

Mikroinkapsulacija ekstrakta tropa grožđa metodom sušenja raspršivanjem uz primjenu proteina kozje sirutke kao glavnog omotača

Perković, Gabriela

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

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:109:000312>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**

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**

Gabriela Perković

**MIKROINKAPSULACIJA EKSTRAKTA TROPA GROŽĐA
METODOM SUŠENJA RASPRŠIVANJEM UZ PRIMJENU PROTEINA
KOZJE SIRUTKE KAO GLAVNOG OMOTAČA**

DOKTORSKI RAD

Osijek, studeni 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DOKTORSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Doktorski studij Prehrambena tehnologija i nutricionizam
Smjer: Prehrambena tehnologija

Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za mehaničke, toplinske i separacijske procese
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska
UDK: 66.061: 663.26(043.3) ; 663.26: 637.344(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Znanstvena grana: Inženjerstvo

Tema rada je prihvaćena na V. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 28. veljače 2024.

Mentor: prof. dr. sc. Mirela Planinić

MIKROINKAPSULACIJA EKSTRAKTA TROPA GROŽĐA METODOM SUŠENJA RASPRŠIVANJEM UZ PRIMJENU PROTEINA KOZJE SIRUTKE KAO GLAVNOG OMOTAČA Gabriela Perković, 0113140210

Sažetak:

Trop grožđa i kozja sirutka nusprodukti su prehrambene industrije koji obiluju organskim tvarima te je njihovo neplansko odlaganje u okoliš nepoželjno. Istodobno, bioaktivne tvari koje imaju u svom sastavu čine ove nusprodukte poželjnim sirovinama u postupcima *upcyclinga*. Stoga je u ovom radu korištena kruto-tekuća ekstrakcija za izdvajanje bioaktivnih tvari iz tropa grožđa, te sušenje raspršivanjem za mikroinkapsulaciju dobivenih ekstrakata s ciljem stabilizacije ekstrahiranih spojeva i očuvanja njihove biodostupnosti. Proteini kozje sirutke korišteni su kao omotač, a temperatura ulaznog zraka od 173,5 °C, brzina pojenja od 7 mL/min i omjer „omotač : ekstrakt“ od 2,5 određeni su kao optimalni uvjeti inkapsulacije pri čemu je ostvaren visok prinos (85,2 %) i efikasnost inkapsulacije (95,5 %), uz zadovoljavajuće nisku vlažnost proizvoda (< 5 %). Dodatak ko-omotača ugljikohidratnog tipa, i to 10 % trehaloze, saharoze ili ksiloze, odnosno 5 % maltodekstrina rezultirao je polukristalnom strukturom mikrokapsula, pri čemu se trehaloza pokazala kao najučinkovitija u povećanju stabilnosti mikrokapsula tijekom skladištenja. Zabilježen je izraženiji stabilizirajući učinak mikroinkapsulacije na fenolne spojeve tijekom skladištenja u odnosu na antocijane. Simulirana *in vitro* probava ukazuje da proteini kozje sirutke doprinose očuvanju biodostupnosti fenolnih spojeva ekstrahiranih iz tropa grožđa te da zajedno čine visokovrijedan funkcionalni proizvod.

Ključne riječi: inkapsulacija, sušenje raspršivanjem, trop grožđa, kozja sirutka, polifenoli

Rad sadrži: 137 stranica
43 slike
23 tablice
238 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu:

| | | |
|----|---|---------------|
| 1. | prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić | predsjednik |
| 2. | izv. prof. dr. sc. Mirela Lučan Čolić | član |
| 3. | dr. sc. Gordana Šimić, ZSV | član |
| 4. | prof. dr. sc. Daliborka Koceva Komlenić | zamjena člana |
| 5. | prof. dr. sc. Nela Nedić Tiban | zamjena člana |

Datum obrane: 22. studenog 2024.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu Sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu te u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku

BASIC DOCUMENTATION CARD

DOCTORAL THESIS

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Doctoral Study Food Technology and Nutrition

Department of Process Engineering
Subdepartment of Mechanical, Thermal and Separation Processes
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

UDC: 66.061: 663.26(043.3) ; 663.26: 637.344(043.3)

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food Technology

Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. V held on 28 February 2024.

Mentor: Mirela Planinić, PhD, full professor

MICROENCAPSULATION OF GRAPE POMACE EXTRACT BY SPRAY DRYING USING GOAT WHEY PROTEIN AS THE MAIN COATING MATERIAL

Gabriela Perković, 0113140210

Summary:

Grape pomace and goat whey are by-products of the food industry that are rich in organic substances and whose unplanned disposal into the environment is undesirable. At the same time, the bioactive substances they contain make these by-products suitable raw materials for upcycling processes. Therefore, solid-liquid extraction was used in this work to extract bioactive substances from the grapes and spray drying to microencapsulate the extracts obtained, with the aim of stabilising the extracted compounds and preserving their bioavailability. Goat whey proteins were used as coating. Optimal encapsulation conditions were determined to be an air inlet temperature of 173.5 °C, a feed rate of 7 mL/min and a "coating : extract" ratio of 2.5, resulting in a high yield (85.2 %) and encapsulation efficiency (95.5 %) with satisfactorily low product moisture (< 5 %). The addition of a carbohydrate-type co-coating, namely 10 % trehalose, sucrose or xylose or 5 % maltodextrin, resulted in a semi-crystalline structure of the microcapsules, with trehalose proving to be particularly effective in increasing the stability of the microcapsules during storage. The stabilisation of phenolic compounds during storage by microencapsulation was more pronounced compared to anthocyanins. Simulated *in vitro* digestion shows that goat whey proteins help to maintain the bioavailability of phenolic compounds extracted from tropical grapes and that together they form a high-value functional product.

Key words: encapsulation, spray drying, grape pomace, goat whey, polyphenols

Thesis contains: 137 pages
43 figures
23 tables
238 references

Original in: Croatian

Review (Evaluation) committee:

| | | |
|----|---|---------------------|
| 1. | Ana Bucić-Kojić, PhD, Full Professor | chair person |
| 2. | Mirela Lučan Čolić, PhD, Associate Professor | member |
| 3. | Gordana Šimić, PhD, Senior Scientific Adviser | member |
| 4. | Daliborka Koceva Komlenić, PhD, Full Professor | stand-in |
| 5. | Nela Nedić Tiban, PhD, Full Professor | stand-in |

Defense date: 22 November 2024

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek; Rector's office, University of Osijek; University Library in Zagreb and in University Library in Osijek

DOKTORSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA

22. studenog 2024.,

pred Povjerenstvom za obranu doktorskog rada:

1. **prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić**, predsjednik Ana Bucić-Kojić
(potpis)
2. **izv. prof. dr. sc. Mirela Lučan Čolić**, član Mirela Čolić
(potpis)
3. **dr. sc. Gordana Šimić**, ZSV, član G. Šimić
(potpis)



Ovaj doktorski 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) i bilateralnog projekta Hrvatska-Mađarska „Inkapsulacija ekstrakata bogatih polifenolima iz ostataka prehrambene industrije i karakterizacija inkapsuliranih čestica” (HRHUN-2020-011).

Najveća hvala mojim roditeljima, Ružici i Marku, zbog kojih sam ovo što sam danas. Hvala Vam za svaku pohvalu i kritiku, svako pruženo rame za plakanje i beskrajnu ljubav. Hvala Vam što ste vjerovali u mene i kada ja nisam. Hvala Vam što ste mi omogućili sve, a moje je bilo "samo učiti". Drago mi je što sam vas učinila ponosnima ♡

Veliko hvala svim mojim prijateljima na ogromnoj podršci, svakoj kritici i pohvali. Hvala što ste bili tu i kad je bilo prekrasno, a i onda kad je bilo manje lijepo.

Veliko hvala mojoj predivnoj kolegici iz ureda, Anđeli, za sav smijeh, šale, savjete, kave i lijepe dane u našem uredu bez prozora.

Zahvaljujem se i svojoj mentorici prof. dr. sc. Mireli Planinić na strpljenju i pomoći pri izradi ovog doktorskog rada.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 4 |
| 2.1. Trop grožđa | 5 |
| 2.2. Polifenolni spojevi | 6 |
| 2.2.1. Fenolne kiseline..... | 6 |
| 2.2.2. Flavonoidi..... | 7 |
| 2.2.3. Stilbeni | 8 |
| 2.2.4. Lignani | 9 |
| 2.3. Mogućnosti iskorištenja tropa grožđa | 9 |
| 2.4. Sirutka | 10 |
| 2.4.1. β -laktoglobulin | 11 |
| 2.4.2. α -laktoalbumin | 11 |
| 2.4.3. Imunoglobulini | 11 |
| 2.4.4. Goveđi serumski albumin..... | 12 |
| 2.4.5. Laktoferin i laktoperoksidaza | 12 |
| 2.5. Mogućnosti iskorištenja sirutke | 12 |
| 2.6. Inkapsulacija | 14 |
| 2.7. Sušenje raspršivanjem - mikroinkapsulacija | 15 |
| 2.7.1. Utjecaj temperature sušenja raspršivanjem na karakteristike mikrokapsula..... | 19 |
| 2.7.2. Utjecaj odabira omotača na karakteristike mikrokapsula | 20 |
| 2.7.3. Utjecaj protoka i koncentracije pojne (inkapsulacijske) smjese na karakteristike mikrokapsula | 23 |
| 2.7.4. Utjecaj protoka zraka za sušenje na karakteristike mikrokapsula | 24 |
| 2.7.5. Utjecaj odabira ciklona na karakteristike mikrokapsula..... | 24 |
| 2.8. Bioraspoloživost i biodostupnost fenolnih spojeva | 25 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 27 |
| 3.1. Zadatak | 28 |
| 3.2. Materijali | 30 |
| 3.2.1. Sirovina | 30 |
| 3.2.2. Omotači i ko-omotači..... | 30 |
| 3.2.3. Kemikalije | 30 |
| 3.2.4. Uređaji..... | 31 |
| 3.3. Metode | 32 |
| 3.3.1. Određivanje kemijskog sastav tropa grožđa | 32 |
| 3.3.1.1. Određivanje udjela suhe tvari i vlage u tropu grožđa | 32 |
| 3.3.1.2. Određivanje udjela pepela u tropu grožđa | 33 |
| 3.3.1.3. Određivanje udjela proteina u tropu grožđa | 33 |
| 3.3.1.4. Određivanje udjela ukupnog ugljika, anorganskog ugljika, ukupnog organskog ugljika i ukupnog dušika u uzorcima tropa grožđa..... | 34 |
| 3.3.1.5. Određivanje udjela neutralnih detergent vlakana, kiselih detergent vlakana i kiselog detergent lignina..... | 35 |
| 3.3.1.6. Određivanje udjela masti u uzorcima tropa grožđa | 37 |
| 3.3.1.7. Priprema ekstrakta tropa grožđa | 38 |
| 3.3.1.8. Određivanje koncentracije ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktima tropa grožđa | 38 |
| 3.3.1.9. Određivanje koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima tropa grožđa..... | 39 |
| 3.3.1.10. Određivanje koncentracije pojedinačnih antocijana u ekstraktima tropa grožđa..... | 40 |
| 3.3.1.11. Određivanje koncentracije ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina u ekstraktima tropa grožđa..... | 41 |
| 3.3.1.12. Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida u ekstraktima tropa grožđa | 41 |
| 3.3.1.13. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom | 42 |
| 3.3.1.14. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta FRAP metodom..... | 43 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 3.3.1.15 | Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom | 44 |
| 3.3.1.16 | Određivanje koncentracije šećera u ekstraktima tropa grožđa | 46 |
| 3.3.1.17 | Određivanje koncentracije proteina Bradfordičinom metodom | 47 |
| 3.3.2. | Optimiranje procesa mikroinkapsulacije ekstrakta tropa grožđa uz primjenu proteina kozje sirutke kao omotača..... | 48 |
| 3.3.3. | Mikroinkapsulacija ekstrakta grožđa uz primjenu proteinskog omotača i ugljikohidratnog ko-omotača | 51 |
| 3.3.4. | Određivanje svojstava mikrokapsula..... | 51 |
| 3.3.4.1 | Određivanje koncentracije ukupnih fenolnih tvari u uzorcima mikrokapsula | 51 |
| 3.3.4.2 | Određivanje koncentracije površinskih fenolnih spojeva u uzorcima mikrokapsula..... | 52 |
| 3.3.4.3 | Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida i ukupnih ekstatibilnih proantocijanidina u uzorcima mikrokapsula | 53 |
| 3.3.4.4 | Određivanje antioksidacijske aktivnosti u uzorcima mikroapsula..... | 53 |
| 3.3.4.5 | Određivanje efikasnosti inkapsulacije | 53 |
| 3.3.4.6 | Određivanje topivosti mikrokapsula..... | 53 |
| 3.3.4.7 | Određivanje prinosa inkapsulacije..... | 54 |
| 3.3.4.8 | Određivanje udjela suhe tvari/vlage | 54 |
| 3.3.4.9 | Određivanje boje mikrokapsula..... | 55 |
| 3.3.4.10 | Gustoća mikrokapsula prije potresanja i nakon potresanja | 56 |
| 3.3.4.11 | Određivanje svojstava kompresibilnosti karaktera i tecivosti mikrokapsula..... | 56 |
| 3.3.4.12 | Analiza rendgenske difrakcije mikrokapsula..... | 57 |
| 3.3.4.13 | Diferencijalna skenirajuća kalorimetrijska analiza..... | 57 |
| 3.3.4.14 | Mjerenje veličine čestica optičkim mikroskopom | 57 |
| 3.3.4.15 | Analiza morfologije mikrokapsula pretražnim elektronskim mikroskopom | 58 |
| 3.3.4.16 | Određivanje kuta kvašenja | 58 |
| 3.3.4.17 | Analiza raspodjele veličine čestica difrakcijom laserskog svjetla | 58 |
| 3.3.5. | Test ubrzanog starenja mikrokapsula..... | 59 |
| 3.3.6. | Simulirana probava mikrokapsula | 60 |
| 3.3.6.1 | <i>In vitro</i> simulirana probava bez enzima..... | 60 |
| 3.3.6.2 | <i>In vitro</i> simulirana probava s enzimima | 60 |
| 3.3.6.3 | Indeks biodostupnosti..... | 61 |
| 3.3.6.4 | UHPLC analiza pojedinačnih polifenola i antocijana u uzorcima probave mikrokapsula | 62 |
| 3.3.6.5 | Određivanje koncentracije fenolnih tvari i antioksidacijske aktivnosti u uzorcima probave mikrokapsula | 62 |
| 3.3.7. | Statistička analiza..... | 62 |
| 4. | REZULTATI I RASPRAVA | 63 |
| 4.1. | Kemijski sastav tropa grožđa | 64 |
| 4.2. | Optimalni uvjeti homogenizacije inkapsulacijske smjese | 66 |
| 4.3. | Optimiranje mikroinkapsulacije | 68 |
| 4.4. | Svojstva mikrokapsula dobivenih primjenom proteinskog omotač i ko-omotača ugljikohidratnog tipa .. | 77 |
| 4.5. | Rezultati simulirane probave mikrokapsula | 94 |
| 4.5.1. | Rezultati <i>in vitro</i> simulirane probave mikrokapsula bez enzima | 94 |
| 4.5.2. | Rezultati <i>in vitro</i> simulirane probave mikrokapsula s enzimima..... | 96 |
| 4.6. | Rezultati ispitivanja stabilnosti mikrokapsula..... | 106 |
| 4.6.1. | Rezultati ispitivanja stabilnosti mikrokapsula korištenjem testa ubrzanog starenja | 106 |
| 4.6.2. | Rezultati ispitivanja stabilnosti mikrokapsula nakon jedne godine skladištenja pri – 80 °C..... | 108 |
| 5. | ZAKLJUČCI..... | 115 |
| 6. | LITERATURA | 120 |

Popis oznaka, kratica i simbola

Oznake

| | |
|----------------------|---|
| <i>A</i> | apsorbancija svjetlosti |
| <i>C</i> | maseni udio (mg/g _{s.t.}) |
| <i>C'</i> | masena koncentracija (mg/mL) |
| <i>d</i> | promjer kivete (cm) |
| <i>l</i> | dužina optičkog puta (cm) |
| <i>m</i> | masa (mg, g, kg) |
| <i>M</i> | molarna masa (g/mol) |
| <i>V</i> | ukupni volumen ekstrakta tropa grožđa (L) |
| <i>w</i> | maseni udio (%) |
| <i>T_i</i> | temperatura ulaznog zraka (°C) |
| <i>R</i> | udio omotača (-) |
| <i>Q</i> | protok pojne smjese (mL/min) |

Kratice

| | |
|------|--|
| ABTS | 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) |
| ADF | kisela detergent vlakna (engl. <i>Acid Detergent Fiber</i>) |
| ADL | kiseli detergent lignin (engl. <i>Acid Detergent Lignin</i>) |
| BCCA | aminoksieline razgranatog lanca (engl. <i>Branched-chain Amino Acid</i>) |
| BD | gustoća praha prije potresanja (engl. <i>Bulked Density</i>) |
| BI | indeks biodostupnosti (engl. <i>Bioaccessibility Index</i>) |
| BSA | goveđi serumski albumin (engl. <i>Bovine Serum Albumin</i>) |
| CE | ekvivalenti katehina (engl. <i>Catechin Equivalents</i>) |
| CI | Carr indeks (engl. <i>Carr Index</i>) |
| CLD | kemiluminiscentni detektor (engl. <i>Chemiluminescence Detector</i>) |
| DE | dekstrozni ekvivalent (engl. <i>Dextrose Equivalent</i>) |
| DF | faktor razrjeđenja (engl. <i>Dilution Factor</i>) |
| DNS | 3,5-dinitrosalicilna kiselina |
| DPPH | 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal |
| DSC | diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (engl. <i>Differential Scanning Calorimetry</i>) |
| EDTA | etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol dihidrat |
| EE | efikasnost inkapsulacije (engl. <i>Encapsulation Efficiency</i>) |
| FRAP | engl. <i>Ferric Reducing/Antioxidant Power</i> |
| GAE | ekvivalenti galne kiseline (engl. <i>Gallic Acid Equivalents</i>) |
| GPE | ekstrakt tropa grožđa (engl. <i>Grape Pomace Extract</i>) |
| GW | protein kozje sirutke (engl. <i>Goat whey protein</i>) |
| HR | Hausner omjer (engl. <i>Hausner Ratio</i>) |
| IC | anorganski ugljik (engl. <i>Inorganic Carbon</i>) |
| MC | mikrokapsule (engl. <i>Microcapsules</i>) |
| MD | maltodekstrin (engl. <i>Maltodextrin</i>) |
| NDF | neutralna detergent vlakna (engl. <i>Neutral Detergent Fiber</i>) |
| NPOC | nehlapljivi organski ugljik (engl. <i>Non Purgeable Organic Carbon</i>) |
| PDA | PDA detektor (engl. <i>Photo Diode Array Detector</i>) |
| PTFE | PTFE filter (engl. <i>Polytetrafluoroethylene Polymer Filter</i>) |
| ref | relativna centrifugalna sila (engl. <i>Relative Centrifugal Force</i>) |

| | |
|-------|--|
| RH | relativna vlažnost (engl. <i>Relative Humidity</i>) |
| RID | RID detektor (engl. <i>Refractive Index Detector</i>) |
| RSM | metoda odzivnih površina (engl. <i>Response Surface Technology</i>) |
| S | saharoza (engl. <i>Sucrose</i>) |
| SEM | skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. <i>Scanning Electron Microscopy</i>) |
| SP | spособnost bubrenja (engl. <i>Swelling Power</i>) |
| SPC | površinske fenolne tvari (engl. <i>Surface Phenolic Content</i>) |
| T | trehaloza (engl. <i>Trehalose</i>) |
| TC | ukupni ugljik (engl. <i>Total Carbon</i>) |
| TD | gustoća praha nakon potresanja (engl. <i>Tapped density</i>) |
| TFC | ukupan udio flavonoida (engl. <i>Total Flavonoid Content</i>) |
| TN | ukupni dušik (engl. <i>Total Nitrogen</i>) |
| TOC | ukupni organski ugljik (engl. <i>Total Organic Carbon</i>) |
| TPC | ukupne fenolne tvari (engl. <i>Total Phenolic Content</i>) |
| TPTZ | 2,4,6-tripiridil-s-triazin |
| UHPLC | tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. <i>Ultra-high Performance Liquid Chromatography</i>) |
| UPA | ukupni ekstraktibilni proantocijanidini |
| WAI | indeks apsorpcije vode (engl. <i>Water Adsorption Index</i>) |
| WSI | indeks topivosti u vodi (engl. <i>Water Solubility Index</i>) |
| X | ksiloza (engl. <i>Xylose</i>) |
| XRPD | kristalografska struktura čestica određena rendgenskom difrakcijom (engl. <i>X-ray Powder Diffraction</i>) |
| Y | prinos produkta (engl. <i>Yield</i>) |

Simboli

| | |
|--------------|---|
| ϵ | ekstinkcijski koeficijent (L/(mol cm)) |
| Y | modelom predviđena odzivna funkcija |
| β_0 | konstanta jednadžbe odzivnog polinoma |
| β_j | koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma |
| β_{ij} | koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma |
| β_{ij} | koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma |
| X_{ij} | ispitivane nezavisne varijable |
| k | broj varijabli |

Indeksi

| | |
|-------|--------------------------------|
| s.tv. | suha tvar |
| m | vlaga (engl. <i>moisture</i>) |
| uz | uzorak |
| k | kontrolni uzorak |
| E | ekstrakt |

1. UVOD

S porastom stanovništva, globalizacijom i razvitkom različitih trendova u prehrani dolazilo je do povećane proizvodnje različitih prehrambenih proizvoda, a samim time i do nastanka sve veće količine otpada koji se bez prethodne obrade skladištio u okoliš. Među takvim otpadom su se nalazile i velike količine visokovrijednih proizvodnih ostataka prehrambene industrije poput tropa grožđa i kozje sirutke. Budući da oba proizvodna ostatka obiluju organskim tvarima, njihovo nekontrolirano odlaganje u okoliš bi uzrokovalo brojne ekološke probleme poput zakiseljavanja tla, smanjenje bioraznolikosti te remećenje ekološke ravnoteže. Širenjem ekološke svijesti te upoznavanjem potrošača s pojmovima “recycling” (proces pretvorbe proizvodnih ostataka, otpadnih materijala, beskorisnih ili neželjenih proizvoda u nove materijale ili proizvode, odnosno “upcycling” (proces pretvorbe proizvodnih ostataka, otpadnih materijala, beskorisnih ili neželjenih proizvoda u nove materijale ili proizvode bolje kvalitete i ekološke vrijednosti) i “downcycling” (proces recikliranja proizvodnih ostataka, otpadnih materijala, beskorisnih ili neželjenih proizvoda pri kojemu je novi proizvod slabije kvalitete i funkcionalnosti od izvornog materijala), razvijaju se brojne ideje i mogućnosti iskorištenja ova dva proizvodna ostatka.

Grožđe je jedna od najkultiviranijih voćnih kultura u svijetu. Trop grožđa je proizvodni ostatak vinske industrije koji nastaje tijekom faze runjenja i muljanja grožđa. Sastoji se od kože, peteljki, sjemenki te zaostale pulpe. Prilikom prerade grožđa, manji dio fenolnih spojeva dopiše u finalni proizvod, odnosno vino ili sok, dok veći dio fenolnih spojeva grožđa zaostaje u tropu grožđa što ga čini visokovrijednim proizvodnim ostatkom. Osim fenolnih spojeva ovaj proizvodni ostatak obiluje i proteinima, prehrambenim vlaknima i uljima. Upravo zbog tako bogatog kemijskog sastava trop grožđa posjeduje biološku aktivnost u obliku antioksidacijske, antimikrobne, antiupalne, prebiotičke, kardioprotektivne i antiproliferativne aktivnosti (Chamorro i sur., 2012; Jara-Palacios i sur., 2015; Koutelidakis, 2016; Luchian i sur., 2019; Mendoza-Wilson i sur., 2013). U prosjeku, prilikom proizvodnje 6 L vina generira se oko 1 kg tropa grožđa (Ilyas i sur., 2021). Stoga je trop grožđa pogodna sirovina za “upcycling” pri čemu se mogu razviti proizvodi iste ili veće proizvodne vrijednosti. Jedna od mogućnosti “upcyclinga” tropa grožđa je proizvodnja ekstrakata bogatih bioaktivnim fenolnim tvarima. Obzirom da su fenolne tvari podložne degradaciji u kontaktu s okolišnim faktorima te su podložne promjenama u kontaktu s probavnim tekućinama humanog probavnog trakta, poželjno ih se inkapsulirati nakon izdvajanja iz biljnog matriksa, kao bi se povećala njihova stabilnost, biodostupnost, a time posljedično i njihova bioraspoloživost.

Sušenje raspršivanjem je jednostavna inkapsulacijska tehnika u kojoj se pojna smjesa suši raspršivanjem u struji vrućeg zraka ili plina te nastaje visokostabilan praškasti produkt. Proces je brz, kontinuiran i energetski učinkovit te pogodan čak i za termoosjetljive komponente. Korištenjem ove inkapsulacijske tehnike zabilježena je zaštita brojnih bioaktivnih komponenata od nepovoljnih okolišnih uvjeta poput niskog pH, visoke temperature i vlage, omogućeno je kontrolirano otpuštanje, zamaskirani su neželjeni organoleptički atributi te je spriječena oksidacija i degradacija hlapljivih komponenata (Banožić i sur., 2021). Produkti nastali sušenjem raspršivanjem svoju primjenu nalaze u brojnim industrijama kao što su farmaceutska, prehrambena, kozmetička, biotehnološka i nutraceutska industrija. Za inkapsulaciju sušenjem raspršivanjem koriste se različiti omotači (nosači) među kojima se nalaze sirutka i proteini sirutke, koji predstavljaju inkapsulacijske omotače prirodnog podrijetla koji osim “zaštitne” uloge, zbog svog kemijskog sastava mogu doprinijeti nutritivnim i bioaktivnim svojstvima nastalog praha (mikrokapsula).

Sirutka je proizvodni ostatak mljekarske industrije, a zaostaje nakon proizvodnje sira. Sastoji se od vode, proteina, esencijalnih aminokiselina, prehrambenih vlakana (inulin), mineralnih tvari (poput kalija, natrija, kalcija, fosfora i magnezija), vitamina skupine A, B i D, od kojih se ističe riboflavin koji daje karakterističnu žuto-zelenu boju sirutke. Prilikom proizvodnje 1 kg sira generira se oko 9 L tekuće sirutke (Gajendragadkar i Gogate, 2016). Sve je veći interes za bioaktivne sastojke iz raznih proizvoda i proizvodnih ostataka mljekarske industrije te za razvoj novih mogućnosti i tehnologija usmjerenih na iskorištavanje bioaktivnih komponenata iz sirutke.

Cilj ovog doktorskog rada bio je razviti optimalan proces homogenizacije i inkapsulacije ekstrakta tropa grožđa metodom sušenja raspršivanjem, koristeći proteine kozje sirutke (GW) kao glavni omotač, u svrhu očuvanja i zaštite fenolnih spojeva te povećanja njihove biodostupnosti. Osim toga ispitan je utjecaj dodatka drugog omotača ugljikohidratnog tipa (saharoze, ksiloze, trehaloze i maltodekstrina) kozjoj sirutki na uspješnost procesa inkapsulacije, fizikalnokemijske karakteristike mikrokapsula (MC), biodostupnost fenolnih spojeva tijekom *in vitro* simulirane probave te stabilnost MC tijekom testa ubrzanog starenja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Trop grožđa

Vinova loza (*Vitis vinifera*) je jedna od najrasprostranjenijih i najznačajnijih kultura koje se uzgajaju na svijetu (Almanza-Oliveros i sur., 2024; Chowdhary i sur., 2021), a ponajviše se uzgaja radi proizvodnje vina te nešto manje za proizvodnju sokova i ostalih proizvoda od grožđa (Koutelidakis, 2016). Prema Goula i sur. (2016) prilikom proizvodnje navedenih proizvoda godišnje nastane čak 9 milijuna tona tropa grožđa. Upravo je trop proizvodni ostatak koji nastaje u najvećoj količini tijekom procesa proizvodnje vina i voćnih vina. Sastoji se od preostale kožice, peteljki i sjemenki grožđa. Smatra se da će od ukupne količine grožđa koja se koristi u procesu proizvodnje vina nastati oko 25 % količine tropa grožđa (Beres i sur., 2017). Najveći udio u tropu grožđa čini kožica, koja je bogata polifenolnim spojevima, a sadrži i oko 12 % hemiceluloze te oko 20 % celuloze. Sjemenke grožđa sadrže lipide, proteine te manju količinu polifenolnih spojeva (Dávila i sur., 2017). Osim u kožici, hemiceluloza i celuloza se nalaze i u zaostalim peteljčkama grožđa, koje uz to sadrže i polifenolne spojeve te složene ugljikohidrate koji pružaju dobrobiti ljudskom organizmu kroz poboljšanje probavnog procesa. Već spomenuta prisutna netopiva vlakna, hemiceluloza i celuloza, smanjuju apsorpciju nezdravih masti i potiču detoksikacijske procese u organizmu (Barros i sur., 2015). Kao što je vidljivo iz **Tablice 1**, prehrambena vlakna dominiraju prosječnim sastavom tropa crvenog grožđa pri čemu prevladavaju netopiva vlakna. Zbog svoje porozne strukture i male gustoće, vlakna poboljšavaju rad probavnog trakta.

Tablica 1 Prosječan kemijski sastav tropa crvenog grožđa (Antonić i sur., 2020)

| Komponenta | % | |
|---------------------|--------------|---------------|
| Pepeo | 1,73 – 9,10 | |
| Proteini | 3,57 – 14,17 | |
| Masti | 1,14 – 13,90 | |
| Polifenolni spojevi | 0,28 – 8,70 | |
| Prehrambena vlakna | ukupna | 17,28 – 88,70 |
| | topiva | 0,72 – 12,78 |
| | netopiva | 16,44 – 67,70 |
| Šećeri | ukupno | 12,20 – 40,53 |
| | fruktoza | 0,38 – 8,91 |
| | glukoza | 0,21 – 26,34 |

Osim prehrambenih vlakana, bitne komponente tropa grožđa jesu i polifenolni (fenolni) spojevi koji se često nalaze vezani u kompleksnu strukturu s prehrambenim vlaknima. U crvenom tropu grožđa od fenolnih spojeva prevladavaju fenolne kiseline i katehini. Ovu skupinu spojeva odlikuje visoko antioksidativno, antitumorsko i antibakterijsko djelovanje, a također bilježe i pozitivan učinak na kompletno ljudsko zdravlje. Osim fenolnih kiselina i katehina, trop crvenog

grožđa obiluje i antocijanima, spojevima koji nose crveno obojenje i koji su izuzetno osjetljivi na svjetlost, promjene pH vrijednosti kao i na promjene temperature.

Osim kemijskog sastava prikazanog u **Tablici 1**, bitno je napomenuti da se u tropu crvenog grožđa nalazi i velika količina mineralnih tvari kao što su kalij, kalcij, mangan, željezo, cink i fosfor (Antonić i sur., 2020).

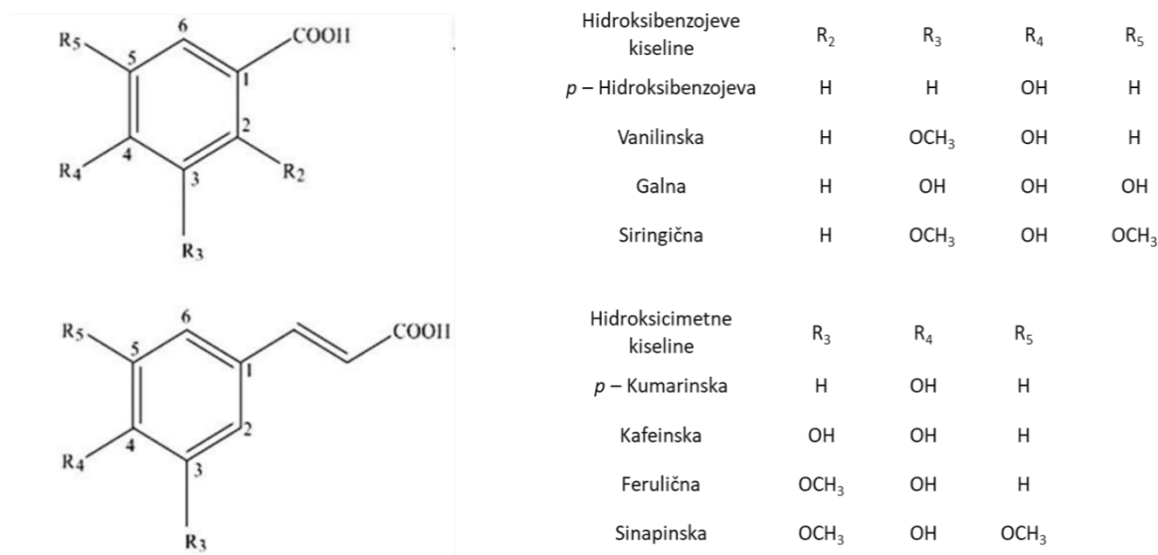
2.2. Polifenolni spojevi

Zbog djelomične i nepotpune ekstrakcije fenolnih spojeva tijekom procesa proizvodnje vina, u tropu grožđa zaostaje širok spektar različitih fenolnih spojeva (Koutelidakis, 2016). Čimbenici poput okolišnih uvjeta, stupnja zrelosti biljke, procesa prerade mogu imati utjecaj na sastav fenolnih spojeva (Peixoto i sur., 2018). Biljni fenoli, uključujući jednostavne fenole, fenolne kiseline, flavonoide, kumarine, stilbene, tanine, lignane i lignine, su najobilniji sekundarni metaboliti, proizvedeni uglavnom kroz shikimatni put od L-fenilalanina i L-tirozina. Nastaju kao odgovor biljke na stresne situacije, odnosno služe kao zaštita od UV zračenja, virusa, insekata i bakterija (Kumar i Goel, 2019). Bitno je napomenuti da se biološka aktivnost fenola razlikuje i izravno utječe na njihovu bioraspodivnost (Koutelidakis, 2016). Prema literaturi, navode se brojna pozitivna djelovanja fenolnih spojeva na ljudsko zdravlje jer se odlikuju antioksidacijskim, antikancerogenim, antialergijskim, antiproliferativnim, antimikrobnim, antifungalnim te neuroprotektivnim i kardioprotektivnim karakteristikama, što rezultira i brojnim mogućnostima njihove potencijalne primjene (Chamorro i sur., 2012; Jara-Palacios i sur., 2015; Koutelidakis, 2016; Luchian i sur., 2019; Mendoza-Wilson i sur., 2013). Zbog strukturnih različitosti postoje mnoge klasifikacije fenolnih spojeva, ali ono što je svima zajedničko je da imaju barem jedan aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih skupina (Grgić i sur., 2020). Broj i položaj hidroksilne skupine u određenom fenolnom spoju dovodi do varijacija u njihovom antioksidativnom potencijalu (Kumar i Goel, 2019).

2.2.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su jedna od glavnih klasa biljnih fenolnih spojeva, a sadrže jedan aromatski prsten te jednu karboksilnu skupinu. U najvećoj koncentraciji ih se može pronaći u listovima, kožici i sjemenkama biljaka. Dijele se u dvije skupine: hidroksibenzojeve te hidroksicimetne kiseline (Abotaleb i sur., 2020). Ovi se spojevi često pojavljuju u konjugiranom obliku, naime kao glikozilirani derivati ili esteri kininske kiseline, shikiminske kiseline i vinske kiseline (Teixeira i sur., 2014). Četiri najčešće hidroksicimetne kiseline su ferulična kiselina, kafeinska,

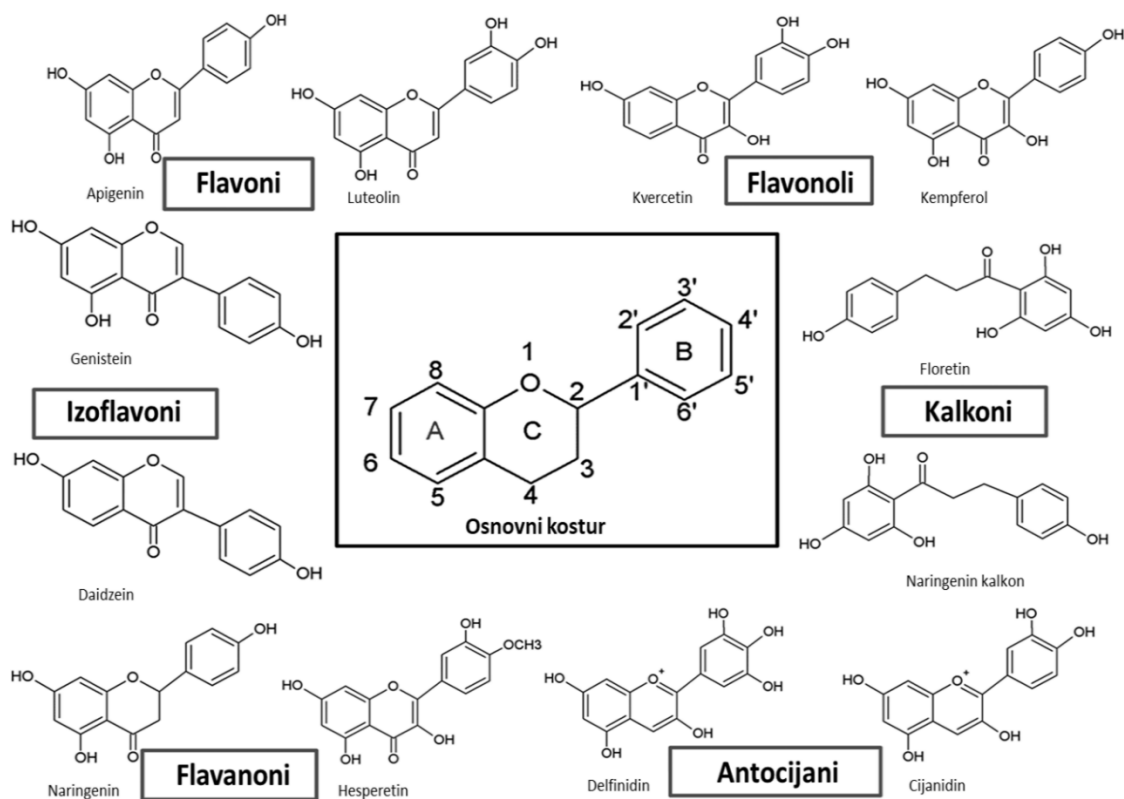
p-kumarinska te sinapinska kiselina, dok se kao najčešće hidroksibenzojeve kiseline navode *p*-hidroksibenzojeva kiselina, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, galna kiselina te vanilinska i siringična kiselina (Abotaleb i sur., 2020; Kumar i Goel, 2019). Kemijske strukture predstavnika ove dvije skupine fenolnih kiselina prikazuje **Slika 1**.



Slika 1 Struktura i klasifikacija pojedinih fenolnih kiselina (Mudnic i sur., 2010)

2.2.2. Flavonoidi

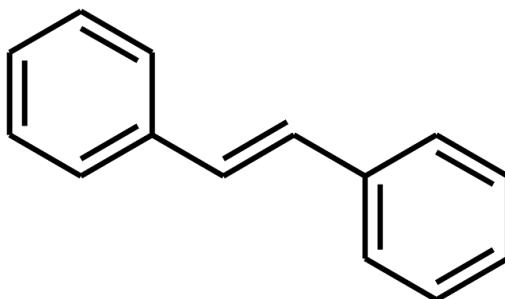
Flavonoidi su najveća i iznimno strukturno raznolika skupina niskomolekularnih fenolnih spojeva u biljkama. Njihova osnovna struktura je difenilpropanski (C₆-C₃-C₆) kostur (**Slika 2**). Stupanj oksidacije C prstena te supstituenti u A i/ili B prstenu uzrok su strukturne različitosti flavonoida, što za posljedicu ima različitu biološku aktivnost. Uzrok su žutih, plavih, crvenih i ljubičastih pigmenata u biljkama. Dijelevaju se na flavonole (kvercetin, kaempferol, miricetin), flavone (luteolin), flavanone (naringenin), kalkone (likokalkon A i E), flavanole ili katehine (katehin, epikatehin, galokatehin, epikatehin galat, galokatehin galat), izoflavone (soforaisoflavon A) te antocijane (cijanidin, delphinidin, malvidin) (Farhadi i sur., 2019). Osjetljivi su na mnoge čimbenike, poput pH, temperature i UV zračenja, koji utječu na njihovu stabilnost i boju (Teixeira i sur., 2014).



Slika 2 Osnovna struktura flavonoida i njihovih pojedinih skupina (Panche i sur., 2016)

2.2.3. Stilbeni

Strukturu stilbena karakteriziraju dva aromatska prstena povezana etilenskim mostom (Slika 3). Grožđe proizvodi stilbene kao odgovor na niz fizioloških faktora stresa, poput ozona i UV-C zračenja, povećavajući razine stilbena do nekoliko stotina puta u kožici i lišću grožđa (Teixeira i sur., 2014).



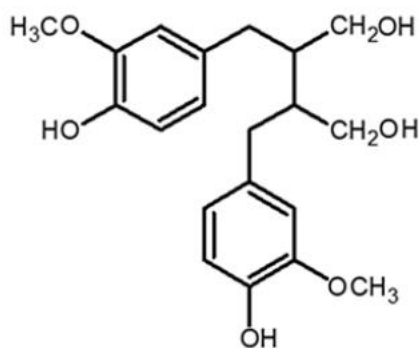
Slika 3 Kemijska struktura E-tipa stilbena (Web 1)

Ovisno o njihovoj konfiguraciji strukturno ih se može podijeliti na Z-tip i E-tip stilbena. Karakteriziraju ih važna biološka svojstva poput antivirusne, protuupalne i antikancerogene

aktivnosti. Neki od najproučavanijih stilbena koji se nalaze u grožđu su resveratrol (3,4',5-trihidroksi-trans-stilben), *epsilon*-viniferin i piceatanol (De Filippis i sur, 2017).

2.2.4. Lignani

Lignani su velika skupina metabolita polimeriziranih s dva derivata fenilpropanoida (C6 – C3) (Slika 4) na različite načine. Uglavnom postoje kao dimeri, dok nekoliko njih postoje kao trimeri i tetrameri. U prirodi se uglavnom nalaze u slobodnom obliku, a rijede se pojavljuju u glikozidnom obliku. Dijele se na norlignane te polimerne lignane, ovisno o različitim polimerizacijskim položajima te načinima dehidracijske kondenzacije skupina bočnih lanaca koje sadrže kisik (Wang i sur., 2022).



Slika 4 Kemijska struktura lignana (Grgić i sur., 2020)

2.3. Mogućnosti iskorištenja tropa grožđa

Gospodarenje otpadom i nusproduktima je tema koja postaje sve aktualnija u današnjem svijetu. Zbog užurbanog načina života i sve veće napučenosti, pojavljuje se potreba za povećanom proizvodnjom hrane, a kao posljedica nastaju velike količine otpada koje se nepravilno skladište u okoliš te tako predstavljaju ne samo ekonomski već i ekološki problem (Plainfossé i sur., 2020), kao što je zakiseljavanje tla, fitotoksičnost, smanjenje sadržaja kisika u tlu (Bustamante i sur, 2008) te onečišćenje zraka usred nekontroliranog spaljivanja (Chowdhary i sur., 2021).

Dugi niz godina, trop grožđa je kao nusprodukt završavao na odlagalištima ili spalionicama (Plainfossé i sur., 2020) te se koristio kao gnojivo, hrana za životinje ili sirovina za proizvodnju vinskog octa (Antonić i sur., 2020). U cilju smanjenja količine otpada koji se odlaže u okoliš te

smanjenja ekonomskih troškova bilo je potrebno osmisliti nova rješenja za pravilno skladištenje ili pronaći novu namjenu ovom nusproduktu velikog potencijala. Budući da trop grožđa obiluje fenolnim spojevima, prehrambenim vlaknima i mineralnim tvarima, jedno od rješenja održivog gospodarenja otpadom je primjena ovog nusprodukta („recycling“) u različitim industrijama kao što su kozmetička, farmaceutska, prehrambena (Plainfossé i sur., 2020), ambalažna (Cejudo-Bastante i sur., 2021; Licciardello i sur., 2015) pa čak i građevinska industrija (Muñoz i sur., 2014). Osim toga prema Chowdhary i sur. (2021) trop grožđa može služiti i kao sirovina za proizvodnju brojnih enzima kao što su celulaza, ksilanaza, pektinaza i lakaza. Također, sve češća je i primjena tropa grožđa u proizvodnji biogoriva, bioplina, biognojiva, bioetanola, biougljena (Chowdhary i sur., 2021; Ibn Ferjani i sur., 2019), alternativnih izvora proteina (Thiviya i sur., 2022; Tropea i sur., 2022) te hlapivih organskih spojeva (Liang i sur., 2020).

2.4. Sirutka

Prema definiciji, sirutka je žuto-zelena tekućina koja zaostaje tijekom proizvodnje sira ili kazeina (Alfano i sur., 2021; Cattaneo i sur., 2013; Pralhadrao i sur., 2021), a nastaje tijekom faze uklanjanja grušča (Ramos i sur., 2016). Pri proizvodnji samo 1 kg sira nastane čak 9 L tekuće sirutke (Gajendragadkar i Gogate, 2016). Postoje dvije vrste sirutke, slatka i kisela. Slatka sirutka se dobiva nakon proizvodnje zrelih sireva (pH 5,8 – 6,6). Za razliku od slatke, kisela sirutka je nusproizvod kiselog zgrušanog sira („svježeg sira“) i ima pH manji od 5,1 (Gajendragadkar i Gogate, 2016; Królczyk i sur., 2016; Ramos i sur., 2016; Ryan i Walsh, 2016). Sirutka može nastati iz različitih mlijeka kao što su devino (Zou i sur., 2022), kozje (Medeiros i sur., 2018), ovčje (Kerasioti i sur., 2016), bivolje (Garau i sur., 2021) ili kravlje (Li i sur., 2015; Ricaurte i sur., 2017; Warncke i sur., 2021). Najveće količine sirutke nastaju proizvodnjom sira od kravljeg mlijeka, s obzirom da je proizvodnja ovog tipa mlijeka najzastupljenija u svijetu. Kvaliteta i sastav sirutke ovisi o kvaliteti i tipu mlijeka koje se koristi (kozje, kravlje, ovčje, bivolje, devino), a koje može varirati ovisno o pasmini životinje, ishrani i zdravlju životinje kao i o stadiju laktacije (Prazeres i sur., 2012). Kemijskim sastavom sirutke dominiraju: voda, laktoza, bjelančevine, minerali, mliječna kiselina, laktoferin, a pored navedenog sirutka sadrži i male količine limunske kiseline, neproteinskih dušikovih spojeva i vitamina B kompleksa - riboflavina, folne kiseline i kobalamina. Upravo je riboflavin glavna odgovorna komponenta za karakterističnu žuto-zelenu boju sirutke (Božanić i sur., 2014). Proteini sirutke su jedinstveni jer sadrže sve bitne aminokiseline. Glavne proteinske komponente sirutke jesu: β -laktoglobulin, α -laktoalbumin, imunoglobulini, goveđi serumski

albumin, laktoferin i laktoperoksidaza (Domínguez-Niño i sur., 2018; Gupta i Prakash, 2017; Ramos i sur., 2016). Osim toga, sirutka se ističe i po tome što posjeduje veliki udio aminokiselina koje sadrže sumpor pa samim time igraju veliku ulogu u funkciji i savijanju proteina te služe kao prekursori intracelularnog antioksidansa glutationa (Smithers, 2015). Osim prethodno navedenog sastav sirutke varira ovisno o vrsti sira, procesu proizvodnje i metodi zgrušavanja (kiselina ili enzim). Ove varijacije značajno utječu na funkcionalna svojstva sirutke (Kandasamy i sur., 2021).

2.4.1. β -laktoglobulin

U goveđem mlijeku upravo je β -laktoglobulin proteinska komponenta koja čini više od polovice ukupnih proteina, za razliku od humanog mlijeka u kojem ove komponente uopće nema. Izvor je esencijalnih aminokiselina te aminokiselina razgranatog lanca. Posjeduje svojstvo modulacije limfnih odgovora, a osim toga odlikuje ga i sposobnost vezanja na hidrofobne ligande poput masnih kiselina. Stabilnost tijekom želučane i duodenalne probave ovoj proteinskoj komponenti otvara mogućnosti njezinog korištenja u svrhu zaštite i sigurne dostave pH osjetljivih lijekova do mjesta apsorpcije (Gupta i Prakash, 2017).

2.4.2. α -laktoalbumin

Oko 20 % ukupnih proteina sirutke čini α -laktoalbumin u kojemu je prisutan visok udio aminokiseline triptofana. Ova proteinska komponenta bilježi značajna antiproliferativna djelovanja na linije ljudskog adenokarcinoma kao što je CaCo-2 te posjeduje antibakterijsko djelovanje (Gupta i Prakash, 2017). Pročišćeni α -laktalbumin se najčešće koristi u proizvodnji formula za dojenčad, budući da ima strukturno najsličniji profil proteina u usporedbi s majčinim mlijekom (Marshall, 2004).

2.4.3. Imunoglobulini

Imunoglobulini su još jedna od frakcija proteina koje pronalazimo u sirutki, a čine 10 – 15 % ukupne količine proteina sirutke. Sintetiziraju se već u mliječnoj žlijezdi životinje (Gupta i Prakash, 2017). Imunoglobulini se dijele u nekoliko klasa uključujući IgM, IgA, IgG, IgE i IgD. IgG je primarna klasa imunoglobulina koja se nalazi u goveđem kolostrumu i mlijeku. Svi monomerni imunoglobulini imaju istu osnovnu molekularnu strukturu, sastoje se od dva identična teška lanca i dva identična laka lanca. Teški i laki lanci međusobno su povezani disulfidnim vezama, što rezultira klasičnim Y-oblikom molekule imunoglobulina. Broj i mjesto

disulfidnih veza ovisi o klasi imunoglobulina (Hurley i Theil, 2011). Imunoglobulini također posjeduju veliki terapijski potencijal protiv gastrointestinalnih infekcija kod ljudi te brojna bioaktivna svojstva (Gupta i Prakash, 2017).

2.4.4. Goveđi serumski albumin

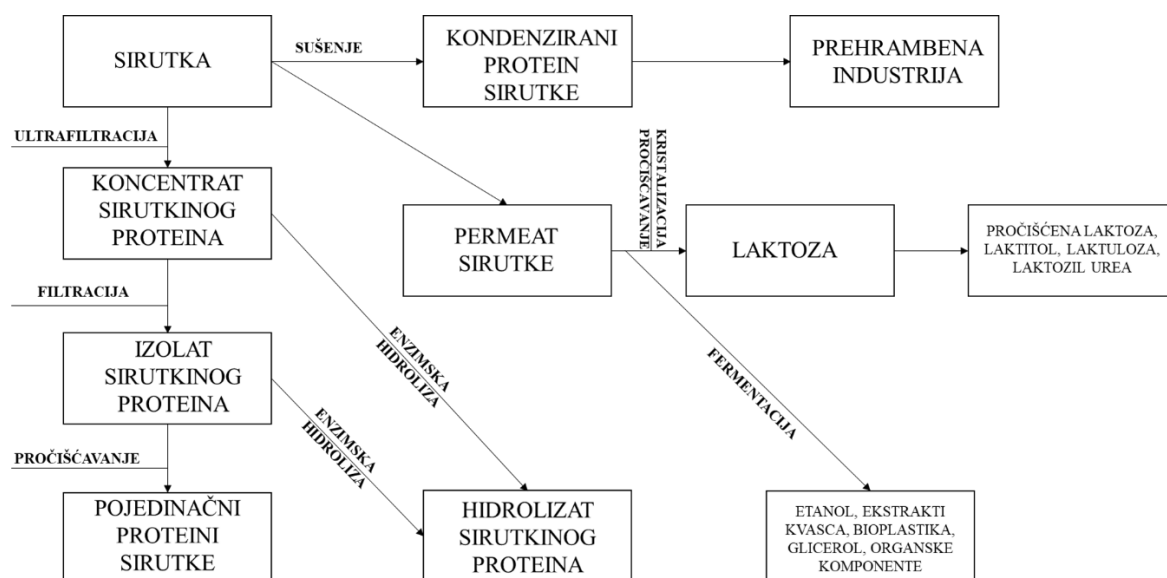
Goveđi serumski albumin (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) ne stvara se u mliječnoj žlijezdi životinje, već se izlučuje u mlijeko nakon njegovog pasivnog istjecanja iz krvotoka. Izvor je svih esencijalnih aminokiselina. Posjeduje sposobnost vezanja za različite ligande i glavni je prijenosnik masnih kiselina, a ovo svojstvo se narušava zagrijavanjem kada dolazi do denaturacije proteina. Osim prijenosa masnih kiselina, goveđi serumski albumin bilježi i antitumorska svojstva (Gupta i Prakash, 2017). U sirutki se nalazi u udjelu od 10 do 15 % (Marshall, 2004).

2.4.5. Laktoferin i laktoperoksidaza

Laktoferin je glikoprotein koji veže željezo, a prisutan je u sirutki i kolostrumu humanog mlijeka. Ova komponenta sirutke se sastoji od približno 689 aminokiselinskih ostataka (Marshall, 2004). Posjeduje antimikrobna, antioksidativna, antivirusna te imunomodulatorna svojstva. Laktoperoksidaza je u mliječnoj sirutki prisutna samo u količinama od 0,25 do 0,5 %. Tijekom procesa pasterizacije ne dolazi do inaktivacije laktoperoksidaze. Uloga ovog enzima je katalizacija peroksidacije tiocijanata i halogenida poput joda ili broma čime se tvore produkti koji inhibiraju rast bakterija (Gupta and Prakash, 2017; Marshall, 2004).

2.5. Mogućnosti iskorištenja sirutke

U posljednjem desetljeću zabilježena je povećana potražnja za hranom bogatom proteinima (Carter i sur., 2018; Guralnick i sur., 2021; Nishanthi i sur., 2018) i općenito zdravijim načinom života (Embiriekah i sur., 2018), što je rezultiralo povećanjem proizvodnje proizvoda sa smanjenim udjelom šećera i masti te proizvoda za lakto-ovo-vegetarijance (Królczyk i sur., 2016). Ovaj porast prati i prehrambena industrija koja je u potrazi za visokoproteinskim mliječnim prahovima zbog njihove široke mogućnosti primjene (Guralnick i sur., 2021). Oko 70 % nastale sirutke prerađuje se i koristi u razne svrhe, dok 30 % sirutke ostaje neprerađeno i kao takvo završava u okolišu (Božanić i sur., 2014). Na **Slici 5** prikazane su mogućnosti frakcioniranja sirutke te primjene pojedinih produkata frakcioniranja.



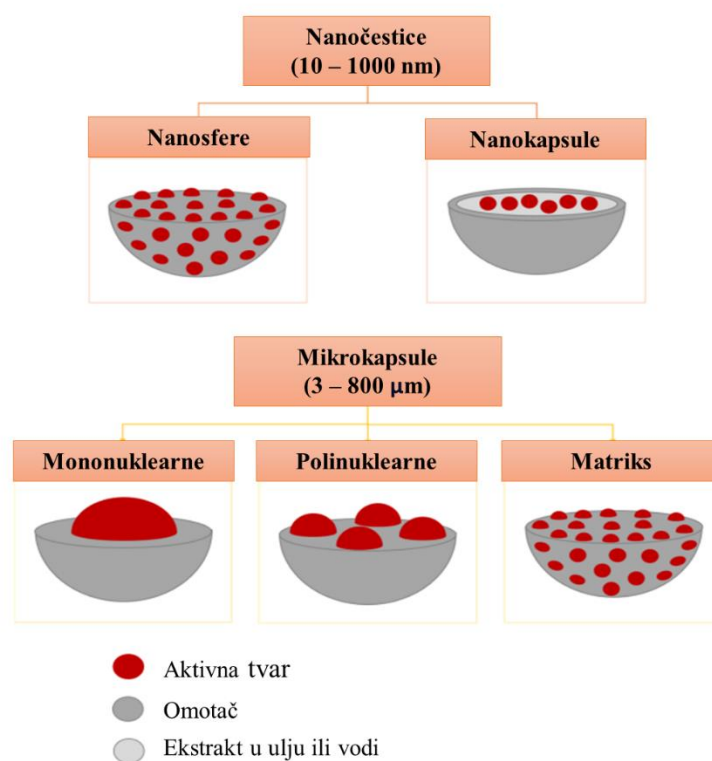
Slika 5 Frakcioniranje sirutke i moguće upotrebe nastalih proizvoda (Ryan i Walsh, 2016)

Nepropisno odlaganje tekuće sirutke u okoliš nije poželjno zbog visokog udjela organske tvari i velike biokemijske potrebe za kisikom. Odlaganje sirutke u okoliš bez prethodne obrade bi za posljedicu imalo loše djelovanje na ljudsko zdravlje, okoliš i vodeni svijet (Lehn i sur., 2018). Bioaktivni peptidi koji potječu iz mliječnih proizvoda, između ostalog i iz sirutke, su jedni od najproučavanijih peptida zbog izražene antioksidacijske, antihipertenzivne, antimikrobne, antimutagene aktivnosti te sposobnosti vezanja minerala. Nastaju enzimskom hidrolizom tijekom fermentacije i gastrointestinalne probave. Upravo zbog toga razni fermentirani mliječni proizvodi s različitim dodacima postaju sve popularniji (Gupta and Prakash, 2017). Osim toga, sirutka sadrži veliki udio aminokiselina razgranatog lanca (engl. *Branched-chain amino acids*, BCCA) stoga sirutka svoju primjenu pronalazi i u proizvodnji različitih suplemenata koji stimuliraju mišićni rast te proizvoda za reguliranje tjelesne težine. U zadnjih 40 godina svojstva sirutke poput sposobnosti zadržavanja vode, sposobnosti miješanja s drugim komponentama, pjenjenja te toplinskog geliranja i emulgiranja, omogućuju njenu primjenu u raznim dehidriranim i koncentriranim proizvodima (Smithers, 2015). Sirutka se koristi i u proizvodnji različitih proizvoda poput Ricotta ili Mysost sira te raznih pića kao što su pivo, vino ili šampanjac (Ryan i Walsh, 2016). Uz sve navedeno, ovaj nusproizvod proizvodnje sira, se sve više prepoznaje zbog svog potencijala kao "alternativnog zelenog" omotača u raznim inkapsulacijskim procesima (Kandasamy i sur., 2021; Zandona i sur., 2021). Glavni razlozi tome jesu: biorazgradivost čime se smanjuje količina novonastalog otpada, sigurnost za konzumaciju, odlična barijerna i nutritivna svojstva te kompatibilnost proteina sirutke s raznim

drugim materijalima i biopolimerima u svrhu poboljšanja mehaničkih i drugih svojstava finalnog produkta (Kandasamy et al., 2021).

