

# Inkapsulacija ionskim geliranjem: Utjecaj omotača na učinkovitost inkapsulacije ekstrakta tropa grožđa sorte merlot

---

**Brtan, Matej**

**Undergraduate thesis / Završni 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:109:360546>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-06**

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**

**PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE**

**Matej Brtan**

**Inkapsulacija ionskim geliranjem: Utjecaj omotača na učinkovitost  
inkapsulacije ekstrakta tropa grožđa sorte merlot**

**Završni rad**

**Osijek, rujan 2023.**

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

**PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**

Prijenos tvari i energije

**Inkapsulacija ionskim geliranjem: Utjecaj omotača na učinkovitost  
inkapsulacije ekstrakta tropa grožđa sorte merlot**

**Završni rad**

Mentor: prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić

---

Student: Matej Brtan

MB: 0152210556

Mentor: prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić

Predano:

Pregledano:

---

Ocjena:

Potpis mentora:

---

## **Inkapsulacija ionskim geliranjem: Utjecaj omotača na učinkovitost inkapsulacije ekstrakta tropa grožđa sorte merlot**

### **Sažetak**

U radu je dan pregled najčešće korištenih omotača i metoda za inkapsulaciju bioaktivnih tvari s naglaskom na metodu ionskog geliranja. U eksperimentalnom dijelu rada cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj različitih omotača prirodnog porijekla i njihovih kombinacija: natrijev alginat, natrijev alginat i želatina, natrijev alginat i guma arabika te natrijev alginat i kitozan na učinkovitost inkapsulacije ekstrakta tropa grožđa sorte merlot, bogatog fenolnim spojevima. Trop grožđa je nusproizvod vinarija organskog porijekla koji obiluje fenolnim spojevima koji imaju potencijalno pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, ali se nedovoljno iskorištava u te svrhe. Fenolni spojevi privlače sve više pažnje zbog svojih antioksidacijskih, protuupalnih, antimikrobnih i antikancerogenih svojstava. Stoga se sve više istražuju metode za očuvanje ovih spojeva, poput inkapsulacije, koja ih štiti od degradacije s obzirom da su fenolni spojevi izrazito nestabilni i osjetljivi na uvjete okoline (temperatura, kisik, svjetlost). Odabir odgovarajućeg omotača igra ključnu ulogu u procesu inkapsulacije, jer utječe na učinkovitost zaštite aktivne tvari koja se inkapsulira, u ovom slučaju fenolnih spojeva.

U ovom radu najveća učinkovitost inkapsulacije ostvarena je pomoću kombinacije omotača 3 %-tnog natrijevog alginata i 5 %-tne želatine te je iznosila 64,63 %.

**Ključne riječi:** trop grožđa, fenolni spojevi, ionsko geliranje, učinkovitost inkapsulacije

*Ovaj završni 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).*

# Encapsulation by Ionic Gelation: The Influence of the Coating on the Encapsulation Efficiency of Merlot Grape Pomace Extract

## Abstract

The paper provides an overview of the most commonly used coating materials and methods for encapsulating bioactive compounds, with a focus on ionic gelation. The aim of research was to investigate the impact of different natural coating materials and their combinations: sodium alginate, sodium alginate and gelatin, sodium alginate and gum Arabic, and sodium alginate and chitosan on the encapsulation efficiency of extract from Merlot variety grape pomace, rich in phenolic compounds. Grape pomace, winemaking by-products, is organic waste abundant in phenolic compounds with potential health benefits. Phenolic compounds from grape pomace are gaining increasing attention due to their antioxidative, anti-inflammatory, antimicrobial, and anticancer properties. Therefore, preservation methods like encapsulation, are being increasingly explored, as they protect these compounds from degradation since phenolic compounds are highly unstable and sensitive to the environmental conditions (temperature, oxygen, and light). The selection of the appropriate coating material plays a crucial role in the encapsulation process as it affects the encapsulation efficiency of encapsulated bioactive compounds, in this case phenolic compounds.

In this study, the highest encapsulation efficiency was achieved using a combination of 3 % sodium alginate with 5 % gelatin, resulting in 64.63 % encapsulation efficiency.

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

*This final thesis was supported by the Croatian Science Foundation under the project (IP-2018-01-1227) „Development of a sustainable integrated process for the production of bioactive isolated from food industry residues“ (POPI-WinCEco)*

## SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. INKAPSULACIJA.....	2
2.1.1. Kemijske metode inkapsulacije.....	2
2.1.2. Fizikalne metode inkapsulacije.....	3
2.2. OMOTAČI.....	5
2.2.1. Polimeri ugljikohidrata.....	5
2.2.2. Proteini.....	9
2.2.3. Lipidi, masti i ulja.....	10
2.3. IONSKO GELIRANJE.....	11
2.4. TROP GROŽĐA.....	13
2.5. FENOLNI SPOJEVI.....	14
3. EKSPERIMENTALNI RAD.....	16
3.1. ZADATAK.....	16
3.2. MATERIJALI I METODE.....	16
3.2.1. Materijal.....	16
3.2.2. Priprema ekstrakta.....	16
3.2.3. Inkapsulacija ionskim geliranjem.....	17
3.2.4. Određivanje ukupnih fenolnih tvari.....	18
3.2.5. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije.....	19
4. REZULTATI.....	21
5. ZAKLJUČAK.....	23
6. LITERATURA.....	24

## 1. UVOD

Trop grožđa nastaje kao nusprodukt tijekom proizvodnje vina, a često se neplanski odlaže u polja ili vinograde i na taj način uzrokuje onečišćenje okoliša te nepovoljno utječe na sastav tla. U svojem sastavu, trop grožđa sadrži kožicu, sjemenke i pulpu grožđa te je bogat izvor fenolnih spojeva među kojima se ističu flavonoli, fenolne kiseline, stilbeni, flavanoli, antocijani i proantocijanidini. Ovi spojevi privlače sve više pozornosti zbog svojih potencijalnih pozitivnih učinaka za ljudsko zdravlje. Posebno su zanimljivi zbog svojih antioksidativnih svojstava koja su povezana s mogućim utjecajem na smanjenje rizika od raznih bolesti (Mohamed Ahmed i sur., 2020). Zbog svoje biološke aktivnosti, fenolni spojevi iz tropa grožđa sve veću primjenu nalaze u raznim industrijama poput prehrambene, farmaceutske i kozmetičke. Međutim, kako bi se iskoristile prednosti ovih spojeva, ključno je osigurati njihovu stabilnost te se zbog toga sve više razvijaju i istražuju metode inkapsulacije fenolnih spojeva iz tropa grožđa. Inkapsulacija je postupak kojim se ovi vrijedni spojevi oblažu zaštitnim omotačem kako bi se sačuvala njihova funkcionalna svojstva. Izbor omotača igra veliku ulogu prilikom inkapsulacije s obzirom da su fenolni spojevi osjetljivi na svjetlost, promjene pH vrijednosti, visoke temperature te izloženost kisiku. Postoje mnogi materijali koji se mogu koristiti kao omotači, ali danas postoji velika težnja koristiti omotače prirodnog porijekla umjesto sintetskih. Zbog toga su omotači često izolirani iz prirodnih izvora te se za metodu ionskog geliranja, koja je korištena prilikom izrade ovog rada, najčešće koriste alginati, kitozan, pektin i gume različitog porijekla.

U eksperimentalnom dijelu ovog rada je istražen utjecaj upotrebe različitih omotača prirodnog porijekla i njihovih kombinacija – natrijev alginat (NA), natrijev alginat i želatina (NA-ŽEL), natrijev alginat i guma arabika (NA-GA) te natrijev alginat i kitozan (NA-KZ) na učinkovitost inkapsulacije ukupnih fenolnih spojeva iz ekstrakt tropa grožđa sorte merlot.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. INKAPSULACIJA

Inkapsulacija predstavlja postupak kojim se aktivna tvar, bez obzira radi li se o tekućini, plinu ili krutini, oblaže određenim materijalom, koji se naziva omotač, kako bi se zaštitila od vanjskih utjecaja i sačuvala njena svojstva (Eghbal i Choudhary, 2018). Također, inkapsulacijom je moguće poboljšati stabilnost i održivost aktivnih sastojaka, zaštititi ih od djelovanja vlage, topline, svjetlosti i drugih nepovoljnih uvjeta te je moguće prikriti nepoželjne mirise i okuse aktivne tvari. Postoje mnoge tehnike inkapsulacije, a općenito se mogu podijeliti na kemijske i fizikalne metode (**Tablica 1**).

**Tablica 1** Podjela metoda inkapsulacije

KEMIJSKE METODE	FIZIKALNE METODE
emulgiranje	ekstruzija
koacervacija	sušenje raspršivanjem
molekularna inkluzija	sušenje zamrzavanjem
ionsko geliranje	hlađenje pomoću raspršivača
primjena liposoma	

Kratko pojašnjenje uobičajenih tehnika inkapsulacije prikazano je u sljedećim odlomcima, a metoda ionskog geliranja detaljnije objašnjena u poglavlju 2.3. Ionsko geliranje.

