

# Zadržavanje fenolnih spojeva u prahovima ekstrakta cvijeta trnine tijekom sušenja raspršivanjem

---

**Tandara, Monika**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*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:159:299819>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-09**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Monika Tandara 784/PI

**ZADRŽAVANJE FENOLNIH  
SPOJEVA U PRAHOVIMA  
EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE  
TIJEKOM SUŠENJA  
RASPRŠIVANJEM**

**Ovaj rad izrađen je u okviru projekta „Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane (IT-PE-FF)“ financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost**

*Rad je izrađen u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva te Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Verice Dragović-Uzelac, te uz pomoć dr.sc. Ivone Elez Garofulić i dr. sc. Sandra Pedisić*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

### ZADRŽAVANJE FENOLNIH SPOJEVA U PRAHOVIMA EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE TIJEKOM SUŠENJA RASPRŠIVANJEM

*Monika Tandara, 784/PI*

**Sažetak:** Proizvodnja prahova biljnih ekstrakata postupkom sušenja raspršivanjem jedan je od učinkovitih načina očuvanja bioaktivnih svojstava. Cilj ovog rada bio je primjenom sušenja raspršivanjem proizvesti prah ekstrakta cvijeta trnine te utvrditi utjecaj temperature (120-180 °C), omjera nosača i suhe tvari ekstrakta (0,7-2) i udjela arapske gume (0,2-0,8) na sadržaj suhe tvari, koncentraciju ukupnih i površinskih fenola te enkapsulacijski kapacitet. Povećanjem temperature, sadržaj suhe tvari se povećava, a koncentracija površinskih fenola smanjuje. Niži udjel arapske gume u nosaču utječe na povećanje suhe tvari i koncentracije ukupnih fenola. Povećanje omjera nosača i suhe tvari pozitivno utječe na enkapsulacijski kapacitet jer je zabilježeno smanjenje koncentracije površinskih fenola i porast koncentracije ukupnih fenola. Pri optimalnim uvjetima sušenja (temperatura 200,45 °C, omjer nosača i suhe tvari 1,96:1 te udio AG 0) dobiven je prah najboljih svojstava u kojem je sadržaj suhe tvari iznosio 99,65 %, maseni udio ukupnih fenola 114,35 mg GAE/g s. tv. e., maseni udio površinskih fenola 7,45 mg GAE/g s. tv. e. te enkapsulacijski kapacitet 93,99 %.

**Ključne riječi:** trnina, biljni ekstrakt, sušenje raspršivanjem, prah, fenoli

**Rad sadrži:** 65 stranica, 13 slika, 6 tablica, 128 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Ivona Elez Garofulić i dr. sc. Sandra Pedisić

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof. dr. sc. Branka Levaj (predsjednik)
2. Prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac (mentor)
3. Doc. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević
4. Izv. prof. dr. sc. Sandra Balbino (zamjena)

**Datum obrane:** 25. rujna 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### **THE RETENTION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN BLACKTHORN FLOWER EXTRACT POWDERS PRODUCED BY SPRAY DRYING**

*Monika Tandara, 784/PI*

**Abstract:** The production of herbal extracts by spray drying is one of the most effective ways of preserving bioactive properties. The aim of this study was to produce powder from blackthorn flower extract by spray drying and to determinate the effect of temperature (120-180 °C), carrier: solid content ratio (0,7-2) and arabic gum proportion (0,2-0,8) on the dry matter content, total and surface phenolic concentration and encapsulation efficiency. Increased temperature was followed by increased dry matter content and decreased surface phenolic concentration. Decreased arabic gum proportion in the carrier influenced the increase of dry matter and total phenolic concentration. Increasing of the carrier: solid content ratio positively affected on encapsulation efficiency because there was also noted that surface phenolic concentration decreased and total phenolic concentration increased. Spray drying in optimal conditions (temperature 200,45 °C, carrier: solid content ratio 1,96:1 and arabic gum proportion 0) resulted with powder of the best properties that contained 99,65 % dry matter, mass fraction of total phenolics 114,35 mg GAE/g s. tv. e., mass fraction of surface phenolics 7,45 mg GAE/g s. tv. e. and 93,99 % encapsulation efficiency.

**Key words:** blackthorn, herbal extract, spray drying, powder, phenols

**Thesis contains:** 65 pages, 13 figures, 6 tables, 128 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** PhD. Verica Dragović-Uzelac, Full Professor

**Technical support and assistance:** PhD. Ivona Elez Garofulić and PhD. Sandra Pedisić

#### **Reviewers:**

1. PhD. Branka Levaj, Full Professor
2. PhD. Verica Dragović-Uzelac, Full Professor (mentor)
3. PhD. Danijela Bursać Kovačević, Assistant Professor
4. PhD. Sandra Balbino, Associate Professor (substitute)

**Thesis defended:** September 25th, 2017

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>3</b>
2.1. TRNINA.....	4
2.1.1. Osnovne karakteristike trnine.....	4
2.1.2. Kemijski sastav trnine .....	5
2.1.3. Fenolni spojevi trnine.....	6
2.1.4. Upotreba trnine i utjecaj na zdravlje .....	9
2.2. BILJNI EKSTRAKTI .....	10
2.2.1. Podjela biljnih ekstrakata .....	10
2.2.2. Postupci ekstrakcije.....	11
2.2.1.1. Konvencionalni postupci ekstrakcije .....	11
2.2.1.2. Nekonvencionalni postupci ekstrakcije.....	12
2.3. SUŠENJE BILJNIH EKSTRAKATA .....	16
2.3.1. Sušenje raspršivanjem .....	16
2.3.2. Primjena nosača pri sušenju raspršivanjem.....	18
2.3.3. Utjecaj vrste nosača i temperature na zadržavanje fenolnih spojeva .....	20
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>24</b>
3.1. MATERIJALI .....	25
3.1.1. Uzorak cvijeta trnine .....	25
3.1.2. Kemikalije .....	25
3.1.3. Aparatura i pribor .....	26
3.2. METODE .....	27
3.2.1. Ubrzana ekstrakcija otapalom pri povišenom tlaku (Accelerated Solvent Extraction, ASE) .....	27
3.2.2. Proizvodnja praha ekstrakta cvijeta trnine primjenom sušenja raspršivanjem.....	28
3.2.3. Fizikalno-kemijska metoda analize prahova ekstrakta cvijeta trnine.....	30

3.2.3.1. Sadržaj suhe tvari (%) .....	30
3.2.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz prahova ekstrakta cvijeta trnine .....	31
3.2.4.1. Ekstrakcija ukupnih fenolnih spojeva (UF) .....	31
3.2.4.2. Ekstrakcija površinskih fenolnih spojeva (PF).....	32
3.2.4.3. Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva.....	32
3.2.4.4. Izračunavanje enkapsulacijskog kapaciteta.....	34
3.2.5. Eksperimentalni dizajn i statistička obrada podataka.....	34
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>36</b>
4.1. Utjecaj parametara sušenja na sadržaj suhe tvari u prahovima ekstrakta cvijeta trnine	37
4.2. Utjecaj parametara sušenja na koncentraciju ukupnih fenola u prahovima ekstrakta cvijeta trnine .....	39
4.3. Utjecaj parametara sušenja na koncentraciju površinskih fenola u prahovima ekstrakta cvijeta trnine .....	42
4.4. Utjecaj parametara sušenja na enkapsulacijski kapacitet prahova ekstrakta cvijeta trnine.....	44
4.5. Rezultati statističke obrade podataka .....	47
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>52</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>54</b>



## **1. UVOD**

U novije vrijeme divlje vrste biljaka predmet su brojnih istraživanja zbog povećane svijesti potrošača o važnosti zdrave prehrane, potencijalne primjene u prevenciji bolesti, a zbog sociološko-ekonomskih i ekoloških promjena njihova upotreba je u stalnom porastu (Luczaj i sur., 2012). Zbog prirodnih ljekovitih svojstava biljaka, osobito cvijeća, ono se koristi u medicinske svrhe te u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Bioaktivne supstance cvjetova imaju širok raspon ljekovitih svojstava, a najčešće se koristi sok cvijeta, svježe ili suhe latice te aroma cvijeta (Arya i sur., 2013).

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je divlja vrsta roda *Prunus* koja raste u gotovo cijeloj Europi (Mikulic-Petkovsek i sur., 2016). Cvjetovi trnine, posebno latice, zbog ljekovitih svojstava se uglavnom koriste u obliku čajeva, sirupa i svježeg soka za suzbijanje dijareje, anemije i ostalih bolesti (Savulescu, 1956; van Wyk, 2005). Cvjetni ekstrakti imaju protuupalno te blago laksativno djelovanje te se koriste za ublažavanje grčeva i pročišćavanje krvi (Olszewska i Wolbis, 2001).

Ekstrakcija je postupak koji se koristi za izdvajanje i koncentriranje sastojaka iz biljnog materijala selektivnim otapalom. Ključan je korak pri izolaciji bioaktivnih komponenti koje utječu na prevenciju raznih oboljenja. Zbog potencijalnog pozitivnog učinka polifenola na zdravlje ljudi, velik je broj istraživanja primjene polifenola u prehrambenoj industriji, u obliku funkcionalnih proizvoda, te u farmaceutskoj industriji. Tekući ekstrakti često se podvrgavaju postupcima sušenja, a za to se najčešće koristi postupak sušenja raspršivanjem koji se provodi u posebnim uređajima za sušenje gdje se tekući ekstrakt raspršuje u struji vrućeg zraka i sitne kapljice se osuše do sitnih čestica praha. Da bi nastao prah što boljih svojstava, prije sušenja je potrebno dodati nosače u tekući ekstrakt, pri čemu se najčešće koriste maltodekstrin, arapska guma i koloidni silicijev dioksid (Gallo i sur., 2011). Cvijet trnine u ovom istraživanju koristio se za pripremu tekućeg biljnog ekstrakta koji se zatim podvrgnuo postupku sušenja raspršivanjem kako bi se dobio standardizirani suhi biljni ekstrakt.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj tri parametra sušenja raspršivanjem (temperatura, omjer nosača i suhe tvari ekstrakta te udio arapske gume) na zadržavanje fenolnih spojeva u prahovima ekstrakta cvijeta trnine. Krajnji cilj istraživanja bila je optimizacija postupka sušenja raspršivanjem kako bi se pri optimalnim uvjetima sušenja proizveo prah ekstrakta cvijeta trnine s niskom koncentracijom površinskih fenola, visokom koncentracijom ukupnih fenola i enkapsulacijskim kapacitetom, te visokim sadržajem suhe tvari.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. TRNINA

### 2.1.1. Osnovne karakteristike trnine

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je divlja vrsta roda *Prunus*, a pripada porodici ruža (*Rosaceae*) (Mikulic-Petkovsek i sur., 2016), a često se susreće pod nazivima crni trn, trnula ili trnjina (Idžojtić, 2013). Prirodno raste na području Europe i zapadne Azije, uključujući Tursku, Iran i Kavkaz, no raširena je i na Novom Zelandu, sjeverozapadnom dijelu Afrike te na istoku Sjeverne Amerike, gdje je uvezena (Kavaz Yuksel, 2015). Najčešće raste na rubovima šuma i otvorenim dijelovima kao dio biljne zajednice, no može se naći i na sunčanim kamenitim padinama, riječnim dolinama, livadama i pašnjacima, u šikarama koje se nalaze između šuma i travnatih površina. Osim u nizinama, može rasti i u brdovitim dijelovima, primjerice u južnim Alpama do 1600 metara nadmorske visine (Mortimer i sur., 2000; Popescu i Caudullo, 2016).

*Prunus spinosa* je trnoviti listopadni grm s crveno-smeđom korom i gustim, trnovitim, tvrdim granama. U pogodnim klimatskim uvjetima može narasti i do pet metara u visinu (Kavaz Yuksel, 2015). Kora je u početku baršunasta i crveno-smeđa, a kasnije postane tamnosiva, s blagim utorima. Listovi su naizmjenični, jajastog ili eliptičnog oblika i nazubljenih rubova, a nalaze se na dlakavim peteljčkama dužine 2 – 10 mm. Dužina listova iznosi 2,5 cm, a širina 1 – 2 cm, zelene su boje, bez sjaja i dlakavi s donje strane. Pupoljci su dlakavi te ovalnog, okruglastog oblika i crvenkasto smeđe boje (Popescu i Caudullo, 2016).

Mnoštvo cvjetova javlja se u rano proljeće, od ožujka do svibnja (Popescu i Caudullo, 2016), neposredno prije pojave lišća. Trnina cvjeta ranije, kad su temperature niže i insekata je manje (Gyan i Woodell, 1987). Cvjetovi su dvospolni, jednodomni, a oprašuju ih kukci (Idžojtić, 2013). Trnina sadrži mnogo malih, nabijenih cvjetova što ih čini vizualno privlačnijima oprašivačima (Gyan i Woodell, 1987). Promjer cvijeta je 1,5 cm, a sadrži pet bijelih latica. Sadrži 20 prašnika koji su dugi oko 0,5 cm (Savulescu, 1956), s tankim bijelim prašničkim nitima i žutim prašnicama (Idžojtić, 2013). Prema istraživanju Guitiana i sur. (1993), dostupni nektar u cvjetovima ima maksimalnu vrijednost u ranim jutarnjim satima, dok se prema podnevnim satima količina nektara smanjuje, a koncentracija povećava. Dva su moguća objašnjenja te pojave: potrošnja od strane oprašivača ili isparavanje.

Plodovi su male, jestive, ljubičasto-plave ili crne koštunice okruglog oblika i promjera 10 – 15 mm. Mesnati dio ploda je zelene boje, čvrst, kiseo i opor, a jestiv je nakon

promrzavanja (Idžojtić, 2013). Zrenjem okus postaje slatkasto-kiselkast (Kavaz Yuksel, 2015). Plodovi dozrijevaju u jesen, trpkog su okusa te imaju tanku pokožicu (Özcan i Baycu, 2008). Prema Nielsen i Olricku (2001) plod trnine ima specifičan kiselkasto-trpak okus zbog visokog sadržaja tanina. Naravno, okus plodova ovisi o klimatskim uvjetima tijekom rasta i o vremenu berbe, a poznato je da su plodovi trnine koji su izloženi mrazu slađi.



**Slika 1.** Cvijet trnine (Summa, 2007)

### **2.1.2. Kemijski sastav trnine**

Plodovi divlje vrste trnine koja raste u pokrajini Konya, u Turskoj, sadrže: 69,37 % vode, 3,4 % sirovih proteina, 2,06 % sirovog ulja, 4,6 % sirovih vlakana, 249 kcal/g energije, 2,72 % pepela, a pH iznosi 3,53. Također, plodovi u većim razinama sadrže slijedeće anorganske esencijalne elemente: S, K, Ca, P, Mg, Na, B i Al (Marakoglu i sur., 2005). U plodovima divlje trnine uzgajane na području Portugala prevladavaju mononezasićene masne kiseline, a detektirano je najviše oleinske kiseline (C18:1), koju slijedi polinezasićena linolna (C18:2). Nezasićene masne kiseline dominiraju nad zasićenima, od kojih je najzastupljenija palmitinska kiselina. Od ukupnih šećera, u plodovima trnine prevladava glukoza (29,84 g/100 g). Dokazana je veća prisutnost askorbinske kiseline. Od proučavanih tokoferola, najzastupljeniji je  $\alpha$ -tokoferol. Razlike u kemijskom sastavu plodova portugalskog i turskog

podrijetla uzrokovane su geografskim podrijetlom i različitim metodama korištenim za analizu (Barros i sur., 2010).

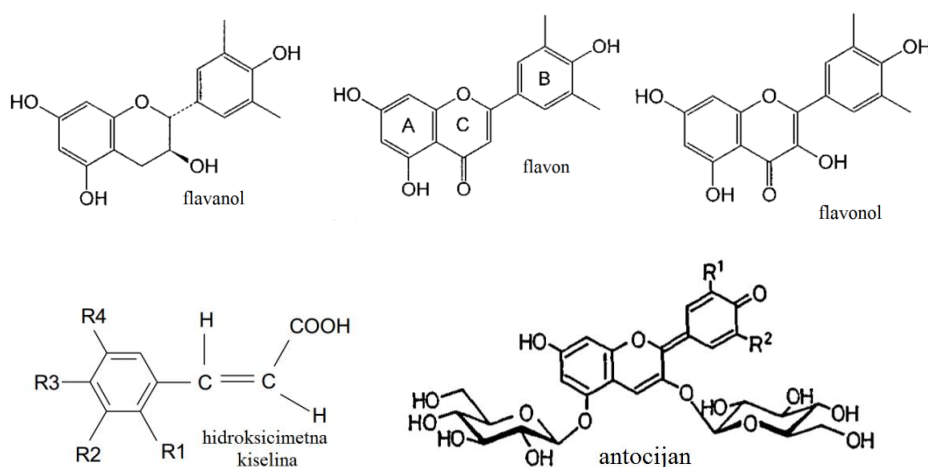
### 2.1.3. Fenolni spojevi trnine

Fenolni spojevi ili polifenoli su sekundarni biljni metaboliti prisutni u svim biljnim tkivima. Vrlo su važni u prehrani ljudi i životinja zbog dokazanog pozitivnog učinka na zdravlje, primjerice antioksidacijskog, antibakterijskog, antivirusnog ili protuupalnog djelovanja (Bravo, 1998). Prema jednoj od najjednostavnijih podjela, polifenoli se dijele na flavonoide i fenolne kiseline (Scalbert i sur., 2005). Flavonoidi su građeni od dva benzenska prstena (A i B) povezana s trećim piranskim prstenom C (Stalikas, 2007), a dijele se na: flavone, flavonole, flavanole, flavanone, izoflavone, antocijane (Scalbert i sur., 2005). Fenolne kiseline su u biljnom tkivu najčešće prisutne u obliku derivata, a dijele se u dvije skupine: hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Manach i sur., 2004).

Fenolni spojevi čine važnu skupinu bioaktivnih spojeva koji su zastupljeni u različitim dijelovima trnine (plod, cvijet, list, kora). Udio i zastupljenost fenolnih spojeva razlikuje se u ovisnosti o dijelu biljke, vrsti, ali i o agroekološkim uvjetima u kojima biljka uspijeva. U literaturi je dostupan mali broj istraživanja o fenolnim spojevima cvijeta trnine, a većina se odnosi na fenolni sastav i udjele fenola u plodu. U ekstraktima *Prunus spinosa* koji su dobiveni iz plodova trnine prikupljenih u srpnju, u Turskoj, određena je visoka razina fenolnih spojeva koji su povezani s visokim antioksidacijskim kapacitetom što opravdava upotrebu sirovih materijala biljke trnine u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Aliyazicioglu i sur., 2015).

