

# Utjecaj parametara miješanja pojne smjese na svojstva mikrokapsula ekstrakta tropa grožđa dobivenih u procesu sušenja raspršivanjem

---

Puš, Matej

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:986032>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**

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**

**Matej Puš**

**UTJECAJ PARAMETARA MIJEŠANJA POJNE SMJESE NA SVOJSTVA  
MIKROKAPSULA EKSTRAKTA TROPA GROŽĐA DOBIVENIH U  
PROCESU SUŠENJA RASPRŠIVANJEM**

**DIPLOMSKI RAD**

Osijek, rujan 2023.

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

**Diplomski sveučilišni studij procesno inženjerstvo****Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija**Nastavni predmet:** Jedinične operacije u procesnom inženjerstvu**Tema rada** je prihvaćena na VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2022./2023. održanoj 22. svibnja 2023.**Mentor:** prof. dr. sc. Mirela Planinić**Pomoć pri izradi:** Gabriela Perković, mag. ing. techn. aliment.**Utjecaj parametara miješanja pojne smjese na svojstva mikrokapsula ekstrakta tropa grožđa dobivenih u procesu sušenja raspršivanjem**

Matej Puš, 0113143709

**Sažetak:** Trop grožđa i kozja sirutka, nusproizvodi su koji nastaju nakon proizvodnje primarnog proizvoda, vina i kozjeg sira. U većini slučajeva ova dva vrijedna nusproizvoda se nepravilno odlažu na deponije, spaljuju ili neadekvatno koriste kao gnojivo. Primjenom novih europskih regulativa, takav način upravljanja otpadom je neprihvatljiv. Trop grožđa i sirutka, nusproizvodi visoke nutritivne vrijednosti u današnje vrijeme su pronašli primjenu u različitim industrijama. Jedan od mogućih načina iskorištenja ovih nusproizvoda je proizvodnja visoko vrijednih nutraceutika što uključuje ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz tropa grožđa te njihovu stabilizaciju inkapsulacijom uz primjenu tehnike sušenja raspršivanja i korištenje sirutke kao omotača. U ovom radu istražen je utjecaj parametara miješanja pojne smjese na fizikalna svojstva mikrokapsula ekstrakta tropa grožđa dobivenih u procesu sušenja raspršivanjem. Prema Box-Bhenken eksperimentalnom planu provedeno je ukupno 15 eksperimenata s različitim kombinacijama ispitivanih parametara miješanja na magnetnoj miješalici (temperature, vremena i brzine miješanja). Primjenom metodom odzivnih površina utvrđeno je da ispitivani parametri miješanja unutar eksperimentalnog raspona nemaju statistički značaja utjecaj svojstva praha (mikrokapsula) proizvedenog sušenjem raspršivanjem. Numeričkom optimizacijom parametri: 50 °C, 10 min i 600 rpm određeni su kao optimalni uvjeti miješanja smjese ekstrakta tropa grožđa i kozje sirutke.

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

**Ključne riječi:** Kozja sirutka, trop grožđa, sušenje raspršivanjem, inkapsulacija**Rad sadrži:** 56 stranica  
21 slika  
16 tablica  
54 literaturnih referenci**Jezik izvornika:** hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

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

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

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**University Josip Juraj Strossmayer in Osijek**  
**Faculty of Food Technology Osijek**  
**Department of Process Engineering**  
**Subdepartment of Mechanical, Thermal and Separation Processes**  
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

**Graduate study program process engineering**

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

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

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

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

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

**The Influence of Liquid Feed Mixing on the Properties of Grape Pomace Extract Microcapsules Prepared by Spray Drying Method**

Matej Puš, 0113143709

**Summary:** Grape pomace and goat whey are by-products obtained in the production of the main products, wine and goat cheese. In most cases, these two valuable by-products are improperly disposed of in landfills, incinerated, or inadequately used as fertilizers. With the application of the new EU regulations, such waste management is unacceptable. Grape pomace and whey, by-products with high nutritional value, are now used in various industries. One of the ways to utilize these by-products is the production of high value nutraceuticals, which involves the extraction of bioactive compounds from grapes and their stabilization by encapsulation using spray drying technique and the use of whey as a coating. In this thesis, the influence of the mixing parameters of the feed solution on the physical properties of the microcapsules of the grape pomace extract obtained by the spray-drying method was studied. According to the Box-Bhenken experimental design, a total of 15 experiments were carried out with different combinations of the studied mixing parameters on a magnetic stirrer (temperature, time and mixing speed). By applying the response surface method, it was found that the tested mixing parameters had no statistically significant effect on the properties of the powder (microcapsules) produced by spray drying within the experimental range. Numerical optimization was used to determine the parameters: 50 °C, 10 min and 600 rpm as optimal mixing conditions for the mixture of tropical grape extract and goat whey.

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

**Key words:** Goat whey, grape pomace, spray drying, encapsulation

**Thesis contains:** 56 pages  
21 figures  
16 tables  
54 references

**Original in:** Croatian

**Defense committee:**

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

**Defense date:** September 28, 2023

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

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Mireli Planinić što mi je pružila priliku izrade diplomskog rada, te na izdvojenom vremenu i pomoći pri izradi rada. Također se zahvaljujem Gabrieli Perković, mag. ing. techn. aliment na strpljenju, ispravcima, pomoći tijekom odrađivanja praktičnog dijela rada i savjetima pri izradi diplomskog rada.

Posebno hvala mojoj djevojci Gabrieli na strpljenju, razumijevanju i riječima ohrabrenja kad je bilo najpotrebnije.

Hvala prijatelju Radenku Nediću s kojim sam prolazio kroz sve probleme i lijepe trenutke tijekom odrađivanja praktičnog dijela rada.

Zahvaljujem se i svim kolegama i prijateljima koji su mi olakšali ove studentske dane i učinili ih zabavnim.

Hvala mojoj obitelji na podršci tijekom studiranja.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	4
2.1. Trop grožđa .....	5
2.1.1. Bioaktivne komponente tropa grožđa .....	6
2.2 Kruto-tekuća ekstrakcija .....	7
2.2.1. Prijenos mase u kruto-tekućoj ekstrakciji .....	8
2.3. Inkapsulacija.....	8
2.3.1. Sušenje raspršivanjem .....	9
2.3.2. Parametri sušenja raspršivanjem.....	14
2.3.3. Omotači .....	15
2.4. Miješanje.....	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	20
3.1. Zadatak.....	21
3.2. Materijali.....	21
3.2.1. Kemikalije.....	21
3.3. Metode.....	22
3.3.1. Box-Behnkenov plan pokusa i metoda odzivnih površina .....	22
3.3.2. Priprema ekstrakta tropa grožđa .....	23
3.3.3. Sušenje raspršivanjem (inkapsulacija) .....	25
3.3.4. Određivanje udjela vlage/suhe tvari .....	26
3.3.5. Određivanje prinosa inkapsulacije .....	26
3.3.6. Određivanje ukupne promjene boje .....	27
3.3.7. Gustoća praha prije i nakon potresanja.....	28
3.3.8. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva.....	30
3.3.9. Određivanje površinskih polifenola .....	33
3.3.10. Određivanje topivosti mikrokapsula (praha) .....	34
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	36
5. ZAKLJUČAK.....	50
6. LITERATURA .....	52

## **1. UVOD**

Rast populacije i povećana konzumacije prerađene hrane dovelo je do povećanja količina otpada i nusproizvoda koju generira prehrambena industrija. Posljedice nedovoljnog iskorištavanja sirovina ne samo da dovode do ekoloških problema i financijskih gubitaka nego se gube i vrlo važni izvori bioaktivnih tvari.

Grožđe je jedno od najčešće uzgajanih voćnih kultura i oko 80 % se koristi za proizvodnju vina pri čemu zaostaje oko 25 % nusproizvoda u obliku tropa. Trop grožđa, nusproizvod koji zaostaje nakon prešanja grožđa, najčešće se odlaže u okoliš, koristi kao gnojivo ili spaljuje što može imati nepovoljan utjecaj na okoliš poput nepoželjnih mirisa. Iako bogat vlaknima, lipidima, proteinima, polifenolima, ovaj nusproizvod još uvijek je nedovoljno iskorišten (Šelo, 2022; Tolun i sur., 2016). Posljednjih godina sve su brojnija istraživanja na temu iskorištenja tropa grožđa i polifenola koje ovaj vrijedni nusproizvod sadrži. Trop grožđa se koristi u raznim industrijama, npr. u kozmetičkoj industriji kao dodatak raznim preparatima, zatim kao dodatak hrani za životinje, a dakako najveće zanimanje za njegovo iskorištavanje je u prehrambenoj industriji pri osmišljavanju nove funkcionalne hrane.

Sirutka je žuto-zelena tekućina koja zaostaje tijekom proizvodnje sira, a prema prosječnom kemijskom sastavu 93 % sirutke je voda. Sirutka je nusproizvod s velikim potencijalom, no unatoč tome veliki dio sirutke se koristi kao gnojivo ili ispušta u prirodne recipijente bez prethodne obrade. Prema li literaturi, Matijević (2018), tona sirutke ispuštena u okoliš bez prethodne obrade uzrokuje opterećenje koje je jednako onome koje uzrokuje 470 ljudi. Obzirom na štetne utjecaje koje ima po okoliš i na vrijedne sastojke koje sirutka sadrži, danas se sirutka nastoji što više iskoristiti u obliku proizvoda ili sirovine. Sirutka se uglavnom prerađuje u izolate/koncentrate proteina, stočnu hranu, itd. Također, istražuje se mogućnost primjene sirutke i/ili njezinih proteinskih izolata/koncentrata u postupcima inkapsulacije, odnosno kao omotača koji različitim bioaktivnim spojevima može osigurati dugotrajnu stabilnosti.

Sušenje raspršivanje (eng. *spry drying*) je tehnika pomoću koje se tekuća ili polutekuća smjesa raspršuje u komori za sušenje gdje dolazi u kontakt s vrućim plinom (zrakom) pri čemu se gubi vlagu te prelazi u prah. Proces je brz, a termolabilni sastojci ostaju zaštićeni. Ciklon se koristi za odvajanje praha od vrućeg plina. Pomoću ove tehnike moguće je inkapsulirati bioaktivne sastojke i tako im produžiti vijek trajanja, povećati stabilnost ili omogućiti kontrolirano otpuštanje u organizam. Uspješnost inkapsulacije bioaktivnih tvari koja se ostvaruje sušenjem



raspršivanjem ovisi o mnogo procesnih parametara, uključujući pripremu smjese bioaktivnih tvari i omotača prije samog postupka sušenja raspršivanjem.

U ovom radu ispitan je utjecaj parametra homogenizacije tekuće smjese sastavljene od bioaktivne tvari (ekstrakt trop grožđa) i omotač (kozja sirutka) na inkapsulacijsku efikasnost i svojstva mikrokapsula, odnosno praha dobivenog u procesu sušenja raspršivanjem.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Trop grožđa

Godišnja proizvodnja grožđa za Republiku Hrvatsku u 2020. godini iznosi 123550,0 tona. (FAOSTAT, 2023). Od ukupne količine proizvedenog grožđa oko 80 % se upotrebljava za proizvodnju vina, a od te količine oko 25 % čini trop, nusproizvod koji nastaje tijekom prešanja grožđa. Prema literaturi, Skračić i sur. (2023), na svakih 6 L vina generira se oko 1 kg tropa grožđa što govori da se na globalnoj razini godišnje proizvede oko 9 milijuna tona ovog nusprodukta. Trop grožđa je lignocelulozni materijal koji se sastoji od kožice, sjemenki, manjeg dijela pulpe i peteljki, a njegov kemijski sastav kao i zastupljenost navedenih dijelova ovisi o procesu vinifikacije, prešanju i sorti grožđa (Skračić i sur. 2023). Udio kožice u tropu iznosi 65 %<sub>s.t.</sub>, dok udio sjemenki varira u rasponu 15 – 52 %<sub>s.t.</sub>. Trop sadrži 9,2 – 14,5 % celuloze, 4,0 – 10,3 % hemiceluloze i 11,6 – 42,2 % lignina, nadalje sadrži 2,7 – 49,1 % šećera, 7,0 – 23,5 % proteina te 4,8 – 6,7 % ukupnih polifenola (Šelo, 2022). Trop kao otpad najčešće se odlaže u vinogradima ili spaljuje što dovodi do velikih ekoloških problema kao što su onečišćenje podzemnih i površinskih voda, zakiseljavanje tla, smanjenje kisika u tlu, nakupine tropa mogu privući štetočine koje šire bolesti, itd. (Antonić i sur., 2020; Šelo, 2022). Posljednjih godina objavljen je veliki broj radova koji istražuju primjenu tropa grožđa u različitim industrijama. U Republici Hrvatskoj najčešći način iskorištenja tropa grožđa je za proizvodnju rakije (komovice). Komovica se često koristi za proizvodnju drugih alkoholnih pića i različitih likera. Miješanjem tropa s drugim organskim biljnim materijalima se može učinkovito provoditi kompostiranje i može se koristiti za proizvodnju bioetanolu i bioplina (Skračić i sur. 2023). U **Tablici 1.** dan je pregled nekih novijih istraživanja mogućnosti ponovne upotrebe tropa.

Iako ima bogat kemijski sastav, trop grožđa se najčešće povezuje s fenolnim spojevima koji mogu imati primjenu u različitim industrijama (Šelo, 2022).

**Tablica 1.** Neki primjeri upotrebe tropa (Skračić i sur., 2023)

INDUSTRIJA	PRIMJENA	ZNAČAJKA	LITERATURA
Kozmetička	Kozmetički preparati	Fenoli i esencijalna ulja zbog dobre antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti mogu zamijeniti sintetske aditive.	Ferreira i Santos, 2022
	Kozmetički preparati	Ekstrakti kao inhibitori aktivnosti enzima koji utječu na starenje kože.	Matos i sur., 2019
Industrija hrane za životinje	Hrana za perad	Dodatak tropa ima pozitivan učinak na imunološki i antioksidacijski status jedinki.	Mavrommatis i sur., 2021
Prehrambena	Sir	Dodatak tropa siru nije narušio fizikalno - kemijske karakteristike, te je povećao sadržaj fenola i antioksidacijsku aktivnost uzorka.	Marchiani i sur., 2016
	Keksi	Dodatak tropa je rezultiralo boljim nutritivnim i antioksidativnim statusom proizvoda. Produljenje roka trajanja.	Theagarajan i sur., 2019

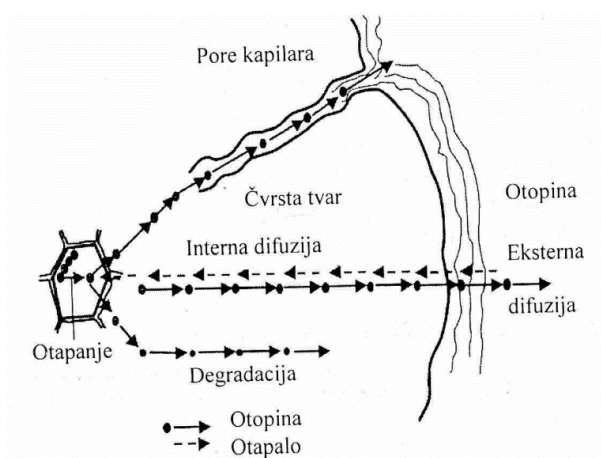
### 2.1.1. Bioaktivne komponente tropa grožđa

Fenolni spojevi su glavne bioaktivne kemikalije u vinu i nusproizvodima proizvodnje vina (Cvejić Hogervorst i sur., 2017). Fenolni spojevi predstavljaju sekundarne metabolite biosintetskog puta fenilpropanoida i flavonoida, te puta šikiminske kiseline, također mogu nastajati i pri stresnim uvjetima okoline kao što su mikrobne infekcije, UV zračenje ili ozljede (Šelo, 2022; Bucić-Kojić, 2008). Brojne su klasifikacije fenolnih spojeva, ali svima je zajedničko da imaju najmanje jedan aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih skupina (Grgić i sur., 2020). Najzastupljenije fenolne spojeve u grožđu predstavljaju flavonoidi i fenolne kiseline (Bucić-Kojić, 2008). Fenoli u hrani su odgovorni za okus, boju, miris i trpkost, osim organoleptičkog utjecaja fenoli povoljno utječu i na zdravlje, imaju antioksidativni učinak, djeluju antikancerogeno, antidijabetički, imaju povoljan utjecaj na mozak i kardio sustav (Grgić i sur., 2020). Prema literaturi Bucić-Kojić i sur. (2012) neki fenolni spojevi mogu djelovati i antireumatski, antimikrobno, antialergeno i vazodilatacijski. Zbog navedenih prednosti fenolnih spojeva i spoznaje koliko otpada bogatog fenolnim spojevima vinska industrija generira, posljednjih godina proveden je veliki broj istraživanja na temu utjecaja fenolnih tvari na ljudski organizam, te izolacije bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda. Kako bi se dobio visokokvalitetan ekstrakt tropa grožđa treba u obzir uzeti različite parametre. Na sastav ekstrakata ne utječu samo uvjeti proizvodnje, sorta grožđa i zastupljenost pojedinih dijelova grožđa, veliki utjecaj imaju i otapala primijenjena za ekstrakciju i fizikalno-kemijski uvjeti

procesa proizvodnje. Dodatan utjecaj na sastav imaju i uvjeti skladištenja i predobrada (Šelo, 2022). Najčešća metoda ekstrakcije fenolnih spojeva iz tropa grožđa je kruto-tekuća ekstrakcija (Bucić-Kojić, 2008).

