljena na isti način, ali umjesto ekstrakta dodano je 40  $\mu\text{L}$  ekstrakcijskog otapala. Uzorci su pomiješani na vorteksu i ostavljeni u vodenoj kupelji 30 min na 40 °C kako bi se razvilo plavo obojenje. Apsorbancija je mjerena na UV/VIS spektrofotometru na 765 nm, a sva mjerenja su provedena u tri ponavljanja.

### **3.3.2. Određivanje ukupnih flavonoida**

Ukupni flavonoidi određeni su spektrofotometrijskom metodom uz pomoć aluminijevog klorida prema Marinova i sur. (2005).

#### *Izrada kalibracijske krivulje*

(+)-katehin je korišten kao standard za izradu kalibracijske krivulje. Otopine (+)-katehina pripremljene su u rasponu koncentracija 0,02 - 0,2 mg/mL (**Tablica 4**) te su korištene kao uzorci u protokolu za određivanje ukupnih flavonoida. Apsorbancije su izmjerene na spektrofotometru pri valnoj duljini 510 nm za pripadajuće koncentracije iz kojih su izrađene

krivulje ovisnosti vrijednosti apsorbancija o koncentraciji katehina (kalibracijska krivulja) (**Slika 16**).

**Tablica 4** Vrijednosti apsorbancija za odgovarajuće koncentracije (+)-katehina

$c_{CE}$ [mg/mL]	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,2
$A_{510nm}$	0,048	0,107	0,168	0,223	0,285	0,598

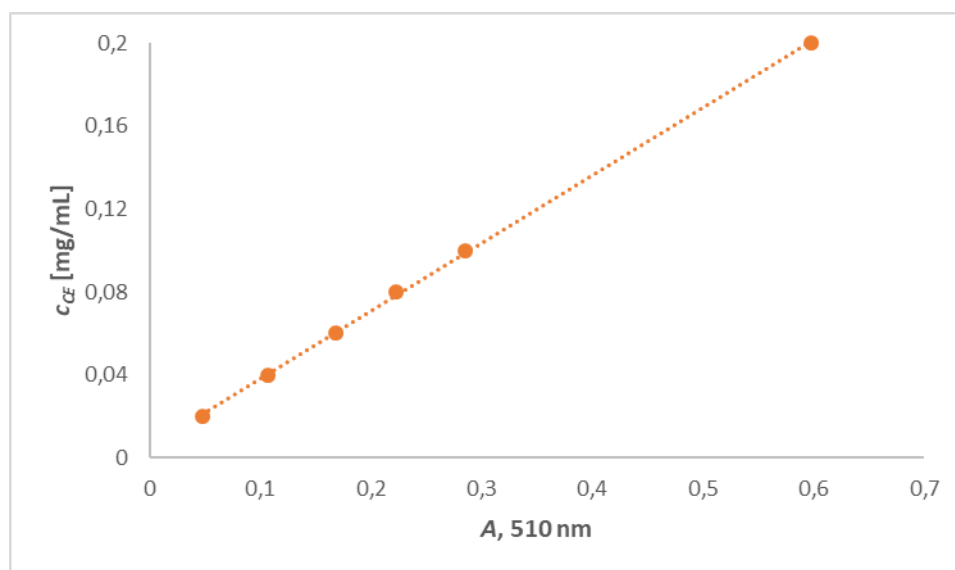
Metodom linearne regresije dobivena je **jednadžba (6)**:

$$y = 0,3267x + 0,0056 \quad (6)$$

odnosno:

$$c (\text{flavonoidi}) = 0,3267 \cdot A + 0,0056 \quad (7)$$

koja je dalje korištena za izračunavanje masene koncentracije ukupnih flavonoida u ekstraktima [mg/mL].



**Slika 16** Kalibracijska krivulja za određivanje flavonoida

### Postupak

U 2 mL destilirane vode dodano je 0,5 mL tekućeg ekstrakta tropa grožđa, a zatim 0,15 mL 5%-tnog natrijevog nitrita. Nakon 5 minuta dodano 0,15 mL 10%-tne vodene otopine aluminij (III) klorida heksahidrata, a nakon 5-8 minuta dodan je 1 mL 1 M natrijevog hidroksida. U

reakcijsku smjesu je zatim dodano 1,2 mL destilirane vode kako bi ukupni volumen bio 5 mL. Slijepa proba je pripremljena na isti način, ali umjesto ekstrakta dodan je jednak volumen destilirane vode. Svi uzorci su promiješani na vorteksu i izmjerena je apsorbancija ekstrakata na valnoj duljini 510 nm. Analize su provedene u tri ponavljanja.

### 3.3.3. Određivanje ukupnih proantocijanidina

Ova metoda se temelji na depolimeriziranju proantocijanidina u butanolu i kiselom mediju (Bucić-Kojić, 2008).

#### *Postupak*

U 500  $\mu$ L ekstrakta tropa grožđa dodano je 5 mL otopine željezo (II)-sulfata heptahidrata te su uzorci inkubirani na 95 °C 15 minuta. Slijepa proba pripremljena je na isti način, ali je umjesto uzorka dodana destilirana voda. Apsorbancija je izmjerena na valnoj duljini od 540 nm i masena koncentracija ukupnih proantocijanidina (UPA) izračunata je prema **formuli (8)**:

$$c_{UPA}[g/L] = \frac{A \cdot M \cdot DF}{\varepsilon \cdot l} \quad (8)$$

gdje je:

- $A$  – apsorbancija [nm],
- $M$  – molarna masa cijanidina, 287 g/mol,
- $DF$  – faktor razrjeđenja, odnosno omjer ukupnog volumena reakcijske smjese za određivanje UPA (5,5 mL) i volumena ekstrakta (2 mL);  $DF = 11$ ,
- $\varepsilon$  - koeficijent molarne ekstinkcije cijanidina, 34700 L/mol cm,
- $l$  – duljina optičkog puta, 1 cm.

### 3.3.4. Određivanje pojedinačnih fenolnih spojeva

Nakon provođenja ekstrakcije, tekući ekstrakti su pripremljeni za analiziranje pojedinačnih fenolnih spojeva na UHPLC-u (Nexera XR, Shimadzu, Japan) (**Slika 17**) uz korištenje PDA detektora pri valnim duljinama od 190 do 350 nm i reverzno-fazne kolone Kinetex<sup>®</sup>C18 (100  $\times$  4,6 mm, 2,6  $\mu$ m; Phenomenex) za razdvajanje fenolnih spojeva. Ekstrakti su profiltrirani na mikrofilteru veličine pora 45  $\mu$ m u vijalice iz kojih je zatim tekući ekstrakt uzorkovan prilikom

analize na UHPLC-u prema prethodno objavljenoj metodi (Bucić-Kojić i sur., 2017). Kao mobilne faze korištene su acetonitril:metanol (1:1) i 1%-tna vodena otopina ledene octene kiseline. Na osnovi usporedbe retencijskih vremena fenolnih spojeva u uzorcima i retencijskih vremena pojedinih standarda identificirani su pojedinačni fenolni spojevi, a njihove masene koncentracije određene su pomoću kalibracijskih krivulja za pojedine spojeve te su krajnji rezultati izraženi u mg/g<sub>s.tv.</sub> prema **formuli 9**. Prikupljeni podaci su analizirani u programu Lab-Solutions (verzija 5.71 SP2).



**Slika 17** UHPLC Nexera XR, Shimadzu, Japan

### 3.3.5. Izračun masenog udjela fenolnih tvari

Prema jednadžbama 3, 5, 7 i 8 izračunate su masene koncentracije ukupnih fenolnih tvari [mg<sub>GAE</sub>/mL], ukupnih flavonoida [mg<sub>CE</sub>/mL], te ukupnih proantocijanidina [mg/mL]. Maseni udjeli navedenih fenolnih spojeva te pojedinačnih fenolnih spojeva preračunati su na suhu tvar uzorka prema **formuli (9)**:

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

gdje je:



- $C$  – maseni udio fenolnih tvari [mg/g<sub>s.t.</sub>]
- $c$  – masena koncentracija uzorka [mg/mL]
- $V$  – volumen otapala [mL]
- $m_{uz}$  – masa uzorka korištenog za ekstrakciju [g]
- $w_{s.t.}$  – udio suhe tvari [%].