Plodovi su dobar izvor hranjivih tvari, a posebno su bogati antioksidansima, kao što su vitamini C i E, te karotenoidima i fenolnim spojevima, koji uz prehrambenu vrijednost imaju i ljekovita svojstva (Kumarasamy i sur., 2007). To potvrđuje i istraživanje Ruiz-Rodrigueza i sur. (2014), prema kojem plodovi sadrže visok udio vitamina C, fenolnih kiselina i flavonola. Prema istraživanju Veličković i sur. (2014), plodovi trnine sadrže: fenolne kiseline (neoklorogenska i kafeinska kiselina), flavonoide (kvercetin i miricetin) te antocijane (cijanidin-3-O-glukozid, cijanidin-3-O-rutinozid, peonidin-3-O-glukozid). Plodovi biljke *Prunus spinosa* sadrže: derivate cimetine kiseline, flavanole (katehin, epikatehin, procijanidin), flavonole (kvercetin, kamferol), antocijane (cijanidin, od čega najviše cijanidin-

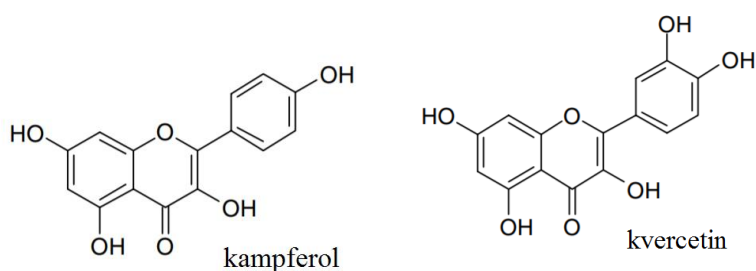
3-glukozid, pelargonidin i peonidin, od čega najviše peonidin-3-glukozid). Istraživanje Mikulic-Petkovsek i sur. (2016) pokazalo je da plodovi *Prunus spinosa*, uz *Prunus padus*, sadrže visoku razinu antocijana, flavonola i ukupnih karotenoida. Prema istraživanju Guimarãesa i sur. (2013), *Prunus spinosa* sadrži najvišu koncentraciju fenolnih kiselina, od čega je najzastupljeniji derivat kafeinske kiseline, zatim flavona, odnosno flavonola, od čega je najzastupljeniji derivat kvercetina. Također je dokazano da plodovi trnine sadrže složeniji profil i višu koncentraciju antocijana od ostalih ispitivanih vrsta.



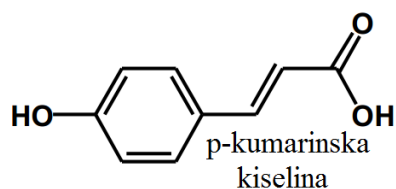
**Slika 2.** Kemijska struktura najvažnijih predstavnika polifenola u plodovima trnine (Hollman i Arts, 2000; Stalikas, 2007; Goto i Kondo, 1991)

Cvijet trnine prema dosadašnjim istraživanjima sadrži visok maseni udio flavonoida, proantocijanidine tipa A i fenolne kiseline (Kolodziej i sur., 1991). U metanolnim ekstraktima cvijeta trnine određeni su flavonoli kamferol, kvercetin i njihovi derivati te p-kumarinska kiselina (Olszewska i Wolbis, 2001). Flavonoidi u cvjetovima najčešće se pojavljuju u obliku monoglikozida, kamferola i kvercetin-3-O-arabinozida (Olszewska i sur., 2001). Prema istraživanju Wagnera i Bladta (1996), cvijet trnine sadrži: glikozide kvercetina (rutin, hiperozid, kvercetin, kvercetin-3-O-arabinozid), kamferol-3,7-O-diramnozid, 3-O-ramnozid i 3-O-arabinozid. Provedeno je istraživanje o sadržaju fenolnih spojeva u mješavini cvijeta i lista trnine prema kojem je utvrđeno da mješavina sadrži flavonoide, derivate flavonola (kamferol, kvercetin i njihove glikozide s arabinozom, ksilozom i ramnozom) (Sakar i Kolodziej, 1993; Tamas, 1985), te fenolne kiseline (Olszewska i sur., 2001). Cvijeće i lišće

trnine smatraju se bogatijim izvorom flavonoida od drugih vrsta biljaka koje se koriste za terapijske svrhe, primjerice list breze i cvijet bazge. Kamferol i kvercetin nalaze se u cvjetovima u omjeru 1:1, dok je u lišću omjer 2,4:1 (Olszewska i sur., 2001). Osim u plodovima, cvjetovima i listu trnine, fenolni spojevi pronađeni su i u grančicama koje sadrže fenolne kiseline (protokatehinska, galna i kafeinska kiselina), kumarini, flavonoli, flavan-3-olite proantocijanidini (Pinacho i sur., 2015).

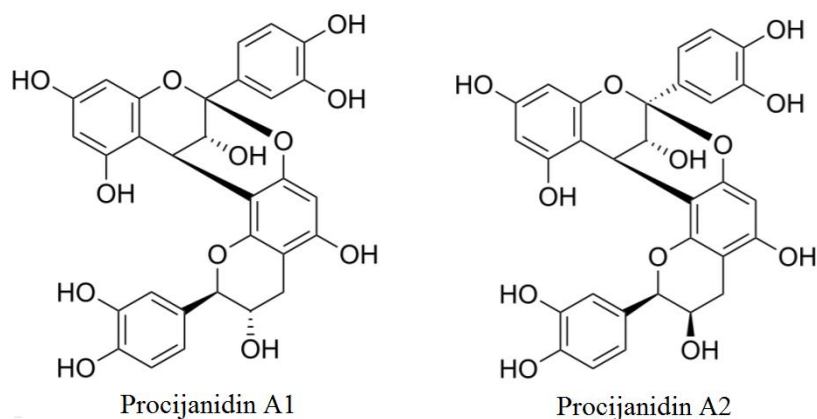


**Slika 3.** Kemijska struktura najvažnijih predstavnika flavonola pronađenih u cvjetovima trnine (Kondo i sur., 2010)



**Slika 4.** Kemijska struktura najvažnijeg predstavnika fenolnih kiselina pronađen u cvjetovima trnine (Tsao, 2010)





**Slika 5.** Kemijska struktura glavnih procijanidina pronađenih u cvijetu trnine (Škerget i sur., 2005)

#### 2.1.4. Upotreba trnine i utjecaj na zdravlje

Poznato je da trnina zbog visoke razine fenolnih spojeva, vitamina i minerala te zbog visokog antioksidacijskog kapaciteta ima pozitivne utjecaje na zdravlje (Kavaz Yuksel, 2015). Ljekovita svojstva pokazuju ne samo plodovi, već i cvjetovi, kora i korijen biljke (Veličković i sur., 2014). Također je važna biljka za biljni i životinjski svijet čiji su rani cvjetovi značajni za razne oprašivače (Popescu i Caudullo, 2016).

Listovi se koriste za proizvodnju čajeva, a plodovi i korijenje za proizvodnju boje (Komarov, 1970). Cvjetovi, posebno latice, se zbog ljekovitih svojstava uglavnom koriste u medicinske svrhe, u obliku čajeva, sirupa i svježeg soka za suzbijanje dijareje, anemije i ostalih bolesti (Savulescu, 1956; van Wyk, 2005). Cvjetni ekstrakti imaju diuretičko, protuupalno te blago laksativno djelovanje, a također se koriste za ublažavanje grčeva i pročišćavanje krvi. Svježe cvijeće koristi se u homeopatskim proizvodima koji se primjenjuju kod poremećaja cirkulacije (Olszewska i Wolbis, 2001). U Navarri, u Španjolskoj se grančice trnine koriste u liječenju hipertenzije, a macerirani plodovi za proizvodnju rakija (González i sur., 1992). U Francuskoj se nezreli plodovi kisele (Komarov, 1970). Potpuno zreli plodovi trnine su jestivi, unatoč trpkoci, ali se uglavnom koriste za proizvodnju džemova, marmelada, vina, vinjaka, destiliranih alkoholnih pića ili kao sastojak peciva (Savulescu, 1956; van Wyk, 2005). Na sjeveroistoku Portugala, plodovi se najčešće konzumiraju sirovi, u obliku džemova ili macerirani sa šećerom, medom ili brandyem u svrhu dobivanja laksativnog likera koji se

konzumira nakon obilnijih obroka (Barros i sur., 2010). Dokazano je da plodovi biljke trnine imaju adstringentno, diuretičko i purgativno djelovanje (Lust, 2014).

## **2.2. BILJNI EKSTRAKTI**

Prema Europskoj farmakopeji, biljni ekstrakti su koncentrirani pripravci tekuće, guste ili krute konzistencije dobiveni iz sirovina biljnog podrijetla koja može biti u svježem ili češće, u suhom obliku. Za pripremu biljnih ekstrakata mogu se koristiti svi dijelovi biljke, ovisno o potrebi, a najčešće se koriste plodovi, lišće, korijenje, cvijeće ili sjemenke.

### **2.2.1. Podjela biljnih ekstrakata**

Ekstrakti se mogu dijeliti s obzirom na konačnu upotrebu ekstrakta, prema tipu otapala, prema konzistenciji te prema postupku ekstrakcije (Savić, 2014). S obzirom na otapalo kojim se ekstrakcija provodi, mogu se podijeliti na vodene, alkoholne, eterske, uljne ekstrakte i ekstrakte dobivene korištenjem ukapljenih plinova (Redchenkova i Khiskova, 2004).

Za ovaj rad važna je podjela ekstrakata s obzirom na konzistenciju: tekući (*Extracta fluida*), suhi (*Extracta sicca*) i gusti (*Extracta spissa*) ekstrakti (Redchenkova i Khiskova, 2004). U tekuće ekstrakte spadaju: infuzi, dekoti, macerati, glicerinski ekstrakti, perkolati i digesti (Marković, 2005).

Prednosti upotrebe tekućih ekstrakata su: isti omjer aktivnih spojeva u početnom materijalu i pripravku za upotrebu, lakše rukovanje i doziranje te zadržavanje hlapivih komponenata u ekstraktu. No, neki od nedostataka su: zasićenost nepotrebnim spojevima izoliranim iz početnog materijala, pojava taloga zbog sniženja temperature ili sadržaja otapala (isparavanje etanola), potreba za hermetičkim zatvaranjem i skladištenjem pri nižoj temperaturi te velika količina otapala koja uzrokuje probleme pri transportu (Redchenkova i Khiskova, 2004). Tekući ekstrakti se vrlo često podvrgavaju daljnjim postupcima poput pročišćavanja, fracioniranja, sušenja, enkapsulacije i sl.

Gusti se ekstrakti zbog viskoznosti koriste za vezanje i oblikovanje tvari. Dodaju se kao aditivi u sirupe, mješavine te se dodaju u pripravke, tinkture i tablete. Viskoznost je

ujedno i nedostatak zbog posebnih postupaka pri vaganju i korištenju ovakvih ekstrakata. Također, nedostatak je osjetljivost na sušenje i skrućivanje na suhom zraku, dok na vlažnom zraku dolazi do prevelikog vlaženja ekstrakta. Zbog tih nestabilnosti potrebno je hermetičko zatvaranje gustih ekstrakata (Redchenkova i Khiskova, 2004).

Danas se provode mnoga istraživanja u svrhu razvijanja novih tehnologija za dobivanje standardiziranih suhih biljnih ekstrakata. Suhi se ekstrakti dobivaju potpunim uklanjanjem otapala i sadrže više od 95% suhog dijela. Iako su male težine i prikladni za rukovanje i upotrebu, vrlo su higroskopni što može uzrokovati pojavu grudica (Redchenkova i Khiskova, 2004). Suhi biljni ekstrakti su higroskopni zbog prisustva hidrofilnih komponenata koje se nalaze primarno u biljkama, šećeri i organske kiseline (Schiller i sur., 2002).

Prednosti suhih ekstrakata nad konvencionalnim tekućim su veća koncentracija i stabilnost aktivnih komponenata te niži troškovi skladištenja. No te prednosti ovise o procesu proizvodnje suhih ekstrakata. Suhi biljni ekstrakti praškastog oblika dobiju se sušenjem koncentriranog tekućeg ekstrakta biljnog materijala, primjerice cvijeta, lišća ili ploda. Postupak i parametri sušenja mogu utjecati na fizikalno-kemijske karakteristike i cijenu proizvoda te na gubitak bioaktivnih sastojaka (Souza i Oliveira, 2006).

### **2.2.2. Postupci ekstrakcije**

Ekstrakcija je proces odjeljivanja spojeva iz biljnih materijala na temelju različite topljivosti u otapalu kojim se vrši ekstrakcija (Rostagno i Prado, 2013). Postupak ekstrakcije je ključan korak pri dobivanju tekućih ekstrakata te izolaciji biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala o kojemu ovise daljnji koraci, odvajanje i identifikacija spojeva (Bucić-Kojić i sur., 2007). Prinos, sastav i čistoća fenolnih spojeva ovise o njihovoj kemijskoj strukturi i strukturi interferirajućih tvari, veličini čestica te o uvjetima i tehnici ekstrakcije (Naczki i Shahidi, 2004). Odabir metode ekstrakcije ovisi o materijalu koji se ekstrahira te o vrsti spoja koji se želi ekstrahirati (Rostagno i Prado, 2013).

#### **2.2.1.1. Konvencionalni postupci ekstrakcije**

Jedan od najčešće korištenih postupaka ekstrakcije je klasični postupak ekstrakcije pomoću otapala (voda ili vodene otopine alkohola) uz primjenu topline ili miješanja (Azmir i

sur., 2013). Kod klasičnih postupaka ekstrakcije na učinkovitost procesa i kvalitetu ekstrakta utječu slijedeći parametri: temperatura, vrijeme kontakta, vrsta otapala za ekstrakciju, omjer krutine i tekućine te veličina čestica (Özcan, 2006). Učinkovitost konvencionalnih metoda najviše ovisi o izboru otapala (Cowan, 1999).

Najvažniji oblik konvencionalne ekstrakcije je ekstrakcija pomoću refleksa. Ta se tehnika često koristi zbog visoke temperature koja ubrzava prijenos mase odnosno ekstrakciju, nema potrebe za filtracijom te je tijekom ekstrakcije osiguran stalan kontakt materijala za ekstrakciju sa svježim otapalom (Rostagno i Prado, 2013). Također, tehnika je jednostavna, oprema za ekstrakciju jeftina i moguće je izdvojiti veću masu uzorka, a sama ekstrakcija ne ovisi o materijalu za ekstrakciju. Glavni nedostaci konvencionalne ekstrakcije su: duže vrijeme ekstrakcije, potrebna su otapala visoke čistoće i cijene, isparavanje velike količine otapala, niska selektivnost i toplinska razgradnja termolabilnih spojeva (de Castro i Garcia-Ayuso, 1998).

#### **2.2.1.2. Nekonvencionalni postupci ekstrakcije**

U posljednje vrijeme sve se više ispituju mogućnosti ekstrakcije primjenom drugih metoda kojima je cilj smanjenje upotrebe otapala pri ekstrakciji, skraćivanje vremena ekstrakcije te povećanje učinkovitosti izolacije ciljanih skupina bioaktivnih supstanci. Stoga je došlo do razvitka modernih nekonvencionalnih tehnika ekstrakcije: ekstrakcija superkritičnim tekućinama, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, visokim hidrostatskim tlakom te ultrazvukom, ekstrakcija pomoću hladne plazme i ubrzana ekstrakcija otapalima (Huie, 2002; Azmir i sur., 2013).

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE) je učinkovita tehnika za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala (Azmir i sur., 2013). Koristi se energija dobivena ultrazvukom, ultrazvučni valovi visokog intenziteta frekvencije od 20 do 100 kHz i visoke razine snage od 10 do 1000 W/cm<sup>2</sup> (Rostagno i Prado, 2013). Zbog velike snage uzrokuju mehanička oštećenja tkiva, ubrzavaju kemijske reakcije te povećavaju brzinu difuzije. Valovi prolazeći kroz tekući medij stvaraju izmjenični pritisak i ekspanzijske vrtloge, čime se stvara negativan tlak. Kad je tlak dovoljno nizak, dolazi do formiranja mjehurića koji se tijekom

slijedeće ekspanzije/kompresije vrtloga šire i skupljaju što nazivamo kavitacija. Implodacijom mjehurića stvaraju se mikropodručja s ekstremno visokom temperaturom i visokim tlakom. Primjena ultrazvuka pri ekstrakciji omogućuje bolje prodiranje otapala u stanični materijal i poboljšava prijenos mase (Hereg i sur., 2009). Smanjeno vrijeme ekstrakcije, utroška otapala i energije su prednosti ove tehnike (Chemat i sur., 2011).

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) je ekološki prihvatljiva tehnika koja se temelji na izravnom utjecaju mikrovalova na polarne spojeve (Barba i sur., 2016). Energija elektromagnetskih valova prevodi se u toplinu u materijalima koji posjeduju dielektrična svojstva. Takvi materijali sadrže električne dipole, molekule koje djelovanjem električnog polja polariziraju. Izlaganjem materijala brzo promjenjivom električnom polju dolazi do reorijentacije dipola što dovodi do gibanja molekula te oslobađanja topline uslijed međusobnog trenja (Lovrić, 2003). Poželjno je da otapalo za ekstrakciju ima visoku dielektričnu konstantu kako bi moglo dobro apsorbirati energiju mikrovalova. Osim vrste otapala, na učinkovitost mikrovalne ekstrakcije utječe niz parametara: vrijeme i temperatura ekstrakcije, snaga mikrovalova te veličina čestica i vlažnost materijala za ekstrakciju (Rostagno i Prado, 2013).

Prednosti korištenja mikrovalova pri ekstrakciji uključuju učinkovitije grijanje, brži prijenos energije odnosno brže zagrijavanje, manju termičku razgradnju, selektivno grijanje, manju količinu opreme, brži početak rada, povećan prinos ekstrakta i eliminaciju određenih procesnih koraka (Chemat i sur., 2011; Barba i sur., 2016). U usporedbi s klasičnom ekstrakcijom, najvažnija je prednost manji utrošak otapala i vremena ekstrakcije (Ganzler i sur., 1986).

Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (HPAE) smatra se ekološki prihvatljivom tehnikom za ekstrakciju bioaktivnih spojeva (Barba i sur., 2015). Metoda obrade visokim tlakom podrazumijeva tri parametra: temperaturu, tlak i vrijeme ekspozicije uzorka (Heinz i Buckow, 2009). Uzorak se podvrgava djelovanju tlaka od 100 do 1000 MPa, dok se temperatura procesa kreće od niže od 0 °C do više od 100 °C i vrijeme izloženosti traje od nekoliko sekundi do više od 20 minuta (Herceg i sur., 2009). Djelovanje visokog tlaka uzrokuje smanjenje volumena sustava na koji se tlak primjenjuje. Prema Le Chatelier-

Braunovom zakonu, djelovanje povišenog tlaka na zatvoreni sustav u stanju ravnoteže pospješiti će reakcije koje vode prema smanjenu volumena, a inhibirati reakcije koje vode povećanju volumena (Krešić i sur., 2011). Pritisak se brzo i ravnomjerno prenosi cijelim uzorkom neovisno o veličini i geometriji uzorka. Jednom postignuti željeni tlak može se održavati bez dodatnog dotoka energije što je vrlo učinkovito jer se na taj način smanjuje potrošnja energije (Barba i sur., 2015). Primjena visokog tlaka poboljšava permeabilnost stanica zbog teorije prijenosa mase, znači da što je hidrostatski tlak viši, više otapala ulazi u stanicu. Posljedica veće propusnosti membrane je veći prinos ekstrakta (Dörnenburg i Knorr, 1993; Toepfl i sur., 2006).