## 2.2 Kruto-tekuća ekstrakcija

Separacijski proces u kojem se koristi odgovarajuće otapalo za izdvajanje jedne ili više komponenti iz čvrstog materijala, dakle prijenos tvari odvija se iz čvrste tvari. Najvažniji korak za efikasnu provedbu ekstrakcije je odabir otapala, otapalo mora biti selektivno prema tvari koja se ekstrahira. Za ekstrakciju fenolnih tvari iz tropa grožđa te tako i ostalih nusproizvoda vinske industrije najčešće se primjenjuje etanol, metanol, propanol, aceton i dr. (Bucić-Kojić 2008; Šelo, 2022). Kruto-tekuća ekstrakcija se može provoditi pri povišenoj temperaturi (Soxhlet) ili pri sobnoj temperaturi (perkolacija, maceracija) (Jurić, 2022). Metanol kao otapalo daje visoke prinose, no toksičnost metanola ograničava njegovu primjenu i zbog toga se koristi samo u analitičke svrhe. Etanol je otapalo koje je povoljnije za okoliš i priznato od strane Europske agencije za sigurnost hrane, stoga se i češće koristi (EFSA, 2011). Ekstraktibilnost osim o otapalu ovisi i o: kemijskoj prirodi fenolnih tvari, temperaturi, vremenu ekstrakcije, veličini čestica, miješanju i dr. Sam proces kruto-tekuće ekstrakcije prikazan ja na **Slika 1.** i sastoji se od nekoliko osnovnih koraka: ulazak otapala u materijal, otapanje sastojaka materijala, transport otapala s otopljenom tvari na površinu krute tvari, transport otopine u glavnu masu otopine, te razdvajanje ekstrakta i krutog ostatka (Bucić-Kojić, 2008). Smjesa acetona i vode ili alkohola i vode se koristi za ekstrakciju fenolnih kiselina (Brglez Mojzer i sur., 2016).



**Slika 1.** Shema osnovnih koraka ekstrakcije tvari iz krute tvari pomoću otapala (Bucić-Kojić, 2008)

### 2.2.1. Prijenos mase u kruto-tekućoj ekstrakciji

Zbog razlika u koncentraciji, između faza koje su u kontaktu, odvija se prijenos mase u smjeru uspostavljanja ravnoteže. Kada je kruta tvar u kontaktu s otapalom na njezinoj površini nastaje granični sloj, odnosno sloj zasićene otopine. Ako se taj sloj ne bi uklonio ili se ravnoteža ne bi smetala, prestalo bi otapanje, odnosno ekstrakcija. Otopljenu/ekstrahiranu tvar je potrebno ukloniti iz graničnog sloja kako ne bi došlo do prestanka prijenosa tvari. Otopljena tvar se uklanja na dva načina: molekularnom difuzijom i vrtložnom difuzijom, tj. u molekularnom i molarnom mjerilu. Zbog različite specifične mase otopine i otapala, te razlika temperatura graničnog sloja i otopine, nastaju konvekcijska strujanja, te nema čiste difuzije. Isto tako nema niti čiste konvekcije zbog postojanja graničnog sloja. Brzina prijenosa tvari odnosno količina tvari koja u jedinici vremena prolazi kroz granični sloj iz čvrste tvari u otapalo izračunava se prema jednadžbi **(1)** (Jurić, 2022; Tomas i sur., 2013):

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

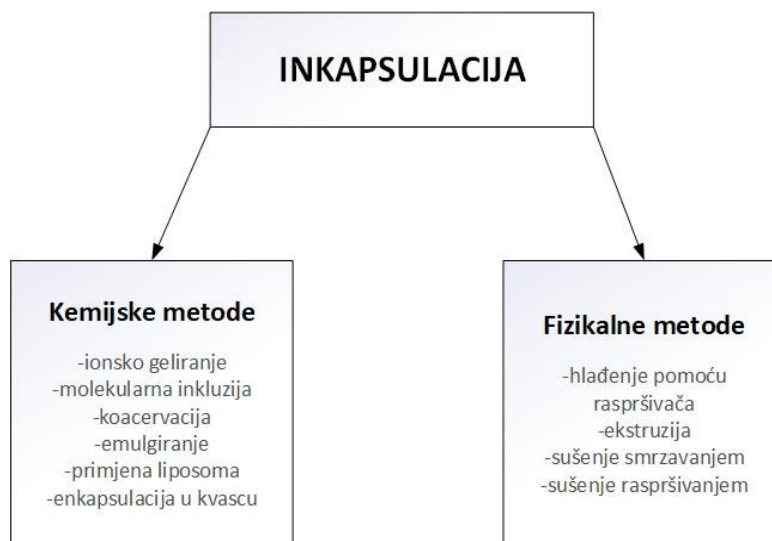
gdje je:

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

### 2.3. Inkapsulacija

U posljednje vrijeme veliku važnost pridobivaju istraživanja na temu funkcionalne hrane i iskorištavanja nusproizvoda određenih industrija. Bioaktivne komponente poput biljnih polifenola, omega-3-masnih kiselina, vitamina i minerala nalaze se u velikim količinama u nusproizvodima prehrambene industrije, te se nastoje iskoristiti. Bioaktivne komponente mogu biti prirodno sadržane u hrani ili se dodaju hrani te takva hrana (funkcionalna hrana) ima poboljšanu biološku aktivnost (antibakterijska, antioksidativna, antivirusna, protuupalna svojstva) i veću nutritivnu vrijednost. Na bioaktivnosti navedenih komponenti utječu vlaga, temperatura, pH i svjetlost, te ih je zato potrebno zaštititi (Nemet, 2023; Đorđević i sur., 2016). Postupkom inkapsulacije se takvi spojevi zaštićuju. Inkapsulacija se definira kao proces u kojem

se aktivna tvar (jezgra) oblaže omotačem (membrana, ljuska, kapsula, matriks) radi zaštite aktivne tvari (Saifullah i sur., 2019). Postoje različiti načini inkapsulacije, a osnovna podjela prikazana je na **Slici 2**. Osnovna razlika između različitih načina inkapsulacije je u primijenjenim parametrima kao što su fizikalna i kemijska svojstva faza, veličina čestica i mehanizmi oslobađanja inkapsuliranih tvari (Jafari, 2017).



**Slika 2.** Osnovna podjela procesa inkapsuliranja

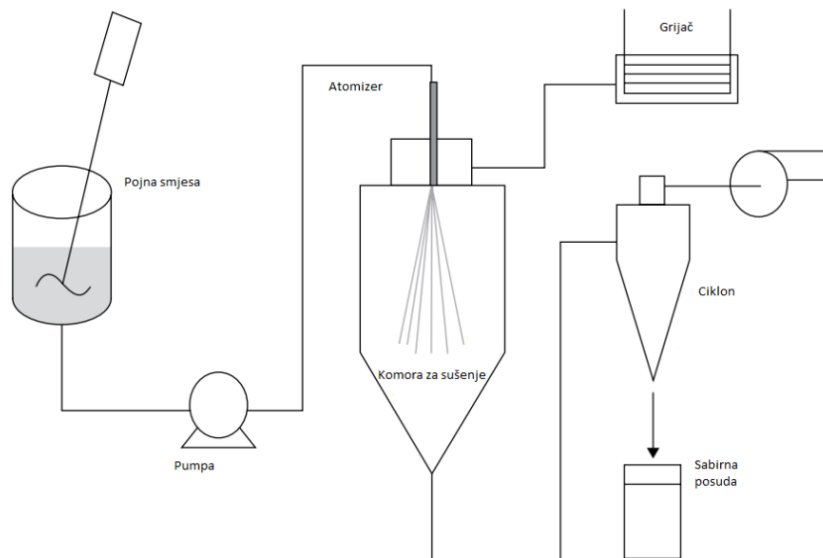
### 2.3.1. Sušenje raspršivanjem

Jedna od učinkovitih metoda inkapsulacije je primjena metode sušenja raspršivanjem.

Razvijanje opreme i tehnike sušenja raspršivanjem trajalo je od 1870-tih do 1900-tih, no prva komercijalna upotreba je bila 1920-tih za proizvodnju mlijeka u prahu. Za vrijeme Drugog svjetskog rata ova jedinična operacija je dobila na značaju zbog mogućnosti proizvodnje hrane reducirane mase. Sušenje raspršivanjem je jedinična operacija kojom se tekućina prevodi u čestice suhog praha procesom atomizacije u struji vrućeg zraka. Jedinstveno je zbog svoje mogućnosti proizvodnje praha s ujednačenom veličinom čestica i sadržajem vlage tijekom cijelog procesa bez obzira na kapacitet sušionika i temperaturnu osjetljivost produkta. Sušenje raspršivanjem omogućuje brzi prijelaz tekućine koja može biti u obliku otopine, emulzije i suspenzije u oblik praha, aglomerata ili granula (mikrokapsula) veličine 10 – 50  $\mu\text{m}$  do 2 – 3 mm (Gharsallaoui i sur., 2007). Koristi se kao tehnika za postizanje mikrobiološke i kemijske stabilnosti proizvoda, smanjenje mase što olakšava distribuciju i skladištenje, te se može

koristiti za poboljšanje boje ili prikrivanje nepoželjne arome. Neke prednosti ovog procesa su niska temperatura krajnjeg proizvoda i nizak sadržaj vlage, što konačan proizvod čini stabilnim, a velika površina na kojoj se odvija izmjena topline za ishod ima kratak period sušenja. Glavni nedostatak ove tehnike su visoki investicijski troškovi. Na **Slici 3.** prikazani su osnovni dijelovi sušionika s raspršivanjem, a to su: komora za sušenje, pumpa, grijač zraka, separator (najčešće ciklon) te raspršivač (atomizer) (Banožić i sur., 2023). Inkapsulacija sušenjem raspršivanjem je jedan od najstarijih načina inkapsulacijskih tehnika, prvi puta primijenjena 1930-tih za inkapsulaciju aroma sa nosačem guma arabika (Tahmaz, 2019). Inkapsulacija sušenjem raspršivanjem je najčešće korišten postupak inkapsulacije u prehrambenoj industriji, proces je ekonomičan i fleksibilan (Trifkovic i sur., 2016; Tahmaz, 2019). Prema literaturi, sušenje raspršivanjem je najčešće korištena metoda za inkapsuliranje bioaktivnih komponenti (Saifullah i sur., 2019). Osnovni princip ove metode je tvorba smjese aktivne tvari i omotača. Smjesa (pojna otopina, suspenzija, emulzija) se peristaltičkom pumpom dovodi do mlaznice i raspršuje u komoru za sušenje gdje dolazi do zagrijavanja i isparavanja vode pomoću struje vrućeg zraka. Suhe čestice padaju na dno komore, uz dodatno korištenje ciklona za odvajanje finijih čestica (Đorđević i sur., 2016). Veličina čestica praha uglavnom ovisi o veličini otvora atomizera (Shishir i Chen, 2017). Ulazna temperatura vrućeg zraka je obično 150 – 220 °C. U raspršenoj smjesi se zajedno nalaze molekule aktivne tvari i molekule omotača. Koncentracija omotača je uvijek veća od koncentracije aktivne tvari, te su stoga molekule aktivne tvari uvijek okružene molekulama omotača. Na taj način dolazi do inkapsulacije jer nakon isparavanja vode molekule omotača oblažu molekule aktivne tvari (Tahmaz, 2019). U industrijskom pogledu najvažnije je što sušenje raspršivanjem može proizvoditi velike količine mikrokapsula, naravno postoje neki ograničavajući faktori. Jedan od njih je materijal koji se može koristiti kao omotač. Neki od tih omotača su maltodekstrin, guma arabika, proteini sirutke, proteini soje, škrob, itd. (Đorđević i sur., 2016). Veliku ulogu ima odabir omotača zbog utjecaja na ciljanu isporuku i kontrolirano otpuštanje te tako utječe i na biodostupnost aktivne tvari. Zahtjevi za omotač su da je inertan prema aktivnoj tvari i okolini te da ima potrebna svojstva kako bi zaštitio aktivnu tvar kao što su fleksibilnost, nepropusnost, čvrstoća, stabilnost, biorazgradivost (Grgić i sur., 2020).





**Slika 3.** Shema sušenja raspršivanjem (Jurić, 2017)

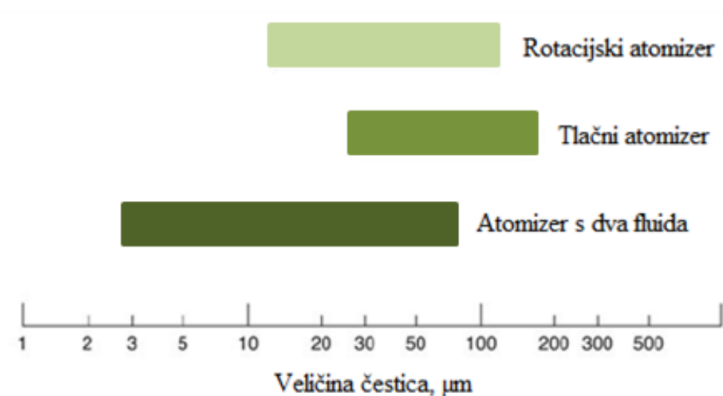
Sam proces sušenja raspršivanjem sastoji se od nekoliko koraka, kako je navedeno u nastavku.

#### ***Priprema sirovine***

Sirovina se najčešće homogenizira i koncentrira kako bi se smanjio udio vode i time smanjila potrebna energija za isparavanje. Emulziji se dodaju aditivi kako vi se spriječilo pjenjenje. Gubitak hlapivih tvari arome smanjuje se dodatkom manje hlapljivih spojeva (Banožić i sur., 2023; Tontul i Topuz, 2017).

#### ***Atomizacija***

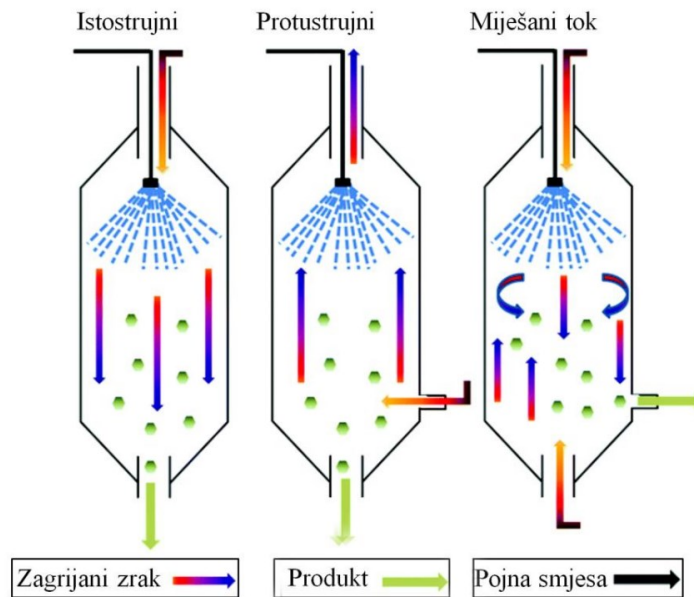
Ključan korak procesa sušenja raspršivanjem je atomizacija. Atomizacija je provođenje pojne smjese kroz uređaj za raspršivanje (atomizer) u komoru za sušenje gdje se veliki broj sitnih kapljica sirovine suši u struji zraka. Atomizer prevodi pojnu smjesu u sitne kapljice i time se povećava ukupna površina kapljica što direktno utječe na brzinu isparavanja vode. Na izbor uređaja za raspršivanje utječe količina pojne smjese, viskoznost te veličina čestica, a najčešće korišteni uređaji su rotacijski atomizer, pneumatske mlaznice, ultrazvučne mlaznice, dualne tlačne mlaznice i tlačne mlaznice (Tontul i Topuz 2017; O'Sullivan i sur., 2019). Na **Slici 4.** prikazan je raspon veličina čestica koje je moguće postići različitim uređajima za atomizaciju.



