

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Gabrijela Šišić

**Primjena inkapsuliranih biljnih ekstrakata za
obogaćivanje praškastih mješavina namijenjenih pripremi
napitaka na bazi kakaovog praha**

Zagreb, 2018

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Draženke Komes i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2017/2018.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	3
3. TEORIJSKI DIO	4
3.1. Maslačak(<i>Taraxacum officinale</i> L.)	4
3.1.1. Bioaktivni sastav maslačka	4
3.1.2. Tradicionalna uporaba i zdravstveni učinci maslačka	5
3.2. Ružmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	6
3.2.1. Bioaktivni sastav ružmarina.....	6
3.2.2. Tradicionalna uporaba i zdravstveni učinci ružmarina	7
3.3. Kakaov prah.....	8
3.3.1. Kemijski i bioaktivni sastav kakaovog praha	8
3.3.2. Tradicionalna uporaba i zdravstveni učinci kakaovog praha	9
3.4. Bioraspoloživost polifenolnih spojeva	9
3.5. Inkapsulacija	11
3.5.1. Materijali za inkapsulaciju aktivnih tvari.....	11
3.5.1.1. Alginat	12
3.5.1.2. Pektin.....	13
3.5.2. Metode inkapsulacije aktivnih tvari	14
3.5.2.1. Ionsko geliranje	14
3.5.2.2. Sušenje raspršivanjem	15
3.5.3. Primjena inkapsulacije u prehrambenoj industriji	16
3.6. Aglomeracija	17
3.6.1. Karakterizacija aglomeriranih proizvoda.....	18
3.6.2. Granuliranje u fluidiziranom sloju.....	20
3.7. Funkcionalna hrana.....	22
4. MATERIJALI I METODE	25

4.1. Materijali	25
4.1.1. Uzorci.....	25
4.1.2. Kemikalije.....	25
4.1.3. Pribor i aparatura.....	27
4.2. Metode rada	30
4.2.1. Priprema polifenolnih ekstrakata maslačka i ružmarina.....	30
4.2.2. Inkapsulacija polifenolnih ekstrakata maslačka i ružmarina	30
4.2.2.1. Inkapsulacija polifenolnih ekstrakata maslačka i ružmarina primjenom ionskog geliranja.....	30
4.2.2.2. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije ukupnih polifenola.....	32
4.2.2.3. Inkapsulacija polifenolnih ekstrakata maslačka i ružmarina primjenom sušenja raspršivanjem	32
4.2.3. Granuliranje u fluidiziranom sloju.....	33
4.2.4. Priprema napitaka na bazi kakaovog praha za određivanje bioaktivnog profila	35
4.3. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika praškastih mješavina na bazi kakaovog praha	35
4.3.1. Veličina čestica	35
4.3.2. Udjel vode	36
4.3.3. Topljivost	36
4.3.4. Disperzibilnost	37
4.3.5. Nasipna gustoća	37
4.3.6. Indeks kohezije i sposobnost stvaranja kolača.....	39
4.3.7. Močivost	40
4.3.8. Parametri boje	40
4.4. Određivanje bioaktivnog profila napitaka na bazi kakaovog praha	42
4.4.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola.....	42
4.4.2. Određivanje udjela ukupnih flavonoida i neflavonoida.....	42
4.4.3. Određivanje udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina	43

4.4.4. Određivanje udjela flavan-3-ola metodom s vanilinom.....	44
4.4.5. Određivanje udjela proantocijanidina metodom Bate-Smith.....	44
4.4.6. Određivanje udjela ukupnih tanina	45
4.4.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom	46
4.4.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	47
4.4.9. Određivanje pojedinačnih polifenola i metilksantina primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).....	48
4.5. Senzorska analiza napitaka na bazi kakaovog praha	49
4.6. Statistička analiza	50
5. REZULTATI	51
5.1. Bioaktivna karakterizacija polifenolnih ekstrakata maslačka i ružmarina	51
5.2. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije ukupnih polifenola	52
5.3. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika praškastih mješavina na bazi kakaovog praha	53
5.3.1. Određivanje veličine čestica	53
5.3.2. Određivanje udjela vode, topljivosti i disperzibilnosti	54
5.3.3. Određivanje karakteristika tečenja prahova.....	55
5.3.4. Određivanje parametara boje	56
5.4. Određivanje bioaktivnog profila napitaka na bazi kakaovog praha	57
5.4.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola.....	57
5.4.2. Određivanje udjela ukupnih flavonoida.....	57
5.4.3. Određivanje udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina	58
5.4.4. Određivanje udjela flavan-3-ola	58
5.4.5. Određivanje udjela proantocijanidina	59
5.4.6. Određivanje udjela ukupnih tanina	59
5.4.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom	60
5.4.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	60

5.4.9. Određivanje udjela teobromina i kafeina u napitcima na bazi kakaovog praha primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)	61
5.4.10. Određivanje udjela čikorinske i ružmarinske kiseline u napitcima na bazi kakaovog praha obogaćenih ekstraktima maslačka i ružmarina primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).....	62
5.5. Senzorska analiza napitaka na bazi kakaovog praha pripremljenih s vodom i mlijekom	63
6. RASPRAVA	64
6.1. Bioaktivna karakterizacija polifenolnih ekstrakata maslačka i ružmarina	64
6.2. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije ukupnih polifenola	65
6.3. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika praškastih mješavina na bazi kakaovog praha	66
6.3.1. Određivanje veličine čestica	66
6.3.2. Određivanje udjela vode, topljivosti, disperzibilnosti i močivosti	67
6.3.3. Određivanje karakteristika tečenja prahova.....	69
6.3.4. Određivanje parametara boje	72
6.4. Određivanje bioaktivnog profila napitaka na bazi kakaovog praha	73
6.4.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola.....	73
6.4.2. Određivanje udjela ukupnih flavonoida.....	74
6.4.3. Određivanje udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina	75
6.4.4. Određivanje udjela flavan-3-ola	75
6.4.5. Određivanje udjela proantocijanidina	76
6.4.6. Određivanje udjela ukupnih tanina	77
6.4.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom	78
6.4.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	78
6.4.9. Određivanje udjela teobromina i kafeina u napitcima na bazi kakaovog praha primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)	79

6.4.10. Određivanje udjela čikorinske i ružmarinske kiseline u napitcima na bazi kakaovog praha obogaćenim ekstraktima maslačka i ružmarina primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).....	81
6.5. Senzorska analiza napitaka na bazi kakaovog praha pripremljenih s vodom i mlijekom	82
7. ZAKLJUČCI	84
8. ZAHVALE	86
9. LITERATURA	87
SAŽETAK.....	107
SUMMARY.....	108

1. UVOD

Tržište funkcionalne hrane posljednjih desetljeća kontinuirano raste zbog povećane svijesti potrošača o važnosti utjecaja pravilne prehrane na zdravlje. Za razvoj funkcionalne hrane od iznimne važnosti su bioaktivni sastojci (polifenolni antioksidansi, omega-3 masne kiseline, vitamini, mineralne tvari, prebiotici, probiotici) koji doprinose poboljšanju zdravlja te smanjenju rizika od nastanka različitih bolesti. No, učinkovitost bioaktivnih komponenata hrane u sprječavanju razvoja bolesti uvelike ovisi o njihovom udjelu u prehranbenom proizvodu te njihovoj bioraspoloživosti u ljudskom organizmu (Langer i Peppas, 2003). Također, procesiranjem, a kasnije i skladištenjem tijekom određenog vremenskog razdoblja može doći do degradacije bioaktivnih sastojaka, a kao rezultat interakcija s drugim komponentama hrane dolazi i do smanjenja kvalitete funkcionalnih prehranbenih proizvoda. Stoga je s ciljem očuvanja osjetljivih bioaktivnih komponenti od vanjskih uvjeta, ali i uvjeta u gastrointestinalnom sustavu posljednjih godina razvijena tehnika inkapsulacije, koja zbog svoje učinkovite zaštite bioaktivnih spojeva u sustave nosača, ali i kataliziranog otpuštanja spoja na ciljanom mjestu, nalazi sve veću primjenu, kako u farmaceutskoj, tako i u prehranbenoj industriji.