2.6. Inkapsulacija

Povećana zabrinutost potrošača za nutritivne aspekte hrane potakunla je razvoj novih prehrambenih proizvoda, s naglaskom na bioaktivna svojstva hrane, koji se svrstavaju u kategoriju funkcionalne hrane. Bolja ravnoteža između hranjivih sastojaka, dodatak neprobavljivih frakcija te nadopuna elementima u tragovima, vitaminima ili posebnim komponentama pojavljuju se kao nužnost u razvoju novih proizvoda (Abd El-Kader i Abu Hashish, 2019). Inkapsulacija je proces u kojemu se aktivna tvar (jezgra) oblaže slojem ili slojevima omotača (membrana, ljuska, kapsula) u svrhu zaštite aktivne tvari od čimbenika koji mogu uzrokovati degradaciju aktivne tvari (Đorđević i sur., 2015; Saifullah i sur., 2019). Omotač kontrolira otpuštanje aktivne tvari pod određenim uvjetima. Inkapsulacijom se osjetljivi materijali poput eteričnih ulja štite od neželjenih kemijskih reakcija poput oksidacije i hlapljenja/isparavanja, dok se u slučaju inkapsulacije aromatskih spojeva čuva ili maskira njihov aromatski profil. Promjeri inkapsuliranih čestica variraju u rasponu od 0,01 do 1000 μm , dok je debljina samog materijala stijenke (omotača) u rasponu od 0,5 – 150 μm . Inkapsulacijske metode možemo podijeliti u tri skupine: fizikalne (sušenje raspršivanjem, liofilizacija, kokristalizacija, sušenje hlađenjem, sušenje u fluidizirajućem sloju), fizikalno-kemijske (isparavanje otapala, koacervacija) te kemijske procese (međufazna polimerizacija i molekularna inkluzija) (Abd El-Kader and Abu Hashish, 2019). Svojstva inkapsuliranih čestica ovise o aktivnoj tvari, korištenim omotačima te upotrijebljenoj tehnici inkapsulacije. Sukladno tome postoji nekoliko oblika kapsula (**Slika 6**) poput mononuklearnih, polinuklearnih i matriksa (Ahangaran i sur., 2019) te nepravilnih oblika (Peanparkdee i sur., 2016).



Slika 6 Vrste nanočestica i mikrokapsula (Díaz-Montes, 2023)

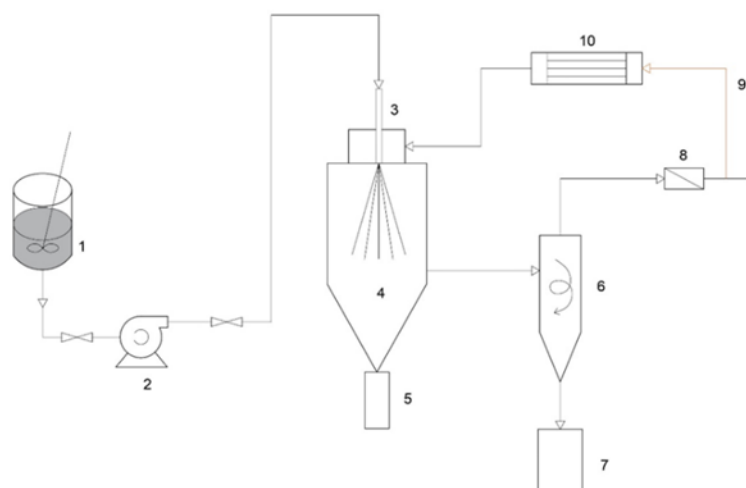
2.7. Sušenje raspršivanjem - mikroinkapsulacija

Sušenje raspršivanjem je dobro poznata, energetska učinkovita konvekcijska tehnika sušenja (Banožić i sur., 2021), koja se koristi i kao inkapsulacijska metoda fizikalnog tipa. Iznimno je prikladna za kontinuiranu proizvodnju suhih krutina u obliku praha, granulata ili aglomerata iz tekućih sirovina u obliku otopina, emulzija i suspenzija koje se mogu s pomoću pumpe dovesti do raspršivača. U procesu sušenja raspršivanjem, suhi prahovi se proizvode iz pojne smjese, njezinim raspršivanjem velikom brzinom i usmjeravanjem raspršenih kapljica u struju vrućeg zraka pri temperaturama 150 – 200 °C. Atomizirane kapljice imaju vrlo veliku površinu u obliku milijuna mikrometarskih kapljica (10 – 200 µm), što rezultira vrlo kratkim vremenom sušenja kada su kapljice izložene vrućem zraku u komori za sušenje (Peighambardoust i sur., 2011). Ova tehnika sušenja svoje korištenje bilježi u raznim granama prehrambene industrije, a ponajviše te najduže u mliječnoj industriji (Banožić i sur., 2021; Cal i Sollohub, 2010; Santos i sur., 2018) gdje se koristi za proizvodnju mlijeka u prahu, dječjih formula i sirutke (Banožić i sur., 2021). Osim u prehrambenoj industriji, bilježi svoju upotrebu i u farmaceutskoj (Baumann i sur., 2021), kozmetičkoj (Giovannelli i sur., 2021) te biotehnološkoj industriji (Poozesh i

Bilgili, 2019). Neke od prednosti ove tehnike sušenja jesu jednostavnost procesa, mogućnost rada s materijalima različitih svojstava, niski operativni troškovi, osiguranje mikrobiološke stabilnosti proizvoda zbog smanjenja udjela vlage i aktiviteta vode, kratko trajanje procesa koje je rezultat velike površine na kojoj se odvija izmjena tvari i topline, smanjenje troškova skladištenja i transporta kao i poboljšanje organoleptičkih svojstava praha (Assadpour i Jafari, 2019; Banožić i sur., 2021; Gharsallaoui i sur., 2007; Martinić i sur., 2022). Glavni nedostatak ove tehnike jesu visoki investicijski troškovi (Gharsallaoui i sur., 2007). Kvaliteta gotovog praškastog proizvoda ovisi o uvjetima sušenja raspršivanjem: koncentraciji pojne smjese, ulaznoj i izlaznoj temperaturi zraka, brzini protoka pojne smjese, brzini protoka zraka, brzini sušenja zraka, vrsti raspršivača, veličini mlaznice kao i o konstrukciji same komore za sušenje (Chegini i Ghobadian, 2005; Fazaeli i sur., 2012). Veličina nastalih čestica ponajviše ovisi o upotrebljenom raspršivaču (Shishir i Chen, 2017). Zbicinski i sur. (2022) u svom istraživanju navode da promjeri i veličine čestica u procesu sušenja raspršivanjem, kada se radi o raspršivanju iz jedne mlaznice koja se nalazi na vrhu tornja, ovise o tome u kojem dijelu tornja se čestice nalaze tj. čestice na dnu tornja imaju manje promjere zbog nižih temperatura okolnog zraka i dužeg vremena zadržavanja u zoni aglomeracije.

Veličina čestica koje nastaju u postupcima inkapsulacije primjenom sušenja raspršivanjem kreće se u rasponu 3 – 800 μm što ih svrstava u red mikrokapsula (MC) koje je najčešće mononuklearnog, polinuklearnog ili matriks tipa (Díaz-Montes, 2023).

Kao što je vidljivo na **Slici 7**, jedinica za sušenje raspršivanjem se sastoji od spremnika za pojnu smjesu i peristaltičke pumpe (sustav za dovod pojne otopine), uređaja za raspršivanje te komore za sušenje (glavni sustav) te ciklona i sabirne posude (sustav za odvajanje praha). Svaki proces sušenja raspršivanjem započinje pripremom pojne smjese. Ovisno o vrsti pojne smjese mogu se primijeniti operacije poput homogenizacije visokim tlakom (Alcântara i sur., 2019; Mis-Solval i sur., 2019) ili ultrazvukom (Alcântara et al., 2019; Koç et al., 2015) te koncentriranja (Nguyen et al., 2018).



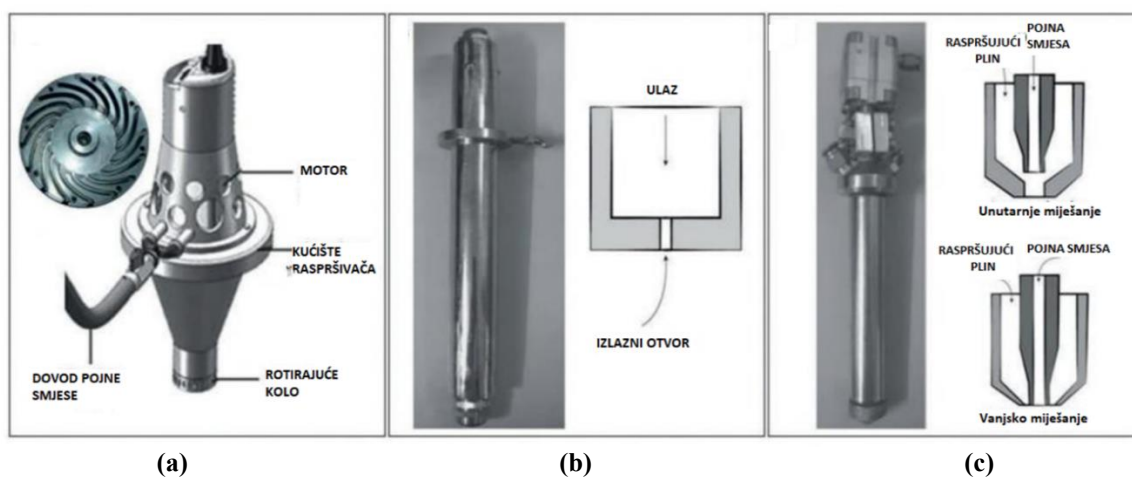
Slika 7 Shematski prikaz procesa sušenja raspršivanjem (1 – spremnik s miješalom i pojnom smjesom, 2 – peristaltička pumpa, 3 – raspršivač, 4 – komora za sušenje, 5 – spremnik za sakupljanje neosušenih čestica 6 – ciklonski separator, 7 – spremnik za sakupljanje proizvoda, 8 – filter, 9 – recirkulacija zraka, 10 – sustav zagrijavanja zraka)

Osim toga prilikom pripreme pojnih otopina zabilježen je i dodatak stabilizatora poput lecitina, Tween 80 (Hamad i sur., 2020) te izolata i hidrolizata proteina sirutke (Ramakrishnan i sur., 2014).

Proces sušenja raspršivanjem se odvija u četiri faze:

1. raspršivanje tekuće pojne smjese u kapljice,
2. kontakt kapljica i vrućeg zraka/plina,
3. isparavanje otapala iz kapljica,
4. odvajanje i skupljanje MC (Banožić i sur., 2021).

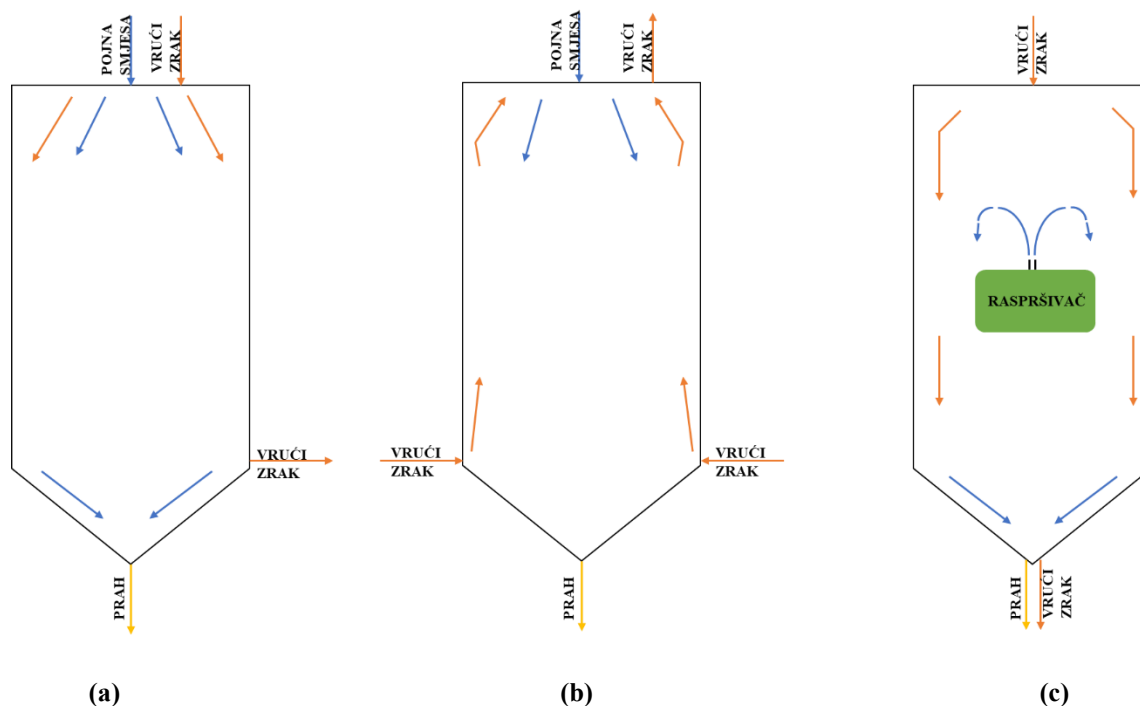
Tijekom prve faze, koja se još naziva i faza atomizacije, pojna smjesa se pomoću peristaltičke pumpe dovodi do uređaja za raspršivanje, prolazi kroz mlaznicu te se raspršuje u mnoštvo sitnih kapljica čime se povećava ukupna površina na kojoj se odvija prijenos topline između raspršenih kapljica i vrućeg zraka, samim time brzina prijenosa topline je veća te je u konačnici proces sušenja učinkovitiji (Banožić i sur., 2021). Većina uređaja za sušenje koristi mlaznice od nehrđajućeg čelika. Također postoje i mlaznice od volframovog karbida koje pokazuju izvrsnu otpornost na habanje kao i dobru otpornost na koroziju (Patel i Suthar, 2009). Proces raspršivanja u obliku kapljica se može postići primjenom tlačne, centrifugalne, elektrostatske ili ultrazvučne sile uz korištenje različitih raspršivača (Santos i sur., 2018). Najčešće korištene vrste raspršivača prikazane su na **Slici 8**.



Slika 8 Najčešće korišteni raspršivači: **(a)** rotirajući raspršivač, **(b)** raspršivač s hidrauličnom mlaznicom, **(c)** raspršivač s pneumatskom mlaznicom (Santos i sur., 2018)

Tijekom druge faze raspršene kapljice dolaze u kontakt s vrućim zrakom/plinom, odmah potom slijedi treća faza u kojoj prijenos topline s plina na kapljicu uzrokuje porast temperature kapljice od njezine početne temperature do konstantne vrijednosti ravnotežne temperature isparavanja pri kojoj se odvija proces sušenja. Nakon toga slijedi isparavanje vode/otapala te se na kraju izjednačava temperatura osušene kapljice i vrućeg zraka. Ovisno o smjeru strujanja vrućeg zraka i raspršenih kapljica pojne smjese, komora za sušenje može imati različite konfiguracije (**Slika 9**). Postoje tri moguća smjera strujanja vrućeg zraka i raspršenih kapljica pojne smjese, a to su: istostrujno, protustrujno te mješovito strujanje. Kada se radi o istostrujnom strujanju, vrući zrak i kapljice pojne smjese struje u istom smjeru. Prilikom ovog smjera strujanja, najviša temperatura zraka je u kontaktu s kapljicama pojne smjese u kojima je prisutan najveći udio vlage, stoga je ovaj način strujanja pogodan za sušenje termoosjetljivih komponenti (Shishir i Chen, 2017). U usporedbi s istostrujnim strujanjem, protustrujno strujanje je brže i energetski učinkovitije. Prilikom korištenja mješovitog strujanja, dolazi do kombiniranja istostrujnog i protustrujnog način strujanja, atomizirane kapljice pojne smjese dovode se s „dna“ komore za sušenje, a vrući zrak se dovodi s gornje strane komore (Banožić i sur., 2021).

U četvrtoj fazi se odvajaju osušene čestice MC od struje vrućeg zraka/plina. Veće čestice same padaju na dno komore za sušenje, za razliku od njih kada imamo manje/sitnije čestice za njihovo izdvajanje se koriste cikloni. Osim različitog načina strujanja, postoje i različiti sistemi za odvajanje nastalih čestica MC od struje vrućeg zraka, kao što su različite izvedbe ciklona, elektrostatsko taloženje te filteri u obliku vreća koji mogu biti izrađeni od različitih materijala poput tekstila ili polietilena (Banožić i sur., 2021).



Slika 9 Konfiguracije komora za sušenje prilikom (a) istostrujnog, (b) protustrujnog, (c) mješovitog načina strujanja

Upotrebom ciklona, struja zraka puna čestica tangencijalno se uvodi u vrh jedinice, stvarajući hibridni vrtložni tok. Plin pun čestica kreće se spiralno duž vanjske stijenke prema dolje, sve dok čestice ne budu odvojene u kolektoru konačnog proizvoda. Plinski tok zatim mijenja smjer i kroz središnji vrtlog visoke tangencijalne brzine izlazi na vrhu ciklona, oslobađajući nastale MC (Vehring i sur., 2020).

2.7.1. Utjecaj temperature sušenja raspršivanjem na karakteristike mikrokapsula

U procesu sušenja raspršivanjem, temperatura je jedan od procesnih parametara koji najviše utječe na karakteristike MC. Postoje ulazna temperatura koju proizvoljno odabiremo te izlazna temperatura koja ovisi o ulaznoj temperaturi i količini isparene vode (Banožić i sur., 2021). Osim toga navodi se i temperatura pojne smjese, što je ona veća to će proces sušenja raspršivanjem biti brži (Patel i Suthar, 2009). Temperatura tijekom sušenja raspršivanjem mora biti dovoljno visoka kako bi se osiguralo isparavanje velike količine vode u pojnoj smjesi, ali ne previsoka kako ne bi došlo do degradacije aktivnih komponenti u MC. Ulazne temperature sušenja raspršivanjem variraju od 100 do 200 °C, ovisno o pojnoj smjesi koja se suši (Banožić i sur., 2021). Porast temperature u procesu sušenja raspršivanjem utječe na brojne parametre

nastalog praškastog proizvoda. Autori Tsermoula i sur. (2021), navode da je povećanje temperature ulaznog zraka uzrokovalo smanjenje efikasnosti inkapsulacije, udjela vlage, aktiviteta vode i gustoće praha prije potresanja. Rezultati istraživanja Nguyen i sur. (2018), pokazuju da je porast temperature ulaznog zraka uzrokovao smanjenje gustoće praha prije i nakon potresanja, omjera gustoće nakon potresanja prema stvarnoj gustoći MC, kapaciteta zadržavanja vode, udjela vlage u MC, ali i povećanje kompresibilnosti MC, Hausnerovog omjera i poroznosti MC. Suprotno prethodno navedenom, porast ulazne temperature uzrokovao je povećanje udjela vlage u prahu te stvaranje većih čestica u istraživanju autora Santhalakshmy i sur. (2015).

2.7.2. Utjecaj odabira omotača na karakteristike mikrokapsula

Izbor omotača je od iznimne važnosti jer je direktno povezan s uspješnosti procesa te stabilnosti bioaktivnih komponenti zaštićenih unutar MC (Dahlem Júnior i sur., 2022). Prinos i efikasnost inkapsulacije su glavne reference uspješnosti odabira omotača u procesu sušenja raspršivanjem (Lu i sur., 2021). Kako navodi Đorđević i sur. (2016), glavne karakteristike koje ima dobar omotač jesu: zadržavanje aktivnih sastojaka unutar kapsula pri različitim uvjetima okoline kao što su nizak pH u želudcu ili pak visoka temperature okoline, inertnost u odnosu na bioaktivnu tvar kao i djelomična propusnost membrane. Osim toga, prema Gharsallaoui i sur. (2007), idealan omotač treba biti dobro topiv u vodi, niske viskoznosti, niske higroskopnosti i dobrih emulgirajućih svojstava. Ukoliko se omotač koristi za inkapsulaciju u prehrambenoj industriji, on mora biti netoksičan i antialergijski za ljude, pogodan za sterilizaciju te nikakvog ili jako blagog okusa (Coimbra i sur., 2021). Osim što je bitno odabrati adekvatni omotač, potrebno je utvrditi i idealnu količinu omotača koja se dodaje u pojnu smjesu. U radu autora Fazaeli i sur. (2012), povećanje koncentracije maltodekstrina ili smanjenje dekstroznog ekvivalenta uzrokovalo je povećanje prinosa sušenja i topivosti te smanjenje gustoće prije potresanja, udjela vlage kao i aktiviteta vode MC.

Škrob i njegovi derivati. Škrob je jedan od najzastupljenijih polisaharida na bazi glukoze koji se generira putem biljaka tj. biljnog korijenja, stabljike ili sjemena. To je jeftina, netoksična, biokompatibilna i biorazgradiva molekula, koja se može lako ekstrahirati u čistom obliku. Glavni nedostaci škroba jesu loše mehaničke karakteristike, mala sposobnost emulgiranja te visoka osjetljivost na vodu. Kako bi se unaprijedila (bio)funkcionalnost i komercijalna primjenjivost polimera na bazi škroba, njegova se struktura može modificirati na različite načine: hidrofobna/hidrofilna modifikacija, oksidacija, acetilacija, hidroksipropilacija i

umrežavanje (Samborska i sur., 2021). Najčešće korišten škrobni derivati jesu maltodekstrini, polimeri D-glukoze, s različitim stupnjevima dekstroznog ekvivalenta (Papoutsis et al., 2018). Najčešće se kao omotači koriste maltodekstrini s dekstroznim ekvivalentom 10 – 20 zbog dobre topljivosti u vodi, niske viskoznosti te lake biorazgradivosti (Šturm i sur., 2019). Glavni nedostaci koji uzrokuju ograničenja u korištenju maltodekstrina kao omotača u procesu sušenja raspršivanjem jesu loša emulgirajuća svojstva zbog prisutnosti hidroksilnih skupina u njihovoj strukturi te izražen gubitak hlapivih komponenti (Šturm i sur., 2019; Waterhouse i sur., 2017). U literaturi se također navodi da maltodekstrin nakon postupka inkapsulacije pokazuje otpornost na promjenu svoje strukture sve do određenog aktiviteta vode, a to se objašnjava smanjenjem prisutnih hidroksilnih skupina nakon inkapsulacije, što rezultira smanjenom adsorpcijom vlage i lošijom topljivosti nastalih MC (Zotarelli i sur., 2022). U radu Gupta i sur. (2015) dokazna je potencijalna stabilizacijska sposobnost maltodekstrina nakon inkapsulacije zbog smanjenog propuštanja kisika. Maltodekstrine karakterizira brzo stvaranje kapsula, a najčešće se koriste u kombinaciji s polimerom dobrih emulgirajućih svojstava kao što su proteini (Both i sur., 2020; Shi i sur., 2013) ili gume (De Oliveira i sur., 2009; Ferrari i sur., 2013).

Proteini. Poznati su kao opće priznati, sigurni, lako probavljivi i biorazgradivi spojevi važni za ljudsko zdravlje. Imaju sposobnost stvaranja filma, sposobnost emulgiranja i pjenjenja, hidrofobnost te visoku temperaturu staklastog prijelaza, minimiziraju štetne učinke vanjskih djelovanja poput visoke temperature, strukturnih promjena, a osim toga smanjuju gubitak antioksidativne i biološke aktivnosti bioaktivnih spojeva. Budući da je porijeklo proteina iz prirodnih izvora, sve je veća tendencija korištenja proteinskih komponenti u industriji. Biljni proteini imaju manju cijenu, bolju hidrofobnost te veća antialergijska svojstva u usporedbi s proteinima životinjskog porijekla. Možda najpoznatiji protein biljnog porijekla je protein soje kojeg odlikuju brojna funkcionalna svojstva kao što su emulgirajuća aktivnost, sposobnost upijanja i vezanja vode za ulje, te očuvanje hidrofobnih i hidrofilnih bioaktivnih spojeva (Akbarbaglu i sur., 2021). Najčešće se koristi za inkapsulaciju ulja, uljnih smola, antocijana i karotenoida (Akbarbaglu i sur., 2021; Ribeiro i sur., 2010; Song i sur., 2022). Osim proteina soje koriste se i proteini krumpira (Galves i sur., 2023) i ječma (Meira i sur., 2023). Kazein, proteini sirutke i želatina pripadaju skupini proteina životinjskog porijekla. Proteini sirutke su najčešće korišteni omotač u inkapsulaciji zbog svojih amfifilnih, bioloških i emulgirajućih svojstava te izražene sposobnosti formiranja filma. Kazeini su glavna skupina topivih mliječnih proteina. Karakterizira ih sposobnost poboljšanja stabilnosti hidrofobnih spojeva. Želatina

nastaje iz životinjskog kolagena primjenom termičkih tretmana ili enzimske, kisele te alkalne hidrolize. Ono što ju karakterizira je visoka biorazgradivost i biokompatibilnost, dobro je topljiva u vodi te također ima sposobnost stvaranja filma. Često se upotrebljava kao omotač u procesu inkapsulacije spojeva s izraženom antioksidativnom aktivnošću (Akbarbaglu i sur., 2021).

Gume. Prirodne polisaharidne gume imaju široku primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji zahvaljujući svojim izvanrednim svojstvima poput biokompatibilnosti, netoksičnosti, biorazgradivosti i svojstvima viskoziranja. Ovo svojstvo molekula guma proizlazi iz njihovog potencijala u formiranju intermolekularnih zona povezivanja između dva različita polimerna lanca, stvarajući 3D-mreže i štiteći bioaktivne tvari tijekom ciljane isporuke. Gume biljnog podrijetla obično se kategoriziraju u četiri glavne skupine ovisno o njihovom izvoru: gume dobivene iz biljnog eksudata (npr. arapska guma), gume dobivene iz sjemenki (npr. guar guma), mikrobnih eksudata (npr. ksantanska guma) i gume dobivene iz morske trave (npr. karagenan) (Samborska i sur., 2021). Guma arabika je prirodni biopolimer sastavljen od mješavine polisaharida i glikoproteina. Izdvaja se iz soka raznih vrsta drveta akacije. Karakterizira ju pH stabilnost, netoksičnost, dobra emulzificirajuća svojstva te visoka topljivost (Bucurescu i sur., 2018). Osim kao omotač u procesu mikroinkapsulacije, koristi se još i kao emulgator, stabilizator i sredstvo za zgušnjavanje u prehrambenoj, tekstilnoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Ali i sur., 2009). Guma od indijskog oraščića je također prirodni biopolimer sastavljen od polisaharida galaktoze i glukoze, ekstrahiran iz soka stabla *Anacardium occidentale*. Svojstva ove gume su jako slična svojstvima gume arabike, stoga se često koristi kao jeftinija zamjena za arapsku gumu u procesima mikroinkapsulacije ribljih ulja (Botrel i sur., 2017). Guma tragakant je visokokvalitetni polisaharid koji se sastoji od dvije frakcije: basarina koji bubri i topljivog dijela tragakantina. Frakcije se osim po ovim svojstvima razlikuju i po gradivnim jedinicama, basarin se sastoji od ksiloze, galaktoze i galakturonske kiseline, a tragakantin izgrađuje arabinoza. Specifične karakteristike koje posjeduje ova guma omogućuju joj primjenu u prehrambenoj industriji kao sredstvo za želiranje, zamjena za mast, emulgator i stabilizator (Saffari i sur., 2013). Karagenan je anionski polisaharid na bazi galaktoze koji se izdvaja iz crvene alge *Rhodophyceae*. Zbog sposobnosti formiranja umreženih trodimenzionalnih mreža, svoju primjenu pronalazi kao mikroinkapsulirajući matriks živih stanica. Ovisno o broju i položaju ester sulfatnih grupa, dijeli se u tri glavne skupine jota, gama i lambda. U farmaceutskoj industriji se najčešće koriste gama i lambda karagenani (Marín-Peñalver i sur., 2021).

Zeleni biopolimeri kao omotači. Porastom ekološke svijesti potrošača i trenda održive proizvodnje javila se i želja za upotrebom novih “zelenih” omotača nastalih iz raznoraznih industrijskih otpada (Sánchez-Osorno et al., 2022). Jedan od takvih primjera je inulin, topivo prehrambeno vlakno koje se pronalazi u raznim biljkama poput pšenice, raži, ječma, češnjaka, cikoriije, luka, korijena maslačka, banana i artičoka. Osim toga kao alternativni izvori inulina se navode i brojni agroindustrijski nusproizvodi. Prema različitim istraživanjima, dokazano je da osim zdravstvenih dobrobiti, inulin kao omotač u procesu sušenja raspršivanjem ima povoljan učinak na očuvanje prirodnih fitokemikalija. Inulin ima temperaturu staklastog prijelaza od 105 °C, što ga čini idealnim omotačem za mikroinkapsulaciju sušenjem raspršivanjem komponenti bogatih šećerom poput voćnih sokova (Samborska i sur., 2021). Još jedan takav materijal je i pektin, topivo prehrambeno vlakno kojeg pronalazimo u brojnim nusproduktima kao što su: otpad citrusa, pulpa jabuke, pulpa šećerne repe, komina masline, pulpa krumpira, sojina ljuska, ljuska luka i otpad od rajčice. Iz navedenih nusprodukata se izdvaja različitim metodama ekstrakcije. Pektin ima potencijal formiranja stabilne početne emulzije prije sušenja raspršivanjem, a to sve zbog prisustva acetilnih skupina i povezanih proteina. Zapravo, 2 % pektina ima sličnu učinkovitost emulgiranja kao 15 % konvencionalne arapske gume. Najčešće se koristi u kombinaciji sa škrobnim (Moslemi i sur., 2014; Sansone i sur., 2011) ili proteinskim (Assadpour i sur., 2017; Carra i sur., 2022; Moghbeli i sur., 2019) omotačima. Još jedno vrijedno topivo dijetetsko vlakno je β -glukan, koji svoju prisutnost bilježi u zobi, ječmu, stanicama kvasca, bakterijama, morskim travama, algama (Kaur i sur., 2020) i gljivama poput šampinjona (Samborska i sur., 2021). β -glukan posjeduje sposobnost jačanja imuniteta, antitumorska, antiupalna i anti-age svojstva (Zhu i sur., 2016). Prilikom upotrebe β -glukana kao omotača ne preporučuje se dodatak veći od 0,5 % (Sobieralska i Kurek, 2019).

2.7.3. Utjecaj protoka i koncentracije pojne (inkapsulacijske) smjese na karakteristike mikrokapsula

Tijekom sušenja raspršivanjem pulpe rajčice u struji odvlaženog zraka, autori Goula i Adamopoulos, (2005) su zaključili da se povećanjem koncentracije pulpe rajčice bilježi i povećanje adsorpcije vode na površini čestice te porast veličine čestica. Istovremeno su vrijednosti parametara kvalitete MC, poput efikasnosti inkapsulacije, vlage te gustoće prije potresanja, smanjene (Goula i Adamopoulos, 2005). U radu autora Nguyen i sur. (2018), povećanje koncentracije pojne smjese je dovelo do povećanja kompresibilnosti, Hausnerovog omjera, poroznosti, indeksa močivosti, ali istovremeno i do smanjenja gustoće MC prije i nakon potresanja, omjera gustoće nakon potresanja prema stvarnoj gustoći MC, kapaciteta

zadržavanja vode i udjela vlage u finalnom proizvodu. Previsok protok pojne smjese negativno utječe na svojstva MC, posebice na prinos. S druge pak strane nizak protok pojne smjese rezultira energetski neučinkovitim procesom (Banožić i sur., 2021). Prilikom pronalaska optimalnih uvjeta sušenja raspršivanjem soka cikla, autori Singh i Hathan (2017), navode da nije zabilježen značaj utjecaj protoka pojne smjese na gustoću MC prije potresanja. Sušenjem raspršivanjem devinog mlijeka, zabilježen je statistički značajan utjecaj protoka pojne smjese na gustoću i rekonstitucijska svojstva praha (Ogolla i sur., 2019). U radu autora Tonon i sur. (2008), zabilježen je negativan utjecaj porasta koncentracije dodanog maltodekstrina u pojnu smjesu na prinos produkta te negativan utjecaj brzine protoka pojne smjese na iskorištenje procesa i higroskopnost, a pozitivan utjecaj na udio vlage praškastog produkta.

2.7.4. Utjecaj protoka zraka za sušenje na karakteristike mikro kapsula

Pokazalo se da je protok zraka još jedan od parametara procesa sušenja raspršivanjem koji utječe na karakteristike MC. Niski protok zraka tijekom sušenja raspršivanjem ekstrakta *Rhamnus purshiana* povećao je srednji promjer čestica i uzrokovao bolju tecivost produkta. Jednako tako je zabilježeno da su pri većem protoku zraka efikasnost inkapsulacije i prinos produkta bili veći (Gallo i sur., 2011). Osim većeg i manjeg protoka zraka, način strujanja zraka također ima utjecaja na svojstva MC. Prema istraživanjima Keshani i sur. (2015), na protok zraka u sušioniku s raspršivanjem, a onda u konačnici i na attribute finalnog proizvoda, utječe i sam dizajn komore za sušenje. Rezultati njihovog istraživanja navode da dizajn dna komore za sušenje utječe na vrtložnost zraka, odnosno da je kod komore za sušenje s paraboličnim dnom, u odnosu na komoru s konusnim dnom, pojava vrtložnosti bila manja, a to je uzrokovalo manje lijepljenje kapljica za stijenke komore za sušenje što je imalo direktan utjecaj na prinos procesa sušenja.

2.7.5. Utjecaj odabira ciklona na karakteristike mikro kapsula

Odabir ciklona također ima utjecaj na karakteristike MC. Kako navode Bögelein i Lee (2010), odabir ciklona manjih dimenzija od uobičajenih ciklona na sušionicima s raspršivanjem omogućuje izdvajanje manjih čestica (engl. *Fine particles*), samim time prinosi procesa sušenja su veći što je izuzetno poželjno kada se radi o sušenju tvari poput enzima. U istraživanju Poozesh i sur. (2020), ispitivan je utjecaj različitih konfiguracija ciklona na karakteristike praha. Proizveli su ciklone s nekoliko spremnika na različitim položajima. Kada se radilo o spremniku koji se nalazi poviše ciklona, dobivene su čestice sferičnog oblika i visoke poroznosti. Za

razliku od njih, upotrebom niže položenih spremnika, nastale su čestice manje poroznosti s izraženijim naborima na površini.

2.8. Bioraspoloživost i biodostupnost fenolnih spojeva

Bioraspoloživost, biodostupnost i bioaktivnost pojmovi su povezani s brojnim aktualnim istraživačkim studijama i usko su povezani s eksperimentima *in vitro* simulirane probave. Bioaktivnost predstavlja aktivnost apsorbiranih spojeva ili njihovih metabolita u metaboličkim putevima, što rezultira biološkim učincima na organizam. Biodostupnost mjeri udio spoja konzumiranog u obroku koji se oslobađa iz matrice hrane tijekom probave i dostupan je za apsorpciju u tankom crijevu ili je biotransformiran od strane crijevne mikrobiote. Bioraspoloživost se odnosi na količinu spojeva koji dovrše put prolazeći kroz probavni trakt, apsorbiraju se i dopijevaju do ciljnih tkiva u intaktnom ili metaboliziranom obliku kako bi izvršili svoju bioaktivnost ili pak bili pohranjeni (Rodrigues et al., 2022). Probava hrane u humanom gastrointestinalnom traktu je kontinuiran i dinamičan proces. Sve započinje u ustima, sa žvakanjem i salivacijom. Prilikom probave čvrste hrane, ova faza će uzrokovati smanjenje veličine čestica hrane i nastanak bolusa hrane. Kada se radi o tekućoj hrani, oralna faza uzrokuje minimalnu promjenu, dolazi do izjednačenja temperature s tjelesnom temperaturom te do razrjeđenja slinom. Rezultirajući bolus hrane prenosi se peristaltikom jednjaka sve do želuca u kojemu se hrana skladišti, miješa i melje te potom odlazi do crijeva. Glavna probava hrane nastavlja se u tankom crijevu nakon želučane probave. Tanko crijevo ima dvije glavne uloge u probavi i apsorpciji, a to su razgradnja makromolekula te apsorpcija vode i hranjivih tvari. Brojni modeli *in vitro* probave u rasponu od jednog statičnog sustava pa sve do složenih dinamičkih sustava s više odjeljaka razvijeni su proteklih godina i naširoko se koriste kao alternativni alat za proučavanje probave hrane (Li i sur., 2020). Postoje različite *in vivo* i *in vitro* metode za određivanje brzine i stupnja probavljanja i apsorpcije polifenola. U prošlosti su se koristile i smatrale najpouzdanijima metode kvantitativne analize odgovarajućih biomarkera pronađenih u urinu, krvi ili fecesu. Budući da su te metode dugotrajne i teške zbog niske koncentracije analita, razvijeni su mnogi funkcionalni modeli koji vjerno simuliraju uvjete različitih dijelova probavnog trakta. Apsorpcija i metabolizam fenolnih spojeva u gastrointestinalnom traktu određuju njihova biološka svojstva. Jedino će polifenolni spojevi otpušteni u crijevima moći ispoljiti svoja biološka svojstva. Približno se 48 % fenolnih spojeva probavlja u tankom crijevu, a nešto manje oko 42 % u debelom crijevu. Oko 10 % fenolnih spojeva ostaje neprobavljeno i zarobljeno unutar matriksa hrane. Neprobavljeni polifenoli zatim

prelaze u debelo crijevo, gdje su podvrgnuti daljnjoj razgradnji u fenolne kiseline putem mikroflore debelog crijeva. Na bioraspoloživost fenolnih spojeva još utječu i pH vrijednost gastrointestinalne okoline te matriks hrane unutar koje se nalaze fenolni spojevi jer u određenim slučajevima fenolni spojevi reagiraju s određenim sastojcima hrane te se time smanjuje njihova apsorpcija iz probave (Tarko i sur., 2013).

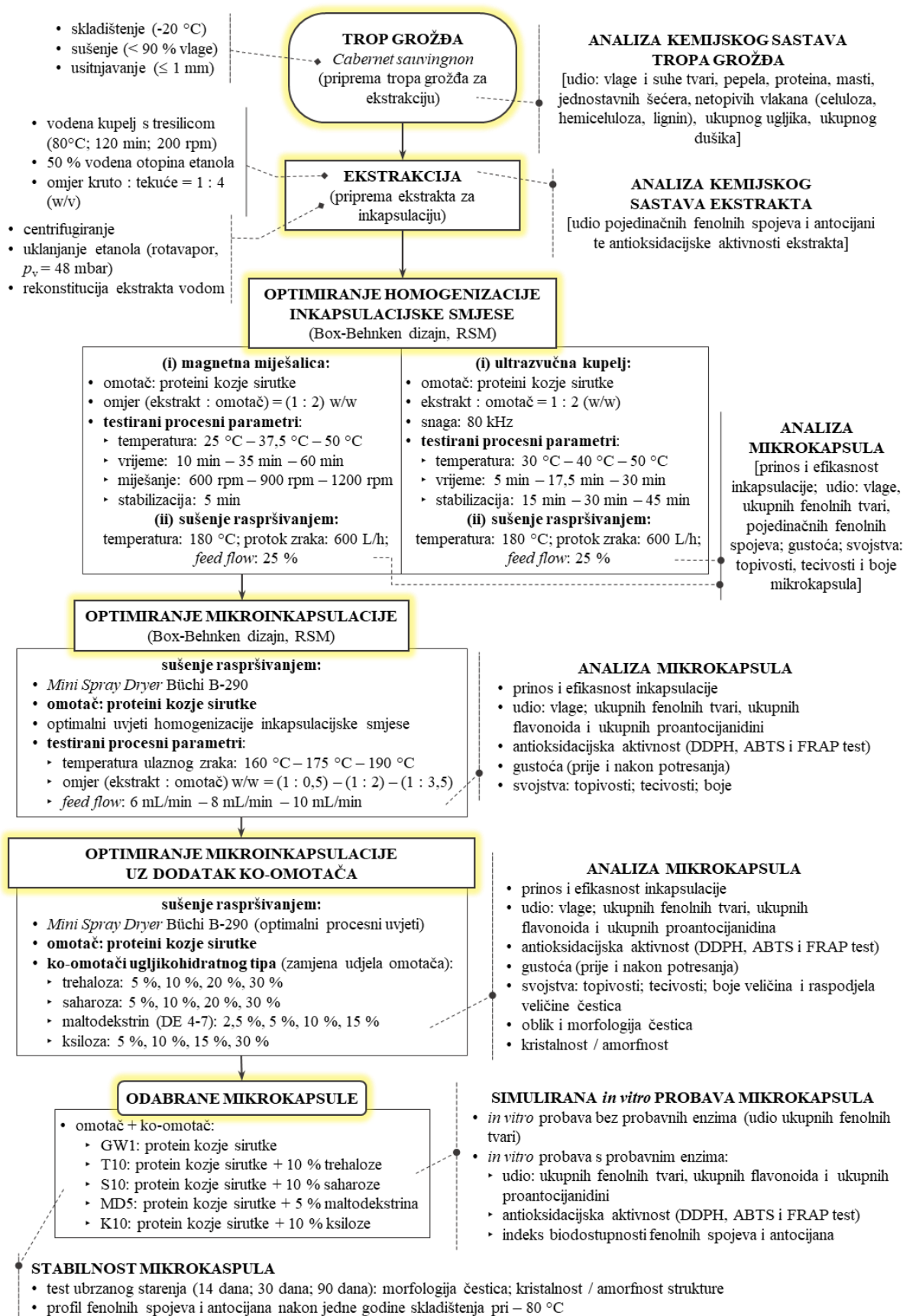
3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Zadatak ovog doktorskog rada je bio:

1. Ekstrakcijom tropa grožđa, zaostalog nakon proizvodnje crnog vina, proizvesti biološki aktivan izolat.
2. Odabrati metodu i optimalne uvjete homogenizacije inkapsulacijske smjese ekstrakta tropa grožđa i omotača (proteina kozje sirutke).
3. Razviti proces inkapsulacije ekstrakta tropa grožđa metodom sušenja raspršivanjem, koristeći proteine kozje sirutke kao omotač, u svrhu očuvanja i zaštite fenolnih spojeva te povećanja njihove biodostupnosti.
4. Ispitati utjecaj dodatka drugog omotača ugljikohidratnog tipa proteinu kozje sirutke, odnosno efikasnost inkapsulacije, fizikalno-kemijske karakteristike MC, biodostupnost fenolnih spojeva tijekom *in vitro* simulirane probave te stabilnost MC tijekom testa ubrzanog starenja.
5. Karakterizacija proizvedenih MC ekstrakta tropa grožđa.

Eksperimentalni dio ovog doktorata bio je podijeljen u nekoliko faza. Najprije je bilo potrebno pripremiti i analizirati trop grožđa te potom provesti ekstrakciju. Potom je dobiveni ekstrakt miješan s odabranim omotačem kako bi se priredila inkapsulacijska smjesa za inkapsulaciju sušenjem raspršivanjem. U idućoj fazi su određeni optimalni uvjeti homogenizacije i sušenja raspršivanjem pojne smjese. Zatim je ispitivan utjecaj dodatka ugljikohidratnog ko-omotača (ksiloze, trehaloze, maltodekstrina, saharoze) u različitim koncentracijama na karakteristike MC. U finalnoj fazi istraživanja provedena je *in vitro* simulirana probava (sa i bez enzima) odabranih MC te je određen indeks biodostupnosti pojedinih polifenola i antocijana. Shematski prikaz eksperimentalnog dijela ovog doktorskog rada prikazan je na **Slici 10**.



Slika 10 Shematski prikaz istraživanja

3.2. Materijali

3.2.1. Sirovina

U radu je korišten uzorak tropa grožđa sorte cabernet sauvignon (berba 2017.), porijeklom iz vinarije Erdut, koji je zaostao preradom grožđa u vino iz vinogradarske regije Slavonija i hrvatsko Podunavlje. Uzorak je skladišten pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Neposredno prije provođenja eksperimenta, uzorak je odmrznut te osušen do udjela suhe tvari većeg od 90 % te potom samljeven na centrifugalnom mlinu na veličinu čestica manju ili jednaku 1 mm.

3.2.2. Omotači i ko-omotači

Komercijalni proizvod kozje sirutke s udjelom proteina od 78,60 % (Goat Whey Protein, Carrington Farms, Closter, New Jersey, USA) je korišten kao glavni inkapsulacijski omotač u procesu sušenja raspršivanjem, dok su trehaloza, saharoza, ksiloza i maltodekstrin (DE 4–7) korišteni kao ko-omotači.

3.2.3. Kemikalije

Tijekom izrade ovog doktorskog rada korištene su kemikalije: apsolutni etanol (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), metanol HPLC čistoće (J.T. Baker, Arnhem, Nizozemska), acetonitril HPLC čistoće (Fisher Chemical, Loughborough, UK), mravlja kiselina 98 – 100 % (Supelco Inc, Bellefonte, Pennsylvania, USA), ledena octena kiselina (Macron Fine Chemicals, Gliwice, Poljska), DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), galokatehin galat, epikatehin galat, (–)-epikatehin, (+)-katehin hidrat, kafeinska kiselina, elaginska kiselina, galna kiselina, resveratrol, siringinska kiselina, kaempferol, *o*-kumarinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, rutin hidrat, *p*-hidroksibenzojeva kiselina (Sigma Aldrich, Saint Louis, SAD), procijanidin B1, procijanidin B2 (Extrasynthese, Genay, Francuska), kvercetin, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina (Acros Organics, Geel, Belgija), ϵ -viniferin (AppliChem, Darmstadt, Njemačka), tirozol, epigalokatehin, klorogenska kiselina, sinapinska kiselina, *p*-hidroksifenilacetatna kiselina, miricetin (Sigma Aldrich, Saint Louis, SAD), tween-80, DL-arabinoza, maltotrioza, L-ramnoza, natrijev sulfit, *n*-oktanol (Sigma Aldrich, Saint Louis, SAD), celuloza, D(+)-ksiloza (Kemika, Zagreb, Hrvatska), D(–)-fruktoza, D(–)-riboza, D(+)-celobioza, D(+)-galaktoza, D(+)-maltoza monohidrat, D(+)-manoza, D(+)-saharoza (Acros Organics, Geel, Belgija), D(+)-glukoza (Gram Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), trehaloza (Hayashibara doo, Nagase group, Tokyo, Japan), 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ), 2,2'-

azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS), amonijev persulfat, natrijev karbonat, kalijev hidrogenftalat, kalijev nitrat, željezo (II) sulfat heptahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska), aluminijev (III) klorid heksahidrat (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Kandel, Njemačka), Folin-Ciocalteu reagens (CPA chem Bogomilovo, Bugarska), kalijev klorid, natrijev klorid, kalcij klorid dihidrat (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), monokalijev fosfat (Sigma Aldrich, Saint Louis, SAD), natrijev hidrogenkarbonat (Kemika, Zagreb, Hrvatska), magnezij klorid heptahidrat (Fisher Chemical, Loughborough, UK), amonij karbonat (Acros Organics, Geel, Belgija), pepsin iz želučane sluznice svinja, pankreatin aktivnosti ekvivalentne TO, 8X*U SPEC, svinjske žučne soli (Sigma Aldrich, Saint Louis, SAD).

3.2.4. Uređaji

Tijekom izrade ovog doktorskog rada korišteni su sljedeći uređaji:

- analitička vaga (Adam Equipment, Nimbus NBL-214i, Kingston, Engleska)
- analizator vlakana (FIWE 3, VELP Scientifica, Usmate Velate, Italy)
- analizator vlage (Mettler Toledo, HR-73, Zürich, Švicarska)
- blok za razaranje (Behr Labor-Technik GmbH, Behrotest K12, Düsseldorf, Njemačka)
- centrifuga (Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- diferencijalni skenirajući kalorimetar (Mettler Toledo 821e DSC; Mettler Inc., Schwerzenbach, Switzerland)
- hidraulička preša Specac (Specac Inc. Orpington, UK)
- klimatska komora (Binder KBF 115, Tuttlingen, Njemačka)
- kolorimetar (Chroma Meter CR-400, Konica Minolta, USA)
- magnetna mješalica (SMHS-6, Witeg, Germany)
- mikroskop (Leica LABORLUX S, Leitz Wetzlar, Njemačka)
- mufolna peć (MF12-124, Forns Hobersal, Barcelona, Španjolska)
- pH metar (pH/ORP HI 2211, HANNA Instruments d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- rotavapor (Büchi B-210, Flawil, Švicarska)
- skenirajući elektronski mikroskop (Hitachi S4700, Hitachi Scientific Ltd., Tokyo, Japan)
- sušionik (UFE 500, Memmert, Njemačka)
- sušionik s raspršivanjem (Mini Spray dryer Büchi B-290, Flawil, Švicarska)
- tehnička vaga (OHAUS PA4102C, OHAUS Europe GmbH, Nänikon, Švicarska)

- termostat (Lovibond TC 135 S/135 L, Tintometer GmbH, Dortmund, Njemačka)
- TOC analizator (TOC-LCPH/CPN, SSM 5000A, Shimadzu, Japan)
- ultracentrifugalni mlin (Retsch ZM200, Haan, Njemačka)
- ultrazvučna kupelj (Elmasonic P 120 H, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka)
- univerzalni sustav za ekstrakciju (Büchi B-811 LSV, Flawil, Švicarska)
- uređaj za pripremu uzorka za skenirajući elektronski mikroskop (Bio-Rad SC 502, VG Microtech, Uckfield, UK)
- uređaj za određivanje gustoće praha nakon potresanja (Autotap, Anton Paar, Austrija)
- uređaj za difrakciju praha sa X-zrakama (BRUKER D8 Advance diffractometer, Karlsruhe, Njemačka)
- uređaj za mjerenje kontaktnog kuta (Contact angle system OCA20, Data physics, Njemačka)
- uređaj za destilaciju (Behr Labor-Technik GmbH, Behrotest Behr S2, Düsseldorf, Njemačka)
- uređaj za analizu veličine čestica (Malvern Mastersizer Scirocco 2000, Richmond Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke učinkovitosti (UHPLC Nexera XR, Shimadzu, Kyoto, Japan)
- UV/VIS spektrofotometar (UV-1280, Shimadzu, Kyoto, Japan)
- vodena kupelj s tresilicom (Julabo, SW-23, Seelbach, Njemačka)
- vorteks (DLab MX-S, Los Angeles, SAD)
- vertikalni multifunkcionalni rotator (PTR-60, Grant Instruments Ltd, Cambridgeshire, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- zamrzivač (SMART-Lab SWUF-80, Witeg, Njemačka).

3.3. Metode

3.3.1. Određivanje kemijskog sastav tropa grožđa

3.3.1.1 Određivanje udjela suhe tvari i vlage u tropu grožđa

Udio suhe tvari i vlage u tropu grožđa je determiniran termogravimetrijskom metodom korištenjem analizatora vlage. Na aluminijsku pliticu je odvagano 3 g uzorka te je sušenje

provedeno standardnom metodom pri 105 °C uz korištenje kriterija završetka procesa 3 (engl. *switch-off criteria*) odnosno sve dok gubitak mase nije bio manji od 1 mg tijekom 50 sekundi.

3.3.1.2 Određivanje udjela pepela u tropu grožđa

U svrhu određivanja udjela pepela u tropu grožđa, korištena je AACC–08–03 metoda (Czaja i sur., 2020). U prethodno pripremljene lončice (žarene, ohlađene i izvagane), izvagano je 2 g uzorka tropa grožđa. Lončici s uzorcima su potom postavljeni u mufolnu peć na 600 °C, 4 h. Po završetku procesa spaljivanja, lončici su postavljeni u eksikator, ohlađeni i izvagani. Korištenjem jednadžbe (1) određen je udio pepela.

$$\text{Udio pepela (\%)} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \quad (1)$$

gdje je:

- m_1 – masa praznog lončića (g),
- m_2 – masa lončić + uzorak (g),
- m_3 – masa lončića nakon žarenja (g).

3.3.1.3 Određivanje udjela proteina u tropu grožđa

Određivanje udjela proteina po Kjeldahlu provedeno je standardnom AOAC metodom (Wendt Thiex and Latimer, 2023) koja se temelji na određivanju udjela proteina indirektno iz udjela dušika. Ova metoda se zasniva na zagrijavanju uzorka s koncentriranom sumpornom kiselinom uz dodatak bakrovog i natrijevog sulfata, pri čemu bakrov sulfat služi kao katalizator, a natrij sulfat kao sol za povišenje vrelišta. Prilikom zagrijavanja dolazi do potpune oksidacije organske tvari, pri čemu nastali dušik koji je oslobođen u obliku amonijaka reagira sa sumpornom kiselinom te nastaje amonijev sulfat. Nakon toga se provodi postupak destilacije gdje se pod djelovanjem lužine na amonijev sulfat oslobađa amonijak koji se potom predestilira u tikvicu s kiselinom poznatog molaliteta dok se višak kiseline utvrdi postupkom titracije. Ukoliko se u analiziranim uzorcima nalaze nitrati i nitriti, tijekom postupka razaranja doći će do njihova hlapljenja te ih neće biti moguće odrediti na ovaj način.

POSTUPAK

0,2 g uzorka se izvaže na komadiće celofana, koji se potom umotaju i postave u staklene epruvete. U epruvete se također prenese i 10 g natrijevog sulfata te 0,1 g bakrovog sulfata, a

nakon toga se doda 15 mL koncentrirane sumporne kiseline. Potom slijedi postavljanje epruveta na stalak za spaljivanje te "mirovanje" u trajanju od 30 min, nakon čega su epruvete protresene laganim pokretima, spojene na sustav za odsisavanje i stavljene u blok za razaranje koji je zagrijan na 420 °C. Po isteku razaranja u trajanju od 1 h, uzorci su ohlađeni te im je dodano 75 mL vode, a nakon toga je uslijedila destilacija. Za potrebe destilacije, u epruvete se dodalo 50 mL 35 % (w/v) natrijevog hidroksida, pokrenuta je destilacija te je skupljeno oko 100 mL destilata. Na kraju destilacije u svaku se tikvicu s uzorkom dodaje indikator te se provodi titracija s 0,1 M natrijevim hidroksidom uz praćenje volumena natrijevog hidroksida utrošenog za titraciju. Za potrebe utvrđivanja udjela dušika u slijepoj probi, korišten je prazan listić celofana. Za izračun udjela dušika je korištena jednadžba (2).

$$\text{Udio dušika (\%)} = \frac{(a - b) \cdot f \cdot 0,14}{c \cdot 10} \quad (2)$$

pri čemu je:

- a – volumen 0,01 M otopine natrijevog hidroksida upotrijebljenog za titraciju slijepe probe (mL),
- b – volumen 0,01 M otopine natrijevog hidroksida upotrijebljenog za titraciju ispitivanog uzorka (mL),
- f – faktor upotrijebljenog 0,01 M natrijevog hidroksida,
- c – količina uzorka (g).

Vrijednost udjela proteina se dobije množenjem udjela dušika s faktorom 6,25.

3.3.1.4 Određivanje udjela ukupnog ugljika, anorganskog ugljika, ukupnog organskog ugljika i ukupnog dušika u uzorcima tropa grožđa

Korištenjem TOC analizatora i metode katalitičke oksidacije izgaranjem pri visokoj temperaturi, određen je udio ukupnog organskog ugljika (engl. *Total Organic Carbon*, TOC) i ukupnog dušika (engl. *Total Nitrogen*, TN) u tekućem ekstraktu tropa grožđa. Upotrebom iste metode u kombinaciji sa SSM-5000A modulom određen je udio ukupnog (TC) i anorganskog ugljika (IC) te ukupnog organskog ugljika u čvrstom uzorku tropa grožđa. Za određivanje udjela TC i IC u prethodno pripremljene keramičke lađice (žarene pri 550 °C tijekom 60 min, potom ohlađene) izvagano je 30 mg uzorka tropa grožđa. TC analiza se provodi pri temperaturi od 900 °C uz prekrivanje uzorka s keramičkom vunom neposredno prije uvođenja u pećnicu. IC analiza se provodi pri 200 °C uz dodatak 300 µL 25 %-tne fosforne kiseline koja osigurava prelazak svih karbonata i hidrogenkarbonata u CO₂. Produkti izgaranja se korištenjem kisika s protokom

500 mL/min odvode do ćelija nedisperzivnog infracrvenog detektora koji detektira CO₂ i šalje detekcijski signal koji se manifestira u obliku pika. Upotreba softvera TOC-Control L (verzija 1.04) omogućava izračunavanje površine ispod pika na temelju usporedbe s prethodno izrađenim kalibracijskim krivuljama. Za izradu kalibracijskih krivulja za TC kao standard je korišten kalijev hidrogenftalat, dok je za izradu IC kalibracijskih krivulja kao standard korišten natrijev karbonat. Udio TOC u čvrstim uzorcima se izračunava kao razlika udjela TC i IC. Svi rezultati su izraženi u % te su preračunati na suhu tvar uzorka.

Kako bi u tekućim ekstraktima odredili koncentraciju TOC-a u softveru je izabrana izravna NPOC (engl. *Non Purgeable Organic Carbon*) metoda prema kojoj se tekućem ekstraktu najprije dodala 1,5 % klorovodična kiselina (1 M) kojom je iz uzorka uklonjen anorganski ugljik. Korištenjem platine kao katalizatora te sintetskog plina kao nosioca, anorganski ugljik se prevodi u CO₂. Potom se uzorak uvodi u oksidacijsku komoru gdje se pri 680 °C sav preostali ugljik, postupkom oksidacije prevodi u CO₂. U svrhu uklanjanja halogenih elemenata do ćelija NDIR-a, plin nosioc se hladi, odvlažuje i prolazi kroz halogeni pročišćivač. NDIR šalje detekcijski signal koji se bilježi u obliku pika, a površina ispod pika se automatski izračunava pomoću softvera TOC-Control L (verzija 1.04) na temelju usporedbe s prethodno izrađenim kalibracijskim krivuljama. Za izradu kalibracijskih krivulja je korišten kalijev hidrogenftalat. Dobivena koncentracija ukupnog organskog ugljika je izražena u mg/L, a taj je rezultat potom preračunat na suhu tvar uzorka (mg/g_{s.tv.}).

Kako bi u tekućim uzorcima izmjerili udio TN upotrijebljena je TNM-L jedinica te metoda katalitičkog izgaranja pri 720 °C pri čemu dolazi do pretvorbe dušika iz uzorka u dušikov monoksid koji u reakciji sa ozonom stvara dušikove dioksidge a njih je moguće detektirati s kemiluminiscentnim detektorom (engl. *Chemiluminescence Detector*, CLD). Detekcijski signal se bilježi u obliku pika, a površina ispod pika se automatski izračunava pomoću softvera TOC-Control L (verzija 1.04) na temelju usporedbe s prethodno izrađenim kalibracijskim krivuljama. Za izradu kalibracijske krivulje korišten je kalijev nitrat. Dobivena koncentracija ukupnog dušika je izražena u mg/L, a taj je rezultat potom preračunat na suhu tvar uzorka (mg/g_{s.tv.}).