#### 2.1.1. Kemijske metode inkapsulacije

*Emulgiranje* je proces stvaranja emulzije najmanje dviju tekućina koje se prirodno ne miješaju, kao što su ulje i voda. U ovom procesu, jedna od tih tekućina koja sadrži bioaktivne sastojke raspršuje se u obliku sitnih kapljica unutar druge tekućine te se naziva emulzijom ulja u vodi ukoliko su kapljice ulja raspršene u vodi. Nasuprot tome, ukoliko su kapljice vode raspršene u ulju naziva se emulzijom vode u ulju. Postoje i složeniji oblici emulzija poput ulje-voda-ulje ili voda-ulje-voda, ovisno o potrebama i primjenama (Fang, 2010). Stabilnost emulzija može biti



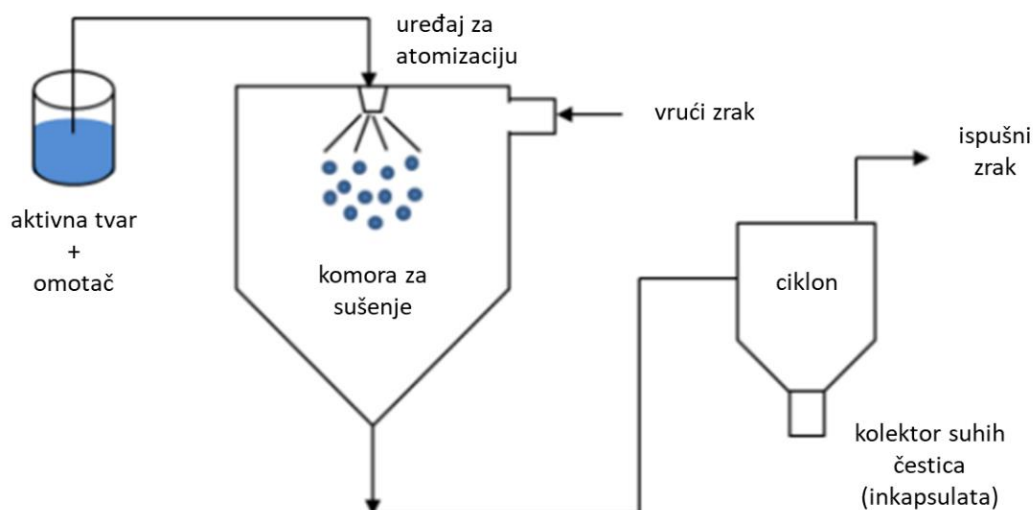
narušena promjenom temperature ili pH vrijednosti, ali unatoč ovim izazovima emulgiranje je korisna tehnika za inkapsulaciju fenolnih spojeva te se često primjenjuje (Lu i sur., 2016).

*Koacervacija* se temelji na elektrostatskim interakcijama između suprotno nabijenih polimera koje ovise o različitim faktorima kao što su pH vrijednost, temperatura, naboj i količina hidrokoloida. Proces koacervacije počinje suspendiranjem ili emulgiranjem aktivne tvari u vodenoj fazi koja sadrži jedan ili više polimera, nakon čega slijedi stvrdnjavanje i umrežavanje. Ukoliko se tijekom koacervacije koristi jedan polimer radi se o jednostavnoj koacervaciji, dok složena koacervacija zahtjeva upotrebu dva ili više tipova polimera. Ovo je jedna od skupljih i složenijih metoda inkapsulacije, ali nudi veću učinkovitost (Wang i sur., 2018a). Pogodna za hidrofobne materijale, ali može se prilagoditi i za hidrofilne tvari (Đorđević i sur., 2014).

*Molekularna inkluzija* je tehnika inkapsulacije koja se odvija na molekularnoj razini, a sastoji se od inkapsuliranja aktivnog spoja od strane polimera putem fizikalno-kemijskih sila, kao što su vodikove veze, van der Waalsove sile ili hidrofobne interakcije (Marques, 2010). Ovi kompleksi nastaju reakcijom koja se odvija samo u prisutnosti vode (Desai i Jin Park, 2005). Najčešće korišteni omotači su ciklodekstrini koji se sastoje od hidrofilnog vanjskog dijela i unutarnjeg hidrofobnog dijela, a aktivna tvar apolarnog karaktera mogla bi biti zarobljena u apolarnoj unutarnjoj šupljini pomoću hidrofobnih interakcija (Ozkan i sur., 2019).

### **2.1.2. Fizikalne metode inkapsulacije**

*Sušenje raspršivanjem* je tehnika inkapsulacije kojom se tekućina, koja sadržava omotač i aktivnu tvar, raspršuje u suhi prah pomoću injektora i struje vrućeg plina (Rattes i Oliveira, 2007). Sastoji se od tri faze: homogenizacije napojne tekućine raspršivačem, sušenja napojne otopine pomoću vrućeg plina nosača kako bi se postiglo isparavanje otapala i skupljanje suhih čestica (inkapsulata) pomoću ciklona ili filtra (Schafroth i sur., 2012). Tekućina koja sadržava aktivnu tvar i omotač se ubrizgava u komoru za sušenje kroz mlaznicu ili raspršivač kako bi se dobile male kapljice nakon čega slijedi isparavanje otapala, zatim se te osušene čestice razdvajaju od plina za sušenje filtrom i ciklonom u kojem se kolektira prah (Fatnassi i sur., 2013). Karakteristike dobivenih prahova osušenih sušenjem raspršivanjem povezane su s procesnim parametrima – temperatura sušenja, brzina protoka zraka za sušenje, brzina protoka punjenja, brzina raspršivača, vrsta omotača i njegova koncentracija (**Slika 1**).



**Slika 1** Shematski dijagram procesa sušenja raspršivanjem (preuzeto i prilagođeno prema Ozkan i sur., 2019)

*Sušenje zamrzavanjem* sastoji se od dvije faze: zamrzavanje i sublimacija. Sublimacija se odvija pod sniženim tlakom, čime se omogućuje izravno isparavanje vode iz zamrznutog materijala (Rezvankhah i sur., 2019). Ova tehnika rezultira stvaranjem porozne strukture kojom se očuvaju prirodna svojstva proizvoda. Izuzetno prikladna tehnika za sušenje i inkapsulaciju termički osjetljivih proizvoda jer osigurava minimalnu termičku razgradnju bioaktivnih spojeva.

*Ekstruzija* se temelji na stvaranju malih kapljica, koje sadrže inkapsuliranu aktivnu komponentu, upotrebom mlaznica. Promjer upotrijebljenih mlaznica tijekom procesa ekstruzije utječe na veličinu proizvedenih kapljica. Postupak ekstruzije sastoji se od pripreme emulzije ulja i vode koja se zatim ekstrudira kroz mlaznice, stvarajući kapljice pomoću raspršivanja. Nastale kapljice dalje se podvrgavaju metodama geliranja, hlađenja ili grijanja (Bamidele i Emmambux, 2020). Ekstruzija je posebno pogodna metoda za inkapsulaciju mikroorganizama jer ne zahtjeva upotrebu štetnih otapala te se može izvoditi u aerobnim i anaerobnim uvjetima (de Vos i sur, 2010).

*Hlađenje pomoću raspršivača* je tehnika inkapsulacije prilikom koje se koriste masnoće s visokom točkom taljenja kako bi se osigurala termička stabilnost aktivnih sastojaka. Aktivne

tvori, topive u lipidima ili u obliku suhih čestica ili emulzije, miješaju se s lipidnim slojem i raspršuju u struju hlađenja. Ova tehnika podsjeća na sušenja raspršivanjem, ali umjesto isparavanja, u ovoj metodi omotač se hladi. Hlađenje raspršivanjem korisna je tehnika za smanjenje hlapljivosti i zaštitu osjetljivih aktivnih sastojaka poput minerala, vitamina, enzima, aroma i proteina (Đorđević i sur., 2014).

## 2.2. OMOTAČI

Izbor prirodnih i sintetičkih polimera koji se koriste kao omotači varira ovisno o vrsti aktivne tvari koja se inkapsulira i željenim svojstvima konačnog proizvoda. Sastav omotača igra ključnu ulogu u oblikovanju funkcionalnih karakteristika inkapsuliranih tvari te utječe na odabir odgovarajuće metode inkapsulacije. Omotači u procesu inkapsulacije moraju zadovoljiti niz uvjeta kako bi se osigurala uspješna inkapsulacija, a neki od tih uvjeta uključuju dobra reološka svojstva, pogotovo pri visokim koncentracijama, kako bi omogućili lako rukovanje tijekom inkapsulacije. Također, omotači trebaju biti nereaktivni s aktivnom tvari koja se inkapsulira, kako tijekom procesa inkapsulacije tako i tijekom skladištenja, kako bi se očuvao integritet inkapsulirane tvari. Jedan od važnih faktora prilikom odabira omotača je i ekonomičnost kako bi proces inkapsulacije bio održiv i efikasan (Grgić i sur., 2020). Upravo zbog toga, danas se najčešće upotrebljavaju omotači prirodnog porijekla kao što su polimeri ugljikohidrata, proteini i lipidi.