**Slika 4.** Prikaza veličina čestica koje je moguće postići različitim atomizerima (Milosavljević, 2017)

### ***Kontakt kapljica i vrućeg zraka***

U komori za sušenje dolazi do kontakta raspršenih kapljica sirovine s vrućim zrakom što rezultira zagrijavanjem i isparavanjem vode iz kapljice. Svaka kapljica postaje zasebna čestica praha. Razlikujemo 3 modela strujanja unutar komore (**Slika 5.**) ovisno o smjeru strujanja zraka u odnosu na dotok sirovine, a to su: istostrujno (eng. *co-current*), protustrujno (eng. *counter-current*) i miješano strujanje (eng. *mixed flow*) (Tontul i Topuz, 2017). Najčešća izvedba u prehrambenoj industriji je istostrujno strujanje kod kojeg se vrući zrak dovodi u istom smjeru kao i raspršena sirovina. Istostrujno strujanje se koristi kod termolabilnih sastojaka jer je u tom slučaju vrući zrak s najvišom temperaturom u doticaju s kapljicom s najvišim sadržajem vlage. Kod protustrujnog strujanja vrući zrak struji prema smjeru dotoka sirovine. Protustrujno strujanje se smatra najekonomičnijim načinom strujanja. Kapljice dolaze u kontakt s hladnijim zrakom i tako se postepeno zagrijavaju i dolazi do brzog isparavanja. Miješano strujanje je kombinacija prva dva načina strujanja. Kao i kod protustrujnog strujanja, kapljice s najnižim sadržajem vlage dolaze u kontakt sa zrakom najviše temperature i zbog toga oba načina nisu pogodna za sušenje termolabilnih sastojaka (Banožić i sur., 2023).



Slika 5. Tri modela strujanja (Milosavljević, 2017)

### ***Sušenje raspršenih kapljica***

Sušenje kapljica se odvija u tri koraka (Tontul i Topuz, 2017):

- nakon kontakta kapljice i zraka temperatura kapljice se povisuje
- pri konstantnoj temperaturi i parcijalnom tlaku vodene pare se provodi isparavanje vode, a brzina sušenja je jednaka brzini difuzije
- temperatura zraka i čestice praha se izjednačavaju.

### ***Odvajanje suhih čestice i vlažnog zraka***

Najveće čestice praha se izdvajaju na dnu komore za sušenje dok se one lakše odvajaju pomoću ciklona. Dodatno, uz ciklone se koriste i filteri za one najsitnije čestice te skruberi za hlapljive čestice (Banožić i sur., 2023).

Proizvodi dobiveni tehnikom sušenja raspršivanjem imaju veću stabilnost, bioaktivnost i bioraspoloživost te niže troškove skladištenja i transporta. Dobiveni prah se može koristiti kao dodatak prehrani, ugrađivati u proizvode s ciljem dobivanja funkcionalnih proizvoda, može se komprimirati u tablete ili ugraditi u kapsule. Da bi se dobio prah odgovarajuće kvalitete, a istovremeno postigla učinkovitost i ekonomičnost procesa, potrebno je optimirati proces. Najznačajniji zahtjevi za prah su: niski sadržaj vlage, odsustvo aglomeracija, stabilnost, male

promjene boje te topivost aktivnih sastojaka. Udio vode treba biti ispod 5 % kako bi se spriječilo mikrobiološke kvarenje i kvarenje uzrokovano kemijskim reakcijama. Prahovi sa većim sadržajem vlage imaju veći nasipnu gustoću jer voda ima daleko veću gustoću od čvrstih tvari. Prema tome nasipna gustoća se smanjuje povećanjem temperature sušenja. Nepoželjno svojstvo je promjena boje. Promjena boje češća je pri sušenju pri višim temperaturama (tamnija boja proizvoda). Uzrok promjeni boje najčešće se objašnjava neenzimskim posmeđivanjem ili oksidacijom pigmentata, što se može ublažiti korištenjem omotač. Dimenzije i oblik čestica jedno je od najvažnijih svojstava praha i na njih izravno utječu parametri procesa. Prema literaturi Banožić i sur. (2023) povećanje ulazne temperature, povećanje brzine protoka zraka, smanjenje brzine dobave pojne smjese te dodatak omotača vjerojatno dovodi do željenih malih dimenzija čestica praha. Ako su čestice male i sferične biti će stabilnije u pakovanom/zbijenom sustavu, te će imati bolju topivost zbog veće dodirne površine između praha i otapala.

### **2.3.2. Parametri sušenja raspršivanjem**

Od velike važnosti je poznavati kako procesni parametri utječu na karakteristike dobivenog praha i kako optimirati proces. Da bi se neki proces optimirao potrebno je poznavati parametre koji utječu na proces. U procesu sušenja raspršivanjem potrebno je poznavati: ulaznu temperaturu (izlazna temperatura ovisi u ulaznoj), brzinu protoka pojne smjese, protok zraka, dimenzije komore i ciklona, koncentraciju pojne smjese (Banožić i sur., 2023). U nastavku opisan je utjecaj nekih od parametara.

#### ***Temperatura***

Ključni korak sušenja raspršivanjem je optimizacija temperature. Osim ulazne i izlazne temperature koje se najčešće spominju, promatra se i temperatura pojne smjese, temperatura prostorije u kojoj se odvija proces i temperatura nakon procesa separacije. Ulazna temperatura treba biti dovoljno visoka da osigura isparavanje vode, ali ne previsoka da ne dođe do razgradnje sastojaka. Ulazna temperatura za ekstrakte nusproizvoda hrane je obično 100 – 200 °C (Banožić i sur., 2023). Povećanjem temperature sušenja od 120 do 200 °C dokazano je da se sadržaj vlage smanjuje od 5,29 % do 3,88 % (Kha i sur., 2010). Povećanjem ulazne temperature voda brže isparava i rezultat su veće čestice dok se gustoća praha smanjuje povećanjem temperature. Razlog tome su šupljine u velikim česticama zbog brzog isparavanja

vode. Ako se promatra nasipna gustoća, manje čestice imaju veću nasipnu gustoću (Jurić, 2017). Pri određivanju ulazne temperature postoje dva ograničavajuća faktora: temperatura pri kojoj se može sigurno provoditi proces sušenja i cijena izvora topline (Gharsallaoui i sur., 2007). Izlazna temperatura ili temperatura ciklona ili temperatura izlaznog zraka je temperatura pri kojoj se čestice odvajaju od vlažnog zraka. Porast temperature izlaznog zraka povećava se povećanjem temperature ulaznog zraka ili smanjenjem brzine protoka pojne smjese i protoka zraka (Jurić, 2017). Prema literaturi idealna izlazna temperatura za inkapsulaciju sastojaka hrane je 50 – 80 °C. Temperatura pojne smjese utječe na viskoznost, ako se povisi temperatura pojne smjese, viskoznost i veličina čestica praha opada, ali ograničavajući faktor je degradacija sastojaka pojne smjese pri višim temperaturama (Gharsallaoui i sur., 2007).

#### ***Protok i koncentracija pojne smjese***

Veća brzina protoka negativno utječe na svojstva dobivenog praha dok niska vodi ka energetskeju neučinkovitosti. Protok pojne smjese ima najveći utjecaj na veličinu i oblik osušenih čestica praha. Povećanjem protoka nastaju manje čestice ako su ostali parametri konstantni (Banožić sur., 2023). Prema Kalamara i sur. (2015), povećanjem koncentracije pojne smjese dolazi do povećanja nasipne gustoće i topivosti praha. Visoka koncentracija pojne smjese rezultira dobrom kompatibilnosti, odgovarajućom tvrdoćom i visokom sipkosti. Brzina protoka koja se koristi sušenje ekstrakata nusproizvoda prehrambene industrije je od 1 – 26 mL/min (Banožić i sur., 2023).

#### ***Brzina strujanja zraka***

Pokazalo se da povećanjem brzine protoka zraka uzrokovalo povećanje ukupnog sadržaja polifenola zbog kraćeg vremena kontakta pojne smjese sa zrakom (Borges i sur., 2017). Veća brzina protoka zraka rezultira nižim sadržajem vlage jer se stvaraju manje kapljice i tako je veća površina između kapljica i zraka te je potrebna manja energija za isparavanje vode (Banožić i sur., 2023).

### **2.3.3. Omotači**

#### ***Škrob***

Mnoge komponente mogu se inkapsulirati škrobom jer ima dobra svojstva emulgiranja i topivosti te je jeftin. Polisaharidi kao što je škrob najčešće se koriste kao omotač zbog vezanja

aktivne tvari u amorfnu strukturu i na taj način omogućavaju čvrst i stabilan oblik kapsule (Labuschagne, 2018). Koristi se za inkapsulaciju bioaktivnih komponenti zbog svoje otpornosti na razgradnju u želucu i gornjem dijelu probavnog trakta te se razgrađuje u debelom crijevu gdje se i apsorbira najviše bioaktivnih komponenti (Grgić i sur., 2020).

### ***Maltodekstrini***

Maltodekstrinu su primjer modificiranog škroba koji nastaje djelomičnom hidrolizom kukuruznog brašna pomoću kiselina ili enzima. Dekstrozni ekvivalent (DE) je stupanj hidrolize polimernih molekula škroba (Tahmaz, 2019). Često se upotrebljavaju zbog toplinske otpornosti, niskih troškova, komercijalne dostupnosti, lake probavljivosti te zbog toga što su bez mirisa i okusa (Grgić i sur., 2020). Molekule maltodekstrina imaju sposobnost formiranja mreže u koju je moguće inkorporirati različite tvari. Maltodekstrini su se dobro pokazali u inkapsulaciji boja i antioksidanasa (Tahmaz, 2019). Najbolju sposobnost zadržavanja hlapljivih tvari imaju maltodekstrini sa DE 10. Sposobnost zadržavanja hlapljivih tvari opada sa povećanjem DE. Najčešću primjenu u inkapsulaciji antocijana i polifenola imaju maltodekstrini s DE 10-20 (Tahmaz, 2019). Maltodekstrini sa višim DE imaju manju molekularnu masu i bolju topivost, ali produkt sadrži više vlage (Jurić, 2022).

### ***Guma arabika***

Guma arabika je prirodni eksudat drveta bagrema vrsta *Acacia senegal*. To je smjesa polisaharida niske kalorijske vrijednosti i dobre topivosti u vodi. Sastoji se od glukuronske kiseline, arabinoze, ramnoze, galaktoze i proteina koji daju funkcionalna svojstva (Jurić, 2022). Guma arabika je dobar stabilizator i to je čini dobrim inkapsulacijskim omotačem. Štiti aktivnu tvar od oksidacije i isparavanja, sprječava apsorpciju vlage i zraka, stvara zaštitni, tanak, nepropusni sloj oko aktivne tvari (Tahmaz, 2019). Tijekom inkapsulacije sprječava karamelizaciju zaostalog šećera u ekstraktu (Jurić, 2022).

### ***Proteini sirutke***

Sirutka je nusproizvod mljekarske industrije, tekućina zeleno-žute boje koja zaostaje nakon koagulacije i odvajanja kazeina tijekom proizvodnje sira i jogurta. Najviše sirutke se proizvodi od kravljeg mlijeka, no neke sirutke potječu i od devinog, kozjeg i ovčjeg mlijeka (Matijević, 2018). Proteini sirutke:  $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktoalbumin, albumin krvnog seruma i imunoglobulin predstavljaju najvrijednije proteine u sirutki. Suhu tvar sirutke čine: laktoza, mineralne tvari, proteini, mliječna mast te vitamin B. Postoje dvije vrste sirutke i to su: slatka i

kisela sirutka. Slatka sirutka nastaje tijekom proizvodnje tvrdih sireva, dok se kisela sirutka dobiva zakiseljavanjem mlijeka odnosno taloženjem kazeina tijekom proizvodnje svježih sireva. Kisela sirutka se rijetko koristi u prehrambene svrhe zbog svoje higroskopnosti i nemogućnosti proizvodnje praha. Prosječni sastav kisele i slatke sirutke prikazan je u **Tablici 2.**

**Tablica 2.** Prosječan sastav (g/L) slatke i kisele sirutke (Matijević, 2018)

Sastojak	Slatka sirutka	Kisela sirutka
<b>Ukupna suha tvar</b>	63,0 - 70,0	63,0 - 70,0
<b>Laktoza</b>	46,0 - 52,0	44,0 - 46,0
<b>Proteini</b>	6,0 - 10,0	6,0 - 8,0
<b>Kalcij</b>	0,4 - 0,6	1,2 - 1,6
<b>Fosfati</b>	1,0 - 3,0	4,0 - 4,5
<b>Laktati</b>	2,0	6,4
<b>Kloridi</b>	1,1	1,1

Pri temperaturi od 70 °C proteini sirutke se djelomično denaturiraju što ne utječe ne njihovu hranjivu vrijednost. Takvi djelomično denaturirani proteini su lakše dostupni i imaju veću biološku vrijednost od nativnih (Đerić, 2022). Sirutka je jedan od najvećih onečišćavala porijeklom iz mljekarske industrije. Kemijska potrošnja kisika (KPK) sirutke iznosi 50000 – 80000 mg/L dok biološka potrošnja kisika (BPK) iznosi 40000 – 60000 mg/L i stoga je važno pronaći načine iskorištavanja sirutke. Jedan od tih načina je korištenje sirutke kao omotača pri procesu inkapsulacije sušenjem raspršivanjem. Sirutka se kao omotač koristi u obliku koncentrata ili izolata. Izolati imaju sposobnost formiranja barijere koja štiti aktivnu tvar od oksidacije, a u kombinaciji s ugljikohidratima se koriste za inkapsulaciju hlapivih komponenti. Kapsule kod kojih se kao nosači koriste proteini sirutke poboljšavaju nutritivnu vrijednost, imaju visoku biološku vrijednost i dobra funkcionalna svojstva (Tahmaz, 2019).

## 2.4. Miješanje

Miješanje ili homogenizacija je jedinična operacija kojoj je svrha uspostaviti jednoliko stanje u mehaničkom, kemijskom i/ili termičkom smislu. Miješanje je moguće provoditi u jednofaznim i višefaznim sustavima. Jednofazno miješanje podrazumijeva homogenizaciju fluida ili miješanje prašaka, dok višefazno miješanje podrazumijeva miješanje nemješljivih kapljevina, miješanje pri raspršivanju (disperzija) plina u tekućini ili miješanje u sustavima čvrsto/tekuće (suspenzije) (Čović-Stanić, 2021). Miješanjem se postiže da neki materijal na svakom svom mjestu ima jednaku temperaturu, jednak sastav i prosječnu veličinu čestica, prema tome to je jedna od najčešćih operacija u industriji (Tomas i sur., 2013).

Dva su općenita pravila koja moraju biti ispunjena kako bi miješanje bilo optimalno. Prvo pravilo ili mikroskopski učin miješanja kaže da miješalo mora biti u stanju heterogene čestice koje dolaze u njegov dohvat tako dobro pomiješati, da u idealnom stanju svaka čestica jednog materijala dođe u kontakt s česticom drugog materijala. Drugo pravilo ili makroskopski učin miješanja kaže da unutar posude mora postojati takvo strujanje, da bez obzira koliko materijal u početku bio udaljenog od samog miješala dođe u njegov zahvat i bude minimum vremena izmiješan s ostalim materijalom prema prvom pravilu (Tomas i sur., 2013).

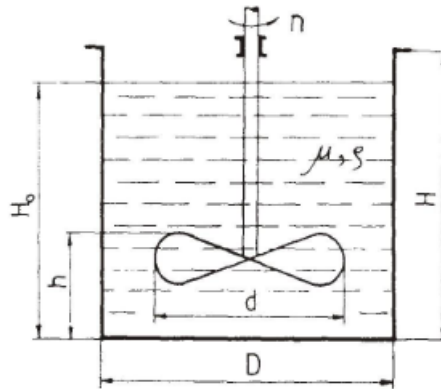
Miješanje se provodi:

- a) kad se želi ubrzati kemijsku reakciju
- b) kad se želi ubrzati izmjena topline
- c) kad se iz više materijala želi napraviti smjesa s novim svojstvima
- d) kako bi se ubrzalo otapanje
- e) za postizanje kristalizacije iz prezasićene otopine (Tomas i sur., 2013).