3.3.1.5 Određivanje udjela neutralnih detergent vlakana, kiselih detergent vlakana i kiselog detergent lignina u tropu grožđa

Za određivanje svih vlakana prisutnih u uzorku tropa grožđa korištena je Van Soest metoda (Goering i Soest, 1970). Najprije je bilo potrebno pripremiti otopine za određivanje neutralnih

detergent vlakana (NDF otopina) i kiselih detergent vlakana (ADF otopina). Za pripremu NDF otopine, najprije se uz zagrijavanje otopi 5,72 g natrijevog hidrogen fosfata dihidrata u 100 mL destilirane vode. Osim toga, 6,81 g natrijeva tetraborata dekahidrata je uz zagrijavanje postupno dodano u 600 mL destilirane vode. Nakon njegova otapanja smanjena je temperatura pri kojoj se priprema otopina te je u otopinu dodano 20,6 g etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol dihidrata (EDTA), 30 g natrijevog dodecil sulfata i 10 mL 2-etoksietanola. Nakon pripreme, obje otopine se pomiješaju u odmjernu tikvicu od 1 L, te se tikvica nadopuni destiliranom vodom do oznake. Za pripremu ADF otopine potrebno je uz zagrijavanje otopiti 20 g heksadeciltrimetilamonij bromida u 200 mL destilirane vode. U 500 mL destilirane vode koja se nalazila u odmjernoj tikvici od 1 L je postupno dodano 26,76 mL 0,5 M sumporne kiseline. Tako pripremljenoj otopini se dodalo 200 mL prethodno spomenute otopine heksadeciltrimetilamonij bromida, te je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

U prethodno pripremljene gučeve (sušenje u trajanju 1 h na 105 °C, potom hlađenje u eksikatoru) odvagano je 1 g uzorka tropa grožđa te su gučevi postavljeni na uređaj za analizu vlakana. Pri određivanju udjela neutralnih detergent vlakana (NDF) u gučeve je dodano 0,5 g natrijevog sulfita, 100 mL pripremljene NDF otopine i nekoliko kapi *n*-oktanola. Uzorci su zagrijani do ključanja te uz refluks zagrijavani 60 min. Potom je uslijedilo filtriranje uzoraka i ispiranje uzoraka – tri puta s 30 mL kipuće vode i dva puta s 25 mL hladnog acetona. Potom su uzorci sušeni 2 h na 130 °C. Određivanje udjela kiselih detergent vlakana (ADF) se nastavlja u gučevima s izvaganim ostatkom nakon određivanja NDF-a. Gučevi su ponovno postavljeni u uređaj za određivanje udjela vlakana te im je dodano 100 mL ADF otopine i nekoliko kapi *n*-oktanola. Provedeno je zagrijavanje uz refluks u trajanju od 1 h, a potom je provedena filtracija uzoraka te ispiranje uzoraka - tri puta s 30 mL kipuće vode i dva puta s 50 mL hladnog acetona. Gučevi su ponovno stavljani na sušenje, po završetku kojeg su ohlađeni i izvagani. U tim gučevima je napravljena analiza za određivanje kiselog detergent lignina (ADL) na način da je dodano 25 mL 72 % sumporne kiseline, ostavljeno pri sobnoj temperature u uređaju za određivanje vlakana tijekom 3 sata, uz miješanje uzoraka svakih sat vremena, nakon čega su uzorci isprani kipućom vodom sve do neutralizacije, a potom osušeni, ohlađeni i izvagani. U svrhu provođenja korekcije ADL-a gučevi sa ostatkom su žareni u mufolnoj peći pri 550 °C tijekom 2 h. Korištenjem jedandžbi (3) i (4) su izračunati udjeli vlakana.

$$\text{NDF ili ADF} = \left(\frac{m_1}{m_{\text{uz}} \cdot \frac{w_{\text{s.t.v.}}}{100}} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

$$ADL = \left(\frac{m_1 - m_2}{m_{uz} \cdot \frac{w_{s.tv.}}{100}} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

gdje je:

- m_1 – ostatak nakon sušenja (g),
- m_2 – ostatak nakon žarenja (g),
- m_{uz} – masa korištenog uzorka (g)
- $w_{s.tv.}$ – udio suhe tvari uzorka (%),
- NDF – udio neutralnih detergent vlakana (%_{s.t.}),
- ADF – udio kiselih detergent vlakana (%_{s.t.})
- ADL – udio kiselog detergent lignina (%_{s.t.}).

Udio hemiceluloze je izračunat kao razlika između NDF-a i ADF-a, udio celuloze kao razlika između ADF-a i ADL-a, dok ADL predstavlja udio lignina.

3.3.1.6 Određivanje udjela masti u uzorcima tropa grožđa

Kako je navedeno u radu Šelo i sur. (2022), upotrebom univerzalnog sustava za ekstrakciju i standardne Soxhlet metode AAOC 945.16 određen je udio masti u uzorku tropa grožđa. Za analizu je najprije izvagano 2 g uzorka u posude koje su potom postavljene u komoru za ekstrakciju. Izabran je standardni Soxhlet program tijekom kojega se provodi ekstrakcija u trajanju od 2 h, potom ispiranje u trajanju od 5 min te isparavanje otapala i sušenje uzorka u trajanju od 15 min. Kao otapalo je korišten *n*-heksan. Na kraju ekstrakcije, slobodne masti su sakupljene u prethodno osušene i izvagane staklene tikvice, nakon čega je provedeno dodatno sušenje u sušioniku pri 105 °C tijekom 30 min. Nakon dodatnog sušenja, tikvice s uzorkom su ohlađene u eksikatoru te potom izvagane. Udio masti izračunat je prema jednadžbi (5). Udio masti je izražen u postotku (%) te je preračunat na suhu tvar uzorka.

$$\text{Udio masti (\%)} = \left(\frac{m_E}{m_{uz}} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

gdje je:

- m_E – masa ekstrakta prikupljenog u staklenoj tikvici koji sadrži slobodne masti (g),
- m_{uz} – masa uzorka korištenog za ekstrakciju (g).

3.3.1.7 Priprema ekstrakta tropa grožđa

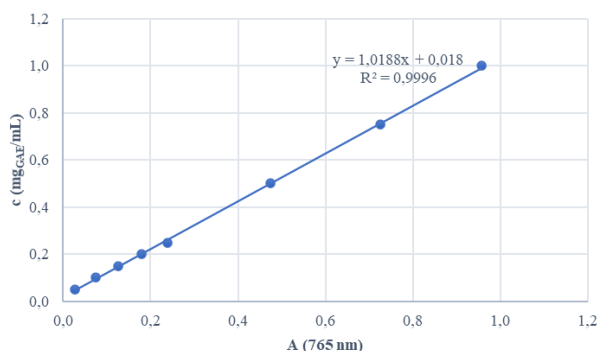
Provedena je konvencionalna kruto-tekuća ekstrakcija tropa grožđa s ciljem određivanja kemijskog sastava ekstrakta. Osušen i samljeven trop grožđa veličine čestica ≤ 1 mm pomiješan je s 50 %-tnom vodenom otopinom etanola u omjeru 1 : 40 (w/v) te je provedena ekstrakcija u vodenoj kupelji s tresilicom, pri uvjetima: 80 °C, 120 min, 200 rpm. Po završetku ekstrakcije uzorak je centrifugiran 10 min pri 11 000 rcf te je supernatant korišten za analizu, odnosno određivanje koncentracije fenolnih spojeva (pojedinačni fenolni spojevi, ukupni fenolni spojevi, ukupni flavonoidi, ukupni ekstraktibilni proantocijanidini) i antioksidacijske aktivnosti ekstrakta tropa grožđa pomoću tri metode (DPPH, FRAP i ABTS metoda).

3.3.1.8 Određivanje koncentracije ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktima tropa grožđa

Ukupni fenolni spojevi (engl. *Total Phenolic Content*, TPC) u ekstraktima tropa grožđa određeni su spektrofotometrijski Folin-Ciocalteuovom metodom prema Waterhouse (2002) uz manje modifikacije. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline. Fenolne tvari u reakciji sa Folin-Ciocalteuovim reagensom stvaraju plavo obojenje koje se može detektirati spektrofotometrom pri vidljivom svjetlosnom spektru. Tijekom reakcije fenolnih tvari i Folin-Ciocalteuova reagensa dolazi do oksidacije fenolnih spojeva i redukcije Folin-Ciocalteuova reagensa u alkalnoj sredini u volfram i molibden oksid, nastaje plavo obojenje čija se apsorbancija mjeri pri valnoj duljini od 765 nm (Stratil i sur., 2006).

IZRADA KALIBRACIJSKE KRIVULJE

Galna kiselina je otopljena u 50 %-tnoj vodenoj otopini etanola, u rasponu koncentracija 0,05 – 1 mg/mL. Nakon reakcije uzoraka galne kiseline s Folin-Ciocalteu reagensom, na spektrofotometru pri valnoj duljini od 765 nm su izmjerene apsorbancije pripadajućih koncentracija prema kojima je izrađena kalibracijska krivulja (**Slika 11**).



Slika 11 Baždarna krivulja napravljena s galnom kiselinom kao standardom za određivanje koncentracije ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktu tropa grožđa

POSTUPAK

U epruvetu je otpipetirano 40 μL pripremljenog ekstrakta, 3160 μL redestilirane vode i 200 μL Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 8 min dodano je 600 μL 20 %-tne vodene otopine Na_2CO_3 . Uzorci su pomiješani na vorteks miješalici te stavljeni na inkubaciju u vodenu kupelj pri 40 $^\circ\text{C}$ tijekom 30 min kako bi se razvilo plavo obojenje čija je apsorbancija po isteku vremena inkubacije izmjerena na UV/VIS spektrofotometru pri 765 nm. Sva mjerenja su provedena u tri paralele. Slijepa proba je pripremljena na isti način uz dodatak 40 μL ekstrakcijskog otapala umjesto uzorka. Konačna vrijednost TPC je izražena kao $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ (masa ekvivalenta galne kiseline po masi suhe tvari uzorka). Ekvivalent galne kiseline određuje se prema kalibracijska krivulji (**Slika 11**), a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ponavljanja \pm SD.

3.3.1.9 Određivanje koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima tropa grožđa

Koristeći reverzno-faznu UHPLC metodu pomoću PDA (engl. *Photodiode Array Detector*) detektora je odrađena kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinačnih fenolnih spojeva. PDA detekcija fenolnih spojeva provedena je snimanjem spektra u području valnih duljina između 252 i 370 nm, dok je razdvajanje fenolnih spojeva provedeno upotrebom Kinetex® C18 kolone (100 \times 4,6) mm, 2,6 μm , Phenomenex, Torrance, CA, SAD). Za razdvajanje spojeva je korištena linearna gradijentalna metoda uz upotrebu otapala A (1 % octena kiselina u vodi, v/v) i B (50 % metanol, 50 % acetonitril, v/v) pri temperaturi od 30 $^\circ\text{C}$ i protoku od 1 mL/min od 5 % do 30 % B 25 minuta, od 30 % do 40 % B 10 minuta, od 40 % do 48 % B 5 minuta, od 48 % do 70 % B 10 minuta, od 70 % do 100 % B 5 minuta, zatim izokratno 100 % B tijekom 5 minuta. Po završetku navedenog slijedi povratak na početne uvjete (10 minuta) kao i ekvilibracija kolone (12 minuta). Neposredno prije provedbe analize uzorci su filtrirani kroz membranske filtere veličine pora od 0,45 μm (Chromafil Xtra PTFE, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Dueren,

Njemačka). Za provedbu analize se injektiralo 20 μL uzorka. Za obradu podataka je korišten softver LabSolutions 5.87. Za identifikaciju pojedinačnih fenolnih spojeva je korištena usporedba retencijskih vremena i UV-Vis spektra pojedinačnih fenolnih spojeva analiziranog uzorka s retencijskim vremenom i UV-VIS spektrom autentičnih standarda analiziranih pri identičnim kromatografskim uvjetima. Provedba kvantifikacije je omogućena primjenom metode vanjskog standarda. Detekcija hidroksibenzojevih kiselina provedena je pri 252 – 280 nm, hidroksicimetnih pri 276 – 277 nm, flavan-3-ola pri 273 – 277 nm, flavonola pri 365 – 370 nm, procijanidina na 278 nm, dok su stilbeni detektirani na 305 – 323 nm. Ova analiza je provedena u tri paralelna ponavljanja, a vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm SD. Masene koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima (C' , mg/L) preračunate su na masu suhe tvari tropa grožđa (C , mg/g_{s.tv.}) prema jednadžbi (6).

$$C = \frac{C' \cdot V \cdot DF}{m \cdot \frac{w_{s.tv.}}{100}} \quad (6)$$

gdje je:

- V – ukupni volumen ekstrakta tropa grožđa (L),
- DF – faktor razrjeđenja (–),
- m – masa uzorka tropa grožđa (g),
- $w_{s.tv.}$ – udio suhe tvari tropa grožđa (%).

3.3.1.10 Određivanje koncentracije pojedinačnih antocijana u ekstraktima tropa grožđa

Određivanje antocijana UHPLC metodom provedeno je prema Bucić-Kojić i sur. (2020) uz manje izmjene. Obje mobilne faze sastojale su se od mješavine voda : mravlja kiselina : acetonitril, samo u drugim omjerima. U slučaju mobilne faze A omjeri su iznosili 87 : 10 : 3 (v/v/v), a u slučaju mobilne faze B 40 : 10 : 50 (v/v/v). Za razdvajanje spojeva je korištena linearna gradijentna metoda na sljedeći način: od 10 % do 25 % B (10 min), od 25 % do 31 % B (5 min), od 31 do 40 % (5 min), od 40 % do 50 % B (10 min), od 50 % do 100 % B (10 min), i od 100 % do 10 % B (5 min). Volumen injektiranja je bio 20 μL , dok je brzina protoka iznosila 0,8 mL/min. Detekcija je provedena pri 500 nm. Jednako kao i u poglavlju 3.3.9., spojevi su identificirani usporedbom njihovog kromatografskog ponašanja i UV spektra s onima iz autentičnih standarda i literature, a kvantifikacija je provedena korištenjem vanjskog standarda. Masene koncentracije pojedinačnih antocijana u ekstraktima (C' , mg/L) preračunate su na masu suhe tvari tropa grožđa (C , mg/g_{s.tv.}) prema jednadžbi (6).

3.3.1.11 Određivanje koncentracije ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina u ekstraktima tropa grožđa

Ukupni ekstraktibilni proantocijanidini (UPA) su određeni spektrofotometrijskom metodom koja se bazira na reakciji proantocijanidina s otopinom kiselina-butanol (Avallone i sur., 1997). Naime, u kiselom mediju proantocijanidini se depolimeriziraju u butanolu pri čemu nastaju crveno obojeni proantocijanidini koji se mogu detektirati spektrofotometrijski (Schofield i sur., 2001).

POSTUPAK

U 500 μ L pripremljenog uzorka dodano je 5 mL otopine željezo (II)-sulfatheptahidrata koja je pripremljena na način da je 77 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ u 500 mL otopine kloridna kiselina: 1-butanol (2: 3 v/v). Nakon inkubacije u trajanju od 15 minuta pri 95 °C uzorci su naglo ohlađeni i odmah analizirani mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 540 nm. Masena koncentracija ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina (C'_{UPA} , g/L) izračunata je prema jednadžbi (7), koristeći iznose vrijednosti kako slijedi: DF= 11 (izračunato iz omjera ukupnog volumena reakcijske smjese i volumena ekstrakta), $l = 1$ cm, $M = 287$ g/mol i $\varepsilon = 34700$ L/mol cm. Slijepa proba je pripremana na isti način, ali se umjesto uzorka dodavao jednak volumen vode.

$$C'_{\text{UPA}} = \frac{A \cdot M \cdot \text{DF}}{\varepsilon \cdot l} \quad (7)$$

gdje je:

- A – aposrbancija (-),
- DF – faktor razrjeđenja (-),
- l – duljina optičkog puta (cm),
- M – molarna masa cijanidina (g/mol),
- ε – koeficijent molarne ekstinkcije cijanidina (L/mol cm).

Dobiveni rezultat masene koncentracije ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina (C'_{UPA} , g/L) preračunat je na suhu tvar uzorka (C_{UPA} , mg/g_{s.tv.}).

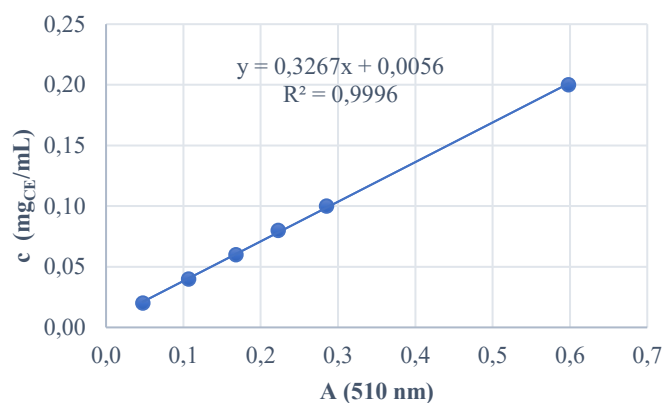
3.3.1.12 Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida u ekstraktima tropa grožđa

Udio ukupnih flavonoida (TFC) u uzorcima je određen spektrofotometrijskom metodom temeljenoj na kemijskoj reakciji stvaranja stabilnih aluminij-flavonoidnih kompleksa s

hidroksilnim skupinama flavona i flavanola pri čemu dolazi do pojave obojenja, čija se apsorbanacija mjeri pri valnoj duljini od 510 nm (Marinova i sur., 2005).

POSTUPAK

U 2 mL destilirane vode dodano je 500 μ L ekstrakta, a potom i 150 μ L 5 % (w/v) natrijevog nitrita. Nakon 5 minuta dodano je 150 μ L 10 %-tne vodene otopine aluminij (III) klorida heksahidrata, dok je po isteku 6 min od dodatka aluminij (III) klorida heksahidrata 1mL natrij hidroksida, a potom je reakcijska smjesa nadopunjena vodom do ukupnog volumena od 10 mL. Svi uzorci su protreseni na vorteks miješalici te je izmjerena apsorbanacija pri valnoj duljini od 510 nm. Koncentracije TFC, izražene u ekvivalentima (+)-katehina (engl. *Catechin Equivalents*, CE) korištenog kao standarda, su izračunate iz dobivenih apsorbanacija preko kalibracijske krivulje (Slika 12). Masena koncentracija flavonoida (C'_{TFC} , mg_{CE}/mL) je preračunata na suhu tvar uzorka (C_{TFC} , mg_{CE}/g_{s.tv.}). Slijepa proba je pripremana na isti način, ali se umjesto uzorka dodavao jednak volumen vode.



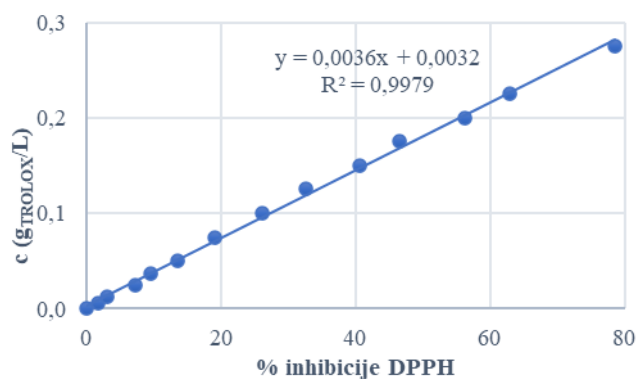
Slika 12 Baždarna krivulja napravljena s katehinom kao standardom za određivanje koncentracije ukupnih flavonoida u ekstraktu tropa grožđa

3.3.1.13 Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

DPPH metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti temelji se na reakciji u kojoj antioksidans donira atom vodika slobodnom DPPH· radikalu. Ova reakcija rezultira nastankom stabilnog neradikalnog oblika DPPH-H, dok se antioksidans pretvara u stabilizirani fenoksi radikal. Pri redukciji DPPH· radikala u određenom vremenu dolazi do smanjenja apsorbanacije (mjerene pri 515 nm) reakcijske otopine zbog smanjenja koncentracije zaostalog slobodnog DPPH· radikala, što se očituje u promjeni ljubičaste boje otopine prema žutoj (Benvenuti i sur., 2004).

POSTUPAK

Najprije je bilo potrebno pripremiti svježu DPPH· otopinu na način da je otopljeno 0,026 mg DPPH· po 1 mL upotrijebljenog 96 %-tnog etanola. Tako pripremljenoj otopini je spektrofotometrijski određena apsorbancija pri 515 nm. U 100 μ L uzorka je dodano 3,9 mL prethodno pripremljene otopine DDPH· u 96 %-tnom etanolu. Potom je provedena inkubacija reakcijske smjese u trajanju od 30 min na tamnom mjestu i sobnoj temperaturi. Po isteku vremena inkubacije, pri valnoj od 515 nm spektrofotometrijski je određena apsorbancija u odnosu na 96 %-tni etanol kao slijepu probu.



Slika 13 Baždarna krivulja napravljena s troloksom kao standardom za određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta tropa grožđa DPPH metodom

Postotak inhibicije DPPH· izračunat je prema jednadžbi (8) te je uvršten u jednadžbu pravca dobivenu iz kalibracijske krivulje (Slika 13) napravljene s Troloksom kao standardom. Radi bolje usporedbe rezultata antioksidacijske aktivnosti uzorka, rezultati su preračunati na masu suhe tvari uzorka.

$$\% \text{ Inhibicije DPPH} = \left(\frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{uz}}}{A_{\text{DPPH}}} \right) \cdot 100 \quad (8)$$

gdje je:

- A_{DPPH} – apsorbancija pripremljene DPPH· otopine spektrofotometrijski očitana pri 515 nm (-),
- A_{uz} – apsorbancija uzorka (-).

3.3.1.14 Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta FRAP metodom

FRAP metoda se temelji na sposobnosti antioksidansa da reducira Fe^{3+} ione u Fe^{2+} ione koji potom u prisutnosti TPZT (2,4,6-tripiridil-s-triazin) reagensa formiraju intenzivno plavo

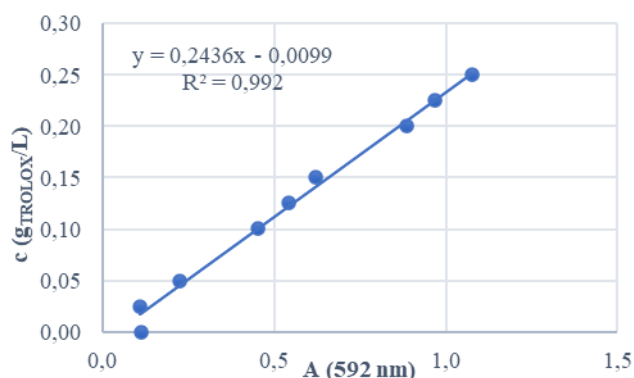
obojenje (Elkina i sur., 2022), a koje pokazuje maksimum apsorpcije pri valnoj duljini od 592 nm (Jolić, 2017).

PRIPREMA REAGENSA

300 mM acetatni pufer (pH 3,6) napravljen je miješanjem 3,1 g natrijevog acetata i 16 mL ledene octene kiseline s destiliranom vodom u odmjerenoj tikvici do ukupnog volumena 1 L. 40 mM klorovodična kiselina je pripravljena pipetiranjem 3,285 mL 37 % (w/v) klorovodične kiseline u 250 mL destilirane vode te nadopunjavanjem do oznake u odmjerenoj tikvici od 1 L. Za pripremu 10 mM TPTZ otopine otopljeno je 159,4 mg TPTZ u 50 mL pripravljene 40 mM klorovodične kiseline. 20 mM željezo (III) klorid heksahidrat je pripremljen otapanjem 551,6 mg željezo (III) klorid heksahidrata u 100 mL destilirane vode. U konačnici FRAP reagens je nastao miješanjem 25 mL 300 mM acetatnog pufera zagrijanog na 37 °C s 2,5 ml 10 mM otopine TPTZ reagensa i 2,7 mL 20 mM otopine željezo (III) klorid heksahidrata.

POSTUPAK

U epruvete je otpipetirano 2,7 mL FRAP reagensa, 270 μ L destilirane vode i 150 μ L uzorka. Sadržaj epruvete je promiješan te su uzorci ostavljeni na inkubaciji pri 37 °C tijekom 40 min. Po isteku vremena inkubacije očitana je apsorbancija pri valnoj duljini od 592 nm. Za pripremu slijepe probe, umjesto 150 μ L uzorka je otpipetirana ista količina destilirane vode. Rezultati su izraženi u ekvivalentima troloksa koji je korišten kao standard (C' , $\text{g}_{\text{TROLOKS}}/\text{L}$) preko kalibracijske krivulje (Slika 14) te su preračunati na suhu tvar uzorka (C , $\text{mg}_{\text{TROLOKS}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$) prema jednadžbi (6).



Slika 14 Baždarna krivulja napravljena s Troloksom kao standardom za određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta tropa grožđa FRAP metodom

3.3.1.15 Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom

ABTS metoda se temelji na sposobnosti antioksidansa da reducira $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikalski kation pri čemu se redukcija manifestira u obliku smanjenja intenzivno zelenog obojenja koje se mjeri

spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 734 nm. Brzina i stupanj obezbojenja (ABTS•+) otopine ovise o koncentraciji i antioksidacijskoj sposobnosti uzorka, a računa se u odnosu na reaktivnost Troloksa kao standard (Re i sur., 1999).

PRIPREMA REAGENSA

7 mM otopina ABTS-a je pripravljena otapanjem 96,02 mg 2,2'-azino-bis(3- etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeve (ABTS) soli u 25 mL destilirane vode. 2,45 mM otopina amonij persulfata je pripravljena otapanjem 4,9 mg amonijeva persulfate u 25 mL vode.

ABTS•+ radikalski kation nastaje oksidacijom ABTS soli pomoću jakih oksidanasa kao što je amonijev persulfat, a to se očituje u promjeni boje iz bezbojne u intenzivno plavo – zelenu boju otopine (Shalaby i Shanab, 2013). Otopine ABTS-a i amonijevog persulfata pomiješane su u jednakim omjerima pri čemu trenutno nastaje ABTS•+ radikal te dolazi do nepotpune oksidacije. Kako bi oksidacija i apsorbancija bile maksimalne i stabilne, otopina ABTS•+ radikalskog kationa se ostavlja u mraku pri sobnoj temperaturi 12 do 16 sati neposredno prije izvođenja analize. Na dan analize otopina se razrjeđuje etanolom (1 mL otopine ABTS•+ radikala i 40 mL etanola) tako da tada apsorbancija te otopine iznosi oko 0,706 pri valnoj duljini od 734 nm.

POSTUPAK

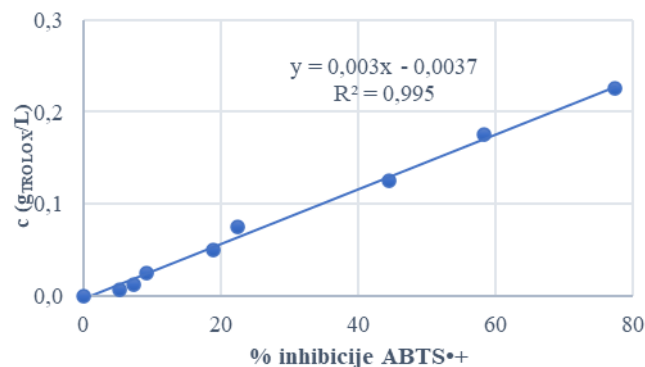
950 µL razrijeđene otopine ABTS•+ radikala dodano je u 50 µL uzorka. Tako pripravljeni uzorci se inkubiraju tijekom 10 min na tamnom mjestu, a potom je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 734 nm. Kod kontrolnog uzorka je umjesto uzorka otpipetirano 50 µL etanola, a upravo se etanol koristio i kao slijepa proba. Za mjerenje % Inhibicije ABTS•+ radikala korištena je jednadža (9).

$$\text{Inhibicija ABTS (\%)} = \left(\frac{A_k - A_{uz}}{A_k} \right) \cdot 100 \quad (9)$$

gdje je:

- A_k – apsorbancija kontrolnog uzorka,
- A_{uz} – apsorbancija uzorka.

Radi bolje usporedivosti rezultata % inhibiranog ABTS•+ radikala preračunat je u ekvivalente troloksa (C' , g_{TROLOKS}/L) preko kalibracijske krivulje (**Slika 15**) i zatim izražen u ekvivalentima troloksa po masi suhe tvari tropa grožđa (C , $mg_{\text{TROLOKS}}/g_{\text{s.tv.}}$) prema jednadžbi (6).



Slika 15 Baždarna krivulja napravljena s Troloksom kao standardom za određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta tropa grožđa ABTS metodom

3.3.1.16 Određivanje koncentracije šećera u ekstraktima tropa grožđa

Za analize šećera u uzorku tropa grožđa najprije je bilo potrebno provesti ekstrakciju. 1 g osušenog i samljevenog uzorka tropa grožđa ekstrahirano je s 25 mL destilirane vode u vodenoj kupelji s tresilicom. Ekstrakcija je provedena pri uvjetima: $T = 30\text{ °C}$, $n = 170\text{ rpm}$, $t = 30\text{ min}$. Po završetku ekstrakcije ekstrakt je centrifugiran 10 min pri 10000 rcf, supernatanti su izdvojeni te su korišteni za analize pojedinačnih i reducirajućih šećera (Bucić-Kojić i sur., 2023).

Određivanje koncentracije pojedinačnih šećera u ekstraktima tropa grožđa

Za određivanje koncentracije pojedinačnih šećera korišten je UHPLC i detektor indeksa loma (engl. *Refractive Index Detector*, RID), osim toga korištene su dvije kolone – Aminex® HPX kolona (HPX 87H, (300 × 7,8) mm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) i Nucleogel® Sugar Pb kolona (VA, (300 × 7,8) mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Dueren, Njemačka). Udio pojedinačnih šećera određen je prema uputama dobivenim uz upotrijebljene kolone. Pomoću Aminex® kolone određen je udio saharoze. Kao mobilna faza korištena je 5 mM sumporna kiselina, uz protok od 0,6 mL/min, pri 40 °C, tijekom 60 min. Udio glukoze, fruktoze i arabinoze određen je pomoću Nucleogel® Sugar Pb kolone. Kao mobilna faza je korištena ultračista voda uz protok od 0,4 mL/min, pri 80 °C, tijekom 20 min. U uzorcima su šećeri identificirani na temelju usporedbe retencijskog vremena i dobivenih spektralnih podataka s korištenim standardima. Softver LabSolutions (verzija 5.87) je korišten za obradu podataka.

Određivanje koncentracije reducirajućih šećera DNS metodom

Upotrebom DNS metode, spektrofotometrijski su određeni reducirajući šećeri. Ova metoda se temelji na reakciji aromatske 3,5-dinitrosalicilne kiseline s karbonilnim krajevima reducirajućih

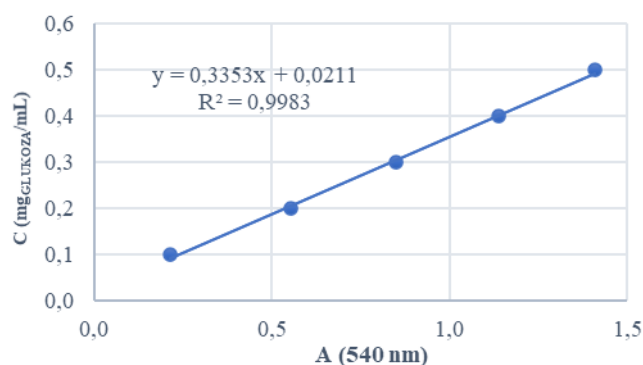
šećera pri čemu nastaje 3-amino-5-nitrosalicilna kiselina tamnonarančaste boje s maksimalnom apsorbancijom pri 540 nm (Miller, 1959).

PRIPREMA REAGENSA

Za provedbu ove analize najprije je bilo potrebno napraviti DNS reagens. U tikvici od 100 mL, 2,18 g DNS-a je uz zagrijavanje i miješanje pri 70 °C otapan u 80 mL natrijevog hidroksida, a nakon otapanja dodano je 30 g natrij kalij taratarata te je nastavljeno s miješanjem sve do potpune disolucije. Tako pripremljena otopina je ohlađena na sobnu temperaturu i nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

POSTUPAK

U epruvete je otpipetirano 500 µL pripremljenog uzorka i 500 µL DNS reagens. Potom je uslijedila inkubacija pri 100 °C u trajanju od 5 min, nakon koje su uzorci ohlađeni na sobnu temperaturu na način da su uronjeni u hladnu vodu tijekom 10 min. Potom je u tako pripremljenim uzorcima izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 540 nm, u odnosu na slijepu probu za čiju je pripremu korištena destilirana voda. Koncentracija reducirajućih šećera (C' , mg_{GLUKOZE}/mL) izračunata je preko kalibracijske krivulje napravljene s glukozom kao standardom (**Slika 16**) uzimajući u obzir razrjeđenja uzoraka te su rezultati preračunati na masu suhe tvari uzorka (C , mg_{GLUKOZE}/g_{s.tv.}).



Slika 16 Baždarna krivulja napravljena s glukozom kao standardom za određivanje koncentracije reducirajućih šećera prema DNS metodi

3.3.1.17 Određivanje koncentracije proteina Bradfordičinom metodom

Koncentracija proteina u uzorku ekstrakta tropa grožđa je određena sukladno Bradfordičinoj metodi (Bradford, 1976), koja se temelji na nespecifičnom vezanju anionskog oblika boje Coomassie Brilliant Blue G-250 za bazične i aromatske bočne ogranke proteina, pri čemu

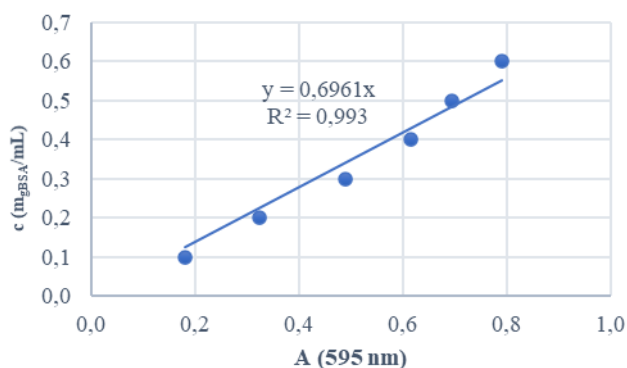
nastaje kompleks protein-boja, koji u kiselom mediju pokazuje apsorpcijski maksimum pri valnoj dulji od 595 nm (Tiwari, 2015).

PRIPREMA REAGENSA

Svježe pripremljenog Bradfordičin reagensa je neposredno prije provedbe analize razrijeđen s destiliranom vodom u omjeru 1 : 4.

POSTUPAK

U kivete je otpipetirano 100 μL uzorka te je potom dodano 2 mL pripremljenog Bradfordičinog reagensa. Usljedila je inkubacija na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 min, a potom je očitana apsorbanca pri valnoj duljini od 595 nm u odnosu na slijepu probu za čiju je pripremu umjesto uzorka korišteno 100 μL destilirane vode. Koncentracija proteina (C , $\text{mg}_{\text{BSA}}/\text{mL}$) određena je u odnosu na kalibracijsku krivulju (Slika 17) koja je pripremljena s nizom otopina poznate koncentracije goveđeg serumskog albumina koji je korišten kao standard.



Slika 17 Baždarna krivulja napravljena s BSA kao standardom za određivanje koncentracije proteina u ekstraktu tropa grožđa

3.3.2. Optimiranje procesa mikroinkapsulacije ekstrakta tropa grožđa uz primjenu proteina kozje sirutke kao omotača

Za planiranje pokusa, optimiranje procesnih parametara, te modeliranje procesa primjenom nelinearne regresijske analize, statističku analizu (ANOVA) značajnosti ispitivanih procesnih parametara, kao i za numeričku optimizaciju procesa sušenja raspršivanjem, korišten je Design-Expert softver, v.13 (Stat-Ease, Minneapolis, USA). Korištenjem metode odzivnih površina (engl. *Response Surface Methodology*, RSM) procijenjen je utjecaj parametara procesa sušenja raspršivanjem na karakteristike MC. Za planiranje eksperimentalnih uvjeta korišten je Box-Behnkenov plan pokusa s tri nezavisne varijable na tri nivoa (Tablica 2).

Tablica 2 Nezavisne varijable (faktori) i područje eksperimentalnog ispitivanja u tri razine za sušenje raspršivanjem pojne otopine

| Nezavisne varijable | Oznaka | Kodirana varijabla | | |
|---|--------|--------------------|-----|-----|
| | | -1 | 0 | +1 |
| Temperatura ulaznog zraka (T_i , °C) | X_1 | 160 | 175 | 190 |
| Udio omotača (R, -) | X_2 | 0,5 | 2 | 3,5 |
| Protok pojne smjese (Q , mL/min) | X_3 | 6 | 8 | 10 |

Temperatura ulaznog zraka za sušenje (X_1), udio omotača u odnosu na suhu tvar ekstrakta (X_2) i brzina pojenja, odnosno protok pojne smjese (X_3) odabrani su kao procesni parametri za koje je procijenjeno da mogu imati utjecaj na svojstva MC (zavisne varijable, odnosno odzive). Kombinacija navedenih nezavisnih varijabli uz tri ponavljanja u centralnoj točki rezultirala je s ukupno 15 eksperimenata mikroinkapsulacije, kako je prikazano u **Tablici 3**.

Tablica 3 Box-Behnken plan pokusa sušenja raspršivanjem pojne smjese

| Pokus | Faktor 1 | Faktor 2 | Faktor 3 |
|-------|----------|----------|----------|
| | A: T_i | B: R | C: Q |
| | (°C) | (-) | (mL/min) |
| 1 | 190 | 3,5 | 8 |
| 2 | 190 | 2 | 6 |
| 3 | 175 | 2 | 8 |
| 4 | 160 | 2 | 6 |
| 5 | 190 | 0,5 | 8 |
| 6 | 160 | 2 | 10 |
| 7 | 175 | 0,5 | 10 |
| 8 | 175 | 0,5 | 6 |
| 9 | 175 | 3,5 | 6 |
| 10 | 175 | 3,5 | 10 |
| 11 | 160 | 3,5 | 8 |
| 12 | 175 | 2 | 8 |
| 13 | 190 | 2 | 10 |
| 14 | 175 | 2 | 8 |
| 15 | 160 | 0,5 | 8 |

Nakon provedenih eksperimenata mikroinkapsulacije, analizirana su odabrana odzivna svojstva dobivenih mikrokapsula (zavisne varijable, Y), a za aproksimaciju eksperimentalnih podataka korišten je kvadratni polinom **(10)**:

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{j=1}^{k-1} \sum_{i=1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (10)$$

gdje je:

- Y – modelom predviđena odzivna funkcija,
- β_0 – konstanta jednadžbe odzivnog polinoma,
- β_j – koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma,
- β_{jj} – koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma,
- β_{ij} – koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma,
- X_{ij} – ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti),
- k – broj varijabli.

Na temelju dobivenog matematičkog modela konstruirane su odzivne površine za sva ispitivana svojstva dobivenih MC. Navedene 3D odzivne površine pružaju vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara na promatrane modele. Provjera uspješnosti optimiranja procesa homogenizacije i sušenja raspršivanjem pojne otopine provedena je usporedbom rezultata dobivenih metodom odzivnih površina i eksperimentalno dobivenih rezultata pri utvrđenim optimalnim uvjetima procesa.

PRIPREMA INKAPSULACIJSKE SMJESE

Za pripremu pojne smjese najprije je napravljena ekstrakcija kako je opisano u **poglavljju 3.3.1.7**. Dobiveni ekstrakt je potom uparen do polovice ukupnog volumena, a samo uparavanje je provedeno na rotavaporu pod vakuumom ($p_v = 48$ mbar) i pri temperaturi od 50 °C. Ovaj korak je proveden s ciljem smanjenja udjela etanola u ekstraktu radi ograničenja rada uređaja za sušenje raspršivanjem s obzirom na udio organskih otapala u pojnoj smjesi. Volumen uklonjenog ekstrakta zamijenjen je jednakim volumenom redestilirane vode te je na taj način dobiven ekstrakt (GPE) koji je pomiješan je s određenom količinom inkapsulacijskog omotača, odnosno proteina kozje sirutke (GW) prema **Tablici 3**, kako bi nastala inkapsulacijska, odnosno pojna smjesa.

HOMOGENIZACIJA POJNE SMJESE

Pripremljena pojna smjesa je homogenizirana na magnetnoj mješalici pri 50 °C i 600 rpm tijekom 10 min, a sve to neposredno prije procesa sušenja raspršivanjem.

3.3.3. Mikroinkapsulacija ekstrakta grožđa uz primjenu proteinskog omotača i ugljikohidratnog ko-omotača

U cilju određivanja utjecaja dodatka ko-omotača na svojstva mikro kapsula, provedeni su pokusi inkapsulacije ekstrakta tropa grožđa pri određenim optimalnim uvjetima sušenja raspršivanjem pri čemu je određeni udio primarnog proteinskog omotača (GW) zamijenjen s ko-omotačem ugljikohidratnog tipa i to u rasponu od 5 % do 30 %, u ovisnosti o ko-omotaču. Kao ko-omotači korišteni su: trehaloza (T) s udjelom 5 – 30 %, saharoza (S) s udjelom 5 – 30 %, maltodekstrin DE 4 – 7 (MD) s udjelom 2,5 – 15 % te ksiloza (X) s udjelom 5 – 30 %.

3.3.4. Određivanje svojstava mikro kapsula

3.3.4.1 Određivanje koncentracije ukupnih fenolnih tvari u uzorcima mikro kapsula

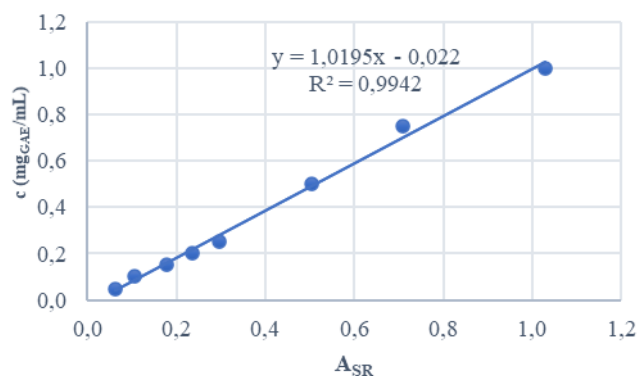
PRIPREMA UZORKA PRAHA

Uzorak je pripremljen prema uputama Tolun i sur. (2016), na način da je u 15 mg MC dodano 3 mL otopine etanol : ledena octena kiselina : voda (50 : 8 : 42, v/v/v). Tako pripremljen uzorak se promiješao na vortex miješalici te potom profiltrirao kroz 0,45 µm PTFE filter.

IZRADA KALIBRACIJSKIH KRIVULJA

Galna kiselina je korištena kao standard za izradu kalibracijske krivulje. Izrađena je kalibracijska krivulje u rasponu koncentracija 0,025 – 1 mg/mL za galnu kiselinu otoplenu u mješavini etanol : ledena octena kiselina : voda (50 : 8 : 42, v/v/v). Nakon reakcije uzoraka galne kiseline s Folin-Ciocalteu reagensom, na spektrofotometru pri valnoj duljini od 765 nm su izmjerene apsorbancije pripadajućih koncentracija prema kojima su izrađene kalibracijske krivulje (**Slika 18**).

Postupak određivanja ukupnih fenolnih tvari (TPC) proveden je prema Folin-Ciocalteu metodi opisanoj u poglavlju **3.3.1.8**.

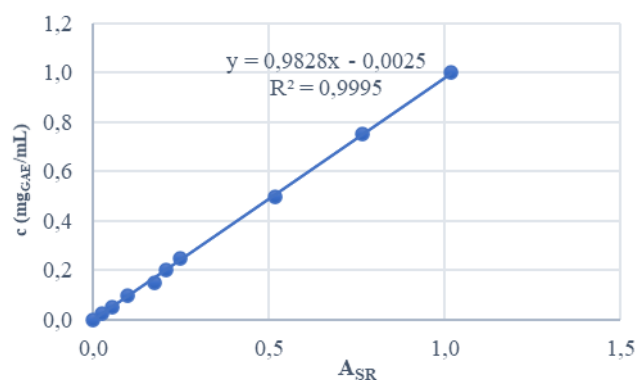


Slika 18 Baždarna krivulja napravljena s galnom kiselinom kao standardom za određivanje koncentracije ukupnih fenolnih spojeva u MC nastalim sušenjem raspršivanjem

3.3.4.2 Određivanje koncentracije površinskih fenolnih spojeva u uzorcima mikrokapsula

Za određivanje površinskih fenolnih tvari (engl. *Surface Phenolic Content*, SPC) u uzorcima MC korištena je ista Folin-Ciocalteu kolorimetrijska metoda kao i pri određivanju ukupnih fenolnih tvari (opisano u poglavlju 3.3.1.8.). Uzorak MC je pripremljen prema Tolun i sur. (2016), na način da je u 24 mg MC dodano 3 mL otopine etanol : metanol (1 : 1, v/v), te je nakon 5 min uzorak profiltriran na 0,45 μ m PTFE filter.

Za izradu kalibracijske krivulje je korištena galna kiselina otopljena u mješavini etanola i metanola (1 : 1, v/v) pripremljena u rasponu koncentracija 0,025 – 1 mg/mL. Nakon reakcije s Folin-Ciocalteu reagensom, pri valnoj dulji 765 nm na spektrofotometru izmjerene su apsorbancije pripremljenih koncentracija galne kiseline te je izrađena kalibracijska krivulja (Slika 19).



Slika 19 Baždarna krivulja napravljena s galnom kiselinom kao standardom za određivanje koncentracije površinskih fenolnih spojeva u MC nastalim sušenjem raspršivanjem

3.3.4.3 Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida i ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina u uzorcima mikrokapsula

Uzorci MC su pripremljeni na način opisan u poglavlju 3.3.4.1., a potom su analize TFC i UPA odrađene kao što je opisano u poglavljima 3.3.1.11. i 3.3.1.12.. Umjesto napisane količine ekstrakta tropa grožđa, dodavana je jednaka količina pripremljenih uzoraka MC.

3.3.4.4 Određivanje antioksidacijske aktivnosti u uzorcima mikroapsula

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzorci MC su pripremljeni prema Tolun i sur. (2016) uz manje modifikacije. 15 mg MC je izvagano i otopljeno u 3 mL mješavine etanol : octena kiselina: voda (50 : 8 : 42 v/v/v). Smjesa je miješana 1 min na miješalici te je potom ostavljena u vodenoj kupelji 20 min pri 40 °C. Po isteku 20 min smjesa je profiltrirana preko naboranog filter papira, a dobiveni filtrat je korišten kao uzorak za određivanje antioksidacijske aktivnosti.

Protokol određivanja antioksidacijske aktivnosti je opisan u poglavljima 3.3.1.13., 3.3.1.14. i 3.3.1.15.

3.3.4.5 Određivanje efikasnosti inkapsulacije

Efikasnost inkapsulacije (engl. *Encapsulation Efficiency*, EE) izračunata je prema Vu i sur. (2020) uz korištenje jednadžbe (11).

$$EE (\%) = \frac{(C_{TPC} - C_{SPC})}{C_{TPC}} \cdot 100 \quad (11)$$

gdje je:

- C_{TPC} – maseni udio ukupnih fenolnih tvari u MC ($\text{mg}_{GAE}/\text{g}_{s.tv.}$),
- C_{SPC} – maseni udio površinskih fenolnih tvari u MC ($\text{mg}_{GAE}/\text{g}_{s.tv.}$).

3.3.4.6 Određivanje topivosti mikrokapsula

Za određivanje topivosti MC korištene su Petrijeve zdjelice, koje su prethodno pripremljene na način da su oprane, a potom osušene u sušioniku na 105 °C tijekom 1h te su nakon hlađenja izvagane zajedno s poklopcem. Jednako tako izvagane su i prazne Falcon epruvete bez čepova. U svaku Falcon epruvetu odvagano je 0,1 g MC te dodano 10 mL redestilirane vode. Sadržaj epruvete je promiješan na vorteks miješalici potom je epruveta inkubirana u vodenoj kupelji pri 60 °C, 30 min. Po isteku 30 min uslijedilo je hlađenje Falcon epruveta s uzorcima te centrifugiranje 10 min pri 11 000 rcf. Supernatant je dekantiran u Petrijevu zdjelicu u kojoj se

sušio 3 h na 105 °C u sušioniku. Nakon završetka sušenja, Petrijeve zdjelice s uzorcima su stavljene u eksikator na hlađenje u trajanju od 1 h. Nakon 1 h hlađenja Petrijeva zdjelica je izvagana radi određivanja mase otopljenih MC. Osim toga izvagana je i Falcon epruveta s talogom radi određivanja mase zaostalog (nabubrenog) taloga (Lee i sur., 2012). Potom su iz očitanih masa izračunati: indeks topivosti (engl. *Water Solubility Index*, WSI) prema jednadžbi (12), indeks adsorpcije vode (engl. *Water Adsorption Index*, WAI) prema jednadžbi (13) i sposobnost bubrenja (engl. *Swelling Power*, SP) prema jednadžbi (14).

$$\text{WSI (\%)} = \frac{\text{masa supernatanta nakon sušenja}}{\text{masa suhe tvari MC}} \cdot 100 \quad (12)$$

$$\text{WAI (-)} = \frac{\text{masa taloga zaostalog nakon centrifugiranja}}{\text{masa suhe tvari uzorka}} \quad (13)$$

$$\text{SP (-)} = \frac{\text{masa taloga zaostalog nakon centrifugiranja}}{\text{masa suhe tvari uzorka} \cdot \left(1 - \frac{\text{WSI \%}}{100}\right)} \quad (14)$$

3.3.4.7 Određivanje prinosa inkapsulacije

Prinos inkapsulacije (Y) je izračunat prema Vu i sur. (2020), uz korištenje jednadžbe (15).

$$Y (\%) = \frac{\text{masa suhe tvari MC}}{\text{teorijski izračunata masa suhe tvari u pojnoj smjesi}} \cdot 100 \quad (15)$$

3.3.4.8 Određivanje udjela suhe tvari/vlage

Udio suhe tvari i vlage je određen u svim uzorcima MC te u omotaču, termogravimetrijskom metodom na uređaju za radijacijsko infracrveno sušenje prema radu Kelly i sur. (2016). Na aluminijsku pliticu je odvagano 0,15 g uzorka te je sušenje provedeno standardnom metodom pri 105 °C uz korištenje kriterija završetka procesa 5 (engl. *switch-off criteria*) odnosno sve dok gubitak mase nije bio manji od 1 mg tijekom 140 sekundi. Za izračun udjela vlage i suhe tvari korištene su jednadžbe (16) i (17).

$$\text{Udio vlage (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \cdot 100 \quad (16)$$

$$\text{Udio suhe tvari (\%)} = \frac{m_2}{m_1} \cdot 100 \quad (17)$$

gdje je:

- m_1 – masa uzorka prije sušenja,
- m_2 – masa uzorka nakon sušenja.

3.3.4.9 Određivanje boje mikrokapsula

Parametri boje MC i omotača su mjereni u CIEL*a*b* sustavu pomoću kromametra. U CIEL*a*b* sustavu svaka boja je definirana točno određenim mjestom u trodimenzionalnom prostoru kojeg predstavljaju tri međusobno okomite osi L^* , a^* i b^* , pri čemu je:

- L^* koordinata svjetline s podjelom od 0 (crna) do 100 (bijela),
- a^* koordinata obojenja s pozitivnim i negativnim smjerom, odnosno vektorom crvene boje ($+a^*$) i vektorom za komplementarnu zelenu boju ($-a^*$),
- b^* koordinata obojenja s pozitivnim i negativnim smjerom, pri čemu je pozitivni smjer vektor žute boje ($+b^*$), a negativni smjer vektor komplementarne plave boje ($-b^*$) (Lukinac Čačić, 2012).

Za određivanje parametara boje korištena je staklena Petrijeva zdjelica promjera 40 mm, koja je ravnomjerno napunjena MC do vrha. Mjerenje je rađeno u tri paralele. Prema izmjerenim vrijednostima parametara boje MC (L^* , a^* i b^*) i boje omotača (L_0^* , a_0^* , b_0^*) računa se ukupna promjena boje prema jednadžbi (18).

$$\Delta E_{ab} = \sqrt{(L_0^* - L^*)^2 + (a_0^* - a^*)^2 + (b_0^* - b^*)^2} \quad (18)$$

Usporedba instrumentalnog mjerenja razlike boje u odnosu na percepciju prosječnog ljudskog oka prema **Tablici 4**.

Tablica 4 Usporedba instrumentalnog mjerenja boje i ljudskog oka

| ΔE_{ab} | Ljudsko oko |
|-----------------|---------------------|
| < 0,20 | nije uočljivo |
| 0,20 - 1,00 | vrlo slabo uočljivo |
| 1,00 - 3,00 | slabo uočljivo |
| 3,00 - 6,00 | uočljivo |
| > 6,00 | vrlo uočljivo |

Osim ukupne promjene boje, izračunata je i vrijednost tona boje (engl. *hue angle*, h^*) prema jednadžbi (19). Vrijednost h^* izražava se u °, pri čemu vrijedi: $0^\circ = +a^*$ (crvena boja), $90^\circ = +b^*$ (žuta boja), $180^\circ = -a^*$ (zelena boja) te $270^\circ = -b^*$ (plava boja) (Ćelić, 2022).

$$h^*(^\circ) = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (19)$$

Zasićenost boje izražava intenzitet boje (engl. *chroma*, C^*), odnosno koliko daleko ona odstupa od sive (Caliskan i Dirim, 2016). Izračunata je prema jednadžbi (20).

$$C^*(-) = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (20)$$

3.3.4.10 Gustoća mikrokapusla prije potresanja i nakon potresanja

Gustoće MC prije i nakon potresanja (engl. *Bulk Density*, BD) određene su prema Boyano-Orozco i sur. (2020) uz manje modifikacije. Izvagan je 1 g MC te prenesen u menzuru od 25 mL. Očitana je volumen kojeg su MC zauzele. Gustoća MC prije potresanja izračunata je prema jednadžbi (21).

$$BD \text{ (g/cm}^3\text{)} = \frac{m_{uz} \text{ (g)}}{V_{uz} \text{ (mL)}} \quad (21)$$

gdje je:

- m_{uz} – masa MC (g),
- V_{uz} – volumen kojeg su zauzele MC u menzuri (mL).

Za određivanje gustoće MC nakon potresanja (engl. *Tapped Density*, TD) menzura s MC je postavljena na postolje uređaja za mjerenje nasipne gustoće te je uređaj namješten na 1250 lupkanja, nakon čega se očitava volumen kojeg MC zauzimaju u menzuri te prema jednadžbi (22) izračunata gustoća MC nakon potresanja:

$$TD \text{ (g/cm}^3\text{)} = \frac{m_{uz} \text{ (g)}}{V_{uz,1250} \text{ (mL)}} \quad (22)$$

gdje je:

- m_{uz} – masa MC (g),
- $V_{uz,1250}$ – volumen kojeg su zauzele MC u menzuri nakon 1250 lupkanja (mL).

3.3.4.11 Određivanje svojstava kompresibilnosti i tecivosti mikrokapusla

Prema Kalušević i sur. (2017), uz primjenu jednadžbi (23) i (24) izračunata su svojstva kompresibilnosti: Hausner omjer (HR) i Carr indeks (CI) te je prema **Tablici 5** određen karakter tecivosti MC. HR predstavlja odnos između gustoće MC prije i nakon potresanja, odnosno mjera je sposobnosti praškastih materijala da se stisnu ili da se komprimiraju pod određenim uvjetima. CI je sličan HR, a služi za procjenu kompaktnosti i sposobnosti materijala da zadrži oblik kada se stisne (European pharmacopoeia, 2010).

$$HR (-) = \frac{TD}{BD} \quad (23)$$

$$CI (\%) = \frac{TD - BD}{TD} \cdot 100 \quad (24)$$

Tablica 5 Karakter tecivosti MC prema Europskoj Pharmacopoeia-i (European pharmacopoeia, 2010)

| Carr indeks (%) | Karakter tecivosti | Hausner omjer (-) |
|-----------------|--------------------|-------------------|
| ≤ 10,00 | Izvrstan | 1,00 – 1,11 |
| 11,00 – 15,00 | Dobar | 1,12 – 1,18 |
| 16,00 – 20,00 | Osrednji | 1,19 – 1,25 |
| 21,00 – 25,00 | Prolazan | 1,26 – 1,34 |
| 26,00 – 31,00 | Loš | 1,35 – 1,45 |
| 32,00 – 37,00 | Vrlo loš | 1,46 – 1,59 |
| > 38,00 | Vrlo, vrlo loš | > 1,60 |

3.3.4.12 Analiza rendgenske difrakcije mikrokapsula

Za ispitivanje kristalne strukture uzoraka MC i omotača korištena je rendgenska difrakcija praha (engl. *X-Ray Powder Diffraction*, XRPD), odnosno XRPD sustav. Uzorci su bili izloženi Cu K α zračenju ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) i skenirani su VANTEC-1 detektorom na 40 kV i 40 mA u intervalima od 3 – 40 2 θ . DIFFRAC plus EVA softver (Karlsruhe, Njemačka) korišten je za zaglađivanje, K2-skidanje i uklanjanje pozadine kao dio procesa evaluacije rezultata.

3.3.4.13 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrijska analiza

Osnovno načelo diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (engl. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC) je da se keramički senzori visoke osjetljivosti koriste za otkrivanje razlike u protoku topline između aluminijske posude s uzorkom i referentne (prazne) aluminijske posude. Korištenjem DSC sustava ispitano je toplinsko ponašanje uzoraka MC i omotača. Masa od 3 – 5 mg MC je izvagano u DSC posude za uzorke, koje su potom hermetički zatvorene s poklopcem. Prazna posuda je korištena kao referenca u inertnoj atmosferi pod stalnim pročišćavanjem argonom protoka 150 mL/min. Uzorci su ispitivani u temperaturnom intervalu 25 – 300 °C pri brzini zagrijavanja od 10 °C/min.

3.3.4.14 Mjerenje veličine čestica optičkim mikroskopom

Mikroskopska mjerenja veličine čestica provode se kako bi se odredila veličina ako je dostupna mala količina uzorka, kada su čestice manje od 75 μm i u slučaju finog praha. Za statistički

odgovarajuću veličinu uzorka, broj čestica koje se morfološki analiziraju kreće se od 300 do 1000 po jednom uzorku, stoga su korišteni cijeli sustavi za analizu slike (mikroskop, kamera i softver). Evaluacija rezultata uključuje analizu podataka koja sadrži statističke izračune i analizu slike. Čestice su opisane svojom duljinom, širinom, perimetrom, konveksnim perimetrom i okruglošću. Za provedbu ove analize korišten je optički LEICA mikroskop. Mala količina uzorka MC je pomoću kista nanijeta u tankom i prozirnem sloju na pokrovnici koja je potom stavljena na stolić mikroskopa. Upotrebom kamere i softvera QWin evaluirani su dobiveni podatci o veličini čestica.

3.3.4.15 Analiza morfologije mikrokapsula pretražnim elektronskim mikroskopom

Kako bi se ispitala morfologija MC upotrijebljen je pretražni elektronski mikroskop (engl. *Scanning Electron Microscope*, SEM) tipa Hitachi S4700. Upotrebom uređaja za nanošenje zlato paladij filma, MC su obložene tankim slojem filma, a potom analizirane na 10 kV pomoću SEM-a.

3.3.4.16 Određivanje kuta kvašenja

Kako bi se odredio kontaktni kut, odnosno kuta kvašenja (kvašljivosti), najprije je bilo potrebno teletirati svaki uzorak. Za tu svrhu izvagan je 0,1 g uzorka MC te prenesen u kalup koji je potom podvrgnut prešanju hidrauličkom prešom Specac promjera prešanja 13 mm i sile prešanja od 1 t u trajanju od 60 sekundi. Optički sustav OCA 20 i metoda sesilne kapi su korišteni za mjerenje kuta kvašljivosti između uzorka MC i vode, odnosno uzorka i dijodometana. Za obradu podataka korišten je softver SCA20 pomoću kojeg je izračunata i polarnost uzoraka.

