

# 3D printanje jestivih gelova i inkapsulacija biljnih ekstrakata

---

**Gregorović, Romia**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:464605>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Romia Gregorović**

7000/PT

**3D PRINTANJE JESTIVIH GELOVA I INKAPSULACIJA  
BILJNIH EKSTRAKATA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:**  
**„Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja sa “zelenim otapalima” primjenom visokonaponskog pražnjenja” (IP-2016-06-1913) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.**

**Mentor:** Prof. dr. sc. *Anet Režek Jambrak*

**Zagreb, 2020.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za opće programe  
Laboratorij za održivi razvoj

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### 3D PRINTANJE JESTIVIH GELOVA I INKAPSULACIJA BILJNIH EKSTRAKATA

*Romina Gregorović, 0058206151*

**Sažetak:** Biljni ekstrakti izvor su brojnih bioaktivnih molekula s potencijalnim povoljnim utjecajem na zdravlje čovjeka. S obzirom na to da je njihova bioraspodjeljivost često ograničena, istražuju se tehnologije kojima će se takvi aktivni spojevi moći ugraditi u funkcionalne proizvode. Jedan od načina prevođenja biljnih ekstrakata u stabilniju formu je tehnologija inkapsulacije koja omogućava očuvanje i kontrolirano otpuštanje aktivne tvari obložene vanjskim omotačem od hidrokoloida, dok se metoda 3D printanja koristi se za dobivanje novih tekstura, okusa i složenih oblika prehrambenih proizvoda. U ovom radu, proveden je postupak inkapsulacije biljnog ekstrakta origana. Dobiveni rezultati pokazali su da je otpuštanje polifenolnih spojeva iz suhih mikrosfera produljeno u odnosu na otpuštanje polifenolnih spojeva iz mokrih mikrosfera.

**Ključne riječi:** 3D printanje, hidrokoloide, inkapsulacija, origano, polifenoli

**Rad sadrži:** 35 stranica, 11 slika, 5 tablica, 48 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici  
Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23,  
10 000 Zagreb**

**Mentor:** Prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

**Pomoć pri izradi:** Marinela Nutrizio, mag.nutr., asistent na projektu

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Food Technology**

**Department of general programs**  
**Laboratory for Sustainable Development**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Food Technology**

### 3D PRINTING OF EDIBLE GELS AND PLANT EXTRACTS ENCAPSULATION

***Romía Gregorović, 0058206151***

**Abstract:** Herbal extracts are a source of many components with a beneficial effect on human health. Given that their bioavailability is often limited, technologies that would allow such active compounds to be incorporated into functional products are being researched. One way to translate plant extracts into more stable form is encapsulation technology that allows the preservation and controlled release of active substances coated with an outer hydrocolloid shell, while the 3D printing method is used to obtain new textures, flavors and complex shapes of food products. In this research, encapsulation process of oregano plant extract was performed. Obtained results showed that the release of polyphenolic compounds from dry microspheres is prolonged compared to the release of polyphenolic compounds from wet microspheres.

**Keywords:** 3D printing, encapsulation, hydrocolloids, oregano, polyphenols

**Thesis contains:** 35 pages, 11 figures, 5 tables, 48 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** *Professor, PhD, Anet Režek Jambrak*

**Technical support and assistance:** *Marinela Nutrizio, MSc, Research Assistant*

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Biljni ekstrakti .....	2
2.2. Origano .....	3
2.3. Sredstva za geliranje .....	5
2.4. 3D printanje .....	7
2.4.1. Postupak printanja.....	7
2.4.2. Printanje bazirano na ekstruziji .....	8
2.4.3. Tintni ispis .....	13
2.4.4. Ostale tehnologije 3D printanja hrane.....	13
2.4.5. Prednosti i nedostaci 3D printanja .....	15
2.5. Inkapsulacija .....	16
2.5.1. Prednosti inkapsulacije.....	16
2.5.2. Vrste kapsula .....	18
2.5.3. Tehnike inkapsulacije .....	19
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	21
3.1. Materijali .....	21
3.1.1. Uzorci .....	21
3.1.2. Reagensi.....	21
3.1.3. Laboratorijski uređaji i pribor .....	21
3.2. Metode rada .....	22
3.2.1. Priprema ekstrakata .....	22
3.2.2. Inkapsulacija .....	22
3.2.3. Otpuštanje polifenola iz mikrosfera.....	23
3.2.4. Metoda određivanja udjela ukupnih polifenola .....	23
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom .....	23

3.2.6.	Određivanje sadržaja vlage u mikrosferama .....	24
3.2.7.	Učinkovitost inkapsulacije .....	24
3.2.8.	Kapacitet punjenja .....	24
3.2.9.	Stupanj bubrenja .....	25
3.2.10.	Mjerenje veličine čestica .....	25
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	26
5.	ZAKLJUČAK .....	30
6.	LITERATURA .....	31

## 1. UVOD

U prehrambenoj industriji posljednjih godina napravljen je značajan napredak te je ujedno uočen trend kontinuiranog rasta u razvoju i proizvodnji proizvoda dobivenih iz biljnih izvora. Jedan od razloga je sve veća osviještenost i educiranost potrošača o pozitivnim djelovanjima bioaktivnih molekula koje su prisutne u biljnim izvorima. Uz to postoje i skupine potrošača koje zahtijevaju prilagodbu sastava hrane zbog zdravstvenih razloga ili želje za isprobavanjem novih okusa i teksture.

Međutim, mnoge bioaktivne komponente koje se nalaze u biljnim ekstraktima često su podložne utjecaju okolišnih uvjeta kao što su temperatura, svjetlost, kisik i vlaga. Primjena bioaktivnih molekula u njihovom prirodnom obliku također je ograničena zbog brzog otpuštanja unutar organizma, slabe topljivosti i nedovoljne bioraspoloživosti pa se tako smanjuje i njihov povoljan utjecaj na zdravlje.

Zbog toga raste potreba za uvođenjem novih tehnologija koje će omogućiti očuvanje takvih sastojaka. Metode 3D printanja i inkapsulacije primjenjuju se u svrhu dobivanja funkcionalnih namirnica. Kontrolirano otpuštanje aktivnog sredstva, maskiranje neželjenih okusa i povećanje stabilnosti postižu se različitim tehnikama inkapsulacije. U najvažnije fizikalne i kemijske metode inkapsulacije spadaju sušenje raspršivanjem, tehnika premaza fluidnim slojem, emulzifikacija, molekularna inkluzija i koacervacija i njima se mogu dobiti kapsule različitih veličina i svojstava. S obzirom na to da lipofilne i hidrofilne molekule imaju različitu strukturu i topljivost im ovisi o matriksu u kojem se nalaze, izbor materijala za oblaganje važan je kako bi se njihova bioraspoloživost povećala.

Osim poboljšanja raspoloživosti funkcionalnih komponenti trendovi u prehrambenoj industriji nalažu proizvodnju namirnica novih oblika, tekstura i personaliziranih sastava. Tehnologijom 3D printanja proizvode se složeni oblici uz smanjenje otpadnih materijala i troškova. Uz to se omogućuje upotreba alternativnih sastojaka koji uklapanjem u različite oblike postaju izgledom prihvatljiviji potrošačima.

Cilj ovog završnog rada stoga je bio teoretski proučiti najvažnije metode 3D printanja hrane i metode inkapsulacije. Tehnologija inkapsulacije provedena je eksperimentalno na biljni ekstrakt origana kako bi se vidio utjecaj postupka na zadržavanje fenolnih spojeva u mokrim i suhim mikrosferama, kao i utjecaj na antioksidacijsku aktivnost i fizikalne parametre tijekom obrade biljnog ekstrakta origana.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Biljni ekstrakti

Ljekovito i aromatsko bilje koristi se kao izvori komponenata s povoljnim utjecajem na zdravlje. Sekundarni metaboliti biljaka nisu uključeni u razvoj biljaka nego služe za zaštitu od nametnika te se ovisno o kemijskim strukturama dijele na alkaloidne, terpenoide, tanine, fenolne spojeve i ostale. Dijelovi biljaka koji sadrže takve ciljane bioaktivne molekule ili komponente podvrgavaju se različitim postupcima ekstrakcije uz upotrebu selektivnih otapala pri čemu se ciljane bioaktivne komponente odvajaju od netopljivih staničnih dijelova. Takvi produkti biljaka nazivaju se ekstraktima i mogu biti tekuće, polukrute ili krute konzistencije. Mogu se dobiti različitim metodama ekstrakcije kao što su maceracija, dekokcija, infuzija, perkolacija i ekstrakcija po Soxhletu. (Dekebo, 2019).

Najčešća standardna metoda ekstrakcije bioaktivnih termosenzibilnih komponenata je maceracija. Postupak uključuje namakanje biljnog materijala u krupnom ili usitnjenom obliku u posudi s otapalom, a nakon toga slijedi prešanje i filtriranje. Prilikom namakanja i miješanja dolazi do razbijanja stanične stijenke i oslobađanja biljnog materijala u ekstrakcijski medij procesom difuzije. Ovaj postupak izvodi se na sobnoj temperaturi u vremenskom periodu od nekoliko dana, a otapala koja se najčešće koriste uključuju vodu, etanol i metanol. Proces se upotrebljava zbog jednostavnosti i mogućnosti korištenja različitih biljnih materijala, no uključuje i nedostatke kao što su dugo vrijeme ekstrakcije, velika količina otapala i niski prinos. Postupak sličan maceraciji je infuzija koja se razlikuje od prethodne tehnike u kraćem vremenu ekstrakcije. Otapalo koje se koristi u infuziji je hladna ili prokuhana voda. Tehnika dekokcije također se odvija po istom principu s razlikom u tome da nije prikladna za termolabilne i hlapljive spojeve.

Perkolacija je jednostavna tehnika ekstrakcije koja se primjenjuje za osušene, praškaste uzorke. Uzorci se potapaju u kipućoj vodi i ekstrahiraju tijekom vremenskog perioda od 2 sata umjerenom brzinom. Nedostatak metode je korištenje velike količine otapala pa je potrebno obratiti pozornost na zbrinjavanje otpadnih materijala.

Ekstrakcija po Soxhletu je kontinuirana, automatska metoda prikladna za osušene, usitnjene biljne materijale koji su otporni na visoke temperature. Postupak se odvija na način da se uzorak smješta u poroznu vrećicu napravljenu od filter papira u komori Soxhletovog aparata. Otapalo se zagrijava u tikvici i potom isparava u vrećicu. Nakon toga dolazi do kondenzacije

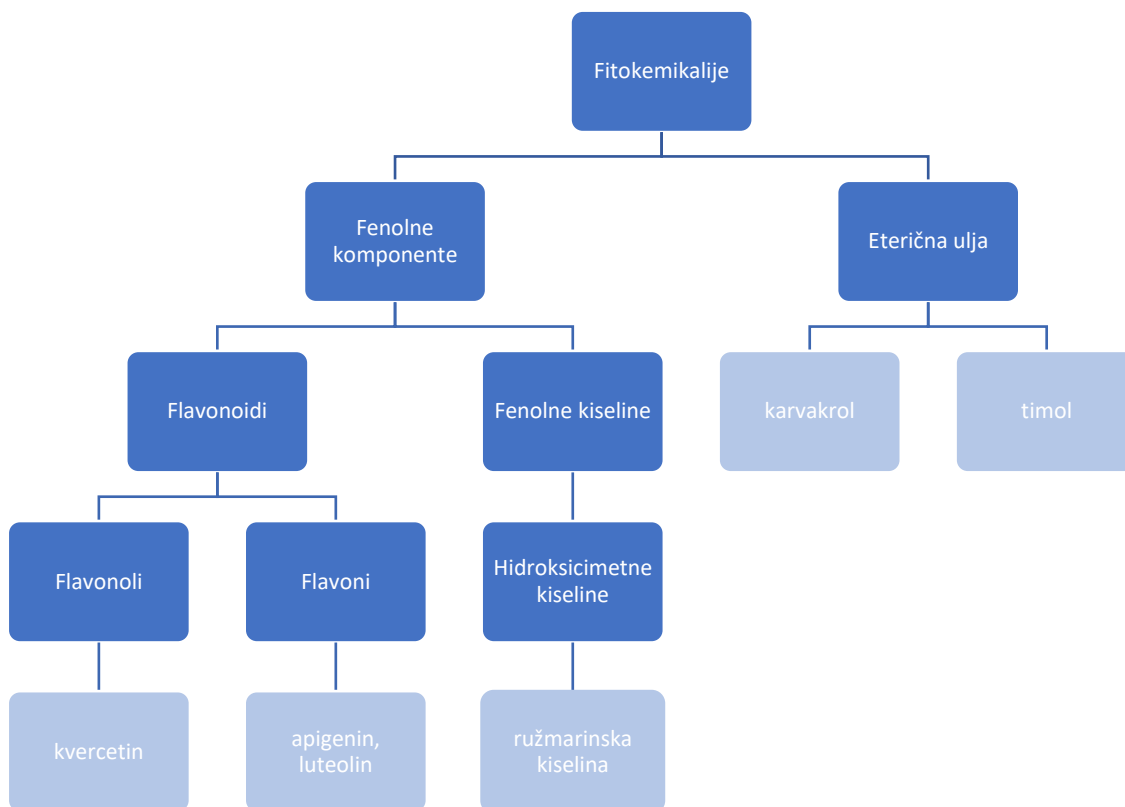


otapala i ponovnog kapanja u tikvicu. Prednost u odnosu na maceraciju je korištenje manje količine otapala i veća učinkovitost, no povećana je izloženost zapaljivim otapalima.