Mnoge su prednosti upotrebe ove tehnike u usporedbi s konvencionalnom ekstrakcijom, no najvažnije je spomenuti nižu temperaturu, kraće vrijeme ekstrakcije te veću uštedu energije (Lee i sur., 2010).

Ekstrakcija superkritičnim fluidom je ekološki prihvatljiva i energetski efikasna tehnika za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala (Modey i sur., 1996; Jokić i sur., 2011). Podrazumijeva ekstrakciju fluidom koji se nalazi u superkritičnom stanju što znači da je temperatura fluida iznad njegove kritične temperature ( $T_c$ ) i tlak iznad kritičnog tlaka ( $p_c$ ). Metoda je efikasna za izolaciju spojeva relativno male polarnosti, no za ekstrakciju polarnih spojeva mogu se koristiti polarnija otapala primjerice voda ili etanol (Skala i sur., 2002). Promjena tlaka i temperature omogućuju visoku selektivnost i jednostavno uklanjanje otapala iz ekstrakta te kontroliraju sposobnost otapanja superkritične tekućine (Jokić i sur., 2011).

Iako je ekstrakcija superkritičnim tekućinama nova tehnika koja zahtjeva visoke troškove ulaganja u opremu, ima brojne prednosti: nižu temperaturu, manju potrošnju energije i dobru kvalitetu ekstrakta zbog odsutnosti otapala (Norhuda i Jusoff, 2009; Jokić i sur., 2011). Superkritično otapalo zbog niske viskoznosti, manje površinske napetosti i bolje difuzije može lakše prodirati u materijal za ekstrakciju (Jokić i sur., 2011). Ekstrakcija superkritičnim  $CO_2$  se najčešće koristi i vrlo je atraktivna u prehrambenoj industriji zahvaljujući brojnim prednostima:  $CO_2$  nije toksičan, eksplozivan niti zapaljiv, ima GRAS status, jeftin je i uvijek dostupan te se lako odvaja od ekstrakta (Norhuda i Jusoff, 2009).

Ekstrakcija potpomognuta hladnom plazmom smatra se zelenom tehnikom gdje se primjenom niske energije može ekstrahirati viša stopa biološki aktivnih spojeva. Hladna plazma proizvodi se visokovoltaznim električnim pražnjenjem koje nastaje između dviju elektroda priključenih na vanjski izvor energije. Električno pražnjenje proizvedeno u vodi uzrokuje ubrzavanje elektrona koji imaju dovoljnu količinu energije da bi izazvali fizikalne i kemijske procese. Nastaje lavina elektrona (eng. „streamer“) koja putuje prema suprotno nabijenoj elektrodi. U trenutku kad dosegne elektrodu, u tekućini nastaju šok valovi, kavitacijski mjehurići te turbulencija. Prema toj teoriji, za razaranje strukture materijala odgovorni su lavina elektrona i nastanak plinovite faze. Točnije, šok valovi i eksplozija kavitacijskih mjehurića uzrokuju fragmentaciju materijala, a turbulencija povećanje prijenosa mase (Boussetta i Vorobiev, 2014).

Iako je ekstrakcija potpomognuta hladnom plazmom nova tehnika te je potrebno provesti brojna istraživanja utjecaja hladne plazme, dosadašnja istraživanja su dokazala brojne prednosti primjerice veći prinos i kvalitetu ekstrakta pri nižim temperaturama te kraće vrijeme ekstrakcije (Boussetta i Vorobiev, 2014; Herceg i sur., 2016).

Ubrzana ekstrakcija otapalima (ASE) je moderna tehnika ekstrakcije koja se provodi uz povišeni tlak i temperaturu kako bi se poboljšala učinkovitost ekstrakcije (Carabias-Martinez i sur., 2005). Primjenjuju se temperature od 50 do 200 °C i tlak do 20 MPa. Uzorak je smješten u ekstrakcijskoj ćeliji od nehrđajućeg čelika koja se puni otapalom za ekstrakciju, potom zagrijava te se na nju primjenjuje pritisak (Luthria i sur., 2004). Na ekstrakciju najviše utječu temperatura i vrsta otapala za ekstrakciju, dok je tlak važan za održavanje otapala u tekućoj fazi pri visokim temperaturama (Carabias-Martinez i sur., 2005). Povišenje temperature otapala rezultira smanjenjem viskoznosti čime je omogućeno bolje prodiranje u materijal koji se ekstrahira. Najčešće se kao otapala koriste voda, aceton, metanol ili heksan pri temperaturama 75 do 150 °C koji ostaju u tekućoj fazi pod pritiskom od 10,4 MPa (Luthria i sur., 2004). Glavne prednosti su smanjena potrošnja otapala i kraće vrijeme ekstrakcije (Benthin i sur., 1999).

## **2.3. SUŠENJE BILJNIH EKSTRAKATA**

Sušenje je proces konzerviranja namirnica temeljen na smanjenju aktivnosti vode. Sušenje hrane podrazumijeva uklanjanje vode iz namirnica pri čemu ona ostaje u čvrstom obliku, a sadržaj vode u proizvodu je niži od 10 %. No, kod instant proizvoda, sadržaj vode nakon sušenja iznosi 1-3 %. Glavni je cilj sušenja dobiti proizvod porozne strukture s dobrom sposobnošću rehidracije i dobro očuvanim senzorskim svojstvima (Herceg, 2009).

Sušenje se može provoditi dovođenjem topline i liofilizacijom. Načini sušenja dovođenjem topline su slijedeći: sušenje strujom toplog zraka, sušenje u dodiru s grijanom površinom te sušenje infracrvenim valovima i mikrovalovima. Sušenje strujom toplog zraka može se odvijati u komorama, tunelskim sušarama, u lebdećem sloju te raspršivanjem (Koprivnjak, 2014).

### **2.3.1. Sušenje raspršivanjem**

Sušenje raspršivanjem je metoda koja se najčešće koristi za sušenje namirnica, lijekova i ostalih tvari osjetljivih na toplinu. Koristi se kao metoda sušenja, ali i kao metoda enkapsulacije koja podrazumijeva hvatanje aktivne tvari unutar zaštitne stjenke, matriksa (I Ré, 1998). Zbog stvaranja zaštitne ovojnice prilikom enkapsuliranja, veća je stabilnost i održivost sastojaka hrane. Metoda se koristi radi zaštite bioaktivnih spojeva ili funkcionalnih komponenti hrane od svjetlosti, oksidacije ili temperature (Murugesan i Orsat, 2012; Elez Garofulić i sur., 2016) te je pogodna za maskiranje neugodnog okusa, kao što su gorčina i trpkost polifenola (Nedovic i sur., 2011). To je jedna od najčešće korištenih metoda enkapsulacije u prehrambenoj industriji zbog niskih operativnih troškova, visoke kvalitete, stabilnosti i brze topivosti kapsula, male veličine i kontinuiranog rada (Fang i Bhandari, 2010). Također, sušenje namirnica provodi se bez kontakta sa zagrijanom metalnom površinom, temperatura proizvoda relativno je niska u odnosu na temperaturu ulaznog zraka, gotov proizvod stabilan je pri rukovanju i transportu, a sam postupak je brz i ekonomičan te su mogući veliki kapaciteti proizvodnje (Lovrić, 2003).

Sušenje raspršivanjem bazira se na smanjivanju sadržaja i aktiviteta vode čime se osigurava mikrobiološka stabilnost proizvoda, smanjuje se rizik kemijske i biološke



degradacije, smanjuju se troškovi skladištenja i transporta te se dobije proizvod specifičnih svojstava (Gharsallaoui i sur., 2007).

Tekućina se raspršuje u struji vrućeg plina, a najčešće se koristi zrak ili rjeđe inertni plin kao što je dušik. Ovisno o karakteristikama sirovine i radnim uvjetima tijekom sušenja, sušenjem se dobije vrlo fini prah (10 – 50  $\mu\text{m}$ ) ili veće čestice (2 – 3 mm) (Gharsallaoui i sur., 2007). Sirovina za sušenje može biti otopina, suspenzija, disperzija ili emulzija, a osušeni proizvod može biti u obliku praha, granula ili aglomerata ovisno o fizikalno kemijskim karakteristikama sirovine, tipu sušionika i željenim svojstvima gotovog proizvoda (Michael, 1993).

Proces sušenja raspršivanjem podrazumijeva četiri osnovne faze: atomizaciju, kontakt, sušenje i separaciju. Tekućinu je potrebno koncentrirati prije unošenja u sušionik (Patel i sur., 2009).

Atomizacija ili raspršivanje najvažnija je faza gdje se stvaraju optimalni uvjeti za isparavanje. To je proces prevođenja otopine u kapljice optimalne veličine (Patel i sur., 2009). Za kvalitetu krajnjeg proizvoda vrlo je važna ujednačenost veličine kapljica te homogenost spreja (I Ré, 1998). Formiranjem sitnih kapljica iste veličine, stvara se maksimalna površina za prijenos topline između vrućeg zraka i tekućine, čime se povećava brzina prijenosa mase i topline, a time i brzina sušenja (Gharsallaoui i sur., 2007). Na primjer, prevelike kapljice ne bi se mogle dobro osušiti, dok bi se premale pregrijale i pregorjele. Da bi se dobio proizvod željenih karakteristika, potrebno je odabrati odgovarajući tip atomizatora (Patel i sur., 2009). Atomizator se bira ovisno o karakteristikama i viskoznosti tekućine koju sušimo i željenim karakteristikama gotovog proizvoda (Gharsallaoui i sur., 2007). Najčešće se koriste raspršivači sa sapnicama (mirujući ili rotirajući), rotirajući diskovi te dvostruki, centrifugalni i pneumatski raspršivači (Lovrić, 2003).

Zatim slijedi kontakt atomiziranih kapljica s vrućim zrakom u komori za sušenje (Patel i sur., 2009). Do kontakta kapljice s vrućim zrakom dolazi već pri atomizaciji i pokreće sušenje. Kapljice tekućine i vrući zrak mogu strujati istosmjerno, protusmjerno i kombinirano. Istosmjerni proces sušenja podrazumijeva raspršivanje tekućine u smjeru toka vrućeg zraka. Ulazna temperatura vrućeg zraka iznosi 150 – 220 °C i istovremeno se odvija isparavanje vlage, a dobiveni suhi proizvodi su izloženi blažim temperaturama 50 – 80 °C što manje dovodi do termalne degradacije proizvoda. Kod upotrebe protusmjernog procesa sušenja, tekućina se raspršuje u smjeru suprotnom od toka vrućeg zraka zbog čega je suhi proizvod

izložen višim temperaturama. Stoga se protusmjerni postupak ne preporuča za sušenje tvari jako osjetljivih na toplinu. No prednost je veća ekonomičnost, odnosno manja potrošnja energije (Gharsallaoui i sur., 2007). Kombinirani postupak pogodniji je za sušenje toplinski osjetljivih tvari jer se kapljice ne zadržavaju dugo u vrućoj zoni (Masters, 1985).

U početku sušenja dolazi do isparavanja vlage s površine kapljice konstantnom brzinom sušenja (Gharsallaoui i sur., 2007). To se odvija sve dok je dotok vode na površinu materijala takav da se održava konstantna temperatura na površini (Herceg, 2009). Stupanj difuzije vode iz unutrašnjosti kapljice prema površini je konstantan i jednak stupnju isparavanja vode s površine kapljice. Kad sadržaj vode u kapljici dosegne kritičnu vrijednost, formira se čvrsti površinski sloj kroz koji voda teško isparava i stupanj difuzije vode iz unutrašnjosti kapljice se smanjuje te slijedi nagli pad brzine sušenja. Teoretski je sušenje završeno u trenutku kad je temperatura čestice jednaka temperaturi zraka (Gharsallaoui i sur., 2007).

Sljedeća je faza odvajanje praškastog proizvoda od vlažnog zraka. Veće čestice praha padaju na dno komore za sušenje, dok se za izdvajanje sitnih čestica praha koriste cikloni. Za izdvajanje najsitnijih čestica praha koriste se vrećasti filtri, dok se za uklanjanje zaostalog praha koriste četke. Ovisno o sastavu kapljica, sadržaju vode i plina, izdvojene čestice praha mogu biti kompaktne ili šuplje (Gharsallaoui i sur., 2007).

Kritični parametri postupka sušenja koji utječu na fizikalno-kemijska svojstva prahova su: temperatura ulaznog zraka za sušenje, brzina raspršivanja, protok tekućine koja se suši, protok zraka (Gallo i sur., 2011) te vrsta i koncentracija nosača (Obón i sur., 2009).

### **2.3.2. Primjena nosača pri sušenju raspršivanjem**

Biljni ekstrakti u značajnoj mjeri sadrže organske kiseline, lipide i smole te u manjoj mjeri šećere koji mogu stvarati probleme tijekom sušenja. Zbog adhezivnih svojstava namirnice koju sušimo, dolazi do stvaranja aglomerata i lijepljenja za površine uređaja, što može dovesti do termalne razgradnje proizvoda, neispravnog rada uređaja za sušenje te niskog prinosa. Stoga se prije sušenja u otopinu ekstrakta dodaju nosači koji mogu poboljšati učinak sušenja i tehnološka svojstva gotovog proizvoda (Souza i Oliveira, 2006). Također, upotrebom nosača pri enkapsulaciji fenolnih spojeva, može se poboljšati stabilnost i održati bioaktivnost navedenih spojeva (Nedovic i sur., 2011).

Prije sušenja, nosač i aktivna tvar se pomiješaju i homogeniziraju (Gibbs i sur., 1999), a veličina okruglih čestica dobivenih sušenjem iznosi 10 – 100  $\mu\text{m}$  (Fang i Bhandari, 2010). Uvjeti koje bi trebali ispunjavati nosači koji se koriste pri sušenju raspršivanjem su: dobra topivost u vodi, niska viskoznost pri visokim koncentracijama, dobra emulgirajuća svojstva i sposobnost formiranja membrane oko aktivne tvari te visoka učinkovitost (I Ré, 1998). Nosači koji se koriste u prehrambenoj industriji moraju imati GRAS status („generally recognized as safe“ – „općenito prepoznatljiv kao neškodljiv“) te biti jestivi i biorazgradivi. Osim toga, najvažniji kriteriji za odabir materijala za enkapsulaciju, odnosno nosača, su: funkcionalnost konačnog proizvoda, koncentracija nosača, tip otpuštanja bioaktivnih spojeva, zahtjevi stabilnosti i ograničenje troškova. Mnogo je kriterija za odabir najpovoljnijeg nosača, ali na prvom mjestu je svakako odabir prema vrsti i karakteristikama aktivne tvari. U prehrambenoj industriji se najčešće koriste prirodni nosači, primjerice škrob i njegovi derivati, celuloza, biljne izlučevine i ekstrakti, proteini, lipidi (Nedovic i sur., 2011). Preciznije, najčešće se upotrebljavaju maltodekstrin, arapska guma te koloidni silicijev dioksid (Gallo i sur., 2011).

Maltodekstrini su topljivi hidrolizati škroba dekstroznog ekvivalenta manjeg od 20. Dekstrozni ekvivalent (DE) označava stupanj hidrolize molekule škroba (Madene i sur., 2006). Proizvode se djelomičnom kiselinskom ili enzimskom hidrolizom škroba kukuruza (Kenyon, 1995). Maltodekstrin je odličan izbor nosača zbog blagog okusa, niske viskoznosti pri visokim koncentracijama, dobrog omjera cijene i učinkovitosti (Apintanapong i Noomhorm, 2003). S druge strane, nedostaci upotrebe maltodekstrina su slaba emulgirajuća svojstva te mala mogućnost zadržavanja hlapljivih spojeva (Madene i sur., 2006). Koriste se maltodekstrini u obliku bijelog praha ili koncentrirane otopine (Kenyon, 1995).

Gume su najčešće blagog okusa ili ga nemaju, no mogu značajno utjecati na okus i aromu hrane. Arapska guma je prirodni nosač koji se proizvodi iz stabla akacije (Mahdavi i sur., 2016). Razgranate je strukture, sastavljena od jednostavnih šećera galaktoze, arabinoze, ramnoze i glukuronske kiseline gdje je proteinska komponenta kovalentno vezana na ugljikohidratni lanac. Struktura arapske gume odgovorna je za njena funkcionalna svojstva (McNamee i sur., 1998). Često se koristi kao nosač zbog dobre topljivosti, niske viskoznosti, dobrih emulgirajućih svojstava te dobre sposobnosti zadržavanja hlapljivih spojeva. Najveći nedostatak ovog nosača je cijena koja je viša od maltodekstrina i ponekad dostupnost materijala. Stoga se često koristi kombinacija maltodekstrina i arapske gume (Madene i sur., 2006).

### 2.3.3. Utjecaj vrste nosača i temperature na zadržavanje fenolnih spojeva

Nosač se bira ovisno o vrsti materijala koji se suši, a mora pružiti dobru zaštitu od vanjskih utjecaja te biti kompatibilan s enkapsuliranim materijalom. Važno je odabrati dobru kombinaciju nosača s ciljem postizanja što bolje stabilnosti praha i enkapsulacijskog kapaciteta. Također, ispravan odabir vrste i koncentracije nosača dobrog zaštitnog utjecaja može smanjiti utjecaj temperature sušenja na svojstva praha. Temperatura sušenja direktno je proporcionalna brzini sušenja i konačnom sadržaju vlage. Pri niskoj temperaturi ulaznog zraka nastaju kapsule visokog sadržaja vlage i slabe fluidnosti zbog niske razine isparavanja. Međutim, pri visokim temperaturama sušenja dolazi do pretjeranog isparavanja vlage što rezultira pukotinama u membrani te dolazi do preranog otpuštanja i degradacije enkapsuliranih sastojaka. Prema tome, optimalna temperatura sušenja je ona kod koje ne dolazi do oštećenja proizvoda (Gharsallaoui i sur., 2007). Kako bi se odredio utjecaj raznih parametara sušenja na svojstva prahova biljnih ekstrakata, provedena su brojna znanstvena istraživanja.

Sušenje raspršivanjem najčešće je korištena metoda za enkapsulaciju antocijana. Čak 80 – 90 % enkapsulacija antocijana provodilo se metodom sušenja raspršivanjem (Mahdavi i sur., 2014). Da se stabilnost proizvoda poboljšava sušenjem raspršivanjem, dokazuje istraživanje Zhanga i sur. (2007). Upotrebom mješavine maltodekstrina (60 %) i arapske gume (40 %) za enkapsulaciju procijanidina iz sjemenki grožđa, postignuta učinkovitost enkapsulacije iznosila je 88,84 %. Također, upotreba kombinacije maltodekstrina i arapske gume kao nosača pokazala se najboljom za zaštitu antocijana u ekstraktima grožđa sorte Cabernet Sauvignon (Burin i sur., 2011).