### 3.3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

DPPH metoda temelji se na redukciji 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala koji je otopljen u alkoholnoj otopini. U reakcijskoj smjesi, antioksidans iz ekstrakta (fenolne tvari) donira atom vodika i veže se na DPPH radikal te prilikom redukcije ovog radikala otopina mijenja boju iz ljubičaste u žutu zbog smanjenja koncentracije zaostalog slobodnog DPPH radikala.

#### Postupak

Najprije je pripremljena alkoholna (etanolna) otopina DPPH u koncentraciji 0,026 mg/mL kojoj je izmjerena apsorbanacija na 515 nm. Zatim je u 100 μL uzorka dodano 3,9 mL otopine DPPH te je reakcijska smjesa ostavljena na tamnom mjestu. Nakon 30 minuta očitana je apsorbanacija. Kao slijepa proba korišten je etanol.

Inhibicija (%) DPPH izračunata je prema **jednadžbi (10)** :

$$\% \text{ inhibicije DPPH} = \left[ \frac{A_{DPPH} - A_{UZ}}{A_{DPPH}} \right] \times 100 \quad (10)$$

gdje je:

- $A_{DPPH}$  – apsorbanacija pripremljene otopine DPPH
- $A_{UZ}$  – apsorbanacija reakcijske smjese uzorka i otopine DPPH

Zbog bolje usporedivosti rezultata postotak inhibiranog DPPH· radikala preračunat je na ekvivalente troloxa koji je snažan antioksidans ( $g_{TROLOX/L}$ ) prema **jednadžbi 11** i zatim izražen u ekvivalentima troloxa po masi suhe tvari tropa grožđa ( $mg_{TROLOXA/g_{s.tv.}}$ ) prema **jednadžbi (9)**.

$$c [g_{trolox/L}] = 0,0036x + 0,0032 \quad (11)$$

Za svaki ekstrakt antioksidacijska aktivnost je određena u tri paralelna ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti određivanja.

### 3.3.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom

ABTS temelji se na sposobnosti antioksidansa da reduciraju ABTS radikalski kation što se očituje u obezbojenju zelene boje kationa (Re i sur., 1999).

#### *Postupak*

ABTS radikalski kation pripremljen je miješanjem jednakog volumena amonij persulfata i ABTS-a te je smjesa ostavljena u tamnom minimalno 16 sati, a zatim je na dan analize pripremljena svježa razrijeđena otopina na način da je 1 mL radikalskog kationa pomiješan sa 40 mL etanola. Nakon toga izmjerena je apsorbancija na 734 nm koja treba iznositi oko 0,706. Zatim je u 50 µL uzorka dodano 950 µL razrijeđenog ABTS radikala. Apsorbancija je izmjerena nakon 10 minuta inkubacije na tamnom mjestu. Kontrolni uzorak pripremljen je na isti način, ali je umjesto uzorka korišten etanol. Kao slijepa proba korišten je etanol. Sva mjerenja napravljena su u tri paralele.

Inhibicija (%) ABTS-a računala se prema **jednadžbi (12)**:

$$\% \text{ inhibicije ABTS} = \left[ \frac{A_K - A_{UZ}}{A_K} \right] \times 1000 \quad (12)$$

gdje je:

- $A_K$  – apsorbancija kontrolnog uzorka
- $A_{UZ}$  – apsorbancija uzorka

Zbog reprezentativnijeg uspoređivanja rezultata postotak inhibiranog ABTS-a preračunat je u ekvivalente troloxa ( $g_{\text{TROLOX}}/L$ ) prema **jednadžbi 13** i zatim izražen u ekvivalentima troloxa po masi suhe tvari tropa grožđa ( $mg_{\text{TROLOXA}}/g_{\text{s.tv.}}$ ) prema **jednadžbi (9)**.

$$c [g_{\text{trolox}}/L] = 0,003x - 0,0037 \quad (13)$$

### 3.3.8. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

FRAP metoda temelji se na redukciji iona željeza u prisustvu antioksidansa te se formira tamnoplavi kompleks čija se apsorbancija mjeri na 592 nm (Jolić, 2017).

#### *Postupak*

FRAP reagens je pripremljen miješanjem 25 mL 300 mM acetatnog pufera zagrijanog na 37 °C sa 2,5 mL 10 mM otopine TPTZ-a (2,4,6-tripiridil-s-triazin) i 2,7 mL željezova klorida heksahidrata. U 150 µL uzorka dodano je 270 µL destilirane vode i 2,7 mL svježe pripremljenog FRAP reagensa. Za pripremu slijepe probe umjesto uzorka dodana je destilirana voda. Apsorbancija je izmjerena nakon 40 minuta inkubacije na 37 °C. Mjerenja su napravljena u tri paralele.

Antioksidacijska aktivnost prema FRAP metodi računala se prema regresijskoj **jednadžbi 14** za uzorke ekstrahirane u 50%-tnom etanolu, a prema **jednadžbi 15** za uzorke ekstrahirane u vodi.

$$y = 967,18x - 0,731 \quad [\mu\text{mol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} / \text{L}] \quad (14)$$

$$y = 973,45x - 39,725 \quad [\mu\text{mol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} / \text{L}] \quad (15)$$

Kako bi se rezultati triju korištenih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti mogli usporediti potrebno je rezultate preračunati u  $\text{g}_{\text{TROLOX}}/\text{L}$  prema **jednadžbi 16** za uzorke ekstrahirane u 50%-tnom etanolu i **jednadžbi 17** za one ekstrahirane u vodi. Potom su dobiveni rezultati izražen u ekvivalentima troloxa po masi suhe tvari tropa grožđa ( $\text{mg}_{\text{TROLOXA}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ ) (**jednadžba 9**).

$$c [\text{g}_{\text{trolox}}/\text{L}] = 0,142x - 0,0002 \quad (16)$$

$$c [\text{g}_{\text{trolox}}/\text{L}] = 0,243x - 0,0099 \quad (17)$$

### 3.4. UČINKOVITOST ENKAPSULACIJE

Učinkovitost enkapsulacije (EE) određena je na temelju masenog udjela slobodnih i vezanih fenolnih spojeva u kapsulama. Pod slobodnim fenolnim spojevima podrazumijevaju se fenolni spojevi koji su zaostali u otopini  $\text{CaCl}_2$  nakon stvrdnjavanja kapsula te oni koji su se isprali sa površine kapsula tijekom ispiranja s destiliranom vodom.

Učinkovitost enkapsulacije izračunata je prema **jednadžbi (18)**:

$$EE, \% = \frac{m_{TPC}(\text{ekstrakt}) - m_{TPC}(\text{CaCl}_2)}{m_{TPC}(\text{ekstrakt})} \cdot 100 \quad (18)$$

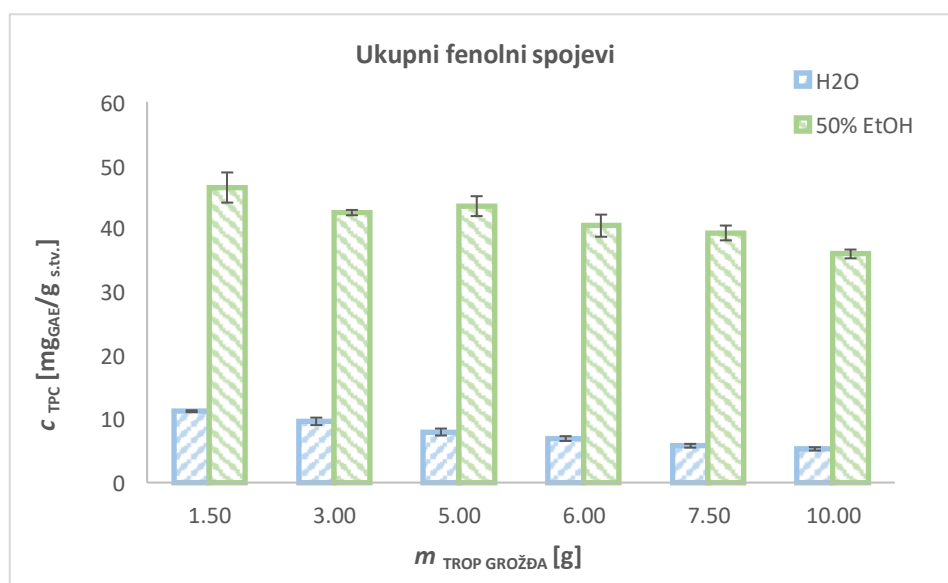
gdje je:

- $m_{TPC}(\text{ekstrakt})$  – masena koncentracija ukupnih fenolnih tvari u ekstraktu koji je enkapsuliran [mg/g<sub>s.t.</sub>]
- $m_{TPC}(\text{CaCl}_2)$  – masena koncentracija ukupnih fenolnih tvari u kalcij kloridu nakon enkapsulacije [mg/g<sub>s.t.</sub>]

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

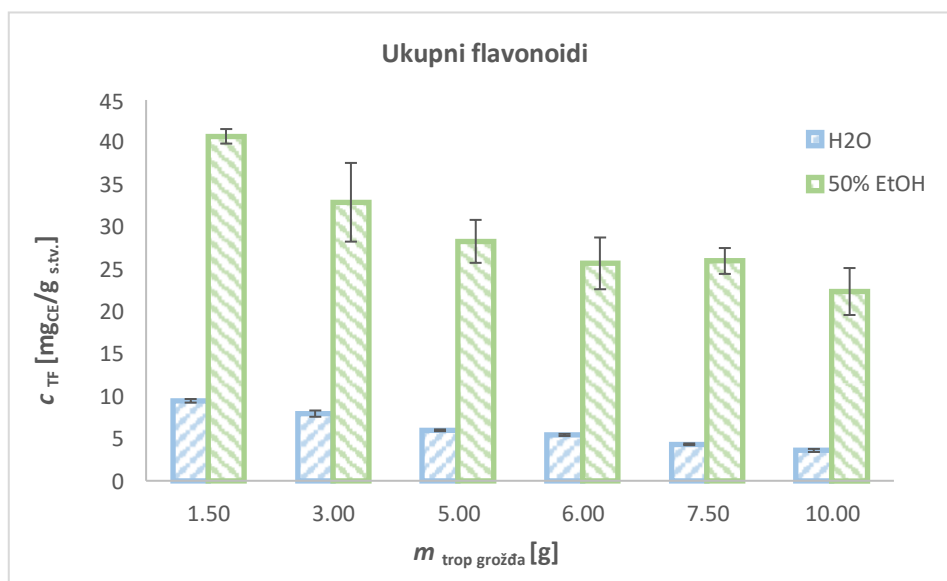
Svi dobiveni rezultati prikazani su u tablicama i dijagramima. Eksperimentalni dio rada proveden je u dva dijela.

U prvom dijelu eksperimentalnog rada provedena su istraživanja u cilju utvrđivanja optimalnog omjera kruto-tekuće (masa tropa grožđa i volumen otapala) za postizanje maksimalnog prinosa fenolnih tvari. Korišten je uvijek isti volumen otapala (60 mL), a mijenjana je masa tropa grožđa (1,5 g; 3 g; 5 g; 6 g; 7,5 g i 10 g). Provedena su dva seta eksperimenata, jedan s vodom i drugi s 50%-tnim etanolom pri uvjetima ekstrakcije (temperatura 80 °C, broj okretaja tresilice 200 rpm i vrijeme ekstrakcije 120 minuta) koji su optimirani u ranijim istraživanjima. Na osnovu dobivenih podataka, najveći prinos ukupnih fenolnih spojeva, flavonoida i proantocijanidina dobiven je koristeći 1,5 g uzorka za oba korištena otapala. Najveći prinos ukupnih fenolnih spojeva (46,49 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>s.tv.</sub>) ostvaren je u slučaju primjene 50%-tnog etanola dok je uz primjenu vode kao otapala ostvaren 4 puta manji prinos ukupnih polifenola (11,26 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>s.tv.</sub>) (Slika 18).

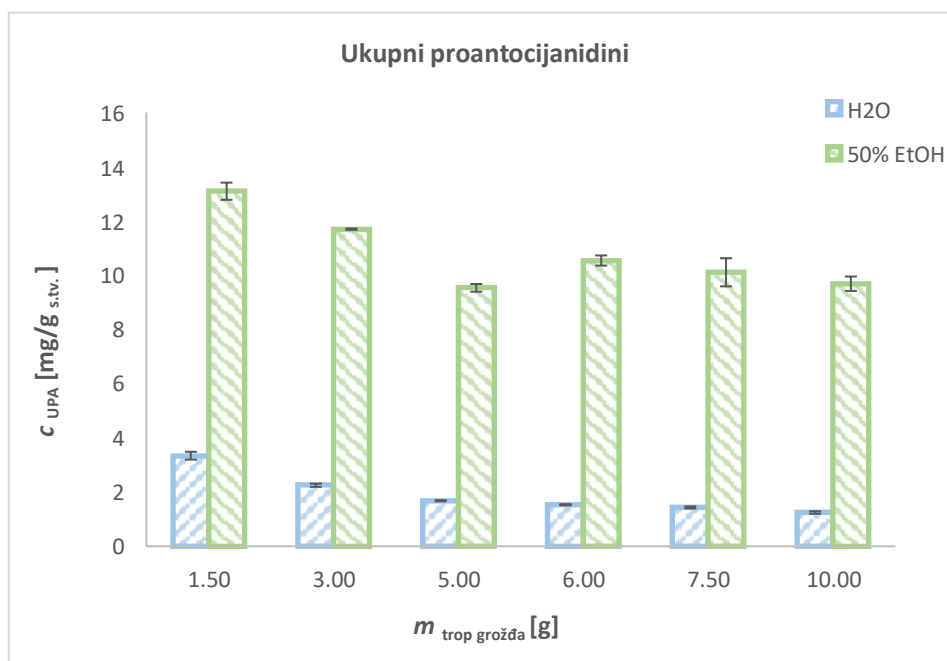


**Slika 18** Ovisnost masenog udjela ukupnih fenolnih spojeva ( $C_{\text{TPC}}$ ) o masi tropa grožđa ( $m$ ) u volumenu otapala 60 mL

Isti trend slijede i flavonoidi (Slika 19) gdje je korištenjem 50%-tnog etanola najviši maseni udio ukupnih flavonoida iznosio 40,71 mg<sub>CE</sub>/g<sub>s.tv.</sub> (pri masi uzorka 1,5 g), a 9,46 mg<sub>CE</sub>/g<sub>s.tv.</sub> za istu masu uzorka ekstrahiranog s vodom.



**Slika 19** Ovisnost masenog udjela ukupnih flavonoida ( $C_{\text{TF}}$ ) o masi tropa grožđa ( $m$ ) u volumenu otapala 60 mL



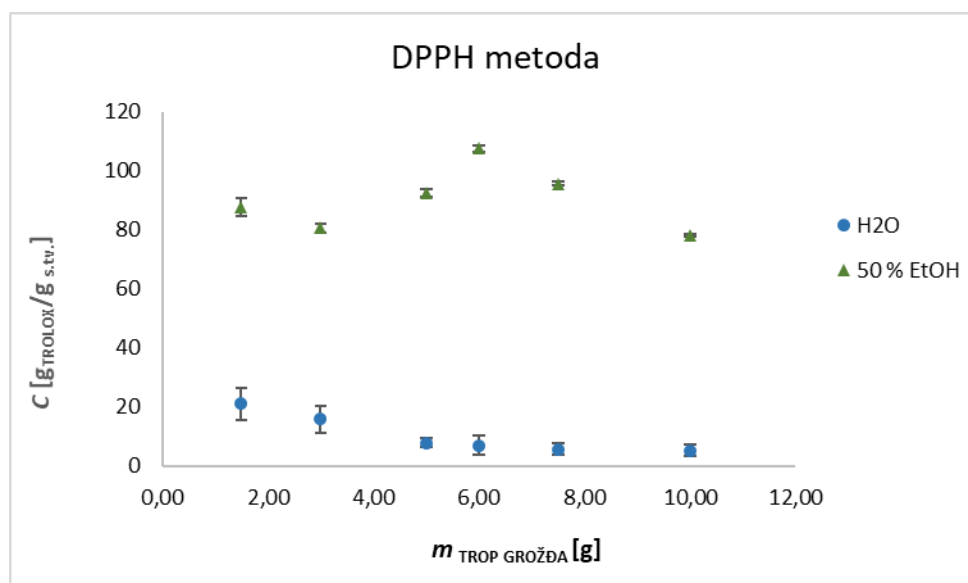
**Slika 20** Ovisnost masenog udjela ukupnih proantocijanidina ( $C_{\text{UPA}}$ ) o masi tropa grožđa ( $m$ ) u volumenu otapala 60 mL

**Slika 20** pokazuje ovisnost masenog udjela ukupnih proantocijanidina o masi uzorka i korištenom otapalu. Vidljivo je da maseni udjeli proantocijanidina u uzorcima ekstrahiranim

sa vodom slijede isti trend kao i kod ukupnih fenolnih tvari i flavonoida, dok kod uzoraka ekstrahiranim etanolom to nije slučaj. Naime, kod uzoraka ekstrahiranim sa etanolom postoje oscilacije u rastu i padu masenog udjela proantocijanidina, iako je najveći prinos ( $13,09 \text{ mg}_{\text{UPA}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ ) ostvaren kada je korištena masa tropa grožđa 1,5 g i 50%-tni etanol kao otapalo kao i kod ukupnih flavonoida te ukupnih fenolnih spojeva.