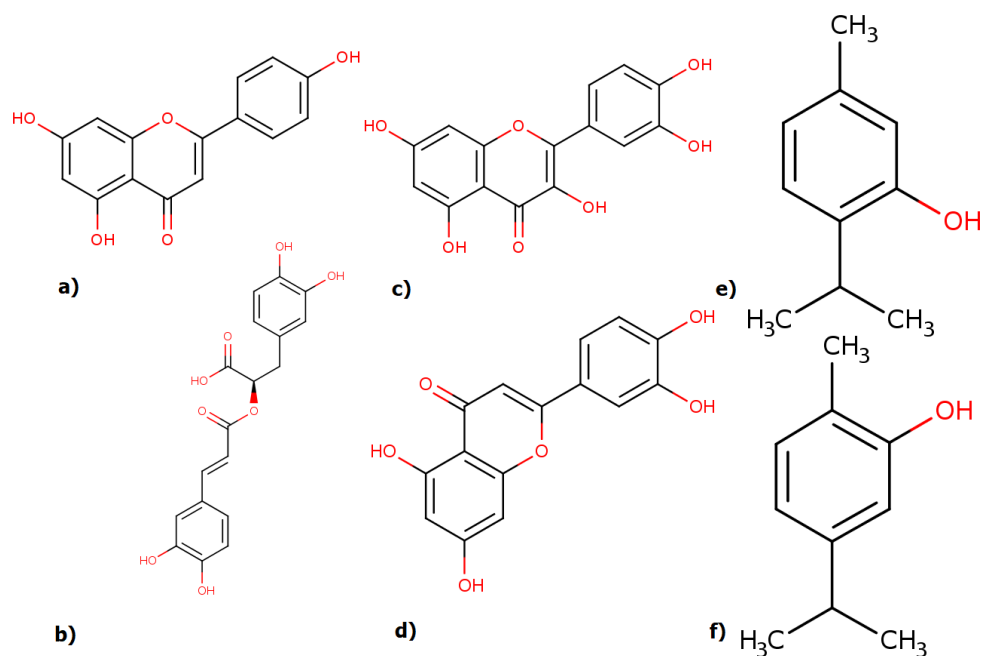
Na pravilan odabir ekstrakcijske metode utjecat će čimbenici kao što su kemijska priroda supstrata i izbor otapala. Prinos ekstrakcije ovisit će o vremenskom periodu tijekom kojeg se odvija ekstrakcija, temperaturi te omjeru otapala i biljnog materijala. Povećanjem temperature poboljšava se topljivost biljnog materijala, skraćuje se vrijeme ekstrakcije i smanjuje se viskoznost otapala, no moguć je negativan utjecaj kada se primjenjuje na hlapljive, termosenzibilne spojeve. Usitnjavanje čestica također će dati veći prinos zbog pojačanog prodiranja otapala (Azwanida i sur., 2015; Brglez Mojzer i sur., 2016; Jovanović i sur., 2017; Zhang i sur., 2018; Dekebo, 2019).

## 2.2. Origano

Origano (*Origanum vulgare* L.) je aromatska biljka mediteranskog podneblja iz porodice *Lamiaceae* (Yan i sur., 2016). Koristi se kao začin u hrani, a zbog prisutnih fitokemikalija u sastavu primjenjuje se i za ublažavanje simptoma respiratornih bolesti, bolesti probavnog sustava i općih infekcija. Fitokemikalije su skupina spojeva dobivena iz sekundarnog metabolizma biljaka čija je glavna funkcija obrana protiv biljnih nametnika, UV zračenja i oksidativnog stresa. Ovisno o hidrofilnim i hidrofobnim svojstvima, fitokemikalije u origanu mogu se podijeliti na eterična ulja i fenolne komponente. Najvažnije fenolne komponente origana su fenolne kiseline i flavonoidi koje imaju izražena antioksidativna svojstva. Fenolne kiseline u strukturi imaju jedan aromatski prsten na kojeg je vezana jedna ili više karboksilnih skupina. Od fenolnih kiselina najzastupljenije su hidroksicinaminske kiseline i hidroksibenzojeve kiseline. Flavonoidi su skupina spojeva niske molekularne težine koji se sastoje od dva benzenska prstena A i B međusobno povezanih s piranskim prstenom C. Najčešći flavonoidi u origanu su flavoni, a zatim slijede flavonoli, flavanoni i flavanoli. Glavni spojevi iz grupa flavonoida i fenolnih kiselina u origanu su apigenin, luteolin, kvercetin i ružmarinska kiselina (Altemimi i sur., 2017; Gutiérrez-Grijalva i sur., 2017). Eterična ulja su hlapljivi biljni metaboliti koji se nalaze u žljezdanim dlačicama ili u sekretornim šupljinama staničnih stijenki i daju biljkama karakterističan okus i miris. Prisutna su u lišću, stabljikama, kori, cvjetovima, korijenju i plodovima biljaka. Glavni spojevi u eteričnim uljima origana su karvakrol i timol (Memar i sur., 2017). Na slici 1. prikazan je dijagram najzastupljenijih fenolnih spojeva i spojeva eteričnih ulja u origanu, dok su na slici 2. prikazane strukturne formule najvažnijih spojeva u origanu.



Slika 1. Dijagram najzastupljenijih fenolnih spojeva i spojeva eteričnih ulja origana (Gutiérrez-Grijalva i sur., 2017)



Slika 2. Strukture najvažnijih spojeva u origanu: a) apigenin, b) ružmarinska kiselina, c) kvercetin, d) luteolin, e) timol, f) karvakrol (Rothwell i sur., 2016)

S obzirom na to da su aktivne komponente origana i ostalih biljnih ekstrakata osjetljive na vanjske uvjete, potrebno ih je zaštititi primjenom tehnika proizvodnje koje će poboljšati njihovu bioraspoloživost kao što su 3D printanje i inkapsulacija. Kako bi bili pogodni za proizvodnju takvim tehnikama, biljni ekstrakti origana mogu se uklopiti u jestive gelove (Shishir i sur., 2018).

### 2.3. Sredstva za geliranje

Dodatak sredstava za geliranje neophodan je za oblikovanje jestivih gelova. Za tu svrhu primjenjuju se hidrokoloide; polimeri s visokim sadržajem hidrofilnih grupa. Imaju svojstvo proizvodnje viskoznih disperzija te su dobro topljivi u vodi (Dickinson, 2017).

Tvari koje se koriste za oblaganje moraju spadati u biorazgradive GRAS (*eng.* Generally recognized as safe) materijale. Kako bi se primijenili za metode inkapsulacije, hidrokoloide moraju ispuniti određene uvjete. Omotač treba zaštititi aktivnu tvar od vanjskih utjecaja, ne smije reagirati s inkapsuliranom tvari i treba stabilizirati inkapsuliranu tvar prilikom skladištenja i obrade. Dobra svojstva emulgiranja i stvaranja mreže gela su također važna za izbor materijala kao i funkcionalnost krajnjeg proizvoda (Shishir i sur., 2018). Opisani su neki od najčešće korištenih hidrokoloida.

- Agar je kompleksna smjesa polisaharida agaroze koja ima svojstva geliranja i agaropektina koji je zgušnjivač. Ekstrahira se iz crvenih algi rodova *Gracilaria*, *Gelidium* i *Gelidiella*. Ima termoreverzibilna svojstva; primjenom topline dolazi do disperzije čestica i taljenja, a hlađenjem nastaju čvrsti gelovi koji su stabilni na temperaturi do 65 °C (Khalil i sur., 2018).
- Alginat je linearni polimer koji se sastoji od  $\beta(1\rightarrow4)$ -D-manuronske kiseline i  $\alpha(1\rightarrow4)$ -L-guluronske kiseline. Povećanjem sadržaja guluronske kiseline dobivaju se čvršći gelovi, dok veći sadržaj manuronske kiseline daje elastične gelove. Ekstrahiran je iz staničnih stijenki smeđih algi i bakterija kao što su *Azotobacter* i *Pseudomonas*. Na sobnoj temperaturi ima sposobnost oblikovanja ireverzibilnih gelova u prisutstvu dvovalentnih iona kao što je kalcij (Khalil i sur., 2018).
- Karagenani se svrstavaju u skupinu polisaharida čija okosnica sadrži naizmjenične  $\beta(1\rightarrow3)$  i  $\beta(1\rightarrow4)$  glikozidne veze s galaktozom i 3,6-anhidrogalaktozom. Uglavnom se sastoje od kalijevih, natrijevih, magnezijevih i kalcijevih soli i imaju mogućnost oblikovanja termoreverzibilnih gelova. Ekstrahirani su iz crvenih algi i razlikuju se tri oblika ovisno o udjelu estera i svojstvima geliranja: jota, kapa i lambda (Khalil i sur., 2018; Krempel i sur., 2019).

- Pektin je heteropolisaharid dobiven iz staničnih stijenki biljaka s okosnicom sastavljenom od jedinica galakturonske kiseline povezanih  $\alpha(1\rightarrow4)$  glikozidnim vezama. Molekularna težina, stupanj esterifikacije i raspored bočnih ogranaka utječu na raznolikost strukture pektina. Niskoesterificirani pektini imaju stupanj esterifikacije manji od 50 % i geliraju mehanizmom ionotropskog geliranja u prisutstvu dvovalentnih kationa kao što je kalcij. Dodatak šećera i kiselina pomaže u nastanku mreže viskoesterificiranih pektina na način da se lanci pektina združuju formiranjem hidrofobnih interakcija pri povišenoj temperaturi. Hlađenjem se hidrofobne veze zamjenjuju vodikovim vezama i tada dolazi do geliranja (Dickinson, 2017; Einhorn-Stoll, 2017).
- Želatina se dobiva iz životinjskog proteina kolagena, a razlikuju se u rasporedu aminokiselina. Tijekom proizvodnog postupka želatine dolazi do promjene konformacije kolagena; aminokiseline prolin, glicin i hidroksiprolin oblikuju trostruku uzvojnica pomoću vodikovih veza na visokim temperaturama. Hlađenjem se takva uzvojnica učvršćuje i dolazi do stvaranja gela zbog prisutstva vode u želatinskoj mreži (Thakur i sur., 2017).
- Kitozan je prirodni linearni polimer dobiven alkalnom deacetilacijom hitina koji je glavna komponenta oklopa člankonožaca i stanične stijenke nekih gljiva. Po kemijskom sastavu je kopolimer glukozamina i N-acetil-glukozamina povezanih  $\alpha(1\rightarrow4)$  glikozidnim vezama. Stupanj acetilacije određuje klasificira li se polimer kao hitin ili kao kitozan. Pri stupnju acetilacije manjem od 50 %, polimer je topljiv u vodenim otopinama ( $\text{pH} < 6$ ) i naziva se kitozan (Vinceković i sur., 2016; Shishir i sur., 2018).

U tablici 1. navedena su sredstva za geliranje dobivena iz različitih izvora.

Tablica 1. Sredstva za geliranje (Bamidele i Emmambux, 2020)

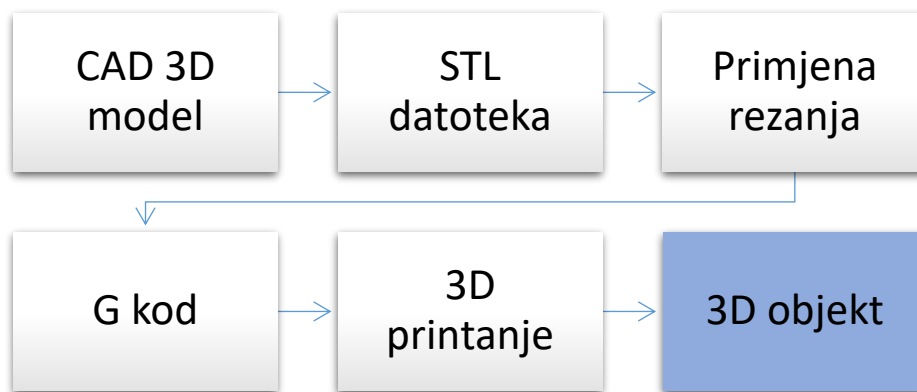
Ugljikohidrati	škrob, modificirani škrobovi, maltodekstrini, ciklodekstrini, celuloza, polisaharidi, kitozan
Proteini	gluten, kazeini, proteini sirutke, želatina
Lipidi	masne kiseline, gliceridi, voskovi, fosfolipidi
Gume	ksantan guma, gelan guma, karagenan, alginat, arapska guma, guar guma

## 2.4. 3D printanje

3D printanje, također poznato kao proces aditivne proizvodnje, tehnologija je koju karakterizira taloženje materijala sloj po sloj prema prethodno dizajniranom 3D modelu (Pinna i sur., 2016). Charles Hull i Scott Crump započeli su primjenjivati aditivne tehnologije proizvodnje stereolitografiju i modeliranje taloženjem 80-tih godina prošlog stoljeća. U odnosu na subtraktivne metode (primjerice mljevenje), aditivne tehnologije razlikuju se po tome što nema gubitka materijala tijekom proizvodnje; prema tome sav se materijal iskorištava za izgradnju konačnog proizvoda (Vogt, 2017). Materijali prikladni za 3D printanje raznoliki su pa se tako objekti mogu izrađivati od plastike, metala, gume, smole, papira, drva te komponenti hrane (Izdebska i Žolek-Tryznowska, 2016).