Upotrebom visoke koncentracije nosača postiže se bolja stabilnost praškastog proizvoda nižeg sadržaja vlage i manje higroskopsnosti (Obón i sur., 2009). Maltodekstrini s višim DE pokazuju bolja svojstva zadržavanja antocijana jer stvaraju gušće membrane i bolje štite unutarnju fazu od oksidacije (Ferrari i sur., 2012). To dokazuje istraživanje Morena i sur. (2016) na ekstraktima komine grožđa. Dodatkom maltodekstrina DE 18 dobiven je prah s najvišim sadržajem ukupnih fenola. Također, najviša koncentracija ukupnih fenola dobivena je upotrebom nosača i ekstrakta u omjeru 0,1:1 (0,1 gram nosača na 1 gram suhog ekstrakta). Utjecaj dekstroznog ekvivalenta maltodekstrina (DE 6, 19, 21 i 33) na svojstva praha, odnosno utjecaj na enkapsulaciju antocijana ekstrakta plodova biljke *Garcinia indica*, ispitalo je istraživanje Nayak i Rastogi (2010). Kombinacijom 5% maltodekstrina DE 21,

0,25 % arapske gume i 0,25 % kalcijevog fosfata, na temperaturi 150 °C proizveden je prah najboljih svojstava, odnosno s najviše enkapsuliranih antocijana. Istraživanje Vidović i sur. (2014) proučavalo je utjecaj različitih koncentracija maltodekstrina od 10, 30 i 50 % na sušenje tekućeg ekstrakta biljke vrisak (*Satureja montana* L.). Pratili su iskorištenje postupka sušenja, senzorska svojstva, sadržaj bioaktivnih spojeva te fizikalno-kemijska svojstva praha. Najbolja fizikalno-kemijska svojstva određena su u prahovima dobivenim dodatkom 50 %-tne koncentracije maltodekstrina, dok je najveći sadržaj bioaktivnih komponenti određen u prahovima dobivenim pomoću koncentracije maltodekstrina od 10 %.

Fenoli ekstrakta komine masline sušeni su raspršivanjem. Proučavan je utjecaj koncentracije maltodekstrina (100 i 500 g/L), temperature (130 i 160 °C) te protok ulaznog materijala (5 i 10 mL/min) na svojstva praha. 94 % fenola ekstrakta zadržano je u prahu pri nižoj temperaturi sušenja i koncentraciji maltodekstrina te većem protoku (Paini i sur., 2015). Istraživanje Ferrari i sur. (2012) ispitalo je utjecaj temperature sušenja (140-180 °C) te koncentracije maltodekstrina (5-25 %) na fizikalno-kemijska svojstva i zadržavanje antocijana u prahu ekstrakta kupine. Postotak zadržanih antocijana u prahu kretao se od 69 do 80 %, a najveći postotak zadržanih antocijana određen je u prahovima proizvedenim s 5 i 25% maltodekstrina. Više temperature sušenja uzrokovale su veći gubitak antocijana. Također, istraživanje Georgetti i sur. (2008) u kojem se ispitivao utjecaj tri vrste nosača (silicijevog dioksida, maltodekstrina i škroba) te tri temperature 80, 115 i 150 °C na svojstva praha proizvedenog sušenjem ekstrakta soje raspršivanjem, pokazalo je da povišenje temperature utječe na pad koncentracije ukupnih fenola praha. U ovom istraživanju silicijev dioksid je pokazao najbolja svojstva nosača.

Utjecaj kombinacije arapske gume, maltodekstrina i proteina soje u različitim omjerima te utjecaj temperature ulaznog zraka (120, 160, 180, 210 °C) na enkapsulacijski učinak prilikom sušenja biljke *Ginkgo biloba* proučavani su u istraživanju Haidonga i sur. (2012). Povišenje temperature do 180 °C pozitivno je utjecalo na učinkovitost enkapsulacije te omjer jezgre, arapske gume, maltodekstrina i proteina soje 6,1:2,87:11,75:4,28. Sušenje ekstrakta klinčića pri omjeru ekstrakta, maltodekstrina i arapske gume 1:4,8:2,4 i temperaturi ulaznog zraka 150 °C, proizveden je prah s najvišom učinkovitosti enkapsulacije, 65 % (Chatterjee i Bhattacharjee, 2013). U istraživanju Toluna i sur. (2016) na prahovima ekstrakta komine grožđa, najveći iznos fenolnih spojeva određen je pri omjeru MD i AG 8:2. Smatra se da dodatak arapske gume povećava stabilnost fenolnih spojeva pružajući bolju zaštitu pri višim temperaturama. Pretpostavlja se da je to posljedica dobrih svojstava arapske gume koja

omogućuju stvaranje mreže s maltodekstrinom te se na taj način štite fenoli od toplinske degradacije.

Prema istraživanju Mahdavi i sur. (2016), najveća učinkovitost procesa i kvaliteta praha postignute su dodatkom maltodekstrina (DE 18-20) i arapske gume u ekstrakt ploda žutike prije sušenja raspršivanjem, dok se omjer jezgre i nosača 25 % odnosno 1/4 pokazao najoptimalnijim za očuvanje antocijana. Visoka učinkovitost maltodekstrina i arapske gume može se objasniti njihovom strukturom. Arapska guma je razgranate strukture (heteropolimer šećera) gdje je mala količina proteina vezana kovalentno na ugljikohidratni lanac što omogućuje bolje „hvatanje“ molekula unutarnje faze. Na taj način povećava se stabilnost antocijana jer se smanji osjetljivost flavijevog kationa antocijana na nukleofilni napad molekule vode.

Za razliku od navedenih istraživanja, Constanza i sur. (2012) dobili su drugačije rezultate. Istražujući utjecaj dodatka maltodekstrina pri sušenju na ekstrakte kože kikirikija, pri konstantnoj temperaturi ulaznog zraka 160 °C i izlaznog 90 °C, zaključili su da najvišu koncentraciju ukupnih polifenola pokazuju prahovi dobiveni sušenjem raspršivanjem bez dodatka nosača maltodekstrina. Zbog utjecaja topline tijekom sušenja došlo je do gubitka 26,8 % ukupnih fenola, a dodatkom maltodekstrina je gubitak ukupnih fenola iznosio 45,1 %. Smatraju da je razlog tome što kožica kikirikija prvenstveno sadrži procijanidine, dok u ostalim istraživanjima uzorci najčešće sadrže antocijane.

Dodatkom nosača maltodekstrina DE 20-21 u etanolni ekstrakt crne mrkve, proizveden je prah s najvišom koncentracijom antocijana. No temperature ulaznog zraka više od 160 – 180 °C uzrokovale su značajan gubitak antocijana. S druge strane, upotrebom maltodekstrina DE 10, temperatura nije imala značajan utjecaj na gubitak antocijana (Ersus i Yurdagel, 2007). Povišenje temperature ulaznog zraka pri sušenju raspršivanjem acai voća dovelo je do većeg gubitka antocijana zbog osjetljivosti pigmenata na visoke temperature. U istraživanju je korišten maltodekstrin DE 10 (Tonon i sur., 2008). Također, više temperature ulaznog zraka uzrokovale su degradaciju antocijana pri sušenju ekstrakta šipka (Vardin i Yasar, 2012).

U istraživanju Ramírez i sur. (2015) na modelu voćnog soka korištena je kombinacija maltodekstrina DE 20 i arapske gume. Optimalni uvjeti sušenja raspršivanjem pri kojoj je očuvana najveća koncentracija galne kiseline u voćnom soku, su sljedeći: koncentracija nosača 10-20 %, omjer nosača 50-80 %, temperatura ulaznog zraka 85-105 °C te protok zraka

80-120 mL/h. Najbolja svojstva čestica praha dobivenog sušenjem ekstrakta kumine grožđa, dobivena su upotrebom maltodekstrina DE 4-7 i arapske gume u omjeru 8:2 i pri temperaturi ulaznog zraka 140 °C te omjerom jezgre i nosača 1:1. Sadržaj ukupnih fenola smanjio se pri temperaturi ulaznog zraka 160 °C, no pri 180 °C se povisio sadržaj ukupnih fenola. Smatra se da je razlog polimerizacija polifenola na visokim temperaturama. Upotreba maltodekstrina DE 4-7 i DE 17-20 dovela je do smanjenja sadržaja fenolnih spojeva na površini, s povećanjem omjera jezgre i nosača. Sadržaj površinskih polifenola u izravnom je odnosu s učinkovitošću mikrokapsula proizvedenih pri optimalnim uvjetima (temperatura 140 °C, omjer maltodekstrina DE 4-7 i arapske gume 8:2). Također je uočena povezanost pada koncentracije površinskih polifenola s povišenjem temperature, zbog toplinske degradacije (Tolun i sur., 2016). U istraživanju Elez Garofulić i sur. (2017) ispitivan je utjecaj temperature, vrste nosača te omjera nosača i suhe tvari na zadržavanje fenolnih kiselina, antocijana i flavonol glikozida prilikom sušenja soka višnje maraske. Upotrebom nosača maltodekstrina DE 13-17 pri omjeru 3:1 i temperaturi sušenja 200 °C postignuto je najbolje zadržavanje antocijana i fenolnih kiselina, dok je najviše flavonol glikozida zadržano upotrebom arapske gume u omjeru 2:1 te pri temperaturi sušenja 180 °C.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**



### **3.1. MATERIJALI**

#### **3.1.1. Uzorak cvijeta trnine**

Za istraživanje je korišten prirodno osušeni uzorak cvijeta trnine (*Pruni spinosi flos*) od proizvođača Suban d.o.o. Cvijet trnine sakupljen je na području Hrvatske te je nakon sušenja zapakiran i čuvan na suhom i tamnom mjestu. Rok trajanja proizvoda je do 30. lipnja 2018. godine, a broj serije je 63453. Uzorci cvijeta trnine samljeveni su pomoću električnog mlinca (Imetec Dolcevita, Italija) u sitni prah neposredno prije provođenja analize.

#### **3.1.2. Kemikalije**

- Deionizirana voda
- Dijatomejska zemlja
- Maltodekstrin DE 13-17 (Sigma Aldrich, SAD)
- Arapska guma (Acros Organics, Belgija)
- Kvarcni pijesak, sitno zrnat (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

#### **Kemikalije za ekstrakciju fenolnih spojeva**

- Destilirana voda
- Etanol, 96%-tni, p.a. (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Octena kiselina, 99,5%-tna, p.a. (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Metanol, 100%-tni (Avantor Performance Materials, Norveška)

#### **Reagensi za određivanje fenolnih spojeva**

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.

- Standard galne kiseline

Priprema: Odvaže se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96%-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

### 3.1.3. Aparatura i pribor

*Aparatura:*

- Električni mlinac (Imetec Dolcevit, Italija)
- Analitička vaga (Ohaus, SAD)
- Uređaj za ubrzanu ekstrakciju otapalom (Dionex ASE 350, Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)
- Uređaj za sušenje raspršivanjem (LabPlant, SD 06, Velika Britanija)
- Magnetska miješalica (HSC Ceramic Hot Top-Plate Stirrer, Velp, Italija)
- Laboratorijski sušionik (Instrumentaria ST – 01/02, Zagreb, Hrvatska)
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker, IKA, SAD)
- Centrifuga (ROTOFIX 32, Hettich Zentrifugen, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (Büchi Heating Bath B-490, Švicarska)
- Laboratorijski eksikator
- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, Kina)

*Pribor:*

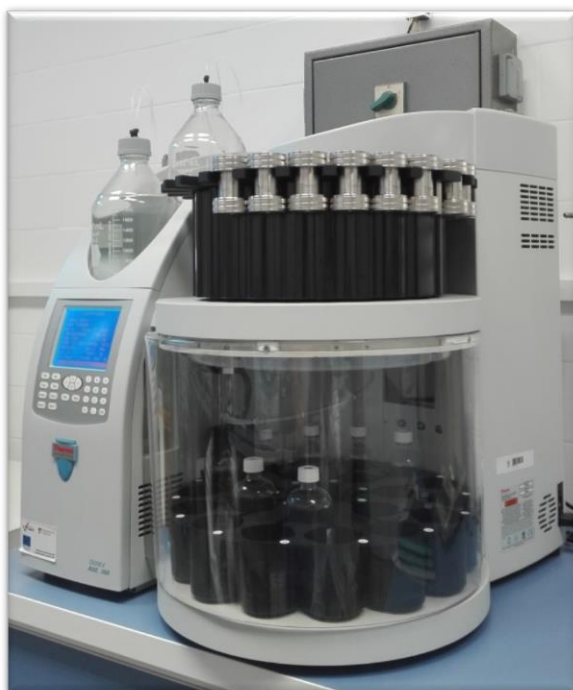
- Plastična lađica za vaganje
- Stakleni štapići
- Falcon plastične kivete, volumena 50 mL
- Pipete, volumena 10 mL i 50 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 100 mL
- Stakleni lijevci, filter papir
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Staklene čaše, volumena 100 mL i 250 mL

- Mikropipete, volumena 100  $\mu\text{L}$ , 250  $\mu\text{L}$  i 1000  $\mu\text{L}$
- Staklene kivete
- Aluminijski lončići

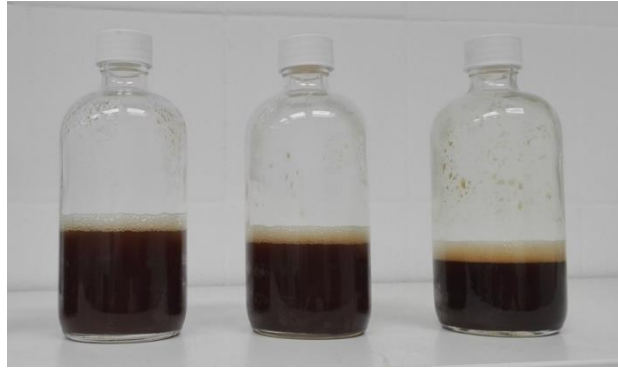
## 3.2. METODE

### 3.2.1. Ubrzana ekstrakcija otapalom pri povišenom tlaku (Accelerated Solvent Extraction, ASE)

U plastičnu lađicu za vaganje odvažuje se 6 g uzorka samljevenog osušenog cvijeta trnine i 1,5 g dijatomejske zemlje te se sve dobro promiješa. U ekstrakcijsku ćeliju od nehrđajućeg čelika postavi se filter papir, a potom se kroz lijevak doda promiješani uzorak trnine i dijatomejske zemlje te se ćelija ručno zatvori. Pripremljene ćelije s uzorcima stave se na uređaj ASE DIONEX 350 (slika 6) te se pripremi odzračena destilirana voda koja služi kao otapalo. Zatim se podese ekstrakcijski parametri tako da se svaki uzorak ekstrahira u tri ciklusa po 5 minuta pri 100 °C i tlaku od 10 MPa. Nakon završene ekstrakcije, ekstrakti (slika 7) se skupe u bočice te čuvaju u zamrzivaču do daljnje upotrebe.



**Slika 6.** Uređaj za ubrzanu ekstrakciju otapalom (vlastita fotografija)



**Slika 7.** Ekstrakti cvijeta trnine dobiveni ekstrakcijom na ASE uređaju (vlastita fotografija)

### **3.2.2. Proizvodnja praha ekstrakta cvijeta trnine primjenom sušenja raspršivanjem**

Postupak sušenja raspršivanjem proveden je u uređaju za sušenje raspršivanjem SD 06 (LabPlant, Velika Britanija) (slika 8) sa specifikacijama navedenim u tablici 1.



**Slika 8.** Sušionik prije početka i tijekom sušenja (vlastita fotografija)

**Tablica 1.** Specifikacije sušionika s raspršivanjem SD 06

<b>Raspršivač</b>	Promjer mlaznice 1 mm, istosmjerni
<b>Kapacitet sušenja</b>	1000-1500 ml/h
<b>Temperaturni raspon</b>	50-250 °C
<b>Protok zraka</b>	15-30 m <sup>3</sup> /h
<b>Kompresor</b>	2 m <sup>3</sup> /h pri 2 bara – 1.7 m <sup>3</sup> /h pri 4 bar
<b>Grijač</b>	3kW
<b>Pumpa</b>	Peristaltička, podesive brzine
<b>Igla za deblokiranje mlaznica</b>	Automatska, 3 brzine
<b>Dimenzije</b>	1110 x 825 x 600mm
<b>Težina</b>	80 kg

Cilj istraživanja bio je odrediti optimalne uvjete pri kojima će se postići najbolje zadržavanje fenolnih spojeva u prahovima. Prema centralno kompozitnom dizajnu pokusa navedenom u tablici 2, proizvedeno je 16 prahova pri čemu se ispitivao utjecaj različitih omjera nosača i suhe tvari (0,7-2), udjela arapske gume (0,2-0,8) te različitih temperatura ulaznog zraka (120-180 °C). Parametri koji su tijekom procesa sušenja bili konstantni su: protok zraka 3,5 m/s, srednja brzina deblokiranja mlaznice, temperatura izlaznog zraka u rasponu od 60-80 °C te protok ulaznog materijala 485 mL/h.

**Tablica 2.** Plan pokusa sušenja ekstrakta cvijeta trnine raspršivanjem primjenom različitog omjera nosača i suhe tvari, udjela arapske gume te primjenom različitih temperatura

Pokus br.	Omjer nosača i suhe tvari ekstrakta	Maseni udio arapske gume u nosaču	Temperatura (°C)
1	2,00	0,20	120
2	2,00	0,80	180
3	0,70	0,20	180
4	0,26	0,50	150
5	1,35	1,00	150
6	2,00	0,20	180
7	1,35	0,50	150
8	1,35	0,00	150
9	0,70	0,20	120
10	2,00	0,80	120
11	1,35	0,50	150
12	0,70	0,80	180
13	0,70	0,80	120
14	1,35	0,50	200
15	1,35	0,50	100
16	2,44	0,50	150

Za proizvodnju prahova korištene su dvije vrste nosača u različitim omjerima, maltodekstrin 13-17 DE i arapska guma. Na temelju suhe tvari ekstrakta trnine (5,53 %) određena je potrebna masa nosača. Neposredno prije procesa sušenja, ekstrakt trnine promiješan je s nosačem na magnetskoj miješalici pri 50 °C kako bi uzorak za raspršivanje bio što homogeniji odnosno kako bi se nosač otopio i ravnomjerno raspodijelio. Nakon provedenog procesa sušenja, proizvedeni prahovi skladišteni su u hermetički zatvorenim Falcon plastičnim kivetama sve do provođenja daljnjih analiza.

### 3.2.3. Fizikalno-kemijska metoda analize prahova ekstrakta cvijeta trnine

#### 3.2.3.1. Sadržaj suhe tvari (%)

Sadržaj suhe tvari (%) prahova ekstrakta cvijeta trnine određen je sušenjem u sušioniku na 105 °C do konstantne mase (AOAC, 1984).

U osušenu i izvaganu aluminijsku posudicu s poklopcem stavi se oko 1 g kvarcnog pijeska i stakleni štapić te se suši u sušioniku pri 105 °C oko dva sata sa skinutim poklopcem. Nakon sušenja posudica se zatvori poklopcem te hladi u eksikatoru, a zatim se izvaže s točnošću ±0,0002 g. U ohlađenu i izvaganu posudicu s pijeskom stavi se oko 1 g pripremljenog uzorka i dobro izmiješa pomoću staklenog štapića. Sve zajedno se važe s točnošću od ±0,0002 g. Aluminijska posudica s pijeskom i ispitivanom količinom uzorka stavi se u laboratorijski sušionik, prethodno zagrijan na 105 °C ± 0,5 °C te se zagrijava jedan sat s otklopljenim poklopcem. Nakon hlađenja i vaganja sušenje se nastavlja toliko dugo dok razlika između dva uzastopna sušenja, u razmaku od pola sata, ne bude manja od 0,001 g. Važe se ponovno s točnošću ± 0,0002g.