Nakon određivanja ekstraktibilnosti ukupnih fenolnih spojeva, proantocijanidina i flavonoida izmjerena je i antioksidacijska aktivnost prema tri spektrofotometrijske metode DPPH, ABTS i FRAP koja je zbog bolje usporedivosti rezultata izrađena u ekvivalentima troloxa na masu suhe tvari ( $\text{g}_{\text{TROLOX}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ ). U ekstraktima dobivenim ekstrakcijom pomoću vode, antioksidacijska aktivnost ekstrakta određena pomoću sve tri metode slijedi isti trend, odnosno antioksidacijska aktivnost opada povećanjem mase uzorka dok kod ekstrakata dobivenih pomoću 50 %-tne vodene otopine etanola to nije bio slučaj (**Slika 21, 22, 23**).

**Slika 21** pokazuje da je najviša antioksidacijska aktivnost ( $107,64 \text{ g}_{\text{TROLOX}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ ) određena DPPH metodom postignuta pri omjeru 6 g uzorka : 60 mL 50%-tnog etanola.

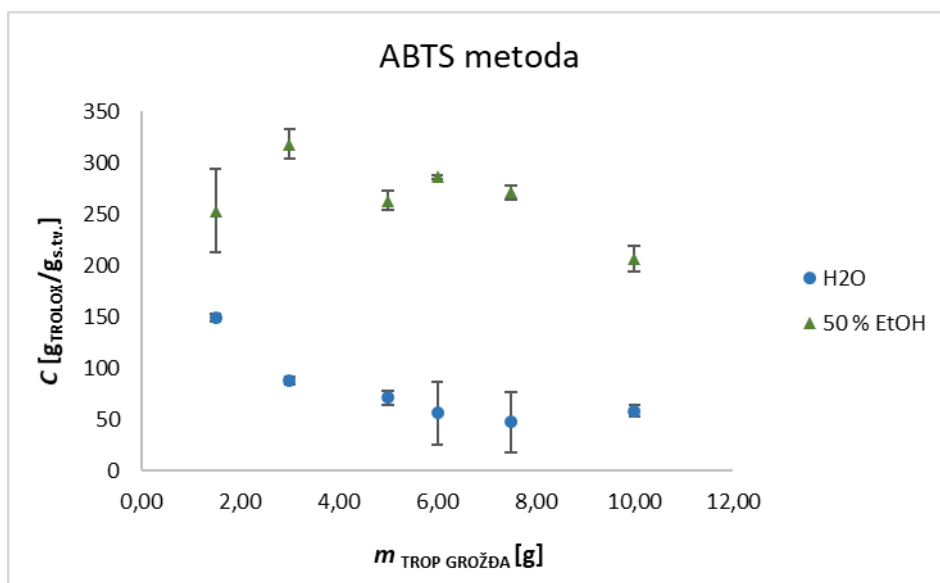


**Slika 21** Ovisnost antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom o masi korištenog tropa grožđa pri ekstrakciji fenolnih spojeva pomoću vode i 50%-tnog etanola

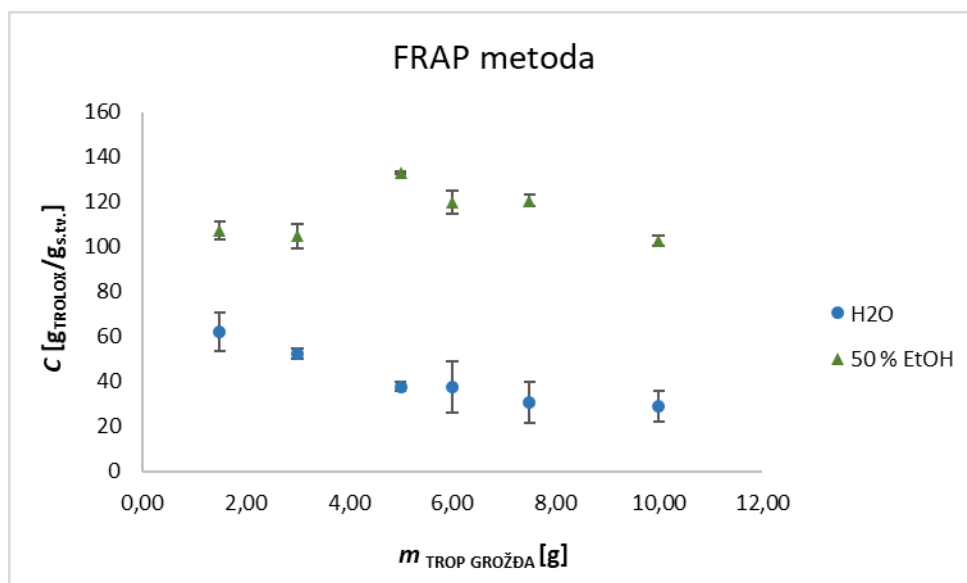
Zatim na **Slici 22** je vidljivo da najveću antioksidacijsku aktivnost određenu ABTS metodom ima uzorak za čiju se ekstrakciju koristila masa tropa 3 g ( $317,84 \text{ g}_{\text{TROLOX}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ ), a na **Slici 23** primjenom FRAP metode masa uzorka od 5 g ( $133,05 \text{ g}_{\text{TROLOX}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ ). Iz priloženih slika može se uočiti da se vrijednosti antioksidacijskih aktivnosti razlikuju između ove tri



spektrofotometrijske metode, ali u svim slučajevima je dokazana veća antioksidacijska aktivnost kod ekstrakata dobivenih pomoću 50%-tne otopine etanola.



**Slika 22** Ovisnost antioksidacijske aktivnosti određene ABTS metodom o masi korištenog tropa grožđa pri ekstrakciji fenolnih spojeva pomoću vode i 50%-tnog etanola



**Slika 23** Ovisnost antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom o masi korištenog tropa grožđa pri ekstrakciji fenolnih spojeva pomoću vode i 50%-tnog etanola