### 2.4.1. Postupak printanja

Osnovni postupak 3D printanja sastoji se od nekoliko koraka koji su zajednički svim tehnologijama neovisno o tome koriste li se za printanje hrane ili uporabnih predmeta. Prvi korak je osmišljavanje 3D modela na računalu u programima za izradu 3D modela. Jedan od takvih je CAD program (*Computer Aided Design*) u kojem model treba biti optimiziran i napravljen po pravilima za izradu 3D modela kako bi printanje bilo uspješno. Takav model zatim je potrebno izvesti u STL datoteku (*stereolithography file*) prikladnu za razmjenu 3D podataka. STL datoteka koristi trokute za aproksimaciju površine CAD modela i na taj način on se pojednostavljuje kako bi bio pogodan za ispis. Pojednostavljeni model potom se rastavlja na slojeve u programima za rezanje (*slicer programs*) te se dobiva datoteka s G kodom kojeg 3D printer prepoznaje. Povećanjem broja slojeva raste rezolucija i kvaliteta printanog objekta. Tijekom tog procesa 3D printer prima informacije o važnim parametrima printanja. Takvi parametri printanja uključuju lokaciju ispisa potpornog materijala, visinu i debljinu sloja, izlazni tlak, izlaznu količinu materijala, koordinaciju kretanja, brzinu kretanja glave pisača, temperaturu komore za ispis i vrijeme printanja. 3D objekt se zatim proizvodi na automatizirani način i nakon završetka procesa može se izravno ukloniti iz 3D printera (Vogt, 2017; Keppner, 2018; Kunc, 2019). Na slici 3. prikazan je općeniti postupak 3D printanja.



Slika 3. Općeniti postupak 3D printanja (Hager i sur., 2016)

Tehnologije koje se koriste za 3D printanje hrane uključuju: printanje bazirano na ekstruziji, selektivno lasersko sinteriranje, printanje primjenom vezivnog sredstva i tintni ispis. Neke od tih tehnologija zahtijevaju podvrgavanje objekta procesima naknadne obrade kao što su uklanjanje potpornih materijala ili dodatak veziva (Izdebska i Žolek-Tryznowska, 2016).

#### 2.4.2. Printanje bazirano na ekstruziji

Printanje bazirano na ekstruziji najčešća je metoda u 3D printanju hrane. Printer se u ovoj tehnologiji sastoji od ekstrudera koji na dnu spremnika ima mlaznicu. Smjesa se puni u spremnik i potom istiskuje u slojevima pod pritiskom kroz mlaznicu zagrijanu iznad temperature taljenja materijala. Neposredno nakon ekstruzije slojevi se međusobno spajaju i učvršćuju u 3D strukturu. Moguće je istovremeno korištenje više ekstrudera kako bi se isprintali objekti različitih svojstava. U slučaju da se želi izmijeniti boja krajnjeg proizvoda, koristi se ekstruder s dvojnim dovodom koji miješa materijale različitih boja. Sirovine koje se upotrebljavaju za printanje ekstruzijom u tekućem su obliku, a najčešće se koriste čokolada, sir te voćne i povrtna kaše. Pretvorba takvih materijala u složene oblike ograničena je njihovim svojstvima budući da su skloni izobličavanju (Izdebska i Žolek-Tryznowska, 2016; Liu i sur., 2017; Vogt, 2017). Nedostaci tehnologije su dugo vrijeme proizvodnje, raslojavanje i vidljiva granica između slojeva (Vogt, 2017).

##### 2.4.2.1. Vrste printera

Huang (2018) u tehnologiji 3D printanja hrane na bazi ekstruzije razlikuje tri vrste printera: Kartezijev, Delta i SCARA sustav.

Zbog jednostavne upotrebe i niskih troškova najčešće se upotrebljava Kartezijev printerski sustav u kojem mlaznica za ispis i platforma kontroliraju pokrete u x, y i z smjeru.

Druga vrsta printera za ekstruziju je Delta printerski sustav. U takvom sustavu mlaznica za ispis postavlja se na sjecište triju držača koji svojim položajem kontroliraju njene pokrete. Brzina Delta printera veća je u odnosu na Kartezijev sustav, ali je takav printer složeniji za kalibraciju i prilagodbu. Za printanje termoplastičnih niti koriste se pomični alati, dok se za ekstruziju paste koriste fiksni alati, a moguće je oblikovanje delta dizajna koji će izmjenjivati pomične i fiksne alate.

Printer s robotskom rukom, SCARA (*eng.* Selective compliance assembly robot arm) sustav, koristi povezane ruke koje se rotiranjem laktova pomiču u luku, a pomicanje u z smjeru ostvaruje se prilagodbom ramena na z osi ili pomicanjem platforme za printanje. U tablici 2. prikazani su primjeri najpoznatijih printera.

Tablica 2. Primjeri najpoznatijih printera (Tan i sur., 2018)

<b>PRIMJERI PRINTERA</b>	<b>SIROVINE</b>	<b>PREDNOSTI</b>	<b>NEDOSTATCI</b>
Procusini 3.0 Dual	čokolada, marcipan, fondan masa	jednostavno punjenje spremnika, magnetska podloga	niski kapacitet
Choc Creator V2.0 Plus	čokolada	bežično sučelje na ploči	ispisuje samo čokoladu
Discov3ry 2.0 Extrusion	jestivi gelovi	dvostruki dovod sirovina	ekstruder smješten u vanjskom kućištu
Fab@Home Model 3	paste	modularan	otvoreni kod dostupan svima
Barilla Pasta Printer	tjestenina	jednostavni sastojci	printa samo tjesteninu
Zmorph 2.0 Vx	paste	ispravljanje slojeva	nema zagrijavanja

#### 2.4.2.2. Procesni parametri

Važan procesni parametar za kvalitetno printanje je razmak između vrha mlaznice i podloge za printanje. Kada je razmak nedovoljan volumen smjese je prevelik za raspoloživ prostor te se tako dobiju stisnuti objekti male točnosti. Prevelik razmak između mlaznice i podloge dovodi

do kašnjenja prilikom istiskivanja materijala iz ekstrudera pa su objekti također smanjene točnosti.

Promjer mlaznice još je jedan od parametara važnih za uspješnu ekstruziju. Nastavak za mlaznicu treba biti najmanje veličine koja omogućuje dosljednu ekstruziju uz dobivanje objekta glatke površine i visoke rezolucije. Upotrebom nedovoljnog promjera mlaznice, linije su dobre rezolucije, ali nisu konzistentne i vrijeme ekstruzije se produžuje. Preveliki promjer mlaznice daje konzistentne linije niske točnosti.

Brzina ekstruzije također se treba uzeti u obzir. Primjenom prevelike brzine ekstruzije uzrokuje se pucanje niti i prevelik promjer ekstrudiranih niti, a mala brzina ekstruzije daje nestabilnosti u toku smjese (Liu i sur., 2017).

#### 2.4.2.3. Mehanizmi ekstruzije

Svojstva materijala trebaju biti takva da omogućuju jednostavno istiskivanje kroz mlaznicu, stabilnost strukture nakon taloženja, brzo učvršćivanje slojeva i glatku površinu objekta. Odgovarajuća struktura može se postići dobrim odnosom elastičnosti i viskoznosti ili dodatkom sredstava za geliranje (Liu i sur., 2017). Prema riječima Godoi i sur. (2016), ovisno o materijalima koji se koriste u procesu ekstruzije, mehanizmi ekstruzije dijele se na ekstruziju mekih materijala, ekstruziju taljenjem i ekstruziju hidrogelova.

Ekstruzija mekih materijala koristi se za printanje sirovina kao što su tijesto, sir i pašteta. Viskoznost materijala treba biti dovoljno visoka za postizanje samostojećih slojeva objekta i strukture koja se neće urušavati, ali dovoljno niska da se smjesa može lagano ekstrudirati iz mlaznice. Kako bi se dobila odgovarajuća reološka svojstva proizvoda, mogu se dodati reološki modifikatori.

Ekstruzija taljenjem upotrebljava se za printanje proizvoda od čokolade na temperaturama između 28°C i 40°C. S obzirom na to da je kakao maslac glavni sastojak čokolade koji ima šest različitih oblika kristalnih polimorfa, potrebno je izabrati odgovarajući oblik kako bi se dobila optimalna svojstva za printanje (tekstura, taljenje i rok trajanja).

#### Ekstruzija hidrogelova

Za printanje jestivih gelova važna su reološka svojstva polimera i mehanizmi formiranja gelova. Otopina polimera treba imati viskoelastična svojstva i sposobnost pretvaranja u samostojeći



gel prije taloženja slojeva. Geliranje se ne smije dogoditi unutar printera, stoga se vrijeme mehanizama geliranja treba kontrolirati (Godoi i sur., 2016).

Burey i sur. (2008) dijele mehanizme geliranja na ionotropsko geliranje, hladno geliranje i geliranje pod utjecajem topline.

Ionotropsko geliranje događa se zbog umrežavanja lanaca hidrokoloida s kationima ili negativno nabijenim polisaharidima. Primjeri takvih hidrokoloida su alginat, karagenan i pektin. Ionotropsko geliranje može se provesti raspršivanjem iona u otopini hidrokoloida, no tako se dobije struktura koja nije homogena. Mehanizam se može odvijati i unutarnjim geliranjem na način da se dodaju inaktivni oblici iona koji uzrokuju geliranje hidrokoloida. Nakon što je raspršivanje inaktivnih iona završeno, promjenom pH dolazi do aktivacije iona. Tim načinom sprječava se prebrzo geliranje koje izaziva nejednaku strukturu.

U metodi hladnog geliranja praškasti hidrokoloidi otapaju se u vodi na povišenoj temperaturi te se potom hlade na sobnu temperaturu i oblikuju trodimenzionalnu mrežu gela. Primjeri takvih sredstava za geliranje su želatina i agar.

Geliranje pod utjecajem topline odvija se na način da se hidrokoloidi zagrijavaju kako bi se potaknulo stvaranje trodimenzionalne mreže gela. Primjenom topline dolazi do širenja native strukture hidrokoloida i njihovog uređenja u mrežu gela. Ne koristi se često u prehrambenoj industriji, a primjer takvog sredstva za geliranje je škrob.

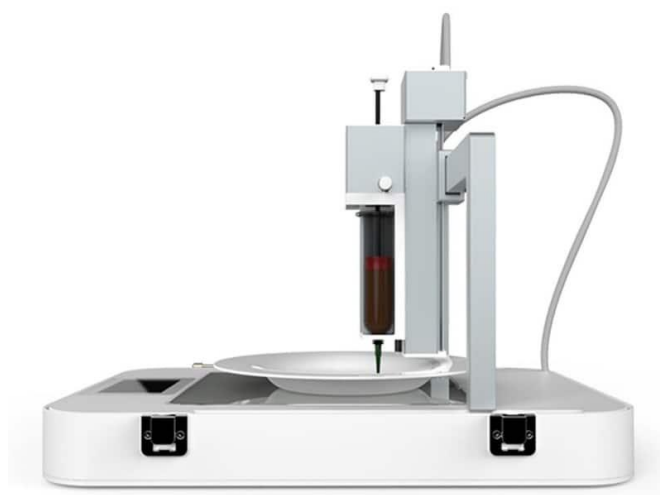
U jednoj studiji (Cohen i sur., 2009) istraživalo se korištenje dvaju hidrokoloida: želatine i ksantana zajedno sa sastojcima pogodnima za printanje. Dobiveni su različiti okusi i teksture, a upotrebom kompleksnog koacervata formiranog miješanjem želatine i ksantana, smjesa je postala granularna. Kao materijal pogodan za daljnja istraživanja printanja jestivih gelova navodi se smjesa alginata s različitim omjerima guluronske kiseline i manuronske kiseline i pektina s različitim stupnjevima esterifikacije. Uvjeti za dobivanje zajedničkog gela su niska pH vrijednost, odsustvo kalcijevih iona, visoka aktivnost vode i parcijalni pozitivni naboj lanaca alginata i pektina.

Yang i sur. (2018) istraživali su dodavanje različitih koncentracija krumpirovog škroba u limunov sok kako bi se dobio gel prikladan za 3D printanje. Dodatak škroba u koncentracijama 17,5 – 20 % rezultirao je prevelikom viskoznošću gela nestabilne strukture, a pri koncentracijama 10 – 12,5 % postigla se premala viskoznost gela. Kuhanjem smjese škroba i limunovog soka na 86 °C u vremenu od 20 minuta postignuto je bubrenje granula škroba i njihovo puknuće prilikom kojeg su oslobođeni amiloza i amilopektin povećali viskoznost smjese. Nakon hlađenja formirao se stabilan gel.