Sadržaj suhe tvari (STV) izračuna se prema slijedećoj formuli:

$$\text{Sadržaj suhe tvari (\%)} = \left( \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \right) * 100 \quad (1)$$

gdje je:

$m_0$  – masa posudice i pomoćnog materijala (pijesak, stakleni štapić, poklopac) (g),

$m_1$  – masa posudice s ispitivanim uzorkom prije sušenja (g),

$m_2$  – masa posudice s ostatkom nakon sušenja (g).

### **3.2.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz prahova ekstrakta cvijeta trnine**

#### **3.2.4.1. Ekstrakcija ukupnih fenolnih spojeva (UF)**

U staklenu epruvetu odvaže se 500 mg praha te se doda 5 mL otapala etanol:octena kiselina:voda (50:8:42, v/v/v). Staklenim štapićem dobro se usitni uzorak u otapalu kako bi se razbila membrana mikrokapsula te se 1 minutu promiješa na Vortex miješalici. Slijedi ekstrakcija od 20 minuta na ultrazvučnoj kupelji, pri sobnoj temperaturi. Ekstrakt se zatim centrifugira na 3000 okretaja u trajanju od 10 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant se profiltrira kroz obični filter papir i prebaci u čistu Falcon kivetu. Pripremljeni ekstrakti koriste se za spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva metodom po Folin-Ciocalteu (Saézn i sur., 2009).

### 3.2.4.2. Ekstrakcija površinskih fenolnih spojeva (PF)

U staklenu epruvetu odvažuje se 500 mg praha, doda se 5 mL otapala etanol:metanol (50:50, v/v) te se smjesa promiješa 1 minutu na Vortex miješalici. Zatim se profiltrira kroz obični filter papir i prebaci u čistu Falcon kivetu. Pripremljeni ekstrakti koriste se za spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva metodom po Folin-Ciocalteu (Saénz i sur., 2009).

### 3.2.4.3. Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva

*Princip metode:*

Određivanje ukupnih fenola provodi se u etanolnom/metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na obojenoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm (Shortle i sur., 2014).

*Razrjeđenja:*

Za određivanje ukupnih fenola, uzorci su razrijeđeni od 20 do 50 puta, ovisno o koncentraciji. Za određivanje površinskih fenola, uzorci su razrijeđeni od 5 do 20 puta, također ovisno o koncentraciji.

*Postupak određivanja:*

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100  $\mu$ L ekstrakta fenolnih spojeva, 200  $\mu$ L Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri  $T=50$  °C (u kupelji od rotavapora). Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

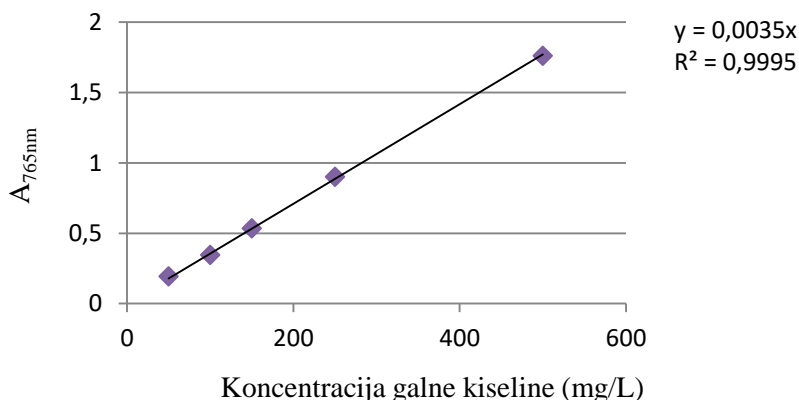
*Izrada baždarnog pravca:*

Za pripremu baždarnog pravca odvažuje se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerneji tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.



Od te otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100  $\mu$ L otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200  $\mu$ L Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostiraju 25 minuta pri  $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$  (u kupelji od rotavapora). Za slijepu probu uzima se 100  $\mu$ L destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija, nacrtana se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisu nanosene koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



**Slika 9.** Jednadžba pravca za izračunavanje koncentracije ukupnih i površinskih fenola

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0035 * X \quad (2)$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm,

X – koncentracija galne kiseline (mg/L).

Dobivene masene koncentracije (mg GAE/L) ukupnih i površinskih fenola prvo su preračunate na masu praha, a zatim su na temelju suhe tvari ekstrakta cvijeta trnine (5,53 %) preračunate na masu suhe tvari ekstrakta (mg GAE/g s. tv. e.).

#### **3.2.4.4. Izračunavanje enkapsulacijskog kapaciteta**

Enkapsulacijski kapacitet računa se prema formuli (Saikia i sur., 2015):

$$\% EK = \frac{UF - PF}{UF} * 100 \quad (3)$$

gdje je:

EK – enkapsulacijski kapacitet (%),

UF – ukupni fenoli (mg/g),

PF – površinski fenoli (mg/g).

#### **3.2.5. Eksperimentalni dizajn i statistička obrada podataka**

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 11.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD).

Da bi se utvrdio utjecaj omjera dodanog nosača prema suhoj tvari ekstrakta, udjela arapske gume u dodanom nosaču te temperature ulaznog zraka pri sušenju raspršivanjem na zadržavanje fenolnih spojeva praha ekstrakta cvijeta trnine s ciljem optimiranja procesa sušenja raspršivanjem, korišten je centralni kompozitni dizajn na tri razine.

Centralno-kompozitni dizajn (CCD) se sastoji od tri dijela: puni  $2^k$  faktorijalni dizajn (dizajn prvog reda), osni dio sastavljen od  $2k$  broja točaka smještenih tako da su dvije točke položene na osima kontrolnih varijabli na istoj udaljenosti  $\alpha$  od centra te od centralne točke i replikacije u istoj (Khuri i Mukhopadhyay, 2010).

Utvrđene su gornje i donje granice ispitivanih parametara kako slijedi: omjer nosača i suhe tvari ekstrakta od 0,7 do 2, udio arapske gume od 0,2 do 0,8 te temperatura od 120 do 180 °C. Svaki od tri ispitivana parametra promatran je na tri razine, nižoj (-1), središnjoj (0) i višoj (1) što je ukupno 16 pokusa uključujući faktorske, aksijalne i centralnu točku s dva ponavljanja (Tablica 2). Kao ovisne varijable promatrani su slijedeći parametri: ukupni fenoli, površinski fenoli, enkapsulacijski kapacitet te sadržaj suhe tvari.

Za analizu i statističku obradu dobivenih podataka korištena je metodologija odzivnih površina – RSM (Response Surface Methodology). Regresijski model za svaku promatranu ovisnu varijablu izračunat je prema slijedećoj formuli:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=j}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (4)$$

gdje je:

Y- predviđeni rezultat odnosno vrijednost ovisne varijable,

$\beta_0$  - fiksni koeficijent a  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  i  $\beta_{ij}$  linearni, kvadratni i koeficijent interakcije,

$X_i...X_j$  - vrijednost neovisne, kontrolirane varijable.

Da bi se utvrdila signifikantnost utjecaja pojedinih varijabli te postojanje razlike među provedenim uvjetima sušenja korištena je analiza varijance (ANOVA). Valjanost cijelog kvadratnog empirijskog modela za predviđanje pojedine ovisne varijable ispitana je metodom analize varijance na 95%-tnoj razini vjerojatnosti.

Prilikom optimizacije parametara sušenja raspršivanjem postavljene su preferencije za tri ovisne varijable koje su procijenjene najznačajnijim za kvalitetu gotovog praha: sadržaj ukupnih i površinskih fenola, enkapsulacijski kapacitet te sadržaj suhe tvari. Tako je za sadržaj ukupnih fenola, enkapsulacijski kapacitet te za sadržaj suhe tvari postavljena visoka preferencija (1,0), a za sadržaj površinskih fenola niska (0,0). Svaki od ulaznih parametara je promatran u maksimalnom broju od 100 koraka radi preciznije optimizacije.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Tekući ekstrakt cvijeta trnine podvrgnut je postupku sušenja raspršivanjem pri čemu je proizvedeno 16 prahova prema centralno kompozitnom dizajnu pokusa.

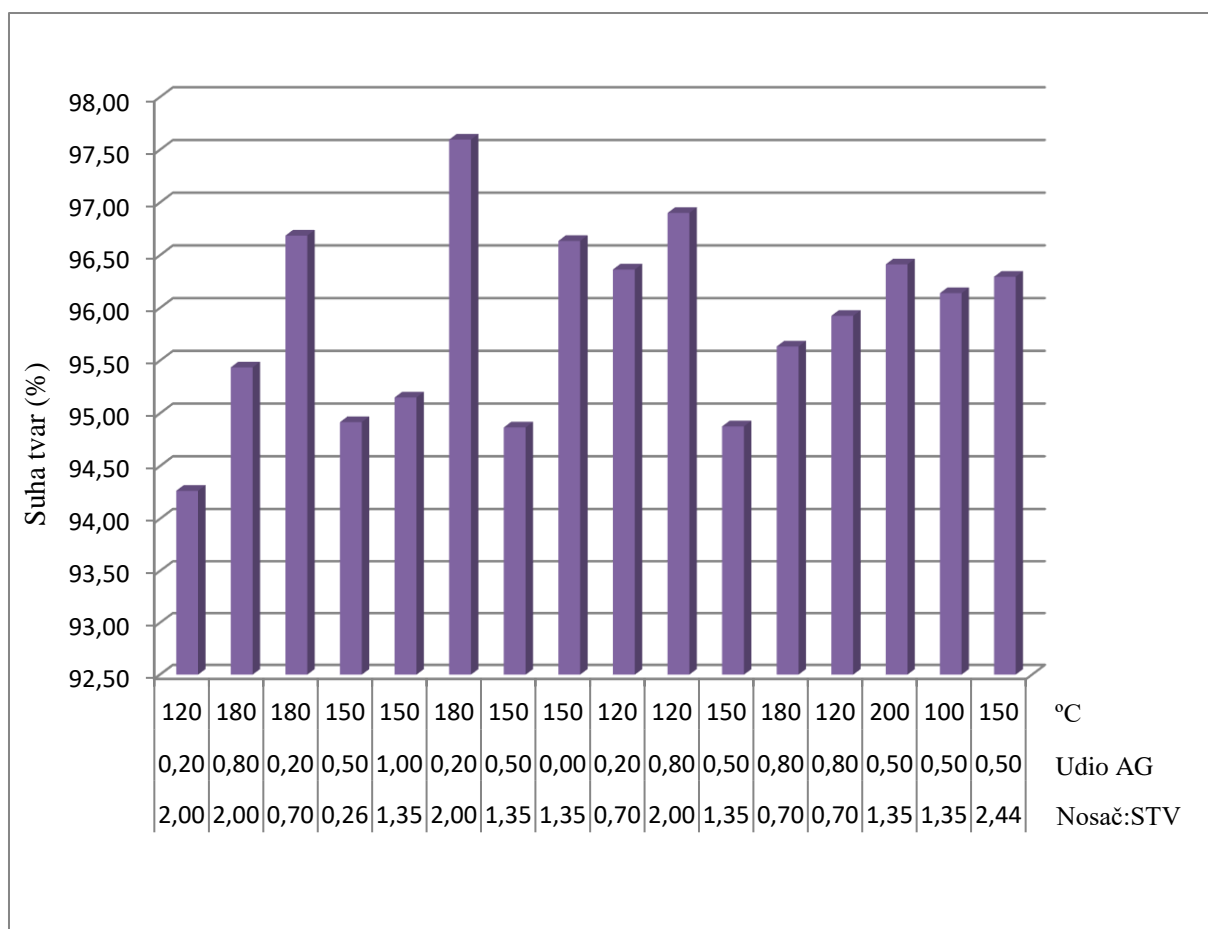
U ovom poglavlju prikazani su rezultati utjecaja uvjeta sušenja na sadržaj suhe tvari i zadržavanje fenolnih spojeva, odnosno na koncentraciju ukupnih i površinskih fenola te enkapsulacijski kapacitet u prahovima ekstrakta cvijeta trnine dobivene sušenjem raspršivanjem. Navedeni parametri prikazani su na slikama 10-13, a proučavani uvjeti sušenja raspršivanjem (temperatura, udio arapske gume te omjer nosača i suhe tvari ekstrakta), prikazani su u legendi apscise na slikama 10-13. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja.

Da bi se utvrdio utjecaj uvjeta sušenja na pojedini parametar pri sušenju raspršivanjem ekstrakta cvijeta trnine, s ciljem optimiranja procesa sušenja raspršivanjem, korišten je centralni kompozitni dizajn na tri razine. Rezultati su statistički obrađeni programskim sustavom Statistica 11.0, metodologijom odzivnih površina – RSM. Analiza varijance (ANOVA) korištena je kako bi se utvrdila signifikantnost utjecaja pojedinih varijabli sušenja raspršivanjem na promatrane parametre, a rezultati analize varijance prikazani su u tablici 3. U svrhu predviđanja promatranih parametara, u tablici 4 prikazane su jednadžbe regresijskih modela.

Cilj istraživanja bio je optimizirati uvjete sušenja raspršivanjem koji će rezultirati prahom s visokim sadržajem suhe tvari, visokom koncentracijom ukupnih fenola i enkapsulacijskim kapacitetom te niskom koncentracijom površinskih fenola. Optimalni uvjeti sušenja i predviđene vrijednosti ispitivanih parametara navedene su u tablici 5.

#### **4.1. Utjecaj parametara sušenja na sadržaj suhe tvari u prahovima ekstrakta cvijeta trnine**

Rezultati utjecaja parametara sušenja (temperatura, udio arapske gume te omjer nosača i suhe tvari ekstrakta cvijeta trnine) na sadržaj suhe tvari u prahovima dobivenim sušenjem raspršivanjem prikazani su grafički na slici 10.



**Slika 10.** Utjecaj parametara sušenja na sadržaj suhe tvari u prahovima ekstrakta cvijeta trnine; AG – arapska guma, STV – suha tvar

Sadržaj vlage, odnosno suhe tvari, važno je svojstvo praha proizvedenog sušenjem raspršivanjem jer određuje da li je potrebno prah podvrgnuti dodatnim procesima sušenja (Jangam i Thorat, 2010). Osim toga, visok sadržaj suhe tvari bitan je za stabilnost i skladištenje prahova (Mahdavi i sur., 2014). Najviša vrijednost suhe tvari određena je u prahu dobivenom sušenjem na temperaturi 180 °C, s omjerom nosača i suhe tvari 2:1 te malim udjelom arapske gume 0,2. Najniža vrijednost suhe tvari određena je u prahu kod kojeg su dva parametra, omjer nosača i suhe tvari te udio arapske gume, jednaki kao kod praha s najvišom vrijednošću suhe tvari, a razlika je u temperaturi koja je u ovom slučaju niža te iznosi 120 °C. Iz toga možemo zaključiti da je sadržaj suhe tvari bio viši pri višim temperaturama sušenja, što potvrđuju druga istraživanja (Ferrari i sur., 2012; Jangam i Thorat, 2010; Tonon i sur., 2008). Pri višim temperaturama ulaznog zraka, veći je temperaturni gradijent između atomiziranog uzorka i vrućeg zraka za sušenje koji omogućuje veću snagu za isparavanje

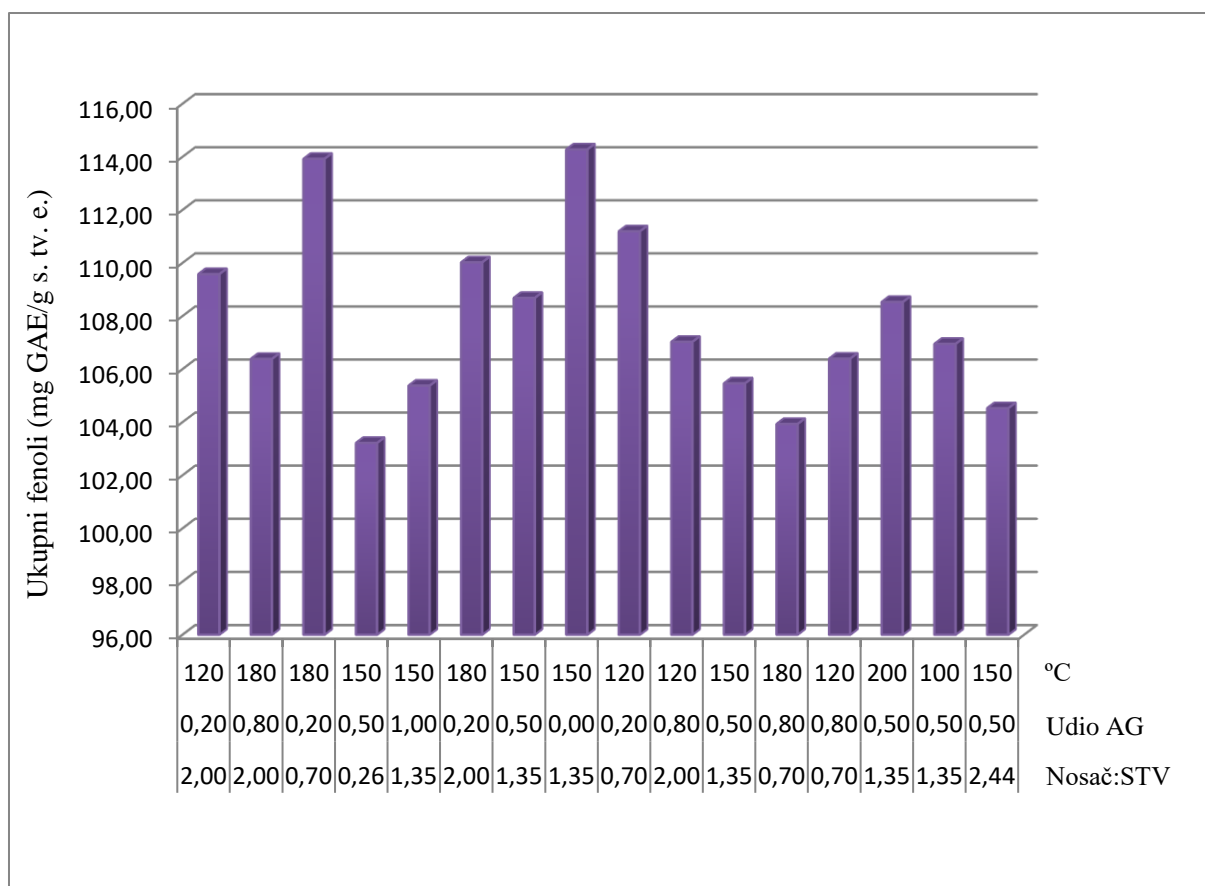
vode te se samim tim proizvode prahovi s nižim sadržajem vlage (Tonon i sur., 2008). Općenito, prema rezultatima prikazanim na slici 10 možemo zaključiti da na sadržaj suhe tvari u prahovima najveći utjecaj ima temperatura dok je dodatak arapske gume pokazao pozitivan utjecaj na sadržaj suhe tvari u prahovima samo u niskim udjelima, do 0,2.