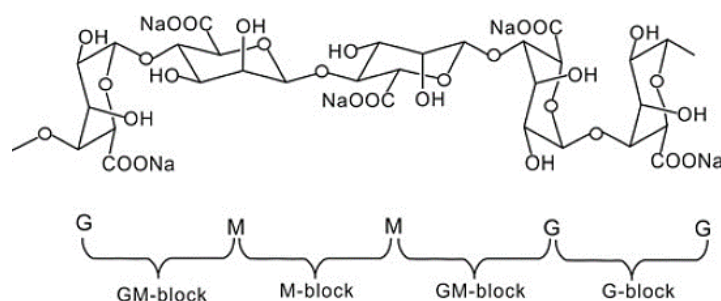
### 2.2.1. Polimeri ugljikohidrata

Polimeri ugljikohidrata opisuju se kao prirodni homo- i kopolimeri koji se sastoje od ostataka šećera i/ili njihovih derivata. Karakteristične veze koje povezuju specifične monosaharide zajedno u ovoj polimernoj strukturi su O-glikozidne veze. Interakcija se može dogoditi između bilo koje od hidroksilnih skupina šećernih monomera, što rezultira polisaharidima sa strukturom linearnog ili razgranatog lanca. Struktura polimera određuje njegova funkcionalna svojstva, kao što su topljivost, sposobnost stvaranja gela i svojstva površine inkapsulata (Samborska i sur., 2021).

#### *Alginati*

Alginati su nerazgranati anionski biopolimeri koji se sastoje od  $\beta$ -D-manuronske kiseline (M) i  $\alpha$ -L-guluronske kiseline (G) povezanih u (1 $\rightarrow$ 4) piranoznu strukturu (**Slika 2**). Čine široku

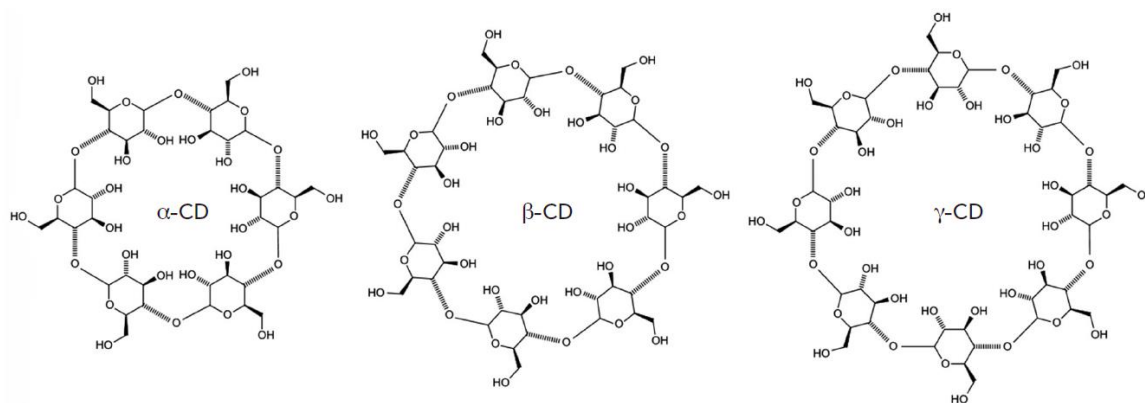
skupinu strukturnih egzopolisaharida prisutnih u morskim algama, poput alginske kiseline i njenih soli, te njihovih derivata. Za komercijalne svrhe većinom se dobivaju iz alginofita, poznatih kao *kelp*, što se u širem kontekstu odnosi na smeđe alge (*Phaeophyceae*). Također, alginatne proizvode bakterije poput *Azotobacter* i *Pseudomonas* (Peteiro, 2018). Kod inkapsulacije, alginati se najčešće koriste za metodu ionskog umrežavanja ili geliranja. Čest su izbor za inkapsulaciju bioaktivnih komponenti hrane zbog svojih svojstava kao što su netoksičnost, biorazgradivost i biokompatibilnost, što ih čini sigurnima za primjenu u prehrambenoj industriji. Osim toga, prikladni su i za inkapsulaciju osjetljivih aktivnih sastojaka budući da se geliranje alginata odvija u blagim procesnim uvjetima, a sam postupak je relativno jednostavan i pristupačan (Paques i sur., 2014).



**Slika 2** Molekularna struktura natrijevog alginata (Wang i sur., 2018b)

### ***Hidrolizirani škrobovi***

Maltodekstrin, kao jedan od najpopularnijih ugljikohidrata koji se koristi za inkapsulaciju, pogotovo prilikom sušenja raspršivanjem, odnosi se na dekstrine koji posjeduju vrijednosti dekstroznog ekvivalenta (DE) manju od 20. Iznimno su topivi u vodi i imaju malu viskoznost što je važno za smanjenje problema sljepljivanja i aglomeracije u prehrambenim sustavima (Rostamabadi i sur., 2020). Maltodekstrini imaju višenamjenski doprinos u inkapsulaciji i zaštiti bioaktivnih sastojaka od oksidacije i toplinske razgradnje. Ipak, posjeduju loš potencijal emulgiranja koji se može riješiti njihovom kombinacijom s drugim omotačima na bazi škroba, bilo u prirodnom ili modificiranom obliku (Ding i sur., 2019). Enzimaska modifikacija škroba može dovesti do stvaranja cikličkih oligosaharida – ciklodekstrina koji posjeduju 6, 7 i 8 glukopiranoznih jedinica ( $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -ciklodekstrin) povezanih  $\alpha$ -(1,4) glikozidnim vezama u ciklički oligomer koji sadrži hidrofobnu šupljinu (**Slika 3**).



**Slika 3** Kemijska struktura  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -ciklodekstrina ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -CD) (Nikitenko i Prassolov, 2013)

U hidrofobnu šupljinu ciklodekstrina mogu se vezati bioaktivne tvari koje su slabo topljive u vodi, poboljšavajući njihovu stabilizaciju tijekom probave i povećavajući njihovu bioraspoloživost (Samborska i sur., 2021). Ciklodekstrini su preporučuju kao snažni materijali/omotači u inkapsulaciji antioksidansa (Webber i sur., 2018), aroma (Xiao i sur., 2019), i eteričnih ulja (Chew i sur., 2018).

### **Prirodne gume**

Prirodne polisaharidne gume imaju široku primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji zahvaljujući svojim svojstvima, poput biokompatibilnosti, netoksičnosti, biorazgradivosti i svojstvima viskoznosti. Ovo svojstvo guma proizlazi iz njihovog potencijala u formiranju intermolekularnih zona povezivanja između dva različita polimerna lanca, stvarajući 3D-mreže i štiteći bioaktivne tvari. Gume biljnog podrijetla obično se kategoriziraju u četiri glavne skupine ovisno o izvoru:

1. biljni eksudati (guma arabika),
2. gume dobivene iz sjemenki (guar guma),
3. mikrobnih eksudata (ksantan guma) i
4. gume morske trave (karagenan) (Taheri i Jafari, 2019).

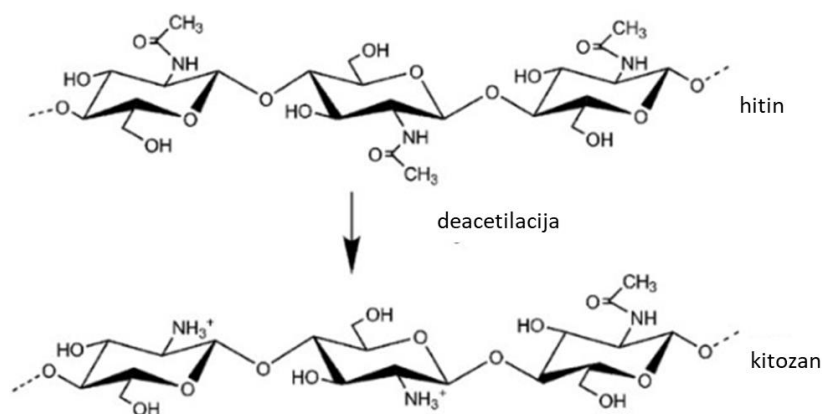
Guma arabika je jedan od najporeznije proučavanih omotača u svim metodama inkapsulacije, a pogotovo kod primjene sušenja raspršivanjem zahvaljujući svojoj visokoj sposobnosti stabiliziranja emulzija i osiguravanja velikog zadržavanja hlapljivih tvari (Sahoo i sur., 2015). Guma arabika je prirodni eksudat koji potječe od drva bagrema, posebice vrste *Acacia senegal*.

Ova vrsta drveća raste u različitim dijelovima svijeta, uključujući Afriku, Indiju, Australiju i Ameriku. Sastoji se pretežno od šećera poput galaktoze, ramnoze i arabinoze te sadrži glukuronsku kiselinu i male količine proteinske komponente koje pridonose njezinim funkcionalnim svojstvima (Williams i Phillips, 2009). Gumu arabiku karakterizira visoka topljivosti u vodi i niska viskoznost u usporedbi s drugim gumama. Kada se dodaje u različite sustave, ne mijenja boju, okus ni miris.