U jednom od istraživanja (Derossi i sur., 2018) proučavao se dodatak pektina u miješanu kašu od banane, obranog mlijeka u prahu, limunovog soka i sušenih gljiva kako bi se dobio obrok za djecu. Zaključeno je da je dodatak pektina u koncentraciji od 3,3 % najprikladniji za modificiranje kaše u gel koji se može printati.

U istraživanju (Liu i sur., 2018) je kuhano meso (piletina, svinjetina i riba) mehanički pomiješano s vodom te je dodana želatina. Zaključeno je da bez dodatka želatine dolazi do razdvajanja faza što dovodi do začepeljivanja mlaznice i loše kvalitete printanih objekata. Želatina omogućuje kontinuiranost procesa printanja.

Primjer 3D printera koji se može upotrebljavati u ekstruziji hidrogelova je *Focus 3D Food Printer* tvrtke byFlow. Printer ima mlaznice s otvorima različitih veličina: 0,8 mm, 1,2 mm i 1,6 mm te je prikladan za printanje konditorskih proizvoda, personaliziranih poklona, složenih oblika i dekoracija. Na slici 4. prikazan je *Focus 3D Food Printer*.



Slika 4. Focus 3D Food Printer (Anonymus, 1)

Drugi primjer printera koji se može koristiti za dobivanje jestivih gelova je *Discov3ry 2.0* sustav za ekstruziju. Ima dvostruki dovod koji omogućuje miješanje dvaju sastojaka u spiralnom mikseru prije taloženja. Zbog toga je prikladan za miješanje sredstava za geliranje i promotora geliranja, a svaki spremnik može prihvatiti 60 mL materijala (Tan i sur., 2018).

Iz navedenih primjera može se zaključiti da je za 3D printanje jestivih gelova moguć dodatak raznih sredstava za geliranje. Odabir sredstva ovisit će o sastojcima smjese, temperaturi na kojoj se odvija mehanizam geliranja i namjeni jestivih gelova. S obzirom na to da se mreža gela uz dodatak želatine ili agara dobiva hlađenjem, takvi jestivi gelovi nisu prikladni za

naknadnu toplinsku obradu i skladištenje na temperaturi većoj od temperature taljenja. U slučaju da se jestivi gel treba podvrgnuti toplinskoj obradi, koristit će se sredstva koja mogu održati stabilan gel na visokoj temperaturi kao što je škrob. pH vrijednost također je jedan od čimbenika zaslužan za odabir materijala za geliranje, stoga će se alginat koristiti za gelove stabilne u kiselom mediju. Visokoesterificirani pektini geliraju u prisustvu šećera pa takvi jestivi gelovi nisu prikladni za osobe koje zbog zdravstvenih razloga moraju paziti na prekomjeren unos šećera (Tan i sur., 2018).

#### 2.4.3. Tintni ispis

Tintni ispis je metoda koja se može usporediti s printanjem knjiga u industriji ili dokumenata kod kuće, s time da se kod primjene takve tehnologije u prehrambenoj industriji koristi jestiva tinta. Postupak se provodi na način da printer štrcaljkom dozira kapljice različitih materijala koje padaju na podlogu silom gravitacije te se suše isparavanjem otapala. Tehnologija se koristi za izradu dvodimenzionalnih slika i ispunjavanje površine na hrani kao što su kolači ili torte jer je tinta niske viskoznosti i teško se može održati trodimenzionalna struktura predmeta (Sun i sur., 2015; Izdebska i Žolek-Tryznowska, 2016).

Serizawa i sur. (2012) su u studiji istraživali printanje jestivih gelova od agara i želatine pomoću E-CHEF printera. Printer se sastoji od injekcije, raspršivača i jedinice za kontrolu temperature kako bi se spriječio nastanak nehomogenih dijelova unutar gela. Gelovi se zagrijavaju na temperaturu od 80 °C kako bi imali potrebnu tečnost te se potom ispuštaju iz štrcaljke. Nakon toga dolazi do faze hlađenja na 0 °C i oblikovanja strukture. Od želatine i agara isprintana su četiri jestiva gela različite čvrstoće u rasponu od 8 kPa do 45 kPa koji su prikladne teksture za starije osobe s poteškoćama gutanja. Gelovi se mogu oblikovati u računalnom softveru *Gel Works* koji šalje digitalne podatke printeru.

#### 2.4.4. Ostale tehnologije 3D printanja hrane

Tehnologijom selektivnog laserskog sinteriranja spajaju se praškaste sirovine u složene oblike u kratkom vremenu. Proces se odvija na način da se materijal nanosi na podlogu u vrlo tankom i jednoliko raspoređenom sloju. Vruć zrak ili laser djeluju kao izvor topline koji sjedinjuje čestice krećući se podlogom po koordinatama. Sjedinjene čestice potom oblikuju čvrst sloj. Podloga se spušta nanošenjem svakog idućeg sloja, a proces se ponavlja dok se ne dobije konačni proizvod. Praškasti materijal koji se ne iskoristi za dobivanje 3D objekta služi kao potpora da se struktura ne bi urušila i taj se višak odstranjuje na završetku procesa. Naknadna toplinska

obrada nije potrebna te je krajnji proizvod odmah spreman za upotrebu (Sun i sur., 2015; Izdebska i Źolek-Tryznowska, 2016; Liu i sur., 2017).

Printanje primjenom vezivnog sredstva proces je u kojem se slojevi praška spajaju raspršenim tekućim vezivom. Često se koristi vodena para kako bi se prašak stabilizirao prilikom raspršivanja veziva. Proces se ponavlja dok se ne dobije 3D objekt koji se dalje obrađuje, a višak praškastog materijala se odstranjuje. Naknadna obrada služi poboljšanju povezanosti slojeva, a postiže se primjenom toplinskih metoda kao što su sušenje i pečenje. Ovom metodom mogu se napraviti složeni i obojani oblici od sastojaka niske cijene u kratkom vremenu. Međutim, 3D printer za tu tehnologiju je skup, a proizvodi imaju visok udio šećera i hrapavu površinu (Sun i sur., 2015; Izdebska i Źolek-Tryznowska, 2016; Liu i sur., 2017).

U tablici 3. prikazana je usporedba tehnologija 3D printanja, njihove prednosti i nedostaci.

Tablica 3. Usporedba tehnologija 3D printanja (Liu i sur., 2017)

	Printanje na bazi ekstruzije	Selektivno lasersko sinteriranje	Printanje primjenom vezivnog sredstva	Tintni ispis
Dostupni materijali	čokolada, tijesto, sir	praškaste sirovine bogate šećerima i mastima	tekuće vezivo i praškasti materijali kao što su škrob, šećer, proteini	sirovine male viskoznosti
Naknadna obrada	aditivi, kontrola recepta	odstranjivanje viška dijelova	zagrijavanje, pečenje, premazivanje površine, odstranjivanje viška dijelova	nema
Prednosti	veći izbor materijala, jednostavni uređaji	kompleksni 3D oblici, različite teksture	kompleksni 3D oblici, korištenje boje, različiti okusi i teksture	veći izbor sirovina, bolja kvaliteta printanja, brza proizvodnja
Nedostaci	jednostavan dizajn hrane, nestabilna 3D struktura	ograničene sirovine, proizvodi manje nutritivne vrijednosti	ograničene sirovine, proizvodi manje nutritivne vrijednosti	jednostavan dizajn hrane, koristi se jedino za ispunjavanje površine ili ukrašavanje slika

#### 2.4.5. Prednosti i nedostaci 3D printanja

Uvođenje tehnologije 3D printanja u prehrambenu industriju dovodi do modernizacije i novih mogućnosti u usporedbi s tradicionalnim tehnologijama.

Najveća prednost 3D printanja je razvoj personalizirane hrane. Prvi razlog personalizacije hrane je mogućnost osmišljavanja obroka koji će biti pogodni za osobe s poteškoćama gutanja ili osobe s alergijama. Osim toga personalizacijom hrane mogu se dobiti obroci koji odgovaraju željama osoba različitih prehrambenih navika (primjerice sportaši ili vojnici).

Upotrebom računala omogućuje se pohranjivanje podataka o prehrambenim navikama potrošača pa je tako priprema obroka jednostavnija i spriječena je slučajna kontaminacija obroka (Izdebska i Žolek-Tryznowska, 2016; Pinna i sur., 2016; Liu i sur., 2017).

Druga prednost je proizvodnja složenih geometrijskih oblika uz ekonomično korištenje resursa. Naime, takvi kompleksni oblici mogu se proizvesti s manje otpadnog materijala jer se proizvodnja odvija prema prethodno izrađenom 3D modelu. Budući da se koristi manje materijala, kraće je vrijeme potrebno da oblici očvrstnu nakon taloženja. Za razliku od toga, tradicionalne metode koriste više materijala za proizvodnju jednostavnijih oblika.

S obzirom na to da se računalom upravlja proizvodnjom, lanac opskrbe hranom je jednostavniji i smanjeni su troškovi transporta, pakiranja i distribucije. Prilagođeni prehrambeni proizvodi na taj su način dostupni potrošaču u kraćem vremenu (Pinna i sur., 2016; Liu i sur., 2017).

Uvođenjem tehnologije 3D printanja u prehrambenu industriju omogućeno je korištenje novih sirovina kao što su alge i insekti koji nisu prikladni za tradicionalne tehnologije zbog izgleda i teksture. Ovim načinom te se sirovine mogu preoblikovati u proizvode koje će izgledom biti prihvatljive potrošačima i uz to imati povoljan utjecaj na okoliš, a zbog svojih dobrih nutritivnih svojstava utjecat će na zdravlje (Pinna i sur., 2016).

Jedna od mogućnosti je primjena tehnologije 3D printanja u proizvodnji hrane za svemirske misije. Izazovi kod pripreme hrane u svemiru su dugo vrijeme trajanja misije, smanjen prostor za skladištenje namirnica te ograničene vrste hrane koje se mogu upotrijebiti. Zbog tih razloga hrana treba imati dug rok trajanja, biti sigurna za upotrebu i imati nutritivnu stabilnost tijekom misija (Liu i sur., 2017).

Osim mnogobrojnih prednosti tehnologije 3D printanja, postoji i nekoliko nedostataka koje treba razmotriti. Glavni nedostatak je taj da većina smjesa nije prikladna za 3D printanje zbog sastojaka, strukture i teksture. Sastojci imaju različita tališta pa zbog toga toplinska obrada utječe različito na njihovu stabilnost. Uz to, oblici nakon printanja trebaju imati sposobnost

zadržavanja strukture za daljnju obradu. Tradicionalnim tehnologijama ne mogu se postići strukture smjesa pogodne za 3D printanje pa se receptura prvo treba prilagoditi mogućnostima printera kako bi bila prikladnija za printanje. No, prilikom preoblikovanja recepture proizvoda može doći do nepoželjnih senzorskih svojstava u odnosu na tradicionalne proizvode (Sun i sur., 2015; Pinna i sur., 2016; Vogt 2017; Growes i Watkins, 2018).

Od ostalih nedostataka ističu se neprikladnost tehnologije za masovnu proizvodnju, dugo vrijeme proizvodnje i mogućnost povrede autorskog prava prilikom dijeljenja 3D oblika putem interneta (Vogt, 2017).

## 2.5. Inkapsulacija

Potrošači su danas educirani o važnosti konzumiranja bioaktivnih komponenti pa se tako unutar prehrambenih proizvoda sve češće primjenjuju sastojci poput polifenola, vitamina, minerala, probiotika i enzima. Nedostatak primjene takvih bioaktivnih komponenata je taj da su često osjetljive na okolišne uvjete pa u prisutstvu svjetlosti, kisika, vlage i topline dolazi do stvaranja nepoželjnih senzorskih svojstava i smanjenja stabilnosti proizvoda. Osim toga oksidativnom degradacijom nastaju slobodni radikala koji mogu imati nepovoljan utjecaj na zdravlje čovjeka. Zbog tih razloga postoji potreba za očuvanjem funkcionalnih komponenti, a u tu svrhu može se primijeniti metoda inkapsulacije. (Shishir i sur., 2018; Abd El Kader i Abu Hashish, 2020)

Inkapsulacija je tehnologija koja ima široku primjenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Ovom tehnologijom se krutine, tekućine ili plinoviti materijali pakiraju u zatvorene kapsule veličine od nekoliko nanometara do milimetara. Tvar koja se nalazi unutar kapsule može biti čista sirovina ili mješavina i naziva se aktivnim sredstvom, dok se materijali za pakiranje zovu omotači, kapsule ili sredstva za oblaganje (Shishir i sur., 2018).