Usporedbom suhe tvari prahova osušenih na temperaturi 150 °C, s udjelom AG 0,5, a različitog omjera nosača i suhe tvari ekstrakta (0,26 i 1,35) možemo zaključiti da omjer nosača i suhe tvari ekstrakta nije značajno utjecao na suhu tvar praha jer je ona u navedenim uzorcima bila podjednaka, 94,92 % i 94,88 %. Za razliku od ovih rezultata, istraživanje Krishnaiah i sur. (2012) pokazalo je drugačije. Proučavan je utjecaj sušenja raspršivanjem na svojstva prahova dobivenih sušenjem ekstrakta biljke *Morinda citrifolia* L. uz dodatak nosača karagenana i maltodekstrina u raznim koncentracijama. Povećanjem količine maltodekstrina, sadržaj vlage se smanjio, odnosno sadržaj suhe tvari povećao.

Kod postupka sušenja raspršivanjem, sadržaj vlage ekstrakta koji se podvrgava sušenju utječe na konačni sadržaj vlage proizvedenog praha (Abadio i sur., 2004). Dodatkom maltodekstrina u uzorak prije samog postupka sušenja, povećava se sadržaj suhe tvari u uzorku i smanji raspoloživa količina vode za isparavanje. Prema tome, da bi se dobio prah sa što nižim sadržajem vlage, treba povećati postotak dodanog maltodekstrina. No, u nekim slučajevima dodavanjem veće količine maltodekstrina smanjuje se koncentracija kemijskih komponenti iz ekstrakta što može rezultirati manjom stabilnosti praha (Krishnaiah i sur., 2012).

#### **4.2. Utjecaj parametara sušenja na koncentraciju ukupnih fenola u prahovima ekstrakta cvijeta trnine**

Rezultati utjecaja parametara sušenja (temperatura, udio arapske gume te omjer nosača i suhe tvari ekstrakta cvijeta trnine) na koncentraciju ukupnih fenola u prahovima dobivenim sušenjem raspršivanjem prikazani su grafički na slici 11.



**Slika 11.** Utjecaj parametara sušenja na koncentraciju ukupnih fenola u prahovima ekstrakta cvijeta trnine; AG – arapska guma, STV – suha tvar

Koncentracije ukupnih fenola (UF) u prahovima nastalim sušenjem ekstrakta cvijeta trnine određene su u rasponu vrijednosti od 103,22 do 114,28 mg GAE/g s. tv. e. Najveća vrijednost koncentracije fenola 114,28 mg GAE/g s. tv. e. određena je u uzorku sušenom pri temperaturi 150 °C, s omjerom nosača i suhe tvari ekstrakta 1,35:1 i bez dodatka AG. Slična vrijednost koncentracije fenola 113,92 mg GAE/g s. tv. e. određena je i u uzorku sušenom pri temperaturi 180 °C, s omjerom nosača i suhe tvari ekstrakta 0,7:1 te udjelom AG 0,2. Iz navedenih vrijednosti možemo zaključiti da su najveće koncentracije UF određene u prahovima s najnižim udjelom, odnosno bez dodatka AG. Dobiveni rezultati suprotni su rezultatima ostalih istraživanja prema kojima je kombinacija AG i MD najbolja za očuvanje enkapsuliranih molekula od oksidativnih procesa (Pérez-Alonso i sur., 2003). To dokazuje istraživanje Toluna i sur. (2016) na prahovima dobivenim sušenjem ekstrakta komine grožđa gdje je najveći iznos fenolnih spojeva određen pri omjeru MD i AG 8:2. Također, u istraživanju Krishnana i sur. (2005) kombinacijom nosača arapske gume, maltodekstrina i



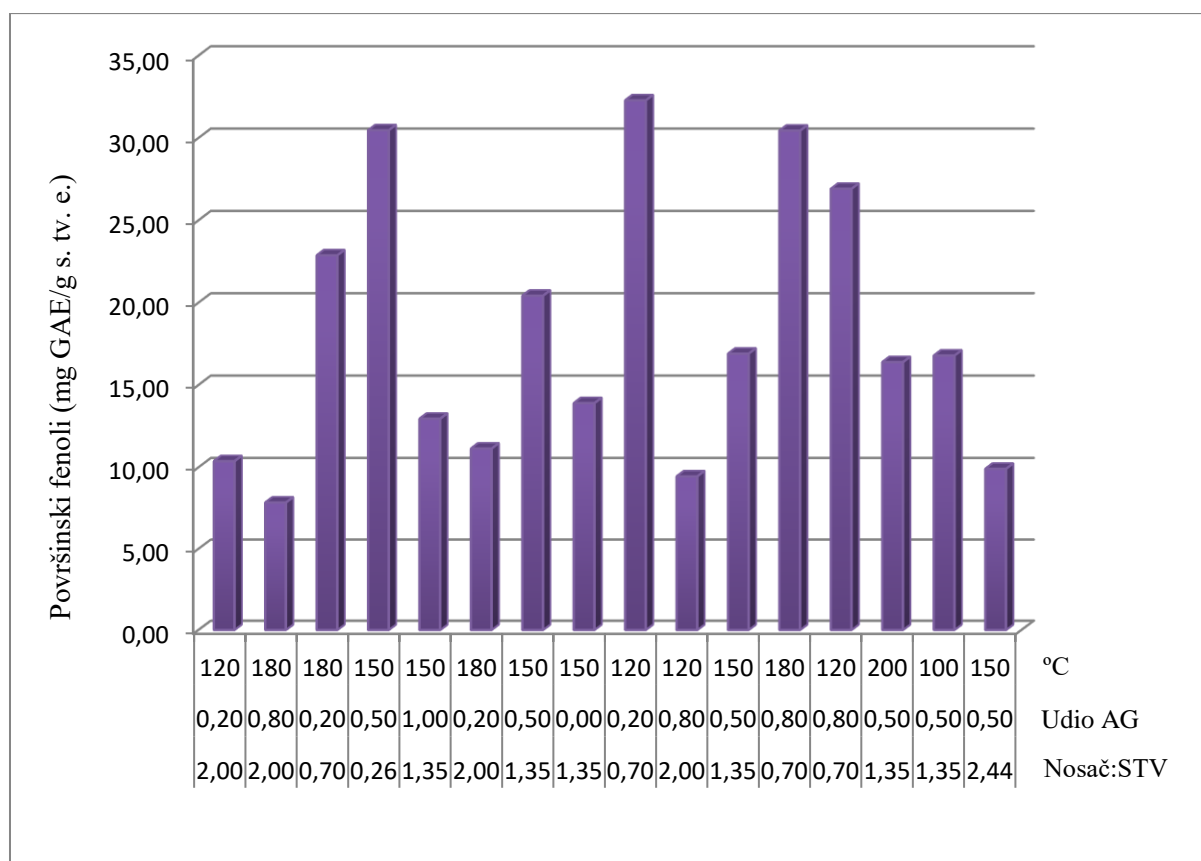
modificiranog škroba postiže se bolja enkapsulacija materijala u usporedbi s upotrebom samo arapske gume kao nosača.

S druge strane, najniža koncentracija UF 103,22 mg GAE/g s. tv. e. određena je pri uvjetima sušenja 150 °C, omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 0,26:1 i udjelu AG 0,5. U ovom je slučaju, osim višeg udjela AG u nosaču, uzrok smanjenja koncentracije UF prvenstveno bio nizak udio nosača u odnosu na suhu tvar ekstrakta. Naime, uloga nosača je stvaranje čvrste membrane oko enkapsulirajućeg materijala što omogućava dobru zaštitu enkapsuliranih fenola od štetnih utjecaja okoline, primjerice visoke temperature. Prema tome, veća koncentracija nosača pruža bolju zaštitu enkapsuliranih fenola. Tu tvrdnju potvrđuje istraživanje Saikia i sur. (2015) gdje je povećanje koncentracije maltodekstrina utjecalo na porast koncentracije enkapsuliranih fenola. Suprotno tome, istraživanje Toluna i sur. (2016) pokazuje da se koncentracija ukupnih fenola značajno smanjila povećanjem omjera nosača i suhe tvari ekstrakta sa 1:1 na 2:1 što su objasnili kao posljedicu povećanja koncentracije nosača u smjesi nosača i ekstrakta. Povećanjem koncentracije maltodekstrina prilikom sušenja ekstrakta komine grožđa raspršivanjem, smanjen je sadržaj ukupnih fenola (Boonchu i Utama-ang, 2015). Pad koncentracije ukupnih fenola s porastom koncentracije nosača potvrđuju i druga istraživanja (Nadeem i sur., 2011; Caliskan i sur., 2013).

Nadalje, prema navedenim rezultatima vidljivo je da temperatura nije imala značajan utjecaj na koncentraciju UF. Međutim, istraživanje Nadeema i sur. (2011) pokazalo je da je povećanje temperature ulaznog zraka iznad 165 °C pri sušenju ekstrakta biljke *Sideritis stricta* uzrokovalo blagi pad koncentracije ukupnih fenola. Za razliku od toga, u istraživanju Krishnaiah i sur. (2012), najveća koncentracija ukupnih fenola dokazana je u prahovima dobivenim sušenjem ekstrakta biljke *Morinda citrifolia* L. pri temperaturi 90 °C i pri omjeru maltodekstrina i ekstrakta 2:1. Povišenje temperature do 120 °C uzrokovalo je pad koncentracije ukupnih fenola. Povišenje temperature ulaznog i izlaznog zraka sa 160/80 na 180/90 °C pri sušenju ekstrakta plodova mirisavog ruja raspršivanjem uzrokovalo je pad koncentracije ukupnih fenola u prahovima za 15 %, dok je povišenje temperatura na 200/100 °C uzrokovalo porast koncentracije ukupnih fenola od 16 % (Caliskan i sur., 2013).

### 4.3. Utjecaj parametara sušenja na koncentraciju površinskih fenola u prahovima ekstrakta cvijeta trnine

Rezultati utjecaja parametara sušenja (temperatura, udio arapske gume te omjer nosača i suhe tvari ekstrakta cvijeta trnine) na koncentraciju površinskih fenola u prahovima dobivenim sušenjem raspršivanjem prikazani su grafički na slici 12.



**Slika 12.** Utjecaj parametara sušenja na koncentraciju površinskih fenola u prahovima ekstrakta cvijeta trnine; AG – arapska guma, STV – suha tvar

Koncentracije površinskih fenola (PF) su oko 10 puta manje od koncentracije ukupnih fenola, a kreću se od 7,85 do 32,28 mg GAE/g s. tv. e. Poželjno je da koncentracija površinskih fenola bude što manja, a koncentracija ukupnih fenola istovremeno što veća jer to upućuje na veću koncentraciju enkapsuliranih fenola. Tako je pri temperaturi sušenja 180 °C, omjeru nosača i suhe tvari 2:1 te udjelu AG 0,8 određena najniža koncentracija površinskih fenola, dok je najviša koncentracija određena pri temperaturi sušenja 120 °C, omjeru nosača i suhe tvari 0,7:1 te udjelu AG 0,2. Pad koncentracije PF može se povezati s porastom

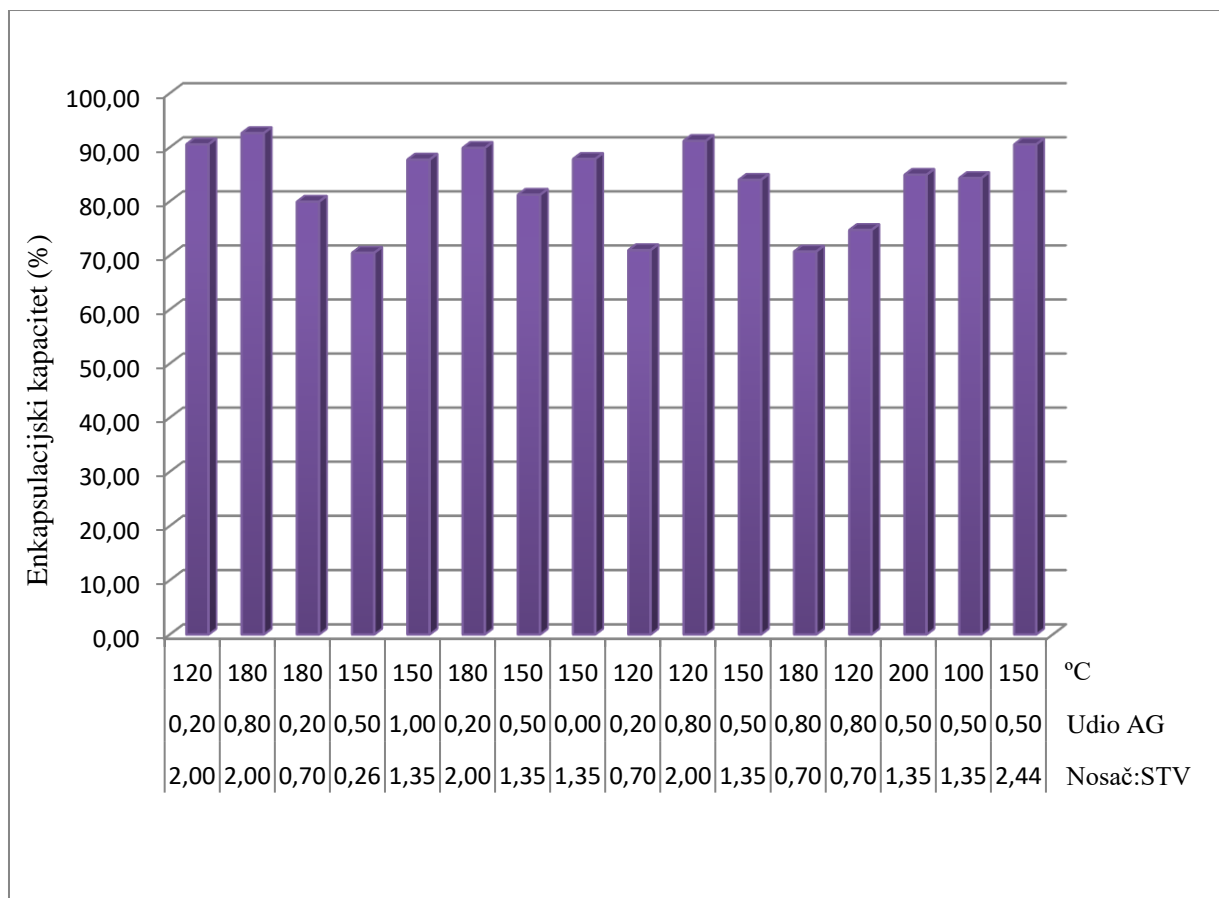
temperature jer površinski fenoli, za razliku od enkapsuliranih fenola, nisu zaštićeni od topline. To potvrđuje istraživanje Toluna i sur. (2016). Povišenje temperature iznad 140 °C uzrokovalo je pad koncentracije većine fenolnih spojeva praha dobivenog sušenjem ekstrakta grožđa. Mogući uzroci su polimerizacija fenolnih spojeva ili degradacija (Tolun i sur., 2016). Pri sušenju raspršivanjem ekstrakta crne mrkve ispitivao se utjecaj različitih DE maltodekstrina te tri temperature (160, 180 i 200 °C) na zadržavanje antocijana u proizvedenim prahovima pri čemu su utvrdili da na temperaturama višim od 180 °C dolazi do većeg gubitka antocijana (Ersus i Yurdagel, 2007).

Povećanje omjera nosača i suhe tvari pozitivno utječe na enkapsulaciju fenola jer je zabilježeno smanjenje koncentracije površinskih fenola što znači da je veća koncentracija enkapsuliranih fenola. Primjerice, promatrajući tri različita omjera nosača i suhe tvari (0,26, 1,35 i 2,44) pri čemu su druga dva parametra sušenja jednaka, koncentracije površinskih fenola padaju u nizu: 30,47 mg GAE/g s. tv. e. pri omjeru 0,26:1 > 20,42 mg GAE/g s. tv. e. pri omjeru 1,35:1 > 9,91 mg GAE/g s. tv. e. pri omjeru 2,44:1. Isto tako, u istraživanju Toluna i sur. (2016), pad koncentracije PF uzrokovan je povećanjem omjera nosača i suhe tvari. Također, povećanjem koncentracije maltodekstrina prilikom sušenja ekstrakta plodova biljke *Averrhoa carambola* L. raspršivanjem, smanjena je koncentracija površinskih fenola (Saikia i sur., 2015).

Udio arapske gume može se promatrati u tri uzorka praha koji su dobiveni sušenjem pri dva ista parametra, temperaturi od 150 °C i omjeru nosača i suhe tvari 1,35:1. U prahu dobivenom sušenjem bez dodatka AG, dakle samo s dodatkom maltodekstrina prije sušenja, koncentracija PF iznosi 13,90 mg GAE/g s. tv. e. Povećanjem udjela AG na 0,5, koncentracija PF iznosi 20,42 mg GAE/g s. tv. e. U prahu u kojemu se kao nosač nalazi samo AG, koncentracija PF iznosi 12,95 mg GAE/g s. tv. e. Prema rezultatima možemo zaključiti da kombinacija AG i MD nije pogodan nosač za enkapsulaciju fenola cvijeta trnine jer je u navedenim prahovima, osim visoke koncentracije PF, određena i niža koncentracija UF. Isto tako, pri sušenju ekstrakta komine višnje raspršivanjem, povećanje udjela AG u omjeru MD:AG s 10:0 na 6:4 uzrokovalo je pad koncentracije PF (Cilek i sur., 2012). No, istraživanje Toluna i sur. (2016) pokazuje da su pri omjerima MD i AG 8:2 najveće koncentracije fenolnih spojeva jer dodatak arapske gume povećava otpornost fenolnih spojeva na toplinu.

#### 4.4. Utjecaj parametara sušenja na enkapsulacijski kapacitet prahova ekstrakta cvijeta trnine

Rezultati utjecaja parametara sušenja (temperatura, udio arapske gume te omjer nosača i suhe tvari ekstrakta cvijeta trnine) na enkapsulacijski kapacitet prahova dobivenih sušenjem raspršivanjem prikazani su grafički na slici 13.



**Slika 13.** Utjecaj parametara sušenja na enkapsulacijski kapacitet prahova ekstrakta cvijeta trnine; AG – arapska guma, STV – suha tvar

Vrijednosti enkapsulacijskog kapaciteta (EK) određene su u rasponu od 70,48 do 92,62 % što ukazuje na dobro zadržavanje fenola unutar kapsula nastalih sušenjem raspršivanjem. EK direktno ovisi o koncentraciji UF, odnosno obrnuto proporcionalno o koncentraciji PF. Prema tome, EK trebao bi biti najvećih vrijednosti pri uvjetima kod kojih je u prahovima bilo više UF, a manje PF.

Enkapsulacijski kapacitet puno je viših vrijednosti u usporedbi s ostalim istraživanjima. Primjerice, učinkovitost enkapsulacije pri sušenju ekstrakta plodova biljke *Averrhoa carambola* L. iznosila je 63 do 79 % (Saikia i sur., 2015). U navedenom istraživanju korišten je nosač maltodekstrin. Varijacije enkapsulacijskog kapaciteta mogu se javljati kao posljedica osjetljivosti određenih fenolnih kiselina na toplinu primijenjenu tijekom postupka sušenja raspršivanjem (Changchub i Maisuthisakul, 2011).