Gumu tragacanth proizvodi drvenasti zimzeleni grm roda *Astragalus* karakterističan za pustinjsku i planinsku regiju Azije. Sastoji se od frakcije topljive u vodi (tragacanthinska kiselina i mala količina arabinogalaktana) i netopljive frakcije, ali koja bubri u vodi, nazvane basorin. Jedna je od najotpornijih guma na kiselinu i najučinkovitiji prirodni emulgator za kisele emulzije ulje u vodi te se često koristi kao stabilizator, emulgator i zgušnjivač u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Weiping i Branwel, 2000). Fizikalno-kemijska i funkcionalna svojstva ove gume znatno ovise o vrsti, stoga je prilikom odabira odgovarajuće vrste gume tragacanth bitno znati njenu buduću primjenu. Unatoč relativno visokoj cijeni, ova guma još uvijek privlači pažnju mnogih prehrambenih industrija zbog svojih izvanrednih i jedinstvenih svojstava. Međutim, održiva opskrba gumom tragacanth glavni je problem koji ograničava njenu komercijalnu primjenu u mnogim industrijama (Nejatian i sur., 2020).

### ***Kitozan***

Kitozan je polisaharid koji se, nakon celuloze, nalazi među najraširenijim prirodnim polisaharidima (Casadidio i sur., 2019) (**Slika 4**). Dobiva se iz hitina, pri čemu otpad od prerade škampa predstavlja najbogatiji i najlakše dostupan izvor hitina i kitozana (Tyliszczak i sur., 2020). Ovi spojevi odlikuju se važnim svojstvima kao što su biorazgradivost, netoksičnost i biokompatibilnost (Kumar i sur., 2018). Jedna od ključnih karakteristika kitozana je njegova netopljivost u vodi i organskim otapalima, ali dobra topljivost u slabo kiselim otapalima (Tyliszczak i sur., 2020). Ovo svojstvo čini kitozan izuzetno prikladnim za učinkovitu dostavu osjetljivih spojeva u ciljane regije, poznatu kao „ciljana isporuka“ (*targeted delivery*) (Raza i sur., 2020).



**Slika 4** Struktura hitina i kitozana (prilagođeno prema Nilsen-Nygaard i sur., 2015)

## 2.2.2. Proteini

Biološki polimeri koji se sastoje od aminokiselina poznati kao proteini, postoje u različitim molekularnim strukturama kao što su globularni proteini, vlaknasti proteini i nasumične zavojnice koji su određeni aminokiselinskim profilom (Matalanis i sur., 2011). Proteini se mogu izolirati iz nusproizvoda životinjskog podrijetla kao što su proteini sirutke i želatina, ali i iz nusproizvoda biljnog podrijetla kao što su proteini žitarica i uljarica koji se intenzivno koriste za inkapsulaciju.

### ***Proteini sirutke***

Proteini sirutke vrijedan su nusproizvod industrije sira, klasificiran kao GRAS (*Generally Recognized as Safe*) i relativno jeftin, a intenzivno se primjenjuju u prehrambenoj industriji zahvaljujući njihovoj nutritivnoj i funkcionalnoj karakterizaciji (Comunian i Favaro-Trindade, 2016). Kombinacija su globularnih proteina s različitim molekularnim svojstvima, a najčešće komponente sirutke su  $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin, serumski albumin i imunoglobulini. Proteini sirutke pokazuju veliku topljivost u vodenom mediju kroz različite pH vrijednosti, dok se mala količina agregacije može dogoditi pri pH vrijednostima blizu njihove izoelektrične točke ( $pI \sim 5$ ) (McClements, 2014). Ovi proteini imaju izvrsna svojstva emulgiranja i geliranja zbog kojih se koriste za proizvodnju inkapsulata na bazi hidrogelova, razvoj sustava nanočestica, kao i za stvaranje složenih koacervata s brojnim polisaharidima (Ramos i sur., 2019).

### ***Proteini soje***

Soja (*Glycine max* L.) se smatra jednom od najčešće uzgajanih uljarica u svijetu, a jeftina je izdašna i obnovljiva sirovina uz izuzetnu ekonomsku vrijednost. Sjeme soje se sastoji od oko 20 % ulja i 40 % proteina na suhoj bazi (Comunian i Favaro-Trindade, 2016). Protein soje je poznat kao nutritivan, funkcionalan i pozitivan za ljudsko zdravlje s obzirom na dobru probavljivost i hipoalergeni potencijal. Osim pozitivnih učinaka na zdravlje, sojini proteini pokazuju brojna sjajna funkcionalna svojstva, prikladna za metode inkapsulacije, uključujući dobru topljivost i svojstva emulgiranja, svojstva geliranja i pjenjenja, apsorpciju vode i masti, pravilno stvaranje filma i visoku sklonost ka stvaranju agregata (Nesterenko i sur., 2013). Proteini soje naširoko se istražuju kao omotači za inkapsulaciju metodom koacervacije, a često se koriste prilikom metode sušenja raspršivanjem pogotovo za inkapsulaciju fitokemikalija (Comunian i Favaro-Trindade, 2016).

### ***Želatina***

Želatina je hidrokoloid koji se dobiva iz kolagena životinjskih izvora kao što su kravlja i svinjska koža i/ili kosti te ribe, a ima čestu primjenu u prehrambenoj industriji. Njezina molekulska masa varira od 15 000 do 400 000 Da ovisno o izvoru i procesu ekstrakcije. Visoka dostupnost i niska cijena dvije su glavne prednosti želatine kao omotača. Osim toga, želatina je topiva i biokompatibilna s mnogim bioaktivnim spojevima (Ali i sur., 2019). Funkcionalna svojstva želatine koja je čine privlačnom za industriju su dobro stvaranje gela i filma, visoka stabilizirajuća aktivnost i sposobnost stvaranja fine, guste mreže koja može biti korisna kao materijal za omotač u svrhu inkapsuliranja sušenjem raspršivanjem i emulgiranjem.

### **2.2.3. Lipidi, masti i ulja**

Lipidi, uključujući mliječnu mast i frakcije mliječne masti kao što su olein i stearin, biljne masti i ulja kao što su sojino ulje, ulje kanole, palmino ulje, suncokretovo ulje i njihove frakcije također se mogu koristiti za inkapsulaciju lipofilnih sastojaka hrane (Mellema i sur., 2006). Trigliceridi (ili triacilgliceroli, sastavljeni od molekule glicerola esterificirane s tri molekule masnih kiselina), digliceridi (ili diacilglicerol, sastavljeni od molekule glicerola esterificirane s dvije molekule masnih kiselina) i monogliceridi (ili ester s jednom masnom kiselinom) povezani su s obitelji glicerida. Tri, dva ili samo jedan masni lanac kovalentno su vezani za molekulu glicerola esterskim vezama. Digliceridi i monogliceridi pokazuju svojstva emulgiranja koja se mogu uzeti u obzir za dizajn i formulaciju inkapsulata. Točke tališta glicerida uvelike ovise o



njihovoj kemijskoj prirodi, a ovisi i o simetriji ostataka masnih kiselina te njihovoj raspodjeli u položajima ugljika. Na primjer, mliječne masti s najvišim talištem obično se koriste kao spoj sekundarnog premaza koji se nanosi na primarne inkapsulate ili na bioaktivne jezgre u prahu kako bi se poboljšala njihova svojstva barijere za vlagu. Osim toga, mogu se razlikovati dvije podskupine masnih kiselina, zasićene i nezasićene masne kiseline, s promjenjivom duljinom, različitim talištem i fizikalnim svojstvima, različitim konfiguracijama lanca – *cis*- i *trans*-, kratke, srednje i duge lančane masne kiseline s različitim brojem ugljika (Wandrey i sur., 2010). Lipidi i spojevi na bazi lipida također mogu biti korisni u svrhu inkapsulacije zbog svojih jedinstvenih svojstava taljenja, površinskih aktivnosti, a također su dobra barijera za kisik i vodu. Ovi se materijali mogu ugraditi u emulzijske formulacije kako bi se stvorila prevlaka oko bioaktivne jezgre, a hidrogenizirane masti također su prikazane kao dobra barijera za kisik i vodu (Samborska i sur., 2021).