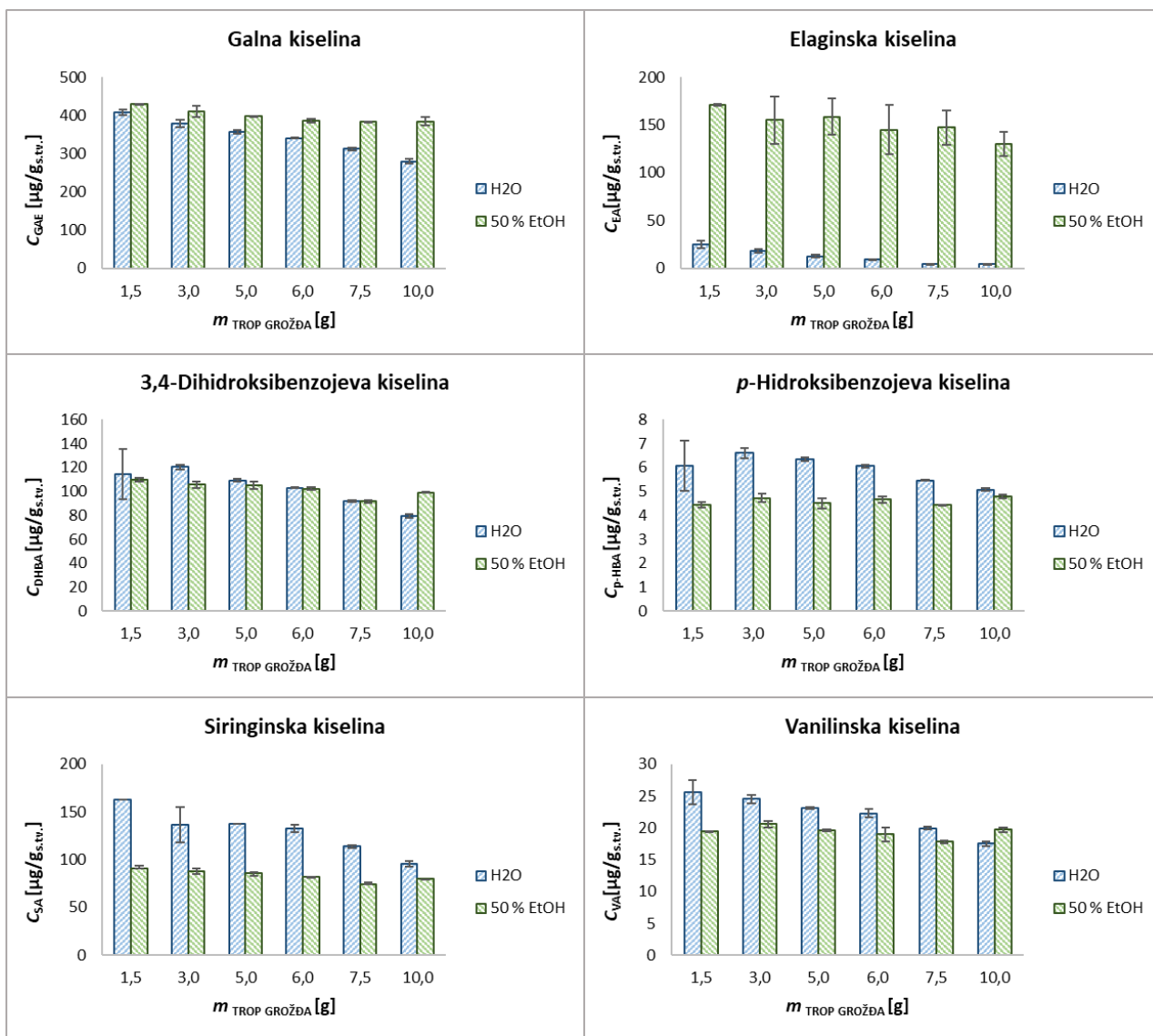
Nakon spektrofotometrijskih metoda provedeno je kvalitativno i kvantitativno određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva u ekstraktima UHPLC metodom. Usporedbom retencijskih vremena sa standardima spojevi su određeni kvalitativno, dok je kvantitativna analiza provedena određivanjem površine ispod dobivenih pikova pomoću LabSolution softvera. Određene su koncentracije fenolnih kiselina i to derivata hidroksibenzoične kiseline (3,4-dihidroksibenzoična, siringična, vanilinska, elaginska, galna i *p*-hidroksibenzična kiselina) i hidroksicinamične kiseline (kafeinska, ferulična, *o*- i *p*-kumarna), potom koncentracije flavan-3-ola (katehina, epikatehina, epikatehin galata i galokatehin galata, procijanidina B1 i B2), flavonola (kvercetina, kampferola, rutina) i koncentracija stilbena resveratrola.

**Slika 24** prikazuje ovisnost masenog udjela derivata hidroksibenzoične kiseline o masi tropa grožđa koja je korištena u procesu ekstrakcije. Maseni udio derivata hidroksibenzoične kiseline bio je veći u vodenim ekstraktima kod siringične ( $95,6\text{--}163,1 \mu\text{g}_{\text{SA}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ ), 3,4-dihidroksibenzoične ( $79,5\text{--}120,3 \mu\text{g}_{\text{DHBA}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ ), vanilinske ( $17,5\text{--}25,5 \mu\text{g}_{\text{VA}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ ) i *p*-hidroksibenzične ( $5,1\text{--}6,6 \mu\text{g}_{\text{p-HBA}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ ) kiseline, dok je maseni udio galne ( $382,9\text{--}428,4 \mu\text{g}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ ) i elaginske ( $130,0\text{--}170,8 \mu\text{g}_{\text{EA}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ ) kiseline bio veći u etanolnim ekstraktima (**Slika 24**). Uspoređujući ekstrakcijska otapala može se uočiti da kod elaginske kiseline postoji značajna razlika, odnosno u 50%-tnom etanolu ekstrahirana je u 7 puta većim koncentracijama u nego što je bila u vodi koristeći omjer 1,5 g/60 mL.

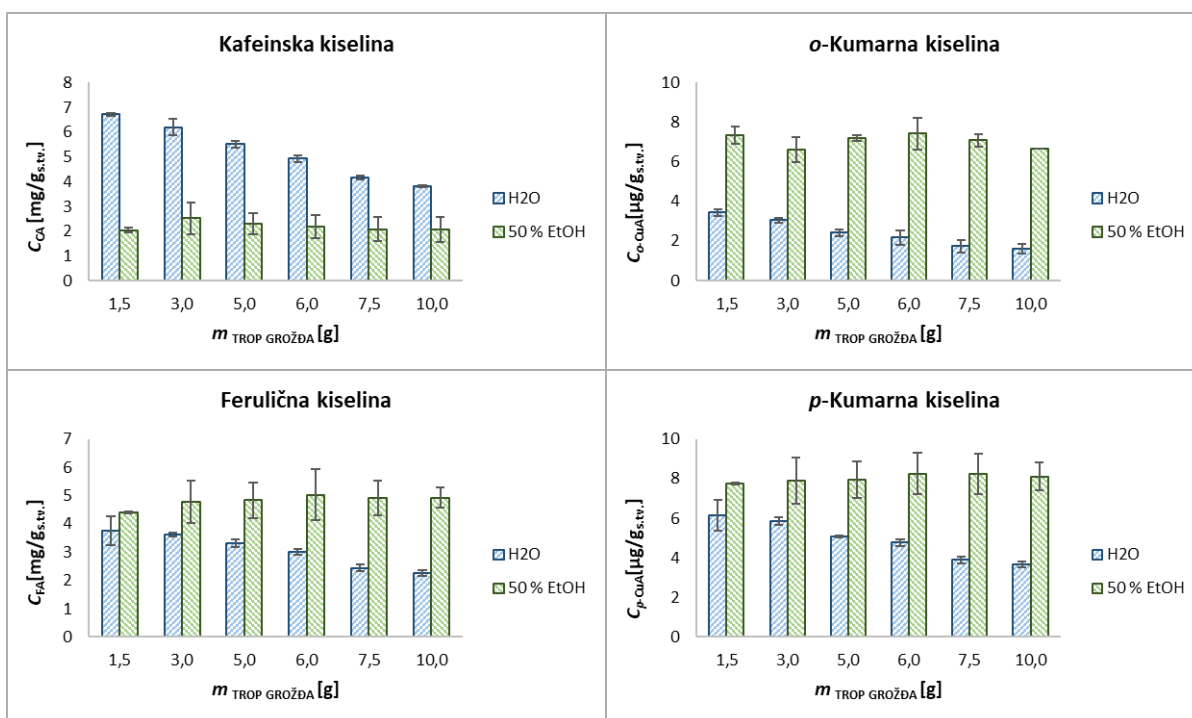
Hidroksicinamične kiseline dokazane su u većim koncentracijama u etanolnim ekstraktima osim kafeinske kiseline kod koje je veći prinos ostvaren u vodenim ekstraktima (**Slika 25**).

U obje grupe fenolnih kiselina vidljiv je isti trend, odnosno maseni udio fenolnih kiselina opada s povećanjem mase uzorka, uz par iznimki. Unatoč određenim razlikama, iz dobivenih podataka može se zaključiti da je masa uzorka od 1,5 g i 60 mL otapala najpogodnija za ekstrakciju pojedinačnih polifenola što je u skladu s rezultatima dobivenim mjerenjem ukupnih fenolnih tvari.

Ukoliko se uspoređuju ove dvije grupe fenolnih kiselina određenih UHPLC metodom nakon ekstrakcije 1,5 g tropa grožđa sa 60 mL 50%-tnog etanola, vidljivo je da su hidroksibenzoične kiseline ( $8264,8 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ ) prisutne u većim koncentracijama u odnosu na derivate hidroksicinamične kiseline ( $226,1 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ ).