Najviša vrijednost EK u iznosu 92,62 % određena je u prahu dobivenom pri 180 °C, udjelu AG 0,8 i omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 2:1, a najniža vrijednost EK 70,48 % određena je u prahu dobivenom pri 150 °C, udjelu AG 0,5 i omjeru nosača i s. tv. e. 0,26:1. Prema navedenim rezultatima možemo primijetiti da je na EK najviše utjecao omjer nosača i suhe tvari ekstrakta, odnosno da njegovo povećanje pozitivno utječe na enkapsulacijski kapacitet. To potvrđuje istraživanje Saikia i sur. (2015) gdje EK raste s povećanjem koncentracije maltodekstrina. Isto tako, povećanjem omjera jezgre i nosača s 1:10 na 1:20 pri sušenju ekstrakta komine višnje raspršivanjem, raste učinkovitost enkapsulacije (Cilek i sur., 2012). Istraživanje Çama i sur. (2014) ispitujući utjecaj različitih omjera fenola i maltodekstrina (1:1, 1:3, 1:6 te 1:10) na svojstva praha dobivenog sušenjem fenola ekstrahiranih iz otpada od proizvodnje soka od nara, pokazalo je da su omjeri 1:1 i 1:3 najoptimalniji. Sukladno rezultatima i prethodnim istraživanjima, vrsta nosača te omjer nosača i jezgre smatraju se najvažnijim parametrima za enkapsulaciju fenolnih spojeva (Robert i sur., 2010). Očekivano je da se upotrebom veće koncentracije nosača od koncentracije jezgre može provesti bolja i kvalitetnija enkapsulacija.

Najviša i najniža vrijednost EK određene su pri višim temperaturama sušenja (180 i 150 °C). Iako je prah s najvišim EK osušen pri višoj temperaturi, prema rezultatima se može zaključiti da promjena temperature nije bitno utjecala na enkapsulacijski kapacitet. Prilikom sušenja ekstrakta lista biljke ginko pri temperaturi ulaznog zraka 180 °C, proizveden je prah s najboljom učinkovitošću enkapsulacije u iznosu 80,4 % (Haidong i sur., 2012). U istraživanju Çama i sur. (2014), učinkovitost enkapsulacije rasla je povišenjem temperature do 160 °C.

Jedan nosač nema sve potrebne osobine za učinkovitu enkapsulaciju, stoga je kombinacija dvaju ili više nosača bolji izbor za učinkovitiju zaštitu enkapsuliranih spojeva (Gharsallaoui i sur., 2007). To potvrđuje istraživanje Burina i sur. (2011) gdje kombinacijom nosača MD i AG nastaju kapsule s većom učinkovitošću enkapsulacije. U prahu ekstrakta komine višnje povećanje udjela AG u nosaču dovelo je do povećanja enkapsulacijskog

kapaciteta (Cilek i sur., 2012). No, u ovom istraživanju rezultati pokazuju da su pri različitim udjelima AG nastala dva praha približnih vrijednosti EK, prema čemu se može zaključiti da udio AG nema prevelik utjecaj na enkapsulacijski kapacitet. Drugi primjer su prahovi proizvedeni samo s jednom vrstom nosača (AG ili MD) koji pokazuju približne vrijednosti EK, dok kombinacija AG i MD u omjeru 0,5:0,5 daje prah nižeg EK.

#### 4.5. Rezultati statističke obrade podataka

**Tablica 3.** Analiza varijance utjecaja omjera nosača i suhe tvari ekstrakta ( $X_1$ ), udjela arapske gume ( $X_2$ ) i temperature ( $X_3$ ) na koncentraciju ukupnih i površinskih fenola, enkapsulacijski kapacitet i sadržaj suhe tvari u prahovima ekstrakta cvijeta trnine, na 95%-tnom nivou vjerojatnosti

Izvor varijacije	Ukupni fenoli		Površinski fenoli		EK		Suha tvar	
	F-omjer	p-vrijednost	F-omjer	p-vrijednost	F-omjer	p-vrijednost	F-omjer	p-vrijednost
$X_1$	0,001	0,971	59,991	0,0002	65,559	0,0002	0,479	0,515
$X_1^2$	2,264	0,183	0,749	0,420	1,160	0,323	1,359	0,288
$X_2$	35,765	0,001	0,067	0,805	0,036	0,856	1,623	0,250
$X_2^2$	5,931	0,051	1,121	0,330	1,683	0,242	2,496	0,165
$X_3$	0,206	0,666	0,279	0,617	0,307	0,600	0,730	0,426
$X_3^2$	1,114	0,332	0,025	0,879	0,068	0,802	4,549	0,077
$X_1X_2$	3,496	0,111	0,359	0,571	0,902	0,379	0,868	0,387
$X_1X_3$	0,010	0,922	0,223	0,653	0,201	0,670	0,757	0,418
$X_2X_3$	1,862	0,221	0,979	0,361	1,354	0,289	6,567	0,043

U tablici 3 prikazani su rezultati analize varijance utjecaja omjera nosača i suhe tvari ekstrakta, udjela arapske gume i temperature na koncentraciju ukupnih i površinskih fenola, enkapsulacijski kapacitet i sadržaj suhe tvari u prahovima ekstrakta cvijeta trnine.

Prema rezultatima analize varijance prikazanim u tablici 3 signifikantan utjecaj na koncentraciju površinskih fenola i enkapsulacijski kapacitet imao je omjer nosača i suhe tvari ( $p < 0,05$ ). Povećanje omjera nosača i suhe tvari ekstrakta pozitivno je utjecalo na EK jer je uzrokovalo smanjenje koncentracije PF. Na koncentraciju ukupnih fenola, signifikantan utjecaj imao je udio arapske gume, na način da je smanjenje udjela AG uzrokovalo porast koncentracije UF. Na sadržaj suhe tvari signifikantan utjecaj imao je kombinirani utjecaj temperature i udjela arapske gume. Povišenjem temperature rastao je sadržaj suhe tvari u prahovima ekstrakta cvijeta trnine, dok je dodatak arapske gume samo u niskim udjelima, do 0,2, pozitivno utjecao na sadržaj suhe tvari.

**Tablica 4.** Jednadžbe regresijskih modela i koeficijenti determinacije za koncentraciju ukupnih i površinskih fenola, enkapsulacijski kapacitet te sadržaj suhe tvari u prahovima ekstrakta cvijeta trnine

Varijabla	Model	R <sup>2</sup>
<b>Ukupni fenoli</b>	$121,1785 + 2,8082X_1 - 1,9033X_1^2 - 17,6025X_2 + 14,4623X_2^2 - 0,1337X_3 + 0,0006X_3^2 + 5,5147X_1X_2 - 0,0030X_1X_3 - 0,0872X_2X_3$	0,903
<b>Površinski fenoli</b>	$48,9148 - 21,8770X_1 + 2,5456X_1^2 - 2,7604X_2 - 14,6201X_2^2 - 0,0696X_3 - 0,0002X_3^2 - 4,1086X_1X_2 + 0,0324X_1X_3 + 0,1470X_2X_3$	0,916
<b>Enkapsulacijski kapacitet</b>	$58,19038 + 20,07583X_1 - 2,76045X_1^2 - 1,23427X_2 + 15,61234X_2^2 + 0,03357X_3 + 0,00031X_3^2 + 5,67721X_1X_2 - 0,02677X_1X_3 - 0,15071X_2X_3$	0,928
<b>Suha tvar</b>	$107,1188 - 4,0077X_1 + 0,6765X_1^2 + 4,4056X_2 + 4,3033X_2^2 - 0,1469X_3 + 0,0006X_3^2 + 1,2606X_1X_2 + 0,0118X_1X_3 - 0,0751X_2X_3$	0,730



U tablici 4 prikazane su jednadžbe regresijskih modela koje omogućuju predviđanje koncentracije ukupnih i površinskih fenola, enkapsulacijski kapacitet ili sadržaj suhe tvari za bilo koju željenu vrijednost omjera nosača i s. tv. e., temperature ili udjela AG. Pripadajući koeficijenti determinacije pokazuju kolika je preciznost modela za predviđanje određenog svojstva (UF, PF, EK ili STV). Smatra se da dobar model treba imati vrijednost  $R^2$  veću od 0,8.

Vrijednosti koeficijenta determinacije modela za predviđanje koncentracije ukupnih fenola, površinskih te enkapsulacijski kapacitet vrlo su visoke (0,903, 0,916 i 0,928), te potvrđuju zadovoljavajuću točnost modela. Za razliku od toga, točnost modela za predviđanje sadržaja suhe tvari u prahovima je nešto niža, što pokazuje vrijednost koeficijenta determinacije od 0,730.

**Tablica 5.** Optimalni uvjeti omjera nosača i suhe tvari ekstrakta, udjela arapske gume i temperature sušenja (°C) prahova ekstrakta cvijeta trnine te predviđene vrijednosti koncentracije ukupnih i površinskih fenola (mg/g s. tv. ekstrakta), enkapsulacijskog kapaciteta (%) i suhe tvari (%)

Omjer nosača i suhe tvari	Udio arapske gume	Temperatura (°C)	Ukupni fenoli (mg/g)	Površinski fenoli (mg/g)	Enkapsulacijski kapacitet (%)	Suha tvar (%)
1,96	0	200,45	114,35	7,45	93,99	99,65

Optimizacija sušenja raspršivanjem provedena je s ciljem utvrđivanja uvjeta sušenja koji će rezultirati prahom s visokim sadržajem suhe tvari, visokom koncentracijom ukupnih fenola i enkapsulacijskim kapacitetom te niskom koncentracijom površinskih fenola. Primjenom metode odzivnih površina utvrđeno je da se navedene karakteristike praha postižu sušenjem ekstrakta cvijeta trnine pri temperaturi 200,45 °C, s omjerom nosača i s. tv. ekstrakta 1,96:1 te bez dodatka AG. Pri tim uvjetima se postižu predviđene vrijednosti suhe tvari 99,65 %, koncentracije ukupnih fenola 114,35 mg GAE/g s. tv. e. i koncentracije površinskih fenola 7,45 mg GAE/g s. tv. e. te enkapsulacijskog kapaciteta 93,99 %.

Veći omjer nosača i jezgre potvrđuje istraživanje Çama i sur. (2014) gdje je optimalni omjer između 1:1 i 3:1. Veći udio nosača osigurava veću stabilnost enkapsuliranog materijala pri skladištenju. Da vrsta i omjer nosača i jezgre imaju utjecaj na učinkovitost enkapsulacije, potvrđuje istraživanje Mahdavi i sur. (2016) gdje je omjer jezgre i nosača od 25 % u odnosu na 10, 35 i 50 %, signifikantno utjecao na porast učinkovitosti enkapsulacije antocijana ekstrakta plodova žutike.

Iako su mnoga istraživanja potvrdila da udio AG dobro utječe na enkapsulaciju fenolnih spojeva tijekom sušenja raspršivanjem (Burin i sur., 2011; Krishnan i sur., 2005), tablica 5 prikazuje da je za sušenje ekstrakta cvijeta trnine najbolji izbor nosača sam maltodekstrin, bez dodatka AG. Slično su zaključili Ramírez i sur. (2015) gdje je niža koncentracija AG kao glavnog nosača pri enkapsulaciji galne kiseline rezultirala većom koncentracijom galne kiseline u prahu.

Tablica 5 prikazuje da je za najbolje zadržavanje fenola potrebna temperatura sušenja 200 °C što se razlikuje od mnogih istraživanja sušenja ekstrakata raspršivanjem gdje se utvrdilo da optimalna temperatura iznosi 160 °C (Çam i sur., 2014; Ersus i Yurdagel, 2007). No, u ovom istraživanju primjena visokih temperatura nije imala negativan utjecaj zbog visokog udjela nosača u prahu, gotovo 2:1, što se može pripisati ulozi nosača koji kao enkapsulacijski materijal štiti fenolne spojeve od toplinske degradacije. Također, visoka temperatura je imala pozitivan utjecaj i na sadržaj suhe tvari praha ekstrakta cvijeta trnine, što je u skladu s drugim istraživanjima (Jangam i Thorat, 2010; Tonon i sur., 2008).

**Tablica 6.** Koncentracija fenolnih spojeva u tekućem ekstraktu cvijeta trnine s 5,53 % suhe tvari

UZORAK	c (mg GAE/g s. tv. e.)
Tekući ekstrakt cvijeta trnine	106,17

Tablica 6 prikazuje koncentraciju fenola određenih u tekućem ekstraktu cvijeta trnine koji sadrži 5,53 % suhe tvari. Taj podatak je važan da bi se odredio postotak fenola zadržanih u prahu nakon postupka sušenja raspršivanjem.

Optimalna koncentracija ukupnih fenola u prahu iznosi 114,35 mg GAE/g s. tv. e. (tablica 5), dok je u tekućem ekstraktu cvijeta trnine određeno 106,17 mg GAE/g s. tv. e. To znači da bi se pri optimalnim uvjetima sušenja dobio prah ekstrakta cvijeta trnine s gotovo 100 % zadržanih fenola. No, u ovom istraživanju postotak zadržavanja fenola je nešto viši od 100 % zbog analitičke pogreške. Slično tome, čak 94 % fenolnih spojeva tekućeg ekstrakta komine masline zaostalo je u prahu proizvedenom sušenjem raspršivanjem (Paini i sur., 2015). U istraživanju Constanza i sur. (2012) proučavan je utjecaj maltodekstrina na svojstva praha proizvedenog sušenjem raspršivanjem ekstrakta kože kikirikija pri konstantnoj temperaturi ulaznog zraka 160 °C i izlaznog 90 °C. Prilikom sušenja bez nosača došlo je do gubitka 26,8 % ukupnih fenola, a dodatkom maltodekstrina gubitak ukupnih fenola iznosio je 45,1 %. Sušenjem ekstrakta plodova biljke *Averrhoa carambola* L. uz vrlo visok dodatak nosača, proizveden je prah s manjim postotkom zadržanih fenola 37,5 % (Saikia i sur., 2015).

## **5. ZAKLJUČCI**

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti slijedeće:

1. Povišenje temperature pri sušenju ekstrakta cvijeta trnine raspršivanjem pozitivno je utjecalo na ispitivana svojstva prahova pri čemu se sadržaj suhe tvari povećao, a koncentracija PF smanjila.
2. Povećanje omjera nosača i suhe tvari pozitivno utječe na enkapsulaciju fenola jer je zabilježeno smanjenje koncentracije površinskih fenola i porast koncentracije ukupnih fenola, a posljedica toga je veći enkapsulacijski kapacitet.
3. Općenito, dodatak arapske gume nije imao pozitivan utjecaj na enkapsulaciju fenolnih spojeva ekstrakta cvijeta trnine, dok je samo niži udjel arapske gume do 0,2 pokazao pozitivan utjecaj na sadržaj suhe tvari u prahovima. Kombinacija AG i MD nije pogodan nosač za enkapsulaciju fenola cvijeta trnine jer je u navedenim prahovima, osim visoke koncentracije PF, određena i niža koncentracija UF. Prema tome, prahovi većeg enkapsulacijskog kapaciteta proizvedeni su uz dodatak čistog maltodekstrina kao nosača.
4. Najviša koncentracija ukupnih fenola 114,28 mg GAE/g s. tv. e. određena je u uzorku sušenom pri temperaturi 150 °C, s omjerom nosača i suhe tvari ekstrakta 1,35:1 i bez AG u nosaču. Istovremeno je najniža koncentracija PF 7,85 mg GAE/g s. tv. e. određena u prahu proizvedenom pri temperaturi sušenja 180 °C, omjeru nosača i suhe tvari 2:1 te udjelu AG 0,8. U tom istom prahu određena je najviša vrijednost EK u iznosu 92,62 %. Najviša vrijednost suhe tvari 97,60 % određena je u prahu proizvedenom sušenjem na temperaturi 180 °C, s omjerom nosača i suhe tvari 2:1 te malim udjelom arapske gume 0,2.
5. Optimalni uvjeti sušenja ekstrakta cvijeta trnine su: temperatura 200,45 °C, omjer nosača i suhe tvari 1,96:1 te udio AG 0. Pri tim uvjetima suha tvar dobivenog praha iznosi 99,65 %, koncentracija UF 114,35 mg GAE/g s. tv. e, koncentracija PF 7,45 mg GAE/g s. tv. e. i EK 93,99 %. Koeficijenti determinacije potvrđuju preciznost dobivenih modela za predviđanje ukupnih i površinskih fenola te enkapsulacijskog kapaciteta.
6. Enkapsulacijom fenolnih spojeva pri optimalnim uvjetima zadržava se gotovo 100 % fenolnih spojeva tekućeg ekstrakta cvijeta trnine, što dokazuje da se pri navedenim uvjetima može dobiti prah s dobrim svojstvima zadržavanja fenolnih spojeva.

## **6. LITERATURA**

- Abadio, F. D. B., Domingues, A. M., Borges, S. V., Oliveira, V. M. (2004) Physical properties of powdered pineapple (*Ananas comosus*) juice-effect of malt dextrin concentration and atomization speed. *J. Food Eng.* **64**, 285-287.
- Aliyazicioglu, R., Yildiz, O., Sahin, H., Eyupoglu, O. E., Ozkan, M. T., Karaoglu, S. A., Kolayli, S. (2015) Phenolic components and antioxidant activity of *Prunus spinosa* from Gumushane, Turkey. *Chem. Nat. Compd.* **51**, 346-349.
- AOAC (1984) Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 14. izd., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Apintanapong, M., Noomhorm, A. (2003) The use of spray drying to microencapsulate 2-acetyl-1-pyrroline, a major flavour component of aromatic rice. *Int. J. Food Sci. Tech.* **38**, 95-102.
- Arya, V., Kumar, D., Gautam, M. (2014) Phytopharmacological review on flowers: Source of inspiration for drug discovery. *Biomed.Prev. Nutr.* **4**, 45-51.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *J. Food Eng.* **117**, 426-436.
- Barba, F. J., Terefe, N. S., Buckow, R., Knorr, D., Orlien, V. (2015) New opportunities and perspectives of high pressure treatment to improve health and safety attributes of foods. A review. *Food Res. Int.* **77**, 725-742.
- Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., Orlien, V. (2016) Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends Food Sci. Tech.* **49**, 96-109.
- Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J. S., Ferreira, I. C. (2010) Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chem.* **120**, 247-254.
- Benthin, B., Danz, H., Hamburger, M. (1999) Pressurized liquid extraction of medicinal plants. *J. Chromatogr. A*, **837**, 211-219.
- Boonchu, T., Utama-ang, N. (2015) Optimization of extraction and microencapsulation of bioactive compounds from red grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *J. Food Sci. Tech.* **52**, 783-792.
- Boussetta, N., Vorobiev, E. (2014) Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. *C. R. Chim.* **17**, 197-203.

- Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., Velić, D. (2007) Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J. Food Eng.* **81**, 236-242.
- Burin, V. M., Rossa, P. N., Ferreira-Lima, N. E., Hillmann, M. C., Boirdignon-Luiz, M. T. (2011) Anthocyanins: optimisation of extraction from Cabernet Sauvignon grapes, microcapsulation and stability in soft drink. *Int. J. Food Sci. Tech.* **46**, 186-193.
- Caliskan, G., Dirim, S. N. (2013) The effects of the different drying conditions and the amounts of maltodextrin addition during spray drying of sumac extract. *Food Bioprod. Process.* **91**, 539-548.
- Çam, M., İçyer, N. C., Erdoğan, F. (2014) Pomegranate peel phenolics: microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT-Food Sci. Technol.* **55**, 117-123.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Revilla-Ruiz, P., Hernández-Méndez, J. (2005) Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *J. Chromatogr. A*, **1089**, 1-17.
- Changchub, L., Maisuthisakul, P. (2011) Thermal stability of phenolic extract and encapsulation from mango seed kernel. *Agri. Sci. J.* **42**, 397-400.
- Chatterjee, D., Bhattacharjee, P. (2013) Comparative evaluation of the antioxidant efficacy of encapsulated and un-encapsulated eugenol-rich clove extracts in soybean oil: shelf-life and frying stability of soybean oil. *J. Food Eng.* **117**, 545-550.
- Chemat, F., Zill-e-Huma, Khan, M. K. (2011) Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* **18**, 813-835.
- Chemat, F., Zill-e-Huma, Khan, M.K. (2011) Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* **11**, 281-285
- Cilek, B., Luca, A., Hasirci, V., Sahin, S., Sumnu, G. (2012) Microencapsulation of phenolic compounds extracted from sour cherry pomace: effect of formulation, ultrasonication time and core to coating ratio. *Eur. Food Res. Technol.* **235**, 587-596.



- Constanza, K. E., White, B. L., Davis, J. P., Sanders, T. H., Dean, L. L. (2012) Value-added processing of peanut skins: antioxidant capacity, total phenolics, and procyanidin content of spray-dried extracts. *J. Agr. Food Chem.* **60**, 10776-10783.
- Cowan, M. M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 564-582.
- De Castro, M. L., Garcia-Ayuso, L. E. (1998) Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Anal. Chim. Acta*, **369**, 1-10.
- Dörnenburg, H., Knorr, D. (1993) Cellular permeabilization of cultured plant tissues by high electric field pulses or ultra high pressure for the recovery of secondary metabolites. *Food Biotechnol.* **7**, 35-48.
- Elez Garofulić, I., Zorić, Z., Pedisić, S., Dragović-Uzelac, V. (2016) Optimization of sour cherry juice spray drying as affected by carrier material and temperature. *Food Technol. Biotech.* **54**, 441-449.
- Elez Garofulić, I., Zorić, Z., Pedisić, S., Dragović-Uzelac, V. (2017) Retention of polyphenols in encapsulated sour cherry juice in dependence of drying temperature and wall material. *Food Sci. Tech.* **83**, 110-117.
- Ersus, S., Yurdagel, U. (2007) Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray-drier. *J. Food Eng.* **80**, 805–812.
- European Pharmacopoeia, 5. izd. [online], European Directorate for the Quality of Medicines, <<https://www.scribd.com/doc/314755827/European-Pharmacopoeia-5th-Editon>>. Pristupljeno 28. kolovoza 2017.
- Fang, Z., Bhandari, B. (2010) Encapsulation of polyphenols-a review. *Trends Food Sci. Tech.* **21**, 510-523.
- Ferrari, C. C., Germer, S. P. M., de Aguirre, J. M. (2012) Effects of spray-drying conditions on the physicochemical properties of blackberry powder. *Dry. Technol.* **30**, 154-163.
- Gallo, L., Llabot, J. M., Allemandi, D., Bucalá, V., Piña, J. (2011) Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. *Powder Technol.* **208**, 205-214.
- Ganzler, K., Salgo, A., Valko, K. (1986) Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. *J. Chromatogr. A*, **371**, 299-306.

- Georgetti, S. R., Casagrande, R., Souza, C. R. F., Oliveira, W. P., Fonseca, M. J. V. (2008) Spray drying of the soybean extract: effects on chemical properties and antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* **41**, 1521-1527.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. (2007) Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.* **40**, 1107-1121.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., Mulligan, C. N. (1999) Encapsulation in the food industry: a review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **50**, 213-224.
- González, A. G., Irizar, A. C., Ravelo, A. G., Fernández, M. F. (1992) Type A proanthocyanidins from *Prunus spinosa*. *Phytochemistry*, **31**, 1432-1434.
- Goto, T., Kondo, T. (1991) Structure and molecular stacking of anthocyanins-flower color variation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**, 17-33.
- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. (2013) Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chem.* **141**, 3721-3730.
- Guitián, J., Guitián, P., Sánchez, J. M. (1993) Reproductive biology of two *Prunus* species (*Rosaceae*) in the Northwest Iberian Peninsula. *Plant Syst. Evol.* **185**, 153-165.
- Gyan, K. Y., Woodell, S. R. J. (1987) Nectar production, sugar content, amino acids and potassium in *Prunus spinosa* L., *Crataegus monogyna* Jacq. and *Rubus fruticosus* L. at Wytham, Oxfordshire. *Funct. Ecol.* **1**, 251-259.
- Haidong, L., Fang, Y., Zhihong, T., Huanwei, S., Tiehui, Z. (2012) Use of combinations of gum arabic, maltodextrin and soybean protein to microencapsulate ginkgo leaf extracts and its inhibitory effect on skeletal muscle injury. *Carbohydr. Polym.* **88**, 435-440.
- Heinz, V., Buckow, R. (2009) Food preservation by high pressure. *J. Verbrauch. Lebensm.* **5**, 73-81.
- Herceg, Z. (2009) Procesi konzerviranja hrane-Novi postupci, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb.
- Herceg, Z., Kovačević, D. B., Kljusurić, J. G., Jambrak, A. R., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V. (2016) Gas phase plasma impact on phenolic compounds in pomegranate juice. *Food Chem.* **190**, 665-672.
- Hollman, P. C. H., Arts, I. C. W. (2000) Flavonols, flavones and flavanols—nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agr.* **80**, 1081-1093.

- Huie, C. W. (2002) A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 23-30.
- I Ré, M. (1998) Microencapsulation by spray drying. *Dry. Technol.* **16**, 1195-1236.
- Idžojić, M. (2013) Dendrologija - Cvijet, češer, plod, sjeme, Sveučilište u Zagrebu Šumarski fakultet, Zagreb.
- Jangam, S. V., Thorat, B. N. (2010) Optimization of spray drying of ginger extract. *Dry. Technol.* **28**, 1426-1434.
- Jokić, S., Nagy, B., Velić, D., Bucić-Kojić, A., Bilić, M. (2011) Kinetički modeli za ekstrakciju uljarica superkritičnim CO<sub>2</sub>-pregledni rad. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3**, 39-54.
- Kavaz Yuksel, A. (2015) The effects of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) addition on certain quality characteristics of ice cream. *J. Food Quality* **38**, 413-421.
- Kenyon, M. M. (1995) Modified starch, maltodextrin, and corn syrup solids as wall materials for food encapsulation. U: Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients (Risch i Reineccius, ured.), American Chemical Society, ACS Symposium Series, Washington, str. 42-50.
- Khuri, A.I., Mukhopadhyay, S. (2010) Response surface methodology. Advanced Review. *Wires Comput. Mol. Sci.* **2**, 128-149.
- Kolodziej, H., Sakar, M. K., Burger, J. F., Engelshowe, R., Ferreira, D. (1991) A-type proanthocyanidins from *Prunus spinosa*. *Phytochemistry*, **30**, 2041-2047.
- Komarov, V. L., Shishkin, B. K., Yuzepchuk, S. V., Fedorov, A. A., Kostina, K. F., Kovalev, N. V., Krishtofovich, A. N., Linchevskii, I. A., Poyarkova, A. I. (1970) Flora of the USSR-Volume X: Rosaceae-Rosoideae, Prunoideae.
- Kondo, K., Kurihara, M., Fukuhara, K., Tanaka, T., Suzuki, T., Miyata, N., Toyoda, M. (2000) Conversion of procyanidin B-type (catechin dimer) to A-type: evidence for abstraction of C-2 hydrogen in catechin during radical oxidation. *Tetrahedron Lett.* **41**, 485-488.
- Koprivnjak, O. (2014) Kvaliteta, sigurnost i konzerviranje hrane, 1. izd., Sveučilište u Rijeci, Studio TiM, Rijeka.
- Krešić, G., Lelas, V., Režek Jambrak, A., Herceg, Z. (2011) Primjena visokog tlaka u postupcima obrade hrane. *Kem. Ind.* **60**, 11-19.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. (2012) Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying. *Chem. Eng. Res. Des.* **90**, 622-632.

- Krishnan, S., Bhosale, R., Singhal, R. S. (2005) Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydr. Polym.* **61**, 95-102.
- Kumarasamy, Y., Byres, M., Cox, P. J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S. D. (2007) Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity. *Phytother. Res.* **21**, 615-621.
- Lee, H. Y., He, X., Ahn, J. (2010) Enhancement of antimicrobial and antimutagenic activities of Korean barberry (*Berberis koreana* Palib.) by the combined process of high-pressure extraction with probiotic fermentation. *J. Sci. Food Agr.* **90**, 2399-2404.
- Lovrić, T. (2003) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva, Hinus, Zagreb.
- Luczaj, L., Pieroni, A., Tardío, J., Pardo-de-Santayana, M., Sõukand, R., Svanberg, I., Kalle, R. (2012) Wild food plant use in 21 st century Europe, the disappearance of old traditions and the search for new cuisines involving wild edibles. *Acta Soc. Bot. Pol.* **81**, 359-370.
- Lust, J. (2014) The Herb Book: The Most Complete Catalog of Herbs Ever Published, Dover Publication Inc., New York.
- Luthria, D., Vinjamoori, D., Noel, K., Ezzell, J. (2004) Accelerated solvent extraction. Oil extraction and analysis: critical issues and comparative studies. AOCS, Champaign, IL, 25-38.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S. (2006) Flavour encapsulation and controlled release—a review. *Int. J. Food Sci. Tech.* **41**, 1-21.
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Assadpoor, E., Dehnad, D. (2016) Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *Int. J. Biol. Macromol.* **85**, 379-385.
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Ghorbani, M., Assadpoor, E. (2014) Spray-drying microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: A review. *Dry. Technol.* **32**, 509-518.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727-747.
- Marakoglu, T., Arslan, D., Özcan, M., Haciseferogullari, H. (2005) Proximate composition and technological properties of fresh blackthorn (*Prunus spinosa* L. subsp *dasyphylla* (Schur.)) fruits. *J. Food Eng.* **68**, 137-142.

- Marković, S. (2005). Fitoaromaterapija, *Centar Cedrus, Zagreb*.
- Masters, K. (1985) Spray drying handbook, 4. izd., George Godwin Ltd., London.
- McNamee, B. F., O'Riorda, E. D., O'Sullivan, M. (1998) Emulsification and microencapsulation properties of gum arabic. *J. Agr. Food Chem.* **46**, 4551-4555.
- Michael, J. K. (1993) Spray drying and spray congealing of pharmaceuticals. Encyclopedia of pharmaceutical technology, Marcel Dekker INC, New York.
- Mikulic-Petkovsek, M., Stampar, F., Veberic, R., Sircelj, H. (2016) Wild Prunus Fruit Species as a Rich Source of Bioactive Compounds. *J. Food Sci.* **81**.
- Modey, W. K., Mulholland, D. A., Raynor, M. W. (1996) Analytical supercritical fluid extraction of natural products. *Phytochem. Analysis*, **7**, 1-15.
- Moreno, T., de Paz, E., Navarro, I., Rodríguez-Rojo, S., Matías, A., Duarte, C., Sanz-Buenhombre, M., Cocero, M. J. (2016) Spray drying formulation of polyphenols-rich grape marc extract: evaluation of operating conditions and different natural carriers. *Food Bioprocess Tech.* **9**, 2046-2058.
- Mortimer, S. R., Turner, A. J., Brown, V. K., Fuller, R. J., Good, J. E. G., Bell, S. A., Stevens, P. A., Norris, D., Bayfield, N. G., Ward, L. K. (2000) The nature conservation value of scrub in Britain. JNCC report No. 308.
- Murugesan, R., Orsat, V. (2012) Spray drying for the production of nutraceutical ingredients-a review. *Food Bioprocess Tech.* **5**, 3-14.
- Naczki, M., Shahidi, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A*, **1054**, 95-111.
- Nadeem, H. Ş., Torun, M., Özdemir, F. (2011) Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. *LWT-Food Sci. Technol.* **44**, 1626-1635.
- Nayak, C. A., Rastogi, N. K. (2010) Effect of selected additives on microencapsulation of anthocyanin by spray drying. *Dry. Technol.* **28**, 1396-1404.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B. (2011) An overview of encapsulation technologies for food applications. *Proc. Food Sci.* **1**, 1806-1815.
- Nielsen, J., Olrik, D. C. (2001) A morphometric analysis of *Prunus spinosa*, *P. domestica* ssp. *insititia*, and their putative hybrids in Denmark. *Nord. J. Bot.* **21**, 349-363.

- Norhuda, I., Jusoff, K. (2009) Supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) as a clean technology for palm kernel oil extraction. *J. Biochem. Tech.* **1**, 75-78.
- Obón, J. M., Castellar, M. R., Alacid, M., Fernández-López, J. A. (2009) Production of a red–purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *J. Food Eng.* **90**, 471-479.
- Olszewska, M., Glowacki, R., Wolbis, M., Bald, E. (2001) Quantitative determination of flavonoids in the flowers and leaves of *Prunus spinosa* L. *Acta Pol. Pharm.* **58**, 199-204.
- Olszewska, M., Wolbis, M. (2001) Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta Pol. Pharm.* **58**, 367-372.
- Özcan, E. (2006) Ultrasound assisted extraction of phenolics from grape pomace. Middle East Technical University, The graduate School of Natural and Applied Sciences, Ph. d., Chemical Engineering, Ankara.
- Özcan, T., Bayçu, G. (2008) Fatty acid and amino acid profiles in the fruits of *Prunus spinosa* L. *subsp. dasyphylla* (Schur) Domin from Europe-in-Turkey. *Adv. Mol. Biol.* **1**, 39-46.
- Painsi, M., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Lagazzo, A., Botter, R., Perego, P. (2015) Microencapsulation of phenolic compounds from olive pomace using spray drying: a study of operative parameters. *LWT-Food Sci. Technol.* **62**, 177-186.
- Patel, R. P., Patel, M. P., Suthar, A. M. (2009) Spray drying technology: an overview. *Indian J. Sci. Technol.* **2**, 44-47.
- Pérez-Alonso, C., Báez-González, J. G., Beristain, C. I., Vernon-Carter, E. J., Vizcarra-Mendoza, M. G. (2003) Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. *Carbohydr. Polym.* **53**, 197-203.
- Pinacho, R., Cavero, R. Y., Astiasarán, I., Ansorena, D., Calvo, M. I. (2015) Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of in vitro digestion on their antioxidant capacity. *J. Funct. Foods*, **19**, 49-62.
- Popescu, I., Caudullo, G. (2016) *Prunus spinosa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. U: European Atlas of Forest Tree Species, (San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A., ured.), Luxembourg, str. 145.

- Ramírez, M. J., Giraldo, G. I., Orrego, C. E. (2015) Modeling and stability of polyphenol in spray-dried and freeze-dried fruit encapsulates. *Powder Technol.* **277**, 89-96.
- Redchenkova, V. N., Khishova, O. M. (2006) Comparative analysis of the requirements of some pharmacopoeias on medicinal extracts. *Pharm. Chem. J.* **40**, 40-43.
- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., Saenz, C. (2010) Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *Int. J. Food Sci. Tech.* **45**, 1386-1394.
- Rostagno, M. A., Prado, J. M. (2013) Natural Product Extraction: Principles and Applications, Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Ruiz-Rodríguez, B. M., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Fernández-Ruiz, V., de Cortes Sánchez-Mata, M., Cámara, M., Tardío, J. (2014) Wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) fruits as valuable sources of antioxidants. *Fruits*, **69**, 61-73.
- Saénz, C., Tapia, S., Chávez, J., Robert, P. (2009) Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chem.* **114**, 616-622.
- Saikia, S., Mahnot, N. K., Mahanta, C. L. (2015) Optimisation of phenolic extraction from Averrhoa carambola pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. *Food Chem.* **171**, 144-152.
- Sakar, M. K., Kolodziej, H. (1993) Flavonoid glycosides from the flowers of *Prunus spinosa*. *Fitoterapia*, **64**, 180-181.
- Savić, Lj. (2014) Metode ekstrakcije biljnih materijala: uporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkričnog ugljen-dioksida. Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Beograd.
- Savulescu T. (1956) Flora Republicii Populare Romine, vol. IV, Bucurest.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci.* **45**, 287-306.
- Schiller, M., von der Heydt, H., März, F., Schmidt, P. C. (2002) Quantification of sugars and organic acids in hygroscopic pharmaceutical herbal dry extracts. *J. Chromatogr. A*, **968**, 101-111.

- Shortle, E., O'Grady, M. N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J. P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98**, 828-834.
- Skala, D., Žižović, I., Gavrančić, S. (2002) Primena natkritične ekstrakcije u prehrambenoj industriji. *Hem. Ind.* **56**, 179-190.
- Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonič, M., Knez, Ž. (2005) Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem.* **89**, 191-198.
- Souza, C. R., Oliveira, W. P. (2006) Powder properties and system behavior during spray drying of *Bauhinia forficata* Link extract. *Dry. Technol.* **24**, 735-749.
- Stalikas, C. D. (2007) Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* **30**, 3268-3295.
- Summa (2007, 27. travnja) Blackthorn spring flowers. Pixabay <<https://pixabay.com/en/blackthorn-spring-flowers-white-1236126/>>. Pristupljeno 30. kolovoza 2017.
- Tamas, M. (1985) Study of flavones *Prunus spinosa* L. flowers. *Farmacia*, **33**, 181–186.
- Toepfl, S., Mathys, A., Heinz, V., Knorr, D. (2006) Potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally friendly food processing. *Food Rev. Int.* **22**, 405-423.
- Tolun, A., Altintas, Z., Artik, N. (2016) Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization. *J. Biotechnol.* **239**, 23-33.
- Tonon, R. V., Brabet, C., Hubinger, M. D. (2008) Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) powder produced by spray drying. *J. Food Eng.* **88**, 411-418.
- Tsao, R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, **2**, 1231-1246.
- Van Wyk, B. E. (2005) Food plants of the world: an illustrated guide, Timber Press, Portland.



- Vardin, H., Yasar, M. (2012) Optimisation of pomegranate (*Punica Granatum* L.) juice spray-drying as affected by temperature and maltodextrin content. *Int. J. Food Sci. Tech.* **47**, 167-176.
- Veličković, J. M., Kostić, D. A., Stojanović, G. S., Mitić, S. S., Mitić, M. N., Randelović, S. S., Đorđević, A. S. (2014) Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. *Hem. Ind.* **68**, 297-303.
- Vidović, S. S., Vladić, J. Z., Vaštag, Ž. G., Zeković, Z. P., Popović, L. M. (2014) Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in *Satureja montana* dry powder extract obtained by spray drying technique. *Powder Technol.* **258**, 209-215.
- Wagner, H., Bladt, S. (1996) Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas, 2. izd., Springer Science & Business Media, New York.
- Zhang, L., Mou, D., Du, Y. (2007) Procyanidins: extraction and microencapsulation. *J. Sci. Food Agr.* **87**, 2192-2197.