3.3.4.17 Analiza raspodjele veličine čestica difrakcijom laserskog svjetla

Tehnika difrakcije laserskog svjetla jedna je od najčešće korištenih industrijskih metoda za određivanje veličina čestica sipkog materijala. Za provedbu ove analize bilo je potrebno odvagati malu količinu uzorka MC (0,5 – 5 g) i postaviti ga na za to predviđeno mjesto u uređaju Malvern Mastersizer Scirocco 2000. Voda je korištena kao disperzijsko sredstvo, a indeks loma je postavljen na 1,62, a potom su čestice uzorka izlagane snopu monokromatske svjetlosti. Svjetlo raspršeno česticama pod različitim kutovima mjeri se detektorom s više elemenata. Kut loma difuzne svjetlosti ovisi o veličini čestice (mala čestica lomi svjetlost pod većim kutom,

dok velika čestica lomi svjetlost pod manjim kutom). Broj detektora i njihovi položaji u uređaju su optimizirani, kako bi se postigla maksimalna rezolucija. Dobivene vrijednosti uzorka raspršenja se zatim transformiraju, korištenjem optičkog modela i matematičkog postupka kako bi se dobio udio ukupnog volumena u diskretnom broju klasa veličine, tvoreći volumetrijsku distribuciju veličine čestica. Uređaj prikazuje podatke mjerenja u tabelarnom obliku i grafički kao službeno izvješće. Ova izvješća uključuju mjerne parametre uzorka kao što su:

- $d(0,1)$ – promjer koji odgovara promjeru malih čestica, odnosno promjer koji je veći ili jednak promjeru 10 % čestica uzorka,
- $d(0,5)$ – promjer koji odgovara medijanu, odnosno promjer koji je veći ili jednak promjeru 50 % čestica uzorka,
- $d(0,9)$ – promjer koji odgovara promjeru velikih čestica, odnosno promjer koji je veći ili jednak promjeru 90 % čestica uzorka.

Na temelju navedenih mjernih parametara računa se vrijednost širine raspodjele (engl. *span*) uz korištenje jednadžbe (25).

$$\text{Širina raspodjele} = \frac{d(0,9) - d(0,1)}{d(0,5)} \quad (25)$$

3.3.5. Test ubrzanog starenja mikrokapsula

Test ubrzanog starenja, odnosno ubrzano ispitivanje stabilnosti MC tijekom skladištenja, provedena su u komori Binder KBF 240. Ova komora omogućuje stvaranje različitih abijentalnih uvjeta, koji uključuju temperaturni raspod od 10 °C do 70 °C i relativne vlažnosti (RH) u rasponu od 10 % do 80 %, a temperaturna točnost i ponovljivost rezultata zajamčeni su elektronički kontroliranom APT.line TM *in-line* komorom za predgrijavanje te sustavom hlađenja. Ispitivanje stabilnosti mikrokapsula provedeno je na 40 ± 2 °C i 75 ± 2 % RH u skladu s Cassol i Noreña (2021). Staklene bočice korištene su za čuvanje uzoraka MC u periodu od tri mjeseca. Uzorkovanje je obavljeno nakon 0 dana, 2 tjedna, 1 i 3 mjeseca. Periodički je napravljena XRPD analiza mikrokapsula te je kod uzoraka u kojima je XRPD analizom dokazna promjena strukture (iz amorfne u kristalnu/semi-kristalnu) napravljena i analiza morfologije MC pretražnim elektronskim mikroskopom.

3.3.6. Simulirana probava mikrokapsula

3.3.6.1 *In vitro* simulirana probava bez enzima

In vitro otpuštanje fenolnih spojeva iz MC nastalih sušenjem raspršivanjem je provedeno prema INFOGEST protokolu (Brodkorb i sur., 2019) uključujući simuliranu oralnu, gastričnu i intestinalnu fazu uz manje modifikacije. Prema Minekus i sur. (2014), napravljene su otopine elektrolita koje oponašaju probavne tekućine u pojedinoj fazi probave. Tijekom ovog eksperimenta *in vitro* otpuštanja fenolnih spojeva nisu korišteni enzimi. Sve započinje sa oralnom fazom za koju je najprije izvagano 0,1 g MC u koje je dodano 4 mL simulirane tekućine sline (SSF) i 25 μL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$, pH vrijednost je podešena na 7 te je dodana voda do ukupnog volumena od 10 mL. Nakon 3 min miješanja na magnetnoj miješalici pri 37 °C i 200 rpm, izuzeto je 2 mL uzorka je istovremeno vraćeno 2 mL SSF otopine. Nakon 3 min završava oralna faza te se uzorku dodaje 8 mL simulirane želučane tekućine (SGF), 5 μL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$, uz korištenje 1 M HCl pH vrijednost se podešava na 3 te se dodaje voda do konačnog volumena od 20 mL. Ova faza traje 120 min, a 2 mL uzorka su izuzimana nakon 3, 5, 10, 20, 45, 60 i 120 min te je svaki puta nakon izuzimanja uzorak vraćeno po 2 mL SGF-a. Nakon isteka 120 min započinje intestinalna faza s dodatkom 16 mL simulirane crijevne tekućine (SIF) i 40 μL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$. pH vrijednost je podešena na 7 te je dodana redestilirana voda do ukupnog volumena 40 mL. Ova faza također traje 120 min. Uzorkovanje je provedeno na isti način te u istim vremenskim intervalima kao i u gastričnoj fazi, samo je umjesto SGF-a, izuzeti volumen prilikom uzorkovanja nadomješten jednakim volumenom SIF-a. Po završetku svih faza, u izuzetim uzorcima je određen udio fenolnih spojeva prema Folin-Ciocalteu metodi.

3.3.6.2 *In vitro* simulirana probava s enzimima

In vitro simulirana probava s enzimima je također provedena prema INFOGEST protokolu (Brodkorb i sur., 2019) uz manje modifikacije. Naime za provođenje *in vitro* simulirane probave korištene su Falcon epruvete postavljene na višenamjenski rotator koji je smješten unutar termostata na temperaturi od 37 °C. Svaka Falcon epruveta predstavlja određeni vremenski interval (3, 63, 123, 183, 243 min), odnosno određenu fazu probave. Najprije se u svaku Falcon epruvetu izvaže 0,1 g uzorka MC te se u sve falkon epruvete doda 4 mL SSF tekućine i 25 μL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$, pH vrijednost se podesi na 7 te se doda voda do ukupnog volumena 10 mL. Po isteku probave uklanja se prva epruveta koja predstavlja oralnu fazu, a u sve ostale Falcon epruvete se dodaju kemikalije za nastavak probave, tj. za gastričnu fazu (8 mL SGF tekućine, 5 μL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$), pH vrijednost se podesi na 3 te se potom doda 500 μL pepsina koji je

otopljen u redestiliranoj vodi i zatim dodan tako da njegova aktivnost u konačnoj otopini bude 2000 U/mL. Na kraju se doda voda do ukupnog volumena 20 mL, Falcon epruvete se vraćaju na rotator i kreće gastrična faza probave. Po isteku 60 i 120 min od početka gastrične faze vadi se po jedna Falcon epruveta koja predstavlja taj vremenski interval. Kako bi započela intestinalna faza u preostale epruvete se dodaje 8,5 mL SIF otopine i 40 μL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$, pH se podesi na 7, a potom se doda 5 mL pripremljenog pankreatina (otopljen u SIF tekućini tako da je njegova aktivnost u konačnom volumenu bila 100 U tripsina/mL) i 2,5 mL žučnih soli (otopljen u SIF tekućini tako da je koncentracija žučnih soli u konačnoj otopini iznosila 1 mM). Po isteku 60 i 120 min od početka intestinalne faze iz rotatora se uklanja po jedna Falcon epruveta koja predstavlja taj vremenski interval. Neposredno nakon uklanjanja Falcon epruvete sa rotatora u određenom vremenskom intervalu, uzorci su centrifugirani 30 min pri 16 000 rcf i 4 °C. Izdvoji se supernatant koji se potom filtrira preko filtera od 0,45 mm (Syringe filters Spheros Nylon, Agilent Technologies, USA). Budući da u filtratima zaostane određena količina žučnih soli, enzima te soli iz probavnih tekućina, filtrate je potrebno dodatno pročistiti ekstrakcijom čvrste faze (SPE) prema metodi Kamiloglu i sur. (2017) uz modifikacije. Kako bi uklonili zaostale enzime, u izdvojenih 4 mL filtrata se dodaje 80 μL ledene octene kiseline, Zakiseljenje filtrate se potom podvrgne centrifugiranju 10 minuta prije 16 000 rcf. Po završetku centrifugiranja izdvaja se bistra faza koja se potom pročišćava preko SPE kolonice za pročišćavanje (Superclean LC-18, 100 mg/ mL, Sigma Aldrich/Supelco) koje su prije propuštanja uzorka kondicionirane sa 6 mL metanola zakiseljenog ledenom octenom kiselinom (1 : 0,01 v/v) i 4 mL destilirane vode koja je također zakiseljena ledenom octenom kiselinom (1 : 0,01 v/v). Na pripremljenu kolonicu se pušta 3 mL uzorka koji se potom ispiru s 15 mL redestilirane vode te eluiraju s kolonice propuštanjem 3 mL metanola kroz kolonicu.

3.3.6.3 Indeks biodostupnosti

Prema Santana Andrade i sur. (2022), indeks biodostupnosti (BI) je izračunat iz prema jednadžbi (26), iz omjera udjela fenolnih spojeva u uzorku nakon (C_A) i prije probave (C_B) te je pomnožen sa 100 i izražen u %.

$$\text{BI (\%)} = \frac{C_A}{C_B} \times 100 \quad (26)$$

3.3.6.4 UHPLC analiza pojedinačnih polifenola i antocijana u uzorcima probave mikrokapsula

Uzorci MC za analize udjela pojedinačnih fenolnih spojeva i antocijana su pripremljeni prema radu Tolun i sur. (2016) uz male modifikacije. Najprije je 100 mg uzorka MC izvagano u epruvetu te potom otopljeno u 1,5 mL otapala (voda : metanol : HCl, 89 : 10 : 1 v/v/v). Nakon toga provedeno je centrifugiranje 3 min pri 14 000 rcf. Supernatant je odvojen i profiltriran kroz PTFE filter od 0,45 µm neposredno prije analize. Korištene su jednake metode i uvjeti analiza opisani u poglavljima 3.3.1.9. i 3.3.1.10.

3.3.6.5 Određivanje koncentracije fenolnih tvari i antioksidacijske aktivnosti u uzorcima probave mikrokapsula

U pročišćenim uzorcima različitih faza probave određeni je udio TPC prema protokolu opisanom u poglavlju 3.3.1.8., udio TFC prema protokolu opisanom u poglavlju 3.3.1.12., udio UPA prema protokolu opisanom u poglavlju 3.3.1.11. te antioksidacijske aktivnosti kao što je opisano u poglavljima 3.3.1.13. – 3.3.1.15., pri čemu je umjesto volumena ekstrakta tropa grožđa, dodavana jednaka količina uzoraka iz različitih faza probave.

3.3.7. Statistička analiza

Za obradu podataka optimizacije procesa sušenja raspršivanjem, primjenjen je softver Design Expert v.13 (Stat Ease, Minneapolis, USA) u sklopu kojega je provedena procjena koeficijenata modela nelinearnom regresijskom analizom, statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametara na promatrane parametre kao i numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametara.

Za obradu ostalih eksperimentalnih podataka korišten je softver TIBCO Statistica (TIBCO Software Inc., Palo Alto, Kalifornija). Jednosmjerna analiza varijance, ANOVA je korištena za određivanje značajnosti razlike između aritmetičkih sredina uzoraka koji predstavljaju populacije. Slijedeći statističku značajnost razlika između aritmetičkih sredina promatranih populacija kako je naznačeno ANOVA-om, provedena je post-hoc analiza pomoću Duncanova testa višestrukih raspona kako bi se identificirale populacije između kojih postoji značajna razlika ($p < 0,05$). Isto malo abecedno slovo koristi se na slikama i tablicama za identifikaciju uzoraka koji pripadaju istoj populaciji. Uzorci označeni različitim malim abecednim slovima reprezentativni su za različite populacije, što znači da postoji statistički značajna razlika između njih.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Kemijski sastav tropa grožđa

Kao što je spomenuto u teorijskom poglavlju 2.1., sastav tropa grožđa varira ovisno o sorti, klimatskim uvjetima, kultivaru, uvjetima uzgoja grožđa (Sousa i sur., 2014) te procesu obrade grožđa (Rondeau i sur., 2013). Sjemenke grožđa se u prosjeku sastoje od 40 % vlakana, 16 % ulja, 11 % proteina te 7 % složenih spojeva poput polifenola, tanina, šećera i minerala. Kožica grožđa predstavlja izvor antocijana, a peteljke grožđa izvor tanina (de Campos i sur., 2008) i prehrambenih vlakana (Teixeira i sur., 2014). U **Tablici 6** je prikazan kemijski sastav sorte cabernet sauvignon koja je korištena u ovom doktorskom radu.

Tablica 6 Rezultati analiza kemijskog sastava uzorka tropa grožđa

| | Analit | Koncentracija analita |
|--------|--|------------------------------|
| | TPC (mg _{GAE} /g _{s.tv.}) | 73,58 ± 6,95 |
| | TFC (mg _{CE} /g _{s.tv.}) | 26,12 ± 0,42 |
| | UPA (mg/g _{s.tv.}) | 11,42 ± 0,03 |
| | ABTS (mg _{TROLOKS} /g _{s.tv.}) | 431,89 ± 22,44 |
| | DPPH (mg _{TROLOKS} /g _{s.tv.}) | 62,40 ± 1,53 |
| | FRAP (mg _{TROLOKS} /g _{s.tv.}) | 102,37 ± 2,03 |
| | NDF (% _{s.tv.}) | 44,21 ± 0,04 |
| | ADF (% _{s.tv.}) | 43,44 ± 0,76 |
| Vlakna | ADL, Lignin (% _{s.tv.}) | 29,91 ± 0,29 |
| | Hemiceluloza (% _{s.tv.}) | 0,76 ± 0,16 |
| | Celuloza (% _{s.tv.}) | 13,53 ± 0,90 |
| | Masti (% _{s.tv.}) | 10,48 ± 0,19 |
| | Vlaga (%) | 7,62 ± 0,00 |
| | Reducirajući šećeri (mg _{GLUKOZE} /g _{s.tv.}) | 11,21 ± 0,31 |
| | Protein Bradford (mg _{BSA} /g _{s.tv.}) | 0,96 ± 0,10 |
| | Proteini Kjeldahl (% _{s.tv.}) | 6,94 ± 0,26 |
| | Pepeo (% _{s.tv.}) | 6,10 ± 0,17 |
| | TN (mg/g _{s.tv.}) | 0,94 ± 0,02 |
| | TOC (mg/g _{s.tv.}) | 41,86 ± 2,36 |
| | TC (% _{s.tv.}) | 64,52 ± 0,67 |
| | IC (% _{s.tv.}) | 0,00 ± 0,00 |

Svi podaci izraženi na suhu tvar tropa grožđa, kao srednja vrijednost ± SD.

Prosječni kemijski sastava uzorka tropa grožđa korištenog u ovom radu (**Tablica 6**) odgovara prosječnom sastavu tropa crvenih sorta grožđa (**Tablica 1**). Osim toga u ovom uzorku je određen i udio TOC i TN u ekstraktu tropa grožđa. Udio organskog ugljika i dušika ovog uzorka su slični udjelu ugljika i dušika u dvije različite sorte crvenog tropa grožđa navedene u radu

autora Korz i sur. (2023). Udio TC u čvrstom uzorku tropa je iznosio 64,52 %_{s.tv.}, a anorganski ugljik nije detektiran u uzorku.

Među šećerima koji su detektirani u ovom tropu grožđa (**Tablica 7**), najviše dominira saharoza (4 mg/g_{s.tv.}), a u nešto manjoj koncentraciji pronalazimo glukozu (3,19 mg/g_{s.tv.}) i fruktozu (1,84 mg/g_{s.tv.}). Kao što je vidljivo iz **Tablice 7**, arabinoza nije detektirana u ovom tropu grožđa. U radu autora Jin i sur. (2019), u četiri različite sorte crvenog tropa grožđa dominirali su fruktoza i galaktoza, dok je saharoza detektirana u najmanjoj koncentraciji. Za razliku od crvenih sorti tropa grožđa, u različitim uzorcima tropa bijelog grožđa, detektirane su veće količine arabinoze (Canalejo i sur., 2021).

Tablica 7 Rezultati analiza pojedinačnih šećera uzorka tropa grožđa

| Šećer | C, mg/g _{s.tv.} |
|-----------|--------------------------|
| Glukoza | 3,19 ± 0,00 |
| Arabinoza | 0,00 ± 0,00 |
| Saharoza | 4,00 ± 0,04 |
| Fruktoza | 1,84 ± 0,04 |

Svi podaci izraženi su na suhu tvar tropa grožđa, kao srednja vrijednost ± SD.

Poznato je da u tropu grožđa zaostane velika količina fenolnih spojeva zbog nepotpune ekstrakcije tijekom procesa proizvodnje vina (Fontana i sur., 2013; Rockenbach i sur., 2011), a upravo zbog toga trop grožđa ima izražena brojna pozitivna djelovanja na ljudsko zdravlje (Casagrande i sur., 2019). Iz **Tablice 8** vidljivo je da su unutar skupine pojedinačnih fenolnih spojeva, katehin, epikatehin, galokatehin galat i procijanidin B1 dokazani u najvećim koncentracijama (838,77 – 3688,01 µg/g_{s.tv.}), dok su spojevi poput *p*-hidrokisbenzojeve kiseline, *p*-kumarinske, ferulične i kafeinske kiseline dokazani u nižim koncentracijama (3,18 – 5,90 µg/g_{s.tv.}).

Tablica 8 Rezultati analiza pojedinačnih fenolnih spojeva i pojedinačnih antocijana u uzorku tropa grožđa

| Analit | C, µg/g _{s.tv.} |
|-------------------|--------------------------|
| Fenoli: | |
| katehin | 3688,01 ± 456,42 |
| epikatehin | 2211,16 ± 272,33 |
| galokatehin galat | 1002,99 ± 175,96 |
| epikatehin galat | 209,03 ± 17,94 |
| procijanidin B1 | 838,77 ± 65,56 |
| procijanidin B2 | 406,55 ± 51,90 |

| Analit | C, $\mu\text{g/g}_{\text{s.tv.}}$ |
|--------------------------------------|---|
| kaempferol | 35,71 \pm 1,21 |
| rutin | 259,70 \pm 66,78 |
| kvercetin | 515,07 \pm 7,41 |
| galna kiselina | 197,37 \pm 24,28 |
| 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina | 34,25 \pm 1,40 |
| <i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina | 5,90 \pm 0,52 |
| vanilinska kiselina | 11,46 \pm 1,34 |
| kafeinska kiselina | 3,18 \pm 0,85 |
| klorogenska kiselina | 32,71 \pm 1,09 |
| siringična kiselina | 52,22 \pm 1,31 |
| <i>p</i> -kumarinska kiselina | 4,34 \pm 0,67 |
| ferulična kiselina | 4,36 \pm 0,03 |
| <i>o</i> -kumarinska kiselina | 11,03 \pm 2,49 |
| elagična kiselina | 79,63 \pm 7,65 |
| resveratrol | 22,02 \pm 1,27 |
| <i>Antocijani:</i> | |
| mirtilin klorid | 29,38 \pm 0,21 |
| kuromanin klorid | 5,98 \pm 0,80 |
| kalistepin klorid | 43,65 \pm 9,31 |
| peonidin-3-O-glukozid | 18,32 \pm 0,86 |
| oenin klorid | 275,06 \pm 2,30 |
| petunidin klorid | 3,57 \pm 1,07 |

Svi podaci koncentracije pojedinačnih spojeva izraženi su na suhu tvartropa grožđa, kao srednja vrijednost \pm SD.

Prilikom analiziranja individualnih antocijana zastupljenih u tropu grožđa, određeno je da je oenin klorid (275,06 $\mu\text{g/g}_{\text{s.tv.}}$) zastupljen u najvećoj mjeri, a petunidin klorid (3,57 $\mu\text{g/g}_{\text{s.tv.}}$) u najmanjoj mjeri u ovom uzorku. Osim ova dva navedena spoja, detektirano je prisustvo još četiri antocijana, i to: kuromanin klorid, peonidin-3-O-glukozid, mirtilin klorid i kalistepin klorid, u koncentracijama od 5,98 do 43,65 $\mu\text{g/g}_{\text{s.tv.}}$ (**Tablica 8**).

4.2. Optimalni uvjeti homogenizacije inkapsulacijske smjese

U svrhu optimizacije uvjeta homogenizacije inkapsulacijske smjese, odnosno otopine pripremljenog ekstrakta tropa grožđa i omotača (proteini kozje sirutke, GW (engl. *goat whey protein*)) provedena su preliminarna istraživanja prema kojima su određeni optimalni uvjeti homogenizacije na magnetnoj mješalici te u ultrazvučnoj kupelji. Upotrebom numeričke optimizacije uz postavljanje uvjeta maksimalne efikasnosti inkapsulacije i minimalnog udjela

vlage u MC, određeni su optimalni uvjeti homogenizacije pojne smjese u ultrazvučnoj kupelji, i to: temperatura homogenizacije od 40 °C, vrijeme homogenizacije pojne smjese u trajanju od 17,5 min uz vrijeme stabilizacije pojne smjese u trajanju od 30 min (Nedić, 2023). Prethodno navedenom upotrebom numeričke optimizacije uz postavljanje jednakih uvjeta (maksimalna efikasnost inkapsulacijskog procesa i minimalni udio vlage) određeni su i optimalni uvjeti homogenizacije pojne smjese na magnetnoj miješalici: temperatura homogenizacije od 50 °C, vrijeme homogenizacije pojne smjese u trajanju od 10 min uz brzinu homogenizacije od 600 rpm (Puš, 2023).

Korištenjem optimalnih uvjeta homogenizacije inkapsulacijske smjese na magnetnoj miješalici, odnosno primjenom ultrazvučne kupelji, sušenjem raspršivanjem su proizvedene MC kojima je određena koncentracija pojedinačnih fenolnih spojeva. Usporedbom koncentracija pojedinačnih fenolnih tvari u MC (**Tablica 9**), može se zaključiti da su gotovo sve vrijednosti pojedinačnih fenolnih spojeva nešto veće u uzorku MC dobivenom uz homogenizaciju inkapsulacijske smjese na magnetnoj miješalici, međutim statističkom obradom podataka zaključeno je da nema statistički značajne razlike između koncentracije pojedinačnih fenola u mikrokapsulama koje su dobivene uz ove dvije različite metode homogenizacije.

Tablica 9 Koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva u MC dobivenih uz homogenizaciju u magnetnoj miješalici (MC_{magnetna miješalica}) i ultrazvučnoj kupelji (MC_{ultrazvučna kupelj})

| Fenolni spoj | C, µg/g _{s.tv.MC} | | p |
|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| | (MC _{magnetna miješalica}) | (MC _{ultrazvučna kupelj}) | |
| galna kiselina | 926,30 ± 115,51 | 914,52 ± 69,84 | 0,9130 ^{ns} |
| 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina | 89,93 ± 26,91 | 90,82 ± 14,79 | 0,9712 ^{ns} |
| p-hidroksibenzojeva kiselina | 29,73 ± 10,59 | 28,59 ± 10,25 | 0,9230 ^{ns} |
| procijanidin B1 | 1465,74 ± 117,06 | 1416,10 ± 36,50 | 0,6247 ^{ns} |
| katehin | 6755,06 ± 848,15 | 6618,22 ± 493,89 | 0,8619 ^{ns} |
| vanilinska kiselina | 10,01 ± 5,20 | 9,86 ± 5,74 | 0,9817 ^{ns} |
| kafeinska kiselina | 19,72 ± 3,69 | 17,94 ± 1,64 | 0,5982 ^{ns} |
| klorogenska kiselina | 92,42 ± 9,36 | 95,65 ± 1,67 | 0,6786 ^{ns} |
| siringična kiselina | 208,97 ± 17,56 | 210,33 ± 5,81 | 0,9264 ^{ns} |
| procijanidin B2 | 1097,87 ± 256,12 | 1008,20 ± 153,26 | 0,7123 ^{ns} |
| epikatehin | 3422,80 ± 385,02 | 3259,82 ± 51,49 | 0,6131 ^{ns} |
| p-kumarinska kiselina | 7,68 ± 0,82 | 7,79 ± 0,55 | 0,8910 ^{ns} |
| galokatehin galat | 1513,85 ± 92,57 | 1441,19 ± 71,51 | 0,4723 ^{ns} |
| ferulična kiselina | 5,53 ± 0,86 | 5,73 ± 0,69 | 0,8182 ^{ns} |
| epikatehin galat | 245,22 ± 23,03 | 232,59 ± 7,86 | 0,5396 ^{ns} |
| o-kumarinska kiselina | 20,55 ± 1,76 | 21,63 ± 2,37 | 0,6577 ^{ns} |

| Fenolni spoj | C, $\mu\text{g/g}_{\text{s.tv.MC}}$ | | p |
|-------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| | (MC _{magnetna mješalica}) | (MC _{ultrazvučna kupelj}) | |
| elagična kiselina | 111,93 \pm 11,30 | 103,74 \pm 3,55 | 0,4309 ^{ns} |
| rutin | 266,14 \pm 9,96 | 250,55 \pm 3,57 | 0,1728 ^{ns} |
| resveratrol | 26,29 \pm 2,97 | 24,52 \pm 2,25 | 0,5693 ^{ns} |
| kaempferol | 16,94 \pm 0,74 | 15,09 \pm 0,32 | 0,0832 ^{ns} |
| kvercetin | 296,43 \pm 24,92 | 271,58 \pm 4,41 | 0,2993 ^{ns} |

Svi podaci izraženi su kao srednja vrijednost \pm SD. ^{ns} – nema statistički značajne razlike između srijednjih vrijednosti dvije grupe podataka (uz $p > 0,05$ prema t-testu za nezavisne uzorke *two-tail*, za nehomogene varijance).

Stoga je u ovom slučaju prednost dana homogenizaciji inkapsulacijske smjese na magnetnoj mješalici u odnosu na primjenu ultrazvučne kupelji s obzirom na kraće ukupno potrebno vrijeme za pripremu inkapsulacijske smjese. Naime vrijeme homogenizacije na magnetnoj mješalici uz dodatno vrijeme stabilizacije inkapsulacijske smjese nakon miješanja iznosi sveukupno 15 min, dok u slučaju homogenizacije u ultrazvučnoj kupelji ukupno potrebno vrijeme pripreme inkapsulacijske smjese iznosi 47,5 min, što je tri puta duže. Iz navedenih razloga odlučeno je da će se uzorci inkapsulacijske smjese prije sušenja raspršivanjem homogenizirati na magnetnoj mješalici pri navedenim optimalnim uvjetima u ostatku eksperimentalnog dijela rada.

4.3. Optimiranje procesa mikroinkapsulacije

Nakon što su izabrani uvjeti pri kojima će se homogenizirati inkapsulacijska smjesa prije mikroinkapsulacije, provedena je optimizacija procesa sušenja raspršivanjem (mikroinkapsulacije) prema planu pokusa kao što je opisano u poglavlju 3.3.2. Rezultati mjerenih odzivnih svojstava MC dobivenih u svih 15 pokusa inkapsulacije prikazani su u **Tablici 10**.

Tablica 10 Vrijednosti odzivnih svojstava mikrokapsula: udio vlage (w_m), prinos (Y), udio ukupnih i površinskih fenolnih tvari (TPC, SPC), efikasnost inkapsulacije (EE), parametri topivosti (WSI, WAI, SP), gustoća (BD, TD), parametri tecivosti (HR, CI), parametri boje (L^* , a^* , b^* , ΔE_{ab} , C^* , h^*)

| # | w_m (%) | Y (%) | TPC [‡] (mg _{GAE} /g _{s.t.}) | SPC [‡] (mg _{GAE} /g _{s.t.}) | EE (%) | WSI (%) | WAI (-) | SP (-) |
|---|-----------------|----------|---|---|------------------|------------------|-----------------|------------------|
| 1 | 6,31 \pm 0,44 | 82,77 | 94,58 \pm 1,23 | 4,04 \pm 0,27 | 95,73 \pm 0,24 | 62,10 \pm 0,31 | 4,02 \pm 0,15 | 10,61 \pm 0,47 |
| 2 | 6,06 \pm 0,03 | 76,35 | 141,18 \pm 1,02 | 8,67 \pm 0,72 | 93,86 \pm 0,59 | 55,08 \pm 0,38 | 4,61 \pm 0,11 | 10,25 \pm 0,17 |
| 3 | 4,92 \pm 0,44 | 78,28 | 119,07 \pm 1,64 | 6,45 \pm 0,39 | 94,58 \pm 0,55 | 51,14 \pm 0,26 | 5,19 \pm 0,02 | 10,62 \pm 0,02 |
| 4 | 5,26 \pm 0,05 | 77,00 | 126,39 \pm 1,44 | 7,86 \pm 0,33 | 93,78 \pm 0,17 | 52,17 \pm 1,15 | 5,55 \pm 0,01 | 11,61 \pm 0,26 |
| 5 | 7,74 \pm 0,44 | 66,03 | 178,34 \pm 1,29 | 45,16 \pm 0,60 | 74,68 \pm 0,39 | 44,82 \pm 0,23 | 5,76 \pm 0,14 | 10,43 \pm 0,22 |

| # | w_m (%) | Y (%) | TPC [‡] (mg _{GAE} /g _{s.t.}) | SPC [‡] (mg _{GAE} /g _{s.t.}) | EE (%) | WSI (%) | WAI (-) | SP (-) |
|----|--------------|----------|---|---|--------------|--------------|-------------|--------------|
| 6 | 5,84 ± 0,05 | 87,08 | 60,58 ± 1,22 | 5,04 ± 0,38 | 91,68 ± 0,30 | 59,58 ± 1,43 | 4,61 ± 0,14 | 11,42 ± 0,05 |
| 7 | 6,02 ± 0,92 | 68,56 | 155,00 ± 0,96 | 29,91 ± 0,72 | 80,71 ± 0,31 | 55,46 ± 0,19 | 5,26 ± 0,04 | 11,81 ± 0,05 |
| 8 | 4,59 ± 0,02 | 67,63 | 184,74 ± 1,29 | 44,80 ± 0,46 | 75,75 ± 0,44 | 55,09 ± 1,36 | 5,35 ± 0,22 | 11,92 ± 0,85 |
| 9 | 5,65 ± 0,44 | 84,47 | 99,57 ± 1,32 | 4,66 ± 0,39 | 95,32 ± 0,25 | 67,23 ± 0,75 | 4,54 ± 0,08 | 13,87 ± 0,08 |
| 10 | 6,31 ± 0,44 | 86,30 | 105,79 ± 0,84 | 3,14 ± 0,26 | 97,03 ± 0,39 | 58,47 ± 1,39 | 4,27 ± 0,09 | 10,28 ± 0,12 |
| 11 | 5,86 ± 0,03 | 83,83 | 97,81 ± 1,19 | 2,56 ± 0,20 | 97,38 ± 0,51 | 65,21 ± 0,83 | 4,78 ± 0,02 | 13,75 ± 0,26 |
| 12 | 4,93 ± 0,42 | 78,27 | 121,81 ± 1,07 | 6,61 ± 0,61 | 94,58 ± 0,42 | 51,34 ± 0,59 | 5,06 ± 0,00 | 10,40 ± 0,12 |
| 13 | 6,64 ± 0,03 | 78,82 | 124,88 ± 1,47 | 7,17 ± 0,60 | 94,26 ± 0,40 | 53,21 ± 0,19 | 5,35 ± 0,32 | 11,43 ± 0,74 |
| 14 | 4,93 ± 0,42 | 78,27 | 120,23 ± 1,69 | 6,41 ± 0,84 | 94,67 ± 0,30 | 51,21 ± 1,22 | 5,15 ± 1,08 | 10,59 ± 2,48 |
| 15 | 5,32 ± 0,02 | 67,11 | 189,38 ± 1,82 | 34,62 ± 0,74 | 81,72 ± 0,31 | 41,56 ± 0,05 | 5,26 ± 0,08 | 9,00 ± 0,13 |

[‡] vrijednosti izražene kao ekvivalent galne kiseline po masi suhe tvari mikrokapsula (srednja vrijednost ± standardna devijacija)

Tablica 10 – nastavak tablice

| # | BD (g/cm ³) | TD (g/cm ³) | HR (-) | CI (%) | L^* (-) | a^* (-) | b^* (-) | ΔE_{ab} (-) |
|----|----------------------------|----------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------------|
| 1 | 0,06 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 1,38 ± 0,00 | 27,78 ± 0,00 | 62,75 ± 1,06 | 6,12 ± 0,05 | 4,49 ± 0,09 | 22,60 ± 0,76 |
| 2 | 0,07 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 1,25 ± 0,00 | 20,00 ± 0,00 | 61,56 ± 2,16 | 8,62 ± 0,15 | 4,84 ± 0,08 | 24,36 ± 1,75 |
| 3 | 0,07 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 1,40 ± 0,00 | 28,57 ± 0,00 | 63,63 ± 1,19 | 8,92 ± 0,13 | 3,61 ± 1,08 | 23,60 ± 1,09 |
| 4 | 0,08 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 1,37 ± 0,00 | 26,92 ± 0,00 | 65,28 ± 0,97 | 7,73 ± 0,17 | 4,34 ± 0,03 | 21,48 ± 0,73 |
| 5 | 0,13 ± 0,00 | 0,20 ± 0,00 | 1,50 ± 0,00 | 33,33 ± 0,00 | 58,04 ± 2,21 | 13,54 ± 0,48 | 4,95 ± 0,11 | 29,40 ± 1,42 |
| 6 | 0,06 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | 1,42 ± 0,00 | 29,41 ± 0,00 | 59,30 ± 1,49 | 8,16 ± 0,17 | 7,44 ± 0,26 | 24,89 ± 1,12 |
| 7 | 0,15 ± 0,00 | 0,25 ± 0,00 | 1,63 ± 0,00 | 38,46 ± 0,00 | 53,61 ± 2,03 | 11,28 ± 0,27 | 4,69 ± 0,09 | 31,92 ± 1,75 |
| 8 | 0,13 ± 0,00 | 0,22 ± 0,00 | 1,67 ± 0,00 | 40,00 ± 0,00 | 49,36 ± 0,92 | 14,32 ± 0,62 | 4,73 ± 0,06 | 36,77 ± 0,65 |
| 9 | 0,08 ± 0,00 | 0,11 ± 0,00 | 1,39 ± 0,00 | 28,00 ± 0,00 | 62,35 ± 2,07 | 8,08 ± 0,09 | 4,59 ± 0,16 | 23,65 ± 1,52 |
| 10 | 0,08 ± 0,00 | 0,11 ± 0,00 | 1,44 ± 0,00 | 30,77 ± 0,00 | 62,60 ± 1,65 | 7,11 ± 0,21 | 4,19 ± 0,11 | 23,26 ± 1,18 |
| 11 | 0,08 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 1,26 ± 0,00 | 20,83 ± 0,00 | 61,31 ± 2,51 | 7,48 ± 0,08 | 4,04 ± 0,16 | 24,48 ± 1,93 |
| 12 | 0,07 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 1,40 ± 0,00 | 28,57 ± 0,00 | 62,72 ± 1,15 | 9,19 ± 0,55 | 4,14 ± 0,10 | 24,08 ± 0,99 |
| 13 | 0,08 ± 0,00 | 0,11 ± 0,00 | 1,33 ± 0,00 | 25,00 ± 0,00 | 59,74 ± 3,18 | 9,39 ± 0,54 | 4,38 ± 0,22 | 26,33 ± 2,72 |
| 14 | 0,07 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 1,40 ± 0,00 | 28,57 ± 0,00 | 62,79 ± 1,64 | 8,96 ± 0,20 | 4,29 ± 0,10 | 23,86 ± 1,16 |
| 15 | 0,11 ± 0,00 | 0,20 ± 0,00 | 1,80 ± 0,00 | 44,44 ± 0,00 | 51,35 ± 0,70 | 13,96 ± 0,11 | 4,03 ± 0,08 | 35,18 ± 0,55 |

Tablica 10 – nastavak tablice

| # | C^* (-) | h^* (°) |
|----|--------------|--------------|
| 1 | 7,59 ± 0,04 | 36,30 ± 0,73 |
| 2 | 9,89 ± 0,11 | 29,34 ± 0,77 |
| 3 | 9,66 ± 0,48 | 21,83 ± 5,86 |
| 4 | 8,87 ± 0,16 | 29,34 ± 0,48 |
| 5 | 14,41 ± 0,44 | 20,09 ± 0,87 |
| 6 | 11,05 ± 0,12 | 42,35 ± 1,48 |
| 7 | 12,22 ± 0,23 | 22,61 ± 0,82 |
| 8 | 15,08 ± 0,61 | 18,28 ± 0,49 |
| 9 | 9,29 ± 0,13 | 29,57 ± 0,77 |
| 10 | 8,25 ± 0,18 | 30,53 ± 1,07 |

| # | C* (-) | h* (°) |
|----|--------------|--------------|
| 11 | 8,51 ± 0,08 | 28,36 ± 1,06 |
| 12 | 10,08 ± 0,54 | 24,29 ± 0,92 |
| 13 | 10,37 ± 0,45 | 25,03 ± 2,10 |
| 14 | 9,93 ± 0,22 | 25,61 ± 0,02 |
| 15 | 14,53 ± 0,13 | 16,11 ± 0,17 |

Kao što je već spomenuto u uvodnom dijelu, parametri sušenja raspršivanjem iznimno su važni za ovu vrstu mikroinkapsulacije kako bi se dobile MC sa zadovoljavajućim svojstvima uz visoku EE i Y, o čemu svjedoče i brojni drugi autori (Koc i sur, 2010; Pino i sur., 2018; Roccia i sur., 2014; Ziaee i sur., 2019).

Rezultati ANOVA analize kvadratnih modela kojima je opisana funkcionalna ovisnost odzivnih varijabli o procesnim parametrima mikroinkapsulacije prikazani su u **Tablici 11**.

Tablica 11 Rezultati analize varijance (ANOVA) za matematičke modele ovisnosti odzivnih svojstava zavisnih varijabli o procesnim parametrima

| Izvor | EE (%) | | | | | w _m (%) | | | | |
|-------------------|--------|--------|--------|---------|-----------|--------------------|--------|--------|---------|---------|
| | df | SS | MS | F | p | df | SS | MS | F | p |
| Model | 9 | 844,43 | 93,83 | 18,80 | 0,0024* | 9 | 8,44 | 0,9383 | 5,01 | 0,0454* |
| A: T _i | 1 | 4,55 | 4,55 | 0,9109 | 0,3837 | 1 | 2,50 | 2,50 | 13,33 | 0,0147* |
| B: R | 1 | 658,84 | 658,84 | 132,04 | < 0,0001* | 1 | 0,0264 | 0,0264 | 0,1411 | 0,7226 |
| C: Q | 1 | 3,09 | 3,09 | 0,6188 | 0,4671 | 1 | 1,32 | 1,32 | 7,05 | 0,0452* |
| AB | 1 | 7,26 | 7,26 | 1,46 | 0,2816 | 1 | 0,9702 | 0,9702 | 5,18 | 0,0720 |
| AC | 1 | 1,56 | 1,56 | 0,3131 | 0,5999 | 1 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 1,0000 |
| BC | 1 | 2,64 | 2,64 | 0,5292 | 0,4996 | 1 | 0,1482 | 0,1482 | 0,7910 | 0,4145 |
| A ² | 1 | 0,9984 | 0,9984 | 0,2001 | 0,6734 | 1 | 2,63 | 2,63 | 14,04 | 0,0133* |
| B ² | 1 | 166,37 | 166,37 | 33,34 | 0,0022* | 1 | 1,06 | 1,06 | 5,67 | 0,0630 |
| C ² | 1 | 1,78 | 1,78 | 0,3574 | 0,5760 | 1 | 0,1185 | 0,1185 | 0,6325 | 0,4625 |
| Residual | 5 | 24,95 | 4,99 | | | 5 | 0,9370 | 0,1874 | | |
| Lack of Fit | 3 | 24,94 | 8,31 | 3079,50 | 0,0003* | 3 | 0,9369 | 0,3123 | 9369,25 | 0,0001* |
| Pure Error | 2 | 0,0054 | 0,0027 | | | 2 | 0,0001 | 0,0000 | | |
| Cor Total | 14 | 869,38 | | | | 14 | 9,38 | | | |
| R ² | | | | 0,9713 | | | | | 0,9001 | |

| Izvor | Y (%) | | | | | WSI (%) | | | | |
|-------------------|-------|--------|--------|-------------------------|-----------|---------|--------|--------|---------|----------------------|
| | df | SS | MS | F | p | df | SS | MS | F | p |
| Model | 9 | 689,54 | 76,62 | 21,44 | 0,0018* | 9 | 566,51 | 62,95 | 2,89 | 0,1277 ^{ns} |
| A: T _i | 1 | 15,26 | 15,26 | 4,27 | 0,0936 | 1 | 1,37 | 1,37 | 0,0628 | 0,8120 |
| B: R | 1 | 578,68 | 578,68 | 161,95 | < 0,0001* | 1 | 393,12 | 393,12 | 18,04 | 0,0081* |
| C: Q | 1 | 29,30 | 29,30 | 8,20 | 0,0353* | 1 | 1,02 | 1,02 | 0,0466 | 0,8376 |
| AB | 1 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0000 | 0,9960 | 1 | 10,14 | 10,14 | 0,4654 | 0,5254 |
| AC | 1 | 14,48 | 14,48 | 4,05 | 0,1003 | 1 | 21,53 | 21,53 | 0,9878 | 0,3659 |
| BC | 1 | 0,2025 | 0,2025 | 0,0567 | 0,8213 | 1 | 20,84 | 20,84 | 0,9561 | 0,3731 |
| A ² | 1 | 0,0652 | 0,0652 | 0,0183 | 0,8978 | 1 | 3,19 | 3,19 | 0,1465 | 0,7176 |
| B ² | 1 | 37,94 | 37,94 | 10,62 | 0,0225* | 1 | 36,00 | 36,00 | 1,65 | 0,2550 |
| C ² | 1 | 10,32 | 10,32 | 2,89 | 0,1499 | 1 | 81,91 | 81,91 | 3,76 | 0,1103 |
| Residual | 5 | 17,87 | 3,57 | | | 5 | 108,98 | 21,80 | | |
| Lack of Fit | 3 | 17,87 | 5,96 | 1,787 · 10 ⁵ | < 0,0001* | 3 | 108,96 | 36,32 | 3526,24 | 0,0003* |

| | | | | | | | | | | |
|-------------------|----|--------|--------|--------|--|----|--------|--------|--------|--|
| <i>Pure Error</i> | 2 | 0,0001 | 0,0000 | | | 2 | 0,0206 | 0,0103 | | |
| <i>Cor Total</i> | 14 | 707,40 | | | | 14 | 675,49 | | | |
| R^2 | | | | 0,9747 | | | | | 0,8387 | |

| Izvor | WAI (-) | | | | | SP (-) | | | | |
|--------------------|---------|--------|--------|--------|----------------------|--------|--------|--------|--------|----------------------|
| | df | SS | MS | F | <i>p</i> | df | SS | MS | F | <i>p</i> |
| Model | 9 | 3,34 | 0,3713 | 53,71 | 0,0002* | 9 | 18,33 | 2,04 | 1,91 | 0,2467 ^{ns} |
| A: T_i | 1 | 0,0265 | 0,0265 | 3,83 | 0,1078 | 1 | 1,17 | 1,17 | 1,10 | 0,3430 |
| B: R | 1 | 2,02 | 2,02 | 292,20 | < 0,0001* | 1 | 3,58 | 3,58 | 3,35 | 0,1266 |
| C: Q | 1 | 0,0392 | 0,0392 | 5,67 | 0,0631 | 1 | 0,9180 | 0,9180 | 0,8601 | 0,3963 |
| AB | 1 | 0,3969 | 0,3969 | 57,41 | 0,0006* | 1 | 5,22 | 5,22 | 4,89 | 0,0779 |
| AC | 1 | 0,7056 | 0,7056 | 102,06 | 0,0002* | 1 | 0,4692 | 0,4692 | 0,4396 | 0,5366 |
| BC | 1 | 0,0081 | 0,0081 | 1,17 | 0,3285 | 1 | 3,03 | 3,03 | 2,84 | 0,1530 |
| A ² | 1 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0015 | 0,9708 | 1 | 0,1345 | 0,1345 | 0,1260 | 0,7371 |
| B ² | 1 | 0,1152 | 0,1152 | 16,67 | 0,0095* | 1 | 1,34 | 1,34 | 1,25 | 0,3140 |
| C ² | 1 | 0,0382 | 0,0382 | 5,52 | 0,0656 | 1 | 2,55 | 2,55 | 2,39 | 0,1826 |
| <i>Residual</i> | 5 | 0,0346 | 0,0069 | | | 5 | 5,34 | 1,07 | | |
| <i>Lack of Fit</i> | 3 | 0,0257 | 0,0086 | 1,93 | 0,3589 ^{ns} | 3 | 5,31 | 1,77 | 124,31 | 0,0080* |
| <i>Pure Error</i> | 2 | 0,0089 | 0,0044 | | | 2 | 0,0285 | 0,0142 | | |
| <i>Cor Total</i> | 14 | 3,38 | | | | 14 | 23,67 | | | |
| R^2 | | | | 0,9898 | | | | | 0,7745 | |

| Izvor | HR (-) | | | | | CI (%) | | | | |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|----------|--------|--------|--------|--------|----------|
| | df | SS | MS | F | <i>p</i> | df | SS | MS | F | <i>p</i> |
| Model | 9 | 0,3125 | 0,0347 | 27,02 | 0,0010* | 9 | 603,19 | 67,02 | 14,87 | 0,0042* |
| A: T_i | 1 | 0,0190 | 0,0190 | 14,80 | 0,0120* | 1 | 29,99 | 29,99 | 6,65 | 0,0495* |
| B: R | 1 | 0,1596 | 0,1596 | 124,21 | 0,0001 | 1 | 298,29 | 298,29 | 66,18 | 0,0005* |
| C: Q | 1 | 0,0025 | 0,0025 | 1,91 | 0,2259 | 1 | 9,50 | 9,50 | 2,11 | 0,2062 |
| AB | 1 | 0,0441 | 0,0441 | 34,32 | 0,0021* | 1 | 81,54 | 81,54 | 18,09 | 0,0081* |
| AC | 1 | 0,0002 | 0,0002 | 0,1751 | 0,6930 | 1 | 1,58 | 1,58 | 0,3495 | 0,5801 |
| BC | 1 | 0,0020 | 0,0020 | 1,58 | 0,2648 | 1 | 4,64 | 4,64 | 1,03 | 0,3566 |
| A ² | 1 | 0,0102 | 0,0102 | 7,92 | 0,0374* | 1 | 32,68 | 32,68 | 7,25 | 0,0432* |
| B ² | 1 | 0,0698 | 0,0698 | 54,33 | 0,0007* | 1 | 132,92 | 132,92 | 29,49 | 0,0029* |
| C ² | 1 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0718 | 0,7994 | 1 | 0,2544 | 0,2544 | 0,0565 | 0,8216 |
| <i>Residual</i> | 5 | 0,0064 | 0,0013 | | | 5 | 22,53 | 4,51 | | |
| <i>Lack of Fit</i> | 3 | 0,0064 | 0,0021 | | | 3 | 22,53 | 7,51 | | |
| <i>Pure Error</i> | 2 | 0,0000 | 0,0000 | | | 2 | 0,0000 | 0,0000 | | |
| <i>Cor Total</i> | 14 | 0,3189 | | | | 14 | 625,73 | | | |
| R^2 | | | | 0,9799 | | | | | 0,9640 | |

| Izvor | ΔE_{ab} (-) | | | | |
|--------------------|---------------------|--------|--------|--------|----------------------|
| | df | SS | MS | F | <i>p</i> |
| Model | 9 | 275,53 | 30,61 | 4,44 | 0,0576 ^{ns} |
| A: T_i | 1 | 1,39 | 1,39 | 0,2024 | 0,6716 |
| B: R | 1 | 192,86 | 192,86 | 28,00 | 0,0032* |
| C: Q | 1 | 0,0025 | 0,0025 | 0,0004 | 0,9857 |
| AB | 1 | 3,80 | 3,80 | 0,5520 | 0,4909 |
| AC | 1 | 0,5184 | 0,5184 | 0,0753 | 0,7948 |
| BC | 1 | 4,97 | 4,97 | 0,7219 | 0,4343 |
| A ² | 1 | 0,2964 | 0,2964 | 0,0430 | 0,8439 |
| B ² | 1 | 69,92 | 69,92 | 10,15 | 0,0244* |
| C ² | 1 | 1,82 | 1,82 | 0,2639 | 0,6293 |
| <i>Residual</i> | 5 | 34,44 | 6,89 | | |
| <i>Lack of Fit</i> | 3 | 34,33 | 11,44 | 198,20 | 0,0050* |
| <i>Pure Error</i> | 2 | 0,1155 | 0,0577 | | |
| <i>Cor Total</i> | 14 | 309,97 | | | |
| R^2 | | | | 0,8889 | |

df – stupanj slobode; SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; MS – varijanca; F – Fisherov koeficijent; p – p -vrijednost; *Residual* – ostatak; *Lack of Fit* – nedostatak modela; *Pure Error* – pogreška; *Pure Total* – ukupno; R^2 – koeficijent multiple determinacije; * – statistički značajno ($p < 0,05$); ns – nije statistički značajno ($p > 0,05$)

Vrijednosti navedene u **Tablici 10**, korištene su za pronalaženje funkcionalne ovisnosti odzivnih svojstava o procesnim parametrima, izradu 3D odzivnih površina te određivanje optimalnih uvjeta inkapsulacije. Regresijski koeficijenti u obliku kodiranih faktora i statistička značajnost utjecaja parametara sušenja raspršivanjem na različita svojstva MC, su prikazani u **Tablici 12**.

Tablica 12 Statistički pokazatelji značajnosti utjecaja nezavisnih varijabli mikroinkapsulacijskog procesa sušenja raspršivanjem na zavisne varijable: EE, w_m , Y, WSI, WAI, SP, HR, CI, L^* , h^* , C^* , ΔE_{ab}

| Zavisna varijabla | Regresijski koeficijenti matematičkih modela za kodirane varijable * | | | | | | | | | |
|-------------------|--|----------|-----------|-----------|----------|------------------------|---------|----------------|----------------|----------------|
| | Intercept | A | B | C | AB | AC | BC | A ² | B ² | C ² |
| TPC | 120,37 | 8,103 | -38,714** | -13,204 | 1,953 | 12,378 | 8,99 | -1,68 | 21,338 | -5,433 |
| SPC | 6,49 | 1,87 | -17,511** | -2,5913** | -2,265 | 0,33 | 3,343** | 0,831 | 14,274** | -0,136 |
| EE | 94,61 | -0,754 | 9,075** | 0,621 | 1,348 | 0,625 | -0,813 | -0,52 | -6,713** | -0,695 |
| w_m | 4,927 | 0,559** | 0,058 | 0,406** | -0,493 | -2,5·10 ⁻¹⁷ | -0,193 | 0,844** | 0,537 | 0,179 |
| Y | 78,273 | -1,381 | 8,505** | 1,914** | 0,005 | -1,914 | 0,225 | -0,133 | -3,21** | 1,672 |
| WSI | 51,23 | -0,414 | 7,01** | -0,356 | -1,593 | -2,32 | -2,283 | -0,93 | 3,123 | 4,71 |
| WAI | 5,133 | -0,058 | -0,503** | -0,07 | -0,315** | 0,42** | -0,045 | -0,002 | -0,177** | -0,102 |
| SP | 10,537 | -0,383 | 0,669 | -0,339 | -1,143 | 0,343 | -0,87 | -0,191 | 0,602 | 0,832 |
| HR | 1,4 | -0,049** | -0,142** | 0,015 | 0,105** | 0,008 | 0,023 | -0,053** | 0,138** | -0,005 |
| CI | 28,57 | -1,936** | -6,106** | 1,09 | 4,515** | 0,628 | 1,078 | -2,975** | 6** | -0,263 |
| L^* | 63,047 | 0,606 | 4,581** | -0,413 | -1,313 | 1,04 | -1,00 | -0,090 | -4,587** | -1,48 |
| h^* | 23,91 | -0,675 | 5,959** | 1,749 | 0,99 | -4,33 | -0,843 | 3,786 | -2,481 | 3,819 |
| C^* | 9,89 | -0,088 | -2,825** | -0,155 | -0,2 | -0,425 | 0,455 | 0,103 | 1,268 | 0,053 |
| ΔE_{ab} | 23,847 | -0,418 | -4,91** | 0,018 | 0,975 | -0,36 | 1,115 | -0,283 | 4,352** | 0,702 |

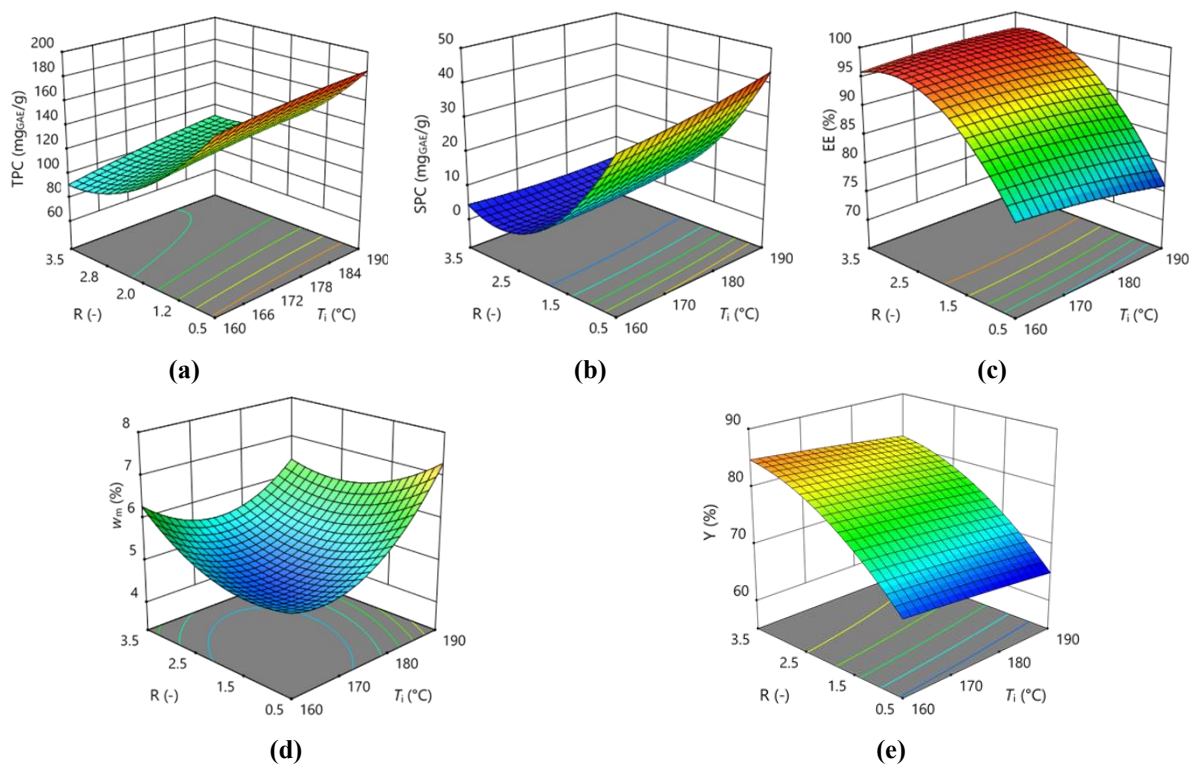
‡ Procijenjeni koeficijent predstavlja očekivanu promjenu odgovora po jedinici promjene vrijednosti faktora kada su svi ostali faktori konstantni. Odsječak u ortogonalnom dizajnu je prosječni ukupni odgovor svih proba. Koeficijenti su prilagodbe oko ovog prosjeka na temelju postavki faktora.

** Statistički značajan koeficijent za model ($p < 0,05$).

Iz navedenih vrijednosti (**Tablice 11 i 12**) može se općenito zaključiti da je među tri ispitana parametra sušenja raspršivanjem, najveći utjecaj na inkapsulaciju i svojstva MC imao udio omotača (R).

Ukoliko promatramo vrijednosti odgovora za zavisne varijable koje su pokazatelji uspjeha procesa inkapsulacije, tj. TPC, SPC, EE i w_m , vidljivo je da: kodirani faktor A (u linearnom i kvadratnom obliku) ima statistički značajan utjecaj na w_m ; kodirani faktor B (u linearnom i kvadratnom obliku) imao je značajan utjecaj na TPC, SPC i EE; dok je faktor C značajno utjecao na SPC i w_m . Osim toga, zabilježena je i interakcija utjecaja faktora BC na SPC. Nadalje, faktor B je imao značajan utjecaj na WSI i WAI uz prisutnost međudjelovanja faktora AB i AC.

Na svojstva fluidnosti/stlačivosti MC (HR i CI) značajno su utjecali faktori A i B, kao nezavisni faktori s linearnom i kvadratnom ovisnošću, a uočen je i zajednički utjecaj ova dva faktora. Parametri boje (L^* , h^* , C^*) MC i ukupna razlika u boji u usporedbi s čistim omotačem bili su statistički ovisni o B i B^2 . Ti su utjecaji također jasno vidljivi na 3D odzivnim površinama (**Slike 20 – 22**).