### 2.5.1. Prednosti inkapsulacije

Budući da su biljni ekstrakti bogati aktivnim sastojcima ograničene bioraspodivnosti, inkapsulacija se koristi kako bi se njihova dostupnost povećala. Kada su takve funkcionalne komponente u inkapsuliranom obliku, njihova stabilnost tijekom skladištenja i obrade je povećana te su manje podložne utjecaju okolišnih uvjeta. Zaštitom bioaktivnih tvari od svjetla, vlage i kisika produžuje se rok trajanja prehrambenog proizvoda i smanjuje se isparavanje hlapljivih tvari. Uz to inkapsulacijom je omogućeno postizanje kontroliranog otpuštanja pa tako biljne komponente mogu dospjeti unutar probavnog sustava bez prijevremenog gubitka

aktivnih svojstava. Inkapsulacijom se također mogu promijeniti fizikalna svojstva poput teksture, topljivosti i protočnosti kako bi se olakšala upotreba. Pritom je omogućeno korištenje sastojaka koji bi inače međusobno reagirali te maskiranje neželjenog okusa i mirisa hrane. Uz navedene prednosti postupak inkapsulacije ima i povoljan utjecaj na okoliš zbog smanjenja toksičnih produkata (Shishir i sur., 2018; Abd El Kader i Abu Hashish, 2020). U tablici 4. prikazani su primjeri bioaktivnih komponenti i prednosti njihova inkapsuliranja.

Tablica 4. Primjeri bioaktivnih komponenta i prednosti njihove inkapsulacije (Abd El Kader i Abu Hashish, 2020).

<b>Bioaktivne komponente</b>	<b>Primjeri</b>	<b>Prednosti inkapsulacije</b>
<b>Bojila</b>	karotenoidi, flavonoidi	poboljšano uklapanje u vodeni medij, bolje skladištenje, bolja kontrola otpuštanja i učinkovitost
<b>Arome</b>	citrusna ulja, prirodni ekstrakti	
<b>Antioksidansi</b>	tokoferoli, karotenoidi, flavonoidi, fenoli	
<b>Antimikrobne tvari</b>	eterična ulja	bolja kompatibilnost s matriksom, bolje skladištenje, smanjena kemijska degradacija, maskiranje neželjenih okusa
<b>Bioaktivni peptidi</b>	mliječni, mesni i biljni peptidi	smanjena degradacija, bolja kontrola otpuštanja, smanjenje gorkog okusa
<b>Bioaktivni lipidi</b>	$\omega$ -3 masne kiseline, linolenska kiselina	poboljšano uklapanje u vodeni medij, smanjena kemijska degradacija, bolja kontrola otpuštanja
<b>Vitamini</b>	vitamini A, D, E, c	
<b>Minerali</b>	željezo, kalcij	prevencija neželjenih kemijskih reakcija, bolja bioaktivnost
<b>Probiotici</b>	bakterije mliječne kiseline	poboljšana održivost

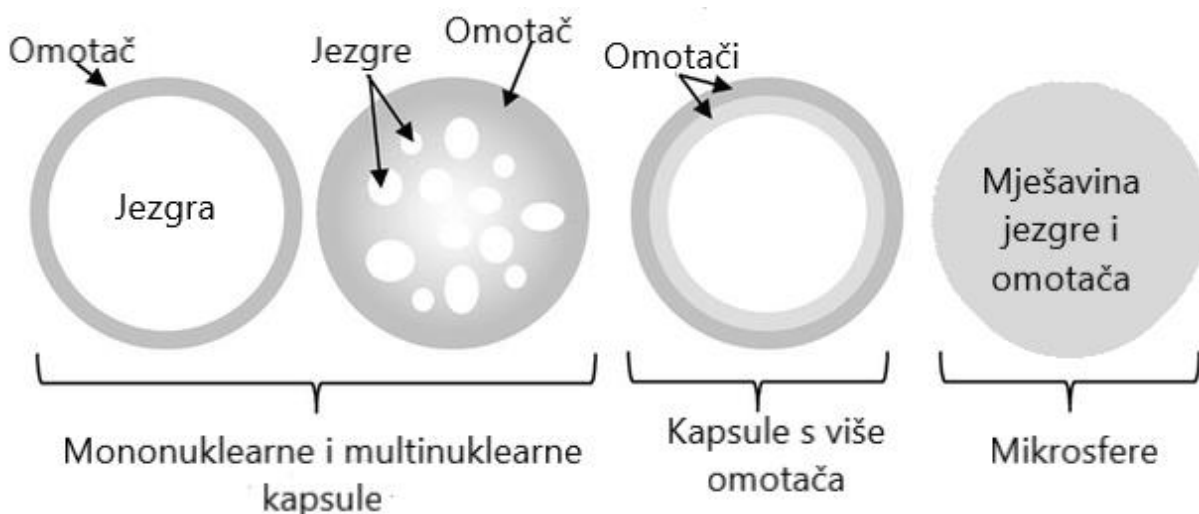
## 2.5.2. Vrste kapsula

Ovisno o tehnikama inkapsulacije mogu se dobiti kapsule koje se morfološki mogu podijeliti na mononuklearne, multinuklearne, kapsule s više materijala za oblaganja i matrikse.

Mononuklearne kapsule sastoje se od jedne jezgre u tekućem ili čvrstom obliku koja sačinjava 10% – 90% volumena kapsule i jednog materijala za oblaganje. Multinuklearne kapsule najčešće su korišteni oblik kapsula u prehrambenoj industriji zbog toga što se više bioaktivnih komponenti može inkapsulirati unutar jednog omotača, a to smanjuje troškove proizvodnje. Takve kapsule sadrže nekoliko jezgri s različitim aktivnim sredstvima koje se mogu inkapsulirati kombinacijom više tehnika inkapsulacije. Svaka jezgra prvo se oblaže jednim materijalom za oblaganje prije inkapsulacije u zajednički materijal za oblaganje.

Kako bi se poboljšala svojstva bioaktivnih spojeva unutar kapsula, moguće je korištenje više materijala za oblaganje. Kombinacijom više omotača postiže se kontrolirano otpuštanje aktivnog sredstva i bolja interakcija sredstva za oblaganje i jezgre. Posljednji tip kapsula su mikrosfere u kojima je aktivna komponenta jezgre jednoliko raspoređena u materijalu za oblaganje (Bamidele i Emmambux, 2020).

Osim prema obliku kapsule se razlikuju i veličinom. U prvu skupinu pripadaju mikrokapsule veličine od 0,2  $\mu\text{m}$  do 5000  $\mu\text{m}$ . To je najčešća veličina kapsula i dobiva se različitim metodama inkapsulacije poput sušenja raspršivanjem, premaza fluidnim slojem, ekstruzijom, koacervacijom. Mikrokapsule veće od 5000  $\mu\text{m}$  dobivaju se tehnikom koekstruzije, dok se nanokapsule manje od 0,2  $\mu\text{m}$  dobivaju inkapsulacijom inkluzijom (Abd El Kader i Abu Hashish, 2020). Na slici 5. prikazane su različite vrste kapsula.



Slika 5. Vrste kapsula (Urbas i sur., 2017)



### 2.5.3. Tehnike inkapsulacije

Abd El Kader i Abu Hashish (2020) razlikuju tri metode inkapsulacije:

1. fizikalni postupci: sušenje raspršivanjem, tehnika premaza fluidnim slojem, hlađenje raspršivanjem, inkapsulacija ekstruzijom, kokristalizacija
2. fizikalno – kemijski postupci: isparavanje otapala, zarobljavanje liposomima, koacervacija
3. kemijski postupci: međufazna polimerizacija, molekularna inkluzija.

U nastavku su opisane neke od najviše korištenih metoda inkapsulacije.

#### 2.5.3.1. Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem najčešće je korištena tehnika inkapsulacije u proizvodnji praškastih materijala, aglomerata i granula. Proces se odvija na način da se materijal za oblaganje otapa u vodi uz dodatak emulgatora te se dodaje aktivno sredstvo. Nastala emulzija se potom homogenizira primjenom visokog tlaka. Nakon toga smjesa se atomizira mlaznicom u sušilici za raspršivanje. Primjenom topline dolazi do isparavanja vode iz atomizirane smjese te se nastale osušene čestice prikupljaju. Primjeri materijala koji se mogu inkapsulirati sušenjem raspršivanjem su arome, proteini, enzimi, sladila, ulja i antibiotici (Abd El Kader i Abu Hashish, 2020).

#### 2.5.3.2. Inkapsulacija ekstruzijom

Inkapsulacija ekstruzijom je tehnika u kojoj se otopina biopolimera propušta kroz mlaznicu u drugu otopinu prilikom čega dolazi do geliranja (Shishir i sur., 2018). Kao materijali za oblaganje često se koriste škrob, alginat, ciklodekstrini i arapska guma, a inkapsulirati se mogu kapljice ulja, arome, vitamini i probiotici. Prednost je kontinuirano izvođenje procesa, produljen rok trajanja proizvoda i niski troškovi. Postupak se odvija na povišenoj temperaturi u kratkom vremenu pa nije prikladan za termolabilne spojeve (Bamidele i Emmambux, 2020).

#### 2.5.3.3. Tehnika premaza fluidnim slojem

Tehnika premaza fluidnim slojem metoda je inkapsulacije koja se sastoji od tri stupnja: nukleacije, prijelaza i rasta čestica. Proces se odvija na način da se u komori za oblaganje krute čestice prvo suspendiraju te se na njih raspršuju kapljice materijala za oblaganje. Nakon isparavanja kapljica dobivaju se mikročestice (Abd El Kader i Abu Hashish, 2020).

#### 2.5.3.4. Koacervacija

Tehnikom koacervacije odvajaju se hidrokoloide iz početne otopine. Nastali koacervat taloži se oko aktivnog sastojka koji je suspendiran ili emulgiran u istoj otopini. Prilikom jednostavne koacervacije koristi se samo jedan materijal za oblaganje, dok se složena koacervacija temelji na interakcijama između dva suprotno nabijena polimera. Tvari za oblaganje koje se najviše koriste su želatina, pektin, alginat i guma arabika (Abd El Kader i Abu Hashish, 2020).

#### 2.5.3.5. Emulzije

Emulzije se koriste kao sustavi za inkapsulaciju mnogih lipofilnih, hidrofilnih i amfifilnih tvari zbog visoke učinkovitosti i kemijske stabilnosti molekula tijekom procesa. Sastoje se od dviju tekućih faza koje se ne miješaju, nego su raspršene jedna u drugoj. Lipofilni spojevi mogu se inkapsulirati u emulziji tipa ulje u vodi, dok se spojevi topljivi u vodi poput polifenola inkapsuliraju u emulzijama tipa voda u ulju. (Lu i sur., 2016; Abd El Kader i Abu Hashish, 2020).

#### 2.5.3.6. Inkapsulacija inkluzijom

Bioaktivne komponente mogu se inkapsulirati inkluzijom korištenjem ciklodekstrina; oligosaharida cilindrične strukture dobivenih iz škroba. Ciklodekstrini su sastavljeni od više ostataka glukoze i dijele se na  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  oblike među kojima je najrasprostranjeniji  $\beta$  oblik. Molekule se sastoje od vanjskog hidrofilnog dijela koji poboljšava topljivost ciklodekstrina u vodi i unutarnjeg hidrofobnog dijela koji stvara inkluzijske komplekse s nepolarnim molekulama. Primjeri inkapsuliranih komponenti uključuju polifenole, vitamine, fitosterole i neželjene komponente poput kolesterola, mikotoksina i raznih alergena (Dos Santos i sur., 2017).

#### 2.5.3.7. Liposomi

Liposomi su koloidne čestice sastavljene od lipidnog dvosloja s hidrofilnim glavama i hidrofobnim repovima koji djeluje kao polupropusna membrana. Formiraju se hidrofilno-hidrofobnim reakcijama između fosfolipida i molekula vode. Takva svojstva omogućuju liposomima da inkapsuliraju materijale topljive u vodi, mastima ili amfifilne materijale, a primjeri takvih molekula su antocijanin, lutein, kvercetin i vitamini. Liposomi mogu posjedovati jedan ili više lipidnih dvosloja, pri čemu višeslojni liposomi omogućuju veću stabilnost bioaktivnih spojeva i bolju kontrolu otpuštanja aktivne tvari (Shishir i sur., 2018).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Uzorci

Tijekom ovog istraživanja korišten je osušeni, usitnjeni origano (*Origanum vulgare* L.) tvrtke Suban d.o.o., Samobor. Izmjerena srednja veličina čestica origana bila je promjera  $d(0.5) \leq 297.345 \mu\text{m}$ . Uzorci origana skladišteni su u polietilenskim vrećama na tamnom i suhom mjestu do ekstrakcije.

##### 3.1.2. Reagensi

Upotrijebljeni su sljedeći reagensi: Folin-Ciocalteu reagens, natrijev karbonat, metanol, natrijev alginat, kalcijev klorid, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal, pufer 0,2 M  $\text{NaHCO}_3$  i 0,06 M  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (pH=8,3).

Sok od jabuke napravljen je od tekućeg koncentrata s vodom i kalibriran je na 11,2 °Bx prema nacionalnom propisu iz Pravilnika o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju (Pravilnik, 2013).