**Slika 24** Ovisnost masenog udjela hidoksibenzoičnih kiselina o masi korištenog tropa grožđa pri ekstrakciji fenolnih spojeva pomoću vode i 50%-tnog etanola

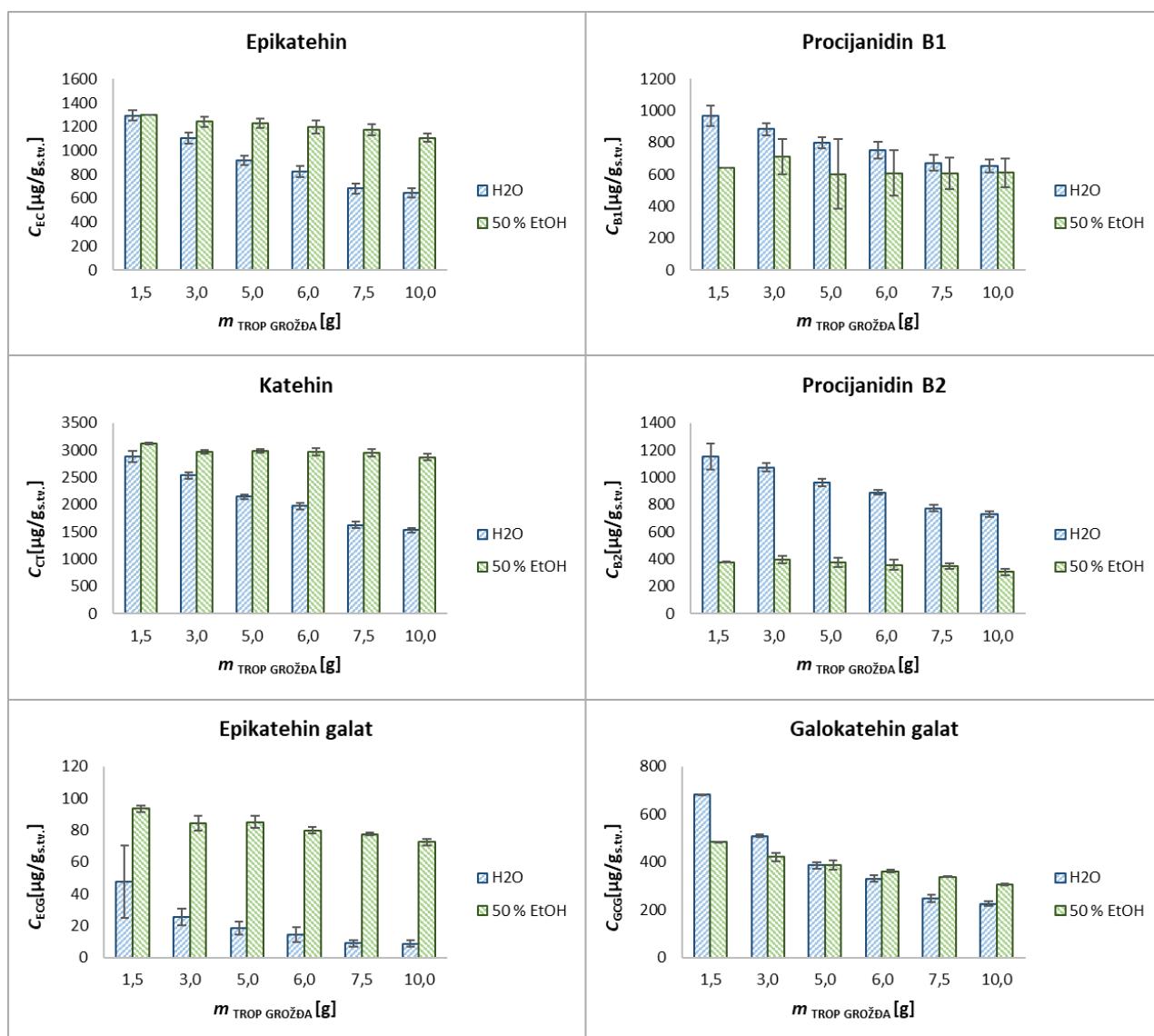


**Slika 25** Ovisnost masenog udjela hidroksicinamičnih kiselina o masi korištenog tropa grožđa pri ekstrakciji fenolnih spojeva pomoću vode i 50%-tnog etanola

Prilikom ekstrakcije s etanolom najveći prinos ostvaren je kod galne (derivat hidroksibenzoične kiseline) i *p*-kumarne kiseline (derivat hidroksicinamične kiseline), dok je upotrebom vode kao ekstrakcijskog otapala, najveći prinos ostvaren kod siringične i kafeinske kiseline.

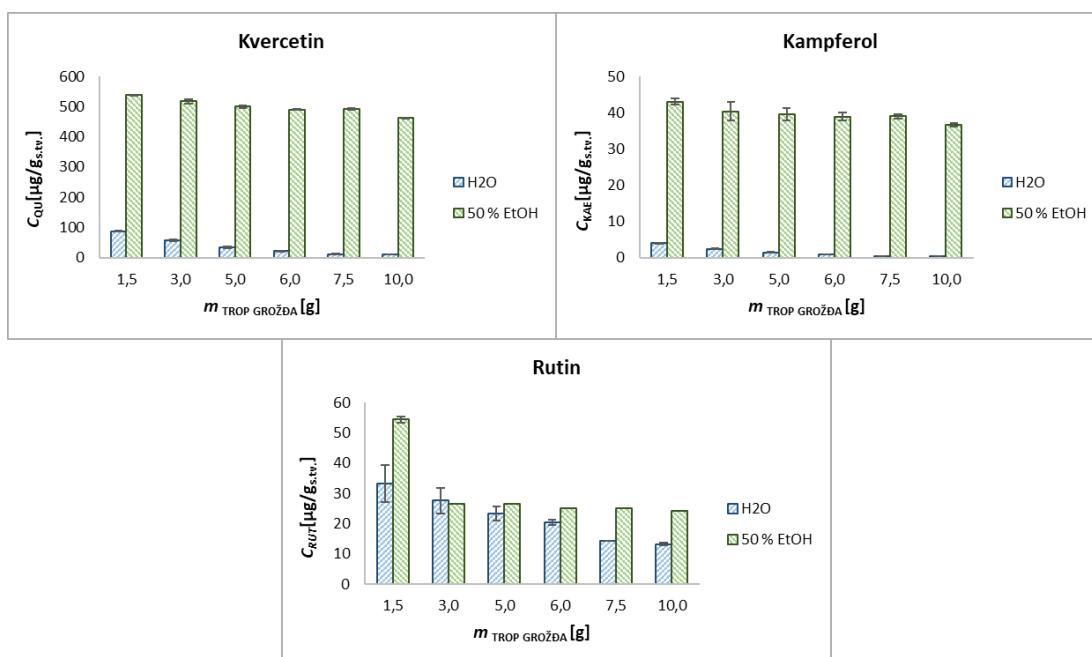
Od šest kvantificiranih flavanola, dokazano je da se katehin (3123 µg/g<sub>s.tv.</sub>), epikatehin (1299 µg/g<sub>s.tv.</sub>) i epikatehin galat (93 µg/g<sub>s.tv.</sub>) u najvećim koncentracijama ekstrahiraju pomoću 50 %-tnog etanola, dok se galokatehin galat (681 µg/g<sub>s.tv.</sub>) i procijanidini B1 (967 µg/g<sub>s.tv.</sub>) i B2 (1149 µg/g<sub>s.tv.</sub>) bolje ekstrahiraju koristeći vodu kao otapalo (**Slika 26**). Isto tako za postizanje maksimalnog prinosa flavanola, omjer uzorka i otapala 1,5 g i 60 mL otapala pokazao se kao optimalan.

Kod ekstrakcije s etanolom najviši prinos je postignut kod katehina, dok je upotrebom vode najveći prinos uočen kod ekstrakcije procijanidina B2.



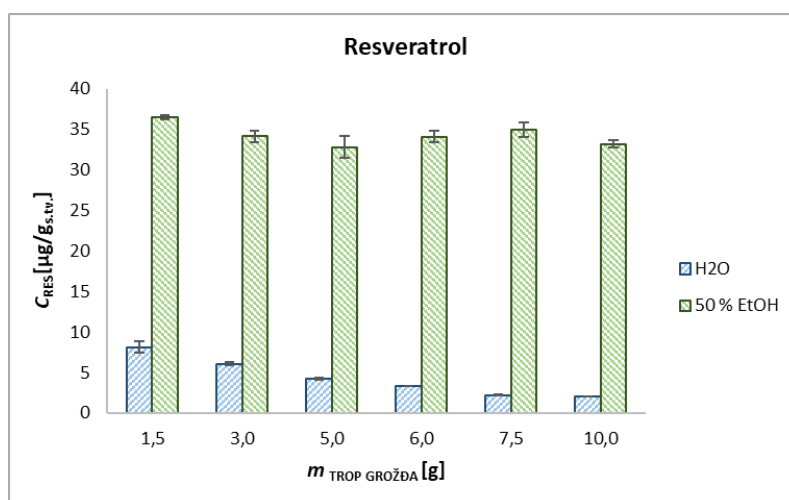
**Slika 26** Ovisnost masenog udjela flavanola o masi korištenog tropa grožđa pri ekstrakciji fenolnih spojeva pomoću vode i 50%-tnog etanola

Flavonoli – kvercetin, kampferol i rutin bolje su se ekstrahirali u 50%-tnom etanolu nego u vodi (Slika 27), gdje je kvercetin ekstrahiran u najvećoj koncentraciji od  $54,47 \mu\text{g/g.s.tv.}$ .