Na **Slici 7.** su prikazani parametri s kojima je potrebno biti upoznat prije provedbe miješanja. Za izračunavanje snage ( $N$ ) miješanja, ako zanemarimo promjene nivoa tekućine tijekom miješanja ( $H_0$ ), potrebno je poznavati promjer miješalice ( $d$ ),  $\zeta_M$  koeficijent otpora miješanja broj okretaja u jedinici vremena ( $n$ ), viskoznost tekućine koja je miješa ( $\mu$ ) i njezinu gustoću ( $\rho$ ), promjer posude ( $D$ ), visinu posude ( $H$ ) te udaljenost miješala od dna posude ( $n$ ). Prema tom snaga miješanja je funkcija navedenih parametara i izračunava se pomoću jednadžbe **(2)** (Čović-Stanić, 2021):

$$N = \zeta_M \cdot n^3 \cdot \rho \cdot d^5 \quad [J/s] \quad (2)$$





**Slika 6.** Karakteristične dimenzije miješala (Tomas i sur., 2013)

Homogenizacija u inkapsulaciji je vrlo bitan proces. Predstavlja sjedinjavanje omotača i aktivne tvari. Kako bi se postigla što veća iskoristivost i učinkovitost procesa, potrebno je odrediti pravilan omjer omotača i aktivne tvari. Omjer zavisi od vrste omotača i aktivne tvari do tehnike inkapsulacije i nije univerzalan. Općenito je udio aktivne tvari manji od udjela omotača. Kako bi se aktivna tvar potpuno obložila omotačem i kako bi nastale sitne kapsule potrebo je dobro homogenizirati pojnu smjesu (Tahmaz, 2019).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

## 3.1. Zadatak

Cilj diplomskog rada je ispitati utjecaj parametara miješanja pojne smjese (ekstrakta tropa grožđa i nosača) na fizikalno-kemijska svojstva praha (mikrokapsula) dobivenog sušenjem raspršivanjem.

Zadatak rada bio je:

- provesti kruto-tekuću ekstrakciju polifenola iz tropa grožđa
- provesti miješanje smjese dobivenog tekućeg ekstrakta i koncentrata proteina iz kozje sirutke (omotač) uz primjenu magnetne miješalice pri različitim procesnim uvjetima (temperatura, vrijeme, brzina miješanja)
- priređenu, homogeniziranu tekuću otopinu (pojna smjesa) prevesti u mikrokapsule metodom sušenja raspršivanjem
- odrediti fizikalno-kemijska svojstva dobivenog praha.

## 3.2. Materijali

Istraživanje je provedeno na tropu vinske sorte grožđa cabernet sauvignon (berba 2017), iz vinarije Erdut. Trop je osušen na zraku do udjela suhe tvari većeg od 90 % te je neposredno prije ekstrakcije samljeven na veličinu čestica  $\leq 1$  mm pomoću ultracentrifugalnog mlina (Retsch ZM 200, Njemačka).

Komercijalni proizvod kozje sirutke s udjelom proteina od 78,6 % (*Goat Whey Protein*, Carrington Farms, Closter, New Jersey, USA) korišten je kao inkapsulacijski omotač.

### 3.2.1. Kemikalije

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

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Box-Behnkenov plan pokusa i metoda odzivnih površina

Softver Design-Expert, v.13 (Stat-Ease, Minneapolis, USA) korišten je za planiranje pokusa i optimiranje procesnih parametara, te modeliranje procesa primjenom nelinearne regresijske analize, statističku analizu (ANOVA) značajnosti ispitivanih procesnih parametara na odabrane fizikalno-kemijske karakteristike praha, kao i za numeričku optimizaciju procesa homogenizacije.

Metoda odzivnih površina (RSM) korištena je za procjenu utjecaja parametara homogenizacije na karakteristike mikrokapsula (praha) te za optimiranje procesnih uvjeta pripreme pojne otopine na magnetnoj miješalici, a Box-Behnkenov plan pokusa s tri ponavljanja u centralnoj točki korišten je za planiranje eksperimentalnih uvjeta. U ovom radu je procjenjivan utjecaj tri (3) nezavisne varijable (parametra miješanja): temperatura ( $X_1$ ), vrijeme miješanja ( $X_2$ ) i brzina miješanja ( $X_3$ ), i to na tri razine. **Tablica 3.** prikazuje kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u ovom RSM dizajnu, a **Tablica 4.** prikazuje eksperimentalne uvjete sukladno zadanom Box-Behnkenovom planu pokusa.

**Tablica 3.** Faktori utjecaja i područje eksperimentalnog ispitivanja u tri razine za pripremu pojne otopine na magnetnoj miješalici

VARIJABLA	SIMBOL	KODIRANA VARIJABLA		
		-1	0	+1
TEMPERATURA (°C)	$X_1$	25	37,5	50
VRIJEME MIJEŠANJA (min)	$X_2$	10	35	60
BROJ OKRETAJA MIJEŠALICE (rpm)	$X_3$	600	900	1200

Za aproksimaciju dobivenih eksperimentalnih podataka korišten je kvadratni polinom (3):

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{j=1}^{k-1} \sum_{i=1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (3)$$

gdje je:

- $Y$  - modelom predviđena odzivna funkcija
- $\beta_0$  - konstanta jednadžbe odzivnog polinoma
- $\beta_j$  - koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

- $\beta_{jj}$  - koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma
- $\beta_{ij}$  - koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma
- $X_{i,j}$  - ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti)
- $k$  – broj varijabli.

**Tablica 4.** Box-Behnken plan pokusa (eksperimentalna matrica)

PROBA (EKSPERIMENT)	VARIJABLA		
	$X_1: T$	$X_2: t$	$X_3: n$
	° C	min	rpm
1	37,5	10	1200
2	50,0	35	600
3	50,0	60	900
4	50,0	10	900
5	37,5	35	900
6	37,5	60	1200
7	50,0	35	1200
8	37,5	35	900
9	25,0	35	1200
10	37,5	10	600
11	25,0	60	900
12	37,5	60	600
13	25,0	10	900
14	37,5	35	900
15	25,0	35	600

Na temelju dobivenog matematičkog modela konstruirana je odzivna površina koja pruža vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara na promatrane modele. Odzivna površina je prikazana kao površina u 3D prostoru.

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

### 3.3.2. Priprema ekstrakta tropa grožđa

Ekstrakcija tropa grožđa provedena je s ciljem izdvajanja bioaktivnih fenolnih tvari zaostalih u tropu pri čemu je dobiveni ekstrakt nadalje korišten u postupku inkapsulacije sušenjem raspršivanjem. Postupak pripreme ekstrakta opisan je u nastavku.

Najprije su fenolni spojevi ekstrahirani kruto-tekućom ekstrakcijom u vodenoj kupelji sa trešnjom (Julabo SW-23, Njemačka) (**Slika 8.**). Omjer pripremljenog uzorka tropa grožđa i 50 %-tne vodene otopine etanola (otapalo) iznosio je: 1 g : 40 mL. Ekstrakcija je provedena tijekom 120 min pri temperaturi od 80 °C i pri trešnji od 200 rpm.



**Slika 7.** Vodena kupelj Julabo SW-23 (Julabo, Njemačka)

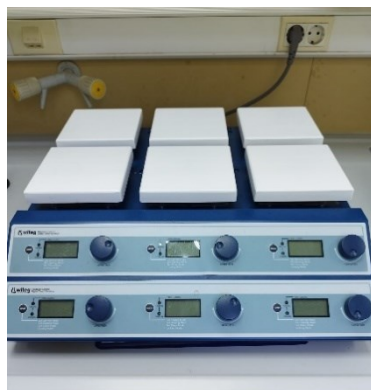
Nakon ekstrakcije, suspenzija uzorka i otapala je centrifugirana na centrifugi (Hermle Z 326 K, Labortechnik GmbH, Njemačka) pri 11000 rcf tijekom 10 min.

Po završetku centrifugiranja supernatant (ekstrakt bogat fenolnim tvarima) je odvojen od taloga te je provedeno uparavanje ekstrakta do polovine njegovog početnog volumena. Uparavanje je provedeno na rotavaporu (Büchi R-210, Büchi, Švicarska) (**Slika 9.**), pod vakuumom ( $p_v = 48$  mbar) i pri temperaturi od 50 °C s ciljem smanjenja udjela etanola u ekstraktu radi ograničenja uređaja za sušenje raspršivanjem. Volumen uklonjenog ekstrakta zamijenjen je jednakim volumenom redestilirane vode.



**Slika 8.** Rotavapor Büchi R-210 (Büchi, Švicarska)

Nakon pripreme ekstrakta tropa pripravljena je pojna smjesa za inkapsulaciju sušenjem raspršivanjem, odnosno mješavina ekstrakta grožđa i omotača u omjeru „masa suhe tvari ekstrakta“ : „masa suhe tvari omotača“ = 1:2 (w/w). Homogenizacija navedene tekuće smjese provedena je u posudi na magnetnoj miješalici (Witeg Germany, SMHS-6), **Slika 10.**, pri različitim uvjetima prema planu pokusa prikazanom u **Tablici 4.** Nakon homogenizacije na magnetnoj miješalici dobivena smjesa stabilizirana je mirovanjem tijekom 5 min.



**Slika 9.** Magnetna miješalica SMHS-6 (Witeg, Germany)

### **3.3.3. Sušenje raspršivanjem (inkapsulacija)**

Pripremljena pojna smjesa je sušena pomoću uređaja za sušenje raspršivanjem (Mini Spray Dryer B-290, Büchi, Švicarska), **Slika 11.**, pri uvjetima sušenja prikazanim u **Tablici 5.**



**Slika 10.** Mini Spray Dryer B-290, Büchi, Švicarska

**Tablica 5.** Uvjeti sušenja raspršivanjem

Uvjeti sušenja	Vrijednost
Protok pojne smjese (%)	25
Protok zraka (L/h)	600
Ulazna temperatura zraka (°C)	180

Nakon provedenog sušenja prah je pažljivo prenesen u odgovarajuće posude, zabilježena je masa dobivenog praha (mikrokapsula) te je prah potom analiziran.

### 3.3.4. Određivanje udjela vlage/suhe tvari

Korištenjem termogravimetrijske metode na uređaju za brzo određivanje vlage, halogenom analizatoru vlage (**Slika 12.**), koji koristi infracrveni izvor topline sušenje (HR73, Mettler Toledo, USA), određen je udio vlage i suhe tvari u uzorcima praha i omotaču prema 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 (eng. *switch-off criteria*) odnosno sve dok gubitak mase nije bio manji od 1 mg tijekom 140 sekundi.



**Slika 11.** Halogeni analizator vlage HR73 (Mettler Toledo, USA)

Za svaki uzorak provedena su po dva paralelna mjerenja te je izračunat udio vlage prema jednadžbi **(4)** i udio suhe tvari prema jednadžbi **(5)**.

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

$$\text{udio suhe tvari (\%)} = \frac{\text{masa uzorka nakon sušenja}}{\text{masa uzorka prije sušanje}} \cdot 100 \quad (5)$$

### 3.3.5. Određivanje prinosa inkapsulacije

Prinos inkapsulacije ( $Y$ ) je izračunat prema Vu i sur. (2020) uz korištenje jednadžbe **(6)**:



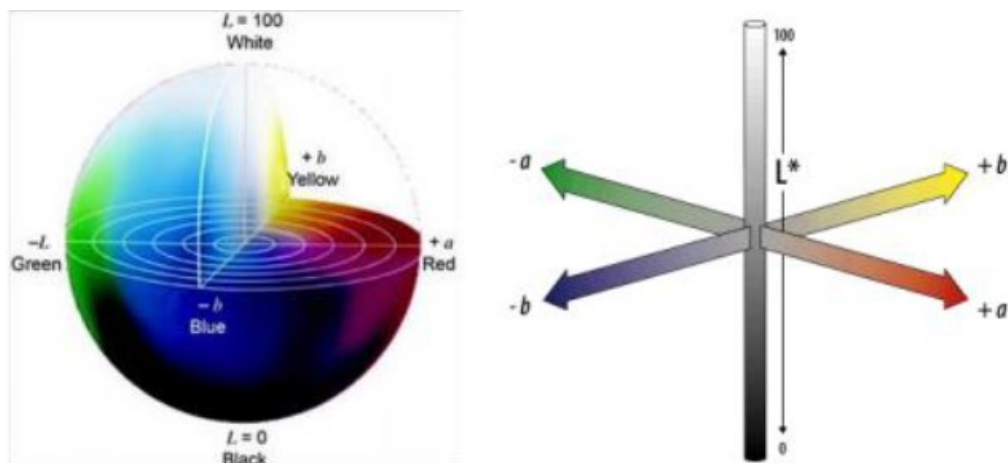
$$Y (\%) = \frac{\text{ukupna masa suhe tvari praha}}{\text{ukupna masa suhe tvari u pojnoj otopini (ekstrakt + omotač)}} \cdot 100 \quad (6)$$

### 3.3.6. Određivanje ukupne promjene boje

Određivanje boje dobivenog praha i omotača provedeno je na uređaju kolorimetru (Chroma Meter CR-400, Konica Minolta, USA), **Slika 13**. Prije svakog mjerenja uređaj je kalibriran pomoću standardne bijele keramičke pločice. Princip uređaja je mjerenje reflektirane količine svjetlosti sa površine uzorka. Uređaj prikazuje količinu reflektirane svjetlosti u obliku trisimulsa kao  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  parametre. Raspon od žute do plave predstavlja parametar  $b^*$ , pozitivne vrijednosti su u području žute boje, a negativne u području plave. Raspon od crvene do zelene boje predstavlja parametar  $a^*$ , negativne vrijednosti su u području zelene boje, a pozitivne vrijednosti su u području crvene boje. Svjetlina uzorka je označena parametrom  $L^*$ , a raspon vrijednosti je od 0 (crna boja) do 100 (bijela boja) (Lukinac Čačić, 2012). Model CIEL  $a^*b^*$  prostora boja je prikazan na **Slici 14**.



**Slika 12.** Kolorimetar (Chroma Meter CR-400, Konica Minolta, USA)



Slika 13. CIE  $L^*a^*b^*$  model (Jaković, 2020)

Za određivanje parametara boje korištena mala staklena Petrijeva zdjelica koja je ravnomjerno napunjena prahom do vrha. Za svaki uzorak mjerenja su provedena u tri paralele. Prema izmjerenim vrijednostima parametara boje praha ( $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ ) i boje omotača ( $L^*_o$ ,  $a^*_o$  i  $b^*_o$ ) izračunata je ukupna promjena boje mikrokapsula (praha) u odnosu na boju omotača, prema jednadžbi (7).

$$\Delta E_{ab} = \sqrt{(L^*_o - L^*)^2 + (a^*_o - a^*)^2 + (b^*_o - b^*)^2} \quad (7)$$

U **Tablici 6.** prikazana je usporedba rezultata instrumentalnog mjerenje u odnosu na percepciju prosječnog ljudskog oka.

**Tablica 6.** Usporedba rezultata instrumentalnog mjerenje u odnosu na percepciju ljudskog oka.

$\Delta E_{ab}$	LJUDSKO OKO
< 0,2	nije uočljivo
0,2 – 1	vrlo slabo uočljivo
1 – 3	slabo uočljivo
3 – 6	uočljivo
> 6	vrlo uočljivo

### 3.3.7. Gustoća praha prije i nakon potresanja

Nasipna gustoća, odnosno gustoća praha prije potresanja (eng. *bulk density*, BD) određena je za mikrokapsule i omotač prema Boyano-Orozco i sur. (2020) uz modifikaciju. Menzura od 25 mL napunjena je s 1 g uzorka, te je nasipna gustoća izračunata kao omjer mase praha i volumena praha očitnog na menzuri, prema jednadžbi (8):

$$BD \text{ (g/cm}^3\text{)} = \frac{\text{masa praha}}{\text{volumen praha}} \quad (8)$$

Gustoća nakon potresanja (eng. *tapped density*, TD) je određena pomoću uređaja AutoTap (Anton Paar, Austrija) prikazanog na **Slici 15.**, prema Boyano-Orozco i sur. (2020) uz modifikaciju. Vrijednost za gustoću nakon potresanja izračunata je kao omjer mase praha i volumena praha nakon 1250 potresanja menzure s prahom (udaraca), prema jednadžbi (9):

$$TD \text{ (g/cm}^3\text{)} = \frac{\text{masa praha}}{\text{volumen praha nakon tapkanja}} \quad (9)$$



**Slika 14.** Uređaj za određivanje gustoće praha nakon potresanja (AutoTap, Anton Paar, Austrija)

Svojstva kompresibilnosti praha izražena su pomoću Hausner omjera (HR) i Carr indeksa (CI), koji su izračunati prema Kalušević i sur. (2017.), uz primjenu jednadžbi (10) i (11):

$$HR = \frac{BD}{TD} = \frac{\text{početni volumen praha}}{\text{volumen praha nakon tapkanja}} \quad (10)$$

$$CI (\%) = \frac{BD - TD}{BD} \cdot 100 = \frac{\text{početni volumen} - \text{volumen nakon tapkanja}}{\text{početni volumen}} \cdot 100 \quad (11)$$

Klasifikacija praha prema tecivosti/kvazifluidnosti (European Pharmacopea) prikazana je u **Tablici 7.**

**Tablica 7.** Klasifikacija praha prema tecivosti (European Pharmacopea)

CI (%)	TECIVOST	HR
≤ 10	izvrsna	1,00 – 1,11
11 – 15	dobra	1,12 – 1,18
16 – 20	osrednja	1,19 – 1,25
21 – 25	prolazna	1,26 – 1,34
26 – 31	loša	1,35 – 1,45
32 – 37	vrlo loša	1,46 – 1,59
> 38	vrlo, vrlo loša	> 1,60

### 3.3.8. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva

Folin-Ciocalteu kolorimetrijska metoda (Waterhouse, 2009) je korištena za određivanje ukupnih fenolnih tvari (eng. *total phenolic content*, TPC) u pripremljenom ekstraktu i dobivenom prahu. Fenolne tvari u reakciji sa Folin-Ciocalteuovim reagensom tvore plavo obojenje koje se može detektirati spektrofotometrom pri vidljivom svjetlosnom spektru. Tijekom reakcije fenolnih tvari s Folin-Ciocalteuovim reagensom dolazi do oksidacije fenolnih spojeva i redukcije Folin-Ciocalteuova reagensa u alkalnoj sredini u volfram i molibden oksid (Pavel i sur., 2006).