Razvojem asortimana funkcionalnih prehranbenih proizvoda, a uzimajući u obzir i suvremeni način života danas su sve popularniji granulirani praškasti proizvodi, kao što su instant čokoladni napitci, instant kave i čajevi koji su često obogaćeni različitim bioaktivnim sastojcima. Zbog instant svojstava njihova priprema je jednostavna, a svakodnevnim konzumiranjem takvih proizvoda unos bioaktivnih sastojaka mogao bi se značajno povećati. Napitci na bazi kakaovog praha su među najpopularnijim instant proizvodima. Prema istraživanju Daini i suradnika (2003) vrući napitci koji u svom sastavu sadrže kakaov prah bogati su vitaminima i mineralnim nutrijentima koji povećavaju nutritivnu vrijednost takvih napitaka. S obzirom na bogat nutritivni sastav, praškastu formu te atraktivna senzorska svojstva, kakaov prah predstavlja idealnu sirovinu za obogaćivanje bioaktivnim sastojcima, zbog čega ima veliki potencijal za razvoj novih funkcionalnih proizvoda.

Kao baza za proizvodnju funkcionalnih napitaka često se koriste biljni ekstrakti. Ljekovite biljne vrste, kao prirodni izvor različitih bioaktivnih sastojaka, koriste se u narodnoj medicini kao „prirodni lijek” za liječenje i prevenciju različitih oboljenja jer djeluju protuupalno ili pak kao diuretici, sedativi, digestivi, koagulansi, a potencijalno i sprječavaju razvoj kardiovaskularnih oboljenja, gastrointestinalnih poremećaja te pojavu karcinoma (Škrovánková i sur., 2012). Za proizvodnju funkcionalnih napitaka najčešće se koriste ekstrakti matičnjaka,

ginsenga, ginka te ekstrakt guarane (Gruenwald, 2009). Biološki potencijal biljnih ekstrakata i njihova vrijednost još uvijek nije dovoljno istražena i prepoznata od strane proizvođača te se često pribjegava upotrebi konzervansa, stabilizatora, aroma i zaslađivača. Maslačak i ružmarin su ljekovite biljne vrste s mnogobrojnim zdravstvenim učincima. Ružmarin je biljna vrsta čiji je bioaktivni sastav puno više istraživani u odnosu na bioaktivni sastav maslačka te je posljednjih pet godina, prema pretraživanju znanstvene baze Web of science, objavljeno četiri puta više znanstvenih istraživanja u odnosu na maslačak. Također, samo nekolicina znanstvenih skupina istraživala je inkapsulaciju polifenolnih spojeva ružmarina i maslačka, gdje je, u odnosu na maslačak, inkapsulacija ekstrakata i bioaktivnih spojeva ružmarina opet više istraživana. Iako je njihova uporaba široko rasprostranjena, puni potencijal ovih biljnih vrsta nije u potpunosti iskorišten. U skladu s trendovima na tržištu funkcionalne hrane koji su vezani uz primjenu prirodnih sastojaka, a uzimajući u obzir da su maslačak i ružmarin široko rasprostranjeni u Hrvatskoj, isti su uključeni u ovo istraživanje.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj ovoga rada je razviti funkcionalne granulirane praškaste mješavine namijenjene pripremi napitaka na bazi kakaovog praha, uz dodatak biljnih ekstrakata maslačka i ružmarina prethodno inkapsuliranih tehnikama ionskog geliranja i sušenja raspršivanjem.

Specifični ciljevi rada su:

- 1) Karakterizirati bioaktivni profil ekstrakata maslačka i ružmarina koji će se koristiti za obogaćivanje praškastih mješavina na bazi kakaovog praha
- 2) Pripremiti različite inkapsulacijske sustave s imobiliziranim ekstraktima maslačka i ružmarina te za svaku biljnu vrstu odabrati najučinkovitiji sustav koji će se koristiti za obogaćivanje praškastih mješavina na bazi kakaovog praha
- 3) Pripremiti obogaćene granulirane praškaste mješavine na bazi kakaovog praha postupkom granuliranja u fluidiziranom sloju
- 4) Odrediti fizikalno-kemijske parametre praškastih mješavina na bazi kakaovog praha te ispitati njihove karakteristike tečenja
- 5) Pripremiti napitke na bazi kakaovog praha s vodom i mlijekom, simulirajući uvjete pripreme u kućanstvu, u svrhu ispitivanja njihovog bioaktivnog profila primjenom spektrofotometrijskih i HPLC metoda
- 6) Ispitati utjecaj granuliranja, vrste inkapsulacijske tehnike (čestice pripremljene ionskim geliranjem i sušenjem raspršivanjem) i biljnog ekstrakta (maslačak i ružmarin) na ispitivane parametre (fizikalno-kemijska svojstva i bioaktivni profil)
- 7) Ispitati bioaktivni profil napitaka na bazi kakaovog praha nakon šest mjeseci skladištenja praškastih mješavina
- 8) Provesti senzorsku analizu pripremljenih napitaka na bazi kakaovog praha metodom kvantitativno-deskriptivne analize

3. TEORIJSKI DIO

3.1. Maslačak (*Taraxacum officinale* L.)

Maslačak (*Taraxacum officinale* L.) je trajna zeljasta višegodišnja livadna biljka koja pripada porodici *Asteraceae*. To je biljka izvornog europskog podrijetla, široko rasprostranjena u toplijim umjerenim predjelima sjeverne polutke. Maslačak je biljka sa snažnim vretenastim korijenom i listovima združenim u prizemnu rozetu. Rozetu čine listovi prislonjeni uz tlo, koji se tek u kasnijem razvoju uspravljaju (Lesinger, 1999). Cjevasta cvjetna stabljika je okrugla i nosi žutu cvatnu glavicu koja se noću i za vrijeme kiše zatvara. Biljka cvate od ranog proljeća do kasne jeseni, jestiva je i ljekovita jer je bogata vitaminom C i mineralnim tvarima; kalijem, željezom, natrijem i fosforom, kao i eteričnim uljima i masnim kiselinama. Nutritivna vrijednost maslačka ovisi o agroklimatskim uvjetima u kojima raste, ali i o udjelu hranjivih tvari u tlu (Erhatic i sur., 2014).