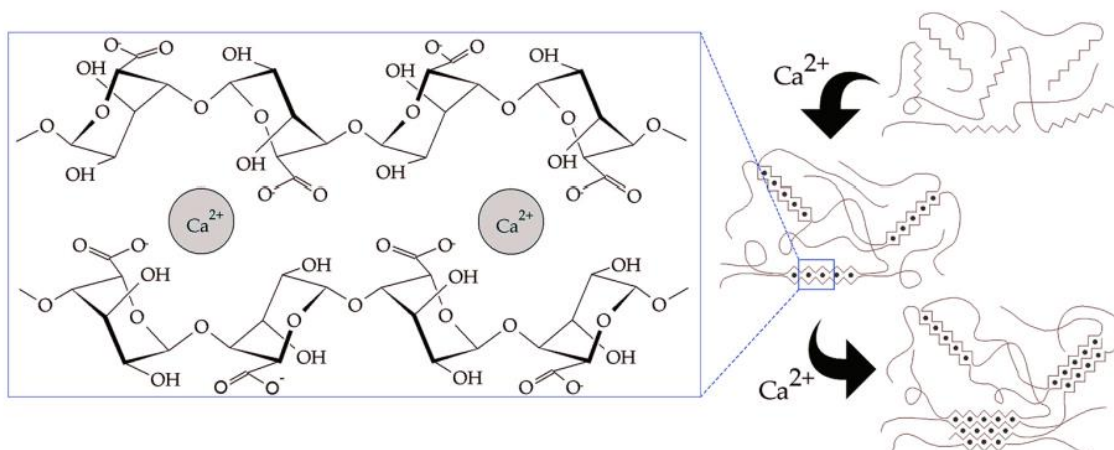
### ***Voskovi***

Voskovi mogu biti prikladan omotač u procesu inkapsulacije. Prirodni voskovi su esteri dugolančanih alkohola i masnih kiselina te su prirodno prisutni u biljkama ili životinjama. Neki od prirodnih voskova su kandelila vosak koji se dobiva iz lišća grma Candelilla, karnauba vosak koji potječe iz lišća palmi i pčelinji vosak. Sintetski voskovi, s druge strane, proizvode se kemijskim procesima u laboratorijskom ili industrijskom okruženju, a često se dobivaju iz nafte ili drugih petrokemijskih izvora te su smjesa ugljikovodika veće molekularne mase. Voskovi su poznati po svojoj hidrofobnosti i jedinstvenim reološkim i mikrostrukturnim svojstvima. Većina voskova pokazuje malu probavljivost u probavnim otopinama, što zauzvrat može ograničiti bioraspodjelivost inkapsuliranih komponenti. Takvi materijali kao omotači su korišteni u farmaceutskoj industriji za izradu višestrukih sustava za kontrolirano i odgođeno otpuštanje (Mellema i sur., 2006).

## **2.3. IONSKO GELIRANJE**

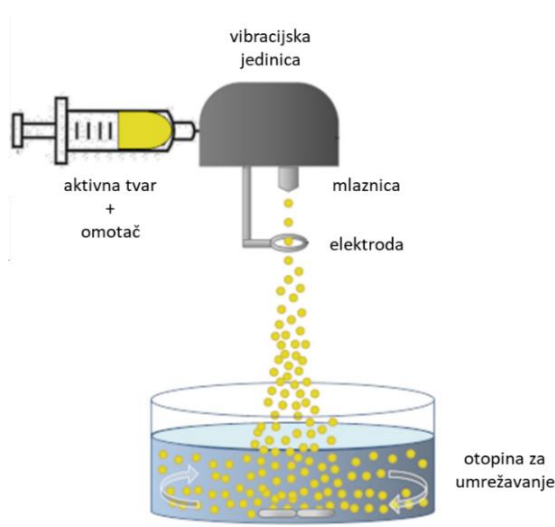
Ionsko ili ionotropsko geliranje je česta kemijska metoda inkapsulacije koja se temelji na sposobnosti polielektrolita za umrežavanje u prisutnosti viševalentnih iona kao što su  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  i  $\text{Al}^{3+}$  pri čemu nastaju hidrogelovi sferičnog oblika (Yeo i sur., 2001). U postupku ionskog geliranja, vodena otopina polimera kaplje kroz iglu šprice ili mlaznicu inkapsulatora u kupku

za geliranje koja sadrži sredstvo za umrežavanje, najčešće  $\text{CaCl}_2$ . Ioni kalcija nalaze se u elektronegativnim šupljinama, što se često ilustrira kao „egg-box“ model kao što je prikazano na **Slici 5**.



**Slika 5** „Egg-box“ model geliranja alginata sa ionima kalcija (da Silva i sur., 2017)

Ionske interakcije između glukuronatnih blokova najčešće korištenog omotača alginata i iona kalcija dovode do formiranja izrazito stabilnih hidrogelova. Konačna svojstva hidrogelova koji se proizvode značajno ovise o karakteristikama polimera koji se koristi i primijenjenom postupku pripreme. Naime, metoda ionskog geliranja može se provoditi na dva načina – vanjskim ili internim, tj. unutarnjim geliranjem. U vanjskom geliranju,  $\text{Ca}^{2+}$  ioni difundiraju iz vanjskog izvora u otopinu polimera (Davarci i sur., 2017) (**Slika 6**).



**Slika 6** Prikaz procesa vanjske metode ionskog geliranja (preuzeto i prilagođeno prema Almari i sur., 2019)

S druge strane, kod internog ionskog geliranja, otopina sredstva za umrežavanje se dodaje u otopinu omotača (polimera) i aktivne tvari, što rezultira stvaranjem inkapsulata s vodenom jezgrom (Funami i sur., 2009).

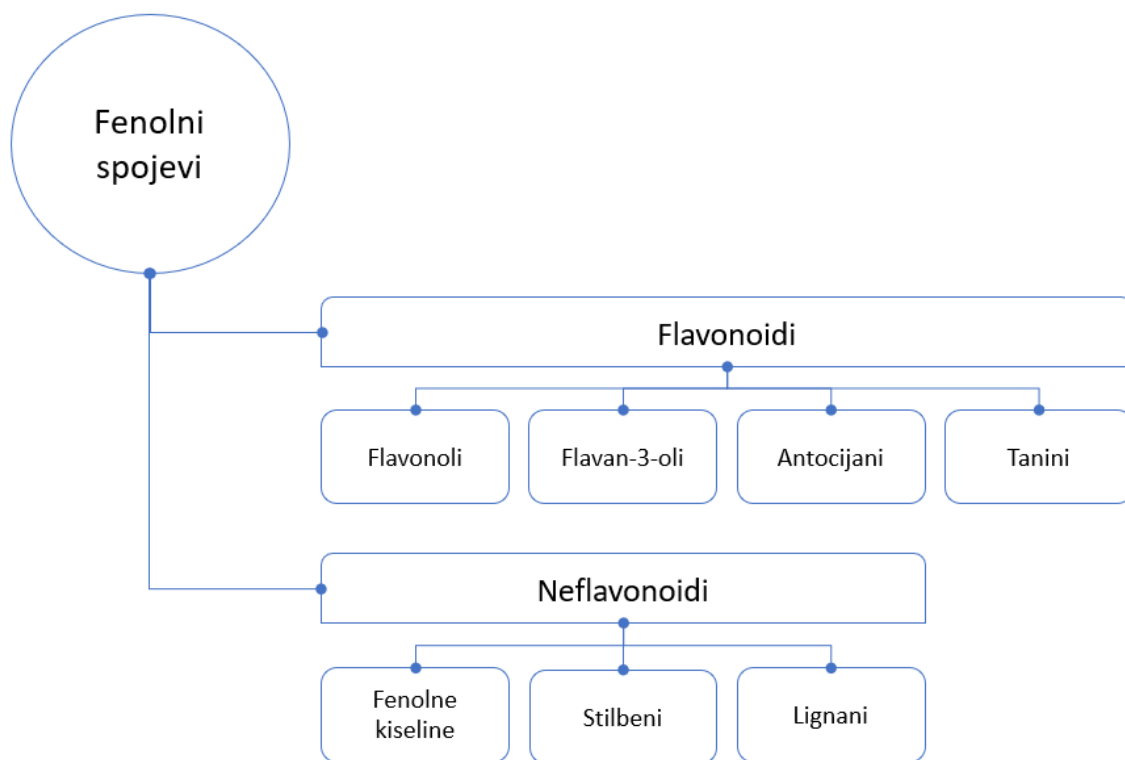
Svojstva proizvedenih hidrogelova pripremljenih metodom ionskog geliranja značajno ovise o različitim čimbenicima koji utječu i na sam proces ionskog geliranja. Koncentracija polimera, aktivne tvari i sredstva za umrežavanje igraju ključnu ulogu u oblikovanju svojstava hidrogelova te imaju utjecaj na učinkovitost procesa inkapsulacije aktivne tvari. Veličina hidrogelova podložna je promjeni ovisno o temperaturi na kojoj se provodi ionsko geliranje, a vrijeme umrežavanja (stvrđavanja) hidrogelova također je osjetljivo na temperaturne uvjete. Nadalje, brzina geliranja, oblik i veličina hidrogelova mogu ovisiti i o pH vrijednosti otopine za umrežavanje.