**Slika 27** Ovisnost masenog udjela flavonola o masi korištenog tropa grožđa pri ekstrakciji fenolnih spojeva pomoću vode i 50%-tnog etanola

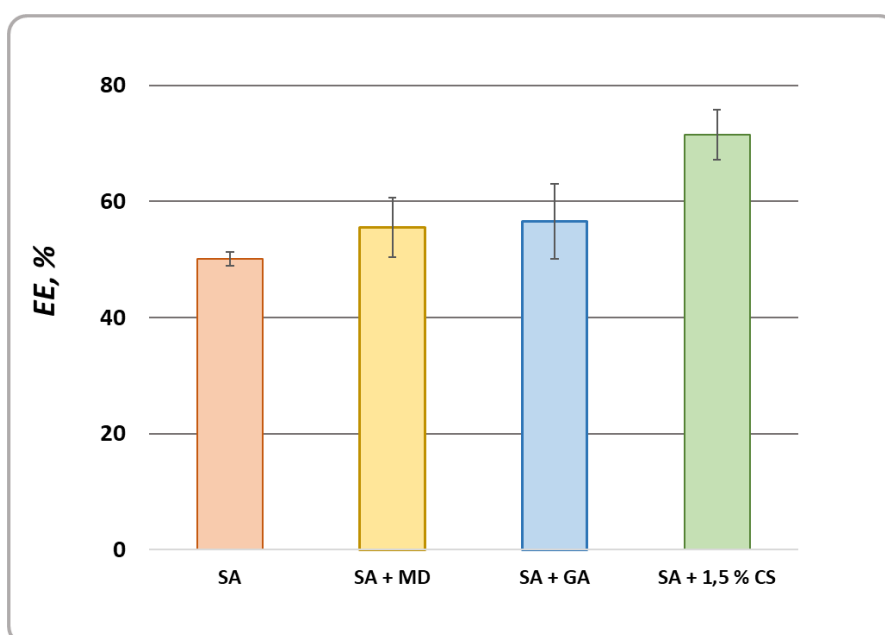
Resveratrol je flavonoid koji pripada grupi stilbena. Prilikom ekstrakcije 1,5 g tropa grožđa sa 60 mL otapala, resveratrol je ekstrahirano u 4,5 puta većim koncentracijama u 50%-tnom etanolu nego u vodi i to u koncentraciji 36,49 µg/g<sub>s.tv.</sub> (**Slika 28**).



**Slika 28** Ovisnost masenog udjela resveratrola o masi korištenog tropa grožđa pri ekstrakciji fenolnih spojeva pomoću vode i 50%-tnog etanola

Nakon obrade rezultata, zaključeno je da se ukupni i pojedinačni polifenolni spojevi u većim koncentracija ekstrahiraju korištenjem 50%-tnog etanola te je najveći prinos ekstrakcije fenolnih spojeva ostvaren pri korištenju omjera kruto-tekuće = 1,5 g /60 mL (0,025 g/mL).

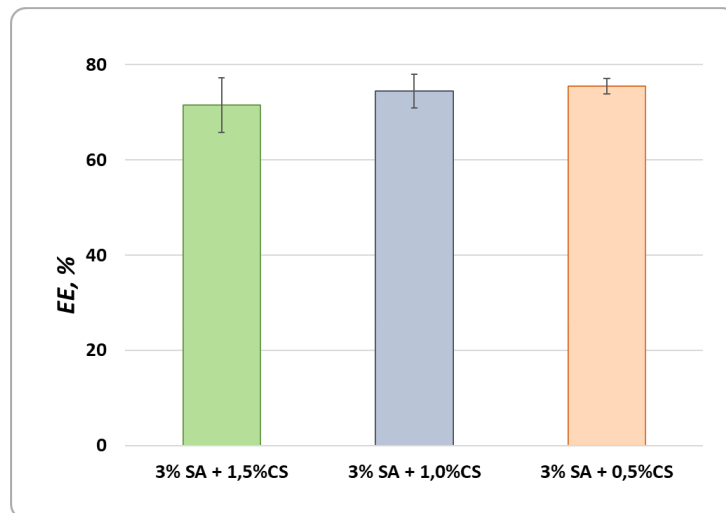
U drugom dijelu eksperimentalnog rada provedena je enkapsulacija ekstrakta koji su dobiveni ekstrakcijom pomoću 50%-tnog etanola uz omjer kruto-tekuće 0,025 g/mL. Tekući ekstrakti su upareni do suhog te je pripremana poznata koncentracija ekstrakta pomoću 30%-tnog etanola koji su podvrgnuti enkapsulaciji. Zadatak ovog dijela bio je ispitati utjecaj dodatka različitih omotača (guma arabika, natrij alginat, kitozan i maltodekstrin) na učinkovitost enkapsulacije koja se računala prema **jednadžbi 18**.



**Slika 29** Usporedba različitih omotača na učinkovitost enkapsulacije (EE, %) (SA-natrij alginat, MD-maltodekstrin, GA-guma arabika, CS-kitozan)

**Slika 29** pokazuje usporedbu učinkovitosti enkapsulacije fenolnih spojeva ostvarene uz primjenu različitih omotača iz koje je vidljivo da se najmanja učinkovitost enkapsulacije postigla upotrebom samog natrij alginata (50,09%), dok je dodatak drugih omotača u natrij alginat uzrokovao povećanje učinkovitosti enkapsulacije ekstrakata tropa grožđa. Najveća učinkovitost postignuta sa 1,5%-tnim kitozonom, koji nije miješan s natrij alginatom već je dodan u kalcijev klorid, i iznosila je 71,4 %. Usporedba učinkovitosti enkapsulacije kada su u kalcijevom kloridu bile dodane različite koncentracije kitozana (1,5%; 1%; 0,5%) prikazana je

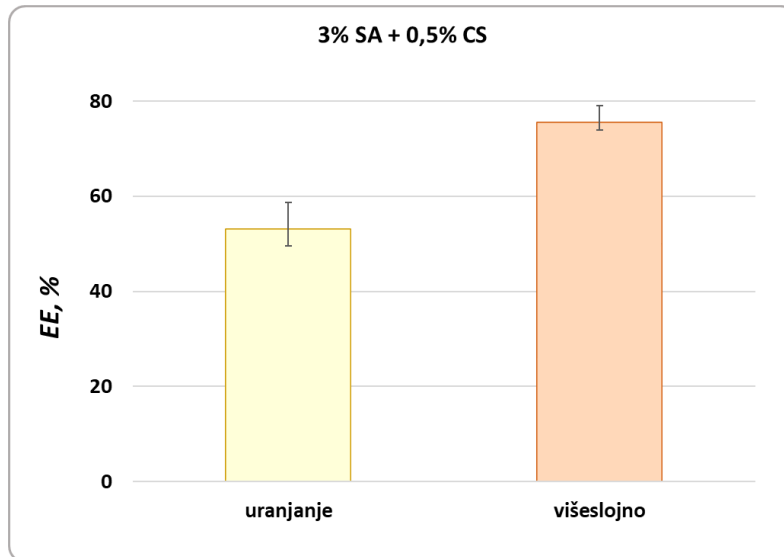
na **Slici 30**. Vidljivo je da je najbolja učinkovitost (75,47%) ostvarena kada je korištena koncentracija kitozana 0,5%.