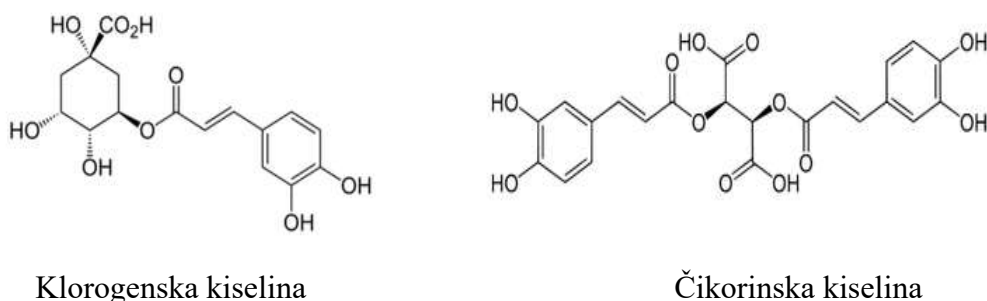


Slika 1. Maslačak (*Taraxacum officinale* L.) (Anonymous 1, 2013)

3.1.1. Bioaktivni sastav maslačka

Listovi, cvjetovi i korijen maslačka predstavljaju bogat izvor polifenolnih spojeva. No, udjel polifenola veći je u cvjetovima i listovima, odnosno vanjskim dijelovima biljke ($9,9 \pm 0,28$ g polifenola na 100 g ekstrakta maslačka), nego u korijenu ($0,086 \pm 0,003$ g polifenola na 100 g ekstrakta maslačka) (González-Castejón i sur., 2012). Najzastupljeniji polifenolni spojevi

u cvjetovima i listovima maslačka su derivati hidroksicimetnih kiselina, naročito esteri kafeinske kiseline poput klorogenske kiseline i čikorinske kiseline (slika 2), od kojih je čikorinska zastupljena u najvećem udjelu (González-Castejón i sur., 2012). U ekstraktu cvijeta i lista maslačka identificirani su i različiti flavonoidni glikozidi poput luteolin-7-glukozida, luteolin-7-rutinozida, izoramnetin-3-glukozida, kvercetin-7-glukozida te apigenin-7-glukozida. Iz ekstrakta cvijeta maslačka izolirani su luteolin-7-glukozidi, dva luteolin-7-diglukozida, kao i slobodni luteolin i krisoeriol (3'-metoksi apigenin) (Schütz i sur., 2006). U cvijetu su identificirani i karotenoidi (lutein, lutein epoksid, kriptoksantin, kriptoksantin epoksid, flavoksantin, krizantemaksantin i violaksantin) te njihovi monoesteri i diesteri s masnim kiselinama (miristinska, laurinska, palmitinska i stearinska kiselina), a u listu od karotenoida najzastupljeniji su lutein i violaksantin (Khan i Abourashed, 2010).



Slika 2. Kemijske strukture najznačajnijih polifenola maslačka (Chen i sur., 2012)

3.1.2. Tradicionalna uporaba i zdravstveni učinci maslačka

Maslačak se koristi u tradicionalnoj, a isto tako i u suvremenoj medicini posebno u Aziji, Europi i Sjevernoj Americi. Korijen maslačka smatra se prvenstveno gastrointestinalnim lijekom koji poboljšava probavu i funkciju jetre, a list se koristi kao diuretik te gorki probavni stimulans. Preklinička istraživanja otkrila su brojne pozitivne učinke maslačka kao što je ublažavanje upala, diuretički učinak, probavni stimulans i stimulans inzulina, imunomodulator te prebiotik (Mir i sur., 2013). Također, doprinosi poboljšanju zdravlja jer ima i antireumatska, antiinflamatorna, antikancerogena i hipoglikemijska svojstva (Koh i sur., 2010). Zbog široke rasprostranjenosti svi dijelovi biljke koriste se u prehrani. Mladi listovi maslačka beru se prije nego biljka počne cvjetati, a najčešće se koriste za pripremu salata. Cvjetovi se koriste za pripremu meda, dok se korijenje vadi u jesen. Zbog visokog udjela inulina, korijen maslačka koristi se kao zamjena za kavu te dobro djeluje i na peristaltiku crijeva (Erhatic i sur., 2014).

3.2. Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.)

Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je višegodišnja, drvenasta biljka iz porodice *Lamiaceae*. Široko rasprostranjena duž sjeverne i južne obale Sredozemnog mora, a danas se kultivira u cijelom svijetu kao ljekovita i aromatična biljka. Kao gust, zimzelen višegodišnji grm može narasti od 90 do 200 cm visine. Listovi su mu nasuprotni, sjedeći, čvrsti, kožasti, vrlo uski i duljine od 2-3 cm. Stabljika je drvenasta i raspucane kore. Između listova, na krajevima ogranaka razvijaju se pršljenasto, na maloj peteljci, maleni ljubičasto plavi cvjetovi. Biljka cvate od ožujka do svibnja, no ponekad i po drugi put cvate u rujnu. Listovi, grančice i cvjetovi imaju ekonomsku važnost jer sadrže eterično ulje čiji udio i kvaliteta ovise o klimatskim uvjetima i području uzgoja (Sasikumar, 2012; Hernández i sur., 2016).

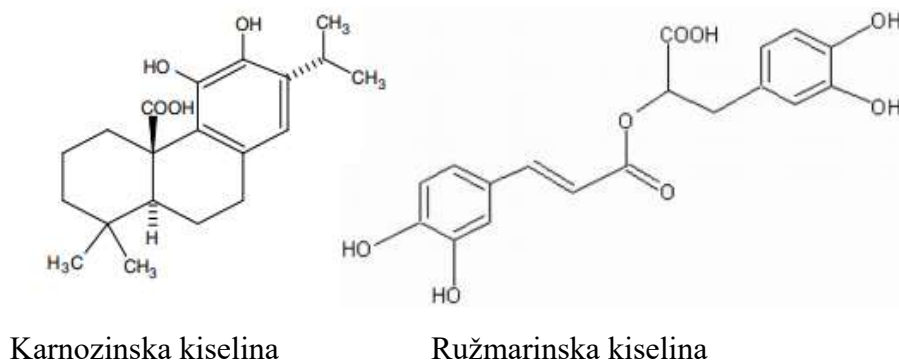


Slika 3. Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (Anonymous 2, 2015)

3.2.1. Bioaktivni sastav ružmarina

Antioksidacijskom kapacitetu ružmarina najviše doprinose polifenoli, posebice: fenolni diterpeni, flavonoidi i fenolne kiseline. List ružmarina sadrži fenolne diterpenoidne opore spojeve (do 4,6 % karnozola, rozmaridifenola, rozmanola) itriterpenoidne kiseline od kojih su najznačajnije oleanolična i ursolična kiselina. U listu ružmarina od flavonoida prisutni su apigenin, luteolin, nepetin te nepitrina, a od ukupnog sastava fenolnih kiselina, 2-3 % otpada na ružmarinsku, klorogensku i kafeinsku kiselinu. Ružmarinska i karnozinska kiselina su među najvažnijim antioksidansima u ružmarinu (slika 4), detektirane uglavnom u listovima

ružmarina. Također, u listu su prisutni i tanini te eterična ulja u udjelu od 1,2-2,5 % (Bele i sur., 2010). Ostali dijelovi biljke kao što su korijenje, stabljika i cvjetovi imaju niži udio polifenolnih spojeva. Jedino je u cvjetovima tijekom proljeća i ljeta karnozinska kiselina prisutna u većoj koncentraciji (Del Baño i sur., 2003). Karnozinska kiselina ima lipofilna, a ružmarinska hidrofilna svojstva, te se stoga ekstrakti ružmarina mogu koristiti pri sprječavanju oksidacije kako polarnih tako i nepolarnih prehrambenih proizvoda (Berdahl i McKeague, 2015).