Slika 20 3D prikaz utjecaja temperature ulaznog zraka i udjela omotača pri konstantnom protoku pojne smjese od 8 mL/min na: **(a)** TPC, **(b)** SPC, **(c)** EE, **(d)** w_m i **(e)** Y

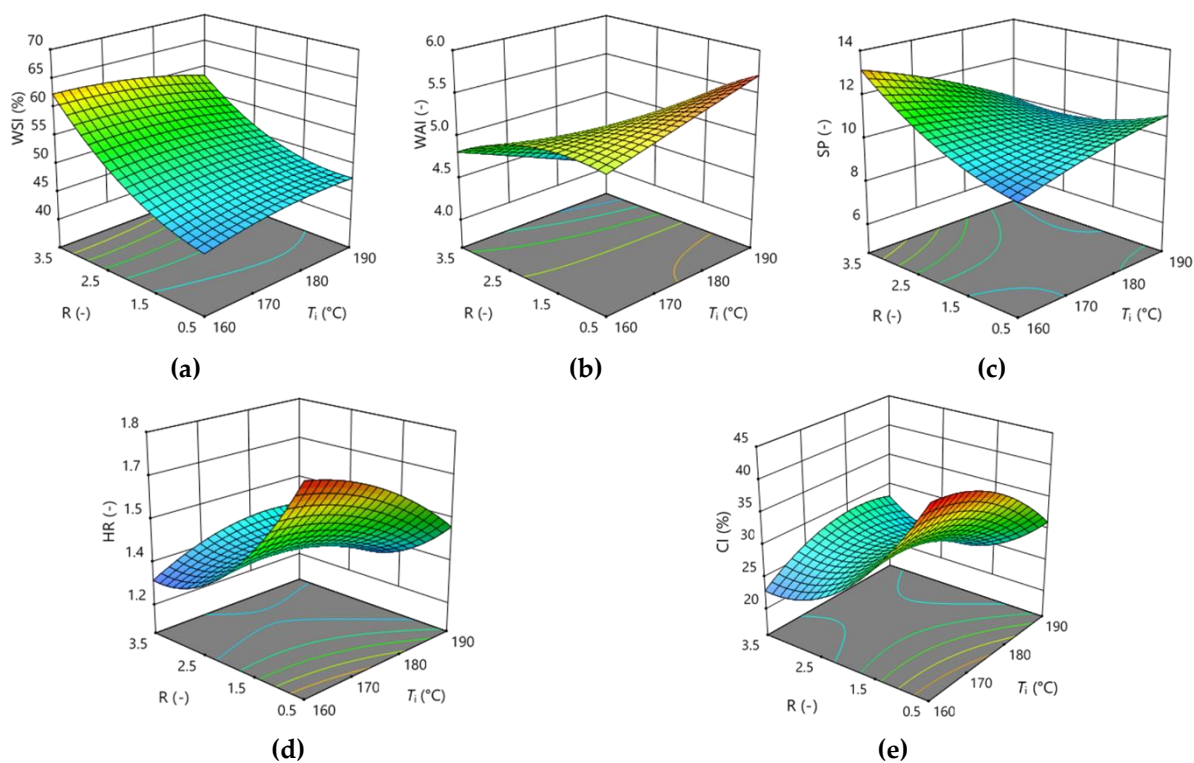
Općenito, može se očekivati da s povećanjem udjela omotača (R) u pojnoj smjesi rasti i njegov udio u MC, pri čemu udio fenolnih tvari (TPC), koji je u ovom slučaju ugrađen u MC u obliku GPE, opada, što je jasno vidljivo na **Slici 20a**. To također utječe na smanjenje količine fenolnih spojeva adsorbiranih na površini MC, što je još izraženije kada se uzme u obzir dodatno uočeni utjecaj Q i njihove interakcije (**Slika 20b**). Posljedično, povećanje TPC i smanjenje SPC dovelo je do povećanja EE (**Slika 20c**). Vrijednosti TPC, SPC i EE kretale su se od 60,58 – 89,38 mg_{GAE}/g_{s.tv.}, 2,56 – 45,16 mg_{GAE}/g_{s.tv.}, odnosno 74,68 – 97,38 %.

Vrijednosti za w_m bile su u rasponu od 4,59 do 7,74 % (**Slika 20d**). Niži udio vlage u uzorcima MC postignut je pri nižim temperaturama ulaznog zraka, što se može objasniti izostankom naglog stvaranja pokorice na površini MC-a u početnoj fazi sušenja, što posljedično može uzrokovati otežano uklanjanje vlage iz središta MC u kasnijim fazama sušenja. Iako nije bilo statistički značajnog utjecaja faktora R (**Tablica 12**), na **Slici 20d** može se vidjeti da s

povećanjem količine dodanog omotača u pojnoj smjesi raste i w_m u konačnom proizvodu, što se može povezati s činjenicom da je udio vlage u čistom omotaču 5,25 %_{s.tv.} i u ovom slučaju sam GW se može smatrati "spremnikom vlage" u sastavu MC. Slično ovim rezultatima, autori Moreno i sur., (2016), su proizveli produkt s udjelom vlage između 4,4 % i 11,7 % u slučaju mikroinkapsulacije GPE korištenjem izolata proteina sirutke kao omotača, dok je w_m bila nešto viša, između 11,1 % i 14,8 %, u slučaju korištenja kombinacije maltodekstrina, izolata proteina sirutke i izolata proteina graška kao omotača.

Eksperimentalno određene vrijednosti za Y su bile iznad 50 % za sve uvjete sušenja raspršivanjem, tj. kretale su se u rasponu 67,11 – 86,30 % (**Tablica 10**), što se može smatrati visokim prinosom procesa inkapsulacije u laboratorijskim uvjetima sušenja raspršivanjem. Navedeni prinosi usporedivi su s rezultatima sličnih studija mikroinkapsulacije u kojima su proteini sirutke korišteni kao omotač (samostalno ili u kombinaciji s ko-omotačima). Na primjer, Rafiq i sur. (2023.) postigli su prinose u rasponu od 77,76 – 82,87 % kada su mikroinkapsulirali ekstrakt kore Kinnowa koristeći maltodekstrin i koncentrat proteina sirutke. Catalkaya i sur. (2022.) inkapsulirali su ekstrakt komine crne aronije bogat antocijanima koristeći različite omotače te su postigli prinos sušenja raspršivanjem do 78,1 %. Oni povezuju ovaj visoki prinos s jakim surfaktantnim karakterom proteina sirutke, koji stvaraju tanku, neljepljivu proteinsku barijeru na površini kapljice u dodiru s vrućim zrakom, uzrokujući da kapljice slabo prijanjaju na unutarnju stijenu komore za sušenje, što rezultira većom proizvodnjom praha. Slično kao i kod EE, R je imao najveći utjecaj na Y, što je i očekivano, tj. s povećanjem udjela GW, povećavao se i prinos MC (**Slika 20e**). Osim toga, utvrđen je statistički značajan pozitivan utjecaj brzine protoka na Y, dok temperatura sušenja u ovom slučaju nije imala statistički značajan utjecaj (**Tablice 11 i 12**).

Parametri topljivosti WSI, WAI i SP ključni su markeri funkcionalnih kvaliteta proizvoda, kao i markeri za korištenje i očuvanje MC. Sposobnost MC da se otopi u vodi predstavlja WSI. Namjena proizvedenih MC određuje da li je viša vrijednost WSI poželjna ili ne. Visoki WSI je posebno ključan ako će se MC koristiti u prehrambenoj ili farmaceutskoj industriji, tako da se MC može lako ugraditi i ravnomjerno raspršiti kroz konačni proizvod. Vjerojatnost mikrobiološke nestabilnosti MC raste s višim vrijednostima WAI (Siacor et al., 2020.). Vrijednosti WSI, WAI i SP ovog skupa optimizacije kretale su se od 41,56 – 67,23 %; 4,06 – 5,76; odnosno 9,00 – 13,87 (**Slika 21a–c**).

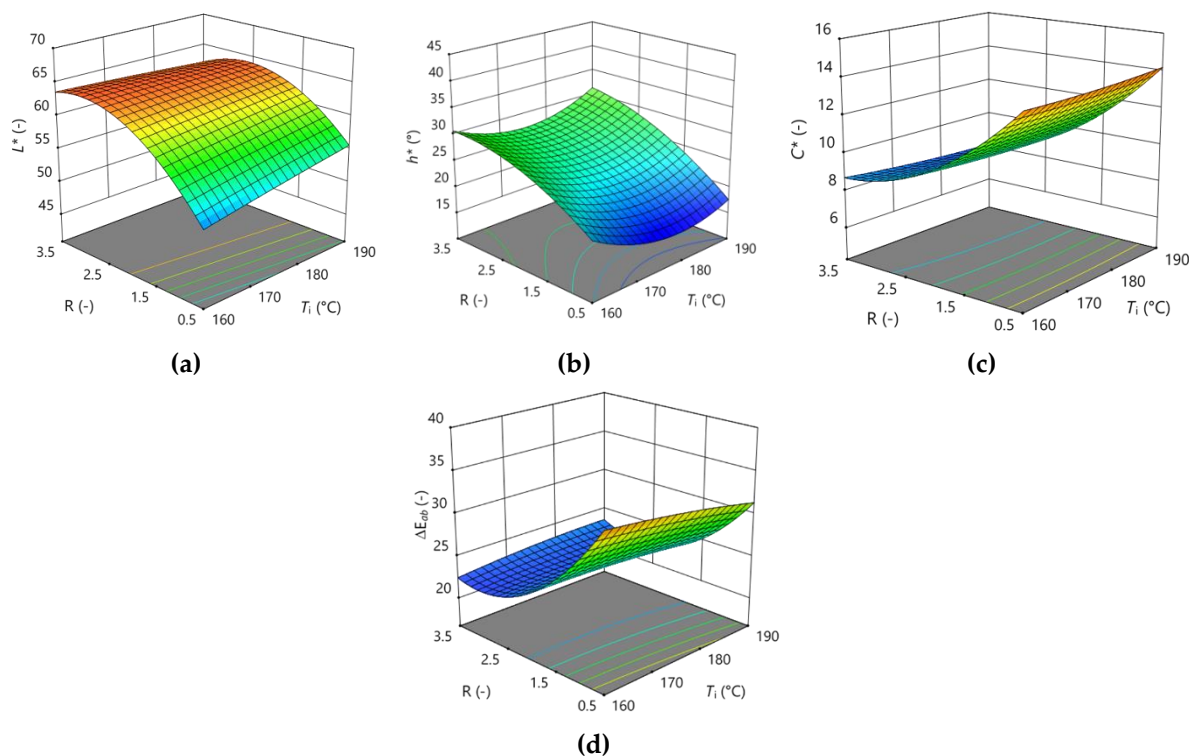


Slika 21 3D prikaz utjecaja temperature ulaznog zraka i udjela omotača pri konstantnom protoku pojne smjese od 8 mL/min na: **(a)** WSI, **(b)** WAI, **(c)** SP, **(d)** HR i **(e)** CI

Na temelju specifične gustoće praha prije i nakon potresanja (**Tablica 10**), izračunati su HR i CI, a 3D površine njihovih odziva prikazane su na **Slici 21 d** i **e**, koja jasno pokazuje neovisni i kombinirani utjecaj R i T_i na HR i CI. Tecivost većine MC proizvedenih tijekom ovog eksperimenta okarakterizirana je kao "vrlo loša" ili "vrlo, vrlo loša".

Kao što je ranije statistički potvrđeno (**Tablica 12**), značajna ovisnost svojstava boje MC o R je također potvrđena i 3D odzivnim površinama prikazanim na **Slici 20**. Svjetlina MC kreće se od 49,36 do 65,25, pri čemu su MC svjetlije u odnosu na čisti omotač, tj. imaju veće vrijednosti L^* (**Tablica 10**, **Slika 22a**). Svjetlina upotrijebljenog GW praha je iznosila 80,17. Vrijednosti parametra h^* kreću se u rasponu od 16,11° do 42,35° (**Slika 22b**), što odgovara I. kvadrantu CIE*Lab* dijagrama boja (0° – 90°), tj. proizvedene MC se nalaze u rasponu crvene boje. U isto vrijeme, kako se udio GW u MC povećava, vrijednost h^* raste, tj. nijansa se pomiče prema II. kvadrant CIE*Lab* dijagrama (90° – 100°; žuta boja), gdje se nalazi h^* vrijednost za GW prah (97,07°). Zasićenost nijanse (**Slika 22c**) bila je u rasponu od 7,59 – 15,8, s nižim vrijednostima za MC koje su imale veće udjele GW, tj. njihova boja je bila manje „živa“ i bliža neutralnoj sivoj boji. S obzirom na prethodno navedeno, očekivalo se da će vrijednosti za ΔE_{ab} biti niže kada je veći udio omotača (GW) u MC (**Slika 22d**). Ove instrumentalno utvrđene

vrijednosti kretale su se u rasponu od 21,48 do 36,77 te su također bile subjektivno vidljive, s obzirom da prosječno ljudsko oko može uočiti svaku $\Delta E_{ab} > 6$.



Slika 22 3D prikaz utjecaja temperature ulaznog zraka i udjela omotača pri konstantnom protoku pojne smjese od 8 mL/min na: **(a)** L^* , **(b)** h^* , **(c)** C^* i **(d)** ΔE_{ab}

Uspoređujući parametre boje (**Slika 22**) sa udjelom fenolnih tvari u MC (**Slika 20**), uočava se jasna korelacija između ovih vrijednosti, što potvrđuju i visoki koeficijenti korelacije za odnose $TPC : h^*$, $SPC : L^*$ i $SPC : C^*$ ($R = -0,8805$; $R = -0,8361$; odnosno $R = 0,9347$).

Temeljem dobivenih matematičkih modela, korištena je numerička optimizacija procesnih parametara u ispitivanom području za određivanje optimalnih parametara sušenja s unaprijed određenim graničnim uvjetima, tj. minimalna vrijednost za w_m i maksimalna vrijednosti za EE. Na taj način su određeni optimalni parametri inkapsulacije, kako slijedi:

$$T_i = 173,5 \text{ °C}; R = 2,5; Q = 7 \text{ mL/min.}$$

Za verifikaciju numeričkog optimiranja proveden je novi pokus inkapsulacije primjenom određenih optimalnih uvjeta. Analizirana su svojstva dobivenih MC te su uspoređene dobivene vrijednosti sa vrijednostima dobivenim numeričkim optimiranjem, odnosno vrijednostima procjenjenim prema regresijskim matematičkim modelima (**Tablica 13**).

Tablica 13 Prikaz vrijednosti predviđenih modelima i eksperimentalno određenih vrijednosti pr optimalnim uvjetima inkapsulacije

| Zavisna varijabla | Prema modelu | Eksperimentalno određeno | Odstupanje (%) |
|---------------------|--------------|--------------------------|----------------|
| w_m (%) | 4,89 | 4,98 | 1,81 |
| Y (%) | 80,22 | 85,17 | 6,17 |
| EE (%) | 96,95 | 95,47 | 1,53 |
| WSI (%) | 57,94 | 57,47 | 0,81 |
| WAI (-) | 4,98 | 4,37 | 12,25 |
| SP (-) | 11,93 | 10,28 | 13,83 |
| ΔE_{ab} (-) | 24,48 | 23,73 | 3,06 |
| HR (-) | 1,35 | 1,36 | 0,74 |
| CI (%) | 26,34 | 26,32 | 0,08 |

Usporedbom prema modelu predviđenih i eksperimentalno utvrđenih vrijednosti svojstava praha u optimalnim uvjetima vidljivo je da je većina odstupanja manja od 10 %. Postoje dvije iznimke kod kojih je odstupanje veće od 10 %, naime SP i WAI vrijednosti (**Tablica 13**).

4.4. Svojstva mikrokapusla dobivenih primjenom proteina kozje sirutke i ko-omotača ugljikohidratnog tipa

Pri navedenim optimalnim uvjetima sušenja raspršivanjem napravljeno je ukupno 17 različitih uzoraka MC ekstrakta tropa grožđa koji je inkapsuliran kombinacijom glavnog omotača (GW) i ko-omotača: trehaloze (T), saharoze (S), ksiloze (X) ili maltodekstrina (MD), kojima je zamijenjen određeni dio glavnog omotača. Ovi uzorci MC označeni su s oznakama navedenim u **Tablici 14** s obzirom na udio pojedinog ko-omotača u odnosu na ukupni omotač.

Tablica 14 Oznake mikrokapusla za čiju inkapsulaciju je korištena kombinacija omotača i ko-omotača

| Oznaka | Omotač | Udio (%) | Ko-omotač | Udio (%) |
|------------|-----------------------|----------|-----------|----------|
| GW1 | protein kozje sirutke | 100 | - | - |
| T5 | protein kozje sirutke | 95 | trehaloza | 5 |
| T10 | | 90 | | 10 |
| T20 | | 80 | | 20 |
| T30 | | 70 | | 30 |
| S5 | protein kozje sirutke | 95 | saharoza | 5 |
| S10 | | 95 | | 10 |

| Oznaka | Omotač | Udio (%) | Ko-omotač | Udio (%) |
|--------|-----------------------|----------|------------------------|----------|
| S20 | | 90 | | 20 |
| S30 | | 80 | | 30 |
| MD2.5 | | 97,5 | | 2,5 |
| MD5 | protein kozje sirutke | 95 | maltodekstrin (DE 4-7) | 5 |
| MD10 | | 90 | | 10 |
| MD15 | | 85 | | 15 |
| X5 | | 95 | | 5 |
| X10 | protein kozje sirutke | 90 | ksiloza | 10 |
| X15 | | 85 | | 15 |
| X30 | | 70 | | 30 |

Za određivanje efikasnosti inkapsulacije korištenih kombinacija omotača i ko-omotača, analiziran je udio ukupnih i površinskih fenolnih tvari pripremljenih MC, a dobiveni rezultati su prikazani u **Tablici 15**.

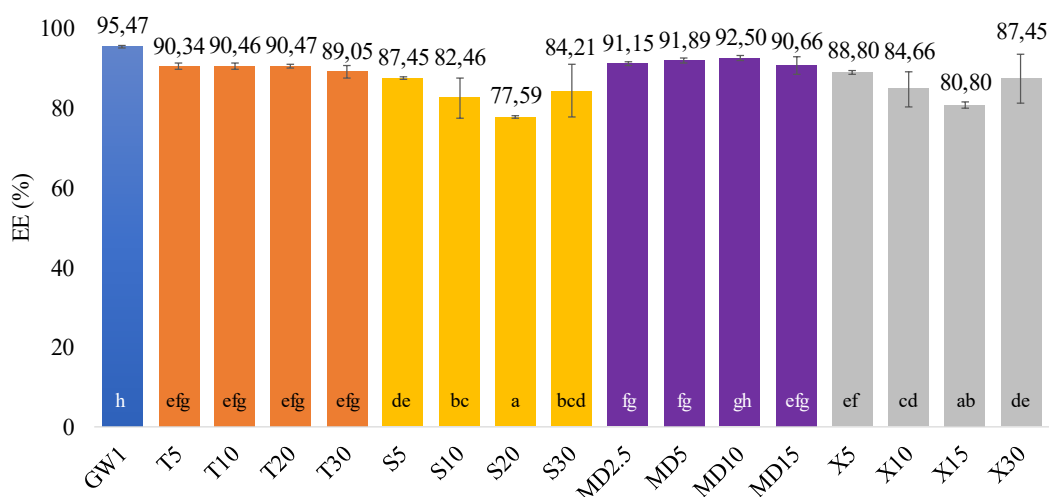
Tablica 15 TPC i SPC mikrokapsula pripremljenih sušenjem raspršivanjem uz kombinaciju omotača i ko-omotača

| Uzorak | TPC (mg _{GAE} /g _{s.tv.}) | SPC (mg _{GAE} /g _{s.tv.}) |
|--------|--|--|
| GW1 | 124,09 ± 1,63 ⁱ | 5,62 ± 0,34 ^{bc} |
| T5 | 102,63 ± 1,19 ^e | 9,90 ± 0,61 ^f |
| T10 | 114,37 ± 0,68 ^g | 10,89 ± 0,54 ^g |
| T20 | 113,15 ± 0,66 ^g | 14,21 ± 0,52 ⁱ |
| T30 | 98,84 ± 0,85 ^d | 22,15 ± 0,15 ^l |
| S5 | 101,47 ± 1,52 ^e | 8,98 ± 0,53 ^e |
| S10 | 102,63 ± 0,85 ^e | 7,70 ± 0,62 ^d |
| S20 | 97,50 ± 0,81 ^{cd} | 10,92 ± 0,27 ^g |
| S30 | 86,81 ± 1,54 ^a | 16,66 ± 0,67 ^k |
| MD2.5 | 113,12 ± 1,18 ^g | 7,12 ± 0,20 ^d |
| MD5 | 97,38 ± 0,82 ^c | 4,54 ± 0,27 ^a |
| MD10 | 96,89 ± 1,33 ^c | 5,05 ± 0,59 ^{ab} |
| MD15 | 93,30 ± 1,38 ^b | 5,71 ± 0,26 ^c |
| X5 | 96,78 ± 1,60 ^c | 8,93 ± 0,49 ^e |
| X10 | 117,34 ± 1,28 ^h | 9,89 ± 0,39 ^f |
| X15 | 104,10 ± 0,95 ^f | 12,89 ± 0,46 ^h |
| X30 | 94,12 ± 1,56 ^b | 15,78 ± 0,34 ^j |

Svi podaci izraženi su na suhu tvar mikrokapsula, kao srednja vrijednost ± SD. Različita slova (a, b, c...) predstavljaju statistički značajne razlike između vrijednosti u istom stupcu (ANOVA, *post-hoc* Duncanov test pri $p < 0,05$)

Najveća koncentracija TPC (124,09 mg_{GAE}/g_{s.tv.}) utvrđena je u MC obloženim GW (GW1), dok je u ostalim MC obloženim GW i ko-omotačem koncentracija TPC varirala između 94,12 mg_{GAE}/g_{s.tv.} i 117,34 mg_{GAE}/g_{s.tv.}. Može se uočiti da povećanje udjela dodanog ko-omotača utječe na smanjenje količine TPC-a neovisno o kojoj se vrsti ko-omotača radi. S druge strane, vrijednosti SPC su rasle s povećanjem udjela pojedinačnog ko-omotača i varirale su od 4,54 mg_{GAE}/g_{s.tv.} (MD5) do 22,15 mg_{GAE}/g_{s.tv.} (T30). Općenito, MD se pokazao kao ko-omotač koji je imao najnižu koncentraciju neinkapsuliranih, tj. površinskih fenolnih spojeva. Zabilježena je statistički značajna razlika u udjelu TPC i SPC kako unutar pojedine skupine ko-omotača tako i općenito između većine MC priređenih s različitim ko-omotačima.

EE ekstrakta tropa grožđa s GW u kombinaciji s četiri različita ko-omotača procijenjena je na temelju izračunatih vrijednosti TPC i SPC. Kada je samo GW korišten kao omotač za inkapsulaciju ekstrakta, EE je dosegla vrijednost 95,47 % (Slika 23).



Slika 23 Efikasnost inkapsulacije (%) za MC koje su dobivene procesom sušenja raspršivanjem s različitim (ko)omotačima. Različita slova (a, b, c...) predstavljaju statistički značajne razlike između uzoraka (ANOVA, *post-hoc* Duncanov test pri $p < 0,05$)

Unutar svake skupine ko-omotača, udio od 10 % ko-omotača postigao je maksimalnu vrijednost EE kada su T, S, MD i X korišteni kao ko-omotači. Unutar skupine MC s dodatkom T kao ko-omotača, nisu postignute statistički značajno različite vrijednosti EE između MC T5, T10, T20 i T30 (svi podaci imaju oznaku 'efg'). Kod skupine sa korištenom S kao ko-omotačem, S30 (77,59 %) se statistički značajno razlikuje od MC s ostalim udjelima S (oznake 'bc', 'de', 'a'). U kombinaciji s MD, najveće vrijednosti EE (91,15 – 92,50 %) postignute su kod MD5 i MD10, no razlike nisu statistički značajne (oznake 'fg' i 'gh'). Općenito, dodavanje MD kao ko-omotača u kombinaciji s GW daje visoke vrijednosti EE, pri čemu EE GW1 (95,47 %) statistički

značajno nadmašuje sve ostale ('h') MC. Različiti udjeli ko-omotača T nisu imali statistički značajan utjecaj na vrijednost EE, dok su kod primjene ostalih ko-omotača uočene manje promjene u EE s obzirom na udio dodanog ko-omotača.

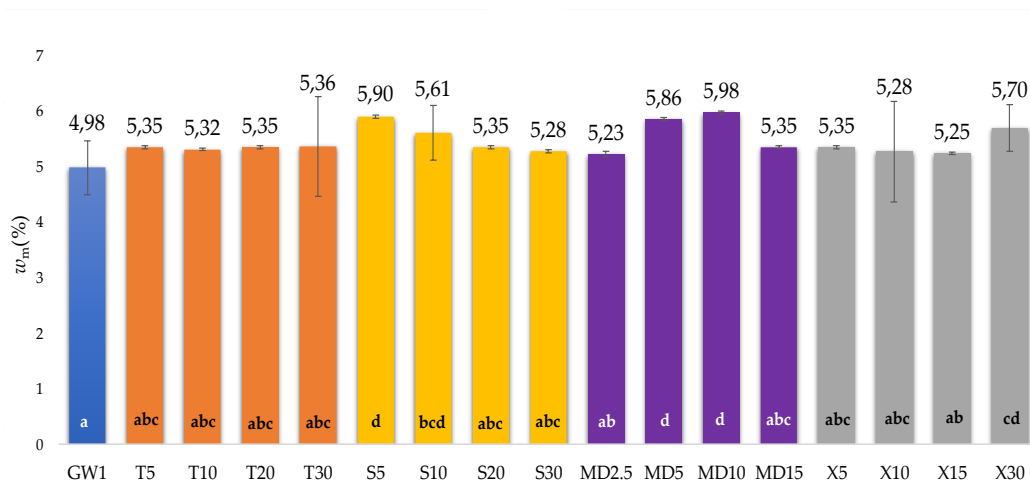
Osim ukupnih i površinskih fenolnih tvari, određeni su i udjeli TFC i UPA te antioksidacijske aktivnosti MC-a za čiju inkapsulaciju je korištena kombinacija omotača i ko-omotača (**Tablica 16**).

Tablica 16 Izmjerene vrijednosti TFC, UPA te antioksidacijske aktivnosti (DPPH, FRAP i ABTS metoda) MC proizvedenih uz dodatak ko-omotača

| Uzorak | TFC (mg _{CE} /g _{s.tv.}) | UPA (mg/g _{s.tv.}) | DPPH (mg _{TROLOKS} /g _{s.tv.}) | FRAP (mg _{TROLOKS} /g _{s.tv.}) | ABTS (mg _{TROLOKS} /g _{s.tv.}) |
|--------------|--|---------------------------------|--|--|--|
| GW1 | 30,88 ± 0,43 ^{jk} | 16,21 ± 0,17 ^h | 40,91 ± 0,40 ^f | 164,43 ± 3,30 ⁱ | 258,78 ± 22,36 ^{efg} |
| T5 | 24,19 ± 0,76 ^{fg} | 11,36 ± 0,24 ^{ef} | 38,49 ± 0,86 ^e | 160,79 ± 4,21 ⁱ | 230,57 ± 9,57 ^d |
| T10 | 30,28 ± 0,21 ^{ij} | 17,19 ± 0,11 ^{hi} | 42,84 ± 0,61 ^g | 181,65 ± 3,43 ^j | 268,19 ± 18,18 ^g |
| T20 | 19,52 ± 0,35 ^b | 11,20 ± 0,20 ^{def} | 33,04 ± 1,20 ^c | 138,14 ± 3,09 ^e | 187,25 ± 10,79 ^b |
| T30 | 25,44 ± 0,11 ^h | 11,66 ± 0,20 ^f | 33,04 ± 1,00 ^c | 160,47 ± 4,78 ^{hi} | 226,58 ± 7,19 ^d |
| S5 | 22,11 ± 0,36 ^{cd} | 10,46 ± 0,21 ^c | 30,93 ± 0,69 ^b | 123,07 ± 4,92 ^d | 192,93 ± 14,42 ^{bc} |
| S10 | 29,85 ± 0,45 ⁱ | 15,96 ± 0,25 ^h | 40,68 ± 0,63 ^f | 152,45 ± 4,10 ^g | 239,13 ± 14,74 ^{def} |
| S20 | 23,32 ± 0,66 ^e | 9,64 ± 0,21 ^b | 35,63 ± 0,95 ^d | 153,75 ± 4,89 ^g | 231,44 ± 8,73 ^d |
| S30 | 25,49 ± 0,40 ^h | 11,35 ± 0,15 ^{ef} | 35,98 ± 0,57 ^d | 145,92 ± 2,59 ^f | 262,82 ± 18,76 ^{fg} |
| MD2.5 | 21,57 ± 0,28 ^c | 11,06 ± 0,32 ^{de} | 32,84 ± 0,48 ^c | 114,14 ± 5,35 ^{bc} | 179,43 ± 11,85 ^b |
| MD5 | 31,59 ± 0,30 ^k | 15,24 ± 0,16 ^g | 43,02 ± 0,67 ^{gh} | 148,55 ± 3,16 ^{fg} | 234,56 ± 15,26 ^{de} |
| MD10 | 22,48 ± 0,40 ^d | 10,72 ± 0,15 ^{cd} | 35,14 ± 0,65 ^d | 133,02 ± 3,12 ^e | 217,37 ± 18,87 ^{cd} |
| MD15 | 24,84 ± 0,76 ^{gh} | 10,90 ± 0,44 ^{cde} | 29,08 ± 0,97 ^a | 99,19 ± 3,50 ^a | 150,55 ± 10,48 ^a |
| X5 | 18,81 ± 0,64 ^b | 10,84 ± 0,12 ^{cde} | 28,92 ± 0,46 ^a | 108,45 ± 2,64 ^b | 152,67 ± 10,22 ^a |
| X10 | 34,55 ± 0,48 ^l | 16,99 ± 0,13 ⁱ | 44,31 ± 0,57 ^h | 209,70 ± 1,07 ^k | 309,31 ± 22,10 ^h |
| X15 | 17,46 ± 0,43 ^a | 8,83 ± 0,24 ^a | 32,39 ± 0,46 ^{bc} | 115,19 ± 2,83 ^c | 182,31 ± 14,92 ^b |
| X30 | 23,75 ± 0,34 ^{ef} | 11,27 ± 0,14 ^{def} | 35,57 ± 0,75 ^d | 153,98 ± 3,63 ^{gh} | 237,16 ± 15,59 ^{de} |

Svi podaci izraženi su na suhu tvar mikrokapsula, kao srednja vrijednost ± SD. Različita slova (a, b, c...) predstavljaju statistički značajne razlike između vrijednosti prikazanih u istom stupcu (ANOVA, *post-hoc* Duncanov test pri $p < 0,05$).

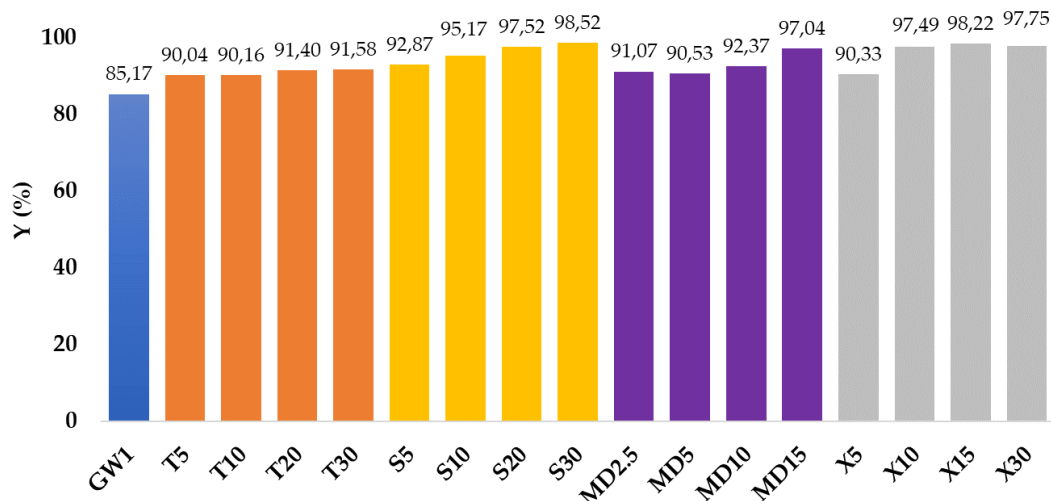
Kao što je vidljivo iz **Tablice 16**, uzorak X15 sadržava najmanji udio TFC (17,46 mg_{CE}/g_{s.tv.}) i UPA (8,83 mg/g_{s.tv.}). Općenito, udio TFC u mikrokapsulama se kretao u rasponu od 17,46 mg_{CE}/g_{s.tv.} do 34,55 mg_{CE}/g_{s.tv.}, a koncentracija UPA u rasponu od 8,83 mg/g_{s.tv.} do 16,99 mg/g_{s.tv.}. Najniže vrijednosti antioksidacijske aktivnosti zabilježene su kod uzoraka MD15 i X5. Unutar svih skupina ko-omotača najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti izmjerene DPPH i FRAP metodom ostvarene su dodatkom 10 % T, S ili X te 5 % MD.



Slika 24 Udio vlage (%) za MC koje su dobivene procesom sušenja raspršivanjem s različitim (ko)omotačima. Različita slova (a, b, c...) predstavljaju statistički značajne razlike između uzoraka (ANOVA, *post-hoc* Duncanov test pri $p < 0,05$)

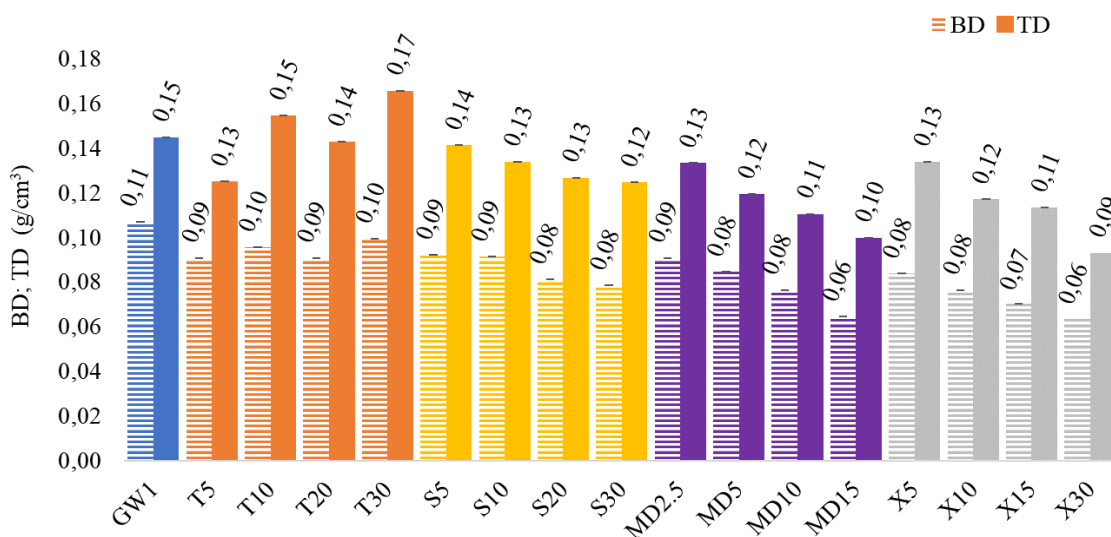
Udio vlage u proizvedenim MC (**Slika 24**) varirao od 4,98 % (GW1) do 5,98 % (MD10) i vizualnim pregledom praha nije primijećeno stvaranje aglomerata. Smanjenje ukupnog udjela GW i dodavanje ko-omotača rezultiralo je povećanjem vlage u svim uzorcima MC. Nizak udio vlage, u iznosu od 3 – 4 %, također su utvrdili autori Navarro-Flores i sur. (2020), koji to pripisuju visokoj ulaznoj temperaturi sušenja koja je pridonijela većoj stopi prijenosa topline na česticu uzrokujući brz proces isparavanja vode. Smatra se da je razina vlage manja od 10 % dovoljna kako bi se osigurala mikrobiološka stabilnost proizvedenih voćnih MC (Wong i Lim, 2016).

Prinos procesa mikroinkapsulacije (Y) se iz pogleda proizvođača može promatrati kao ekonomičnost procesa. U postupcima inkapsulacije, Y se može okarakterizirati kao krajnji rezultat fizikalnih i kemijskih svojstava proizvedenih MC. Uz pomoć izračunatih Y vrijednosti, moguće je usporediti različite procese inkapsulacije (Baysan i sur., 2021). Prema Tontul i Topuz, (2017), svako laboratorijsko sušenje raspršivanjem s Y većim od 50 % može se okarakterizirati kao uspješno. Y je za sve inkapsulacije u ovom eksperimentu (**Slika 25**) bio visok (> 85,17 %). Visoki Y pripisujemo upotrebi proteina GW kao glavnog omotača, koji je poboljšao svojstva MC i održao ljepljivost raspršenih čestica na minimumu. Unutar skupina MC s ko-omotačima uglavnom s porastom udjela ko-omotača raste i Y.



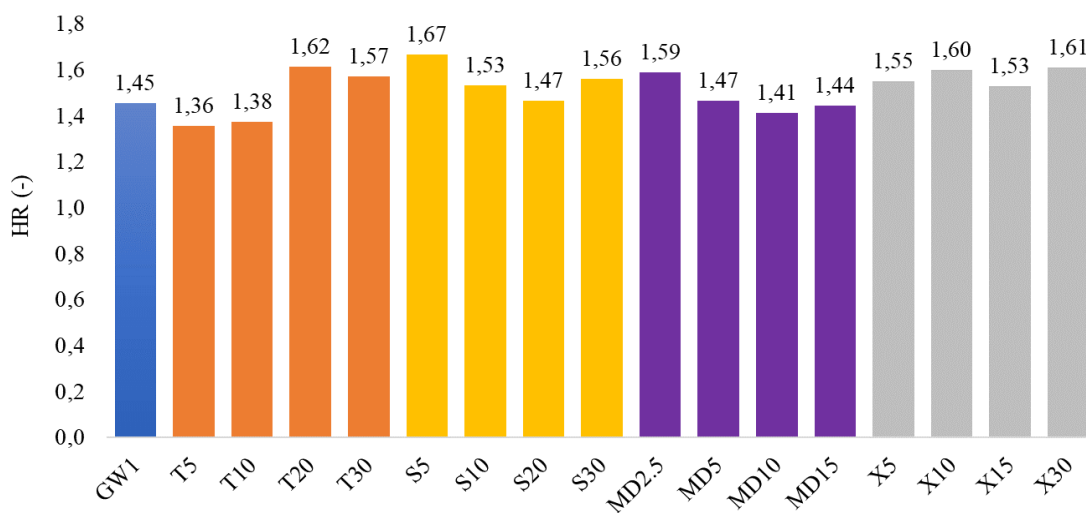
Slika 25 Prinos inkapsulacije (Y, %) za MC koje su dobivene procesom sušenja raspršivanjem s različitim (ko)omotačima

Visoka vrijednost BD prahova povoljna je za smanjenje troškova transporta i pakiranja (Tontul i Topuz, 2017). Niže vrijednosti BD su nepoželjne jer zahtijevaju više prostora u spremniku. Nadalje, kako se BD smanjuje, više zraka ostaje zarobljeno unutar sloja MC i veća je vjerojatnost da će proizvod oksidirati, što će rezultirati smanjenom stabilnošću pri skladištenju (Kurozawa i sur., 2009). Na **Slici 26** prikazana su svojstva gustoće MC prije (BD) i nakon potresanja (TD). Svi pokusi pokazali su niske vrijednosti gustoće, što prema Braga i sur. (2018), može biti posljedica visoke ulazne temperature zraka za sušenje. Unutar skupina S, X i MD, vrijednost gustoće BD i TD opadaju s povećanjem udjela dodanog ko-omotača.

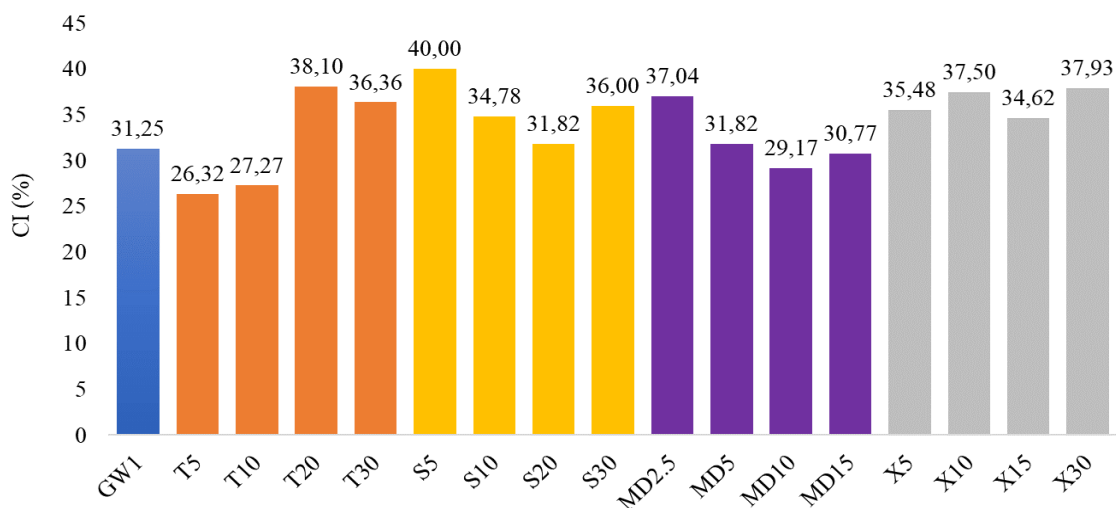


Slika 26 BD i TD (g/cm³) za MC koje su dobivene procesom sušenja raspršivanjem s različitim (ko)omotačima

Prema klasifikaciji Europske Pharmacopoeia-e (*European pharmacopoeia*, 2010) i izračunatim vrijednostima za Hausnerov omjer – HR (**Slika 27**) i Carr indeks - CI (**Slika 28**), tecivost MC se može okarakterizirati kao loša za uzorke MD5, X30 i GW1. Svi ostali uzorci imaju vrlo lošu ili vrlo vrlo lošu tecivost. Loša tecivost svih proizvedenih MC može se pripisati velikom udjelu proteina sirutke, koji u svom sastavu imaju značajan udio masti te su zbog toga slabo tecivi. Veličina MC također ima utjecaj na tecivost MC. Kako se veličina čestica smanjuje, specifična površina se povećava, što smanjuje tecivost uzorka jer veća dostupna kontaktna površina između čestica povećava kohezijske sile i otpor trenju tijekom protoka. Osim toga, smanjena tecivost MC-a može biti uzrokovana i povećanjem vlažnosti, jer to rezultira povećanjem učinka kapilarnih sila između čestica MC (Kim i sur., 2005). Nadalje, prema Tontul i Topuz (2017), površina čestica utječe na gustoću MC prije potresanja, tj. što su čestice glađe površine i jednoličnije, to je veća vrijednost izmjerene BD.

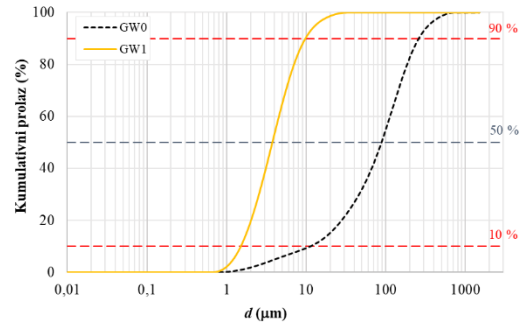
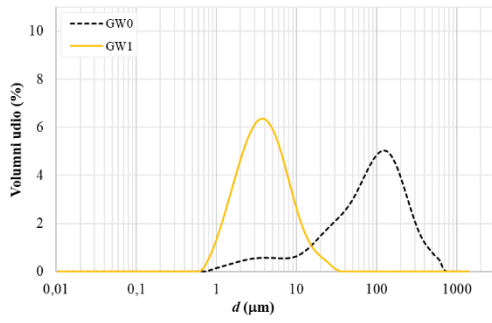


Slika 27 Hausnerov indeks (HR) za MC koje su dobivene procesom sušenja raspršivanjem s različitim (ko)omotačima

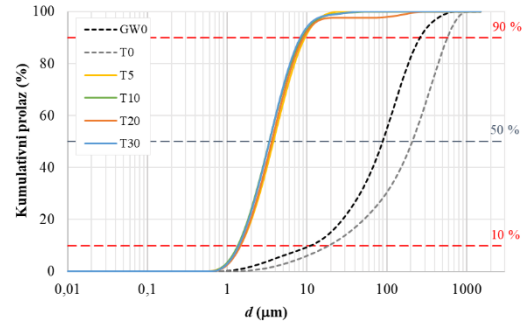
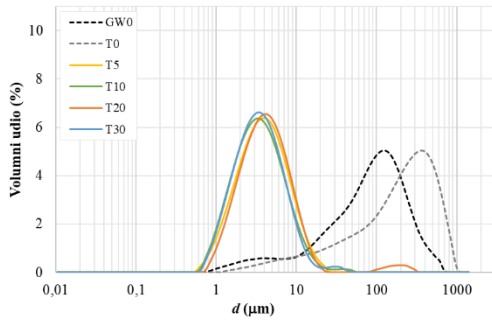


Slika 28 Carr indeks (CI) za MC koje su dobivene procesom sušenja raspršivanjem s različitim (ko)omotačima

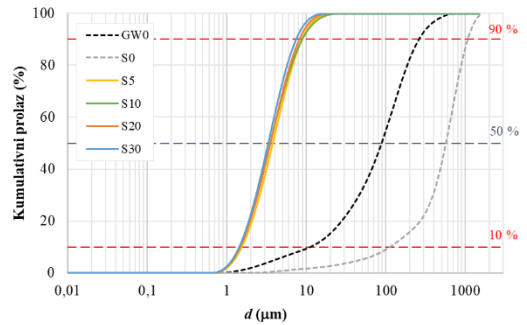
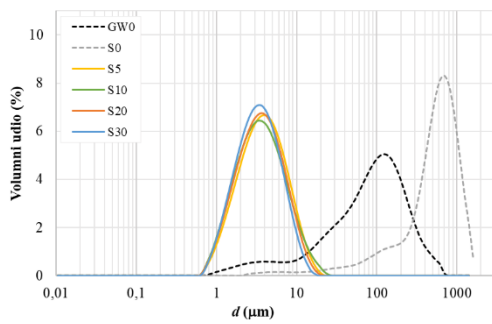
Veličina, oblik i raspodjela čestica igraju ključnu ulogu u daljnjem korištenju mikrokapsula, njihovom pakiranju, transportu i vijeku trajanja inkapsuliranih čestica. Mikrostruktura čestica značajno utječe na različita kvalitativna svojstva mikrokapsula, poput stabilnosti, protočnosti i sposobnosti očuvanja aktivnih sastojaka. Tehnika i parametri sušenja imaju značajan utjecaj na veličinu, oblik i distribuciju čestica (Aziz i sur., 2018). Na **Slici 29** prikazani su dijagrami raspodjele veličine (diferencijalne i integralne krivulje) svih čestica (MC) te omotača i ko-omotača.



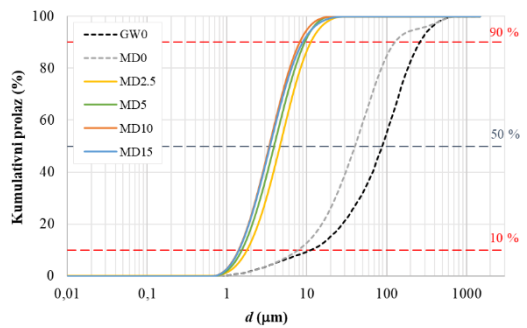
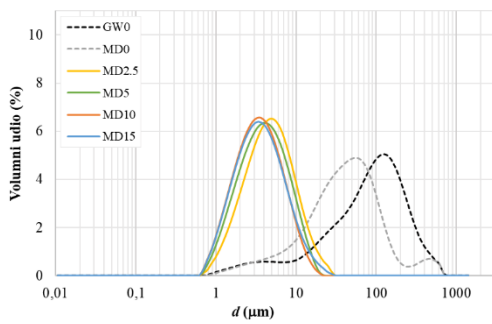
(a)



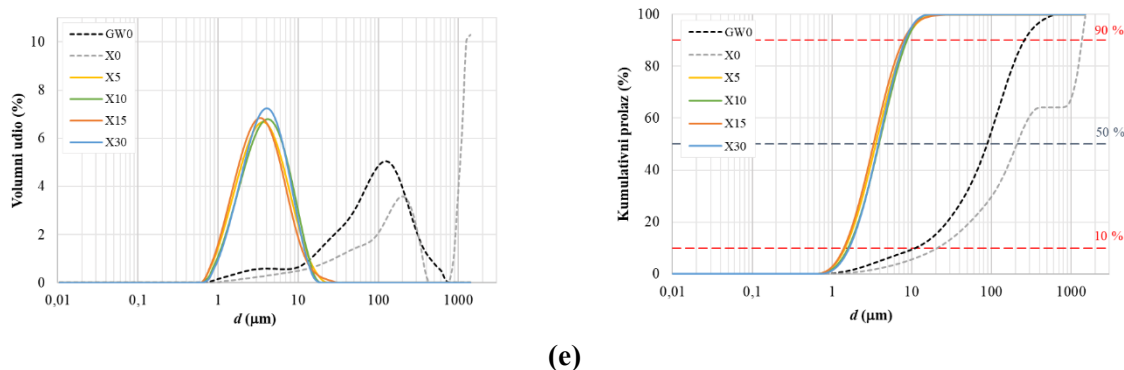
(b)



(c)



(d)



Slika 29 Diferencijalne i integralne krivulje raspodjele veličine čestica: **(a)** proteini kozje sirutke (GW0) i MC s GW omotačem (GW1); **(b)** trehaloza (T0) i MC uz primjenu omotača (GW0) i ko-omotača T (T5 – T30); **(c)** saharoza (S0) i MC uz primjenu omotača (GW0) i ko-omotača S (S5 – S30); **(d)** maltodekstrin (MD0) i MC uz primjenu omotača (GW0) i ko-omotača MD (MD2.5 – MD15); **(e)** ksiloza (X) i MC uz primjenu omotača (GW0) i ko-omotača X (X5 – X30)

Rezultati raspodjele veličine čestica se osim srednjim promjerima, mogu prikazati koristeći funkcije raspodjele. To su diferencijalna krivulja te kumulativna krivulja prolaza ili ostatka. Kumulativni udio predstavlja postotak čestica unutar raspodjele koje su ili veće (funkcija ostatka) ili manje (funkcija prolaza) od neke određene vrijednosti. Diferencijalna krivulja prikazuje udio uzorka određene veličine unutar svake skupine izražen u postotku (Posavec, 2017). Kao što je vidljivo sa **Slike 29a–e** sve čestice proizvedenih MC, neovisno o kojem se ko-omotaču i/ili njegovom udjelu radi, imaju srednji promjer manji od 5 μm . Jednako tako srednji promjer manji od 5 μm je zabilježen i kod GW1 MC napravljenih bez dodatka ko-omotača. 50 % čestica čistog omotača je manje od 100 μm . Prosječni promjer veličine čestica čistih ko-omotača (X0, S0, T0) je veći u usporedbi s prosječnim promjerom veličine čestica GW. Jedino su se čestice MD pokazale manjima u usporedbi sa GW. Sve čestice proizvedenih MC pokazuju unimodalnu raspodjelu veličine (**Slika 29**). Za razliku od ovih rezultata, autori Zotarelli i sur. (2017) prijavljuju bimodalnu raspodjelu veličine čestica uzoraka dobivenih sušenjem raspršivanjem. Na temelju udjela određenih veličina čestica izračunat je srednji promjer čestica prikazan u **Tablici 17**.

Prema **Tablici 17** vidljivo je da je prosječna veličina čestica proizvedenih MC varirala od 3,31 μm (S30) do 4,61 μm (MD2.5). Međutim, unutar skupine MD uočeno je da se povećanjem koncentracije dodanog MD-a s 2,5 % na 10 % smanjuje veličina čestica. Slično smanjenje veličine čestica primijećeno je i unutar skupina drugih ko-omotača, no to nije bilo toliko pravilno i dosljedno kao u skupini MC s MD.

Tablica 17 Polarnost, prosječni promjer, specifična površina i širina raspodjele uzoraka MC

| Uzorak | Polarnost (%) | $d(0.5)$ (μm) | Specifična površina (m^2/g) | Širina raspodjele (-) |
|--------------|------------------|----------------------------|---|-----------------------|
| GW1 | 46,47 \pm 0,32 | 3,76 | 2,00 | 2,20 |
| T5 | 43,93 \pm 2,71 | 3,78 | 2,04 | 2,09 |
| T10 | 45,99 \pm 0,89 | 3,36 | 2,22 | 2,18 |
| T20 | 44,80 \pm 1,23 | 3,61 | 2,07 | 2,08 |
| T30 | 44,78 \pm 1,17 | 3,38 | 2,19 | 2,03 |
| S5 | 40,06 \pm 1,19 | 3,76 | 2,01 | 1,93 |
| S10 | 44,01 \pm 0,36 | 3,50 | 2,13 | 2,12 |
| S20 | 48,39 \pm 1,25 | 3,51 | 2,12 | 1,90 |
| S30 | 48,25 \pm 0,93 | 3,31 | 2,21 | 1,80 |
| MD2.5 | 36,46 \pm 1,74 | 4,61 | 1,68 | 2,05 |
| MD5 | 47,82 \pm 1,62 | 3,88 | 1,97 | 2,02 |
| MD10 | 41,50 \pm 1,72 | 3,37 | 2,21 | 1,99 |
| MD15 | 41,24 \pm 0,28 | 3,45 | 2,16 | 2,16 |
| X5 | 40,65 \pm 0,18 | 3,53 | 2,11 | 1,97 |
| X10 | 43,85 \pm 0,51 | 3,88 | 1,94 | 1,84 |
| X15 | 43,42 \pm 0,63 | 3,32 | 2,21 | 1,94 |
| X30 | 47,42 \pm 2,36 | 3,81 | 1,93 | 1,73 |

Vrijednosti polarnosti su izražene kao srednja vrijednost \pm SD.

Prema Medina-Torres i sur. (2013), čestica se kvalificira kao “fina” (engl. *fine particle*) ako joj je prosječni promjer manji od 5 μm . U skladu s tim, svaka kombinacija omotača koja je korištena u eksperimentalnom dijelu ovog doktorata, rezultira “finim” prahom. Nakon usporedbe dobivenih rezultata s rezultatima drugih autora, izveden je zaključak da su čestice proizvedenih MC tijekom ovih eksperimenata, ujednačenije i manje od čestica raznih drugih MC nastalih sušenjem raspršivanjem ekstrakata voća. Prosječna veličina čestica praha dobivenog sušenjem raspršivanjem filtrirane pulpe ploda palme *Euterpe oleracea* Mart. (*açaí*) uz dodatak različitih omotača kretala se od 9,33 μm do 13,67 μm (Tonon i sur., 2009), dok je veličina čestica praha dobivenog liofilizacijom pulpe zrelog ploda manga bila 88,879 μm (Ong i sur., 2014). Tijekom proizvodnje čestica izolata proteina sirutke s trehalozom kao stabilizatorom, veličina čestica varirala je od 100 do 1000 nm (Haque i sur., 2015). Bez obzira na to, mala veličina čestica proizvedenih uzoraka MC tijekom eksperimentalnog dijela ovog doktorskog rada, u skladu je s tvrdnjama Verruck i sur. (2019) te Čujić Nikolić i sur. (2018). Širina raspodjele (engl. *span*) je parametar koji označava ujednačenost uzorka. Iz **Tablice 17** vidljivo je da je uzorak GW1 imao najveću vrijednost širine raspodjele (2,20), što znači da je

najmanje homogen uzorak. Kao rezultat toga, također je imao najveću vrijednost BD u iznosu od $0,11 \text{ g/cm}^3$. Uzorak X30 bio je najhomogeniji uzorak, odnosno uzorak s najmanjom vrijednošću širine raspodjele od 1,73. Općenito, cijela skupina uzoraka s X ima najmanje vrijednosti širine raspodjele u iznosu od 1,73 – 1,97.

Na temelju vrijednosti kontaktnog kuta vode i dijodometana izračunata je polarnost uzoraka (Tablica 17) koja se kretala od 36,46 % (MD2.5) do 48,39 % (S20). Iz toga se može zaključiti da su sve proizvedene MC hidrofilne, što ukazuje na njihovu dobru topljivost u vodi. Prema Chang i sur. (2014), brojni biljni ekstrakti osušeni raspršivanjem sadrže značajnu količinu hidrofilnih tvari uključenih u njihov sastav, što ih čini higroskopnima.

U Tablici 18 prikazane su prosječne vrijednosti duljine, širine i okruglosti čestica MC određene optičkim LEICA mikroskopom. Usporedbom s prosječnom veličinom čestica prikazanom u Tablici 17, rezultati dobiveni ovom analizom pokazuju veće vrijednosti veličine čestica. Zbog veće subjektivnosti i manjka selektivnosti ove metode može se zaključiti da su LEICA mikroskopom izmjerene prosječne veličine aglomerata MC. Najveći aglomerati su zabilježeni u uzorcima s dodatkom MD gdje je prosječna duljina čestica varirala od 9,87 do 12,14 μm . Za razliku od MC s dodatkom MD, u MC napravljenim s dodatkom X determinirana je najmanja prosječna duljina čestica u iznosu od 7,77 do 11,74 μm . Jednako je primjenjivo i na širinu, okruglost, perimetar i konveksni perimetar proizvedenih MC. Uzorak X15 se može posebno izdvojiti jer generalno gledano pokazuje najmanje izmjerene vrijednosti duljine (7,77 μm), širine (5,47 μm), okruglosti (1,95) te perimetra (26,40 μm) i konveksnog perimetra (21,17 μm).

Tablica 18 Prosječne vrijednosti duljine, širine i okruglosti MC izmjerene optičkim mikroskopom

| Uzorak | Duljina (μm) | Širina (μm) | Okruglost (–) | Perimetar (μm) | Konveksni perimeter (μm) |
|--------------|------------------------------|-----------------------------|------------------|--------------------------------|---|
| GW1 | 11,40 ± 9,00 | 8,18 ± 6,83 | 2,17 ± 0,81 | 41,70 ± 39,19 | 31,18 ± 25,26 |
| T5 | 9,83 ± 5,91 | 6,56 ± 3,69 | 2,23 ± 0,86 | 34,56 ± 23,11 | 26,25 ± 15,25 |
| T10 | 11,87 ± 7,95 | 8,20 ± 5,23 | 2,10 ± 0,54 | 41,71 ± 29,28 | 32,02 ± 21,08 |
| T20 | 8,15 ± 5,58 | 5,64 ± 3,60 | 1,85 ± 0,63 | 27,59 ± 21,07 | 22,03 ± 14,97 |
| T30 | 9,05 ± 5,40 | 6,17 ± 3,57 | 2,02 ± 1,27 | 31,05 ± 23,16 | 24,31 ± 14,32 |
| S5 | 9,15 ± 6,52 | 6,42 ± 4,87 | 2,26 ± 0,81 | 33,53 ± 27,50 | 24,81 ± 17,94 |
| S10 | 12,34 ± 8,32 | 8,43 ± 5,36 | 2,49 ± 1,24 | 46,26 ± 36,37 | 33,21 ± 21,65 |
| S20 | 10,58 ± 6,00 | 7,07 ± 3,46 | 2,33 ± 0,86 | 37,47 ± 22,57 | 28,28 ± 15,12 |
| S30 | 11,24 ± 6,55 | 7,38 ± 3,53 | 2,43 ± 0,97 | 40,36 ± 25,01 | 29,87 ± 16,18 |
| MD2.5 | 12,03 ± 8,56 | 8,68 ± 5,95 | 2,24 ± 1,01 | 43,48 ± 33,65 | 33,04 ± 23,00 |
| MD5 | 12,10 ± 8,30 | 8,35 ± 5,78 | 2,59 ± 1,10 | 46,35 ± 36,14 | 32,83 ± 22,38 |
| MD10 | 12,14 ± 8,24 | 8,38 ± 5,12 | 2,38 ± 0,93 | 44,44 ± 32,56 | 32,78 ± 21,47 |

| Uzorak | Duljina (μm) | Širina (μm) | Okruglost (-) | Perimetar (μm) | Konveksni perimetar (μm) |
|-------------|------------------------------|-----------------------------|------------------|--------------------------------|---|
| MD15 | 9,87 \pm 6,61 | 6,76 \pm 4,59 | 2,29 \pm 0,87 | 36,03 \pm 28,08 | 26,67 \pm 17,86 |
| X5 | 9,34 \pm 6,84 | 6,53 \pm 4,54 | 2,25 \pm 0,73 | 33,94 \pm 27,51 | 25,24 \pm 18,06 |
| X10 | 11,74 \pm 8,87 | 7,85 \pm 5,58 | 2,71 \pm 1,27 | 45,52 \pm 47,12 | 31,47 \pm 23,28 |
| X15 | 7,77 \pm 2,89 | 5,47 \pm 2,01 | 1,95 \pm 0,62 | 26,40 \pm 10,85 | 21,17 \pm 7,67 |
| X30 | 9,99 \pm 5,31 | 7,14 \pm 3,98 | 2,14 \pm 0,66 | 35,18 \pm 20,17 | 27,34 \pm 14,80 |

Vrijednosti rezultata su izražene kao srednja vrijednost \pm SD.