## **2.4. TROP GROŽĐA**

Vinova loza (*Vitis vinifera*) je trajna penjačica koja pripada porodici lozica (*Vitaceae*) i predstavlja jednu od najraširenijih kultura širom svijeta. Plodovi vinove loze su okrugle bobice koje se grupiraju u prepoznatljive grozdove, a veličina i karakteristike ploda značajno se razlikuju ovisno o sorti vinove loze i mogu se koristiti u raznim oblicima, bilo svježi, prerađeni ili suhi. Prerodom grožđa u vino nastaje čvrsti nusprodukt koji se naziva trop grožđa. Trop grožđa sastoji se od sjemenke, pulpe, kožice i peteljki grožđa. Iako je otpadni nusprodukt, trop grožđa je bogat i lako dostupan izvor vrijednih spojeva poput ulja, soli limunske, jabučne i vinske kiseline, vlakana te fenolnih spojeva. Na kemijski sastav tropa grožđa utječu sorta grožđa, stupanj zrelosti, berba i tehnološki proces vinifikacije (Arnous i Meyer, 2009). Tijekom procesa proizvodnje vina, čak 60 – 70 % fenolnih spojeva zaostaje u tropu grožđa, dok se ostatak ekstrahira u vino. Rastući broj istraživanja posvećen je istraživanju moguće primjene tropa grožđa u proizvodnji prehrambenih dodataka ili proizvoda s dodanom vrijednošću. To se prvenstveno temelji na bogatstvu fenolnih spojeva u tropu grožđa, koji imaju zaštitni učinak na ljudsko zdravlje.

## 2.5. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka, a odgovorni su za senzorska svojstva biljaka poput boje, arome i okusa. Također, igraju ključnu ulogu u zaštiti biljaka od štetnog zračenja, kao što je UV zračenje, te pomažu biljkama u borbi protiv bolesti i mikroorganizama (Grgić i sur., 2020). Strukturalno gledano, fenolni spojevi spadaju u aromatske spojeve s jednom ili više hidroksilnih skupina. Mogu se podijeliti u dvije osnovne grupe: flavonoidi i neflavonoidi, koji se dalje razvrstavaju u podskupine temeljem sličnosti njihovih kemijskih struktura (**Slika 7**) (Yu i Ahmedna, 2013).



**Slika 7** Osnovna podjela fenolnih spojeva

Flavonoidi su velika skupina prirodnih fenolnih spojeva, često prisutna u ljuskama voća i povrća. U prehrani, oni imaju ključnu ulogu u oblikovanju okusa i boje te djeluju kao antioksidansi. Nalaze se u raznovrsnim izvorima hrane, uključujući voće i povrće, zeleni i crni čaj, čokoladu, crno vino i bobičasto voće. Kod grožđa, veće količine flavonoida mogu se naći u sjemenkama, kožici i peteljnkama grožđa (Pichler, 2019). U nusproizvodima nastalim tijekom proizvodnje vina uglavnom se mogu naći flavanoli, proantocijanidini, flavoni, flavonoli i

antocijani. Flavone predstavlja luteolin (Garrido i Borges, 2013), a najzastupljeniji flavan-3-ol je katehin i njegovi derivati (El Gharras, 2009).

Neflavonoidi su skupina fenolnih spojeva strukturalno slični flavonoidima, ali se razlikuju prema kemijskoj strukturi. Ova grupa obuhvaća stilbene, lignane i fenolne kiseline. Najznačajniji derivati stilbena koji se nalaze u vinu i ostacima vina su derivati resveratrola (Cvejić i sur., 2010) te fenolne kiseline od kojih su uglavnom zastupljene *p*-hidroksibenzojeva, 3,4-dihidroksibenzojeva, taninska, vanilinska, derivati galne kiseline i siringinska kiselina (El Gharras, 2009).

## 3. EKSPERIMENTALNI RAD

### 3.1. ZADATAK

Zadatak rada bio je ispitati utjecaj različitih omotača prirodnog porijekla (natrijev alginat, te kombinacije natrijevog alginata sa želatinom, gumom arabikom i kitozanom) na učinkovitost inkapsulacije ukupnih fenolnih spojeva ekstrakta tropa grožđa sorte merlot pomoću metode inkapsulacije ionskim geliranjem.

### 3.2. MATERIJALI I METODE

#### 3.2.1. Materijal

Istraživanje je provedeno na tropu grožđa sorte merlot, berba 2018, prikupljeno iz vinarije Erdut. Trop grožđa je prethodno osušen na zraku (~ 48 h pri temperaturi od 25 – 27 °C) i samljeven na veličinu čestica od  $\leq 1$  mm ultracentrifugalnim mlinom (Retsch ZM200, Haan, Njemačka) prije upotrebe.

#### 3.2.2. Priprema ekstrakta

Fenolni spojevi iz tropa grožđa ekstrahirani su konvencionalnom kruto-tekućom ekstrakcijom u vodenoj kupelji (Julabo SW-23, Njemačka, **Slika 8**) pri 80 °C i trešnji 200 rpm tijekom 120 min koristeći svježe pripremljenu 50 %-tnu vodenu otopinu etanola. Prilikom ekstrakcije korišten je omjer kruto-tekuće 40 mL/g. Nakon ekstrakcije, uzorci su centrifugirani (Hermle Z 326 K, Njemačka), dobivajući dva sloja – kruti ostatak tropa i tekući ekstrakt bogat fenolnim spojevima. Tekući ekstrakt je uparen do suhog na rotavaporu (Büchi R-210, Švicarska; **Slika 9**) pri vakuumu od 48 mbar i temperaturi 50 °C. Nakon uparavanja, suhi ekstrakt je pripremljen za inkapsulaciju ionskim geliranjem.



**Slika 8** Vodena kupelj s tresilicom  
Julabo SW 23



**Slika 9** Rotavapor Büchi R-210

### 3.2.3. Inkapsulacija ionskim geliranjem

U čašu je izvagano 1,04 g suhog ekstrakta tropa grožđa i dodano je 20,8 mL 30 %-tne vodene otopine etanola te je naknadno dodano 79,2 mL destilirane vode, čime je postignuta koncentracija ekstrakta 10,4 mg/mL. Ekstrakt je zatim podvrgnut miješanju na magnetnoj miješalici tijekom 1 sat, nakon čega je centrifugiran pri 11 000  $\times g$  tijekom 5 minuta. Supernatant je odvojen i u njega je dodan omotač/i u potrebnoj koncentraciji (**Tablica 2**). Otopina omotača i aktivne tvari miješana je na magnetnoj miješalici 24 h prije procesa inkapsulacije kako bi se postigla homogenost. Prilikom inkapsulacije sa kitozonom, u supernatant je dodan samo natrijev alginat, dok je kitozan pripremljen prema niže opisanom postupku.

**Tablica 2** Omotači korišteni za inkapsulaciju liofilizacijom i njihove koncentracije

OZNAKA	OMOTAČ	c, (% w/v)
NA	natrij alginat	3
NA-ŽEL	natrij alginat	3
	želatina	5
NA-GA	natrij alginat	3
	guma arabika	1,6
NA-KZ	natrij alginat	3
	kitozan	1,5

Inkapsulacija je izvedena pomoću inkapsulatora Büchi B-390 (**Slika 10**) pri frekvenciji od 140 Hz, s naponom elektrode 750 V, promjerom mlaznice 300  $\mu\text{m}$  i tlakom 206 mbar. Smjesa aktivne tvari i omotača je prolazila kroz mlaznicu i kapala u otopinu za umrežavanje, koja je

bila 0,25 M vodena otopina  $\text{CaCl}_2$  te su se hidrogelovi stvrdnjavali 10 min u otopini za umrežavanje. Nakon inkapsulacije, hidrogelovi su filtrirani i potom dva puta isprani destiliranom vodom.



**Slika 10** Inkapsulator Büchi B-390

Tijekom inkapsulacije sa kitozonom, hidrogelovi sa 3 %-tnim natrijevim alginatom kao omotačem su pripremljeni koristeći ranije opisan postupak. Nakon procesa inkapsulacije, dobiveni hidrogelovi su filtrirani i potom uronjeni u 1,5 %-tnu otopinu kitozana, u kojoj su miješani tijekom 10 minuta. Otopina 1,5 %-tnog kitozana pripremljena je 24 h sata prije inkapsulacije kako bi se osiguralo potpuno otapanje kitozana, koji je bio otapan u 1 %-tnoj ledenoj octenoj kiselini. Nakon miješanja u kitozanu, hidrogelovi su opet filtrirani i isprani dva puta destiliranom vodom.

### **3.2.4. Određivanje ukupnih fenolnih tvari**

Udio ukupnih fenolnih tvari određen je kolorimetrijskom Folin-Ciocalteu metodom koja se temelji na reakciji fenolnih spojeva s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibdenove kiseline. U alkalnom mediju uz prisustvo FC reagensa, fenolni spojevi se oksidiraju, a navedene kiseline reduciraju u wolframov i molibdenov oksid (plavo obojeni) te se njihova apsorbancija mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm (Waterhouse, 2001). U svrhu ispitivanja učinkovitosti inkapsulacije, udio ukupnih fenolnih tvari određen je u ekstraktu koji je korišten za inkapsulaciju, prije dodatka omotača, te u otopini za umrežavanje i vodi kojom su se ispirali proizvedeni hidrogelovi.