Slika 4. Kemijske strukture najznačajnijih polifenola ružmarina (Erkan i sur., 2008)

3.2.2. Tradicionalna uporaba i zdravstveni učinci ružmarina

Ružmarin se tradicionalno koristi u kulinarstvu kao začim, uglavnom za modificiranje i poboljšanje okusa hrane. U narodnoj medicini koristi se kao stimulans i blagi analgetik, a smatra se jednom od najučinkovitijih biljaka za liječenje migrene, slabe cirkulacije, upalnih procesa te ima hepatoprotektivni, diuretski, antireumatski i antidepresivni učinak (Al-Sereiti i sur., 1999; Yu i sur., 2013). Također, eterična ulja, infuzije i ekstrakti cijele biljke koriste se kod probavnih smetnji, srčanih tegoba, nekih zaraznih bolesti te u svrhu poboljšanja pamćenja (Sasikumar, 2012). Većina zdravstvenih učinaka ružmarina posljedica je izraženog antioksidacijskog djelovanja glavnih bioaktivnih sastojaka, koji uključuju karnozol, ursoličnu, ružmarinsku i kafeinsku kiselinu (Ngo i sur., 2011). Provedena su različita istraživanja na štakorima u kojima je potvrđen hepatoprotektivni učinak ružmarina na akutna oštećenja jetre. Metanolni ekstrakt ružmarina djelotvoran je kod akutnog oštećenja jetre induciranog ugljikovim tetrakloridom (Sotelo-Félix i sur., 2002), a vodeni ekstrakt ružmarina može spriječiti nastanak akutnih oštećenja jetre induciranih azatioprinom (Amin i Hamza, 2005). Ekstrakti i eterično ulje ružmarina mogu se koristiti i u prehrambenoj industriji za stabilizaciju masti, ulja i njihovih

proizvoda te u fermentiranim mesnim proizvodima jer usporavaju oksidaciju i pojavu užeglosti (Sasikumar, 2012).

3.3. Kakaov prah

Tijekom 16. stoljeća kakaovo zrno imalo je neprocjenjivu vrijednost, a koristilo se kao novac prilikom razmjene dobara i pružanja usluga, pa se opravdano tvrdi kako je imalo ulogu prvog novca. Kakaova zrna osušene su fermentirane sjemenke ploda kultiviranih vrsta biljke kakaovac, botaničkog naziva *Theobroma cacao* L. i osnovna su polazna sirovina za izradu svih kakaovih proizvoda (kakaova masa, kakaova pogača, kakaov maslac, kakaov prah i čokoladni proizvodi). Iz kakaove sjemenke položene u zemlju razvije se stablo visine od 5 do 15 m i debljine oko 20 cm. Na razvijenom stablu godišnje procvjeta 6000 do 12000 cvjetova, ali dozrijeva samo 20 do 50 kakaovih plodova (Goldoni, 2004).

Kakaov prah je proizvod dobiven od očišćenih, oljuštenih i prženih kakaovih zrna, koji sadrži najmanje 20% kakaovog maslaca, računato na suhu tvar i najviše 9% vode, a kakaov prah smanjene masti sadrži manje od 20 % kakaovog maslaca, računato na suhu tvar (Pravilnik, 2005). Kakaov prah dobre kvalitete relativno je slobodne tečnosti, stabilan, ujednačene boje i okusa, dobre mikrobiološke kvalitete te se njime lako rukuje (de Muijnck, 2005). Osim navedenog, niz drugih svojstava utječe na kvalitetu praha, kao i konačnog proizvoda u kojem se kakaov prah koristi kao što su: pH, finoća praha, udio masti, alkalitet, močivost, udjel vode, topljivost i gustoća (de Muijnck, 2005). Poznata je i činjenica da čisti kakaov prah pokazuje loša rekonstitucijska svojstva, kao što su disperzibilnost, močivost i topljivost. To se može poboljšati dodatkom drugih praškastih sastojaka kao npr. šećera, vitamina, mlijeka u prahu te instantiziranjem praškaste mješavine uz dodatak lecitina.

3.3.1. Kemijski i bioaktivni sastav kakaovog praha

Kakaov prah je vrlo bogat izvor polifenola, posebno fenolnih kiselina i flavonoida. U kakaovim proizvodima flavonoidi su najznačajnija skupina polifenolnih spojeva, a među kojima su značajnom udjelu prisutni flavan-3-oli (37 %), antocijani (4 %) te proantocijanidini (58 %) koji posjeduju visoku antioksidacijsku aktivnost i pri tome pozitivno utječu na ljudsko zdravlje. Flavan-3-oli prisutni su u monomernom obliku, točnije kao (+)-epikatehini te su prisutni u oligomernom i polimernom obliku, kao procijanidini (Wollgast i Anklam, 2000).

Mnogi čimbenici mogu utjecati na udio polifenola u kakaovom prahu počevši od fermentacije, sušenja, preko prženja do usitnjavanja i/ili aglomeriranja. Posljedica je smanjenje udjela ukupnih polifenola u kakaovom prahu u odnosu na sirovo kakovo zrno (Shahidi i Naczki, 2003). Osim polifenolima, kakaov prah je bogat metilksantinima, odnosno kafeinom i teobrominom (Greer i sur., 2001; Rios i sur., 2003), koji su odgovorni za njegov blagi i stimulirajući učinak.

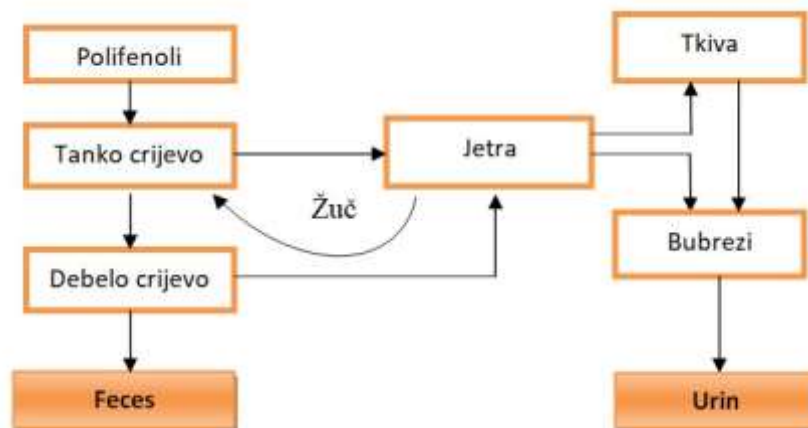
3.3.2. Tradicionalna uporaba i zdravstveni učinci kakaovog praha