#### **PRIPREMA UZORKA**

Uzorak je pripremljen prema uputama Tolun i sur. (2016.). U 15 mg praha je dodano 3 mL otopine etanol : ledena octena kiselina : voda (50 : 8 : 42, v/v/v). Uzorak se promiješa na vortex miješalici te potom profiltrira kroz 0,45 µm PTFE filter.

#### **PROVEDBA ANALIZE**

U epruvetu je otpipetirano 40 µL pripremljenog uzorka (tekućeg ekstrakta ili pripremljenog praha), 3160 µL redestilirane vode i 200 µL Folin-Ciocalte reagensa. Nakon 8 min otpipetirano je 600 µL 20 %-tne vodene otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Uzorci su pomiješani na vorteks miješalici i ostavljeni u vodenoj kupelji na 40 °C tijekom 30 min. Po isteku vremena inkubacije, na UV/VIS spektrofotometru (Shimadzu UV-1280, Shimadzu, Japan), **Slika 16.**, pri 765 nm je izmjerena apsorbancija. Sva mjerenja su provedena u tri paralele. Slijepa proba je pripremljena na isti način, ali se umjesto uzorka u slijepu probu otpipetiralo 40 µL ekstrakcijskog otapala.

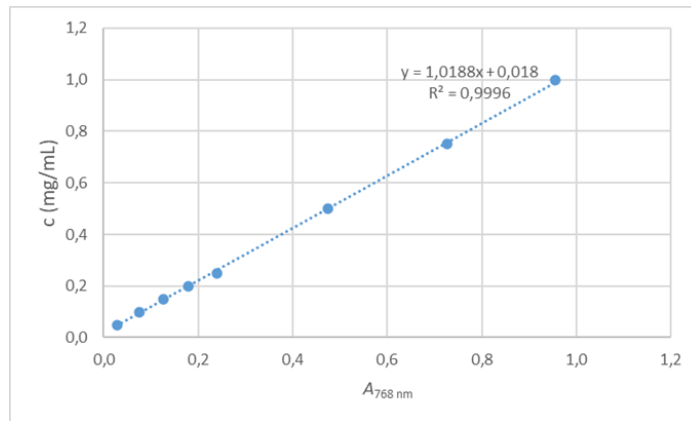


**Slika 15.** Spektrofotometar (Shimadzu UV-1280, Shimadzu, Japan)

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 17.**). TPC je određen u ekstrakte, prahu (mikrokapsulama) i omotaču.

#### ***IZRADA KALIBRACIJSKIH KRIVULJA***

Kao standard za izradu kalibracijske krivulje je korištena galna kiselina. Napravljene su dvije kalibracijske krivulje - jedna za galnu kiselinu otoplenu u 50 %-tnoj vodenoj otopini etanola i druga za galnu kiselinu otoplenu u mješavini etanol : ledena octena kiselina : voda (50 : 8 : 42, v/v/v). Otopina galne kiseline u 50 %-tnoj vodenoj otopini etanola pripravljena je u rasponu koncentracija 0,05 – 1 mg/mL, dok je otopina galne kiseline u mješavini etanol : ledena octena kiselina : voda (50 : 8 : 42, v/v/v) pripravljena u rasponu koncentracija 0,025 – 1 mg/mL. Nakon reakcije s Folin-Ciocalteu reagensom, pri valnoj dulji 765 nm na spektrofotometru (Shimadzu UV-1280, Japan) izmjerene su apsorbancije pri valnoj duljini od 765 nm su izmjerene apsorbancije pripadajućih koncentracija prema kojima su izrađene kalibracijske krivulje (**Slike 17. i 18.**).



**Slika 16.** Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih fenolnih tvari koristeći 50 %-tni etanol kao otapalo

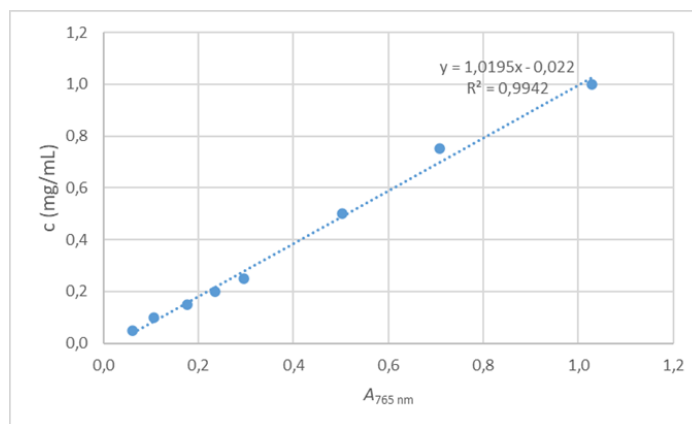
Metodom linearne regresije je dobivena jednadžba **(12)**:

$$y = 1,0188x + 0,018 \quad (12)$$

odnosno jednadžba **(13)**:

$$c_{\text{TPC}} = 1,0188 \cdot A + 0,0188 \quad (13)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije ukupnih fenolnih tvari u tekućem ekstraktu.



**Slika 17.** Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih fenolnih tvari koristeći smjesu otapala etanol : ledena octena kiselina : voda (50 : 8 : 42, v/v/v)

Metodom linearne regresije je dobivena jednadžba **(14)**:

$$y = 1,0195x - 0,022 \quad (14)$$

odnosno:

$$c_{\text{TPC}} = 1,0195 \cdot A - 0,022 \quad (15)$$

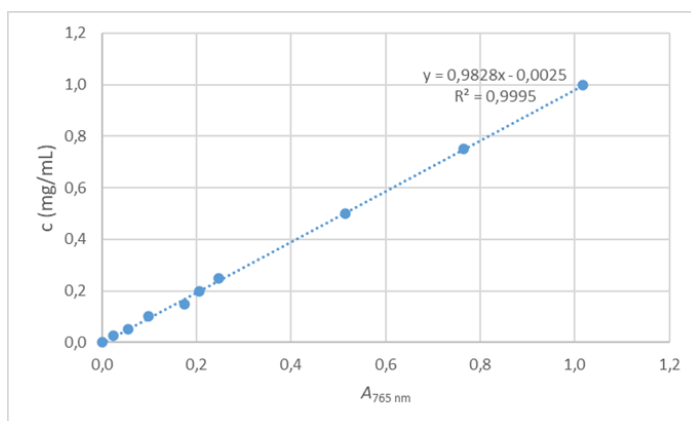
koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije ukupnih fenolnih tvari u dobivenom prahu.

### 3.3.9. Određivanje površinskih polifenola

Za određivanje fenolnih tvari na površini mikrokapsula (eng. *surface phenolic content, SPC*) korištena je Folin-Ciocalteu kolorimetrijska metoda kao i za određivanje ukupnih fenolnih tvari (opisano u podpoglavlju 3.3.8.) uz različitu pripremu uzorka.

Uzorak je pripremljen prema Tolun i sur. (2016.), kako slijedi: u 24 mg praha dodano 3 mL otopine etanol : metanol (1 : 1, v/v), a po isteku 5 min uzorak je profiltriran kroz 0,45 µm PTFE filter.

Za izradu kalibracijske krivulje je korištena galna kiselina otopljena u mješavini etanola i metanola (1:1, v/v). Otopina galne kiseline u mješavini etanola i metanola je pripremljena u rasponu koncentracija 0,025 - 1 mg/mL. Nakon reakcije s Folin-Ciocalteu reagensom, pri valnoj dulji 765 nm na spektrofotometru (Shimadzu UV-1280, Japan) izmjerene su apsorbancije te je izrađena kalibracijska krivulja (**Slika 19.**).



**Slika 18.** Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih fenolnih tvari koristeći etanol : metanol (1 : 1, v/v) kao otapalo

Metodom linearne regresije je dobivena jednadžba **(16)**:

$$y = 0,9828 \cdot x - 0,0025 \quad (16)$$

odnosno:

$$c_{\text{SPC}} = 0,9828 \cdot A - 0,0025 \quad (17)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije površinskih fenolnih tvari u dobivenom prahu.

### **IZRAČUN UDJELA FENOLNIH TVARI**

Prema jednadžbama (13), (15) i (17) izračunate su masene koncentracije fenolnih tvari ( $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$ ), a vrijednosti masenih udjela fenolnih spojeva preračunati su na suhu tvar uzorka prema jednadžbi (18):

$$C (\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.tv.}}) = \frac{c \cdot V}{m_{\text{uzorka}} \cdot w_{\text{s.tv.}}} \quad (18)$$

gdje je:

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

**Efikasnost inkapsulacije** (eng. *encapsulation efficiency*, EE) izračunata je prema  $V_u$  i sur. (2020.) uz korištenje jednadžbe (19):

$$\text{EE} [\%] = \frac{C_{\text{TPC}} - C_{\text{SPC}}}{C_{\text{TPC}}} \cdot 100 \quad (19)$$

gdje je:

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

### **3.3.10. Određivanje topivosti mikrokapsula (praha)**

Za određivanje topivosti mikrokapsula korištene su Petrijeve zdjelice, koje su oprane, potom osušene u sušioniku (UFE 500, Memmert, Njemačka) na  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 h te su nakon hlađenja izvagane zajedno s poklopcem. Također, izvagane su prazne Falcon epruvete od 50 mL bez čepa. U svaku Falcon epruvetu odvagano 0,1 g praha te je dodano 10 mL redestilirane vode. Sadržaj epruvete je promiješan na vorteks miješalici (DLAB MX-S, Kina) te je epruveta stavljena u vodenu kupelj (Witeg WSB-30, Njemačka) na  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 min. Po završetku inkubacije uslijedilo je hlađenje Falcon epruveta s uzorcima u hladnoj vodi te potom centrifugiranje na centrifugi (Hermle Z 326 K, Njemačka) 10 min pri 11 000 rcf. Supernatant je dekantiran u Petrijevu zdjelicu u kojoj se sušio 3 h na  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  u sušioniku (Memmert UFE 500, Njemačka). Nakon završetka



procesa sušenja, Petrijeve zdjelice s uzorcima su stavljene u eksikator na hlađenje u trajanju od 1 h. Po isteku vremena hlađenja Petrijeva zdjelica je izvagana radi određivanja mase otopljenog praha. Osim toga izvagana je i Falcon epruveta s talogom kako bi se odredila masa zaostalog (nabubrenog) taloga (Chung-Woo i sur., 2012).

Iz očitanih masa izračunati su: indeks topivosti (eng. *water solubility indeks*, WSI) prema jednadžbi **(20)**, indeks adsorpcije vode (eng. *water adsorbtion indeks*, WAI) prema jednadžbi **(21)** i sposobnost bubrenja (eng. *swelling power*, SP) prema jednadžbi **(22)**.

$$\text{WSI (\%)} = \frac{\text{masa supernatanta nakon sušenja}}{\text{masa suhe tvari uzorka}} \cdot 100 \quad (20)$$

$$\text{WAI} = \frac{\text{masa taloga zaostalog nakon centrifugiranja}}{\text{masa suhe tvari uzorka}} \quad (21)$$

$$\text{SP} = \frac{\text{masa taloga zaostalog nakon centrifugiranja}}{\text{masa suhe tvari uzorka} \cdot \left(1 - \frac{\text{WSI \%}}{100}\right)} \quad (22)$$

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

U ovom eksperimentalnom radu provedena su istraživanja u svrhu pronalaska optimalnih uvjeta homogenizacije inkapsulacijske smjese (ekstrakt tropa grožđa bogat fenolnim tvarima i omotač – kozja sirutka) na magnetnoj miješalici za postizanje maksimalne učinkovitosti inkapsulacije procesom sušenja raspršivanjem. Uzorak je prije homogenizacije pripreman uvijek na isti način pri čemu je odnosi suhe tvari ekstrakta i suhe tvari omotača (kozje sirutke) iznosio 1 : 2 (w/w), a u svakom pokusu mijenjani su uvjeti homogenizacije sukladno Box-Behnken eksperimentalnim planom (**Tablica 4.**). Dobiveni eksperimentalni i izračunati rezultati prikazani su u tablicama i slikama u ovom poglavlju.

**Tablica 8.** Udio vlage ( $w_v$ ), prinos inkapsulacije ( $Y$ ), maseni udio ukupnih fenolnih tvari ( $C_{TPC}$ ), maseni udio površinskih fenolnih tvari ( $C_{SPC}$ ) i efikasnost inkapsulacije ( $EE$ ) proizvedenih prahova

PROBA	A: $T$ (° C)	B: $t$ (min)	C: $n$ (rpm)	$w_v$ (%)	$Y$ (%)	$C_{TPC}$ (mg <sub>GAE</sub> /g <sub>s.tv.</sub> )	$C_{SPC}$ (mg <sub>GAE</sub> /g <sub>s.tv.</sub> )	$EE$ (%)
1	37,5	10	1200	6,02	78,20	134,70	8,86	93,42
2	50,0	35	600	6,02	69,96	121,54	8,30	93,17
3	50,0	60	900	6,04	71,14	144,85	8,04	94,56
4	50,0	10	900	6,04	62,29	123,44	8,51	93,10
5	37,5	35	900	5,92	76,56	123,43	7,28	94,10
6	37,5	60	1200	5,9	75,95	130,92	10,07	92,31
7	50,0	35	1200	5,98	85,31	138,83	9,60	93,09
8	37,5	35	900	5,92	73,70	124,73	7,42	94,05
9	25,0	35	1200	5,98	93,05	136,52	8,51	93,77
10	37,5	10	600	6,01	73,31	132,08	8,42	93,62
11	25,0	60	900	6,02	70,82	136,44	8,95	93,44
12	37,5	60	600	6,04	69,47	113,31	9,78	91,37
13	25,0	10	900	5,94	73,57	131,26	8,29	93,69
14	37,5	35	900	5,96	76,85	124,78	7,38	94,09
15	25,0	35	600	5,95	72,89	138,07	8,86	93,27

A: temperatura,  $T$

B: vrijeme miješanja,  $t$

C: brzina miješanja,  $n$

U **Tablici 8.** prikazani su eksperimentalno dobiveni rezultati prinosa inkapsulacije ( $Y$ ), sadržaja vode u prahu ( $w_v$ ), koncentracije ukupnih polifenola ( $C_{TPC}$ ), koncentracije površinskih polifenola ( $C_{SPC}$ ) i efikasnosti inkapsulacije ( $EE$ ) pri uvjetima homogenizacije prema Box-Behnken eksperimentalnom planu. Poželjna karakteristika svakog proizvodnog procesa je ostvariti što je moguće manje gubitaka, odnosno što je moguće veći prinos. Kao što je već navedeno u teorijskom dijelu, negativan utjecaj na prinos sušenja raspršivanjem ima lijepljenje i taloženje čestica praha o stijenke uređaja. Kako bi to smanjili i postigli što uspješniji proces sušenja

raspršivanjem bitno je odabrati adekvatne parametre sušenja i odgovarajući omotač (Yousefi i sur., 2011). U **Tablici 8.** vidljivo je kako su ostvareni visoki prinosi sušenja raspršivanjem u laboratorijskim uvjetima te su varirali između 62,23 % i 93,05%. Prema radu Lacerda i sur. (2016.), proces sušenja raspršivanjem se smatra uspješnim ukoliko je prinos produkta veći od 50 %. Budući da je prinos svih sušenja raspršivanjem u ovom eksperimentu bio veći od 50 %, možemo reći da su sva sušenja bila uspješna. Na sadržaj vlage značajno utječe ulazna i izlazna temperatura. U radu je svih 15 proba sušeno pri istoj temperaturi (180 °C) dok se izlazna temperatura mijenjala ovisno o probi. Iz **Tablice 8.** se vidi kako prah 6 homogeniziran pri 37,5 °C, 900 rpm tijekom 60 min ima najmanji sadržaj vode (5,90 %), a prahovi 3, 4 i 12 imaju najviši sadržaj vode (6,04 %). Kako navode Banožić i sur. (2023.) udio vode u prahu treba biti ispod 5 % kako bi se spriječilo mikrobiološke kvarenje i kvarenje uzrokovano kemijskim reakcijama. Za razliku od toga, autori Ji i sur. (2016.), navode kako bi konačni sadržaj vlage u prahu bi trebao biti između 2 – 3 % jer u suprotnom može imati utjecaj na adsorpciju vode kao i na karakter tcvosti praha. Kako bi se odredila efikasnost inkapsulacije, potrebno je odrediti sadržaj ukupnih (TPC) i površinskih (SPC) fenolnih spojeva. Izračunate vrijednosti ukupnih i površinskih fenolnih spojeva su prikazane u **Tablici 8.** Primijećena je niska koncentracija fenolnih spojeva na površini mikrokapsula te je varirala od 7,38 do 10,07 mg<sub>SPC</sub>/gs.tv.. Udio ukupnih fenolnih spojeva je varirao od 113,31 do 144,85 mg<sub>TPC</sub>/gs.tv.. Bez obzira na uvjete homogenizacije pojnesmjese svi su eksperimenti rezultirali visokim postotkom inkapsulacijske efikasnosti te je varirala od 91,37 % do 94,56 %.