Prema podacima iz **Tablice 19**, ukupne promjene boje (ΔE_{ab}) u odnosu na GW varirale su od 23,70 do 28,62, što je ljudskom oku bilo vrlo vidljivo. Sve proizvedene MC su bile svijetlo ružičaste boje. U radu autora Belščak-Cvitanović i sur. (2015), tijekom sušenja raspršivanjem zelenog čaja uz korištenje različitih omotača, pri korištenju proteina sirutke ukupna promjena boje iznosila je 3,3, odnosno 12,74 uz korištenje proteina graška.

Tablica 19 Ukupna promjena boje (ΔE_{ab}) i svojstva topljivosti (WSI, WAI, SP) MC s ko-omotačem

| Uzorak | ΔE_{ab} (-) | WSI (%) | WAI (-) | SP (-) |
|--------------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| GW1 | 23,73 \pm 0,13 ^{ab} | 57,47 \pm 0,54 ^f | 4,37 \pm 0,01 ^{ab} | 10,28 \pm 0,10 ^{fghi} |
| T5 | 24,58 \pm 1,34 ^{abc} | 51,40 \pm 0,97 ^{cd} | 4,82 \pm 0,24 ^{efg} | 9,92 \pm 0,28 ^{defg} |
| T10 | 25,65 \pm 1,36 ^{cd} | 55,25 \pm 0,26 ^e | 4,68 \pm 0,01 ^{cde} | 10,45 \pm 0,03 ^{ghi} |
| T20 | 27,60 \pm 0,59 ^{ef} | 56,46 \pm 0,69 ^{ef} | 4,67 \pm 0,13 ^{cde} | 10,74 \pm 0,14 ^{hi} |
| T30 | 26,04 \pm 1,22 ^{cde} | 55,63 \pm 0,22 ^e | 4,24 \pm 0,07 ^a | 9,56 \pm 0,10 ^{cdef} |
| S5 | 25,39 \pm 0,46 ^{bcd} | 50,78 \pm 0,80 ^{bcd} | 4,64 \pm 0,37 ^{bcd} | 9,44 \pm 0,90 ^{bcd} |
| S10 | 25,40 \pm 1,15 ^{cd} | 50,83 \pm 1,46 ^{bcd} | 4,96 \pm 0,44 ^{fgh} | 10,07 \pm 0,59 ^{efgh} |
| S20 | 26,39 \pm 0,25 ^{de} | 49,55 \pm 1,36 ^b | 4,62 \pm 0,01 ^{bcd} | 9,15 \pm 0,23 ^{bc} |
| S30 | 25,99 \pm 0,41 ^{cde} | 57,68 \pm 2,48 ^f | 4,57 \pm 0,13 ^{bcd} | 10,80 \pm 0,33 ⁱ |
| MD2.5 | 25,94 \pm 1,22 ^{cd} | 49,63 \pm 2,21 ^{bc} | 4,41 \pm 0,04 ^{abc} | 8,77 \pm 0,46 ^{ab} |
| MD5 | 28,62 \pm 0,91 ^f | 51,17 \pm 1,86 ^{bcd} | 4,70 \pm 0,04 ^{def} | 9,64 \pm 0,46 ^{cdef} |
| MD10 | 26,46 \pm 0,63 ^{de} | 50,79 \pm 0,15 ^{bcd} | 4,55 \pm 0,12 ^{bcd} | 9,25 \pm 0,28 ^{bcd} |
| MD15 | 25,67 \pm 1,13 ^{cd} | 43,91 \pm 0,21 ^a | 4,55 \pm 0,04 ^{bcd} | 8,11 \pm 0,04 ^a |
| X5 | 26,16 \pm 0,85 ^{cde} | 51,80 \pm 0,19 ^d | 5,18 \pm 0,63 ^h | 10,75 \pm 1,27 ^{hi} |
| X10 | 25,09 \pm 1,19 ^{abcd} | 62,62 \pm 4,20 ^g | 5,08 \pm 0,00 ^{gh} | 13,68 \pm 1,52 ^k |
| X15 | 23,70 \pm 1,11 ^a | 62,59 \pm 0,40 ^g | 4,60 \pm 0,13 ^{bcd} | 12,31 \pm 0,49 ^j |
| X30 | 26,44 \pm 0,80 ^{de} | 63,15 \pm 0,07 ^g | 5,13 \pm 0,22 ^h | 13,93 \pm 0,58 ^k |

Svi podaci su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD. Različita slova (a, b, c) predstavljaju statistički značajne razlike između vrijednosti prikazanih u istom stupcu (ANOVA, *post-hoc* Duncanov test pri $p < 0,05$)

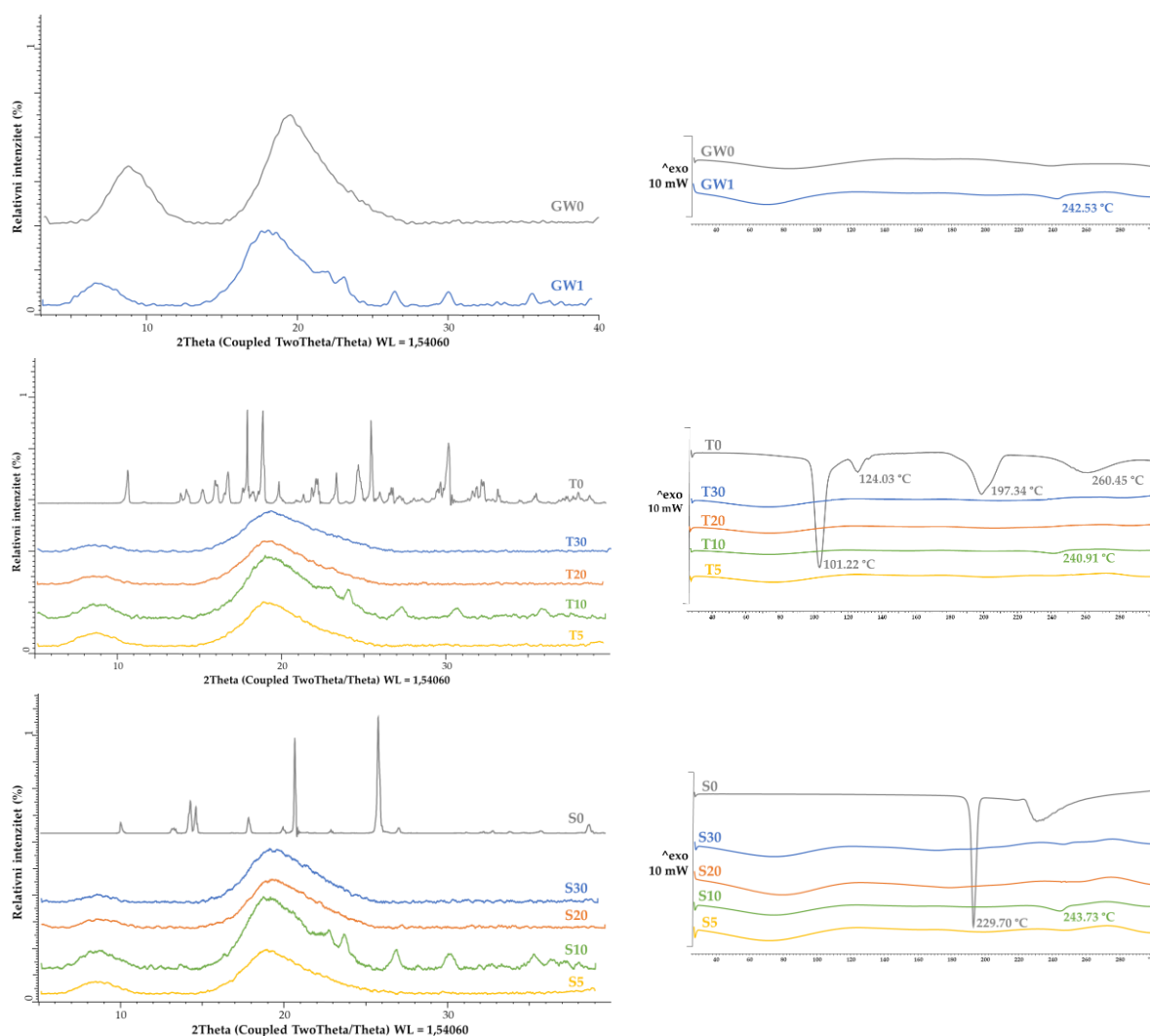
Parametri topljivosti - indeks topljivosti (WSI), indeks adsorpcije vode (WAI) i sposobnost bubrenja (SP) važni su pokazatelji funkcionalnih svojstava proizvoda i važni su za procjenu

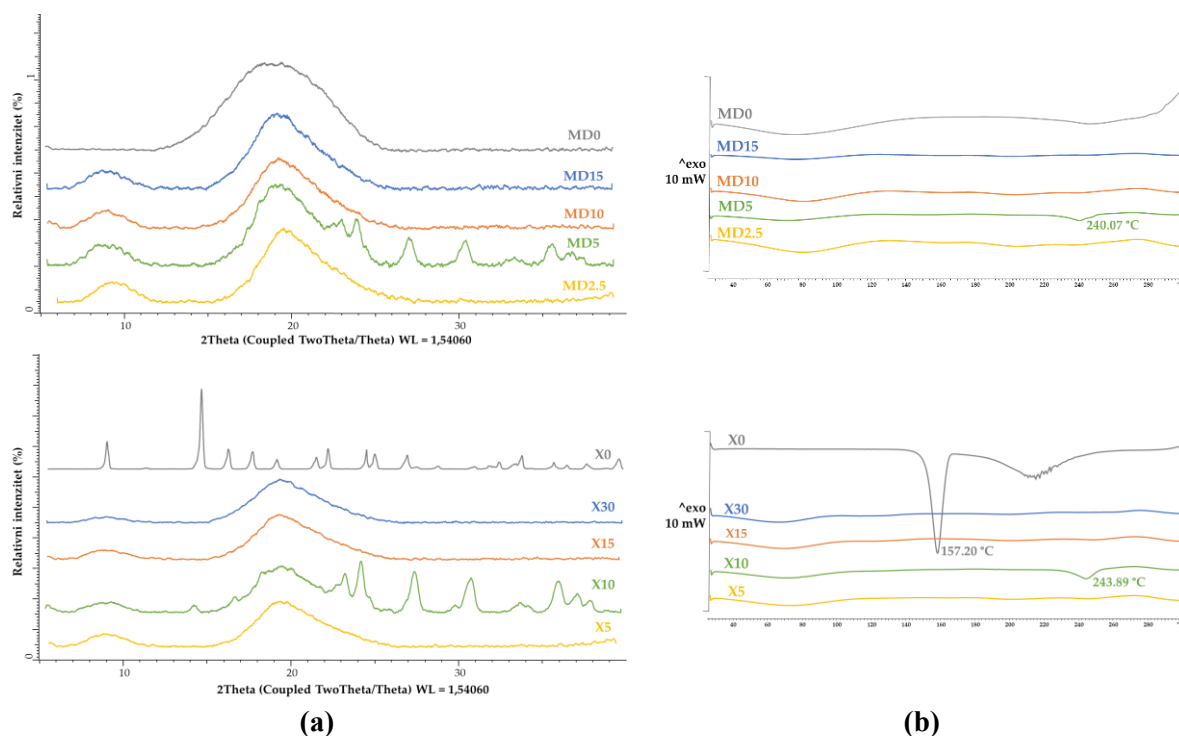
njihove stabilnosti, primjenu u formulacijama i ponašanje tijekom skladištenja MC. WSI predstavlja sposobnost MC da se otopi u vodi. Poželjnost veće vrijednosti WSI ovisi o konačnoj primjeni MC. Ako se MC namjeravaju koristiti u prehrambenoj ili farmaceutskoj industriji, visoki WSI je posebno važan kako bi se MC lako ugradile i ravnomjerno rasporedile unutar finalnog proizvoda. Vrijednosti WAI povezane su sa stupnjem želatinizacije i mikrobnom stabilnošću. Što su veće vrijednosti WAI, to je veća mogućnost mikrobiološke nestabilnosti MC (Siacor i sur., 2020). MC s ksilozom kao ko-omotačem su pokazale najveću vrijednost WSI. Unutar te skupine vrijednosti WSI su varirale od 51,80 do 63,15 %. Osim toga, MC iz te skupine pokazuju najviše vrijednosti WAI (4,60 – 5,18) kao i najviše SP vrijednosti (10,75 – 13,93). Za razliku od X, korištenje MD kao ko-omotača je rezultiralo MC s najnižim vrijednostima WSI i SP. Unutar te skupine, WSI je bio u rasponu od 43,91 do 51,17 %, a SP u rasponu od 8,11 do 9,64. Razlog tome može biti umrežavanje MD s drugim spojevima, što rezultira nižim vrijednostima topljivosti i sposobnosti bubrenja u usporedbi s drugim uzorcima. Tijekom inkapsuliranja sušenjem raspršivanjem fenolnog ekstrakta manga dobivene su MC s nižim vrijednostima WSI (8,62 % do 24,28 %) i WAI (2,58 % do 3,91 %) (Siacor i sur., 2020) u usporedbi sa rezultatima prikazanim u **Tablici 19**. Za razliku od njih, Sidlagatta i sur. (2020) izvještava o WSI vrijednosti od 77,9 do 89,8 % kao i WAI vrijednostima od 6,7 do 12,3 % za MC slatke naranče nastale sušenjem raspršivanjem.

Analize rendgenske difrakcije praha (XRPD) i diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC) su korištene za ispitivanje kristalnosti i amorfности uzoraka MC. XRPD krivulje analiziranih MC te omotača i ko-omotača prikazane su na **Slici 30**. Kao što navode brojni autori (Chiou i Langrish, 2007; R. Li i sur., 2019; Nežić i sur., 2019; Niazi i Broekhuis, 2012), sušenjem raspršivanjem se proizvode uglavnom amorfne MC. **Slika 30** pokazuje da ko-omotači S (S0), T (T0) i X (X0) imaju kristalnu strukturu. MC koje sadrže 10 % S (S10), X(X10), T (T10), 5 % MD (MD5) i MC koje sadrže samo GW (GW1) imaju djelomično kristalnu strukturu, dok sve ostale MC prema rezultatima XRPD analize imaju amorfnu strukturu. Sušenje voćnih sokova raspršivanjem, prema Cano-Chauca i sur. (2005), rezultira MC s visokim udjelom šećera prisutnih u amorfnom stanju zbog korištenog procesa sušenja. Budući da su ti šećeri iznimno higroskopni, mogu se kristalizirati apsorbirajući samo malu količinu vode. Budući da uređeni sustav kristalne strukture promiče stabilnost proizvoda, ova vrsta strukture u konačnim proizvodima je stalno tražena. Istražujući učinke različitih uvjeta na vodom induciranu kristalizaciju na različitim amorfnim materijalima dobivenim sušenjem raspršivanjem, autori Chiou i Langrish (2007) su došli do sličnih zaključaka. Potvrdili su da je proizvodima potrebno

dulje vrijeme za kristalizaciju kada su njihova molekularna težina i temperatura staklenog prijelaza veće. Budući da je ekstrakt tropa grožđa također bogat brojnim šećerima, moguće je da je upravo adsorpcija vode razlog djelomično kristalne strukture spomenutih uzoraka MC. Za razliku od ovog istraživanja, autori Haque i sur. (2015) navode da dodavanje šećera nije izazvalo pojavu pikova na rendgenskim difraktogramima, pa su strukture MC tog istraživanja okarakterizirane kao amorfne. Za razliku od tih uzoraka, dodatak celuloze ili *waxy* škroba u kombinaciji s MD uzrokovao je djelomično kristalnu strukturu MC sojinog umaka (Wang i Zhou, 2015).

Rezultati DSC analize su također ilustrirani su na **Slici 30**.





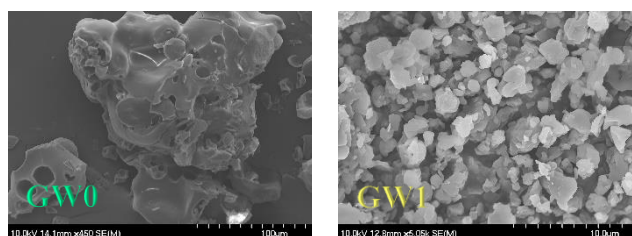
Slika 30 Kristalnost i amorfnost MC uzoraka s različitim omotačima/ko-omotačima: **(a)** difraktogrami X-zraka praša i **(b)** DSC termogrami

Termogrami uzoraka MD5, S10, T10, X10 i GW1 pokazuju endotermne pikove na temperaturi od oko 240 °C, što potvrđuje djelomično kristalnu strukturu dokazanu XRPD analizom. Također je iz svih DSC krivulja vidljivo da se pri temperaturi oko 80 °C pojavljuju endotermni blago široki pikovi, koji ukazuju na gubitak vode. Mimo navedenih pikova, u uzorcima S0, X0 i T0 su vidljivi i drugi endotermni pikovi koji ukazuju na njihova tališta.

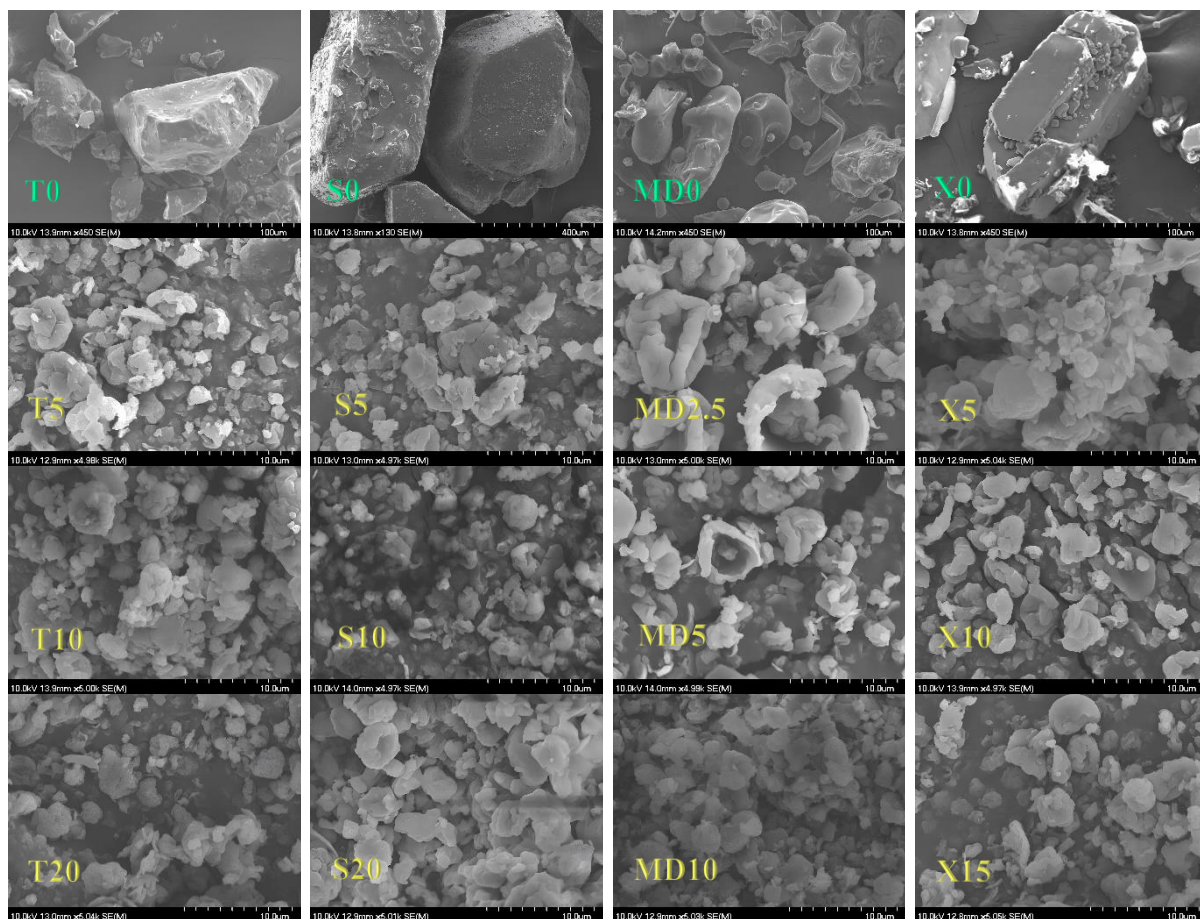
Na svim SEM fotografijama prikazanim na **Slici 31** vidljivo je da kombinacija GW s ko-omotačima stvara MC čije su čestice različitih nepravilnih oblika i veličina, a neke od njih su u aglomeratima. Uočeno je da se veličina i izgled površine svake skupine MC stvorenih sušenjem raspršivanjem značajno razlikuje od čistog omotača i ko-omotača.

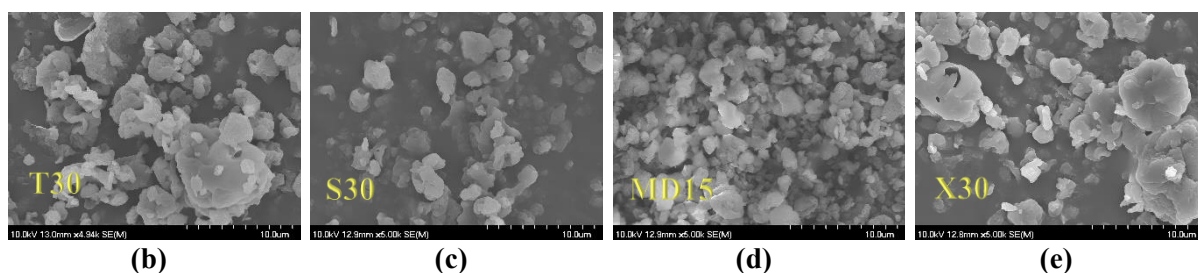
Ono što je također iznimno uočljivo u samom GW (**Slika 31a**) je šuplja struktura, koja nije vidljiva u uzorcima osušenim raspršivanjem. Smežuranje MC se objašnjava kao posljedica brzog isparavanja vode uslijed sušenja raspršivanjem. U radu autora Navarro-Flores i sur. (2020), navedeno je da brzo isparavanje vode može rezultirati stvrdnjavanjem kapsule, što dovodi do zadržavanja izvornog oblika, ili isparavanjem vode i stvaranjem smežuranih MC. Prema Haque i sur. (2015), nabori na površini MC proteina sirutke rezultat su stvaranja "kože" koja je karakteristična za sve tvari bogate proteinima. Ova karakteristika, u kombinaciji s brzim isparavanjem vode tijekom sušenja raspršivanjem, rezultira česticama koje imaju izbočine.

Prema Oliveira i sur. (2018), takve izbočine mogu imati negativan utjecaj na karakteristike tecivosti MC, ali nemaju utjecaja na stabilnost MC. Ono što se također može primijetiti je da dodatak šećera GW-u ima utjecaj na morfologiju čestica, tj. MC s dodatkom T, S i X imaju glađu površinu u odnosu na MC GW1. Kod MC s dodatkom X najizraženije su glatke udubine. Kod MD čestica se na **Slici 30** također vidi šuplja struktura. U svom istraživanju, autori Wijiani i sur. (2020) informiraju o istom učinku dodatka S na morfologiju čestica. U tom istraživanju čestice s dodatkom S imaju glađu površinu u odnosu na čestice bez S u svom sastavu.



(a)





Slika 31 SEM prikazi čestica: (a) proteini kozje sirutke (GW0) i MC s GW omotačem (GW1); (b) trehaloza (T0) i MC uz primjenu omotača i ko-omotača T (T5 – T30); (c) saharoza (S0) i MC uz primjenu omotača i ko-omotača S (S5 – S30); (d) maltodekstrin (MD0) i MC uz primjenu omotača i ko-omotača MD (MD2.5 – MD15); (e) ksiloza (X) i MC uz primjenu omotača i ko-omotača X (X5 – X30)

Već je navedeno da SEM fotografije (**Slika 31**) proizvedenih MC pokazuju da površina nije glatka i da čestice nisu ujednačene, što može implicirati na to da je i takva površina jedan od uzroka niske BD proizvedenih MC.

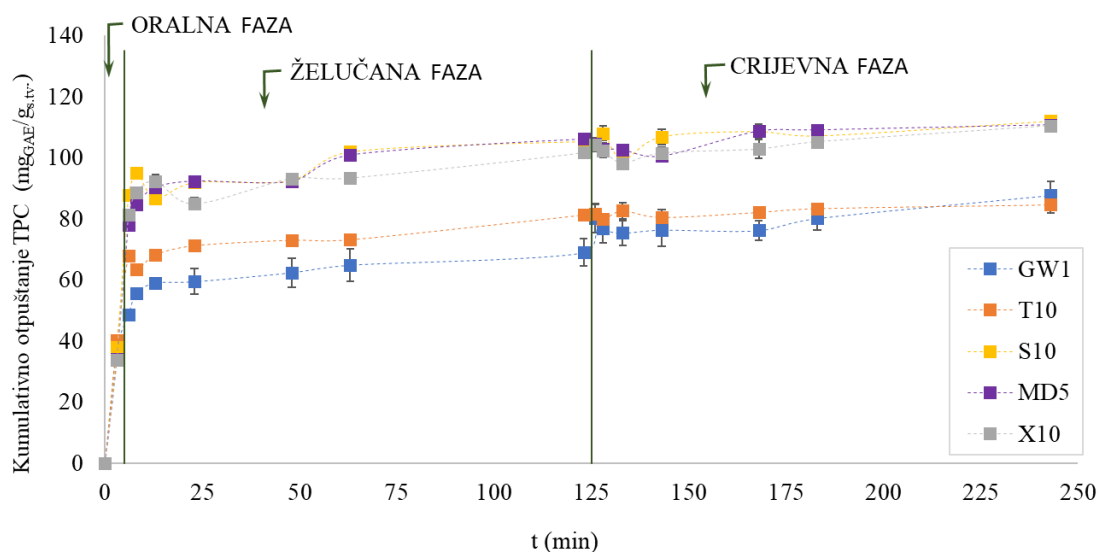
Na temelju svih do sada navedenih analiza, uz uzorak bez dodanog ko-omotača (GW1), iz svake od skupina ko-omotača odabran je “najbolji” uzorak, a to su bili: T10, S10, MD5 i X10. Na navedenim uzorcima su provedeni testovi *in vitro* simulirane probave sa i bez enzima.

4.5. Rezultati simulirane probave mikrokapsula

4.5.1. Rezultati *in vitro* simulirane probave mikrokapsula bez enzima

Različitim tehnikama inkapsulacije je omogućeno inkapsuliranom matriksu da ostane izoliran od vanjskog okruženja, a osim zaštite pružena je i stabilnost u nepovoljnim okolnostima sve dok se spoj ne treba osloboditi. Oslobađanje matriksa iz mikrokapsula može biti uzrokovano nizom čimbenika, od kojih neki uključuju difuziju, razgradnju, primjenjeno otapalo, pH, temperaturu i tlak (da Rosa i sur., 2014). Oslobađanje fenolnih spojeva iz MC koje su nastale sušenjem raspršivanjem, tijekom *in vitro* testa otpuštanja, proučavano je u uvjetima koji simuliraju oralnu, želučanu i intestinalnu fazu gastrointestinalnog trakta, koristeći otopine bez enzima. Upotreba omotača omogućuje zaštitu fenolnih spojeva od nepovoljnih uvjeta okoline kao što su niske pH vrijednosti u želučanoj fazi te osigurava siguran transport i otpuštanje fenolnih tvari u intestinalnoj fazi (Martinović i sur., 2023a). Fenolni spojevi apsorbiraju se u intestinalnoj fazi, oko 46 % u tankom crijevu i 42 % u debelom crijevu (Tarko i sur., 2013). Apsorpcija fenolnih spojeva u intestinalnoj fazi omogućuje ispoljavanje njihovih brojnih bioloških aktivnosti, poput antioksidativnog, antimikrobnog ili antiproliferativnog djelovanja (Albuquerque i sur., 2021).

Kumulativno otpuštanje fenolnih spojeva tijekom provedenog *in vitro* testa simulirane probave (bez probavnih enzima) u oralnoj fazi kretala se od 34,13 (MD5) do 40,03 mg_{GAE}/g_{s.tv.} (T10) (Slika 32).



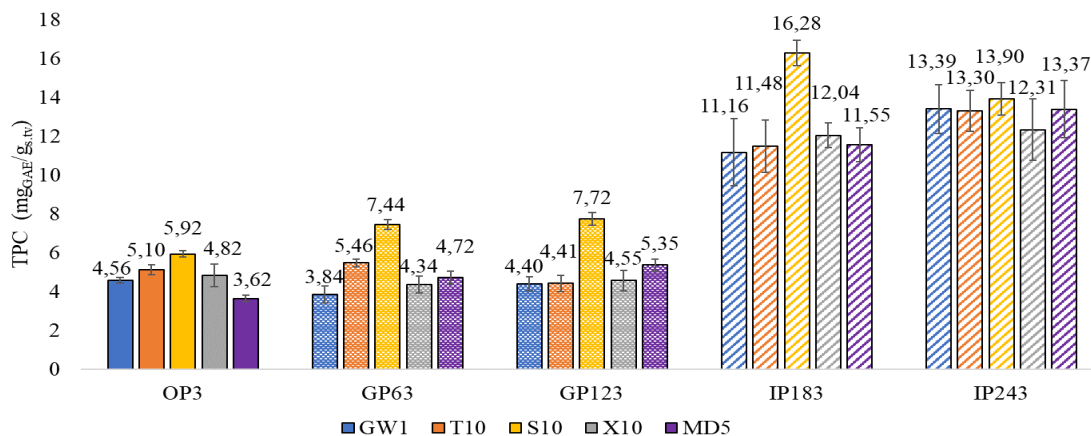
Slika 32 Kumulativno otpuštanje TPC (mg_{GAE}/g_{s.tv.}) iz MC nastalih s različitim ko-omotačima.

Difuzija fenolnih spojeva iz MC se zatim nastavlja u želučanoj fazi. Tijekom oslobađanja u želučanoj fazi zbog promjene pH u kiselo, boja otopine elektrolita koja sadrži MC promijenila se u crveno ružičastu, što je posljedica prisutnosti antocijana u ekstraktu tropa grožđa. Kumulativna stopa otpuštanja u želučanoj fazi kretala se od 48,56 mg_{GAE}/g_{s.tv.} (GW1) do 100,84 mg_{GAE}/g_{s.tv.} (MD5). U posljednjoj fazi simulirane gastrointestinalne probave, intestinalnoj fazi, vrijednosti kumulativno oslobođenog TPC kretale su se od 76,10 mg_{GAE}/g_{s.tv.} (GW1) do 111,92 mg_{GAE}/g_{s.tv.} (S10). Važno je napomenuti da su uzorci X10 i MD5 također imali visoke vrijednosti otpuštenog kumulativnog TPC u iznosu od 110,42 mg_{GAE}/g_{s.tv.} i 110,75 mg_{GAE}/g_{s.tv.}. Rezultati ovog eksperimenta, koji pokazuju veće otpuštanje fenolnih spojeva tijekom crijevne faze probave za razliku od želučane faze, u skladu su s rezultatima koje su objavili (Dag i sur., 2017), koji su provodili otpuštanje fenolnih spojeva iz liofiliziranih MC soka peruanske jagode. Nedavne studije pokazuju da inkapsulacije koje kao omotače koriste mješavine proteina i polisaharida djeluju obećavajuće za poboljšanje otpuštanja, zadržavanja i zaštite bioaktivnih spojeva (Hosseini i sur., 2015). Kako navode Belščak-Cvitanović i sur. (2015), hidrofilni karakter korištenih polisaharidnih i proteinskih omotača kao i njihova svojstva sorpcije vode uzrokuju visoko i brzo otpuštanje bioaktivnih spojeva u probavnim tekućinama. Snažna rezistencija β -laktoglobulina na pepsin (Liao i sur., 2021) još je jedan

čimbenik koji ide u prilog tome. Pri korištenju ovih kombinacija omotača i ko-omotača, visoka vrijednost kumulativnog otpuštanja TPC-a može se pripisati svim gore navedenim čimbenicima. Vrijednosti TPC-a oslobođenog iz MC u kojem je T korištena kao ko-omotač, su niže u usporedbi sa svim drugim ko-omotačima i bliže su vrijednostima TPC-a oslobođenog iz MC u kojima je samo GW korištena kao omotač (GW1). Kako navodi Richards i sur. (2002), među svim šećerima, trehaloza je najstabilnija na promjene pH vrijednosti i temperature. Navedeno može biti potencijalni razlog smanjenog otpuštanja fenola iz MC koje sadrže T. Budući da je već dokazano da je T više higroskopna i manje topiva u vodi u usporedbi s drugim šećerima (Ohtake i Wang, 2011), drugi potencijalni razlog za smanjeno otpuštanje fenola može biti to što je moguće da je T manje topljiva u simuliranim želučanim i crijevnim tekućinama od ostalih (ko)omotača.

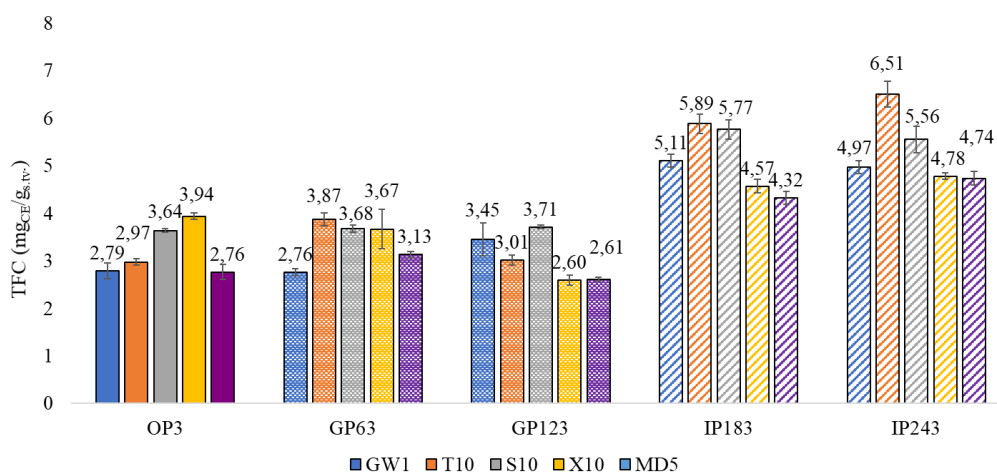
4.5.2. Rezultati *in vitro* simulirane probave mikro kapsula s enzimima

In vitro simulirana probava prihvaćen je pristup za procjenu biodostupnosti ciljne molekule. Može pružiti daljnje informacije o metabolizmu fenolnih spojeva, njihovoj dostupnosti za daljnju apsorpciju u tijelu i njihovim potencijalnim zdravstvenim prednostima. Fenolni spojevi moraju se osloboditi iz matrice mikročestica tijekom gastrointestinalne probave kako bi postali biodostupni. Kao rezultat navedenoga, ispitano je ponašanje MC ekstrakta tropa grožđa s različitim omotačima tijekom *in vitro* simulirane probave s enzimima. Za procjenu razine TPC, TFC i UPA (Slika 32 – 34), uzorci su uzimani 243 minute tijekom 3 faze: oralne (OP), želučane (GP) i crijevne (IP) faze. Prije digestije, ukupno 21 pojedinačna fenolna komponenta je kvantificirana u otopljenim MC (Tablica 21). Nakon 243 minute, u zadnjoj (crijevnoj) fazi *in vitro* simulirane probave s enzimima, 10 prethodno kvantificiranih fenolnih komponenti nije detektirano u digestatu bilo koje vrste MC, a radi se o idućim fenolnim spojevima: procijanidin B1, kafeinska kiselina, klorogenska kiselina, siringična kiselina, *p*-kumarinska kiselina, elagična kiselina, rutin, resveratrol, kaempferol i kvercetin.



Slika 33 Koncentracija TPC ($\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$) u digestatima svih faza simulirane *in vitro* probave

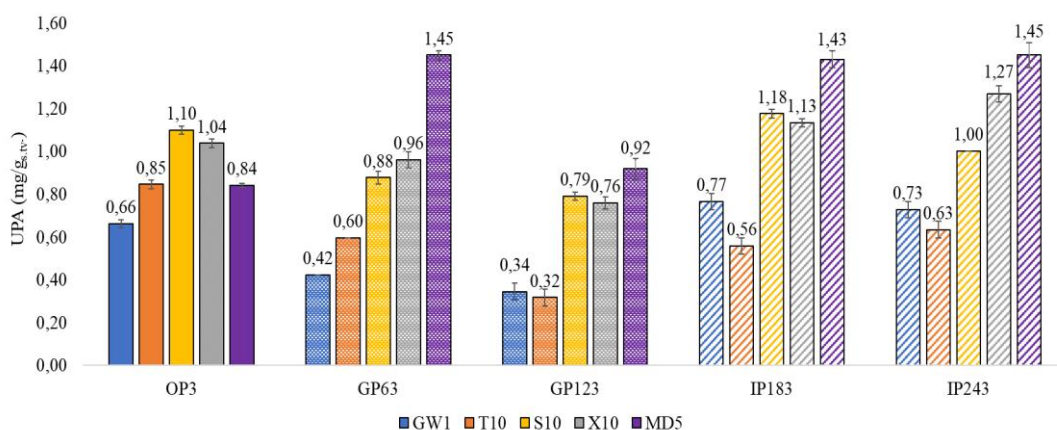
In vitro simulirana probava s enzimima pokazala je da S10 MC imaju najvišu razinu TPC-a tijekom svih faza simulirane probave (**Slika 33**). Ukupno, najveća vrijednost TPC postignuta tijekom probave u crijevima nakon 1 h (IP183) bila je $16,28 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$. Maksimalna TPC vrijednost dobivena je unutar svake skupine ko-omotača tijekom intestinalne faze probave. Slično kao i TPC, pri određivanju ukupnog udjela flavonoida (TFC) (**Slika 34**) unutar svih skupina uzoraka MC najveće vrijednosti postignute su tijekom intestinalne faze probave. U uzorku T10 utvrđena je najveća količina TFC-a u iznosu od $6,51 \text{ mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ tijekom posljednjeg dijela crijevne faze (IP243). Općenito tijekom zadnje faze crijevne probave vrijednosti TFC su se kretale u rasponu $4,74$ do $6,51 \text{ mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$



Slika 34 Koncentracija TFC ($\text{mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$) u digestatima svih faza simulirane *in vitro* probave

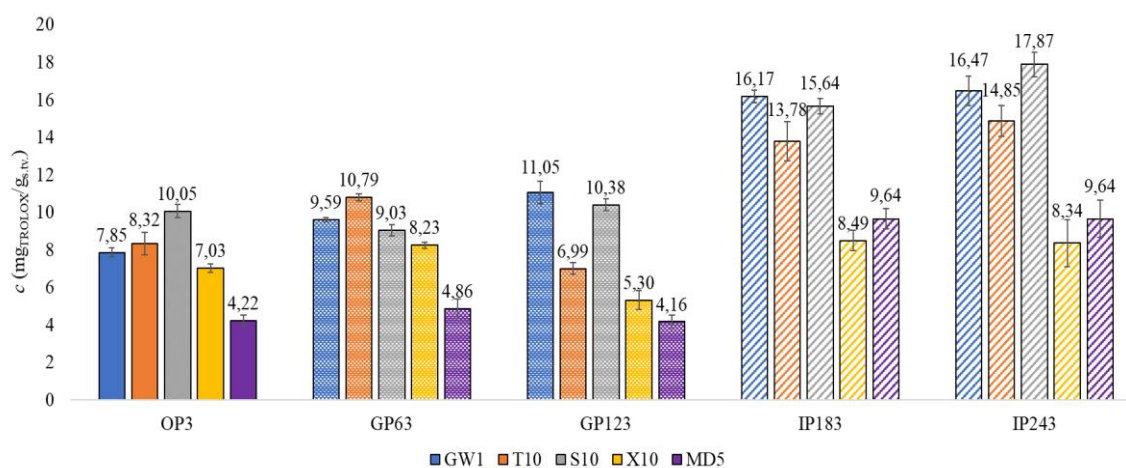
Vrijednosti ukupnih proantocijanidina (UPA) (**Slika 35**) tijekom analiza uzoraka MC digestije prilično su niske u usporedbi s vrijednostima TPC (**Slika 33**) i TFC (**Slika 34**). Tijekom UPA

analiza, uzorak MD5 postigao je istu količinu UPA u iznosu od 1,45 mg/g_{s.tv.}, kako tijekom faze GP63, tako i tijekom faze IP243. Uzorak T10 bilježi smanjenje količine proantocijanidina s 0,85 mg/g_{s.tv.} tijekom OP3 faze na 0,56 mg/g_{s.tv.} tijekom IP183 faze.

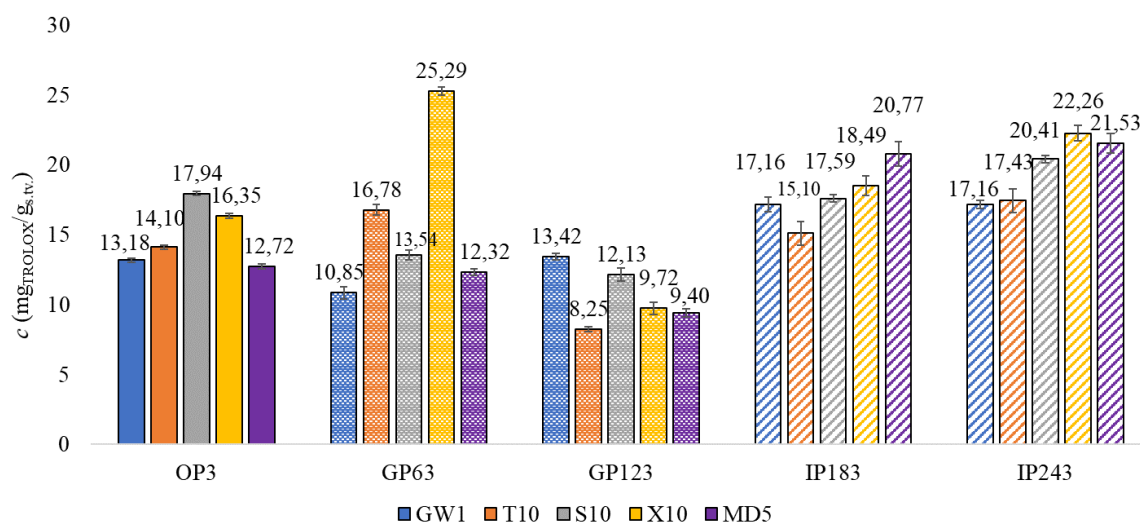


Slika 35 Koncentracija UPA (mg/g_{s.tv.}) u digestatima svih faza simulirane *in vitro* probave

Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom su varirale od 4,16 mg_{TROLOKS}/g_{s.tv.} do 17,87 mg_{TROLOKS}/g_{s.tv.} (**Slika 36**) tijekom cjelokupnog procesa *in vitro* simulirane probave. Najveće vrijednosti postignute su tijekom crijevne faze probave (IP183 i IP243), a bitno je i napomenuti da su vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uzoraka GW1, T10 i S10 znatno veće u usporedbi sa vrijednostima antioksidacijske aktivnosti uzoraka X10 i MD5.

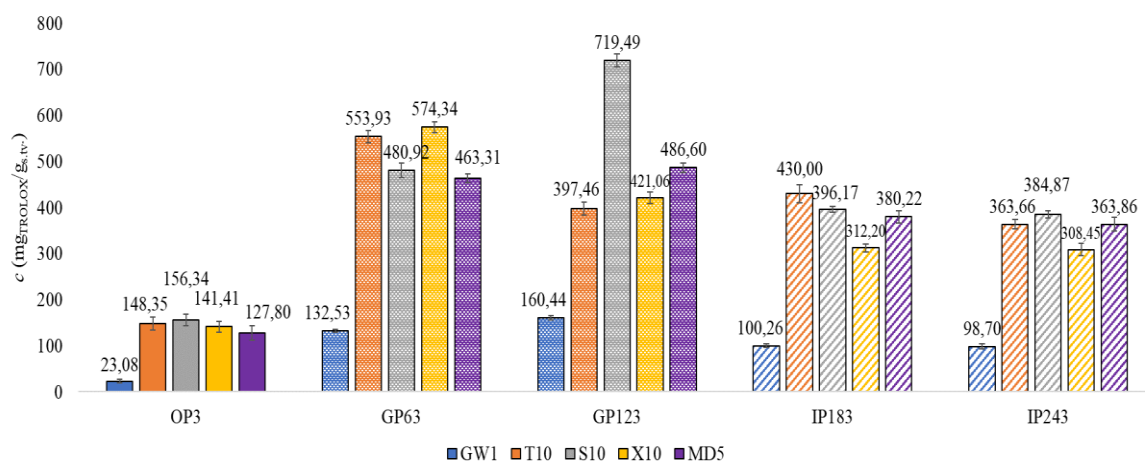


Slika 36 Antioksidacijska aktivnost (mg_{TROLOKS}/g_{s.tv.}) u digestatima svih faza simulirane *in vitro* probave određena DPPH metodom



Slika 37 Antioksidacijska aktivnost ($\text{mg}_{\text{TROLOKS}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$) u digestatima svih faza simulirane *in vitro* probave određena FRAP metodom

Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom su varirale od $8,25 \text{ mg}_{\text{TROLOKS}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ do $25,29 \text{ mg}_{\text{TROLOKS}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$ (**Slika 37**) tijekom cjelokupnog procesa simulirane probave. Slično kao i kod antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom, i ovom slučaju su najveće vrijednosti postignute tijekom crijevnih faza probave uz iznimku uzorka X10 koji je najveću vrijednost antioksidacijske aktivnosti ostvario tijekom želučane faze (GP63).



Slika 38 Antioksidacijska aktivnost ($\text{mg}_{\text{TROLOKS}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$) u digestatima svih faza simulirane *in vitro* probave određena ABTS metodom

Prilikom određivanja antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom postignute su znatno više vrijednosti (**Slika 38**) u usporedbi s DPPH i FRAP metodom. Ono što je također zamjetno je da

je antioksidacijska aktivnost uzorka GW1 izmjerena ABTS metodom tijekom svih faza probave niža u usporedbi sa svim ostalim uzorcima.

Udio fenolnih spojeva koji su detektirani u svim fazama simulirane *in vitro* probave (galna kiselina, procijanidin B2, katehin i epikatehin te vanilinska kiselina) je smanjen u odnosu na količinu tih pojedinačnih fenolnih spojeva u MC prije digestije (**Tablica 20**). Moguće je da su ovi spojevi hidrolizirani crijevnim enzimima i stoga je njihov udio smanjen nakon probave (Xie i sur., 2021). Elagična kiselina, rutin, resveratrol, kvercetin, kaempferol, *p*-kumarinska i klorogenska kiselina nisu otkriveni u digestatima niti jedne od testiranih faza simulirane *in vitro* probave. Siringična kiselina je detektirana jedino u digestatu oralne faze uzorka GW1, dok se u svim drugim digestatima i fazama simulirane *in vitro* probave nije pojavljivala. Međutim, važno je istaknuti da su epikatehin galat, vanilinska i ferulinska kiselina, 3,4-dihidrohibenzojeva kiselina te katehin bili prisutni tijekom faze crijevne probave, dok nisu detektirani tijekom oralne ili želučane faze digestije.

Tablica 20 Udio pojedinačnih fenolnih spojeva prije i tijekom pojedinačnih faza *in vitro* simulirane probave mikrokapsula uz primjenu enzima

| | Prije probave | Oralna faza OP ₃ | Želučana faza | | Crijevna faza | |
|---|-----------------|--------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | | GP ₆₃ | GP ₁₂₃ | IP ₁₈₃ | IP ₂₄₃ |
| galna kiselina (μg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 732,71 ± 0,41 | nd | nd | nd | 229,21 ± 39,59 | 244,16 ± 29,77 |
| T10 | 827,66 ± 8,45 | 5,28 ± 0,15 | 9,19 ± 0,15 | 9,72 ± 0,30 | 268,69 ± 7,17 | 230,88 ± 7,47 |
| S10 | 754,16 ± 4,09 | 4,93 ± 0,22 | 9,11 ± 0,90 | 8,37 ± 0,15 | 371,44 ± 3,90 | 216,55 ± 3,00 |
| MD5 | 959,15 ± 3,04 | 5,36 ± 0,23 | 10,41 ± 0,30 | 11,15 ± 0,15 | 288,51 ± 1,80 | 161,04 ± 2,40 |
| X10 | 854,20 ± 10,44 | 6,33 ± 0,60 | 7,60 ± 0,30 | 7,81 ± 0,00 | 301,31 ± 8,06 | 177,58 ± 5,08 |
| 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina (μg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 60,22 ± 0,21 | nd | nd | nd | 136,60 ± 5,66 | 149,23 ± 9,23 |
| T10 | 66,10 ± 9,22 | nd | nd | nd | 106,89 ± 1,79 | 143,64 ± 2,99 |
| S10 | 71,63 ± 0,48 | nd | nd | nd | 65,90 ± 7,49 | 51,06 ± 0,90 |
| MD5 | 79,60 ± 0,29 | nd | nd | nd | 61,82 ± 3,30 | 33,99 ± 3,00 |
| X10 | 69,38 ± 2,24 | nd | nd | nd | 53,21 ± 4,18 | 52,15 ± 3,28 |
| <i>p</i>-hidroksibenzojeva kiselina (μg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 18,39 ± 1,23 | 5,00 ± 7,07 | 6,42 ± 9,08 | 3,89 ± 5,51 | 10,73 ± 15,18 | 8,84 ± 12,50 |
| T10 | 27,76 ± 2,99 | 18,75 ± 3,51 | 25,45 ± 2,54 | 20,91 ± 2,09 | 31,47 ± 3,29 | 27,67 ± 0,30 |
| S10 | 32,50 ± 0,72 | 18,86 ± 0,15 | 24,05 ± 1,35 | 16,32 ± 0,90 | 46,40 ± 1,50 | 37,72 ± 5,99 |
| MD5 | 28,67 ± 1,25 | 22,15 ± 2,03 | 16,68 ± 3,46 | 15,51 ± 0,60 | 55,66 ± 3,61 | 52,05 ± 3,91 |
| X10 | 14,80 ± 0,32 | 19,74 ± 2,09 | 27,13 ± 0,75 | 22,59 ± 0,30 | 61,23 ± 4,18 | 58,49 ± 4,48 |
| procijanidin B1 (μg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 1121,04 ± 48,47 | 271,00 ± 15,93 | nd | nd | nd | nd |
| T10 | 1054,90 ± 26,64 | 173,06 ± 6,20 | 113,75 ± 25,84 | nd | nd | nd |
| S10 | 923,51 ± 40,55 | 203,04 ± 10,11 | 39,52 ± 8,24 | nd | nd | nd |
| MD5 | 1329,88 ± 61,03 | 270,93 ± 7,29 | nd | nd | nd | nd |
| X10 | 987,87 ± 90,96 | 167,97 ± 8,06 | 163,53 ± 4,93 | nd | nd | nd |
| katehin (μg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 4675,02 ± 99,35 | nd | nd | nd | 601,56 ± 35,72 | 701,54 ± 29,47 |
| T10 | 5928,03 ± 65,47 | nd | nd | nd | 495,78 ± 1,49 | 591,47 ± 22,11 |
| S10 | 4861,45 ± 80,73 | nd | nd | nd | 593,28 ± 47,35 | 630,58 ± 47,35 |

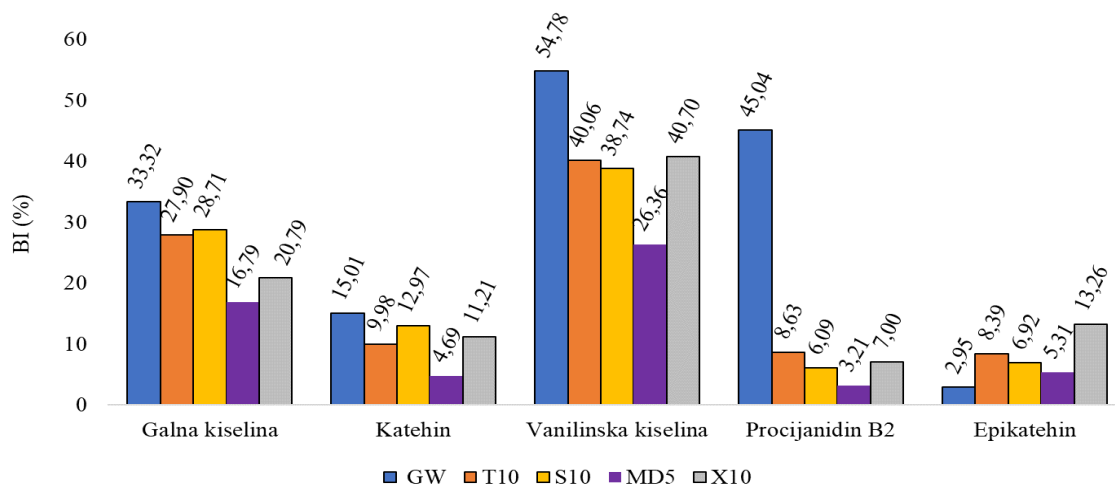
| | Prije probave | Oralna faza OP ₃ | Želučana faza | | Crijevna faza | |
|---|------------------|--------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | | GP ₆₃ | GP ₁₂₃ | IP ₁₈₃ | IP ₂₄₃ |
| MD5 | 5325,62 ± 14,85 | nd | nd | nd | 496,92 ± 12,32 | 249,84 ± 2,40 |
| X10 | 4359,75 ± 12,53 | nd | nd | nd | 459,25 ± 2,09 | 488,60 ± 37,62 |
| vanilnska kiselina (µg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 41,55 ± 0,54 | nd | nd | nd | 18,94 ± 2,38 | 22,73 ± 0,00 |
| T10 | 45,35 ± 0,41 | nd | nd | nd | 18,80 ± 0,30 | 18,17 ± 0,60 |
| S10 | 42,66 ± 0,66 | nd | nd | nd | 15,26 ± 2,40 | 16,53 ± 0,00 |
| MD5 | 47,55 ± 0,24 | nd | nd | nd | 16,57 ± 0,00 | 12,53 ± 0,30 |
| X10 | 35,28 ± 0,66 | nd | nd | nd | 17,53 ± 0,30 | 14,36 ± 0,00 |
| kafeinska kiselina (µg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 23,97 ± 0,28 | 3,16 ± 0,15 | nd | nd | nd | nd |
| T10 | 21,89 ± 0,13 | 3,64 ± 0,67 | nd | nd | nd | nd |
| S10 | 19,78 ± 0,29 | 4,45 ± 0,75 | nd | nd | nd | nd |
| MD5 | 21,49 ± 0,25 | 3,93 ± 0,00 | nd | nd | nd | nd |
| X10 | 17,21 ± 0,50 | 3,17 ± 0,75 | nd | nd | nd | nd |
| klorogenska kiselina (µg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 81,32 ± 1,73 | nd | nd | nd | nd | nd |
| T10 | 67,99 ± 4,58 | nd | nd | nd | nd | nd |
| S10 | 77,79 ± 1,30 | nd | nd | nd | nd | nd |
| MD5 | 89,30 ± 2,33 | nd | nd | nd | nd | nd |
| X10 | 70,14 ± 1,01 | nd | nd | nd | nd | nd |
| siringična kiselina (µg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 122,55 ± 1,83 | 1,47 ± 0,45 | nd | nd | nd | nd |
| T10 | 204,17 ± 4,07 | nd | nd | nd | nd | nd |
| S10 | 182,78 ± 0,80 | nd | nd | nd | nd | nd |
| MD5 | 199,24 ± 1,55 | nd | nd | nd | nd | nd |
| X10 | 158,92 ± 1,30 | nd | nd | nd | nd | nd |
| procijanidin B2 (µg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 1034,65 ± 105,81 | 117,08 ± 1,71 | nd | 24,31 ± 0,74 | 348,77 ± 2,08 | 466,01 ± 45,84 |
| T10 | 1060,26 ± 49,77 | 110,95 ± 5,60 | 135,51 ± 2,54 | 30,84 ± 1,79 | 57,03 ± 13,74 | 91,47 ± 8,66 |
| S10 | 1401,46 ± 31,99 | 172,48 ± 4,49 | 130,73 ± 7,19 | 73,84 ± 12,44 | 83,91 ± 8,99 | 85,39 ± 3,90 |
| MD5 | 1158,63 ± 54,88 | 131,82 ± 6,16 | 55,66 ± 12,62 | nd | 58,85 ± 14,12 | 37,18 ± 2,70 |
| X10 | 883,58 ± 41,05 | 186,97 ± 13,44 | 119,72 ± 9,26 | 50,68 ± 3,88 | 82,98 ± 10,45 | 61,87 ± 11,05 |
| epikatehin (µg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 3284,86 ± 10,78 | 1228,00 ± 28,58 | 335,93 ± 5,66 | 360,35 ± 3,57 | 152,39 ± 0,60 | 97,03 ± 4,46 |
| T10 | 4001,84 ± 38,51 | 1122,73 ± 107,10 | 1074,57 ± 44,21 | 572,88 ± 16,13 | 336,92 ± 2,09 | 335,87 ± 27,48 |
| S10 | 3238,02 ± 50,81 | 1361,43 ± 23,60 | 824,03 ± 27,57 | 570,72 ± 11,84 | 263,59 ± 10,19 | 223,96 ± 11,69 |
| MD5 | 3650,18 ± 5,68 | 1092,79 ± 74,44 | 504,14 ± 36,65 | 334,93 ± 9,16 | 215,42 ± 14,42 | 193,97 ± 2,10 |
| X10 | 2012,11 ± 49,61 | 1154,77 ± 8,96 | 657,73 ± 5,37 | 467,91 ± 0,00 | 255,70 ± 8,06 | 266,89 ± 1,79 |
| p-kumarinska kiselina (µg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 11,55 ± 0,08 | nd | nd | nd | nd | nd |
| T10 | 10,61 ± 0,17 | nd | nd | nd | nd | nd |
| S10 | 9,82 ± 0,09 | nd | nd | nd | nd | nd |
| MD5 | 14,13 ± 0,11 | nd | nd | nd | nd | nd |
| X10 | 6,61 ± 0,59 | nd | nd | nd | nd | nd |
| galokatehin galat (µg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 1229,93 ± 25,65 | nd | 680,38 ± 16,52 | 659,44 ± 3,57 | 2117,66 ± 24,11 | 2144,18 ± 10,42 |
| T10 | 1403,32 ± 57,59 | nd | 812,21 ± 22,11 | nd | 2050,27 ± 1,79 | 2188,42 ± 23,90 |
| S10 | 1475,91 ± 9,08 | nd | 781,33 ± 10,04 | 766,82 ± 26,97 | 2095,56 ± 40,15 | 2137,09 ± 14,98 |
| MD5 | 1393,36 ± 7,50 | nd | 735,29 ± 3,00 | 779,80 ± 23,28 | 1951,14 ± 20,43 | 1840,88 ± 19,53 |
| X10 | 1259,73 ± 12,22 | nd | nd | 768,79 ± 24,78 | 1969,17 ± 53,15 | 1893,16 ± 38,82 |
| ferulična kiselina (µg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 3,47 ± 0,06 | nd | nd | nd | 4,21 ± 1,79 | 11,79 ± 0,00 |
| T10 | 3,80 ± 0,11 | nd | nd | nd | 12,04 ± 2,09 | 16,69 ± 2,09 |
| S10 | 3,73 ± 0,04 | nd | nd | nd | 11,23 ± 0,30 | 14,83 ± 2,40 |

| | Prije probave | Oralna faza OP ₃ | Želučana faza GP ₆₃ GP ₁₂₃ | | Crijevna faza IP ₁₈₃ IP ₂₄₃ | |
|---|----------------|--------------------------------|---|--------------|--|----------------|
| MD5 | 4,95 ± 0,15 | nd | nd | nd | 11,90 ± 0,00 | 7,65 ± 0,00 |
| X10 | 4,12 ± 0,58 | nd | nd | nd | 15,84 ± 0,30 | 10,77 ± 0,30 |
| epikatehin galat (µg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 168,75 ± 3,24 | nd | nd | nd | 384,76 ± 4,17 | 491,69 ± 16,07 |
| T10 | 221,77 ± 16,62 | nd | nd | nd | 566,12 ± 2,99 | 628,64 ± 5,38 |
| S10 | 184,63 ± 7,28 | nd | nd | nd | 380,97 ± 28,77 | 660,24 ± 32,96 |
| MD5 | 260,80 ± 10,43 | nd | nd | nd | 217,55 ± 13,82 | 370,51 ± 12,62 |
| X10 | 181,83 ± 0,81 | nd | nd | nd | 553,63 ± 33,44 | 572,00 ± 19,41 |
| o-kumarinska kiselina (µg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 13,49 ± 0,17 | 58,62 ± 2,68 | 15,05 ± 0,74 | 21,36 ± 0,15 | 49,67 ± 1,19 | 98,72 ± 6,85 |
| T10 | 15,19 ± 0,89 | 93,42 ± 4,85 | 161,70 ± 2,54 | 88,61 ± 1,05 | 48,16 ± 4,78 | 71,61 ± 2,69 |
| S10 | 12,78 ± 0,58 | 116,91 ± 0,22 | 102,77 ± 0,30 | 34,54 ± 2,70 | 63,14 ± 0,60 | 50,01 ± 4,79 |
| MD5 | 14,87 ± 0,39 | 75,69 ± 4,73 | 18,91 ± 3,00 | 7,75 ± 1,95 | 42,28 ± 0,30 | 38,03 ± 0,30 |
| X10 | 12,64 ± 1,57 | 80,82 ± 3,06 | 44,76 ± 3,88 | 36,95 ± 0,00 | 59,12 ± 2,99 | 50,46 ± 2,09 |
| elagična kiselina (µg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 84,07 ± 0,86 | nd | nd | nd | nd | nd |
| T10 | 100,32 ± 2,25 | nd | nd | nd | nd | nd |
| S10 | 90,88 ± 2,30 | nd | nd | nd | nd | nd |
| MD5 | 87,67 ± 2,97 | nd | nd | nd | nd | nd |
| X10 | 83,06 ± 1,90 | nd | nd | nd | nd | nd |
| rutin (µg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 159,54 ± 2,11 | nd | nd | nd | nd | nd |
| T10 | 189,07 ± 5,20 | nd | nd | nd | nd | nd |
| S10 | 152,52 ± 0,73 | nd | nd | nd | nd | nd |
| MD5 | 196,83 ± 0,92 | nd | nd | nd | nd | nd |
| X10 | 218,63 ± 9,55 | nd | nd | nd | nd | nd |
| resveratrol (µg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 19,93 ± 0,03 | nd | nd | nd | nd | nd |
| T10 | 26,89 ± 0,49 | nd | nd | nd | nd | nd |
| S10 | 23,54 ± 0,29 | nd | nd | nd | nd | nd |
| MD5 | 26,02 ± 0,70 | nd | nd | nd | nd | nd |
| X10 | 20,26 ± 1,38 | nd | nd | nd | nd | nd |
| kaempferol (µg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 21,13 ± 0,55 | nd | nd | nd | nd | nd |
| T10 | 20,98 ± 0,20 | nd | nd | nd | nd | nd |
| S10 | 23,69 ± 0,42 | nd | nd | nd | nd | nd |
| MD5 | 25,44 ± 0,15 | nd | nd | nd | nd | nd |
| X10 | 20,21 ± 0,38 | nd | nd | nd | nd | nd |
| kvercetin (µg/g_{s.tv.}) | | | | | | |
| GW1 | 317,88 ± 2,76 | nd | nd | nd | nd | nd |
| T10 | 395,91 ± 0,58 | nd | nd | nd | nd | nd |
| S10 | 351,92 ± 4,97 | nd | nd | nd | nd | nd |
| MD5 | 359,10 ± 0,23 | nd | nd | nd | nd | nd |
| X10 | 303,78 ± 2,72 | nd | nd | nd | nd | nd |

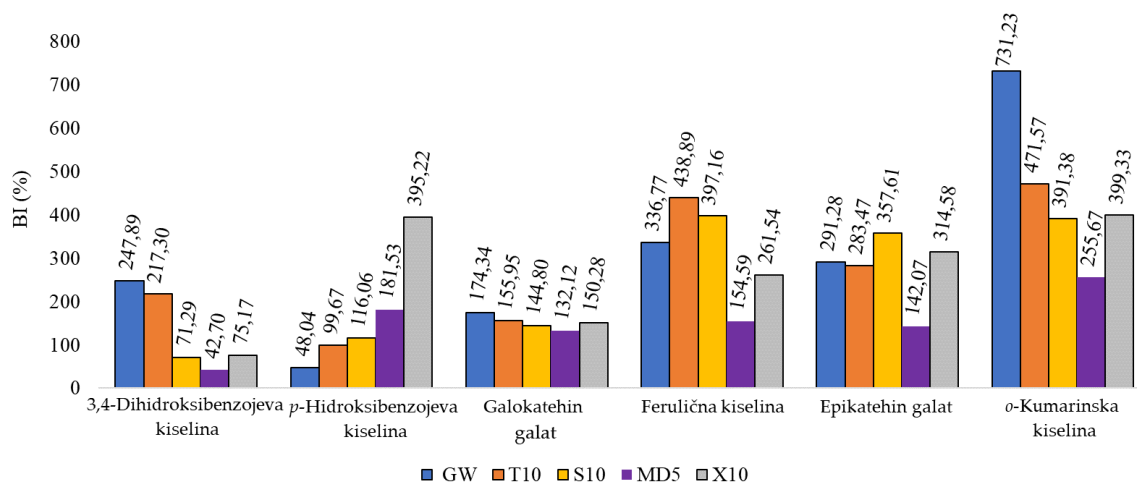
OP – oralna faza, GP – želučana faza, IP – intestinalna faza, nd – nije detektirano. Brojevi indeksa povezani sa kraticama označavaju vremenski interval kada je određeni uzorak uzet (tj. OP₃ – 3. minuta oralne faze). Maseni udio fenola izražen je kao srednja vrijednost (µg/gdb) ± SD

Prema provedenim istraživanjima (Slika 39 i 40), biodostupnost pojedinih fenolnih spojeva povećana je nakon *in vitro* simulirane probave. U slučaju galne kiseline, BI je varirao od 16,79 % (MD5) do 33,32 % (GW1). Za razliku od galne kiseline, u slučaju o-kumarinske

kiseline BI se kretao od 255,67 % (MD5) do 731,23 % (GW) i to su bile najveće vrijednosti BI dobivene u ovom pokusu.