Kakaov prah vrlo je popularan zbog jedinstvene kombinacije specifičnog okusa i arome te se kakaovi proizvodi konzumiraju među svim generacijama širom cijelog svijeta. Iz kakaovog praha i kakaovog praha smanjene masti proizvode se i čokoladni prah, čokoladni napitak, zaslađeni kakao te zaslađeni kakaov prah (Pravilnik, 2005). S obzirom na značajnu prisutnost bioaktivnih spojeva i njihove potencijalne zdravstvene učinke, kakaov prah smatra se funkcionalnom hranom (Ackar i sur., 2013). Dokazano je da kakaov prah ima brojne fiziološke učinke, kao što su antioksidacijski i protuupalni učinci, a poboljšanjem funkcija endotelnih stanica pozitivno djeluje i na kardiovaskularni sustav (Corti i sur., 2009; Steinberg i sur., 2003). Prethodna istraživanja dokazala su da može inhibirati oksidaciju lipoproteina niske gustoće (LDL) te sprječiti povišenje glukoze u krvi (Kurosawa i sur., 2005; Tomaru i sur., 2007). Provedena su i istraživanja u kojima je dokazano da kakaov prah može imati blagotvoran učinak na imunološke bolesti (Martín i sur., 2013) te može inhibirati proliferaciju humanih stanica raka dojke (Ramljak i sur., 2005).

3.4. Bioraspoloživost polifenolnih spojeva

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji čine veliku obitelj sveprisutnih i raznovrsnih tvari od jednostavnih do izrazito kompleksnih struktura. U svojoj kemijskoj strukturi imaju jedan ili više aromatskih prstena na koji su vezane jedna ili više hidroksilnih skupina (Tsao, 2010), a kemijska struktura ima važan utjecaj na njihovu bioraspoloživost i biološka svojstva (Manach i sur., 2005). Polifenoli imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji u novije vrijeme njihovim dodatkom i obogaćivanjem prehrambenih proizvoda nastoji se utjecati na poboljšanje ljudskoga zdravlja. Mnogi biljni ekstrakti, bogati polifenolima, koriste se kao dodaci prehrani ili se mogu implementirati u različite kozmetičke ili farmaceutske

proizvode (Munin i Edwards-Lévy, 2011). Učinkovitost polifenolnih spojeva u svrhu poboljšanja zdravlja ovisi o njihovoj bioraspoloživosti. Bioraspoloživost predstavlja udjel hranjive tvari koji je probavljen, apsorbiran i metaboliziran uobičajenim putem. Mali dio oralno unesenih molekula je apsorbiran u probavnom sustavu zbog nedovoljnog vremena zadržavanja u želucu te niske permeabilnosti i/ili slabe topljivosti. Nestabilnost tijekom procesiranja hrane, distribucije i skladištenja ili nestabilnost u probavnom sustavu (zbog niske pH vrijednosti želuca, prisutnosti enzima i drugih nutrijenata), ograničava pozitivan učinak polifenola na ljudsko zdravlje. Apsorpcijom polifenolnih spojevakroz probavni sustav nakon konzumacije hrane bogate polifenolima dolazi do povećanja antioksidacijskog kapaciteta. Ovo je zapaženo kod niza prehrambenih proizvoda poput čaja (Serafini i sur., 1996; van het Hof i sur., 1997), crnog vina (Duthie i sur., 1998; Fuhrman i sur., 1995) ili soka od crnog ribiza i jabuke (Young i sur., 1999). Izravan dokaz o bioraspoloživosti nekolicine polifenolnih spojeva je njihova koncentracija u plazmi i urinu nakon unosa bilo čistih polifenolnih spojeva ili hrane s poznatim udjelom ispitivanog spoja. Istraživanja koja se temelje na ovakvim mjerenjima dokazala su da veliki udjel polifenola (75-99%) nije prisutan u urinu nakon njegove ingestije. To ukazuje ili na izostanak njihove apsorpcije u probavnom sustavu, apsorpcije i izlučivanja u žuči ili provedbe metaboličkih procesa od strane crijevne mikroflore vlastitog organizma (Scalbert i Williamson, 2000). Na slici 5 prikazani su mogući putevi prolaska oralno unesenih polifenola kroz probavni sustav i urinarni trakt.



Slika 5. Shematski prikaz mogućih puteva prolaska oralno unesenih polifenola kroz GI i urinarni trakt (Scalbert i Williamson, 2000)

Osnovna uporaba polifenolnih spojeva ograničena je također zbog njihove osjetljivosti na vanjske čimbenike (fizikalne, kemijske i biološke). Polifenoli vrlo brzo oksidiraju što dovodi do progresivnog posmeđivanja i/ili pojave neželjenih mirisa uz značajan gubitak aktivnosti.

Veliki broj polifenolnih spojeva u slobodnom obliku ima ograničenu topljivost u vodi ili pak neugodan okus koji je potrebno maskirati prije inkorporiranja u prehrambene proizvode ili lijekove. Zbog toga je važno da završni proizvod koji sadrži polifenolne spojeve ima sposobnost zadržati strukturni integritet polifenola do trenutka konzumacije ili primjene, maskirati njihov okus, povećati njihovu topljivost u vodi i bioraspoloživost te usmjeriti njihovo djelovanje u točno određenom, fiziološkom smjeru (Munin i Edwards-Lévy, 2011). S obzirom na to razvijena je tehnika inkapsulacije u svrhu zaštite polifenola, ali i drugih aktivnih spojeva, ugradnjom u zaštitne nosače.

3.5. Inkapsulacija

Inkapsulacija je tehnika koja predstavlja proces „pakiranja“ aktivnih spojeva unutar određenih materijala, tzv. nosača - polupropusnih matriksa (Gasperini i sur., 2014). Također, može se definirati i kao tehnika „pakiranja“ čvrstog, tekućeg ili plinovitog materijala u male kapsule (promjera 1-1000 μm) koje otpuštaju inkapsulirani sadržaj kontroliranom brzinom i isključivo u određenim uvjetima (Desai i Park, 2005). Tvar koja je inkapsulirana naziva se još i jezgra materijala, aktivna tvar, punjenje i unutarnja faza, a tvar koja čini ovojnici premaz, membrana, ljuska, stijenka materijala ili vanjska faza (Wandrey i sur., 2009; Fang i Bhandari, 2010). Primjenom te tehnike aktivne komponente su kompletno obavijene, prekrivene i zaštićene fizičkom barijerom pri čemu je onemogućena njihova protruzija, odnosno oštećenje ili izobličavanje (Đorđević i sur., 2014). Glavni cilj tehnike inkapsulacije je zaštita jezgre materijala od nepovoljnih okolišnih uvjeta, kao što su nepoželjni učinci vlage, svjetlosti i kisika pri čemu se poboljšava stabilnost funkcionalnog sastojaka i istodobno potiče njegovo kontrolirano ili ciljano otpuštanje (Fang i Bhandari, 2010). Osim toga, primjenom te tehnike može se očuvati nutritivna vrijednost hrane, povećati topljivost i disperzibilnost lipofilnih spojeva, maskirati okus bez nepovoljnog utjecaja na okus, aromu ili teksturu, te povećati stabilnost i produžiti rok trajanja proizvoda (Augustin i Hemar, 2009).