##### 3.1.3. Laboratorijski uređaji i pribor

Uređaji:

- Büchi inkapsulator (Büchi Encapsulator B-390, Büchi Labortechnik AG, Švicarska)
- analizator vlage (Moisture analyzer - PMB, Adam Equipment, SAD)
- orbitalna miješalica (OS-20 BioSan, Ltd., Latvija)
- Mastersizer 2000 uređaj (Malvern Instruments, Worcestershire, Velika Britanija)
- spektrofotometar (Shimadzu UV/Vis 1700, Shimadzu Suzhou Instruments, Kina)
- analitička vaga (Precisa 100A – 300M, Precisa Gravimetrics AG, Švicarska)
- vorteks (Vortex Genie 2, Bender & Hobein AG, Švicarska)

Stakleno posuđe: menzure, kivete, odmjerne tikvice, čaše, epruvete, lijevak, stakleni štapić, Petrijeve posudice, staklene posude, pokrovno stakalce, pipete

Ostali pribor: automatske pipete, plastične kivete (50 mL), magnetič za miješanje, pinceta, stalak za epruvete, filter papir, gaza, aluminijska folija

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Priprema ekstrakata

U staklenu čašu od 100 mL izvagan je 1 g osušenog i usitnjenog uzorka origana, a u menzuru je stavljeno 50 mL destilirane vode. Uzorak origana promiješan je s destiliranom vodom u staklenoj čaši na magnetskoj miješalici tijekom 9 minuta. Nakon isteka vremena miješanja ekstrakt origana profiltriran je kroz stakleni lijevak s filter papirom te je pohranjen u plastične kivete. Postupak je proveden pri sobnoj temperaturi.

### 3.2.2. Inkapsulacija

U ekstrakt origana dodaje se natrijev alginat (1,5 %, m/v) i takva otopina propušta se kroz inkapsulator (Büchi Encapsulator B-390, Büchi Labortechnik AG, Švicarska) (slika 6). Na magnetsku miješalicu stavlja se otopina kalcijevog klorida (1 %, m/v)) u koju kapa pripremljena otopina natrijevog alginata. U prisutstvu dvovalentnih kalcijevih iona alginat stvara mrežu gela pa na taj način nastaju mikrosfere s omotačem od kalcijevog alginata. Mikrosfere se ostavljaju u otopini kalcijevog klorida na magnetskoj miješalici tijekom razdoblja od sat vremena kako bi imale čvršću strukturu. Nakon toga mikrosfere se ispiru destiliranom vodom i filtriraju. Postavke inkapsulatora podešene su tako da je otvor mlaznice veličine 0,08 mm, frekvencija iznosi 1600 Hz, pritisak mlaznice je 660 mbar, a plin dušik je pod pritiskom od 2 bara (Jurić i sur., 2019).



Slika 6. Inkapsulator (Büchi Encapsulator B-390)

### 3.2.3. Otpuštanje polifenola iz mikrosfera

Izvagano je 20 g mokrih mikrosfera i stavljeno je u 50 mL otapala (voda ili sok). Tijekom vremenskog perioda u trajanju od 30 minuta otopina je miješana na magnetskoj miješalici. Uzeti su alikvoti od 100  $\mu$ L otopine nakon 30 sekundi, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 i 30 minuta. Postupak je ponovljen za suhe mikrosfere s omjerom 0,5 g mikrosfera otopljenih u 50 mL vode. Alikvoti otopine suhih mikrosfera su, osim u navedenom vremenskom periodu, uzeti i nakon 60, 90 i 120 minuta. Alikvoti su korišteni u metodi određivanja ukupnih polifenola i za određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.

### 3.2.4. Metoda određivanja udjela ukupnih polifenola

Metoda se temelji na principu kolorimetrijske reakcije fenolnih spojeva i ostalih reducirajućih supstanci s Folin-Ciocalteovim reagensom koji je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline. U redoks reakciji nastaju volframovi oksidi i molibdenovi oksidi plave boje koji su proporcionalni koncentraciji polifenola. Iz takve kolorimetrijske reakcije može se spektrofotometrijski odrediti ukupan sadržaj polifenola prema intenzitetu plave boje (Lamuela-Raventós, 2018).

Postupak se odvija na način da se u epruvetu dodaje 0,1 mL uzorka otopine inkapsuliranog ekstrakta origana, 7,9 mL destilirane vode i 0,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa razrijeđenog s vodom u omjeru 1:2. Reakcija započinje dodatkom 1,5 mL natrijevog karbonata (20 %, m/v) u otopinu koja se potom vorteksira. Postupak je isti za slijepu probu, a umjesto uzorka koristi se 0,1 mL otapala. Epruvete s uzorcima ostavljaju se na sobnoj temperaturi tijekom 2 sata kako bi se reakcija odvila u potpunosti, a zatim se pomoću spektrofotometra mjeri apsorbancija plavog obojenja u odnosu na slijepu probu pri valnoj duljini od 765 nm. Izmjerene vrijednosti apsorbancije i poznate koncentracije galne kiseline zatim se koriste se u izradi baždarnog dijagrama. Iz dobivene jednadžbe pravca potom se izračunavaju koncentracije ukupnih polifenola koje se izražavaju u mg ekvivalenata galne kiseline po litri ekstrakta (mg GAE/L) (Vinceković i sur., 2019). Sva mjerenja napravljena su u duplikatu.

### 3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Antioksidacijski kapacitet određuje se reakcijom uzorka sa stabilnim DPPH radikalom. DPPH se reducira u otopini metanola pri čemu dolazi do smanjenja apsorbancije (Vinceković i sur., 2019).

Postupak se provodi tako da se u epruvetu dodaje 3,9 mL otopine DPPH (0,094 mmol) i 100  $\mu$ L uzorka otopine inkapsuliranog ekstrakta origana te se nastala otopina vorteksira. Reakcija se odvija 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku te se potom mjeri smanjenje apsorbancije na 515 nm. Postupak je ponovljen za slijepu probu prilikom čega se umjesto uzorka koristi metanol. Baždarni dijagram izrađuje se pomoću poznatih koncentracija Troloxa i izmjerenih vrijednosti smanjenja apsorbancije. Iz dobivene jednadžbe pravca izračunava se antioksidacijski kapacitet izražen u ekvivalentima Troloxa po litri ekstrakta ( $\mu$ mol ET/L) (Vinceković i sur., 2019). Sva mjerenja napravljena su u duplikatu.

### 3.2.6. Određivanje sadržaja vlage u mikrosferama

Mokrim mikrosferama origana određen je sadržaj vlage (SV). Određena masa uzorka podvrgnuta je sušenju putem uređaja koji analizira vlagu (Moisture analyzer - PMB, Adam Equipment, SAD). Mikrosfere su zagrijavane na 131 °C i sušene do konstantne mase. Osušanim uzorcima potom je izvagana masa i izračunat je sadržaj vlage pomoću jednadžbe u kojoj  $m_p$  predstavlja početnu masu mikrosfera, a  $m_z$  predstavlja konačnu masu mikrosfera. Mjerenja su napravljena u triplikatima (Jurić i sur., 2020).

$$SV (\%) = \frac{m_p - m_z}{m_z} \times 100 \quad /1/$$

### 3.2.7. Učinkovitost inkapsulacije

Postotak učinkovitosti inkapsulacije određen je kao omjer sadržaja ukupnih fenola ( $\gamma_{INK}$ ) unutar mikrosfera u odnosu na početnu količinu ukupnih fenola u ekstraktu ( $\gamma_{UK}$ ). Mjerenja su napravljena u triplikatima (Vinceković i sur., 2016).

$$UI (\%) = \frac{\gamma_{INK}}{\gamma_{UK}} \times 100 \quad /2/$$

### 3.2.8. Kapacitet punjenja

Kapacitet punjenja definiran je kao koncentracija fenolnog sadržaja u mikrosferi. Postupak se odvija tako da se 1 g mokrih mikrosfera otopi u 10 ml pufera 0,2 M  $\text{NaHCO}_3$  i 0,06 M  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$  pri pH pufera 8,3. Otopina se promiješa na orbitalnoj miješalici (OS-20 BioSan, Ltd., Latvija) postavljenoj na 160 okretaja/min na sobnoj temperaturi u vremenskom periodu od 60 minuta. Mjerenja su ponovljena tri puta. Prosječan rezultat svih mjerenja prikazan je kao ukupni fenoli 1 g mikrosfere u 10 mL pufera te je zatim pretvoren u ekvivalent ukupnih fenola

za 20 g mikrosfera u 50 mL pufera koji je bio početni omjer mase i volumena za mjerenje oslobađanja polifenola. Rezultat je izražen u mg GAE/L (Vinceković i sur., 2016).

### 3.2.9. Stupanj bubrenja

50 mg suhih mikrosfera raspršeno je u staklenoj boci s 10 mL destilirane vode te je ostavljeno na sobnoj temperaturi u vremenskom razdoblju od tri sata kako bi mikrosfere nabubrile. Nakon bubrenja mokre mikrosfere obrisane su filter papirom kako bi se uklonila vlaga priljepljena na njihovoj površini te su potom izvagane. Određen im je stupanj bubrenja (SB) pomoću navedene jednadžbe u kojoj  $W_B$  predstavlja masu nabubrenih mikrosfera, a  $W_0$  predstavlja početnu masu mikrosfera. Mjerenja su ponovljena tri puta (Vinceković i sur., 2016).

$$SB (\%) = \frac{W_B - W_0}{W_0} \quad /3/$$

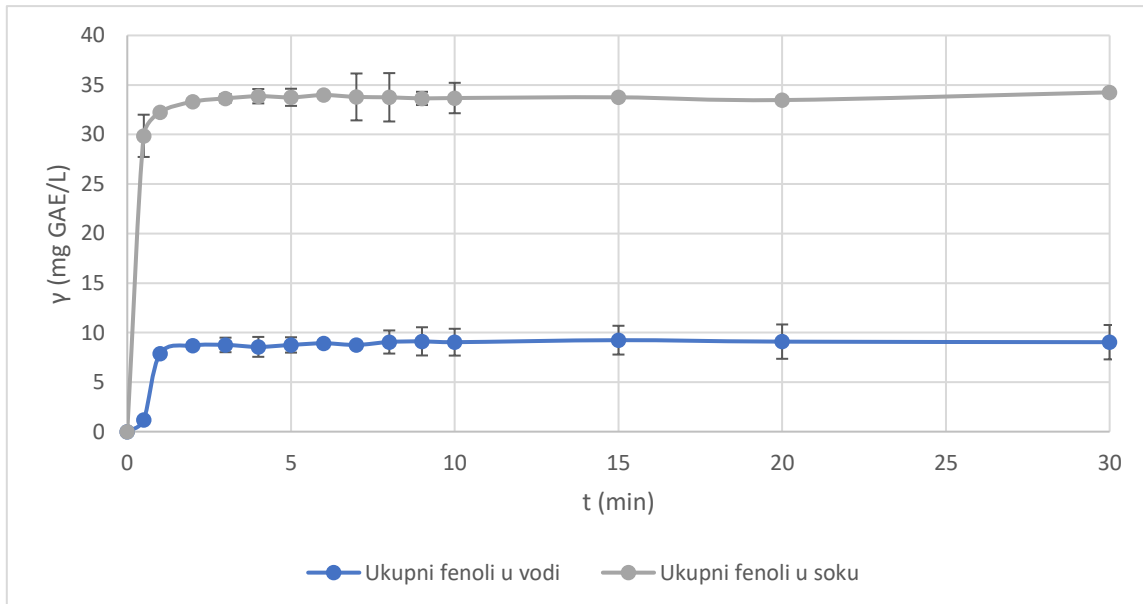
### 3.2.10. Mjerenje veličine čestica

Veličina mikrosfera određena je korištenjem uređaja Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Velika Britanija) koji se sastoji od disperzijske jedinice Hydro 2000S. Postupak se provodi na način da se 0,5 g mikrosfera rasprši u 5 mL vode na sobnoj temperaturi te se doda u disperzijsku jedinicu. Ultrazvučna disperzija provodi se dvije minute uz miješanje kako bi se omogućilo neovisno raspršivanje čestica. Mjerenja su provedena u triplikatima. Dobiveni parametri raspodjele veličine čestica (RVČ raspon) uključuju najmanju veličinu čestica  $d(0,1)$ , srednju veličinu čestica  $d(0,5)$  i najveću veličinu čestica  $d(0,9)$  (Belščak-Cvitanović i sur., 2016).

$$RV\check{c}raspon = \frac{d(0,9) - d(0,1)}{d(0,5)} \quad /4/$$

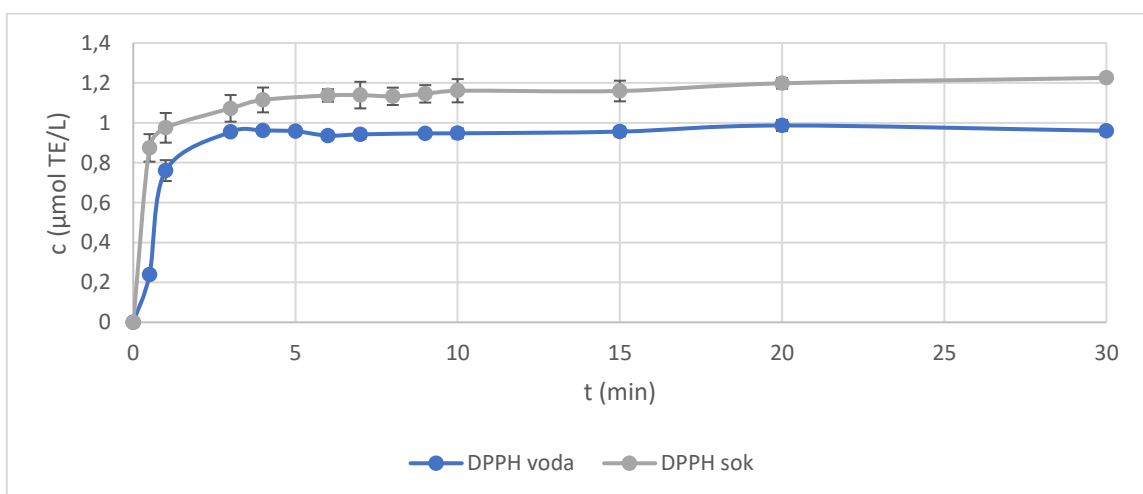
#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati ovog rada obuhvaćali su praćenje otpuštanja polifenola iz mokrih i suhih mikrosfera origana u vodi i soku, određivanje udjela ukupnih polifenola, određivanje antioksidacijskog kapaciteta mikrosfera ekstrakta origana putem DPPH metode te određivanje fizikalnih parametara. Svi rezultati obrađeni su pomoću programa Microsoft Office Excel 2016.