Slika 39 Indeks biodostupnosti (BI < 100 %) pojedinačnih fenolnih spojeva nakon provedene probave



Slika 40 Indeks biodostupnosti (BI > 100 %) pojedinačnih fenolnih spojeva nakon provedene probave

Ovako visoke vrijednosti BI (**Slika 39** i **40**) sugeriraju kako su se korišteni omotači pokazali kao dobri nosači određenih fenolnih spojeva tijekom *in vitro* simulirane probave.

Antocijanini, koji se obično povezuju s bojom crvenog grožđa i koriste se kao prirodni pigmenti, samo su jedna od podskupina flavonoida. U brojnim studijama spominje se njihovo antikarcinogeno, protuupalno, antioksidativno (Smeriglio i sur., 2016), kardioprotektivno (Liobikas i sur., 2016), antitrombotičko (Ku i sur., 2016), antiaterosklerotičko (Mozos i sur.,

2021), kao i vazoprotektivno djelovanje (Bell i Gochenaur, 2006). Najzastupljeniji antocijanin u svim proizvedenim MC je bio oenin klorid s udjelom od 818,92 $\mu\text{g/g}_{\text{s.tv}}$. (Tablica 21). Kao što je prethodno navedeno, oenin klorid je antocijanin koji se nalazi u najvećim koncentracijama u većini vrsta crvenog grožđa, dok ostali spojevi variraju ovisno o sorti grožđa, iako su mirtilin klorid i peonidin-3-O-glukozid-klorid često prisutni u sastavu raznih tropova grožđa (Martinović i sur., 2023a). Tijekom probave opala je razina svih antocijanina. Mirtilin klorid, kuromarin klorid, kalistepin klorid i petunidin klorid nisu detektirani u uzorcima tijekom intestinalne faze probave. Svi ispitani antocijani bili su prisutni u uzorcima prije probave, kao i u uzorcima tijekom oralne faze probave.

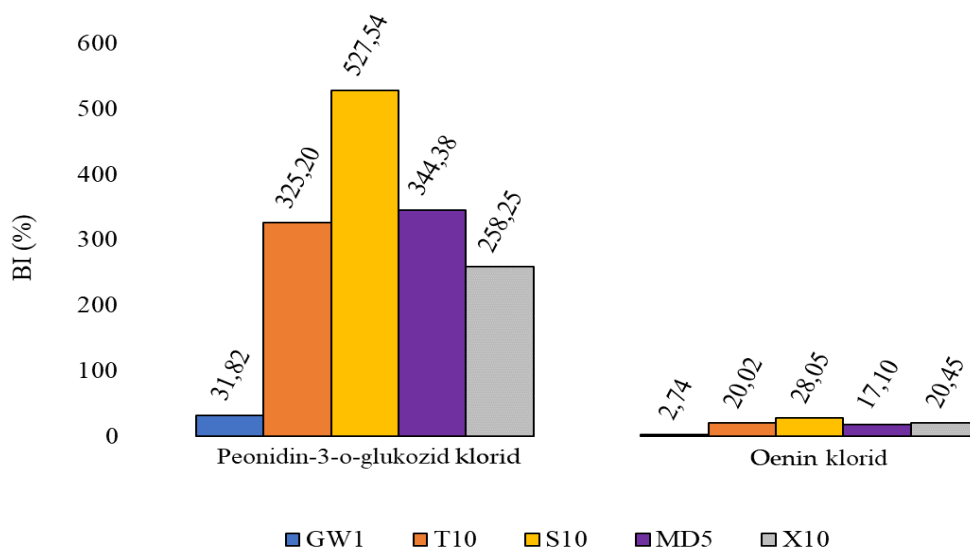
Tablica 21 Maseni udio individualnih antocijana prije i tijekom pojedinih faza *in vitro* simulirane probave s enzimima

| Antocijan/ uzorak | Prije probave | Oralna faza | | | Crijevna faza | |
|---|------------------|-----------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | OP ₃ | GP ₆₃ | GP ₁₂₃ | IP ₁₈₃ | IP ₂₄₃ |
| mirtilin klorid ($\mu\text{g/g}_{\text{s.tv}}$) | | | | | | |
| GW1 | 115,71 ± 3,21 | 34,31 ± 2,08 | 6,63 ± 1,64 | 5,89 ± 0,60 | nd | nd |
| T10 | 136,99 ± 0,41 | 16,37 ± 2,39 | 7,92 ± 0,15 | 5,39 ± 0,75 | nd | nd |
| X10 | 104,35 ± 0,57 | 38,80 ± 1,27 | 9,29 ± 1,19 | 8,13 ± 1,64 | nd | nd |
| S10 | 116,24 ± 2,37 | 27,17 ± 2,32 | 15,04 ± 2,40 | 8,48 ± 1,20 | nd | nd |
| MD5 | 114,54 ± 0,30 | 35,90 ± 0,60 | 9,88 ± 0,45 | 9,77 ± 0,60 | nd | nd |
| kuromanin klorid ($\mu\text{g/g}_{\text{s.tv}}$) | | | | | | |
| GW1 | 7,86 ± 0,60 | 1,11 ± 0,07 | nd | nd | nd | nd |
| T10 | 8,37 ± 0,08 | 1,90 ± 0,75 | nd | nd | nd | nd |
| X10 | 7,47 ± 0,03 | 1,16 ± 0,30 | nd | nd | nd | nd |
| S10 | 8,76 ± 0,03 | 2,38 ± 0,37 | nd | nd | nd | nd |
| MD5 | 7,86 ± 0,26 | 2,18 ± 0,38 | nd | nd | nd | nd |
| kalistepin klorid ($\mu\text{g/g}_{\text{s.tv}}$) | | | | | | |
| GW1 | 140,75 ± 16,88 | 50,67 ± 1,41 | 12,94 ± 0,45 | 10,52 ± 1,19 | nd | nd |
| T10 | 152,60 ± 2,33 | 43,88 ± 2,76 | 25,98 ± 2,39 | 21,76 ± 0,90 | nd | nd |
| X10 | 127,70 ± 1,34 | 43,76 ± 0,07 | 27,55 ± 1,34 | 24,07 ± 0,00 | nd | nd |
| S10 | 144,57 ± 2,05 | 49,53 ± 1,72 | 35,17 ± 3,00 | 26,06 ± 4,49 | nd | nd |
| MD5 | 144,65 ± 0,36 | 67,45 ± 6,01 | 21,46 ± 1,20 | 14,23 ± 4,81 | nd | nd |
| peonidin-3-O-glukozid-klorid ($\mu\text{g/g}_{\text{s.tv}}$) | | | | | | |
| GW1 | 2,78 ± 0,31 | 29,52 ± 1,12 | 10,73 ± 1,19 | 11,68 ± 0,15 | 10,31 ± 2,68 | 5,89 ± 0,60 |
| T10 | 2,92 ± 0,10 | 27,99 ± 1,34 | 26,93 ± 0,45 | 20,38 ± 3,44 | 13,52 ± 1,79 | 9,51 ± 1,49 |
| X10 | 2,29 ± 0,08 | 29,77 ± 1,94 | 21,22 ± 1,05 | 16,68 ± 0,90 | 7,39 ± 2,09 | 5,91 ± 1,19 |
| S10 | 2,86 ± 0,02 | 35,65 ± 1,57 | 31,36 ± 2,40 | 23,63 ± 1,95 | 15,68 ± 5,39 | 15,04 ± 3,30 |
| MD5 | 2,05 ± 0,03 | 30,75 ± 2,78 | 13,38 ± 2,40 | 12,96 ± 1,50 | 12,11 ± 0,30 | 7,01 ± 0,90 |
| oenin klorid ($\mu\text{g/g}_{\text{s.tv}}$) | | | | | | |
| GW1 | 727,24 ± 46,84 | 363,34 ± 0,97 | 148,39 ± 4,17 | 131,76 ± 1,49 | 157,02 ± 2,98 | 132,81 ± 6,25 |
| T10 | 818,92 ± 4,31 | 374,26 ± 0,37 | 366,08 ± 8,36 | 302,18 ± 43,76 | 203,63 ± 0,00 | 163,92 ± 2,99 |
| X10 | 682,28 ± 3,53 | 356,00 ± 1,79 | 262,04 ± 6,27 | 244,19 ± 4,63 | 167,02 ± 3,28 | 139,57 ± 1,49 |
| S10 | 771,35 ± 4,26 | 441,78 ± 4,34 | 349,40 ± 2,70 | 327,68 ± 41,80 | 239,22 ± 1,50 | 215,70 ± 10,19 |
| MD5 | 774,82 ± 1,24 | 370,94 ± 14,27 | 270,24 ± 8,71 | 231,25 ± 2,85 | 186,11 ± 12,62 | 131,72 ± 3,00 |
| petunidin klorid ($\mu\text{g/g}_{\text{s.tv}}$) | | | | | | |
| GW1 | 6,31 ± 2,49 | 3,42 ± 0,37 | nd | nd | nd | nd |
| T10 | 4,38 ± 0,01 | 3,01 ± 0,22 | 1,16 ± 0,15 | nd | nd | nd |
| X10 | 4,29 ± 0,11 | 1,53 ± 0,52 | nd | nd | nd | nd |

| Antocijan/ uzorak | Prije probave | Oralna faza | | Želučana faza | | Crijevna faza | |
|--|------------------|-----------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----|
| | | OP ₃ | GP ₆₃ | GP ₁₂₃ | GP ₁₂₃ | IP ₂₄₃ | |
| petunidin klorid (µg/g _{s.tv.}) | | | | | | | |
| S10 | 4,82 ± 0,18 | 1,27 ± 0,30 | 3,18 ± 0,60 | nd | nd | nd | nd |
| MD5 | 3,73 ± 0,27 | 3,51 ± 0,30 | nd | nd | nd | nd | nd |

OP – oralna faza, GP – želučana faza, IP – intestinalna faza, nd – nije detektirano. Brojevi indeksa povezani sa kraticama označavaju vremenski interval kada je određeni uzorak uzet (tj. OP3 – 3. minuta oralne faze). Maseni udio fenola izražen je kao srednja vrijednost (µg/gdb) ± SD

Probava je pozitivno utjecala na biodostupnost samo dva antocijana, i to oenin klorida i peonidin-3-O-glukozid-klorida. BI oenin klorida kretao se od 17,00 % (MD5) do 28,05 % (S10), dok su BI vrijednosti petudnidin-3-O-glukozid klorida bile u rasponu od 212,12 % (GW1) do 527,54 % (S10). Ono što je vidljivo iz **Slike 41** je da je korištenje omotača i ko-omotača pozitivno utjecalo na biodostupnost dva navedena antocijana.

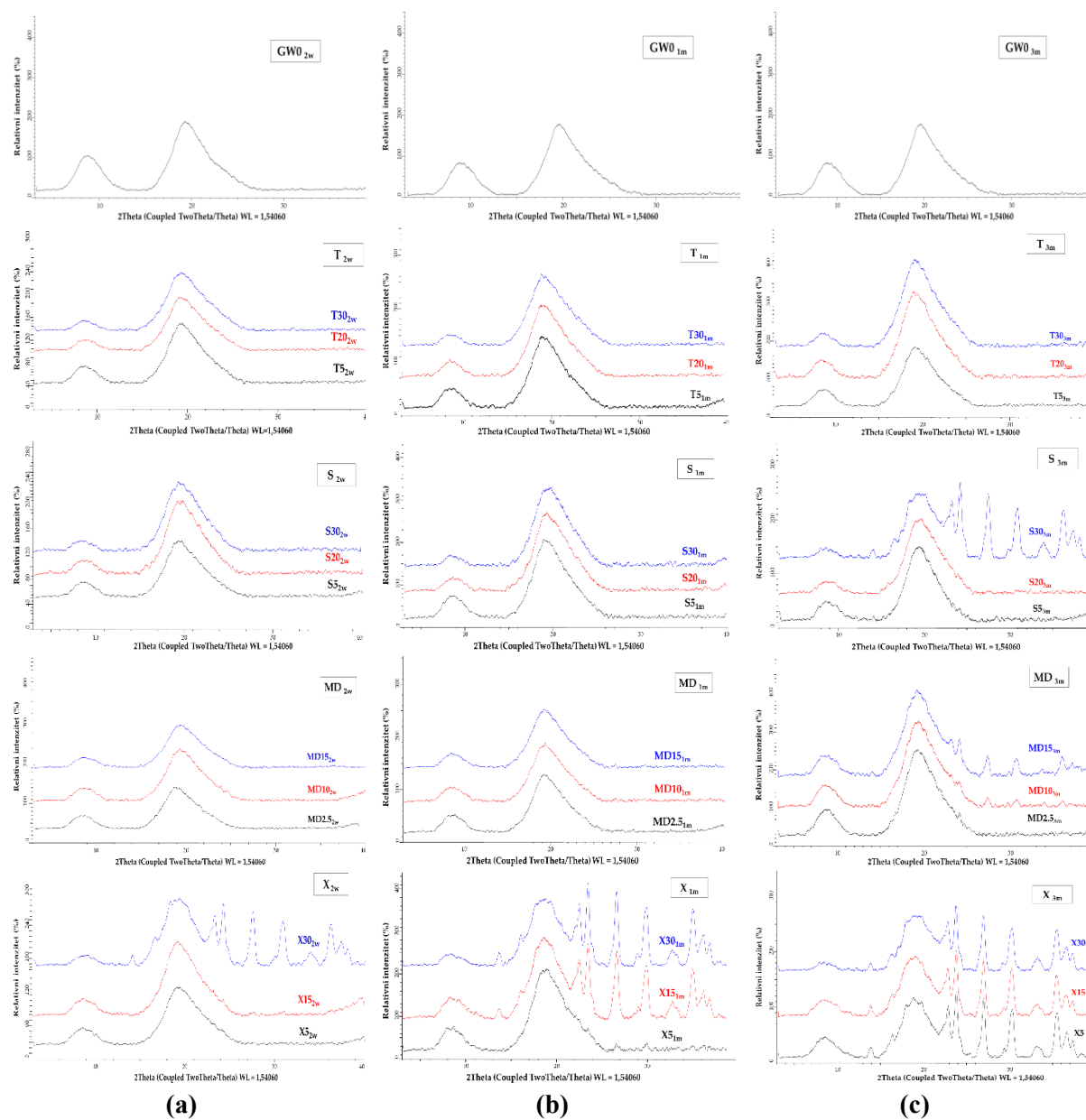


Slika 41 Ideks biodostupnosti (BI) pojedinačnih spojeva antocijana nakon provedene probave

4.6. Rezultati ispitivanja stabilnosti mikrokapsula

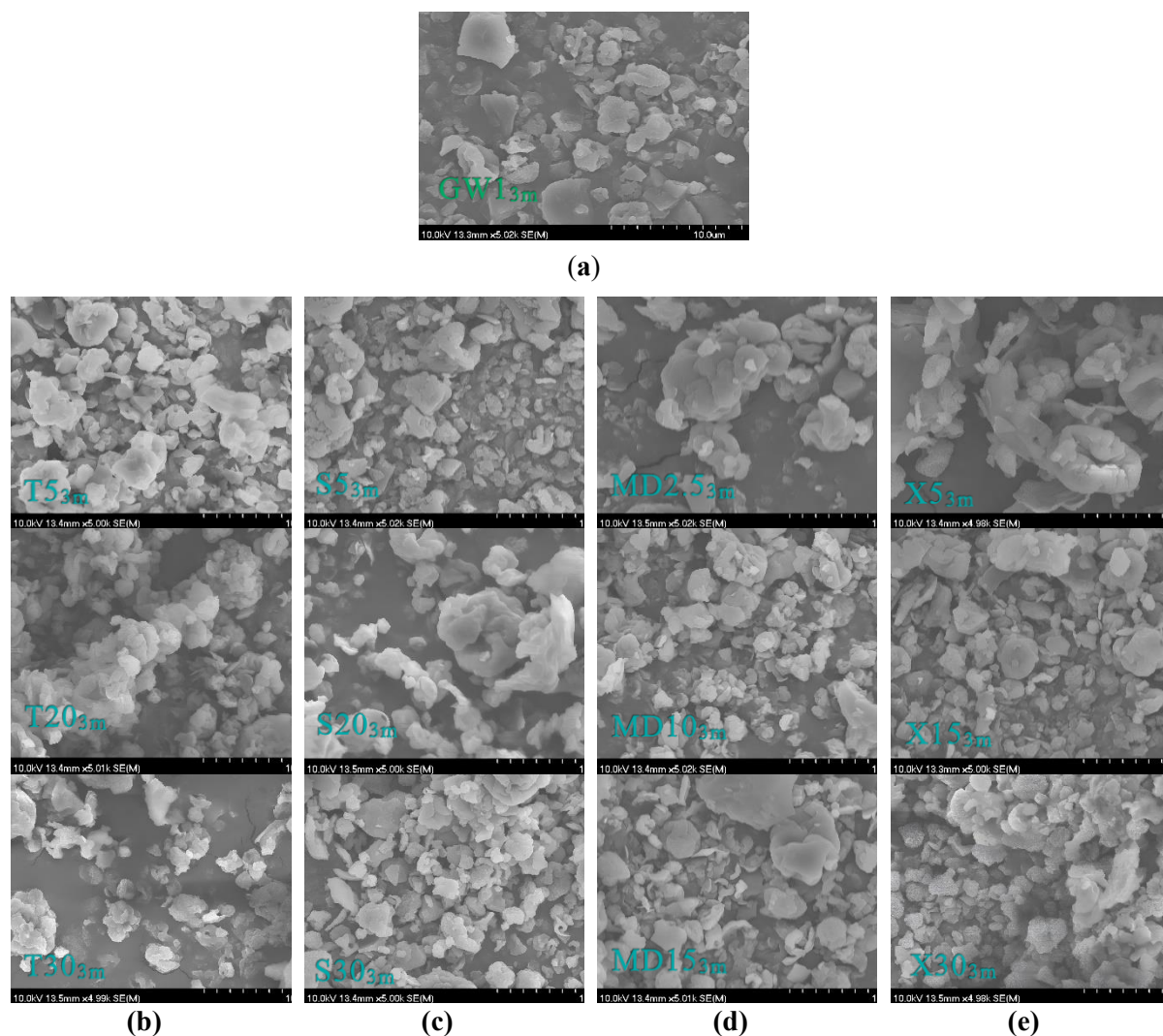
4.6.1. Rezultati ispitivanja stabilnosti mikrokapsula korištenjem testa ubrzanog starenja

Amorfni materijali su termodinamički u neravnotežnom stanju, te stoga teže prijeći u kristalnu (termodinamički stabilnu) strukturu tijekom skladištenja. Brzina ove transformacije prvenstveno ovisi o temperaturi i relativnoj vlažnosti (RH) zraka (Čujić Nikolić i sur., 2018). Kada su pohranjeni u okolini s visokom RH, apsorbiraju vlagu i naknadno ponovno kristaliziraju (Shetty i sur., 2020). Za provjeru stabilnosti MC uzeti su uzorci proteina GW0 i uzorci MC (T5, T20, T30; S5, S20, S30; MD2.5, MD10, MD15; X5, X15 i X30) čiji su rendgenski difraktogrami (**Slika 30a**) ukazivali na amorfnu strukturu podvrgnuti su testu ubrzanog starenja kako je opisano u poglavlju 3.3.5. Rezultati analize rendgenske difrakcije MC nakon testa ubrzanog starenja tijekom 2 tjedna, 1 mjeseca i 3 mjeseca prikazani su na **Slici 42**. Nakon dva tjedna samo se struktura uzorka X30 promijenila iz amorfne u djelomično kristalnu strukturu. Svi ostali uzorci su ostali amorfni (**Slika 42**). Ostali uzorci s dodatkom ksiloze (X5, X15) također su promijenili strukturu iz amorfne u semi-kristalnu nakon mjesec dana ubrzanog starenja. Nakon tri mjeseca uzorak S30 i dva uzorka s dodatkom MD (MD15 i MD10) su pokazali promjenu strukture iz amornog u polukristalni oblik. Uzorci S5, S20, T5, T20, T30 i MD2.5 su dokazali svoju stabilnost jer ni tri mjeseca u uvjetima ubrzanog ispitivanja stabilnosti nisu uočene strukturne promjene. Amorfna struktura i stabilnost GW praha zadržana je i nakon tri mjeseca ubrzanog starenja (**Slika 42**).



Slika 42 XRPD difraktogrami za sve MC nakon ubranog starenja tijekom: (a) 2 tjedna, (b) 1 mjeseca i (c) 3 mjeseca.

Dodatno, SEM analize MC uzoraka napravljene su nakon tri mjeseca pri uvjetima ubranog testa stabilnosti. Za većinu uzoraka nisu primijećene značajne promjene u izgledu MC. Za uzorak X15 postoji prividna šupljina (**Slika 43e**). Iz navedenog se može zaključiti da je dodatak T, čak i u najmanjim udjelima stabilizirao mikrokapsule, jer u uzorcima T5, T20, T30 nije primijećena promjena u kristalografskoj strukturi čestica. Nadalje, isti rezultati su ostvareni i za uzorak koji je imao najmanji udio dodanog ko-omotača MD (MD2.5).



Slika 43 SEM slike uzoraka MC nakon 3 mjeseca testa ubrzanog starenja: (a) GW1_{3m}; (b) T5_{3m}, T20_{3m}, T30_{3m}; (c) S5_{3m}, S20_{3m}, S30_{3m}; (d) MD2.5_{3m}, MD10_{3m}, MD15_{3m}; i (e) X5_{3m}, X15_{3m}, X30_{3m}.

4.6.2. Rezultati ispitivanja stabilnosti mikrokapsula nakon jedne godine skladištenja pri – 80 °C

Nakon proizvodnje MC kako je navedeno u **Tablici 14**, dio svakog uzorka je odvojen i skladišten u zamrzivaču pri – 80 °C. Nakon godinu dana uzorci su odmrznuti, te prema Tolun i sur. (2016), pripremljeni za UHPLC analizu. Dobiveni rezultati koncentracije pojedinog fenolnog spoja u mikrokapsulama prikazani su u **Tablici 22** te su uspoređeni s vrijednostima koncentracija pojedinog fenolnog spoja u mikrokapsulama prije skladištenja, a nastale promjene koncentracija izražene su u %.

Tablica 22 Koncentracija pojedinačnih fenolnih spojeva u uzorcima MC prije skladištenja (C) nakon 1 godine skladištenja (C_{1y})

| Fenolni spoj | Uzorak | C (µg/g.s.tv.) | C _{1y} (µg/g.s.tv.) | C _{1y} /C (%) † |
|--------------------------------------|--------|-----------------|------------------------------|--------------------------|
| galna kiselina | GW1 | 732,71 ± 0,41 | 939,35 ± 10,08 | 128,2 |
| | T10 | 827,66 ± 8,45 | 904,46 ± 9,38 | 109,3 |
| | S10 | 754,16 ± 4,09 | 935,36 ± 10,65 | 124,0 |
| | MD5 | 959,15 ± 3,04 | 962,87 ± 6,76 | 100,4 |
| | X10 | 854,20 ± 10,44 | 1037,09 ± 2,86 | 121,4 |
| 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina | GW1 | 60,22 ± 0,21 | 148,65 ± 2,80 | 246,8 |
| | T10 | 66,10 ± 9,22 | 143,20 ± 0,53 | 216,6 |
| | S10 | 71,63 ± 0,48 | 119,12 ± 1,60 | 166,3 |
| | MD5 | 79,60 ± 0,29 | 127,96 ± 0,82 | 160,8 |
| | X10 | 69,38 ± 2,24 | 139,51 ± 3,10 | 201,1 |
| <i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina | GW1 | 18,39 ± 1,23 | 0,90 ± 0,00 | 4,9 |
| | T10 | 27,76 ± 2,99 | 5,67 ± 0,22 | 20,4 |
| | S10 | 32,50 ± 0,72 | 5,62 ± 0,30 | 17,3 |
| | MD5 | 28,67 ± 1,25 | 2,81 ± 0,12 | 9,8 |
| | X10 | 14,80 ± 0,32 | 8,73 ± 0,73 | 59,0 |
| procijanidin B1 | GW1 | 1121,04 ± 48,47 | 275,75 ± 2,01 | 24,6 |
| | T10 | 1054,90 ± 26,64 | 251,91 ± 37,45 | 23,9 |
| | S10 | 923,51 ± 40,55 | 286,95 ± 23,31 | 31,1 |
| | MD5 | 1329,88 ± 61,03 | 290,14 ± 2,84 | 21,8 |
| | X10 | 987,87 ± 90,96 | 619,45 ± 59,33 | 62,7 |
| katehin | GW1 | 4675,02 ± 99,35 | 735,62 ± 10,02 | 15,7 |
| | T10 | 5928,03 ± 65,47 | 863,23 ± 31,55 | 14,6 |
| | S10 | 4861,45 ± 80,73 | 997,30 ± 36,44 | 20,5 |
| | MD5 | 5325,62 ± 14,85 | 1057,22 ± 23,71 | 19,9 |
| | X10 | 4359,75 ± 12,53 | 616,54 ± 15,73 | 14,1 |
| vanilinska kiselina | GW1 | 41,55 ± 0,54 | 86,22 ± 1,51 | 207,5 |
| | T10 | 45,35 ± 0,41 | 85,77 ± 1,78 | 189,1 |
| | S10 | 42,66 ± 0,66 | 90,54 ± 0,24 | 212,2 |
| | MD5 | 47,55 ± 0,24 | 88,90 ± 0,19 | 187,0 |
| | X10 | 35,28 ± 0,66 | 35,08 ± 2,19 | 99,4 |
| kafeinska kiselina | GW1 | 23,97 ± 0,28 | nd | nd |
| | T10 | 21,89 ± 0,13 | nd | nd |
| | S10 | 19,78 ± 0,29 | nd | nd |
| | MD5 | 21,49 ± 0,25 | nd | nd |
| | X10 | 17,21 ± 0,50 | nd | nd |
| klorogenska kiselina | GW1 | 23,97 ± 0,28 | 24,53 ± 2,95 | 102,3 |
| | T10 | 21,89 ± 0,13 | 25,31 ± 0,35 | 115,6 |
| | S10 | 19,78 ± 0,29 | 25,58 ± 0,60 | 129,3 |
| | MD5 | 21,49 ± 0,25 | 24,68 ± 0,81 | 114,8 |
| | X10 | 17,21 ± 0,50 | 32,73 ± 0,83 | 190,2 |

| Fenolni spoj | Uzorak | C (µg/g _{s.tv.}) | C _{1y} (µg/g _{s.tv.}) | C _{1y} /C (%) [‡] |
|-------------------------------|--------|----------------------------|--|-------------------------------------|
| siringična kiselina | GW1 | 122,55 ± 1,83 | 8,33 ± 1,62 | 6,8 |
| | T10 | 204,17 ± 4,07 | 8,13 ± 0,60 | 4,0 |
| | S10 | 182,78 ± 0,80 | 10,05 ± 0,82 | 5,5 |
| | MD5 | 199,24 ± 1,55 | 14,62 ± 0,66 | 7,3 |
| | X10 | 158,92 ± 1,30 | 3,63 ± 0,04 | 2,3 |
| procijanidin B2 | GW1 | 1034,65 ± 105,81 | 916,02 ± 4,59 | 88,5 |
| | T10 | 1060,26 ± 49,77 | 1090,51 ± 47,84 | 102,9 |
| | S10 | 1401,46 ± 31,99 | 663,59 ± 39,90 | 47,3 |
| | MD5 | 1158,63 ± 54,88 | 770,03 ± 10,75 | 66,5 |
| | X10 | 883,58 ± 41,05 | 1123,85 ± 20,91 | 127,2 |
| epikatehin | GW1 | 3284,86 ± 10,78 | 1386,56 ± 29,16 | 42,2 |
| | T10 | 4001,84 ± 38,51 | 1347,04 ± 42,28 | 33,7 |
| | S10 | 3238,02 ± 50,81 | 1173,68 ± 16,01 | 36,2 |
| | MD5 | 3650,18 ± 5,68 | 1262,86 ± 23,07 | 34,6 |
| | X10 | 2012,11 ± 49,61 | 1504,23 ± 1,66 | 74,8 |
| <i>p</i> -kumarinska kiselina | GW1 | 11,55 ± 0,08 | 2,16 ± 0,00 | 18,7 |
| | T10 | 10,61 ± 0,17 | 2,47 ± 0,34 | 23,3 |
| | S10 | 9,82 ± 0,09 | 2,14 ± 0,10 | 21,8 |
| | MD5 | 14,13 ± 0,11 | 2,15 ± 0,09 | 15,2 |
| | X10 | 6,61 ± 0,59 | 2,93 ± 0,09 | 44,3 |
| galoketehin galat | GW1 | 1229,93 ± 25,65 | 738,89 ± 23,17 | 60,1 |
| | T10 | 1403,32 ± 57,59 | 853,56 ± 2,40 | 60,8 |
| | S10 | 1475,91 ± 9,08 | 790,01 ± 2,10 | 53,5 |
| | MD5 | 1393,36 ± 7,50 | 794,10 ± 11,99 | 57,0 |
| | X10 | 1259,73 ± 12,22 | 487,52 ± 16,00 | 38,7 |
| ferulična kiselina | GW1 | 3,47 ± 0,06 | 3,63 ± 0,18 | 104,6 |
| | T10 | 3,80 ± 0,11 | 2,37 ± 0,37 | 62,4 |
| | S10 | 3,73 ± 0,04 | 3,35 ± 0,06 | 89,8 |
| | MD5 | 4,95 ± 0,15 | 1,89 ± 0,06 | 38,2 |
| | X10 | 4,12 ± 0,58 | 5,05 ± 0,09 | 122,6 |
| epikatehin galat | GW1 | 168,75 ± 3,24 | 29,48 ± 0,12 | 17,5 |
| | T10 | 221,77 ± 16,62 | 36,18 ± 2,01 | 16,3 |
| | S10 | 184,63 ± 7,28 | 45,22 ± 3,00 | 24,5 |
| | MD5 | 260,80 ± 10,43 | 43,33 ± 1,07 | 16,6 |
| | X10 | 181,83 ± 0,81 | 52,17 ± 0,88 | 28,7 |
| <i>o</i> -kumarinska kiselina | GW1 | 13,49 ± 0,17 | nd | nd |
| | T10 | 15,19 ± 0,89 | nd | nd |
| | S10 | 12,78 ± 0,58 | nd | nd |
| | MD5 | 14,87 ± 0,39 | nd | nd |
| | X10 | 12,64 ± 1,57 | nd | nd |
| elagična kiselina | GW1 | 84,07 ± 0,86 | 2,36 ± 0,12 | 2,8 |
| | T10 | 100,32 ± 2,25 | 3,93 ± 0,36 | 3,9 |

| Fenolni spoj | Uzorak | C ($\mu\text{g/g}_{\text{s.tv.}}$) | C _{1y} ($\mu\text{g/g}_{\text{s.tv.}}$) | C _{1y} /C (%) [‡] |
|--------------|--------|--------------------------------------|--|-------------------------------------|
| | S10 | 90,88 ± 2,30 | 3,68 ± 0,33 | 4,0 |
| | MD5 | 87,67 ± 2,97 | 3,52 ± 0,16 | 4,0 |
| | X10 | 83,06 ± 1,90 | 2,52 ± 0,27 | 3,0 |
| rutin | GW1 | 159,54 ± 2,11 | 29,76 ± 2,36 | 18,7 |
| | T10 | 189,07 ± 5,20 | 32,78 ± 0,29 | 17,3 |
| | S10 | 152,52 ± 0,73 | 31,73 ± 1,00 | 20,8 |
| | MD5 | 196,83 ± 0,92 | 32,53 ± 0,01 | 16,5 |
| | X10 | 218,63 ± 9,55 | 37,04 ± 1,30 | 16,9 |
| resveratrol | GW1 | 19,93 ± 0,03 | 2,97 ± 0,31 | 14,9 |
| | T10 | 26,89 ± 0,49 | 4,03 ± 0,15 | 15,0 |
| | S10 | 23,54 ± 0,29 | 5,13 ± 0,03 | 21,8 |
| | MD5 | 26,02 ± 0,70 | 4,87 ± 0,03 | 18,7 |
| | X10 | 20,26 ± 1,38 | 3,91 ± 0,27 | 19,3 |
| kaempferol | GW1 | 21,13 ± 0,55 | 19,28 ± 0,57 | 91,2 |
| | T10 | 20,98 ± 0,20 | 19,33 ± 0,13 | 92,1 |
| | S10 | 23,69 ± 0,42 | 15,38 ± 0,83 | 64,9 |
| | MD5 | 25,44 ± 0,15 | 18,65 ± 0,37 | 73,3 |
| | X10 | 20,21 ± 0,38 | 17,23 ± 0,34 | 85,3 |
| kvercetin | GW1 | 317,88 ± 2,76 | 337,42 ± 3,26 | 106,1 |
| | T10 | 395,91 ± 0,58 | 318,39 ± 2,33 | 80,4 |
| | S10 | 351,92 ± 4,97 | 287,98 ± 0,62 | 81,8 |
| | MD5 | 359,10 ± 0,23 | 285,05 ± 0,45 | 79,4 |
| | X10 | 303,78 ± 2,72 | 312,57 ± 8,81 | 102,9 |

Sve vrijednosti koncentracije fenolnih spojeva izražene su na suhu tvar mikrokapsula ($\mu\text{g/g}_{\text{s.tv.}}$), kao srednja vrijednost \pm SD.

[‡] crveno označene vrijednosti su: < 50 %; plavo označene vrijednosti su: > 50 % i < 95 %; zeleno označene vrijednosti su: > 95 %.

nd nije detektirano.

Kao što je vidljivo iz **Tablice 22** udio većine polifenolnih spojeva iz uzoraka MC se nakon 1 godine skladištenja pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ značajno smanjio u usporedbi s udjelom polifenola u MC prije skladištenja. Kafeinska kiselina i *o*-kumarinska kiselina nisu dokazane niti u jednom uzorku MC nakon 1 godine skladištenja, dok su koncentracije: katehina, siringične kiseline, epikatehina, *p*-kumarinske kiseline, epikatehin galata, elagične kiseline, rutina i resveratrola bile < 50 % koncentracije fenolnog spoja u MC prije skladištenja. Također, dokazano je smanjenje početne koncentracije za više od 50 % u slučaju *p*-hidroksibenzojeve kiseline, procijanidina B1 i epikatehina kod svih MC s izuzetkom mikrokapsula X10, odnosno mikrokapsula koje su sadržavale ksilanazu kao ko-omotač s udjelom od 10 %, kod kojih su navedeni fenolni spojevi zadržani u koncentraciji > 50 %, i to: 59,0 %, 62,7 % odnosno 74,8 %.

S druge strane, galna kiselina, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina i klorogenska kiselina su fenolni spojevi čija je koncentracija u svim uzorcima MC bila veća od njihove koncentracije u MC prije skladištenja (zeleno označene vrijednosti u **Tablici 22**), pri čemu je najveće povećanje koncentracije nakon skladištenja uočeno u slučaju 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (160,8 % – 246,8 %). U radu autora Galani i sur. (2017), ispitivan je utjecaj temperature skladištenja od – 21 °C tijekom 15 dana na udio fenolnih spojeva različitih uzoraka voća i povrća. Ono što je kod njih dokazano je da skladištenje voća i povrća pri toj temperaturi ima pozitivan utjecaj na sastav pojedinačnih polifenola, točnije na udio fenolnih kiselina. Naime prema rezultatima navedenih autora, skladištenje pri temperaturi od – 21 °C, kod većine uzoraka je uzrokovalo rast udjela fenolnih kiselina, posebice galne, vanilinske i elagične kiseline. Također jedan od mogućih razloga porasta koncentracije navedenih fenolnih kiselina bi mogla biti razgradnja različitih antocijana ili razgradnja složenijih polifenolnih spojeva na jednostavnije. Smatra se da bi porast udjela galne kiseline mogao biti uzrokovan razgradnjom oenin klorida i mirtilin klorida, dok bi razlog porasta udjela 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline mogla biti razgradnja oenin i kuromanin klorida (Martinović i sur., 2023b).

Analiziranjem udjela pojedinačnih antocijana nakon godine dana skladištenja uzoraka na – 80 °C, vidljivo je da se udio gotovo svih, odnosno 4 od 6 dokazanih antocijana značajno smanjio u usporedbi sa udjelom antocijana u uzorcima MC prije skladištenja (**Tablica 23**). Točnije, koncentracije: mirtilin klorida, kalistepin klorida, peonidin-3-O-glukozid-klorida i oenin klorida su nakon skladištenja uzoraka na – 80 °C tijekom godine dana bile < 50 % koncentracije istog spoja prije skladištenja mikrokapsula bez obzira na sastav korištenog omotača.

Tablica 23 Koncentracija pojedinačnih antocijana u uzorcima MC prije skladištenja (C) nakon 1 godine skladištenja (C_{1y})

| Antocijan | Uzorak | C, µg/g.s.tv. | C _{1y} (µg/g.s.tv.) | C _{1y} /C (%) [‡] |
|------------------|--------|---------------|------------------------------|-------------------------------------|
| mirtilin klorid | GW1 | 115,71 ± 3,21 | 0,80 ± 0,03 | 0,7 |
| | T10 | 136,99 ± 0,41 | 0,88 ± 0,06 | 0,6 |
| | S10 | 104,35 ± 0,57 | 4,12 ± 0,18 | 3,9 |
| | MD5 | 116,24 ± 2,37 | 5,07 ± 0,20 | 4,4 |
| | X10 | 114,54 ± 0,30 | 1,65 ± 0,11 | 1,4 |
| kuromanin klorid | GW1 | 7,86 ± 0,60 | 0,75 ± 0,06 | 9,5 |
| | T10 | 8,37 ± 0,08 | 4,10 ± 1,11 | 49,0 |
| | S10 | 7,47 ± 0,03 | 96,24 ± 0,36 | 1288,4 |
| | MD5 | 8,76 ± 0,03 | 105,50 ± 0,99 | 1204,3 |

| Antocijan | Uzorak | C, µg/g _{s.tv.} | C _{1y} (µg/g _{s.tv.}) | C _{1y} /C (%) † |
|------------------------------|-------------|--------------------------|--|--------------------------|
| kalistepin klorid | X10 | 7,86 ± 0,26 | 35,24 ± 0,75 | 448,3 |
| | GW1 | 140,75 ± 16,88 | 4,82 ± 0,28 | 3,4 |
| | T10 | 152,60 ± 2,33 | 1,73 ± 0,13 | 1,1 |
| | S10 | 127,70 ± 1,34 | 8,94 ± 0,03 | 7,0 |
| | MD5 | 144,57 ± 2,05 | 11,11 ± 0,23 | 7,7 |
| peonidin-3-O-glukozid-klorid | X10 | 144,65 ± 0,36 | 3,48 ± 0,04 | 2,4 |
| | GW1 | 2,78 ± 0,31 | 0,47 ± 0,01 | 16,9 |
| | T10 | 2,92 ± 0,10 | 0,15 ± 0,06 | 5,1 |
| | S10 | 2,29 ± 0,08 | 1,12 ± 0,01 | 48,9 |
| | MD5 | 2,86 ± 0,02 | 0,25 ± 0,06 | 8,7 |
| oenin klorid | X10 | 2,05 ± 0,03 | 0,29 ± 0,01 | 14,1 |
| | GW1 | 727,24 ± 46,84 | 94,34 ± 3,66 | 13,0 |
| | T10 | 818,92 ± 4,31 | 97,94 ± 0,09 | 12,0 |
| | S10 | 682,28 ± 3,53 | 65,64 ± 0,84 | 9,6 |
| | MD5 | 771,35 ± 4,26 | 69,27 ± 0,51 | 9,0 |
| petunidin klorid | X10 | 774,82 ± 1,24 | 42,24 ± 1,52 | 5,5 |
| | GW1 | 6,31 ± 2,49 | 5,94 ± 0,28 | 94,1 |
| | T10 | 4,38 ± 0,01 | 6,89 ± 0,34 | 157,3 |
| | S10 | 4,29 ± 0,11 | 15,69 ± 0,01 | 365,7 |
| | MD5 | 4,82 ± 0,18 | 15,68 ± 0,54 | 325,3 |
| X10 | 3,73 ± 0,27 | 7,12 ± 0,08 | 190,9 | |

Sve vrijednosti koncentracije antocijana izražene su na suhu tvar mikrokapsula (µg/g_{s.tv.}), kao srednja vrijednost ± SD.

† crveno označene vrijednosti su: < 50 %; plavo označene vrijednosti su: > 50 % i < 95 %; zeleno označene vrijednosti su: > 95 %.

nd nije detektirano.

S druge strane, dodatak ko-omotača saharoze (S10), maltodekstrina (MD5) i ksiloze (X10) imao je pozitivan učinak na značajno povećanje koncentracije kuromanin klorida (448 % – 1288 %), dok je na koncentraciju petunidin klorida nakon skladištenja pozitivan učinak ostvario dodatak sva 4 ko-omotača (T10, S10, MD5, X10) pri čemu je ovo povećanje bilo u rasponu 157 % – 366 %).

Slično ovim rezultatima, prema brojnim drugim autorima, udio antocijana u različitim voćnim prahovima se smanjuje tijekom skladištenja, neovisno o kojoj temperaturi skladištenja se radi (Fracassetti i sur., 2013; Teleszko i sur., 2016; Wilkes i sur., 2014). Općenito antocijani se prema brojnoj literaturi spominju kao izuzetno nestabilni spojevi, osjetljivi na razne vanjske utjecaje (Giacosa i sur., 2023; Sinopoli i sur., 2019). U svom istraživanju Arslan (2015) navodi da je stabilnost antocijana povećana dodatkom saharoze u koncentrat višnje. Moguće je da su se i tijekom ovih eksperimenata saharoza, maltodekstrin i ksiloza pokazali kao izvrsni stabilizatori

antocijana te se stoga koncentracija kuromanin klorida u MC s navedenim ko-omotačima povećala tijekom perioda skladištenja.

5. ZAKLJUČCI

Provedbom postavljenog plana istraživanja, ostvareni su zadani ciljevi doktorskog rada na čemu se temelje doneseni zaključci, kako je navedeno u nastavku:

- ekstrakcijom tropa grožđa sorte cabernet sauvignon, zaostalog nakon proizvodnje crnog vina, proizveden je tekući ekstrakt koji je obiluje bioaktivnim tvarima (flavanolima, flavanolima, procijanidinima i antocijanima) te je u tom obliku nepogodan za duže skladištenje radi opasnosti od degradacije bioaktivnih spojeva i gubitka antioksidacijske aktivnosti, a rješenje ovog problema može se ostvariti inkapsulacijom ekstrakta;
- odabrana je metoda i optimalni uvjeti homogenizacije inkapsulacijske smjese, odnosno ekstrakta tropa grožđa i proteina kozje sirutke (omotača), i to:
 - ✓ metoda: miješanje inkapsulacijske smjese na magnetnoj miješalici,
 - ✓ optimalni procesni uvjeti: temperatura homogenizacije od 50 °C, vrijeme homogenizacije od 10 min, uz brzinu homogenizacije od 600 rpm, nakon čega slijedi 5 min stabilizacije smjese na sobnoj temperaturi – ovi procesni parametri odabrani su temeljem numeričke optimizacije uz uvjet maksimalne efikasnosti inkapsulacije i minimalnog udjela vlage u produktu;
- razvijen je proces inkapsulacije ekstrakta tropa grožđa metodom sušenja raspršivanjem u laboratorijskim uvjetima, koristeći proteine kozje sirutke kao omotač sa svrhom očuvanja i zaštite fenolnih spojeva od vanjskih faktora, pri čemu je zaključeno:
 - ✓ da su optimalni procesni parametri sušenja raspršivanjem: temperatura ulaznog zraka za sušenje = 173 °C, protok pojne smjese = 7 mL/min , dodatak omotača u omjeru ekstrakt : omotač = 1 : 2,5 (w/w),
 - ✓ da su ostvareni zadovoljavajući pokazatelji uspješnosti inkapsulacije, odnosno efikasnost inkapsulacije od 95,5 % i prinos inkapsulacije od 85,2 %,
 - ✓ da su proizvedene mikrokapsule niskog udjela vlage (< 5%), koje su zadržale fenolni profil tropa grožđa te odgovarajuću antioksidacijsku aktivnost,
 - ✓ da je omjer ekstrakta i omotača općenito parametar koji je imao najveći učinak na uspješnost inkapsulacije i svojstva proizvedenih mikrokapsula;
- ispitan je utjecaj dodatka ko-omotača ugljikohidratnog tipa na stabilizaciju primarnog omotača (proteina kozje sirutke), odnosno uspješnost inkapsulacije, fizikalno-kemijske

karakteristike mikrokapsula, biodostupnost fenolnih spojeva tijekom *in vitro* simulirane probave te stabilnost mikrokapsula tijekom testa ubrzanog starenja, pri čemu je zaključeno:

- ✓ kao najučinkovitije kombinacije primarnog proteinskog omotača i ko-omotača ugljikohidratnog tipa pokazale su se kombinacije: 90 % proteina kozje sirutke i 10 % trehaloze (T10), saharoze (S10) ili ksiloze (X10), odnosno 95 % proteina kozje sirutke i 5 % maltodekstrina DE 4-7 (MD5), pri čemu je:
 - dodatak ko-omotača utjecao na smanjenje efikasnosti inkapsulacije (82,5 % – 91,9 %) uz istodobno povećanje prinosa inkapsulacije (90,2 % – 97,5 %) u odnosu na inkapsulaciju ekstrakta samo s proteinima kozje sirutke (EE = 95,5 %, Y = 85,2 %), dok je utjecaj ko-omotača na udio vlage u mikrokapsulama bio zanemariv ($w_m < 6\%$),
 - dodatak ko-omotača rezultirao je djelomično kristalnom strukturom mikrokapsula, koja je zabilježena i kod mikrokapsula bez dodatka ko-omotača, a koja se može pripisati kristalizaciji šećera (ko-omotača i prirodno prisutnih šećera u uzorku ekstrakta tropa grožđa) u prisutnosti vode te koja u konačnici povećava stabilnost mikrokapsula,
 - dodatak trehaloze pokazao kao najbolji stabilizator omotača s obzirom da su sve mikrokapsule s dodatkom trehaloze zadržale amorfnu strukturu i nakon 3 mjeseca testa ubrzanog starenja,
 - prosječna veličina mikrokapsula bila u rasponu 3,36 μm – 3,88 μm , uz niske vrijednosti širine raspodjele veličina (*span*, 1,84 – 2,22), što upućuje na homogenost uzoraka s obzirom na veličinu čestica,
 - tecivost proizvedenih mikrokapsula okarakterizirana je kao loša te vrlo, vrlo loša, a razlog tome može biti činjenica da omotač (protein kozje sirutke) u svom sastavu ima masti koje narušavaju svojstva tecivosti mikrokapsula,
 - dokazana hidrofilnost svih mikrokapsula što utječe na njihovu dobru topivost, dodatak trehaloze, saharoze i maltodekstrina je utjecao na povećanje kumulativnog otpuštanja ukupnih fenolnih spojeva u modelnim probavnim tekućinama u odnosu na mikrokapsule bez dodatka ko-omotača te s dodatkom trehaloze,

- općenito, dokazano je da su primjenjeni omotači bili manje učinkoviti u osiguranju visoke biodostupnosti inkapsuliranih antocijana u odnosu na biodostupnost ostalih fenolnih spojeva,
- biodostupnost galne kiseline, katehina, vanilinske kiseline, procijanidina B2 i epikatehina je bila u rasponu 3 – 55 %, dok je indeks biodostupnosti za 3,4-dihidroksibenzojevu kiselinu, *p*-hidroksibenzojevu kiselinu, galokatehin galat, feruličnu kiselinu, epikatehin galat i *o*-kumarnu kiselinu bio veći od 100 % ovisno o fenolnom spoju i korištenim omotačima,
- kombinacija proteina kozje sirutke i saharoze najbolja kombinacija omotača / najbolji nosač za petudnidin-3-O-glukozid klorid s obzirom vrlo indeks biodostupnosti (527 %) ovog antocijana nakon *in vitro* simulirane probave,
- tijekom jedne godine skladištenja mikrokapsula pri – 80 °C djelomično očuvana stabilnost očuvana je stabilnost fenolnih spojeva (9 od 21 spojeva) i antocijana (2 od 6 spojeva) inicijalno prisutnih u mikrokapsulama prije skladištenja.

Slijedom gore navedenih sumarnih zaključaka potvrđene su pomoćne hipoteze doktorskog rada, odnosno potvrđeno je:

- da je proizvodne ostatke iz dvije različite prehrambene industrije (trop grožđa i kozja sirutka) moguće iskoristiti kao sirovine za proizvodnju novog proizvoda, visokovrijednog nutraceutika, odnosno:
 - ✓ trop grožđa je sirovina pogodna za ekstrakciju prirodnih antioksidanasa,
 - ✓ kozja sirutka i njeni produkti (proteini kozje sirutke) prikladni su inkapsulacijski omotači za ekstrakte koji su bogati šećerima (ekstrakt tropa grožđa) s obzirom na minimalno lijepljenje i prijanjanje raspršenih kapljica na unutrašnje stjenke komore za sušenje, što rezultira visokim prinosima inkapsulacije,
 - ✓ rezultati doktorskog rada ukazuju na značajan potencijal primjene proteina kozje sirutke kao omotača u procesima inkapsulacije različitih bioaktivnih spojeva s obzirom na ostvarene vrijednosti efikasnosti inkapsulacije uz dodatni doprinos bioaktivnim svojstvima inkapsulata vezano uz kemijski sastav te bioaktivna i antimikrobna svojstva same kozje sirutke, što u kombinaciji s bioaktivnim svojstvima

ekstrakta kumine grožđa daje novi visokovrijedni proizvod koji može biti funkcionalni dodatak prehrani i nutraceutik;

- da uvjeti homogenizacije inkapsulacijske smjese, uvjeti sušenja raspršivanjem, kao i dodatak drugog omotača (stabilizatora proteina) utječu na karakteristike i stabilnost proizvedenih mikrokapsula te na biodostupnost fenolnih spojeva iz ekstrakta tropa grožđa tijekom *in vitro* simulirane probave mikrokapsula.

Sve gore navedeno potvrđuje i postavljenu glavnu hipotezu doktorskog rada, koja glasi:

mikroinkapsulacija ekstrakta tropa grožđa sušenjem raspršivanjem, uz korištenje proteina kozje sirutke kao omotača, pospješuje funkcionalna svojstva i stabilnost bioaktivnog izolata tropa grožđa te povećava biodostupnost fenolnih spojeva iz ekstrakta tijekom *in vitro* simulirane probave.