U **Tablici 9.** prikazana su rezultati statističke analize značajnosti utjecaja nezavisnih varijabli: temperature, vremena i brzine miješanja na pojedini karakteristike praha. Statistička značajnost iskazana je pomoću  $p$  – vrijednosti. Za nezavisne varijable kod kojih su  $p$  – vrijednosti veće od 0,05 može se reći da imaju utjecaj na pojedine karakteristike praha, tj. da imaju statistički značajan utjecaj. Za  $p$  – vrijednosti koje su između 0,1 i 0,05 može se reći da imaju utjecaj na pojedinu karakteristiku praha, ali nemaju statistički značajan utjecaj. Iz **Tablice 9.** se vidi da brzina miješanja može imati utjecaja na sadržaj vode u prahu, ali to nije statistički značajno. Za nezavisne varijable kod kojih su  $p$  – vrijednosti veće od 0,1 može se reći da nemaju utjecaja pojedine karakteristike praha te se tako prema podacima iz **Tablice 9.** vidi da parametri homogenizacije nemaju statistički utjecaj na sadržaj vode (osim brzine miješanja), prinos

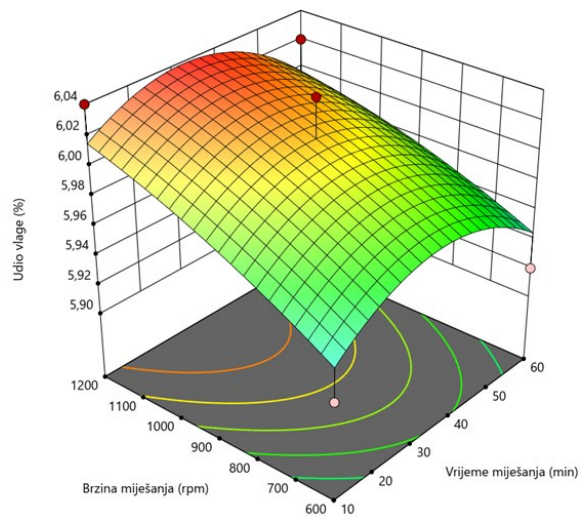
koncentraciju ukupnih polifenola, koncentraciju površinskih polifenola i uspješnost inkapsulacije, što je također vidljivo iz **Slike 19**.

**Tablica 9.** Statistički pokazatelji značajnosti utjecaja temperature, vremena i brzine miješanja na udio vlage ( $w_v$ ), prinos inkapsulacije ( $Y$ ), maseni udio ukupnih fenolnih tvari ( $C_{TPC}$ ), maseni udio površinskih fenolnih tvari ( $C_{SPC}$ ) i efikasnost inkapsulacije (EE) praha

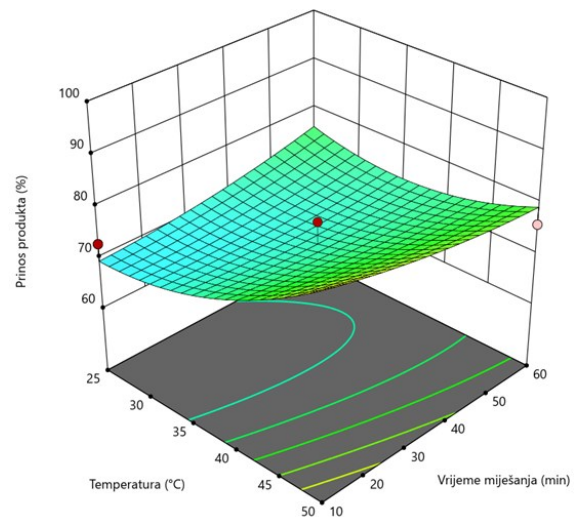
	<i>Intercept</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>AB</i>	<i>AC</i>	<i>BC</i>	<i>A<sup>2</sup></i>	<i>B<sup>2</sup></i>	<i>C<sup>2</sup></i>
$w_v$ (%)	6,01	-0,0250	-0,0038	0,0313	-0,0375	0,0125	-0,0050	-0,0192	-0,0317	-0,0067
<i>p</i> -vrijednost		0,1535	0,8109	0,0895	0,1346	0,5781	0,8215	0,4212	0,2075	0,7729
$Y$ (%)	72,49	5,1125	-0,1575	0,5575	-3,5425	2,3125	3,2625	4,2704	1,2054	-1,0046
<i>p</i> -vrijednost		0,1240	0,9568	0,8483	0,4069	0,5803	0,4425	0,3425	0,7792	0,8150
$C_{TPC}$ (mg <sub>GAE</sub> /g <sub>s.tv.</sub> )	127,65	1,1750	-1,5213	1,6488	2,7325	2,9825	3,1400	6,0967	-1,9808	0,9092
<i>p</i> -vrijednost		0,7822	0,7212	0,6993	0,6517	0,6230	0,6052	0,3510	0,7519	0,8841
$C_{SPC}$ (mg <sub>GAE</sub> /g <sub>s.tv.</sub> )	8,40	0,1888	0,0975	0,4313	0,6375	0,4600	0,1225	0,7200	-0,0775	-0,3050
<i>p</i> -vrijednost		0,5550	0,7572	0,2082	0,1914	0,3256	0,7833	0,1622	0,8669	0,5185
EE (%)	93,20	0,0438	-0,2763	-0,1725	-0,3325	-0,2750	0,1550	-0,1404	0,0596	0,3171
<i>p</i> -vrijednost		0,9134	0,5028	0,6711	0,5659	0,6330	0,7861	0,8131	0,9199	0,5978

A: temperatura, *T*  
B: vrijeme miješanja, *t*  
C: brzina miješanja, *n*

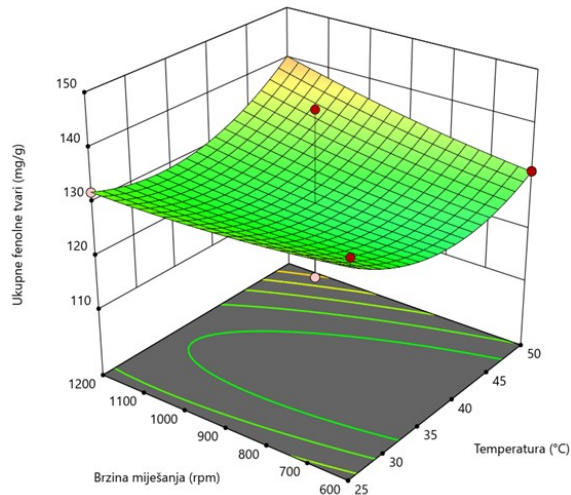
*p*-vrijednost:  $p < 0,05$   $0,05 \leq p < 0,1$   $p \geq 0,1$



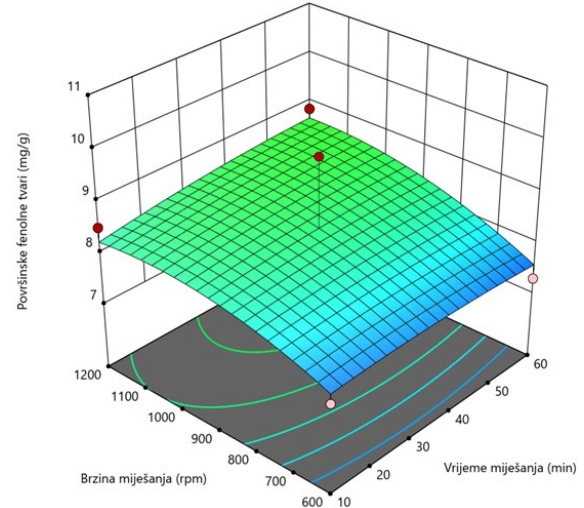
(a)



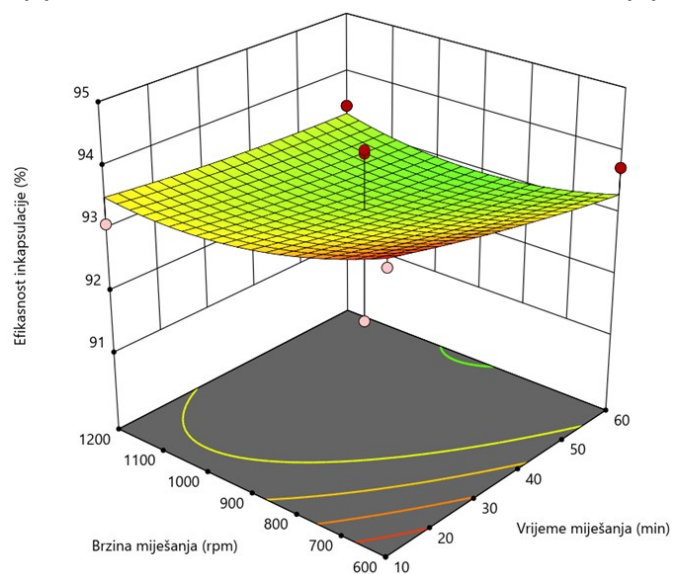
(b)



(c)



(d)



(e)

**Slika 19.** 3D prikaz utjecaja temperature, vremena i brzine miješanja na udio vlage u prahu (a), prinos produkta (b), koncentraciju ukupnih fenolnih tvari (c), koncentraciju površinskih fenolnih tvari (d) i efikasnost inkapsulacije (e) praha

Gustoća praha prije potresanja izračunata je kao omjer mase praha i volumena kojeg prah zauzima u menzuri. Na ovu karakteristiku praha utječe sadržaj vlage u prahu te veličina i raspodjela veličine čestica. Što je veći sadržaj vlage u uzorku praha to će biti povećana ljepljivost čestica i stvarati će se više slobodnog prostora između čestica što će za posljedicu imati povećanu gustoću praha prije potresanja. Smanjenjem veličine čestica praha, povećava se kontaktna površina s okolinom i smanjuju se pore između čestica što ponovno za posljedicu imat povećanu gustoću praha prije potresanja (Phisut, 2012).

U **Tablica 10.** prikazani se eksperimentalno dobivene vrijednosti gustoće praha prije i nakon potresanja. Vrijednosti gustoće prije potresanja iznose 0,0476 – 0,0874 g/cm<sup>3</sup>, a vrijednosti gustoće praha nakon potresanja iznose 0,0690 – 0,1333 g/cm<sup>3</sup>. Proba s najvišom gustoćom prije potresanja je prah 11 (0,0874 g/cm<sup>3</sup>), a s najnižom vrijednošću je proba 4 (0,0476 g/cm<sup>3</sup>), proba s najvećom gustoćom nakon potresanja je proba 15 (0,1333 g/cm<sup>3</sup>), a s najnižom vrijednošću je proba 2 (0,0690 g/cm<sup>3</sup>).

Prema radu autora Juliano i Barbosa-Canovas (2010) tecivost praha je definirana kao relativno kretanje mase čestica među susjednim česticama ili duž površine stijenke spremnika. Parametri koje koristimo za karakterizaciju tecivosti praha jesu Carr indeks (CI) i Hausner omjer (HR) koji su izračunati na temelju vrijednosti gustoće praha prije i nakon potresanja. U **Tablici 10.** prikazane su eksperimentalno dobivene vrijednosti za Hausner omjer i Carr index za svaku probu. Vrijednosti Hausner omjera su varirale između 1,30 – 1,67 dok vrijednosti Carr indexa se kreću između 23,08 – 40,0 %. Vrijednsoti za CI i HR ukazuju da sve probe karakterizira vrlo loša tecivost.

**Tablica 10.** Gustoća praha prije (BD) i nakon potresanja (TD), Hasuner omjer (HR) i Carr indeks (CI) proizvedenih prahova

PROBA	A: $T$ (° C)	B: $t$ (min)	C: $n$ (rpm)	BD (g/cm <sup>3</sup> )	TD (g/cm <sup>3</sup> )	HR (-)	CI (%)
1	37,5	10	1200	0,057	0,080	1,40	28,57
2	50,0	35	600	0,048	0,069	1,45	30,95
3	50,0	60	900	0,061	0,080	1,32	24,24
4	50,0	10	900	0,048	0,069	1,45	30,95
5	37,5	35	900	0,067	0,105	1,58	36,67
6	37,5	60	1200	0,059	0,083	1,42	29,41
7	50,0	35	1200	0,077	0,100	1,30	23,08
8	37,5	35	900	0,069	0,105	1,53	34,48
9	25,0	35	1200	0,077	0,106	1,37	26,92
10	37,5	10	600	0,069	0,098	1,42	29,35
11	25,0	60	900	0,087	0,126	1,44	30,43
12	37,5	60	600	0,063	0,091	1,45	31,25
13	25,0	10	900	0,070	0,102	1,45	31,03
14	37,5	35	900	0,067	0,105	1,58	36,67
15	25,0	35	600	0,080	0,133	1,67	40,00

A: temperatura,  $T$   
 B: vrijeme miješanja,  $t$   
 C: brzina miješanja,  $n$

**Tablica 11.** Statistički pokazatelji značajnosti utjecaja temperature, vremena i brzine miješanja na gustoću praha prije (BD) i nakon potresanja (TD), Hausner omjer (HR) i Carr indeks (CI) praha

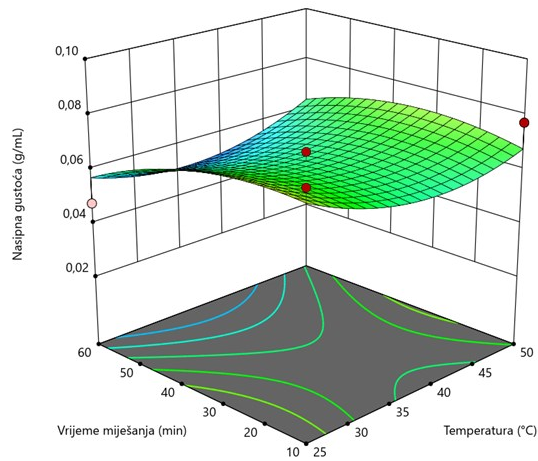
	Intercept	A	B	C	AB	AC	BC	A <sup>2</sup>	B <sup>2</sup>	C <sup>2</sup>
<b>BD</b>	0,06	-0,0002	-0,0055	-0,0054	0,0035	0,0062	0,0030	0,0091	-0,0065	0,0033
<i>p</i> -vrijednost		0,9635	0,1935	0,2005	0,5294	0,2804	0,5912	0,1485	0,2801	0,5628
<b>TD</b>	0,09	-0,0044	-0,0095	-0,0115	0,0105	0,0065	0,0028	0,0110	-0,0052	0,0030
<i>p</i> -vrijednost		0,5218	0,2005	0,1350	0,3023	0,5066	0,7744	0,2988	0,6074	0,7627
<b>HR (-)</b>	1,45	-0,0550	-0,0213	-0,0538	0,0675	-0,0325	-0,0250	-0,0300	0,0575	-0,0175
<i>p</i> -vrijednost		0,1600	0,5520	0,1679	0,2117	0,5214	0,6187	0,5678	0,2942	0,7360
<b>CI (%)</b>	30,72	-2,5363	-0,8438	-2,5825	2,8850	-1,7175	-1,1425	-1,5475	2,6475	-0,7000
<i>p</i> -vrijednost		0,1582	0,6050	0,1522	0,2399	0,4632	0,6200	0,5225	0,2926	0,7684

A: temperatura,  $T$   
 B: vrijeme miješanja,  $t$   
 C: brzina miješanja,  $n$