Slika 7. Otpuštanje ukupnih fenola iz mokrih mikrosfera ekstrakta origana u vodi i soku

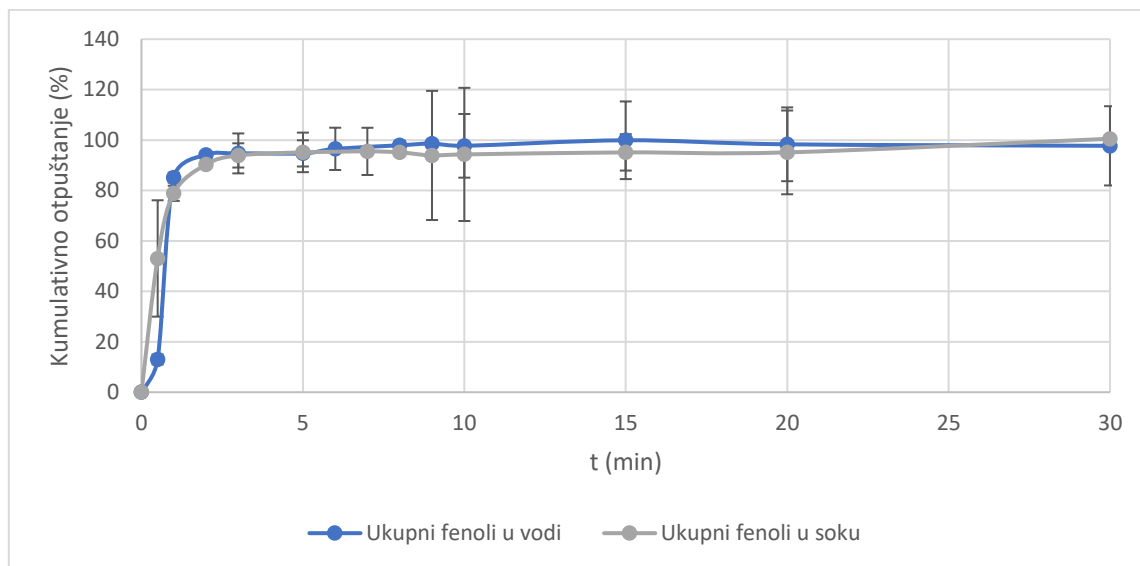
Na slici 7. praćeno je otpuštanje ukupnih polifenola iz mokrih mikrosfera u vodi i soku tijekom 30 minuta. Vrijednosti koncentracije polifenola veće su u soku nego u vodi zbog toga što sok od jabuke prirodno sadrži polifenole.



Slika 8. Antioksidacijski kapacitet mokrih mikrosfera ekstrakta origana u vodi i soku

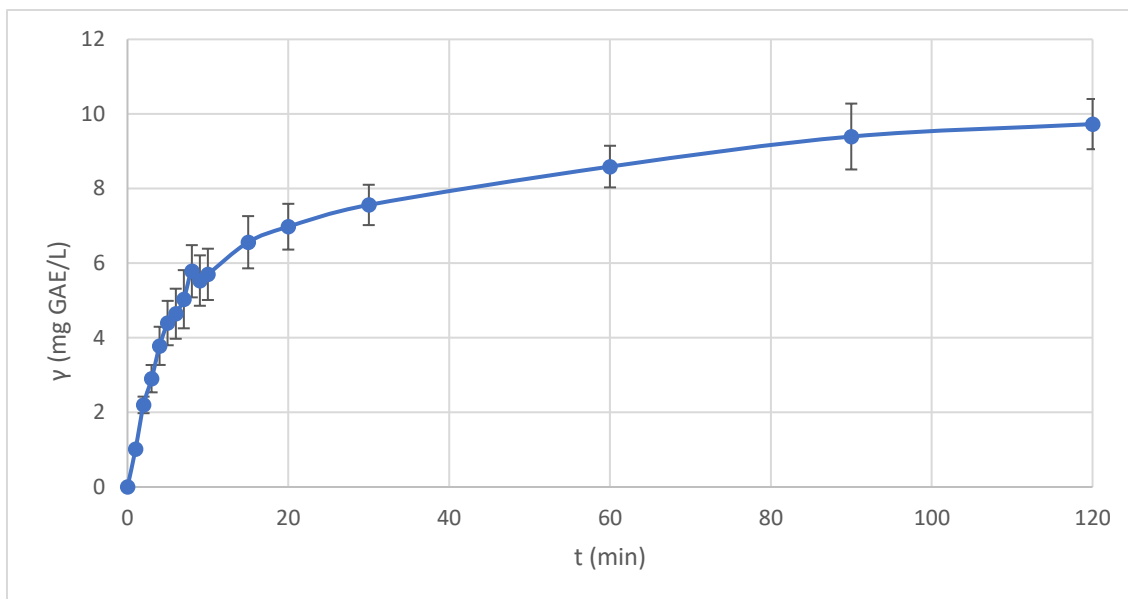


Slika 8. prikazuje antioksidacijski kapacitet mokrih mikrosfera u vodi i soku. Vrijednosti koncentracija u skladu su s vrijednostima iz prethodnog grafa koji prikazuje otpuštanje ukupnih polifenola u vodi i soku, stoga je i u ovom grafu antioksidacijski kapacitet veći u soku nego u vodi.



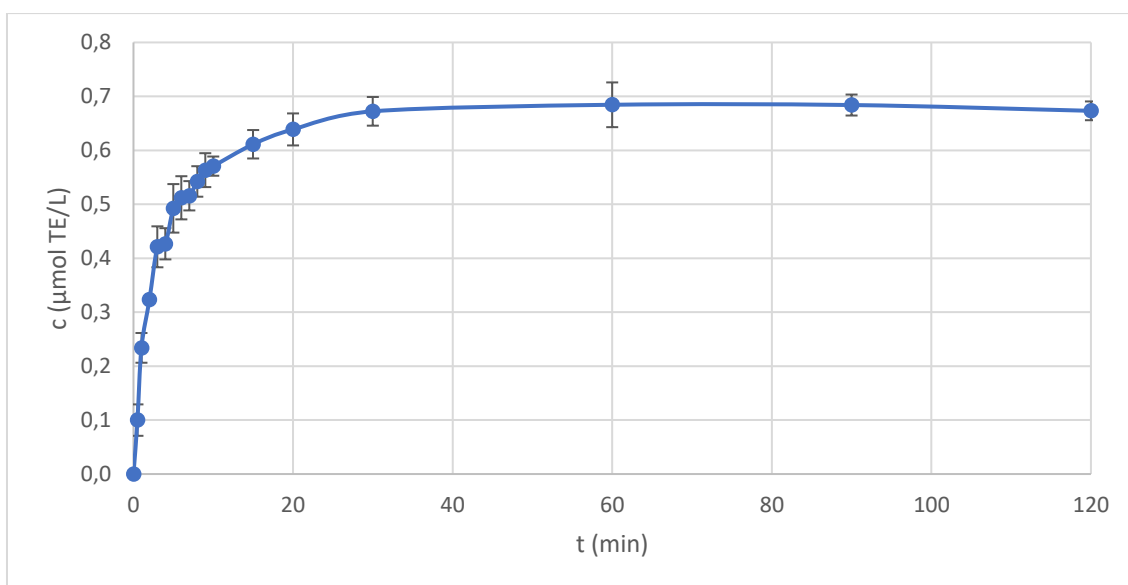
Slika 9. Kumulativno otpuštanje ukupnih fenola iz mokrih mikrosfera ekstrakta origana u vodi i soku

U grafu na slici 9. praćeno je kumulativno otpuštanje ukupnih fenola iz mokrih mikrosfera kako bi se u postocima vidjelo nakon kojeg vremenskog perioda dolazi do potpunog otpuštanja. Izmjerena je srednja apsorbancija soka od jabuke koja je iznosila 0,225 te je oduzeta od ukupne vrijednosti apsorbancije kako bi se prikazalo kumulativno otpuštanje fenola bez utjecaja matriksa. Iz grafa se može vidjeti da otpuštanje polifenola započinje brže u soku nego u vodi zbog interakcije polifenola u mikrosferama i polifenola prisutnih u soku. Nakon 30 sekundi u vodi se otpustilo 12,98 % ukupnih polifenola, dok se u soku nakon istog vremena otpustilo 53,04 % ukupnih polifenola. Nakon brzog početnog rasta, otpuštanje polifenola postalo je stabilno i u vodi i u soku. U 3. minuti može se primijetiti preklapanje krivulja i stabilizacija otpuštanja polifenola u vodi i soku. Vrijednost otpuštanja polifenola u vodi u 3. minuti je 94,71 %, dok je u soku 93,91 %. Maksimalno otpuštanje polifenola u vodi u odnosu na kapacitet punjenja postignuto je u 15-oj minuti, dok je u soku maksimalno otpuštanje ostvareno u 30-oj minuti. Otpuštanje polifenola iz mokrih mikrosfera provedeno je unutar vremenskog razdoblja od 30 minuta, a iz grafa se može zaključiti da je u tom vremenu došlo do stabilizacije krivulje.



Slika 10. Otpuštanje ukupnih polifenola iz suhих mikrosfera ekstrakta origana u vodi

Na slici 10. praćeno je otpuštanje ukupnih polifenola iz suhих mikrosfera u vodi. Vidljivo je da nakon 30 minuta ne dolazi do stabilizacije koncentracije otpuštenih polifenola kao kod mokrih mikrosfera, stoga je otpuštanje provedeno tijekom duljeg vremenskog perioda. Nagli porast koncentracije događa se do 10. minute (koncentracija tad iznosi 5,70 mg GAE/L) te nakon toga dolazi do postepene stabilizacije. Nakon 120 minuta koncentracija otpuštenih polifenola postala je stabilna.



Slika 11. Antioksidacijski kapacitet suhих mikrosfera ekstrakta origana u vodi

Slika 11. pokazuje antioksidacijski kapacitet suhих mikrosfera u vodi. Krivulja prati vrijednosti iz prethodnog grafa pa se tako nagli porast antioksidacijske aktivnosti događa do 10. minute (koncentracija iznosi 0,571 μmol TE/L). Nakon toga dolazi do postepene stabilizacije krivulje.

Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da se otpuštanje polifenola dijeli u dvije faze. Prvu fazu karakterizira nagli porast koncentracije polifenola u vodi ili soku i može se objasniti naglim otpuštanjem polifenola koji se nalaze na površini omotača od alginata. Nakon toga slijedi stabilna, sporija faza otpuštanja polifenola. Mreža kalcijevog alginata je porozna i omogućava produljeno otpuštanje polifenola u tekućem mediju koje je rezultat difuzije (Belščak-Cvitanović i sur. 2016).

Tablica 5. Fizikalni parametri

Fizikalno-kemijski parametri	Rezultati
Kapacitet punjenja (mg GAE/L)	9,24
Udio vlage (%)	97,42 ± 0,30
Stupanj bubrenja (%)	97,53 ± 14,18
Učinkovitost inkapsulacije (%)	89,56
d(0,1) (µm)	169,85 ± 4,16
d(0,5) (µm)	316,73 ± 5,18
d(0,9) (µm)	518,54 ± 14,94
RVČ raspon	1,10 ± 0,04

U tablici 5. prikazani su fizikalni parametri mikrosfera ekstrakta origana. Rezultat kapaciteta punjenja pokazuje da je maksimalna koncentracija polifenola u mokrim mikrosferama 9,24 mg GAE/L, a udio vlage u mokrim mikrosferama iznosi 97,42 %. Suhe mikrosfere imaju stupanj bubrenja 97,53 ± 14,18 %. Zbog toga što suhe mikrosfere prvo trebaju proći korak bubrenja u vodi, otpuštanje polifenola je sporije.