3.5.1. Materijali za inkapsulaciju aktivnih tvari

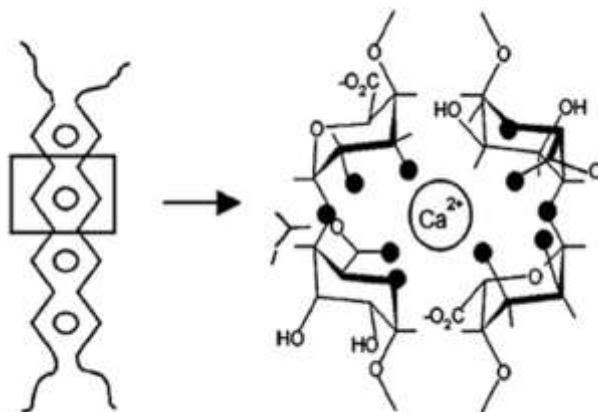
Materijali koji se koriste kao nosači za inkapsulaciju moraju biti uvršteni na GRAS (eng. „*Generally Recognized as Safe*“) listu, odnosno biti prepoznati kao sastojci sigurni za

korištenje u proizvodnji hrane. Također moraju biti netoksični, inertni prema sastojcima kapsule, moraju se postepeno razgrađivati pri zadanim uvjetima te imati poželjna fizikalna i senzorska svojstva. Za inkapsulaciju čvrstih, tekućih ili plinovitih aktivnih tvari različitih vrsta i karakteristika mogu se koristiti različiti materijali. Izbor odgovarajućeg materijala za omotače određuje fizikalna i kemijska svojstva same mikrokapsule. Za inkapsulaciju se koriste hidrofilni ili hidrofobni polimeri ili njihova kombinacija kao što su alginat, želatina, polivinil alkohol, derivati celuloze i škroba i dr. (Wandrey i sur., 2009). Prirodni polimeri su meki, potencijalno prozirni, jeftini, održivi i biorazgradivi. Imaju dobru citokompatibilnost i mogu se koristiti i u tkivnom inženjerstvu. Slični su biološkim makromolekulama pa se zbog toga mogu lako metabolizirati (Dong, 2013).

Prirodni biopolimeri za inkapsulaciju koji se često koriste su polisaharidi, kao što su alginat, pektin, kitozan, dekstrin, škrob jer udovoljavaju prethodno navedenim zahtjevima. Također, svojstvo koje ih čini prikladnima je i mogućnost tvorbe kinetički metastabilnih, amorfnih gelova koji pružaju čvrstoću strukturi kapsule. Kod polisaharida poput alginata i niskometiliranog pektina geliranje se postiže umrežavanjem s kalcijevim ionima (Augustin i Hemar, 2009).

3.5.1.1. Alginat

Alginat je jedan od najčešće korištenih polimera zbog jednostavne primjene, biokompatibilnosti i niske cijene (Goh i sur., 2012). To je prirodni polimer ekstrahiran iz smeđih morskih algi koji sastoji od linearnih lanaca α -L-guluronske kiseline (G-blok) i β -D-manuronske kiseline (M-blok) povezane α -1,4-glikozidnom vezom (Rowley i sur., 1999). Najznačajnija karakteristika alginata je sposobnost stvaranja gela u prisustvu određenih kationa. Divalentni kationi vežu se za guluronske blokove alginatnih lanaca. Guluronski blokovi jednog polimera stvaraju zatim veze sa susjednim polimerinim lancima, pri čemu se stvara struktura poznata pod nazivom „kutija za jaja“ („egg-box“) i rezultira formiranjem gel strukture.



Slika 6. Prikaz modela „kutije za jaja” (Li i sur., 2007)

Nedostatak primjene alginata kao nosača za inkapsulaciju jest poroznost alginatnog gela, zbog čega je otežano zadržavanje aktivnih spojeva unutar takvog nosača, stoga se često kombinira s drugim prirodnim materijalima poput proteina (Augustin, 2003).

3.5.1.2. Pektin

Pektin je prirodni polisaharid dobiven ekstrakcijom iz kore citrusa ili mesnatog dijela jabuke, a koristi se kao sredstvo za zgušnjavanje i geliranje. Sastoji se od jedinica D-galakturonske kiseline povezanih α -1,4 glikozidnom vezom. Pektin ima slična svojstva kao i alginat, što je rezultat prisustva poli- α -(1-4)-D-galakturonske kiseline koja je gotovo zrcalna slika poli- α -(1-4)-D-guluronske kiseline. Jedina razlika je u tome što je kod poli- α -(1-4)-D-guluronske kiseline 3-hidroksilna skupina aksijalna (Racovića i sur., 2009). Sposobnost formiranja gela je slična kao kod alginata. Stupanj esterifikacije koji se izražava kao postotak esterificiranih karboksilnih skupina važan je u klasificiranju pektina. Svojstva pektina ovise o stupnju esterifikacije: niskometoksilirani pektin kod kojeg je stupanj esterifikacije manji od 50 % tvori krute gelove s kalcijevim ionima, koji križaju lance galakturonske kiseline (Rolin, 1993). Tehnika inkapsulacije s pektinom, kao polimernim nosačem, vrlo je jednostavna tehnika koja se može koristiti npr. za produženo otpuštanje lijekova u probavnom sustavu (Singh i Kim, 2005; Grasdalen i Smidsrød 1987), ali i za ciljano otpuštanje lijekova u debelom crijevu (Munjeri i sur., 1998; Sriamornsak i Nunthanid 1999; Chambin i sur., 2006).

3.5.2. Metode inkapsulacije aktivnih tvari

Postoji više metoda inkapsulacije aktivnih tvari i stanica koje se prema izvedbi mogu podijeliti u četiri osnovne skupine (slika 7):

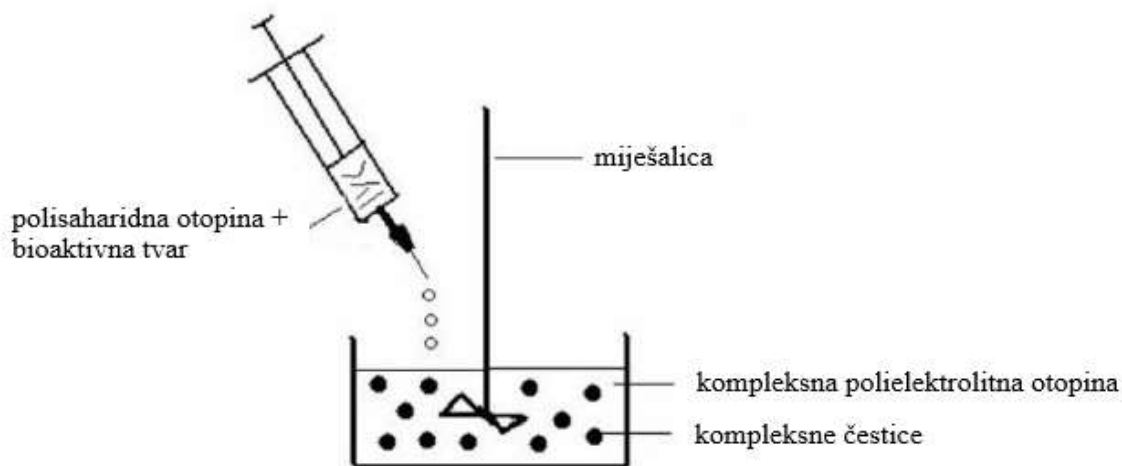
<u>Fizikalne metode</u>	<u>Fizikalno-kemijske metode</u>	<u>Kemijske metode</u>	<u>Ostale metode inkapsulacije</u>
<ul style="list-style-type: none">• sušenje raspršivanjem• inkapsulacija superkritičnim fluidima	<ul style="list-style-type: none">• inkapsulacija hlađenjem emulzija• emulzifikacija i uklanjanje otapala• metode temeljene na hidrofobnim interakcijama• metode temeljene na ionskim interakcijama	<ul style="list-style-type: none">• <i>in situ</i> polimerizacija,• granična polimerizacija• granično unakrsno povezivanje (eng., <i>cross linking</i>)	<ul style="list-style-type: none">• inkapsulacija u stanicama kvasaca,• ko-kristalizacija, molekularna inkluzija