6. LITERATURA

- Abd El-Kader, A., Abu Hashish, H., 2019. Encapsulation techniques of food bioproduct. *Egypt. J. Chem.* 0, 0–0. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2019.16269.1993>
- Abotaleb, M., Liskova, A., Kubatka, P., Büsselberg, D., 2020. Therapeutic Potential of Plant Phenolic Acids in the Treatment of Cancer. *Biomolecules* 10, 221. <https://doi.org/10.3390/biom10020221>
- Ahangaran, F., Navarchian, A.H., Picchioni, F., 2019. Material encapsulation in poly(methyl methacrylate) shell: A review. *J. Appl. Polym. Sci.* 136, 48039. <https://doi.org/10.1002/app.48039>
- Akbarbaglu, Z., Peighambaroust, S.H., Sarabandi, K., Jafari, S.M., 2021. Spray drying encapsulation of bioactive compounds within protein-based carriers; different options and applications. *Food Chem.* 359, 129965. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129965>
- Albuquerque B.R., Heleno S.A., Oliveira M.B.P.P., Barros L., Ferreira I.C.F.R., 2021. Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. *Food Funct.* 12, 14–29. <https://doi.org/10.1039/D0FO02324H>
- Alcântara, M.A., Lima, A.E.A. de, Braga, A.L.M., Tonon, R.V., Galdeano, M.C., Mattos, M. da C., Brígida, A.I.S., Rosenhaim, R., Santos, N.A. dos, Cordeiro, A.M.T. de M., 2019. Influence of the emulsion homogenization method on the stability of chia oil microencapsulated by spray drying. *Powder Technol.* 354, 877–885. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.06.026>
- Alfano, A., D'ambrosio, S., D'Agostino, A., Finamore, R., Schiraldi, C., Cimini, D., 2021. Concentrated Buffalo Whey as Substrate for Probiotic Cultures and as Source of Bioactive Ingredients: A Local Circular Economy Approach towards Reuse of Wastewaters. *Fermentation* 7, 281. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040281>
- Ali, B.H., Ziada, A., Blunden, G., 2009. Biological effects of gum arabic: A review of some recent research. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.07.001>
- Almanza-Oliveros, A., Bautista-Hernández, I., Castro-López, C., Aguilar-Zárate, P., Meza-Carranco, Z., Rojas, R., Michel, M.R., Martínez-Ávila, G.C.G., 2024. Grape Pomace—Advances in Its Bioactivity, Health Benefits, and Food Applications. *Foods* 13, 580. <https://doi.org/10.3390/foods13040580>
- Antonić, B., Jančíková, S., Dordević, D., Tremlová, B., 2020. Grape Pomace Valorization: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Foods* 9, 1627. <https://doi.org/10.3390/foods9111627>
- Arslan, D., 2015. Effects of degradation preventive agents on storage stability of anthocyanins in sour cherry concentrate. *Agronomy Research* 13(4), 892–899.
- Assadpour, E., Jafari, S.M., 2019. Advances in Spray-Drying Encapsulation of Food Bioactive Ingredients: From Microcapsules to Nanocapsules. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 10, 103–131. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121641>
- Assadpour, E., Jafari, S.-M., Maghsoudlou, Y., 2017. Evaluation of folic acid release from spray dried powder particles of pectin-whey protein nano-capsules. *Int. J. Biol. Macromol.* 95, 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.023>
- Avallone, R., Plessi, M., Baraldi, M., Monzani, A., 1997. Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannin. *J. Food Compos. Anal.* 10, 166–172. <https://doi.org/10.1006/jfca.1997.0528>
- Aziz, M.G., Yusof, Y.A., Blanchard, C., Saifullah, M., Farahnaky, A., Scheiling, G., 2018. Material Properties and Tableting of Fruit Powders. *Food Eng. Rev.* 10, 66–80. <https://doi.org/10.1007/s12393-018-9175-0>
- Banožić, M., Vladić, J., Banjari, I., Velić, D., Aladić, K., Jokić, S., 2021. Spray Drying as a Method of Choice for Obtaining High Quality Products from Food Wastes—A Review. *Food Rev. Int.* 39, 1953–1985. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1938601>

- Barros, A., Gironés-Vilaplana, A., Teixeira, A., Baenas, N., Domínguez-Perles, R., 2015. Grape stems as a source of bioactive compounds: application towards added-value commodities and significance for human health. *Phytochem. Rev.* 14, 921–931. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9421-5>
- Baumann, J.M., Adam, M.S., Wood, J.D., 2021. Engineering Advances in Spray Drying for Pharmaceuticals. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 12, 217–240. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-091720-034106>
- Baysan, U., Zungur Bastioğlu, A., Coşkun, N.Ö., Konuk Takma, D., Ülkeryıldız Balçık, E., Sahin-Nadeem, H., Koç, M., 2021. The effect of coating material combination and encapsulation method on propolis powder properties. *Powder Technol.* 384, 332–341. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2021.02.018>
- Bell, D.R., Gochenaur, K., 2006. Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 100, 1164–1170. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00626.2005>
- Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Kalušević, A., Špoljarić, I., Đorđević, V., Komes, D., Mršić, G., Nedović, V., 2015. Efficiency Assessment of Natural Biopolymers as Encapsulants of Green Tea (*Camellia sinensis* L.) Bioactive Compounds by Spray Drying. *Food Bioprocess Technol.* 8, 2444–2460. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1592-y>
- Benvenuti, S., Pellati, F., Melegari, M., Ber^{TE}lli, D., 2004. Polyphenols, Anthocyanins, Ascorbic Acid, and Radical Scavenging Activity of Rubus, Ribes, and Aronia. *J. Food Sci.* 69, FCT164–FCT169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13352.x>
- Beres, C., Costa, G.N.S., Cabezudo, I., Da Silva-James, N.K., Teles, A.S.C., Cruz, A.P.G., Mellinger-Silva, C., Tonon, R.V., Cabral, L.M.C., Freitas, S.P., 2017. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Manag.* 68, 581–594. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017>
- Bögelein, J., Lee, G., 2010. Cyclone selection influences protein damage during drying in a mini spray-dryer. *Int. J. Pharm.* 401, 68–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.023>
- Both, E.M., Boom, R.M., Schutyser, M.A.I., 2020. Particle morphology and powder properties during spray drying of maltodextrin and whey protein mixtures. *Powder Technol.* 363, 519–524. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2020.01.001>
- Botrel, D.A., Borges, S.V., Fernandes, R.V. de B., Antoniassi, R., de Faria-Machado, A.F., Feitosa, J.P. de A., de Paula, R.C.M., 2017. Application of cashew tree gum on the production and stability of spray-dried fish oil. *Food Chem.* 221, 1522–1529. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.141>
- Boyano-Orozco, L., Gallardo-Velázquez, T., Meza-Márquez, O.G., Osorio-Revilla, G., 2020. Microencapsulation of Rambutan Peel Extract by Spray Drying. *Foods* 9, 899. <https://doi.org/10.3390/foods9070899>
- Božanić, R., Barukčić Jurina, I., Lisak Jakopović, K., Tratnik, L., 2014. Possibilities of Whey Utilisation. *Austin J. Nutr. Food Sci.* 2.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Braga, M.B., Rocha, S.C.D.S., Hubinger, M.D., 2018. Spray-Drying of Milk–Blackberry Pulp Mixture: Effect of Carrier Agent on the Physical Properties of Powder, Water Sorption, and Glass Transition Temperature. *J. Food Sci.* 83, 1650–1659. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14187>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U.,

- Macierzanka, A., Mackie, A.R., Martins, C., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C.N., Souchon, I., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Recio, I., 2019. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat. Protoc.* 14, 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Bucić-Kojić, A., Fernandes, F., Silva, T., Planinić, M., Tišma, M., Šelo, G., Šibalić, D., Pereira, D.M., Andrade, P.B., 2020. Enhancement of the anti-inflammatory properties of grape pomace treated by *Trametes versicolor*. *Food Funct.* 11, 680–688. <https://doi.org/10.1039/C9FO02296A>
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Šibalić, D., Tišma, M., 2023. Release of Fermentable Sugars from Corn Silage – The Effect of Biological Pretreatment. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 37, 245–253. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2023.2191>
- Bucurescu, A., Blaga, A.C., Estevinho, B.N., Rocha, F., 2018. Microencapsulation of Curcumin by a Spray-Drying Technique Using Gum Arabic as Encapsulating Agent and Release Studies. *Food Bioprocess Technol.* 11, 1795–1806. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2140-3>
- Bustamante, M.A., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., Pérez-Murcia, M.D., 2008. Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Manag.* 28, 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.01.013>
- Cal, K., Sollohub, K., 2010. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. *J. Pharm. Sci.* 99, 575–586. <https://doi.org/10.1002/jps.21886>
- Caliskan, G., Dirim, S.N., 2016. The effect of different drying processes and the amounts of maltodextrin addition on the powder properties of sumac extract powders. *Powder Technol.* 287, 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.10.019>
- Canalejo, D., Guadalupe, Z., Martínez-Lapuente, L., Ayestarán, B., Pérez-Magariño, S., 2021. Optimization of a method to extract polysaccharides from white grape pomace by-products. *Food Chem.* 365, 130445. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130445>
- Cano-Chauca, M., Stringheta, P.C., Ramos, A.M., Cal-Vidal, J., 2005. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 6, 420–428. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003>
- Carra, J.B., Matos, R.L.N. de, Novelli, A.P., Couto, R.O. do, Yamashita, F., Ribeiro, M.A. dos S., Meurer, E.C., Verri, W.A., Casagrande, R., Georgetti, S.R., Arakawa, N.S., Baracat, M.M., 2022. Spray-drying of casein/pectin bioconjugate microcapsules containing grape (*Vitis labrusca*) by-product extract. *Food Chem.* 368, 130817. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130817>
- Carter, B., Patel, H., Barbano, D.M., Drake, M., 2018. The effect of spray drying on the difference in flavor and functional properties of liquid and dried whey proteins, milk proteins, and micellar casein concentrates. *J. Dairy Sci.* 101, 3900–3909. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13780>
- Casagrande, M., Zanela, J., Pereira, D., de Lima, V.A., Oldoni, T.L.C., Carpes, S.T., 2019. Optimization of the extraction of antioxidant phenolic compounds from grape pomace using response surface methodology. *J. Food Meas. Charact.* 13, 1120–1129. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-00027-x>
- Cassol, L., Noreña, C.P.Z., 2021. Microencapsulation and accelerated stability testing of bioactive compounds of *Hibiscus sabdariffa*. *J. Food Meas. Charact.* 15, 1599–1610. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00757-x>
- Catalkaya, G., Guldiken, B., Capanoglu, E. (2022). Encapsulation of anthocyanin-rich extract from black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) pomace by spray drying using different coating materials. *Food Funct.* 13, 11579–11591, doi:10.1039/D2FO02569H.

- Cattaneo, T.M.P., Marinoni, L., Iametti, S., Monti, L., 2013. Behavior of Aflatoxin M1 in dairy wastes subjected to different technological treatments: Ricotta cheese production, ultrafiltration and spray-drying. *Food Control* 32, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.007>
- Cejudo-Bastante, C., Arjona-Mudarra, P., Fernández-Ponce, M.T., Casas, L., Mantell, C., Martínez de la Ossa, E.J., Pereyra, C., 2021. Application of a Natural Antioxidant from Grape Pomace Extract in the Development of Bioactive Jute Fibers for Food Packaging. *Antioxidants* 10, 216. <https://doi.org/10.3390/antiox10020216>
- Ćelić, G., 2022. Digitalna spektrofotometrijska procjena boje gornjih i donjih prednjih prirodnih zuba (info:eu-repo/semantics/masterThesis). Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. Faculty of Dental Medicine and Health Osijek.
- Chamorro, S., Goñi, I., Viveros, A., Hervert, D., Brenes, A., 2012. Changes in polyphenolic content and antioxidant activity after thermal treatments of grape seed extract and grape pomace. *Eur. Food Res. Technol.* 234. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1621-7>
- Chang, Y.-X., Yang, J.-J., Pan, R.-L., Chang, Q., Liao, Y.-H., 2014. Anti-hygroscopic effect of leucine on spray-dried herbal extract powders. *Powder Technol.* 266, 388–395. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.06.058>
- Chegini, G.R., Ghobadian, B., 2005. Effect of Spray-Drying Conditions on Physical Properties of Orange Juice Powder. *Dry. Technol.* 23, 657–668. <https://doi.org/10.1081/DRT-200054161>
- Chiou, D., Langrish, T.A.G., 2007. Crystallization of Amorphous Components in Spray-Dried Powders. *Dry. Technol.* 25, 1427–1435. <https://doi.org/10.1080/07373930701536718>
- Chowdhary, P., Gupta, A., Gnansounou, E., Pandey, A., Chaturvedi, P., 2021. Current trends and possibilities for exploitation of Grape pomace as a potential source for value addition. *Environ. Pollut.* 278, 116796. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116796>
- Coimbra, P.P.S., Cardoso, F. de S.N., Gonçalves, É.C.B. de A., 2021. Spray-drying wall materials: relationship with bioactive compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 61, 2809–2826. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1786354>
- Ćujic Nikolić, N., Stanisavljević, N., Katarina, Š., Kalušević, A., Nedovic, V., Samardzic, J., Janković, T., 2018. Application of gum Arabic in the production of spray-dried chokeberry polyphenols, microparticles characterisation and in vitro digestion method 38, 10–18.
- Czaja, T., Sobota, A., Szostak, R., 2020. Quantification of Ash and Moisture in Wheat Flour by Raman Spectroscopy. *Foods* 9, 280. <https://doi.org/10.3390/foods9030280>
- da Rosa, C.G., Borges, C.D., Zambiazzi, R.C., Rutz, J.K., da Luz, S.R., Krumreich, F.D., Benvenuti, E.V., Nunes, M.R., 2014. Encapsulation of the phenolic compounds of the blackberry (*Rubus fruticosus*). *LWT - Food Sci. Technol.* 58, 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.042>
- Dag, D., Kilercioglu, M., Oztop, M.H., 2017. Physical and chemical characteristics of encapsulated goldenberry (*Physalis peruviana* L.) juice powder. *LWT - Food Sci. Technol.* 83, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.007>
- Dahlem Júnior, M.A., Dall Agnol, W., Neitzke, N., Felipe dos Santos, A.C., Mendonça Esquredo, V., Neutzling Lehn, D., de Almeida Pinto, L.A., Volken de Souza, C.F., 2022. Spray-Dried Microcapsules of Cheese Whey and Whey Permeate as a Strategy to Protect Chia Oil from Oxidative Degradation. *Food Technology & Biotechnology* Vol. 60 | No. 4, 449-457. <https://doi.org/10.17113/ftb.60.04.22.7451>
- Dávila, I., Robles, E., Egués, I., Labidi, J., Gullón, P., 2017. 2 - The Biorefinery Concept for the Industrial Valorization of Grape Processing By-Products, in: Galanakis, C.M. (Ed.), *Handbook of Grape Processing By-Products*. Academic Press, pp. 29–53. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809870-7.00002-8>

- de Campos, L.M.A.S., Leimann, F.V., Pedrosa, R.C., Ferreira, S.R.S., 2008. Free radical scavenging of grape pomace extracts from *Vitis vinifera*. *Bioresour. Technol.* 99, 8413–8420. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.058>
- De Filippis, B., Ammazzalorso, A., Fantacuzzi, M., Giampietro, L., Maccallini, C., Amoroso, R., 2017. Anticancer Activity of Stilbene-Based Derivatives. *ChemMedChem* 12, 558–570. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700045>
- De Oliveira, M.A., Maia, G.A., De Figueiredo, R.W., De Souza, A.C.R., De Brito, E.S., De Azeredo, H.M.C., 2009. Addition of cashew tree gum to maltodextrin-based carriers for spray drying of cashew apple juice. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 641–645. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01888.x>
- Díaz-Montes, E., 2023. Wall Materials for Encapsulating Bioactive Compounds via Spray-Drying: A Review. *Polymers* 15, 2659. <https://doi.org/10.3390/polym15122659>
- Domínguez-Niño, A., Cantú-Lozano, D., Ragazzo-Sanchez, J.A., Andrade-González, I., Luna-Solano, G., 2018. Energy requirements and production cost of the spray drying process of cheese whey. *Dry. Technol.* 36, 597–608. <https://doi.org/10.1080/07373937.2017.1350863>
- Dorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., Nedović, V., 2015. Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Eng. Rev.* 7, 452–490. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9106-7>
- Dorđević, V., Paraskevopoulou, A., Mantzouridou, F., Lalou, S., Pantić, M., Bugarski, B., Nedović, V., 2016. Encapsulation Technologies for Food Industry, in: Nedović, V., Raspor, P., Lević, J., Tumbas Šaponjac, V., Barbosa-Cánovas, G.V. (Eds.), *Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food*, Food Engineering Series. Springer International Publishing, Cham, pp. 329–382. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24040-4_18
- Elkina, N.A., Grishchenko, M.V., Shchegolkov, E.V., Makhaeva, G.F., Kovaleva, N.V., Rudakova, E.V., Boltneva, N.P., Lushchekina, S.V., Astakhova, T.Y., Radchenko, E.V., Palyulin, V.A., Zhilina, E.F., Perminova, A.N., Lapshin, L.S., Burgart, Y.V., Saloutin, V.I., Richardson, R.J., 2022. New Multifunctional Agents for Potential Alzheimer's Disease Treatment Based on Tacrine Conjugates with 2-Arylhiaziridinylidene-1,3-Diketones. *Biomolecules* 12, 1551. <https://doi.org/10.3390/biom12111551>
- Embiriekah, S., Bulatovic, M., Gnjatovic, M., Vukasinovic-Sekulic, M., Krunic, T., Zaric, D., Rakin, M., 2018. Comparative analysis of functionality of spray dried whey protein hydrolysates obtained by enzymatic and microbial hydrolysis. *Hem. Ind.* 72, 265–274. <https://doi.org/10.2298/HEMIND171121019E>
- European pharmacopoeia, 7th ed. ed, 2010. , European treaty series. Council Of Europe : European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, Strasbourg.
- Farhadi, F., Khameneh, B., Iranshahi, M., Iranshahi, M., 2019. Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phytother. Res.* 33, 13–40. <https://doi.org/10.1002/ptr.6208>
- Fazaeli, M., Emam-Djomeh, Z., Kalbasi Ashtari, A., Omid, M., 2012. Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. *Food Bioprod. Process.* 90, 667–675. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.04.006>
- Ferrari, C.C., Marconi Germer, S.P., Alvim, I.D., de Aguirre, J.M., 2013. Storage Stability of Spray-Dried Blackberry Powder Produced with Maltodextrin or Gum Arabic. *Dry. Technol.* 31, 470–478. <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.742103>
- Fontana, A.R., Antonioli, A., Bottini, R., 2013. Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 61, 8987–9003. <https://doi.org/10.1021/jf402586f>

- Fracassetti, D., Del Bo', C., Simonetti, P., Gardana, C., Klimis-Zacas, D., Ciappellano, S., 2013. Effect of Time and Storage Temperature on Anthocyanin Decay and Antioxidant Activity in Wild Blueberry (*Vaccinium angustifolium*) Powder. *J. Agric. Food Chem.* 61, 2999–3005. <https://doi.org/10.1021/jf3048884>
- Gajendragadkar, C.N., Gogate, P.R., 2016. Intensified recovery of valuable products from whey by use of ultrasound in processing steps – A review. *Ultrason. Sonochem.* 32, 102–118. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.02.023>
- Galani, J.H.Y., Patel, J.S., Patel, N.J., Talati, J.G., 2017. Storage of Fruits and Vegetables in Refrigerator Increases their Phenolic Acids but Decreases the Total Phenolics, Anthocyanins and Vitamin C with Subsequent Loss of their Antioxidant Capacity. *Antioxidants* 6, 59. <https://doi.org/10.3390/antiox6030059>
- Gallo, L., Llabot, J.M., Allemandi, D., Bucalá, V., Piña, J., 2011. Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. *Powder Technol.* 208, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2010.12.021>
- Galves, C., Galli, G., Kurozawa, L., 2023. Potato protein: current review of structure, technological properties, and potential application on spray drying microencapsulation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 63, 6564–6579. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2036093>
- Garau, V., Manis, C., Scano, P., Caboni, P., 2021. Compositional Characteristics of Mediterranean Buffalo Milk and Whey. *Dairy* 2, 469–488. <https://doi.org/10.3390/dairy2030038>
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R., 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.* 40, 1107–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>
- Giacosa, S., Ferrero, L., Paisonni, M.A., Río Segade, S., Gerbi, V., Rolle, L., 2023. Grape skin anthocyanin extraction from red varieties during simulated maceration: Influence of grape seeds and pigments adsorption on their surface. *Food Chem.* 424, 136463. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136463>
- Giovannelli, L., Milanesi, A., Ugazio, E., Fracchia, L., Segale, L., 2021. Effect of Methyl- β -Cyclodextrin and Trehalose on the Freeze-Drying and Spray-Drying of Sericin for Cosmetic Purposes. *Pharmaceuticals* 14, 262. <https://doi.org/10.3390/ph14030262>
- Goering, H.K., Soest, P.J.V., 1970. Forage Fiber Analyses (apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications). U.S. Agricultural Research Service.
- Goula, A.M., Adamopoulos, K.G., 2005. Spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. The effect on powder properties. *J. Food Eng.* 66, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.02.031>
- Goula, A.M., Thymiatis, K., Kaderides, K., 2016. Valorization of grape pomace: Drying behavior and ultrasound extraction of phenolics. *Food Bioprod. Process.* 100, 132–144. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.06.016>
- Grgić, J., Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M., Bucić-Kojić, A., 2020. Role of the Encapsulation in Bioavailability of Phenolic Compounds. *Antioxidants* 9, 923. <https://doi.org/10.3390/antiox9100923>
- Gupta, C., Chawla, P., Arora, S., Tomar, S.K., Singh, A.K., 2015. Iron microencapsulation with blend of gum arabic, maltodextrin and modified starch using modified solvent evaporation method – Milk fortification. *Food Hydrocoll.* 43, 622–628. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.021>
- Gupta, C., Prakash, D., 2017. Therapeutic Potential of Milk Whey. *Beverages* 3, 31. <https://doi.org/10.3390/beverages3030031>
- Guralnick, J.R., Panthi, R.R., Bot, F., Cenini, V.L., O'Hagan, B.M., Crowley, S.V., O'Mahony, J.A., 2021. Pilot-scale production and physicochemical characterisation of spray-dried

- nanoparticulated whey protein powders. *Int. J. Dairy Technol.* 74, 581–591. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12797>
- Hamad, A., Suriyarak, S., Devahastin, S., Borompichaichartkul, C., 2020. A novel approach to develop spray-dried encapsulated curcumin powder from oil-in-water emulsions stabilized by combined surfactants and chitosan. *J. Food Sci.* 85, 3874–3884. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15488>
- Haque, M.A., Chen, J., Aldred, P., Adhikari, B., 2015. Denaturation and Physical Characteristics of Spray-Dried Whey Protein Isolate Powders Produced in the Presence and Absence of Lactose, Trehalose, and Polysorbate-80. *Dry. Technol.* 33, 1243–1254. <https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1023311>
- Hosseini, S.M.H., Emam-Djomeh, Z., Sabatino, P., Van Der Meeren, P., 2015. Nanocomplexes arising from protein-polysaccharide electrostatic interaction as a promising carrier for nutraceutical compounds. *Food Hydrocoll.* 50, 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.006>
- Hurley, W.L., Theil, P.K., 2011. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. *Nutrients* 3, 442–474. <https://doi.org/10.3390/nu3040442>
- Ibn Ferjani, A., Jeguirim, M., Jellali, S., Limousy, L., Courson, C., Akrou, H., Thevenin, N., Ruidavets, L., Muller, A., Bennici, S., 2019. The use of exhausted grape marc to produce biofuels and biofertilizers: Effect of pyrolysis temperatures on biochars properties. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 107, 425–433. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.03.034>
- Ilyas, T., Chowdhary, P., Chaurasia, D., Gnansounou, E., Pandey, A., Chaturvedi, P., 2021. Sustainable green processing of grape pomace for the production of value-added products: An overview. *Environmental Technology & Innovation* Volume 23, 101592. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101592>
- Jara-Palacios, M.J., Hernanz, D., Cifuentes-Gomez, T., Escudero-Gilete, M.L., Heredia, F.J., Spencer, J.P.E., 2015. Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. *Food Chem.* 183, 78–82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.022>
- Jin, Q., O’Hair, J., Stewart, A.C., O’Keefe, S.F., Neilson, A.P., Kim, Y.-T., McGuire, M., Lee, A., Wilder, G., Huang, H., 2019. Compositional Characterization of Different Industrial White and Red Grape Pomaces in Virginia and the Potential Valorization of the Major Components. *Foods* 8, 667. <https://doi.org/10.3390/foods8120667>
- Jolić, N., 2017. Antioksidacijska aktivnost fenola: interakcija derivata hidroksibenzojeve kiseline (info:eu-repo/semantics/bachelorThesis). University of Split. Faculty of Chemistry and Technology. Division of Engineering and Chemistry.
- Kalušević, A.M., Lević, S.M., Čalića, B.R., Milić, J.R., Pavlović, V.B., Bugarski, B.M., Nedović, V.A., 2017. Effects of different carrier materials on physicochemical properties of microencapsulated grape skin extract. *J. Food Sci. Technol.* 54, 3411–3420. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2790-6>
- Kamiloglou, S., Ozkan, G., Isik, H., Horoz, O., Van Camp, J., Capanoglu, E., 2017. Black carrot pomace as a source of polyphenols for enhancing the nutritional value of cake: An in vitro digestion study with a standardized static model. *LWT, Volume 77*, 475–481. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.002>
- Kandasamy, S., Yoo, J., Yun, J., Kang, H.-B., Seol, K.-H., Kim, H.-W., Ham, J.-S., 2021. Application of Whey Protein-Based Edible Films and Coatings in Food Industries: An Updated Overview. *Coatings* 11, 1056. <https://doi.org/10.3390/coatings11091056>
- Kaur, R., Sharma, M., Ji, D., Xu, M., Agyei, D., 2020. Structural Features, Modification, and Functionalities of Beta-Glucan. *Fibers* 8, 1. <https://doi.org/10.3390/fib8010001>

- Kelly, G.M., O'Mahony, J.A., Kelly, A.L., O'Callaghan, D.J., 2016. Effect of hydrolyzed whey protein on surface morphology, water sorption, and glass transition temperature of a model infant formula. *J. Dairy Sci.* 99, 6961–6972. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10447>
- Kerasiotti, E., Stagos, D., Georgatzi, V., Bregou, E., Priftis, A., Kafantaris, I., Kouretas, D., 2016. Antioxidant Effects of Sheep Whey Protein on Endothelial Cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, e6585737. <https://doi.org/10.1155/2016/6585737>
- Keshani, S., Montazeri, M.H., Daud, W.R.W., Nourouzi, M.M., 2015. CFD Modeling of Air Flow on Wall Deposition in Different Spray Dryer Geometries. *Dry. Technol.* 33, 784–795. <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.966201>
- Kim, E.H.-J., Chen, X.D., Pearce, D., 2005. Effect of surface composition on the flowability of industrial spray-dried dairy powders. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 46, 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.11.005>
- Koc, B., Yilmazer, M.S., Balkır, P., Ertekin, F.K., 2010. Spray Drying of Yogurt: Optimization of Process Conditions for Improving Viability and Other Quality Attributes. *Dry. Technol.* 28, 495–507. <https://doi.org/10.1080/07373931003613809>
- Koç, M., Güngör, Ö., Zungur, A., Yalçın, B., Sele, İ., Ertekin, F.K., Ötles, S., 2015. Microencapsulation of Extra Virgin Olive Oil by Spray Drying: Effect of Wall Materials Composition, Process Conditions, and Emulsification Method. *Food Bioprocess Technol.* 8, 301–318. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1404-9>
- Korz, S., Sadzik, S., More, C., Buchmann, C., Richling, E., Munoz, K., 2023. Effect of Grape Pomace Varieties and Soil Characteristics on the Leaching Potential of Total Carbon, Nitrogen and Polyphenols. *Soil Syst.* 7, 49. <https://doi.org/10.3390/soilsystems7020049>
- Koutelidakis, A., 2016. Grape Pomace: A Challenging Renewable Resource of Bioactive Phenolic Compounds with Diversified Health Benefits. *MOJ Food Process. Technol.* 3. <https://doi.org/10.15406/mojfpt.2016.03.00065>
- Królczyk, J.B., Dawidziuk, T., Janiszewska-Turak, E., Sołowiej, B., 2016. Use of Whey and Whey Preparations in the Food Industry – a Review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 66, 157–165. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2015-0052>
- Ku, S.-K., Yoon, E.-K., Lee, W., Kwon, S., Lee, T., Bae, J.-S., 2016. Antithrombotic and antiplatelet activities of pelargonidin in vivo and in vitro. *Arch. Pharm. Res.* 39, 398–408. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0708-x>
- Kumar, N., Goel, N., 2019. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol. Rep.* 24, e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>
- Kurozawa, L., Morassi, A., Vanzo, A., Park, K., Hubinger, M., 2009. Influence of Spray Drying Conditions on Physicochemical Properties of Chicken Meat Powder. *Dry. Technol.* 27, 1248–1257. <https://doi.org/10.1080/07373930903267187>
- Lee, C.-W., Oh, H.-J., Han, S.-H., Lim, S., 2012. Effects of hot air and freeze drying methods on physicochemical properties of citrus “Hallabong” powders. *Food Sci. Biotechnol.* 21. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0217-8>
- Lehn, D.N., Esquerdo, V.M., Dahlem Júnior, M.A., Dall’Agnol, W., dos Santos, A.C.F., de Souza, C.F.V., de Almeida Pinto, L.A., 2018. Microencapsulation of different oils rich in unsaturated fatty acids using dairy industry waste. *J. Clean. Prod.* 196, 665–673. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.06.127>
- Li, C., Yu, W., Wu, P., Chen, X.D., 2020. Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends Food Sci. Technol.* 96, 114–126. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.015>

- Li, R., Lin, D., Roos, Y.H., Miao, S., 2019. Glass transition, structural relaxation and stability of spray-dried amorphous food solids: A review. *Dry. Technol.* 37, 287–300. <https://doi.org/10.1080/07373937.2018.1459680>
- Li, Y.H., Wang, W.J., Meng, Y.C., Chen, J., 2015. Formation and Gelation Role of Serum Protein Aggregates during the Manufacture of Milk Powder. *J. Food Process Eng.* 38, 299–308. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12163>
- Liang, Z., Pai, A., Liu, D., Luo, J., Wu, J., Fang, Z., Zhang, P., 2020. Optimizing extraction method of aroma compounds from grape pomace. *J. Food Sci.* 85, 4225–4240. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15533>
- Liao, M., Ma, L., Miao, S., Hu, X., Liao, X., Chen, F., Ji, J., 2021. The in-vitro digestion behaviors of milk proteins acting as wall materials in spray-dried microparticles: Effects on the release of loaded blueberry anthocyanins. *Food Hydrocoll.* 115, 106620. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106620>
- Licciardello, F., Wittenauer, J., Saengerlaub, S., Reinelt, M., Stramm, C., 2015. Rapid assessment of the effectiveness of antioxidant active packaging—Study with grape pomace and olive leaf extracts. *Food Packag. Shelf Life* 6, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2015.08.001>
- Liobikas, J., Skemiene, K., Trumbeckaite, S., Borutaite, V., 2016. Anthocyanins in cardioprotection: A path through mitochondria. *Pharmacol. Res.* 113, 808–815. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.036>
- Lu, W., Yang, X., Shen, J., Li, Z., Tan, S., Liu, W., Cheng, Z., 2021. Choosing the appropriate wall materials for spray-drying microencapsulation of natural bioactive ingredients: Taking phenolic compounds as examples. *Powder Technol.* 394, 562–574. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2021.08.082>
- Luchian, C.E., Cotea, V.V., Vlase, L., Toiu, A.M., Colibaba, L.C., Răschip, I.E., Nadăș, G., Gheldiu, A.M., Tuchiluş, C., Rotaru, L., 2019. Antioxidant and antimicrobial effects of grape pomace extracts. *BIO Web Conf.* 15, 04006. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191504006>
- Lukinac Čačić, J., 2012. Matematičko modeliranje i optimiranje kinetike promjene boje kruha tijekom pečenja (info:eu-repo/semantics/doctoralThesis). Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY. Department of Process Engineering. Sub-department of Modelling, Optimisation and Automatisation.
- Marinova, D., Ribarova, F., Atanassova, M., 2005. Total phenolics and flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *J. Univ. Chem. Technol. Metall.* 40, 255–260.
- Marín-Peñalver, D., Alemán, A., Montero, M.P., Gómez-Guillén, M.C., 2021. Entrapment of natural compounds in spray-dried and heat-dried iota-carrageenan matrices as functional ingredients in surimi gels. *Food Funct.* 12, 2137–2147. <https://doi.org/10.1039/D0FO02922J>
- Marshall, K., 2004. Therapeutic applications of whey protein. *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.* 9, 136–156.
- Martinić, A., Kalušević, A., Lević, S., Nedović, V., Vojvodić Cebin, A., Karlović, S., Špoljarić, I., Mršić, G., Žižek, K., Komes, D., 2022. Microencapsulation of Dandelion (*Taraxacum officinale* L.) Leaf Extract by Spray Drying. *Food Technol. Biotechnol.* 60, 237–252. <https://doi.org/10.17113/ftb.60.02.22.7384>
- Martinović, J., Lukinac, J., Jukić, M., Ambrus, R., Planinić, M., Šelo, G., Klarić, A.-M., Perković, G., Bucić-Kojić, A., 2023a. Physicochemical Characterization and Evaluation of Gastrointestinal In Vitro Behavior of Alginate-Based Microbeads with Encapsulated Grape Pomace Extracts. *Pharmaceutics* 15, 980. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030980>
- Martinović, J., Lukinac, J., Jukić, M., Ambrus, R., Planinić, M., Šelo, G., Klarić, A.-M., Perković, G., Bucić-Kojić, A., 2023b. In Vitro Bioaccessibility Assessment of Phenolic Compounds from

- Encapsulated Grape Pomace Extract by Ionic Gelation. *Molecules* 28, 5285. <https://doi.org/10.3390/molecules28135285>
- Medeiros, G.K.V.V., Queiroga, R.C.R.E., Costa, W.K.A., Gadelha, C.A.A., e Lacerda, R.R., Lacerda, J.T.J.G., Pinto, L.S., Braganhol, E., Teixeira, F.C., de S. Barbosa, P.P., Campos, M.I.F., Gonçalves, G.F., Pessôa, H.L.F., Gadelha, T.S., 2018. Proteomic of goat milk whey and its bacteriostatic and antitumour potential. *Int. J. Biol. Macromol.* 113, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.200>
- Medina-Torres, L., García-Cruz, E.E., Calderas, F., González Laredo, R.F., Sánchez-Olivares, G., Gallegos-Infante, J.A., Rocha-Guzmán, N.E., Rodríguez-Ramírez, J., 2013. Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*). *LWT - Food Sci. Technol.* 50, 642–650. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.038>
- Meira, A.C.F.D.O., Morais, L.C.D., Figueiredo, J.D.A., Veríssimo, L.A.A., Botrel, D.A., Resende, J.V.D., 2023. Microencapsulation of β -carotene using barley residue proteins from beer waste as coating material. *J. Microencapsul.* 40, 171–185. <https://doi.org/10.1080/02652048.2023.2183277>
- Mendoza-Wilson, A.M., Armenta-Vázquez, M.E., Castro-Arredondo, S.I., Espinosa-Plascencia, A., Robles-Burgueño, M. del R., González-Ríos, H., González-León, A., Baladrán-Quintana, R.R., 2013. Potential of polyphenols from an aqueous extract of apple peel as inhibitors of free radicals: An experimental and computational study. *J. Mol. Struct.* 1035, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.09.035>
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Brodtkorb, A., 2014. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct* 5, 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Mis-Solval, K.E., Jiang, N., Yuan, M., Joo, K.H., Cavender, G.A., 2019. The Effect of the Ultra-High-Pressure Homogenization of Protein Encapsulants on the Survivability of Probiotic Cultures after Spray Drying. *Foods* 8, 689. <https://doi.org/10.3390/foods8120689>
- Moghbeli, S., Jafari, S.M., Maghsoudlou, Y., Dehnad, D., 2019. Influence of pectin-whey protein complexes and surfactant on the yield and microstructural properties of date powder produced by spray drying. *J. Food Eng.* 242, 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.08.025>
- Moreno, T., de Paz, E., Navarro, I., Rodríguez-Rojo, S., Matías, A., Duarte, C., Sanz-Buenhombre, M., Cocero, M.J., 2016. Spray Drying Formulation of Polyphenols-Rich Grape Marc Extract: Evaluation of Operating Conditions and Different Natural Carriers. *Food Bioprocess Technol.* 9, 2046–2058. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1792-0>
- Moslemi, M., Hosseini, H., Erfan, M., Mortazavian, A.M., Fard, R.M.N., Neyestani, T.R., Komeyli, R., 2014. Characterisation of spray-dried microparticles containing iron coated by pectin/resistant starch. *Int. J. Food Sci. Technol.* 49, 1736–1742. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12483>
- Mozos, I., Flangea, C., Vlad, D.C., Gug, C., Mozos, C., Stoian, D., Luca, C.T., Horbańczuk, J.O., Horbańczuk, O.K., Atanasov, A.G., 2021. Effects of Anthocyanins on Vascular Health. *Biomolecules* 11, 811. <https://doi.org/10.3390/biom11060811>
- Mudnic, I., Modun, D., Rastija, V., Vukovic, J., Brizic, I., Katalinic, V., Kozina, B., Medic-Saric, M., Boban, M., 2010. Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. *Food Chem.* 119, 1205–1210. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.038>
- Muñoz, P., Morales, M.P., Mendivil, M.A., Juárez, M.C., Muñoz, L., 2014. Using of waste pomace from winery industry to improve thermal insulation of fired clay bricks. Eco-friendly way of building

- construction. *Constr. Build. Mater.* 71, 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2014.08.027>
- Navarro-Flores, M.J., Ventura-Canseco, L.M.C., Meza-Gordillo, R., Ayora-Talavera, T. del R., Abud-Archila, M., 2020. Spray drying encapsulation of a native plant extract rich in phenolic compounds with combinations of maltodextrin and non-conventional wall materials. *J. Food Sci. Technol.* 57, 4111–4122. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04447-w>
- Nedić, R., 2023. Utjecaj ultrazvučne homogenizacije na uspješnost mikroinkapsulacije ekstrakta tropa grožđa s proteinima kozje sirutke (info:eu-repo/semantics/masterThesis). Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY. Department of Process Engineering. Sub-department of Unit Operations.
- Nežić, I., Sander, A., Meštrović, E., Čavuzić, D., 2019. Production of stable amorphous form by means of spray drying. *Part. Sci. Technol.* 37, 632–642. <https://doi.org/10.1080/02726351.2017.1417936>
- Nguyen, D.Q., Nguyen, T.H., Mounir, S., Allaf, K., 2018. Effect of feed concentration and inlet air temperature on the properties of soymilk powder obtained by spray drying. *Dry. Technol.* 36, 817–829. <https://doi.org/10.1080/07373937.2017.1357040>
- Niazi, M.B.K., Broekhuis, A.A., 2012. Production of amorphous starch powders by solution spray drying. *J. Appl. Polym. Sci.* 126. <https://doi.org/10.1002/app.36551>
- Nishanthi, M., Chandrapala, J., Vasiljevic, T., 2018. Physical properties of selected spray dried whey protein concentrate powders during storage. *J. Food Eng.* 219, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.09.021>
- Ogolla, J.A., Kulig, B., Bădulescu, L., Okoth, M.W., Esper, G., Breitenbach, J., Hensel, O., Sturm, B., 2019. Influence of Inlet Drying Air Temperature and Milk Flow Rate on the Physical, Optical and Thermal Properties of Spray-Dried Camel Milk Powders. *Food Bioprocess Technol.* 12, 751–768. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-2243-5>
- Ohtake, S., Wang, Y.J., 2011. Trehalose: Current Use and Future Applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(6), 2020–2053. doi:10.1002/jps.22458
- Oliveira, B.E., Junior, P.C.G., Cilli, L.P., Contini, L.R.F., Venturini, A.C., Yoshida, C.M.P., Braga, M.B., 2018. Spray-drying of grape skin-whey protein concentrate mixture. *J. Food Sci. Technol.* 55, 3693–3702. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3299-3>
- Ong, M.Y., Yusof, Y.A., Aziz, M.G., Chin, N.L., Amin, N.A.Mohd., 2014. Characterisation of fast dispersible fruit tablets made from green and ripe mango fruit powders. *J. Food Eng.* 125, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.014>
- Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R., 2016. Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Papoutsis, K., Golding, J.B., Vuong, Q., Pristijono, P., Stathopoulos, C.E., Scarlett, C.J., Bowyer, M., 2018. Encapsulation of Citrus By-Product Extracts by Spray-Drying and Freeze-Drying Using Combinations of Maltodextrin with Soybean Protein and ι -Carrageenan. *Foods* 7, 115. <https://doi.org/10.3390/foods7070115>
- Patel, R.P., Suthar, M.P.P. and A.M., 2009. Spray drying technology: an overview. *Indian J. Sci. Technol.* 2, 44–47. <https://doi.org/10.17485/ijst/2009/v2i10.3>
- Peanparkdee, M., Iwamoto, S., Yamauchi, R., 2016. MICROENCAPSULATION: A REVIEW OF APPLICATIONS IN THE FOOD AND PHARMACEUTICAL INDUSTRIES. *Rev. Agric. Sci.* 4. <https://doi.org/10.7831/ras.4.56>
- Peighambardoust, S.H., Golshan Tafti, A., Hesari, J., 2011. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 22, 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.01.009>

- Peixoto, C.M., Dias, M.I., Alves, M.J., Calhelha, R.C., Barros, L., Pinho, S.P., Ferreira, I.C.F.R., 2018. Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chem.* 253, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.163>
- Pino, J.A., Aragüez-Fortes, Y., Bringas-Lantigua, M., 2018. Optimization of spray-drying process for concentrated orange juice. *Acta Aliment.* 47, 417–424. <https://doi.org/10.1556/066.2018.47.4.4>
- Plainfossé, H., Trinel, M., Verger-Dubois, G., Azoulay, S., Burger, P., Fernandez, X., 2020. Valorisation of *Ribes nigrum* L. Pomace, an Agri-Food By-Product to Design a New Cosmetic Active. *Cosmetics* 7, 56. <https://doi.org/10.3390/cosmetics7030056>
- Poozesh, S., Bilgili, E., 2019. Scale-up of pharmaceutical spray drying using scale-up rules: A review. *Int. J. Pharm.* 562, 271–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.047>
- Poozesh, S., Jafari, S.M., Akafuah, N.K., 2020. Interrogation of a new inline multi-bin cyclone for sorting of produced powders of a lab-scale spray dryer. *Powder Technol.* 373, 590–598. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2020.07.012>
- Posavec, J., 2017. Utjecaj veličine čestica na svojstva tečenja granulata (info:eu-repo/semantics/masterThesis). University of Zagreb. Faculty of Pharmacy and Biochemistry. Department of pharmaceutical technology.
- Pralhadrao, J.V., Arora, S., Shilpashree, B.G., Sharma, V., Singh, A.K., Panjagari, N.R., 2021. Standardization of model for the production of spray dried whey protein-zinc complex and its acceptability in milk. *LWT* 137, 110450. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110450>
- Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J., 2012. Cheese whey management: A review. *J. Environ. Manage.* 110, 48–68. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>
- Puš, M., 2023. Utjecaj parametara miješanja pojne smjese na svojstva mikrokapsula ekstrakta tropa grožđa dobivenih u procesu sušenja raspršivanjem (info:eu-repo/semantics/masterThesis). Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY. Department of Process Engineering. Sub-department of Unit Operations.
- Rafiq, S., Nayik, G.A., Kaul, R., Kumar, H., Rodriguez, A.R. 2023. Utilization of maltodextrin and whey protein concentrate for micro-encapsulation of Kinnow peel extract in breadsticks. *Curr. Nutr. Food Sci.* 19, 188–196, doi:10.2174/1573401318666220517200926.
- Ramakrishnan, S., Ferrando, M., Aceña-Muñoz, L., Mestres, M., De Lamo-Castellví, S., Güell, C., 2014. Influence of Emulsification Technique and Wall Composition on Physicochemical Properties and Oxidative Stability of Fish Oil Microcapsules Produced by Spray Drying. *Food Bioprocess Technol.* 7, 1959–1972. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1187-4>
- Ramos, O.L., Pereira, R.N., Rodrigues, R.M., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., Malcata, F.X., 2016. Whey and Whey Powders: Production and Uses, in: *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, pp. 498–505. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00747-9>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
- Ribeiro, H.S., Schuchmann, H.P., Engel, R., Walz, E., Briviba, K., 2010. Encapsulation of Carotenoids, in: Zuidam, N.J., Nedovic, V. (Eds.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer, New York, NY, pp. 211–252. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1008-0_8
- Ricaurte, L., Prieto, R., Perea-Flores, M.J., Quintanilla-Carvajal, M.X., 2017. Influence of Milk Whey on High-Oleic Palm Oil Nanoemulsions: Powder Production, Physical and Release Properties. *Food Biophys.* 12, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11483-017-9500-9>
- Richards, A., Krakowka, S., Dexter, L., Schmid, H., Wolterbeek, A. P., Waalkens-Berendsen, D., Kurimoto, M., 2002. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and

- results of multiple safety studies. *Food and Chemical Toxicology*, 40(7), 871–898. doi:10.1016/s0278-6915(02)00011-x
- Roccia, P., Martínez, M.L., Llabot, J.M., Ribotta, P.D., 2014. Influence of spray-drying operating conditions on sunflower oil powder qualities. *Powder Technol.* 254, 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.01.044>
- Rockenbach, I.I., Rodrigues, E., Gonzaga, L.V., Caliari, V., Genovese, M.I., Gonçalves, A.E. de S.S., Fett, R., 2011. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chem.* 127, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.137>
- Rodrigues, D.B., Marques, M.C., Hacke, A., Loubet Filho, P.S., Cazarin, C.B.B., Mariutti, L.R.B., 2022. Trust your gut: Bioavailability and bioaccessibility of dietary compounds. *Curr. Res. Food Sci.* 5, 228–233. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.01.002>
- Rondeau, P., Gambier, F., Jolibert, F., Brosse, N., 2013. Compositions and chemical variability of grape pomaces from French vineyard. *Ind. Crops Prod.* 43, 251–254. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.053>
- Ryan, M.P., Walsh, G., 2016. The biotechnological potential of whey. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 15, 479–498. <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9402-1>
- Saffari, M.M., Farzi, M., Emam-Djomeh, Z., Moini, S., Mohammadifar, M.A., 2013. Applying Iranian Gum Tragacanth to Improve Textural Properties of Maltodextrin Microcapsules. *J. Texture Stud.* 44, 12–20. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2012.00359.x>
- Saifullah, Md., Shishir, M.R.I., Ferdowsi, R., Tanver Rahman, M.R., Van Vuong, Q., 2019. Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review. *Trends Food Sci. Technol.* 86, 230–251. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.030>
- Samborska, K., Boostani, S., Geranpour, M., Hosseini, H., Dima, C., Khoshnoudi-Nia, S., Rostamabadi, H., Falsafi, S.R., Shaddel, R., Akbari-Alavijeh, S., Jafari, S.M., 2021. Green biopolymers from by-products as wall materials for spray drying microencapsulation of phytochemicals. *Trends Food Sci. Technol.* 108, 297–325. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.008>
- Sánchez-Osorno, D.M., Caicedo Paz, A.V., López-Jaramillo, M.C., Villa, A.L., Martínez-Galán, J.P., 2022. Protection of Mono and Polyunsaturated Fatty Acids from Grapeseed Oil by Spray Drying Using Green Biopolymers as Wall Material. *Foods* 11, 3954. <https://doi.org/10.3390/foods11243954>
- Sansone, F., Mencherini, T., Picerno, P., d'Amore, M., Aquino, R.P., Lauro, M.R., 2011. Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. *J. Food Eng.* 105, 468–476. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.03.004>
- Santana Andrade, J.K., Chagas Barros, R.G., Pereira, U.C., Nogueira, J.P., Gualberto, N.C., Santos de Oliveira, C., Shanmugam, S., Narain, N., 2022. Bioaccessibility of bioactive compounds after in vitro gastrointestinal digestion and probiotics fermentation of Brazilian fruits residues with antioxidant and antidiabetic potential. *LWT* 153, 112469. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112469>
- Santhalakshmy, S., Don Bosco, S.J., Francis, S., Sabeena, M., 2015. Effect of inlet temperature on physicochemical properties of spray-dried jamun fruit juice powder. *Powder Technol.* 274, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.01.016>
- Santos, D., Maurício, A., Sencadas, V., Santos, J., Fernandes, M., Gomes, P., 2018. Spray Drying: An Overview. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72247>
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, Tannins: Analysis and Biological Effects in Ruminant Feeds 91, 21–40. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0)

- Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M., Grgić, J., Perković, G., Koceva Komlenić, D., Bucić-Kojić, A., 2022. A Comparative Study of the Influence of Various Fungal-Based Pretreatments of Grape Pomace on Phenolic Compounds Recovery. *Foods* 11, 1665. <https://doi.org/10.3390/foods11111665>
- Shalaby, E., Shanab, S., 2013. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *Afr J Pharm Pharmacol* 7.
- Shetty, N., Cipolla, D., Park, H., Zhou, Q.T., 2020. Physical stability of dry powder inhaler formulations. *Expert Opin. Drug Deliv.* 17, 77–96. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1702643>
- Shi, Q., Fang, Z., Bhandari, B., 2013. Effect of Addition of Whey Protein Isolate on Spray-Drying Behavior of Honey with Maltodextrin as a Carrier Material. *Dry. Technol.* 31, 1681–1692. <https://doi.org/10.1080/07373937.2013.783593>
- Shishir, M.R.I., Chen, W., 2017. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. *Trends Food Sci. Technol.* 65, 49–67. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.006>
- Siacor, F.D.C., Lim, K.J.A., Cabajar, A.A., Lobarbio, C.F.Y., Lacks, D.J., Taboada, E.B., 2020. Physicochemical properties of spray-dried mango phenolic compounds extracts. *J. Agric. Food Res.* 2, 100048. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2020.100048>
- Sidlagatta, V., Chilukuri, S.V.V., Devana, B.R., Dasi, S.D., Rangaswamy, L., 2020. Effect of Maltodextrin Concentration and Inlet Air Temperature on Properties of Spray Dried Powder from Reverse Osmosis Concentrated Sweet Orange Juice. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 63, e20190538. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020190538>
- Singh, B., Hathan, B.S., 2017. Process optimization of spray drying of beetroot Juice. *J. Food Sci. Technol.* 54, 2241–2250. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2659-8>
- Sinopoli, A., Calogero, G., Bartolotta, A., 2019. Computational aspects of anthocyanidins and anthocyanins: A review. *Food Chem.* 297, 124898. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.172>
- Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocco, E., Trombetta, D., 2016. Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. *Phytother. Res.* 30, 1265–1286. <https://doi.org/10.1002/ptr.5642>
- Smithers, G.W., 2015. Whey-ing up the options – Yesterday, today and tomorrow. *Int. Dairy J.*, 7th International Whey Conference 48, 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.011>
- Sobieralska, M., Kurek, M.A., 2019. Beta-Glucan as Wall Material in Encapsulation of Elderberry (*Sambucus nigra*) Extract. *Plant Foods Hum. Nutr.* 74, 334–341. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00741-x>
- Song, J., Yu, Y., Chen, M., Ren, Z., Chen, L., Fu, C., Ma, Z., feei, Li, Z., 2022. Advancement of Protein- and Polysaccharide-Based Biopolymers for Anthocyanin Encapsulation. *Front. Nutr.* 9.
- Sousa, E.C., Uchôa-Thomaz, A.M.A., Carioca, J.O.B., Morais, S.M. de, Lima, A. de, Martins, C.G., Alexandrino, C.D., Ferreira, P.A.T., Rodrigues, A.L.M., Rodrigues, S.P., Silva, J. do N., Rodrigues, L.L., 2014. Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera* L.), Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil. *Food Sci. Technol.* 34, 135–142. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612014000100020>
- Stratil, P., Klejdus, B., Kubáň, V., 2006. Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables Evaluation of Spectrophotometric Methods. *J. Agric. Food Chem.* 54, 607–616. <https://doi.org/10.1021/jf052334j>
- Šturm, L., Osojnik Črnivec, I.G., Istenič, K., Ota, A., Megušar, P., Slukan, A., Humar, M., Levic, S., Nedović, V., Kopinč, R., Deželak, M., Pereyra Gonzales, A., Poklar Ulrih, N., 2019. Encapsulation of non-dewaxed propolis by freeze-drying and spray-drying using gum Arabic, maltodextrin and inulin as coating materials. *Food Bioprod. Process.* 116, 196–211. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.05.008>

- Tarko, T., Duda-Chodak, A., Zajac, N., 2013. Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro simulation methods. A review. *Rocz. Państw. Zakładu Hig.* 64.
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D.A., Garcia-Viguera, C., 2014. Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 15638–15678. <https://doi.org/10.3390/ijms150915638>
- Teleszko, M., Nowicka, P., Wojdyło, A., 2016. Effect of cultivar and storage temperature on identification and stability of polyphenols in strawberry cloudy juices. *J. Food Compos. Anal.* 54, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.09.009>
- Thiviya, P., Gamage, A., Kapilan, R., Merah, O., Madhujith, T., 2022. Single Cell Protein Production Using Different Fruit Waste: A Review. *Separations* 9, 178. <https://doi.org/10.3390/separations9070178>
- Tiwari, P., Anand, 2015. *Practical Biochemistry: A Student Companion*.
- Tolun, A., Altintas, Z., Artik, N., 2016. Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization. *J. Biotechnol.* 239, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.001>
- Tonon, R.V., Brabet, C., Hubinger, M.D., 2008. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *J. Food Eng.* 88, 411–418. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.02.029>
- Tonon, R.V., Brabet, C., Pallet, D., Brat, P., Hubinger, M.D., 2009. Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 1950–1958. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02012.x>
- Tontul, I., Topuz, A., 2017. Spray-drying of fruit and vegetable juices: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties. *Trends Food Sci. Technol.* 63, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.009>
- Tropea, A., Ferracane, A., Albergamo, A., Potorti, A.G., Lo Turco, V., Di Bella, G., 2022. Single Cell Protein Production through Multi Food-Waste Substrate Fermentation. *Fermentation* 8, 91. <https://doi.org/10.3390/fermentation8030091>
- Tsermoula, P., Khakimov, B., Nielsen, J.H., Engelsen, S.B., 2021. WHEY - The waste-stream that became more valuable than the food product. *Trends Food Sci. Technol.* 118, 230–241. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.025>
- Vehring, R., Snyder, H., Lechuga-Ballesteros, D., 2020. Spray Drying, in: *Drying Technologies for Biotechnology and Pharmaceutical Applications*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 179–216. <https://doi.org/10.1002/9783527802104.ch7>
- Verruck, S., De Liz, G.R., Dias, C.O., De Mello Castanho Amboni, R.D., Prudencio, E.S., 2019. Effect of full-fat goat's milk and prebiotics use on Bifidobacterium BB-12 survival and on the physical properties of spray-dried powders under storage conditions. *Food Res. Int.* 119, 643–652. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.042>
- Vu, H.T., Scarlett, C.J., Vuong, Q.V., 2020. Encapsulation of phenolic-rich extract from banana (*Musa cavendish*) peel. *J. Food Sci. Technol.* 57, 2089–2098. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04243-6>
- Wang, L.-X., Wang, H.-L., Huang, J., Chu, T.-Z., Peng, C., Zhang, H., Chen, H.-L., Xiong, Y.-A., Tan, Y.-Z., 2022. Review of lignans from 2019 to 2021: Newly reported compounds, diverse activities, structure-activity relationships and clinical applications. *Phytochemistry* 202, 113326. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113326>
- Wang, W., Zhou, W., 2015. Characterisation of spray dried soy sauce powders made by adding crystalline carbohydrates to drying carrier. *Food Chem.* 168, 417–422. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.065>

- Warncke, M., Keienburg, S., Kulozik, U., 2021. Cold-Renneted Milk Powders for Cheese Production: Impact of Casein/Whey Protein Ratio and Heat on the Gelling Behavior of Reconstituted Rennet Gels and on the Survival Rate of Integrated Lactic Acid Bacteria. *Foods* 10, 1606. <https://doi.org/10.3390/foods10071606>
- Waterhouse, A.L., 2002. Determination of total phenolics. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* 6, II-1.
- Waterhouse, G.I.N., Sun-Waterhouse, D., Su, G., Zhao, H., Zhao, M., 2017. Spray-Drying of Antioxidant-Rich Blueberry Waste Extracts; Interplay Between Waste Pretreatments and Spray-Drying Process. *Food Bioprocess Technol.* 10, 1074–1092. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1880-9>
- Wendt Thiex, N.J., Latimer, G.W., Jr. (Eds.), 2023. Protein, in: *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*. Oxford University Press, p. 0. <https://doi.org/10.1093/9780197610145.003.038>
- Wijiani, N., Isadiartuti, D., Rijal, M.A.S., Yusuf, H., 2020. Characterization and Dissolution Study of Micellar Curcumin-Spray Dried Powder for Oral Delivery. *Int. J. Nanomedicine Volume* 15, 1787–1796. <https://doi.org/10.2147/IJN.S245050>
- Wilkes, K., Howard, L.R., Brownmiller, C., Prior, R.L., 2014. Changes in Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) Polyphenols during Juice Processing and Storage. *J. Agric. Food Chem.* 62, 4018–4025. <https://doi.org/10.1021/jf404281n>
- Wong, C.W., Lim, W.T., 2016. Storage stability of spray-dried papaya (*Carica papaya* L.) powder packaged in aluminium laminated polyethylene (ALP) and polyethylene terephthalate (PET) 23, 1887–1894.
- Xie, X., Chen, C., Fu, X., 2021. Study on the bioaccessibility of phenolic compounds and bioactivities of passion fruit juices from different regions in vitro digestion. *J. Food Process. Preserv.* 45. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15056>
- Zandona, E., Blažić, M., Režek Jambrak, A., 2021. Whey Utilization: Sustainable Uses and Environmental Approach. *Food Technol. Biotechnol.* 59, 147–161. <https://doi.org/10.17113/ftb.59.02.21.6968>
- Zbicinski, I., Ciesielski, K., Ge, B., 2022. Mechanism of Particle Agglomeration for Single and Multi-Nozzle Atomization in Spray Drying: A Review. *Processes* 10, 727. <https://doi.org/10.3390/pr10040727>
- Zhu, F., Du, B., Xu, B., 2016. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocoll.* 52, 275–288. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.003>
- Ziaee, A., Albadarin, A.B., Padrela, L., Femmer, T., O'Reilly, E., Walker, G., 2019. Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: Critical parameters and experimental process optimization approaches. *Eur. J. Pharm. Sci.* 127, 300–318. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.10.026>
- Zotarelli, M.F., da Silva, V.M., Durigon, A., Hubinger, M.D., Laurindo, J.B., 2017. Production of mango powder by spray drying and cast-tape drying. *Powder Technol.* 305, 447–454. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2016.10.027>
- Zotarelli, M.F., Durigon, A., da Silva, V.M., Hubinger, M.D., Laurindo, J.B., 2022. Rehydration of mango powders produced by cast-tape drying, freeze drying, and spray drying. *Dry. Technol.* 40, 175–187. <https://doi.org/10.1080/07373937.2020.1777562>
- Zou, Z., Duley, J.A., Cowley, D.M., Reed, S., Arachchige, B.J., Bhandari, B., Shaw, P.N., Bansal, N., 2022. Physicochemical Properties and Whey Proteomes of Camel Milk Powders Produced by Different Concentration and Dehydration Processes. *Foods* 11, 727. <https://doi.org/10.3390/foods11050727>

Web 1: [https://en.wikipedia.org/wiki/\(E\)-Stilbene](https://en.wikipedia.org/wiki/(E)-Stilbene) (26.11.2024.)