Učinkovitost inkapsulacije iznosi 89,56 %. Iz dobivenog rezultata može se zaključiti da je u filtratu izgubljeno 10,44 % ukupnih polifenola što označava visoku učinkovitost inkapsulacije.

Postignuti rezultati raspodjele veličine čestica pokazuju da 10 % čestica ima promjer manji od 169,85 ± 4,16 µm, a 90 % čestica ima promjer manji od 518,54 ± 14,94 µm. Promjer d(0,5) pokazuje da 50 % čestica ima promjer manji od 316,73 ± 5,18 µm i označava prosječnu veličinu čestica. U odnosu na veličinu mlaznice koja iznosi 80 µm, prosječna veličina čestica je 3,96 puta veća. Vrijednost raspona raspodjele veličine čestica iznosi 1,10 ± 0,04 što ukazuje na to da su mikrosfere homogene i jednoliko raspoređene.

## 5. ZAKLJUČAK

1. Mikrosfere su imale visoku učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola iz ekstrakta origana (89,56 %).
2. Otpuštanje polifenola iz mokrih mikrosfera događa se unutar nekoliko minuta u vodi ili soku (nakon 3. minute otpuštanje u vodi iznosi 94,71 %, dok u soku iznosi 93,91 %). S obzirom na takva svojstva mokre mikrosfere mogle bi se koristiti u prehrambenim proizvodima koje potrošači konzumiraju neposredno nakon pripreme. Iako pokazuju brzo otpuštanje polifenola u soku i vodi unutar nekoliko minuta, zbog svoje teksture nisu prikladne za izravnu upotrebu u napitcima. Kako bi se omogućila njihova upotreba, mokre mikrosfere mogle bi se staviti u filter vrećice i potom se namočiti u vodi ili soku. Tekstura mokrih mikrosfera mogla bi biti prednost u tehnologiji instant proizvoda koji se pripremaju uz dodatak vode. Primjer takvih proizvoda su instant zobene kaše, instant kukuruzna krupica ili žitne pahuljice s dodatkom mješavine voća. Mokre mikrosfere bi pritom trebale biti pohranjene u ambalažu koja će zadržavati potreban sadržaj vlage.
3. U odnosu na mokre mikrosfere suhe mikrosfere sporije otpuštaju bioaktivne spojeve u vodi (nakon 120 minuta otpuštanje polifenola je i dalje prisutno). Takve mikrosfere prikladne su za upotrebu u prehrambenim proizvodima koji se pripremaju s vodom i ne konzumiraju se neposredno nakon pripreme. Primjer takvih proizvoda bili bi napitak od chia sjemenki ili hladno pripremljena kava (eng. *cold brew*). Uz to potrošači danas često koriste termos boce koje imaju sposobnost zadržavanja topline ili hladnoće napitka kako bi ga mogli konzumirati tijekom produljenog razdoblja. Suhe mikrosfere punjene u filter vrećice mogle bi se koristiti za takve proizvode. Ukoliko se upotrebljavaju u vrućim napitcima, omotač mikrosfera treba imati sposobnost održavanja mreže gela na povišenoj temperaturi. Osim u prehrambenim proizvodima suhe mikrosfere mogle bi se primijeniti i u kozmetičkim proizvodima.

## 6. LITERATURA

- Abd El Kader A. E., Abu Hashish H. M. (2020) Encapsulation Techniques of Food Bioproduct. *Egyptian Journal of Chemistry* **63(5)**: 1881 – 1909.
- Abdul Khalil H. P. S. A., Lai T. K., Tye Y. Y., Rizal S., Chong E. W. N., Yap S. W., Hamzah A. A., Nurul Fazita M. R., Paridah M. T. (2018) A review of extractions of seaweed hydrocolloids: Properties and applications. *eXPRESS Polymer Letters* **12(4)**: 295 – 317.
- Altemimi A., Lakhssassi N., Baharlouei A., Watson D. G., Lightfoot D. A. (2017) Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants* **6(42)**: 1 – 23.
- Anonymus 1. byFlow (godina nepoznata) <<https://www.3dbyflow.com/>> Pristupljeno 21. srpnja 2020.
- Azwanida N. N (2015) A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants* **4(196)**: 1 – 6.
- Bamidele O. P., Emmambux M. N. (2020) Encapsulation of bioactive compounds by “extrusion” technologies: a review. *Critical reviews in Food Science and Nutrition* **60**: 1 – 19.
- Belščak-Cvitanović A., Jurić S., Đorđević V., Barišić L., Komes D., Ježek D., Bugarski B., Nedović V. (2016) Chemometric evaluation of binary mixtures of alginate and polysaccharide biopolymers as carriers for microencapsulation of green tea polyphenols. *International Journal of Food Properties*. **20(9)**: 1971 – 1986.
- Brglez Mojzer E., Knez Hrnčič M., Škerget M., Knez Ž., Bren U. (2016) Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* **21(901)**: 1 – 38.
- Burey P., Bhandari B. R., Howes T., Gidley M. J. (2008) Hydrocolloid Gel Particles: Formation, Characterization, and Application. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **48(5)**: 361 – 377.
- Cohen D. L., Lipton, J. I., Cutler M., Coulter D., Vesco A., Lipson H. (2009) Hydrocolloid printing: a novel platform for customized food production. *20th Annual International Solid Freeform Fabrication Symposium, SFF 2009*: 807 – 818.
- Dekebo A. (2019) Introductory Chapter: Plant Extracts, IntechOpen, str. 1 – 3.

- Derossi A., Caporizzi R., Azzollini D., i sur. (2018) Application of 3D printing for customized food. A case on the development of a fruit-based snack for children. *Journal of Food Engineering* **220**: 65 – 75.
- Dickinson E. (2017) Hydrocolloids acting as emulsifying agents – How do they do it? *Food Hydrocolloids* **1(13)**: 1 – 13.
- dos Santos, C., Buera, P., Mazzobre, F. (2017) Novel trends in cyclodextrins encapsulation. Applications in food science. *Current Opinion in Food Science* **16**: 106 – 113.
- Einhorn-Stoll U. (2017) Pectin-water interactions in foods – From powder to gel. *Food Hydrocolloids* **78**: 109 – 119.
- Godoi F. C., Prakash S., Bhandari B. R. (2016) 3d printing technologies applied for food design: Status and prospects. *Journal of Food Engineering* **179** 44 – 54.
- Groves K., Watkins R. (2018) 3D printing and food manufacture: Gimmick or game-changer? *Leatherhead Food Research* **61**: 1 – 7.
- Gutiérrez-Grijalva E. P., Picos-Salas M. A., Leyva-López N., Criollo-Mendoza M. S., Vazquez-Olivo G., Basilio Heredia J. (2018) Flavonoids and Phenolic Acids from Oregano: Occurrence, Biological Activity and Health Benefits. *Plants* **7(2)**: 1 – 23.
- Hager I., Golonka A., Putanowicz R. (2016) 3D printing of buildings and building components as the future of sustainable construction. *Procedia Engineering* **151**: 292 – 299.
- Huang, C. Y. (2018) Extrusion-based 3D printing and characterization of edible materials, Master Thesis, University of Waterloo.
- Izdebska J., Żołek-Tryznowska Z. (2016) 3D food printing - facts and future. *Agro FOOD Industry Hi Tech* **27(2)**: 33 – 36.
- Jovanović A., Petrović P., Đorđević V., Zdunić G., Šavikin K., Bugarski B. (2017) Polyphenols extraction from plant sources. *Lekovite Sirovine* **37**: 45 – 49.
- Jurić S., Šegota S., Vinceković M. (2019) Influence of surface morphology and structure of alginate microparticles on the bioactive agents release behavior. *Carbohydrate Polymers* **218**: 234 – 242.
- Jurić S., Sopko Stracenski K., Król-Kilińska Ž., Žutić I., Fabek Uher S., Đermić E., Topolovec-Pintarić S., Vinceković M. (2020) The enhancement of plant secondary metabolites content in *Lactuca sativa* L. by encapsulated bioactive agents. *Scientific reports* **10(3737)**: 1 – 12.

- Keppner B., Kahlenborn W., Richter S., Jetzke T., Lessmann A., Bovenschulte M. (2018) Focus on the future: 3D printing, Trend report for assessing the environmental impacts, Umweltbundesamt, str. 12.
- Krempel M., Griffin K., Khouryieh H. (2019) Hydrocolloids as Emulsifiers and Stabilizers in Beverage Preservation. *Preservatives and Preservation Approaches in Beverages* **15**: 427 – 465.
- Kunc P., (2019) 3D model u .stl formatu je preduvjet 3D printanja. 3DPrintaj, <<https://www.3dprintaj.com/3d-model-u-stl-formatu-je-preduvjet-3d-printanja/>>Pristupljeno 27. lipnja 2020.
- Lamuela-Raventós R. M. (2018) Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications, 1. izd., John Wiley & Sons Ltd. str. 107 – 115.
- Liu C., Ho C., Wang J. (2018) The development of 3D food printer for printing fibrous meat materials. *IOP Conf. Ser.:Mater. Sci. Eng.*, **284**: 1 – 10.
- Liu Z., Zhang M., Bhandari B., Wang Y. (2017) 3D printing: Printing precision and application in food sector. *Trends in Food Science & Technology* **69**: 1 – 36.
- Lu, W., Kelly, A. L., Miao, S. (2016) Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. *Trends in Food Science & Technology* **47**: 1 – 9.
- Memar M. Y., Raei P., Alizadeh N., Akhbari Aghdam M., Samadi Kafil H. (2017) Carvacrol and thymol: strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Reviews in Medical Microbiology* **28**: 63 – 68.
- Pinna L. R., Sisca F. G., Angioletti C. M., Taisch M., Terzi S., (2016) Additive manufacturing applications within food industry: An actual overview and future opportunities. 18 – 24.
- Pravilnik o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju (2013) *Narodne novine* **48** (NN 48/2013).
- Rothwell J. A., Pérez-Jiménez J., Neveu V., Medina-Ramon A., M'Hiri N., Garcia Lobato P., Manach C., Knox K., Eisner R., Wishart D., Scalbert A. (2016) Phenol-Explorer 3.6: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content, <<http://phenol-explorer.eu/>> Pristupljeno 8. srpnja 2020.
- Serizawa R., Shitara M., Gong J., Makino M. (2014) 3D Jet Printer of Edible Gels for Food Creation. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*.

- Shishir I. M. R., Xie L., Sun C., Zheng X., Chen W. (2018) Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology* **78**: 34 – 60.
- Singh P., Raghav A. (2018) 3D Food Printing: A Revolution in Food Technology. *Acta Scientific Nutritional Health* **2.2**: 11 – 12.
- Sun J., Peng Z., Yan L. K., Fuh J. Y. H., Hong G. S. (2015) 3D food printing—An innovative way of mass customization in food fabrication. *International Journal of Bioprinting* **1(1)**: 27 – 38.
- Tan C., Toh W. Y., Wong G., i sur. (2018) Extrusion-based 3D food printing – Materials and machines. *Int J Bioprint* **4(2)**: 1 – 13.
- Urbas R., Milošević R., Kašiković N., Pavlović Ž., Stanković Elesini U. (2017) Microcapsules application in graphic arts industry: a review on the state-of-the-art. *Iranian Polymer Journal* **26**: 541 – 561.
- Vinceković M., Jalšenjak N., Topolovec-Pintarić S., Đermić E., Bujan M., Jurić S. (2016) Encapsulation of Biological and Chemical Agents for Plant Nutrition and Protection: Chitosan/Alginate Microcapsules Loaded with Copper Cations and *Trichoderma viride*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **64**: 8073 – 8083.
- Vinceković M., Maslov Bandić L., Jurić S., Jalšenjak N., Čaić A., Živičnjak I., Đermić E., Karoglan M., Osrečak M., Topolovec-Pintarić S. (2019): The enhancement of bioactive potential in *Vitis vinifera* leaves by application of microspheres loaded with biological and chemical agents. *Journal of Plant Nutrition* **42(6)**: 543 – 558.
- Vogt S. (2017) 3D Food printing: What options the new technology offers, <<https://www.dlg.org/en/>> Pristupljeno 27.lipnja 2020.
- Yan F., Azizi A., Janke S., Schwarz M., Zeller S., Honermeier B. (2016) Antioxidant capacity variation in the oregano (*Origanum vulgare* L.) collection of the German National Genebank. *Industrial Crops and Products* **92**: 19 – 25.
- Yang F., Zhang M., Bhandari B. (2017) Recent development in 3D food printing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57(14)**: 3145 – 3153.
- Yang F., Zhang M., Bandari B. i sur. (2018) Investigation on lemon juice gel as food material for 3D printing and optimization of printing parameters. *LWT - Food Science and Technology* **87**: 67 – 76.



Zhang Q.-W., Lin L.-G., Ye W.-C. (2018) Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine* **13(20)**: 1 – 26.

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

Romina Gregorić  
ime i prezime studenta