### *Postupak*

U epruvete je dodano 40  $\mu\text{L}$  uzorka, 3160  $\mu\text{L}$  destilirane vode i 200  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa. Uzorci su promiješani te je nakon 8 minuta dodano 600  $\mu\text{L}$  20 %-tne vodene otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i uzorci su opet dobro promiješani i inkubirani u vodenoj kupelji na 40 °C. Nakon 30 minuta očitana je apsorbancija na 765 nm pomoću UV/VIS spektrofotometra (Shimadzu UV-1280, Japan), a sva mjerenja provedena su u tri ponavljanja. Slijepa proba pripremljena je na isti način, ali je umjesto uzorka dodan isti volumen destilirane vode.

Kalibracijska krivulja je izrađena koristeći otopine galne kiseline s koncentracijama od 0,05 do 1,0 mg/mL. Na temelju izmjerenih apsorbancija prema prethodno opisanom postupku, metodom linearne regresije dobivena je jednadžba pravca prema kojoj je računata koncentracija ukupnih fenolnih spojeva (1):

$$c = 1,0188 \cdot A + 0,018 \quad (1)$$

gdje je:  $c$  – masena koncentracija ukupnih fenolnih spojeva (mg/mL), a  $A$  – izmjerena apsorbancija uzorka pri valnoj duljini 765 nm.

Kako bi se mogla odrediti učinkovitost inkapsulacije ukupnih fenolnih spojeva (UF), dobiveni rezultati su preračunati na masu UF-a prisutnih u ekstraktu koji je inkapsuliran te na masu UF-a prisutnih u tekućini (otopina  $\text{CaCl}_2$  + voda za ispiranje inkapsulata) zaostaloj nakon inkapsulacije pomoću izraza (2):

$$m_{UF} = c \cdot V \cdot DF \quad (2)$$

gdje je:  $m_{UF}$  – masa ukupnih fenolnih spojeva u uzorku (mg),  $V$  – volumen otapala korišten za otapanje ekstrakta prilikom pripreme za inkapsulaciju odnosno volumen  $\text{CaCl}_2$  i vode za ispiranje nakon inkapsulacije (mL), a  $DF$  – faktor razrjeđenja.

### **3.2.5. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije**

Učinkovitost inkapsulacije ( $EE$ ) određena je na temelju mase slobodnih i u hidrogelovima vezanih fenolnih spojeva. Slobodni fenolni spojevi obuhvaćaju one spojeve koji su ostali u

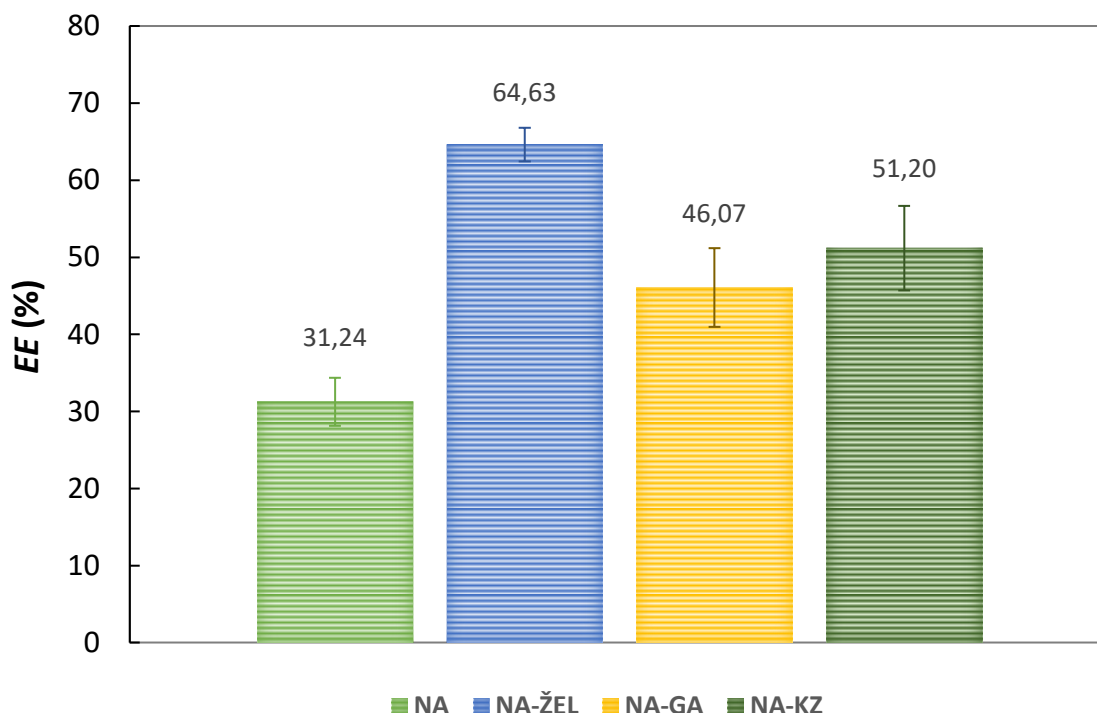
otopini CaCl<sub>2</sub> nakon stvrdnjavanja hidrogelova, kao i one koji su se isprali sa površine hidrogelova tijekom postupka ispiranja destiliranom vodom.

Učinkovitost inkapsulacije (*EE*) izračunata je prema izrazu **(3)**:

$$EE (\%) = \frac{m_A - m_B}{m_A} \cdot 100 \quad (3)$$

gdje je:  $m_A$  – masa ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktu pripremljenom za inkapsulaciju (mg)  
i  $m_B$  – masa ukupnih fenolnih spojeva u otopini CaCl<sub>2</sub> i vodi ostaloj nakon ispiranja hidrogelova (mg). Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost ± SD.

## 4. REZULTATI



**Slika 11** Utjecaj dodatka omotača na učinkovitost inkapsulacije (*EE*) ukupnih fenolnih spojeva ekstrakta tropa grožđa sorte merlot pomoću omotača prirodnog porijekla: natrijevog alginata (NA) te kombinacije NA sa želatinom (NA-ŽEL), gumom arabikom (NA-GA) i kitozonom (NA-KZ)

Ispitivanjem utjecaja omotača prirodnog porijekla na *EE* ukupnih fenolnih spojeva iz ekstrakta tropa grožđa sorte merlot metodom ionskim geliranjem (**Slika 11**) dokazano je da je dodatak sekundarnog omotača natrijevom alginatu utjecao na povećanje *EE* u odnosu na *EE* kada je korišten samo natrijev alginat. Najbolja učinkovitost je ostvarena kada je korišten omotač NA-ŽEL (64,63 %), a potom ju slijede *EE* ostvarene uz primjenu NA-KZ (51,20 %), NA-GA (46,07 %) te NA (31,24 %). ŽEL je protein, a poznato je da su proteini sposobni stvarati vodikove i hidrofobne veze s fenolnim spojevima te se vezati za slobodne karboksilne skupine polimera što objašnjava i najbolju *EE* postignutu s omotačem NA-ŽEL. Kitozan, zbog svoje kationske prirode, stvara membranu oko polianionskog alginata, formirajući veze između karboksilnih skupina alginata i protoniranih amino skupina kitozana. Ovaj proces, smanjio je gubitak fenolnih spojeva tijekom inkapsulacije i utjecao na povećanje *EE* u odnosu na čisti NA. GA je polisaharid, ali sadrži i proteinsku komponentu koja je utjecala na povećanje *EE* fenolnih

spojeva u odnosu na čisti NA. Osim toga GA je utjecala na smanjenje poroznosti NA hidrogelova, sprečavajući "curenje"

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i analize rezultata, može se zaključiti da učinkovitost procesa ionskog geliranja u inkapsulaciji fenolnih spojeva ekstrahiranih iz tropa grožđa ovisi o vrsti i kombinaciji omotača. U ovom radu postignuta je najveća učinkovitost inkapsulacije ukupnih fenolnih spojeva (64,63 %) korištenjem kombinacije 3 %-tnog natrijevog alginata i 5 %-tne želatine. Također, uočeno je da dodavanje sekundarnog omotača natrijevom alginatu značajno poboljšava učinkovitost inkapsulacije u usporedbi s korištenjem samo natrijevog alginata kao omotača.

## 6. LITERATURA

- Ali OM, Hashem Y, Bekhit AA, Khattab SN, Elkhodairy KA, Freag MS, Elzoghby AO: Nanostructures of gelatin for encapsulation of food ingredients. U *Biopolymer nanostructures for food encapsulation purposes*, str. 189-216. Academic Press, Massachusetts, USA, 2019.
- Almari B, Brough D, Harte M, Tirella A: Fabrication of amyloid- $\beta$ -secreting alginate microbeads for use in modelling alzheimer's disease. *Journal of Visualized Experiments* 149:e59597, 2019.
- Arnous A, 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* 57:3911-3619, 2009.
- Bamidele OP, Emmambux MN: Encapsulation of bioactive compounds by "extrusion" technologies: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1–19, 2020.
- Casadidio C, Peregrina DV, Gigliobianco MR, Deng S, Censi R, Di Martino P: Chitin and chitosans: Characteristics, eco-friendly processes, and applications in cosmetic science. *Marine Drugs* 17:369, 2019.
- Chew SC, Tan CP, Nyam KL: Microencapsulation of refined kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seed oil by spray drying using  $\beta$ -cyclodextrin/gum Arabic/ sodium caseinate. *Journal of Food Engineering* 237:78–85, 2018.
- Comunian TA, Favaro-Trindade CS: Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. *Food Hydrocolloids* 61:442–457, 2016.
- Cvejić J, Djekić S, Petrović A, Atanacković M, Brćeski I, Gojković-Bukarica L: Determination of trans- and cis-resveratrol in Serbian commercial wines. *Journal of Chromatographic Science* 48:229-234, 2010.
- Davarcı F, Turan D, Ozcelik B, Poncelet D: The influence of solution viscosities and surface tension on calcium-alginate microbead formation using dripping technique. *Food Hydrocolloids* 62:119-127, 2017.
- Desai KGH, Jin Park H: Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology* 23:1361-1394, 2005.
- Ding J, Xu Z, Qi B, Cui S, Wang T, Jiang L, Sui X: Fabrication and characterization of soybean oil bodies encapsulated in maltodextrin and chitosan-EGCG conjugates: An *in vitro* digestibility study. *Food Hydrocolloids* 94:519–527, 2019.