**Slika 30** Utjecaj dodatka različitih koncentracija kitozana (CS) u kalcijev klorid na učinkovitost enkapsulacije

Zatim je ispitan utjecaj načina dodatka kitozana na učinkovitost enkapsulacije. Na **Slikama 29 i 30** prikazani su rezultati kada je kitozan miješan s kalcijevim kloridom dok je na **Slici 31** prikazana usporedba tako korištenog kitozana u koncentraciji 0,5% i kitozana u istoj koncentraciji u koji su se kapsule zasebno uranjale nakon geliranja u  $\text{CaCl}_2$ . Prema rezultatima je vidljivo da je način dodatka kitozana uvelike utjecao na učinkovitost enkapsulacije s obzirom da je učinkovitost enkapsulacije bila manja (52,98%) kada su se kapsule naknadno dodavale u čisti kitozan (**Slika 31**).





**Slika 31** Utjecaj načina dodatka 0,5% kitozana (CS) na učinkovitost enkapsulacije (EE,%) (višeslojno = 0,5% CS pomiješan s  $\text{CaCl}_2$ , uranjanje = 0,5 %CS korišten je samostalno nakon što su kapsule stvrdnute u  $\text{CaCl}_2$ )

## **5. ZAKLJUČCI**

Na osnovi provedenog istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- ✓ Uvjeti ekstrakcije značajno utječu na prinos ekstrakcije fenolnih spojeva iz tropa grožđa.
- ✓ Vodena otopina etanola pokazuje bolju učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva iz tropa grožđa u odnosu na čistu destiliranu vodu.
- ✓ Najveći prinos ukupnih i pojedinačnih polifenolnih spojeva dobiven je, u većini eksperimentalnih mjerenja, korištenjem 1,5 g tropa grožđa i 60 mL 50%-tne vodene otopine etanola kao ekstrakcijskog otapala te se navedeni uvjeti smatraju optimalnim u okviru eksperimentalnih uvjeta.
- ✓ Flavan-3-oli, katehin (3113,83  $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ ) i epikatehin (1299,12  $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ ) dokazani su u najvećim masenim koncentracijama u predmetnom tropu grožđa sorte cabernet sauvignon pri utvrđenim optimalnim uvjetima ekstrakcije.
- ✓ Primjena različitih omotača značajno utječe na učinkovitost enkapsulacije
- ✓ Između ispitanih omotača najveća učinkovitost enkapsulacije ostvarena je uz primjenu natrijevog alginata u kombinaciji s kitozonom.
- ✓ Način dodatka i koncentracija kitozana imaju značajan utjecaj na učinkovitost enkapsulacije
- ✓ Od ispitivanih koncentracija kitozana (0,5-1-1,5%) najbolja učinkovitost enkapsulacije (75,47%) je ostvarena pri koncentraciji kitozana 0,5% kada se kitozan dodaje u otopinu za stvrdnjavanje odnosno kalcij klorid.

## **6. LITERATURA**

- Azevedo M, Bourbon A, Vicente A, Cerqueira M: Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B<sub>2</sub>. *International Journal of Biological Macromolecules* 71:141-146, 2014.
- Bennacef C, Desobry-Banon S, Probst L, Desobry S: Advances on alginate use for spherification to encapsulate biomolecules. *Food Hydrocolloids* 118:e106782, 2021.
- Beres C, Costa G, Cabezudo I, Da Silva James N, Teles A, Cruz A, Mellinger-Silva C, Tonon R, Cabral L, Freitas S: Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste management* 68:581-594, 2017.
- Bucić-Kojić A: Utjecaj procesnih uvjeta i načina kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2008.
- Bucić-Kojić A, Šelo G, Zelić B, Planinić M, Tišma M: Recovery of phenolic acid and enzyme production from corn silage biologically treated by *Trametes versicolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 181:948-960, 2017.
- Cardenas-Ramirez C, Jaramillo F, Gomez M: Systematic review of encapsulation and shape-stabilization of phase change materials. *Journal of Energy Storage* 30:e101495, 2020.
- Dai J, Mumper RJ: Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15:7313-7352, 2010.
- De Vos P, Faas M, Spasojević M, Sikkema J: Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal* 20:292-302, 2010.
- Dordoni R, Bassani A, Rossetti C, Garrido GD, Frustace A, Spigno G: Encapsulated walnut paste with grape skin extract addition: Oxidative stability and use in biscuits. *Chemical Engineering Transactions* 87:73-78, 2021.
- Drmić H, Jambrak AR: Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 2:22-33, 2010.
- Drosou C, Kyriakopoulou K, Bimpilas A, Tsimogiannis D, Krokida M: A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products* 75:141-149, 2015.

- Fontana A, Antonioli A, Bottini R: Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 61:8987-9003, 2013.
- Grgić J, Šelo G, Planinić M, Tišma M, Bucić-Kojić A: Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds. *Antioxidants* 9:e923, 2020.
- Jolić N: Antioksidacijska aktivnost fenola: interakcija derivata hidroksibenzojeve kiseline. *Završni rad*. Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2017.
- Kumar S, Mukherjee A, Dutta J: Chitosan based nanocomposite films and coatings: Emerging antimicrobial food packaging alternatives. *Trends in Food Science & Technology* 97:196-209, 2020.
- Kurozawa LE, Hubinger MD: Hydrophilic food compounds encapsulation by ionic gelation. *Food Science* 15:50-55, 2017.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L: Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79:727-747, 2004.
- Manca ML, Firoznejhad M, Caddeo C, Marongiu F, Escribano-Ferrer E, Sarais G, Peris JE, Usach I, Zaru M, Manconi M, Fadda AM: Phytocomplexes extracted from grape seeds and stalks delivered in phospholipid vesicles tailored for the treatment of skin damages. *Industrial Crops & Products* 128:471-478, 2019.
- Marinova D, Ribarova F, Atanassova M: Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 40:255-260, 2005.
- Martinac A, Filipović-Grčić J: Kitozan-biopolimer 21.stoljeća. *Glasnik* 58:1-10, 2002.
- Mohamed Ahmed IA, Özcan MM, Al Juhaimi F, Babiker EFE, Ghafoor K, Banjanin T, Osman MA, Gasseem MA, Alqah HAS: Chemical composition, bioactive compounds, mineral contents, and fatty acid composition of pomace powder of different grape varieties. *Journal of Food Processing and Preservation* 44:e14539, 2020.
- Mohammed NK, Tan Ping C, Manap YA, Muhiadin BJ, Hussin ASM: Spray drying for the encapsulation of oils - A Review. *Molecules* 25:e3873, 2020.
- Mojzer EB, Hrnčić MK, Škerget M, Knez Ž, Bren U: Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules* 21:e901, 2016.
- Muhamad II, Jusoh YMM, Nawi NM, Aziz AA, Padzil AM, Lian HL: Advanced natural food colorant encapsulation methods: anthocyanin plant pigment. U *Natural and*

- Artificial Flavoring Agents and Food Dyes*, str. 495-526. Handbook of Food Bioengineering, Amsterdam, 2018.
- Musa HH, Ahmed AA, Musa TH: Chemistry, biological and pharmacological properties of gum Arabic. U *Bioactive Molecules in Food*, str.1-18. Springer International Publishing, Švicarska, 2018.
- Nawaz H, Shi J, Mittal GS, Kakuda Y: Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology* 48:176-181, 2006.
- Nedović V, Kalušević A, Manojlović V, Lević S, Bugarski B: An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* 1:1806-1815, 2011.
- Pavel S, Klejdus B, Kuban V: Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables-Evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:607-616, 2006.
- Rajabi H, Jafari SM, Rajabzadeh G, Sarfarazi M, Sedaghati S: Chitosan-gum Arabic complex nanocarriers for encapsulation of saffron bioactive components. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 578:e123644, 2019.
- Ray S, Raychaudhuri U, Chakraborty R: An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience* 13:76-83, 2016.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26:1231-1237, 1999.
- Saifullah Md, Shishir MRI, Ferdowsi R, Rahman Md, Van Vuong Q: Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review. *Trends in Food Science & Technology* 86:230-251, 2019.
- Shishir MRI, Xie L, Sun C, Zheng X, Chen W: Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology* 78:34-60, 2018.
- Tomas S, Planinić M, Bucić-Kojić A: *Jedinične operacije u prehranbenom i procesnom inženjerstvu*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.
- Vemmer M, Patel A: Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control* 67:380-389, 2013.

- Waterhouse AL: Determination of total phenolics. U *Current Protocols in Food Analytics Chemistry*, str. 11.1.1-11.1.8. John Wiley & Sons Inc., New York, Sjedinjene Američke Države, 2009.
- Williams PA, Phillips GO: Gum Arabic. U *Handbook of Hydrocolloids*, str. 252-273. Glyndwr University, UK, 2009.