Slika 7. Podjela metoda inkapsulacije aktivnih tvari (Munin i Edwards-Lévy, 2011)

3.5.2.1. Ionsko geliranje

Ionsko geliranje je metoda inkapsulacije koja se provodi na način da se materijal koji se želi inkapsulirati otopi u vodenoj (kod primjerice alginata ili pektina) ili blago kiseloj otopini (kod kitozana) polisaharida te se iglom i špricom ili automatiziranim sustavom ukapava u otopinu s molekulama suprotnih naboja određene koncentracije koja se intenzivno miješa pri čemu dolazi do tvorbe kapsula zbog kompleksacije te precipitacije polisaharida u obliku omotača (slika 8). Alginat, pektin i kitozan su polisaharidi koji se najčešće koriste, a za tvorbu suprotnih naboja mogu se koristiti različite tvari kao što su: kloridi metala (CaCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2), pirofosfati, tripolifosfati, tetrapolifosfati, zatim oktil sulfati, lauril sulfati, heksadecil sulfati (Racovića i sur., 2009). Kalcijev klorid (CaCl_2) jedan je od najčešće korištenih gelirajućih medija prilikom ionskog geliranja (Lee i Mooney, 2012).

Ionsko geliranje je jednostavna i blaga tehnika, a čimbenici koji utječu na učinkovitost te oblik i veličinu nastalih čestica su: koncentracija polimera i kationa za geliranje, temperatura, pH otopine za geliranje i koncentracija bioaktivnog sastojka (Racovića i sur., 2009).



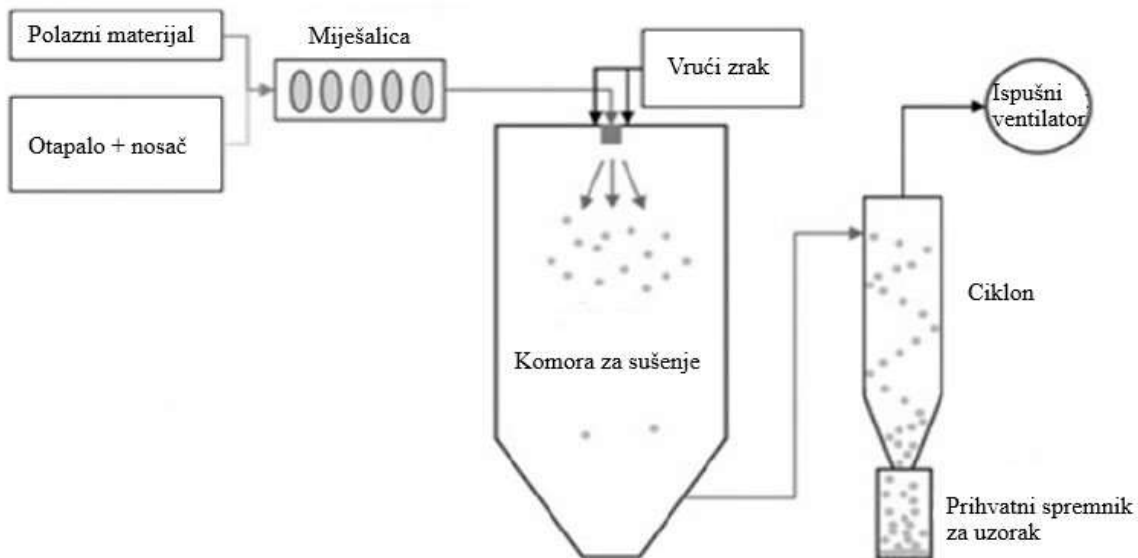
Slika 8. Shematski prikaz izvođenja inkapsulacije metodom ionskog geliranja (Racovića i sur., 2009)

3.5.2.2. Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem jedna je od najstarijih i najčešće korištenih tehnika inkapsulacije koja se koristi u prehrambenoj industriji nekoliko desetljeća (Yamamoto, 2012). Proces je ekonomičan, fleksibilan, oprema je lako dostupna, a produkt su čestice praha prilično dobre kvalitete. To je tehnika koja štiti, stabilizira te povećava topljivost i kontrolirano otpuštanje bioaktivnih spojeva koji se isporučuju u praškastom obliku (Zuidam i Shimoni, 2010). Osim toga, sušenje raspršivanjem osigurava mikrobiološku stabilnost proizvoda, smanjuje troškove skladištenja i transporta te smanjuje rizik od kemijskih i/ili bioloških degradacija smanjivanjem udjela vode i vodenog aktiviteta (Gharsallaoui i sur., 2007). Iako se ova tehnika često koristi u prehrambenoj industriji postoje dva nedostatka u primjeni ove tehnike: otopina nosača mora biti sposobna stvarati film te mora biti topljiva u vodi, a aktivna tvar mora biti otporna na toplinu pri temperaturama koje se obično primjenjuju za ovu metodu tijekom relativno kratke izloženosti protoku vrućeg zraka (Adamiec, 2009). Proces sušenja raspršivanjem odvija se u četiri stupnja:

1. Atomizacija smjese za mikroinkapsulaciju u fine kapljice
2. Miješanje raspršenih kapljica sa zagrijanom strujom zraka za sušenje
3. Sušenje kapljica
4. Odvajanje suhog praha iz struje zraka i njegovo skupljanje u sabirnoj posudi

Proces se odvija u komori koja se zagrijava, uslijed čega dolazi do otparavanja otapala, a čestice se formiraju prolaskom smjese kroz mlaznicu ili rotirajući atomizer (slika 9). Kao otapalo najčešće se koristi voda, ali se mogu koristiti i organska otapala poput acetona i etanola (Zuidam i Shimoni, 2010).