- de Vos P, Faas, MM, Spasojevic M, Sikkema J: Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal* 2:292–302, 2010.
- Dorđević V, Balanč B, Belščak-Cvitanović A, Lević S, Trifković K, Kalušević A, Nedović V: Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Engineering Reviews* 7:452–490, 2014.
- Eghbal N, Choudhary R: Complex coacervation: encapsulation and controlled release of active agents in food systems. *Food Science and Technology* 90:254–264, 2018.
- El Gharras H: Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *International Journal of Food Science & Technology* 44:2512–2518, 2009.
- Fang Z, Bhandari B: Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology* 21:510–523, 2010.
- Fatnassi M, Tourné-Péteilh C, Peralta P, Cacciaguerra T, Dieudonné P, Devoisselle J-M, Alonso B: Encapsulation of complementary model drugs in spray-dried nanostructured materials. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 68:307–316, 2013.
- Funami T, Fang Y, Noda S, Ishihara S, Nakauma M, Draget KI, Nishinari K, Phillips GO: Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca<sup>2+</sup> binding. *Food Hydrocolloids* 23:1746–1755, 2009.
- Garrido J, Borges F: Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. *Food Research International* 54:1844–1858, 2013.
- Grgić J, Šelo G, Planinić M, Tišma M, Bucić-Kojić A: Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds. *Antioxidants* 9:923, 2020.
- Kumar V, Sangeetha K, Ajitha P, Aisverya S, Sashikala S, Sudha PN: Chitin and chitosan: The defense booster in agricultural field. U *Handbook of biopolymers: Advances and multifaceted applications*. Jenny Stanford Publishing, Singapur, 2018.
- Lu W, Kelly AL, Miao S: Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. *Trends in Food Science & Technology*, 47:1–9, 2016.
- Marques HMC: A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal* 25:313–326, 2010.
- Matalanis A, Jones OG, McClements DJ: Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids* 25:1865–1880, 2011.
- McClements DJ: *Nanoparticle-and microparticle-based delivery systems: Encapsulation, protection and release of active compounds*. CRC press, Boca Raton, USA, 2014.

- Mellema M, Van Benthum W, Boer B, Von Harras J, Visser A: Wax encapsulation of water-soluble compounds for application in foods. *Journal of Microencapsulation* 23:729–740, 2006.
- Mohamed Ahmed IA, Özcan MM, Al Juhaimi F, Babiker EFE, Ghafoor K, Banjanin T, Osman MA, Gassem 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.
- Nejatian M, Abbasi S, Azarikia F: Gum tragacanth: structure, characteristics and applications in foods. *International Journal of Biological Macromolecules* 160:846-860, 2020.
- Nesterenko A, Alric I, Silvestre F, Durrieu V: Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products* 42:469–479, 2013.
- Nikitenko NA, Prassolov VS: Non-viral delivery and therapeutic application of small interfering RNAs. *Acta Naturae* 5:35-53, 2013.
- Nilsen-Nygaard J, Strand SP, Vårum KM, Draget KI, Nordgård CT: Chitosan: gels and interfacial properties. *Polymers* 7:552-579, 2015.
- Ozkan G, Franco P, De Marco I, Xiao J, Capanoglu E: A Review of microencapsulation methods for food antioxidants: principles, advantages, drawbacks and applications. *Food Chemistry* 272: 494-506, 2019.
- Paques JP, van der Linden E, van Rijn CJM, Sagis LMC: Preparation methods of alginate nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface* 209:163–171, 2014.
- Peteiro C: Alginate production from marine macroalgae, with emphasis on kelp farming. U *Alginates and their biomedical applications*. Springer, Singapur, 2018.
- Pichler A: Mehanički sastav grožđa i kemijski sastav grožđa. Nastavni materijali. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2019.
- Ramos OL, Pereira RN, Simões LS, Madalena DA, Rodrigues RM, Teixeira JA, Vicente AA: Biopolymer nanostructures for food encapsulation purposes. U *Nanoencapsulation in the food industry series*, str. 69–100. Academic Press, Massachusetts, USA, 2019.
- Rattes ALR, Oliveira WP: Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. *Powder Technology* 171:7–14, 2007.
- Raza ZA, Khalil S, Ayub A, Banat IM: Recent developments in chitosan encapsulation of various active ingredients for multifunctional applications. *Carbohydrate Research* 108004, 2020.
- Rezvankhah A, Emam-Djomeh Z, Askari G: Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: A review. *Drying Technology* 38:235-258, 2019.



- Rostamabadi H, Assadpour E, Tabarestani HS, Falsafi SR, Jafari SM: Electrospinning approach for nanoencapsulation of bioactive compounds; recent advances and innovations. *Trends in Food Science & Technology* 100:190–209, 2020.
- Sahoo S, Singh VK, Uvanesh K, Biswal D, Anis A, Rana UA, Pal K: (2015). Development of ionic and non-ionic natural gum-based bigels: Prospects for drug delivery application. *Journal of Applied Polymer Science* 132, 2015.
- Samborska K, Boostani S, Geranpour M, Hosseini H, Dima C, Khoshnoudi-Nia S, Rostamabadi H, Falsafi SR, Shaddel R, Akbari-Alavijeh S, Jafari SM: Green biopolymers from by-products as wall materials for spray drying microencapsulation of phytochemicals. *Trends in Food Science & Technology* 108:297–325, 2021.
- Schafroth N, Arpagaus C, Jadhav UY, Makne S, Douroumis D: Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 90:8–15, 2012.
- da Silva TL, Vidart JMM, da Silva MGC, Gimenes ML, Vieira MGA: Alginate and sericin: Environmental and pharmaceutical applications. U *Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides*, str. 57 – 85. InTechOpen, London, UK, 2017.
- Taheri A, Jafari SM: Gum-based nanocarriers for the protection and delivery of food bioactive compounds. *Advances in Colloid and Interface Science* 269:277–295, 2019.
- Tyliszczak B, Drabczyk A, Kudłacik-Kramarczyk S, Sobczak-Kupiec A: Sustainable production of chitosan. U *Sustainable production: Novel trends in energy, environment and material systems*, str. 45-60. Springer, Berlin, Njemačka, 2020.
- Wandrey C, Bartkowiak A, Harding SE: Materials for encapsulation. U *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*, str. 31–100. Springer, New York, SAD, 2010.
- Wang B, Akanbi TO, Agyei D, Holland BJ, Barrow CJ: Coacervation Technique as an Encapsulation and Delivery Tool for Hydrophobic Biofunctional Compounds. U *Role of materials science in food bioengineering*, str. 235-261. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2018a.
- Wang B, Wan Y, Zheng Y, Lee X, Liu T, Yu Z, Huang J, Ok YS, Chen J, Gao B: Alginate-based composites for environmental applications: a critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 49:318-356, 2018b.
- Waterhouse AL: Determination of total phenolics. U *Current protocols in food analytical chemistry*, str. I1.1.1–I1.1.8. John Wiley & Sons Inc, New York, SAD, 2001.
- Webber V, de Siqueira Ferreira D, Barreto PLM, Weiss-Angeli V, Vanderlinde R: (2018). Preparation and characterization of microparticles of  $\beta$ -cyclodextrin/glutathione and chitosan/glutathione obtained by spray-drying. *Food Research International* 105:432–439, 2018.

Weiping W, Branwell A: Tragacanth, Karaya. U *Handbook of Hydrocolloids*, str. 231-246. Woodhead publishing, Sawston, UK, 2000.

Williams PA, Phillips GO: Gum Arabic. U *Handbook of Hydrocolloids*, str. 252-273. Glyndwr University, UK, 2009.

Xiao Z, Hou W, Kang Y, Niu Y, Kou X: Encapsulation and sustained release properties of watermelon flavor and its characteristic aroma compounds from  $\gamma$ -cyclodextrin inclusion complexes. *Food Hydrocolloids* 97:105202, 2019.

Yeo Y, Baek N, Park K: Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 6:213-230, 2001.

Yu J, Ahmedna M: Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science & Technology* 48:221-237, 2013.