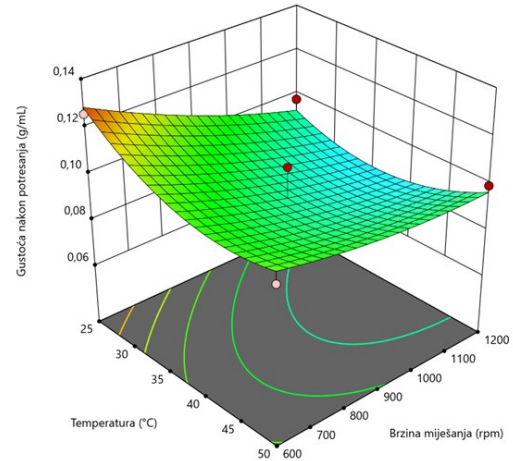
*p*-vrijednost:  $p < 0,05$   $0,05 \leq p < 0,1$   $p \geq 0,1$

Iz  $p$  – vrijednosti vidljivih iz **Tablice 11.** se može zaključiti da niti jedna nezavisna varijabla (temperatura, vrijeme i brzina miješanja) nemaju statistički značajan utjecaj na gustoću prije i nakon potresanja te na Hausner omjer i Carr indeks, što je također vidljivo i na **Slici 20.**

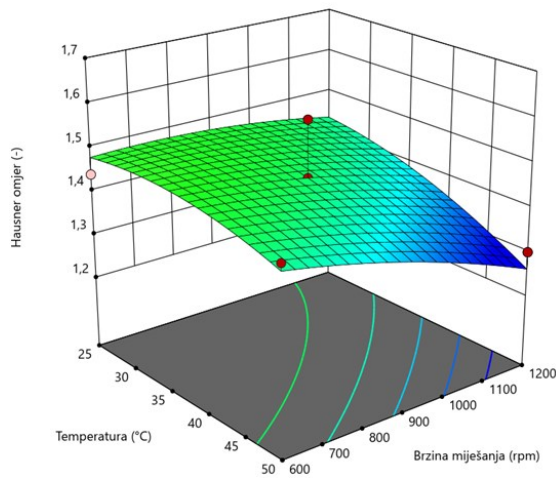




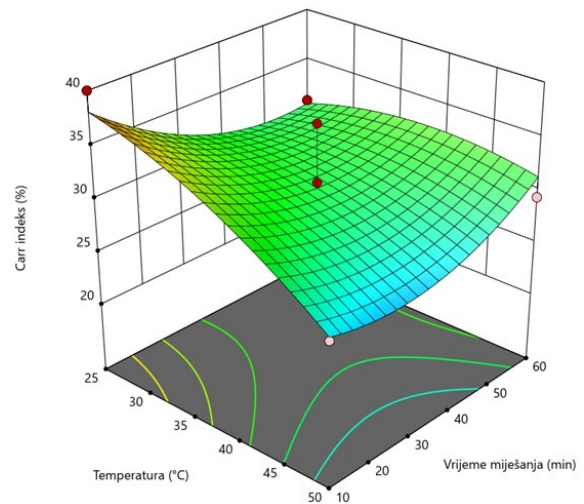
(a)



(b)



(c)



(d)

**Slika 20.** 3D prikaz utjecaja temperature, vremena i brzine miješanja na nasipnu gustoću (a), gustoću poslije potresanja (b), Hausner omjer (c) i Carr index (d) praha

Svim prahovima, odnosno mikroinkapsulatima ekstrakta tropa grožđa bogatog fenolnim spojevima, napravljenim u ovom eksperimentu, određeni su parametri boje  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  primjenom CIEL<sup>\*</sup> $a^*b^*$  sustava boja.  $L^*$  koordinata predstavlja svjetlinu, što je njena vrijednost manja to je obojenje jače, odnosno boja je tamnija, a što je njena vrijednost veća to je obojenje manje intenzivno, odnosno prah je svjetliji. Parametri  $a^*$  i  $b^*$  su koordinate kromatičnosti pa tako  $+a^*$  predstavlja crvenu os, dok  $-a^*$  zelenu os,  $+b^*$  koordinata predstavlja žutu os,  $-b^*$  plavu os. Ukupna promjena boje praha izračunata je u odnosu na boju omotača (kozje sirutke u prahu). Vrijednosti svih koordinata CIEL<sup>\*</sup> $a^*b^*$  sustava boja dobivenih mjerenjem proba iz ovog eksperimenta su prikazane u **Tablici 12**.

**Tablica 12.** Vrijednosti parametara boje praha

PROBA	PARAMETRI BOJE		
	L*	a*	b*
1	62,20	6,92	2,7
	61,61	6,95	2,69
	61,50	6,98	2,77
2	62,31	6,62	2,51
	60,10	6,57	2,4
	62,57	6,82	2,45
3	55,41	6,04	2,39
	55,26	6,06	2,34
	55,39	6,05	2,34
4	63,71	6,86	2,62
	64,67	7,72	2,96
	62,11	6,23	2,75
5	69,61	8,01	3,01
	70,05	8,06	3,12
	69,14	8,03	3,05
6	64,27	7,50	2,95
	64,99	7,64	2,99
	64,30	7,58	2,96
7	66,95	7,52	3,27
	66,83	7,41	3,15
	66,37	7,65	3,24
8	69,03	8,56	3,6
	70,02	8,36	3,24
	68,73	8,30	3,25
9	65,31	6,12	4,02
	68,84	6,18	4,14
	67,15	6,10	4,07
10	65,36	8,11	3,46
	67,90	8,04	3,53
	68,58	8,38	3,57
11	57,52	7,50	2,6
	58,46	7,55	2,64
	57,86	7,47	2,66
12	59,55	6,83	2,08
	61,21	7,03	2,17
	58,51	7,27	2,19
13	58,20	7,24	2,45
	59,95	7,32	2,56
	58,54	7,14	2,56
14	69,56	8,13	3,19
	70,17	8,41	3,07
	68,52	8,02	3,17
15	61,60	8,65	3,53
	61,90	8,75	3,65
	61,66	8,62	3,5

Vrijednosti  $L^*$  praha iznose 55 – 70,  $a^*$  vrijednosti iznose 6 – 9 i  $b^*$  vrijednosti iznose 2 – 4. Vrijednosti za omotač su iznosile:  $L_0^* = 80,17$ ,  $a_0^* = -2,03$  i  $b_0^* = 16,35$ . Temeljem dobivenih vrijednosti uočljivo je da prilikom inkapsulacije sušenjem raspršivanjem dolazi do nastanka svijetlih uzoraka praha s blago razvijenom žutom i crvenom bojom. Vrijednosti ukupne promjene boje praha u odnosu na omotač iznose 19,73 – 29,61, što prema **Tablici 6.** ukazuje da su promjene boje vrlo uočljive ljudskom oku.

U **Tablici 13.** prikazane su eksperimentalno dobivene vrijednosti indeksa adsorpcije vode, indeksa topivosti u vodi, sposobnosti bubrenja i ukupne promjene boje. Vrijednosti indeksa adsorpcije vode su varirale između 7,36 – 16,77. Najvišu WAI ima proba 7 koja je homogenizirana pri 50 °C, 35 min pri 1200 rpm, dok najmanju vrijednost ima proba 12 homogenizirana pri 37,5 °C, 60 min pri 600 rpm. Jednako kao i kod indeksa adsorpcije vode, najvišu vrijednosti sposobnosti bubrenja ima proba 7 (38,48) dok najniži ima proba 12 (14,97). Jednako kao i kod WAI, SP vrijednosti rastu porastom udjela suhe tvari u prahu. Vrijednosti indeksa topivosti u vodi su varirale od 49,82 do 65,46 %. Proba 13 ima najnižu vrijednost indeksa topivosti u vodi (49,82 %), dok proba 9 ima najvišu vrijednost (65,46 %).

Budući da je krajnjim potrošačima važna brza i potpuna rekonstitucija praha, karakteristike indeks topivosti u vodi (WSI), indeks adsorpcije vode (WAI) i sposobnost bubrenja (SP) predstavljaju glavne pokazatelje kvalitete praha. Na topivost praha utjecaj imaju različiti parametri poput odabira omotača, postavke procesnih uvjeta – ponajviše protok zraka i protok pojne smjese (Jafari, 2017). Svaki kvalitetni prah bi trebao imati što manje vrijednosti indeksa adsorpcije vode i što veće vrijednosti indeksa topivosti u vodi (Vidović i sur., 2014). Na **slici 27.** prikazana su izračunate vrijednosti za WAI, WSI i SP.

Iz  $p$  – vrijednosti vidljivih iz **Tablice 14.** se može zaključiti da niti jedna nezavisna varijabla (temperatura, vrijeme i brzina miješanja) nemaju statistički značajan utjecaj indeks adsorpcije vode, indeks topivosti u vodi, sposobnost bubrenja u vodi i ukupnu promjenu boje, što je također vidljivo na **Slici 21.**

**Tablica 13.** Vrijednosti indeksa topivosti u vodi (WSI), indeksa adsorpcije vode (WAI), sposobnost bubrenja (SP) i ukupna promjena boje ( $\Delta E_{ab^*}$ ) proizvedenih prahova

PROBA	A: $T$ (° C)	B: $t$ (min)	C: $n$ (rpm)	WSI (%)	WAI (-)	SP (-)	$\Delta E_{ab^*}$ (-)
1	37,5	10	1200	57,82	10,04	23,89	24,60
2	50,0	35	600	53,81	10,26	22,22	24,74
3	50,0	60	900	54,76	10,55	23,32	29,61
4	50,0	10	900	56,20	10,48	23,90	23,32
5	37,5	35	900	62,68	10,18	27,36	19,74
6	37,5	60	1200	56,61	13,58	31,15	22,72
7	50,0	35	1200	56,40	16,77	38,48	21,09
8	37,5	35	900	62,79	10,31	27,78	19,92
9	25,0	35	1200	65,46	9,16	26,44	19,73
10	37,5	10	600	59,72	10,84	26,95	20,88
11	25,0	60	900	52,41	7,62	15,94	27,80
12	37,5	60	600	51,03	7,36	14,97	26,48
13	25,0	10	900	49,82	9,92	19,78	27,01
14	37,5	35	900	62,63	10,21	27,44	19,87
15	25,0	35	600	51,08	9,81	20,02	24,87

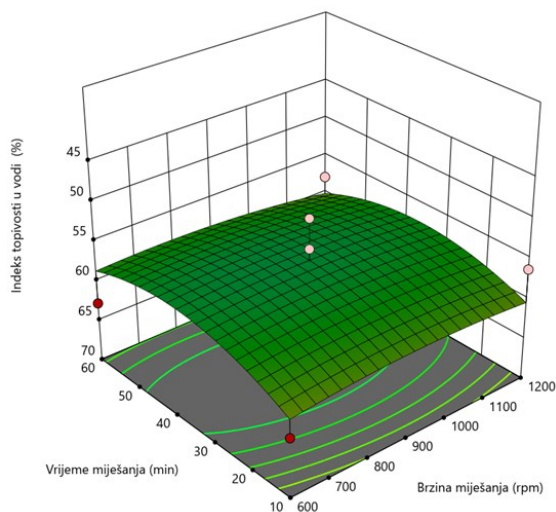
A: temperatura,  $T$   
 B: vrijeme miješanja,  $t$   
 C: brzina miješanja,  $n$

**Tablica 14.** Statistički pokazatelji značajnosti utjecaja temperature, vremena i brzine miješanja na indeks topivosti u vodi (WSI), indeksa adsorpcije vode (WAI), sposobnost bubrenja (SP) i ukupna promjena boje ( $\Delta E_{ab^*}$ ) praha

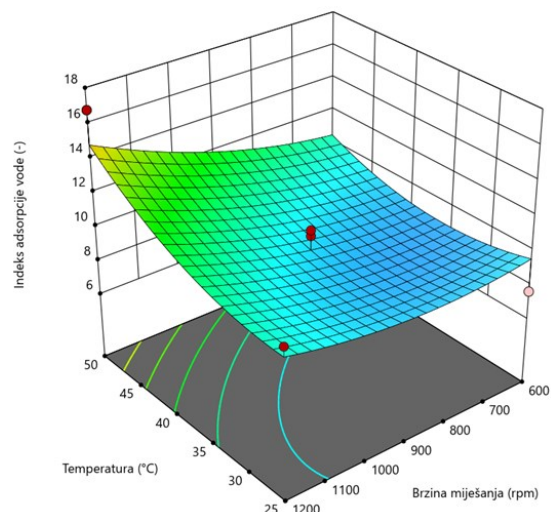
	Intercept	A	B	C	AB	AC	BC	A <sup>2</sup>	B <sup>2</sup>	C <sup>2</sup>
WSI (%)	56,14	1,4088	-0,5763	0,3050	-2,8950	-0,1825	0,4325	-2,3425	2,9425	0,7900
$p$ -vrijednost		0,5778	0,8174	0,9025	0,4269	0,9587	0,9023	0,5314	0,4371	0,8297
WAI (-)	9,37	1,3625	0,5375	1,2625	0,9925	0,9075	-0,0775	1,1821	0,1471	0,7321
$p$ -vrijednost		0,1537	0,5368	0,1802	0,4263	0,4646	0,9487	0,3675	0,9067	0,5665
SP (-)	21,91	3,8400	0,8100	2,7950	0,6275	1,9225	0,1025	1,3013	1,7463	2,0763
$p$ -vrijednost		0,1918	0,7632	0,3222	0,8685	0,6162	0,9784	0,7425	0,6608	0,6033
$\Delta E_{ab^*}$ (-)	25,32	-0,9675	0,4950	-0,5725	0,7800	0,2500	0,3650	-0,0025	-2,3025	-1,1225
$p$ -vrijednost		0,5864	0,7782	0,7450	0,7539	0,9196	0,8829	0,9992	0,3906	0,6662

A: temperatura,  $T$   
 B: vrijeme miješanja,  $t$   
 C: brzina miješanja,  $n$

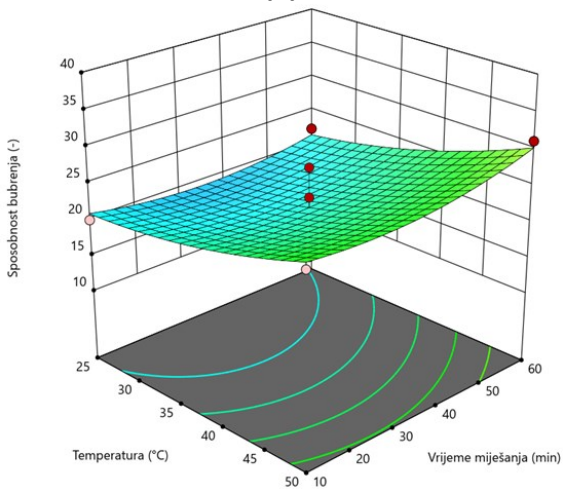
$p$ -vrijednost:  $p < 0,05$   $0,05 \leq p < 0,1$   $p \geq 0,1$



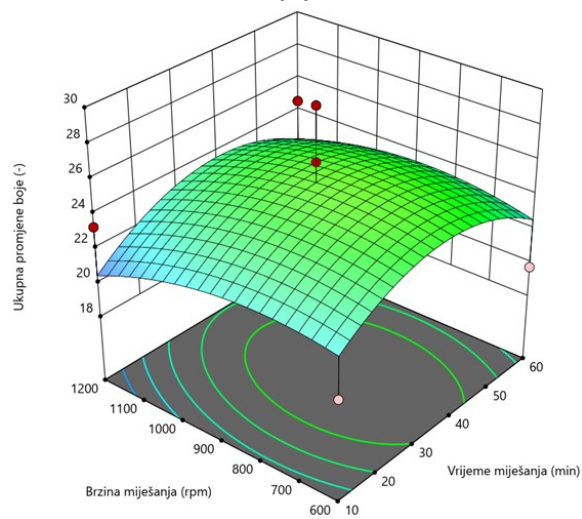
(a)



(b)



(c)



(d)

**Slika 21.** 3D prikaz utjecaja temperature, vremena i brzine miješanja na indeks toplivosti u vodi (a), indeks adsorpcije vode (b) i sposobnost bubrenja (c) praha

Optimiranje procesa homogenizacije pojne smjese na magnetnoj miješalici provedenom je aproksimacijom eksperimentalnih podataka polinomom drugog reda koji daje funkcionalnu ovisnost ispitan je utjecaj nezavisnih varijabli (temperature, vremena miješanja i brzine miješanja) na zavisne varijable te je ispitana prikladnost primijenjenog Box-Behnkenovog plana eksperimenta u modeliranju i optimiranju procesa homogenizacije pojne smjese na magnetnoj miješalici. Model i njegovi koeficijenti dobiveni su statističkom metodom (ANOVA) nelinearne regresije eksperimentalnih podataka. Model za sve zavisne varijable iz ovog eksperimenta je bio kvadratni.

Budući da su sve  $p$ -vrijednosti modela bile veće od 0,05 to znači da uvjeti modela u slučaju homogenizacije pojne smjese na magnetnoj miješalici nisu značajni odnosno da ne postoji statistički značajna veza između nezavisnih varijabli i odziva.

Provedena je numerička optimizacija parametara homogenizacije u ispitivanim rasponima s obzirom na odzive udjela vlage u prahu (minimalna vrijednost) i efikasnosti inkapsulacije (maksimalna vrijednosti). Optimizacija je provedena obradom eksperimentalnih podataka u softveru Design Expert v.13 (Stat Ease, Minneapolis, USA), a optimalni uvjeti homogenizacije u ultrazvučnoj kupelji prikazani su u **Tablici 15**.

**Tablica 15.** Optimalni uvjeti homogenizacije pojne smjese na magnetnoj miješalici

<b>TEMPERATURA (°C)</b>	50
<b>VRIJEME MIJEŠANJA (min)</b>	10
<b>BRZINA MIJEŠANJA (rpm)</b>	600

Kako bi se verificirala optimizacija procesa proveden je pokus inkapsulacije sušenjem raspršivanjem uz miješanje pojne smjese na magnetnoj miješalici pri određenim optimalnim uvjetima (**Tablica 15**). Dobiveni prah je analiziran te su uspoređene procijenjene i eksperimentalno određene vrijednosti svojstava proizvedenog praha (mikrokapsula).

**Tablica 16.** Prikaz vrijednosti predviđenih modelima i eksperimentalno dobivenih vrijednosti

<b>ODZIV</b>	<b>PREDVIĐENA VRIJEDNOST</b>	<b>ODREĐENA VRIJEDNOST</b>	<b>ODSTUPANJE (%)</b>
<b>EFIKASNOST INKAPSULACIJE (%)</b>	94,70	91,45	3,4
<b>UDIO VLAGE (%)</b>	5,92	5,96	0,7
<b>PRINOS (%)</b>	86,16	81,11	5,9
<b>INDEKS TOPIVOSTI U VODI (%)</b>	62,72	52,46	16,4
<b>INDEKS ADSORPCIJE VODE (-)</b>	9,02	9,76	8,2
<b>SPOSOBNOST BUBRENJA (-)</b>	24,82	20,54	17,2
<b>HAUSNER OMJER (-)</b>	1,42	1,42	0,0
<b>CARR INDEKS (%)</b>	31,82	29,63	6,9
<b>UKUPNA PROMJENA BOJE (-)</b>	20,34	22,79	12,0

Usporedbom procijenjenih i eksperimentalno određenih vrijednosti svojstava praha može se uočiti da su odstupanja vrijednosti uglavnom manja od 10 %, osim za vrijednost indeksa topivosti u vodi, sposobnosti bubrenja praha ukupne promjene boje praha gdje su zabilježena odstupanja u rasponu od 12,0 % do 17,2 %.

## **5. ZAKLJUČAK**



Na osnovu provedenog istraživanja utjecaja parametara miješanja pojne smjese (ekstrakta tropa grožđa i kozje sirutke kao nosača) na fizikalno-kemijska svojstva praha (mikrokapsula) dobivenog sušenjem raspršivanjem te primjenom RSM metode optimiranja, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- parametri miješanja pojne smjese na magnetnoj miješalici, odnosno temperatura, vrijeme i brzina miješanja u ispitivanim rasponima nemaju statistički značajan utjecaj na inkapsulacijsku efikasnost te fizikalno-kemijske karakteristike dobivenih mikrokapsula (prahova)
- ostvareni su visoki prinosi sušenja raspršivanjem u laboratorijskim uvjetima, i to u rasponu 70,82 – 93,05 %
- koncentracija ukupnih fenolnih spojeva određenih u mikrokapsulama varirala je od 113,31 mg<sub>GAE/g<sub>s.tv.</sub></sub> do 147,75 mg<sub>GAE/g<sub>s.tv.</sub></sub> uz nizak sadržaj fenolnih tvari zadržanih na površini mikrokapsula (7,28 mg<sub>GAE/g<sub>s.tv.</sub></sub> do 10,07 mg<sub>GAE/g<sub>s.tv.</sub></sub>), odnosno bez obzira na primijenjene uvjete miješanja pojne smjese svi eksperimenti rezultirali su visokim postotkom inkapsulacijske efikasnosti (od 91,37 % do 94,56 %)
- udio vlage u dobiveni prahovima kretao se u rasponu od 5,90 do 6,04 % što je mogući uzrok nezadovoljavajućih svojstava tečnosti proizvedenih prahova prema Hausner omjeru i Carr indeksu
- prahovi su pokazali zadovoljavajuću topivost u vodi s vrijednostima indeksa topivosti u vodi u rasponu 49,82 – 65,46 %
- numeričkom optimizacijom uz postavljen uvjet maksimalne vrijednosti efikasnosti inkapsulacije i minimalnog udjela vode u prahu unutar ispitivanog raspona, određeni su optimalni procesni parametri miješanja, koji su iznosili: 50 °C i 600 rpm tijekom 10 minuta.

## **6. LITERATURA**

1. Antičić B, Jančinkova S, Dordević D, Tremlova B: Grape Pomace Valorization: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Foods*, 9(11). 2020. doi:10.3390/foods9111627
2. Banožić, M, Vladić J, Banjari I, Velić D, Aladić K, and Jokić S: "Spray Drying as a Method of Choice for Obtaining High Quality Products from Food Wastes– A Review." *Food Reviews International* 39 (4): 1953–85, 2023.
3. Borges LL, Martins FS, Conceição EC, and Silveira D: "Optimization of the Spray-Drying Process for Developing Jaboticaba Waste Powder Employing Response Surface Methodology." *Journal of Food Process Engineering* 40 (1), 2017.
4. Boyano-Orozco L, Gallardo-Velázquez T, Meza-Márquez O. G, Osorio-Revilla G: Microencapsulation of Rambutan Peel Extract by Spray Drying. U *Foods*, 9, 899. 2020. doi:10.3390/foods9070899
5. Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Bren U: Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. U *Molecules* 21 (7): 901. 2016. doi:10.3390/molecules21070901
6. Bucić-Kojić A: Utjecaj procesnih uvjeta i načina kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa. Doktorski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2008.
7. Bucić-Kojić A, Fernandes F, Silva T, Planinić M, Tišma M, Šelo G, Šibalić D, Pereira D M, Andrade P B: Enhancement of anti-inflammatory properties of grape pomace treated by *Trametes versicolor*. *Food & Function*, 2020, 11, 680-688 2012. doi: 10.1039/C9FO02296A
8. Cvejic Hogervorst J, Miljić U, Puškaš V: Extraction of Bioactive Compounds from Grape Processing By-Products. U *Handbook of Grape Processing By-Products*. Editor(s): Charis M. Galanakis, Academic Press, 105-135. 2017. doi: 10.1016/B978-0-12-809870-7.00005-3
9. Chung-Woo L, Hyun-Jung O, Sang-Heon H, Sang-Bin L: "Effects of hot air and freeze drying methods on physicochemical properties of citrus 'hallabong' powders". U *Food Science and Biotechnology* 21: 1633-1639
10. Čović-Stanić A: Utjecaj tipa miješala na karakteristike raspršenja plina u kapljevini. Diplomski rad. Kemijsko-tehnološki fakultet Split, Split, 2021.
11. Đerić D: Sušenje raspršivanjem u proizvodnji proteina sirutke. Diplomski rad. Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet, Mostar, 2022.
12. Đorđević V, Adamantini P, Fani M, Sofia L, Milena P, Branko B, Viktor N: Encapsulation Technologies for Food Industry. *Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food*. 329–82. 2016. doi 10.1007/978-3-319-24040-4\_18
13. EFSA: Scientific Opinion on the Evaluation of the Substances Currently on the List in the Annex to Commission Directive 96/3/EC as Acceptable Previous Cargoes for Edible Fats and Oils – Part I of III. *EFSA Journal*, 9(12):2482. 2011. doi:10.2903/j.efsa.2011.2482
14. European Pharmacopoeia, 7th Ed., European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, Council of Europe, Strasbourg 2010.
15. FAOSTAT, Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database, <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (27.7.2023.)

16. Ferreira M. S, Santos L: A Potential Valorization Strategy of Wine Industry by-Products and Their Application in Cosmetics—Case Study: Grape Pomace and Grapeseed. *U Molecules*, 27, 969. 2022. doi.org/10.3390/molecules27030969
17. Gharsallaoui A, Gaëlle R, Odile C, Andrée V, Rémi S: Applications of Spray-Drying in Microencapsulation of Food Ingredients. *Food Research International* 40 (9): 1107–21. 2007. doi:10.1016/j.foodres.2007.07.004
18. Grgić J, Šelo G, Planinić M, Tišma M, Bucić-Kojić A: Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds. *Antioxidants* 9(10), 923, 2020. DOI: 10.3390/antiox9100923
19. Jafari Seid M: An Overview of Nanoencapsulation Techniques and Their Classification. *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*, 1–34. 2017. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809436-5.00001-X.
20. Jaković M: Utjecaj dodatka tropa grožđa na kvalitetu krepera. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2020.
21. Ji J, Fitzpatrick J, Cronin K, A. Fenelon M, Miao S: The effects of fluidized bed and High Shear mixer 2 granulation processes on water adsorption and flow 3 properties of milk protein isolate powder. *Journal of Food Engineering*, 2016. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2016.07.018.
22. Juliano P, V. Barbosa-Canovas G: Food powders flowability characterization: theory, methods, and applications. *U Annu Rev Food Sci Technol*, 211 - 39, 2010. doi: 10.1146/annurev.food.102308.124155
23. Jurić, M: Proizvodnja praškastih biljnih ekstrakata sušenjem raspršivanjem. Diplomski rad. Prehrambeno - biotehnološki fakultet Zagreb, Zagreb, 2017..
24. Jurić T: Utjecaj različitih omotača na učinkovitost enkapsulacije ukupnih fenolnih spojeva iz ekstrakta tropa grožđa sorte cabernet sauvignon. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2022.
25. Kalamara E, Goula A. M, Adamopoulos G. K: An Integrated Process for Utilization of Pomegranate Wastes — Seeds. *U Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27: 144–53, 2015. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.12.001.
26. Kalušević, A. M, Lević M. S, Čalija B. R, Milić R. M, Pavlović B. V, Bugarski M. B, Nedović A. V: Effects of Different Carrier Materials on Physicochemical Properties of Microencapsulated Grape Skin Extract. *U Journal of Food Science and Technology* 54 (11): 3411–20. 2017. https://doi.org/10.1007/s13197-017-2790-6.
27. Kelly GM, O'Mahony JA, Kelly AL, O'Callaghan DJ: "Effect of hydrolyzed whey protein on surface morphology, water sorption, and glass transition temperature of a model infant formula", *U Journal of Dairy Science*, 2016.
28. Kha T. C, Nguyen M. H, Roach P. D: Effects of Spray Drying Conditions on the Physicochemical and Antioxidant Properties of the Gac (*Momordica Cochinchinensis*) Fruit Aril Powder. *U Journal of Food Engineering* 98 (3): 385–92, 2010. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.016.
29. Lacerda E C Q, de Araújo Calado V M, Monteiro M, Finotelli P V, Guedes Torres A, Perrone D: Starch, inulin and maltodextrin as encapsulating agents affect the quality

- and stability of jussara pulp microparticles. U *Carbohydr Polym.* 151, 500-510, 2016. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.05.093.
30. Labuschagne, P: Impact of Wall Material Physicochemical Characteristics on the Stability of Encapsulated Phytochemicals. U *Food Research International* 107: 227–47. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.026>.
  31. Lukinac Čačić J: Matematičko modeliranje i optimiranje kinetike promjene boje kruha tijekom pečenja. Doktorski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2012.
  32. Marchiani R, Bertolino M, Ghirardello D, L. H. McSweeney P, Zeppa G: Physicochemical and nutritional qualities of grape pomace powder-fortified semi-hard cheeses. *Journal of Food Science and Technology.* 53, 1585–1596, 2016. doi: 10.1007/s13197-015-2105-8
  33. Matijević B: Mogućnosti iskorištavanja i upotrebe sirutke. Pregledni rad. Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 2018.
  34. Matos S M, Romero-Diez R, Alvarez A, Bronze M R, Rodriguez-Rojo S, B. Mato S, Cocero M J, Matias A A: Polyphenol-Rich Extracts Obtained from Winemaking Waste Streams as Natural Ingredients with Cosmeceutical Potential. U *Antioxidants*, 8, 355. 2019. doi:10.3390/antiox8090355
  35. Mavrommatis A, Giamouri E, D. Myrtsi E, Evergetis E, Filippi K, Papapostolou H, D. Koulocheri S, Zoidis E, C. Pappas A, Koutinas A, A. Haroutounian S, Tsiplakou E: Antioxidant Status of Broiler Chickens Fed Diets Supplemented with Vinification By-Products: A Valorization Approach. U *Antioxidants*, 10, 1250, 2021. <https://doi.org/10.3390/antiox10081250>
  36. Milosavljević N: Sušenje prirodnih materijala u sušioniku s raspršivanjem. Diplomski rad. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Zagreb, Zagreb, 2017.
  37. Nemet A: Kinetika otpuštanja fenolnih spojeva iz liofilizacijom inkapsuliranih ekstrakata tropa grožđa sorte cabernet sauvignon. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2023.
  38. O’Sullivan J. J., Norwood E. A, O’Mahony A. J, Kelly L. A: Atomisation Technologies Used in Spray Drying in the Dairy Industry. U *Journal of Food Engineering* 243: 57–69. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.08.027>.
  39. Pavel S, Klejdus B, Kuban V: Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables-Evaluation of spectrophotometric methods. U *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:607-616, 2006. doi: 10.1021/jf052334j
  40. Phisut N: Spray drying technique of fruit juice powder: some factors influencing the properties of product. U *International Food Research Journal* 19(4): 1297-1306, 2012.
  41. Saifullah Md, Shishir I. R. M, Ferdowsi R, Rahman T. R. Md, Vuong Q: Micro and Nano Encapsulation, Retention and Controlled Release of Flavor and Aroma Compounds. U *Trends in Food Science & Technology* 86: 230–51. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.030>.
  42. Shishir I R M, Chen W: Trends of Spray Drying: A Critical Review on Drying of Fruit and Vegetable Juices. U *Trends in Food Science & Technology* 65: 49–67. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.006>.

43. Skračić Ž, Ljubenkov I, Mimica N, Generalić Mekinić I: Valorizacija nusproizvoda proizvodnje vina. *Kemija u industriji* 72, 3–4 (247 - 255). 2023. <https://doi.org/10.15255/KUI.2022.051>.
44. Šelo G: Razvoj procesa biološke obrade i frakcioniranja tropa grožđa u svrhu proizvodnje fenolnih spojeva. Doktorska disertacija. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2022.
45. Tahmaz J: Enkapsulacijske tehnike u prehrambenom inženjerstvu. Dobra knjiga, Sarajevo, 2019.
46. Theagarajan R, Narayanaswamy L M, Dutta S, Moses J A, Chinnaswamy A: Valorisation of grape pomace (cv. *Muscat*) for development of functional cookies. U *International Journal of Food Science and Technology*. 54 (4): 1299-1305, 2019. doi: 10.1111/ijfs.14119
47. Tolun A, Altintas Z, Artik N: Microencapsulation of Grape Polyphenols Using Maltodextrin and Gum Arabic as Two Alternative Coating Materials: Development and Characterization. U *Journal of Biotechnology* 239: 23–33. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.001>.
48. Tomas S, Planinić M, Bucić-Kojić A: Jedinične operacije u prehrambenom i procesnom inženjerstvu. Interna skripta. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2013.
49. Tontul I, Topuz A: Spray-Drying of Fruit and Vegetable Juices: Effect of Drying Conditions on the Product Yield and Physical Properties. U *Trends in Food Science & Technology* 63: 91–102. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.009>.
50. Trifkovic K, Tadić G, Bugarski B: Short overview of encapsulation technologies for delivery of bioactives to food. U *Journal of engineering & processing management* 8 (1). 2016. <https://doi.org/10.7251/JEPMEN1608103T>.
51. Vidović S S, Vladić J Z, Vaštag Ž G, Zeković Z P, Popović LJ M: Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in *Satureja montana* dry powder extract obtained by spray drying technique. U *Powder Technology* 258 (2014) 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.03.038>
52. Vu T. H, J. Scarlett C. V. Voung Q: Encapsulation of phenolic-rich extract from banana (*Musa cavendish*) peel. U *J Food Sci Technol*, 57(6):2089–2098, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04243-6>.
53. Waterhouse A. L: Determination of Total Phenolics. U *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, str. 11.1.1-11.1.8. John Wiley & Sons, New York, Sjedinjene Američke Države, 2009. doi:10.1002/0471142913.faa0101s06
54. Yousefi S, Emam-Djomeh Z, M. Mousavi S: Effect of carrier type and spray drying on the physicochemical properties of powdered and reconstituted pomegranate juice (*Punica Granatum L.*). U *J Food Sci Technol*, 48(6):677–684, 2011. doi 10.1007/s13197-010-0195-x