Slika 9. Shematski prikaz metode sušenja raspršivanjem (Casanova i Santos, 2015)

3.5.3. Primjena inkapsulacije u prehrambenoj industriji

Tehnike inkapsulacije primjenjuju se u prehrambenoj, farmaceutskoj, tekstilnoj industriji, biotehnologiji te u poljoprivredi. U prehrambenoj industriji primjenatehnikeinkapsulacije rastuće je područje istraživanja zbog potražnje potrošača za primjenom prirodnih namirnica s manjim sadržajem sintetičkih aditiva i širokim rasponom raspoloživih bioaktivnih spojeva u raznim oblicima (izolati, koncentрати, itd.) koji se ugrađuju u različite prehrambene proizvode radi povećanja nutritivne vrijednosti. Raspon primjene inkapsulacije u prehrambenoj industriji raste zbog brojnih prednosti koje nudi, prvenstvenozbog očuvanja bioaktivnih tvari umjesto njihovog direktnog uključivanja u sustav hrane (Gomez-Estaca i sur., 2012). Prehrambena industrija primjenjuje inkapsulaciju iz nekoliko razloga, a to su:

- zaštita aktivne jezgre od degradacije koju uzrokuju vanjski uvjeti (toplina, vlaga, zrak i svjetlost)

- smanjene isparavanja ili brzine prijenosa materijala jezgre prema vanjskom okolišu
- olakšano rukovanje inkapsuliranom aktivnom komponentom (npr. inkapsulacija tekućine i dobivanje čvrstih inkapsulata koji su lakši za rukovanje)
- kontrolirano otpuštanje aktivne komponente
- maskiranje nepoželjnih mirisa i drugih senzorskih svojstava aktivne komponente
- odjeljivanje komponenata unutar smjese koji mogu međusobno reagirati (Gouin, 2004).

3.6. Aglomeracija

Aglomeracija se može definirati kao proces povećanja veličine polaznih čestica, kao što su prašina ili prah, njihovim povezivanjem što rezultira stvaranjem poroznih aglomeratavećih dimenzija od polaznog materijala, pri čemu se polazne čestice mogu identificirati (Ortega-Rivas, 2005; Parikh i sur., 1997; Schuchmann, 1995). U prehrambenoj industriji aglomeracija se može definirati kao proces kojem je glavni cilj kontrola poroznosti i gustoće materijala u svrhu poboljšanja svojstava kao što su gustoća i topljivost (Barbosa-Cánovas i sur., 2005). Aglomeracija utječe na fizikalna svojstva prahova kao što su veličina čestica, poroznost, nasipna gustoća, tečivost te procese rekonstitucije (Vu i sur., 2003). Također, proces aglomeracije i naknadnog sušenja utječu na kemijske spojeve prisutne u prahu uglavnom kao posljedica visokih temperatura koje se primjenjuju tijekom aglomeracije (Mrkić i sur., 2006; Larossa i sur., 2014).

3.6.1. Karakterizacija aglomeriranih proizvoda

Poznavanje i karakterizacija sirovine i proizvoda ključni su za odabir odgovarajućih metoda i strojeva, optimizaciju procesa, funkcionalnost, formulaciju proizvoda te smanjenje troškova proizvodnje, kao i zasvojsva prehrambenih svojstava (struktura, veličina i površinske karakteristike). Određivanje svojstava prahova je važno zbog utjecaja na ponašanje prahova tijekom skladištenja, rukovanja i prerade (Dhanalakshmi i sur., 2011), a ta svojstva su:

Nasipna gustoća i poroznost

Određivanje nasipne gustoće od iznimne je važnosti za industriju zbog prilagođavanja uvjeta skladištenja, proizvodnje, pakiranja i distribucije. Volumna gustoća je masa čestice koja zauzima jedinični volumen u datom obujmu, a određena je vaganjem posude poznatog volumena s čijom se masom podjeli neto masa praha. Poroznost se definira kao dio volumena kojeg ne zauzima čestica. Postoji nekoliko vrsta gustoće koje se temelje na metodi određivanja volumena. Nasipna gustoća praha je masa čestica koja zauzima jedinicu volumena, a određena je gustoćom čestica koje je povratno određena gustoćom krutih dijelova, unutarnjom poroznosti čestica te posebnim rasporedom čestica u spremniku. "Tapped" nasipna gustoća dobije se udaranjem ili vibracijom volumena praha pod određenim uvjetima, a "loose" nasipna gustoća se mjeri nakon što je prah slobodno usipan u spremnik. "Aerated" nasipna gustoća se koristi za ispitivanje pod fluidiziranim uvjetima ili tijekom pneumatskog transporta. Volumni udio zraka u čitavom volumenu spremnika naziva se poroznost (Barbosa-Canovas i Juliano, 2005).

Tecivost

Tecivost se može definirati kao relativno kretanje većine čestica među susjednim česticama duž površine spremnika (Peleg, 1978). Sile unutar praha koje uzrokuju tecivost su sila gravitacije, trenje, sile kohezije (privlačenje među česticama) te adhezije (privlačenje između čestica i površine spremnika). Čimbenici koji utječu na tecivost su svojstva površine i oblik čestica, raspodjela veličine te geometrija sustava. Praktični cilj određivanja tecivosti prahova je određivanje kvalitativnih i kvantitativnih svojstava prahova u svrhu projektiranja opreme. Postoji niz empirijski testova koji se koriste za određivanje tecivosti, a neki od njih su mjerenje kuta mirovanja (Teunou i sur., 1995), Hausnerov omjer i Carr indeks, rotirajuća oštrica koja se koristi kod mjerenja teksture (Mukherjee i Bhattacharya, 2006).

Veličina i oblik čestica

Veličina je jedna od najvažnijih fizikalnih svojstava čestica. Za određivanje veličine čestica može se koristiti bilo koje mjerljivo fizikalno svojstvo koje korelira s karakterističnim geometrijskim dimenzijama ili ekvivalentnim dimenzijama (Schubert, 1987). Oblik čestica utječe na tecivost prahova, pakiranje, interakciju s tekućinama te prevlake prahova kao što su pigmenti (Barbosa-Canovas i sur., 2005). Općenito, oblici čestica mogu biti igličasti, kristalni, razgranatog kristalnog oblika, vlaknasti, nepravilnog, modularnog te sferičnog oblika.

Čvrsti i tekući mostovi

Interakcije između čestica regulirane su odnosom između privlačnih (ili odbojnih) i gravitacijskih sila. Za sve čestice koje se nalaze u amorfnom stanju (ili iznad temperature staklastog prijelaza), sile koje uzrokuju da se primarne čestice drže skupa su privlačne sile između čestica (van der Waalsove i elektrostatske sile) te tekući i čvrsti mostovi (Hartley i sur., 1985; Seville i sur., 2000). Čvrsti most nastaje kao posljedica sinteriranja, čvrste difuzije, kondenzacije ili kemijske reakcije i proizlazi iz materijala koji se taloži između aglomeriranih čestica (Loncin i Merson, 1979). Tekući mostovi se odnose na kemijske interakcije između komponenata čestica i rezultat su prisutnosti rasutih tekućina (općenito nevezane vode ili rastaljenih lipida) između pojedinih čestica. Potencijal za stvaranje mostova ili ljepljivost ovisi o čimbenicima kao što su vlaga u prahu, sadržaj masti ili sadržaj šećera s malim molekulskim udjelom i oblik čestica (Barbosa-Canovas i sur., 2005).

Instant svojstva

Određuju se mjerenjem svojstava otapanja kada se aglomerati rasprše na površini tekućine (Schubert, 1987), a ta svojstva su:

- močivost – prodiranje tekućine u pore aglomerata zbog kapilarnih sila
- potapanje – potapanje aglomerata ispod površine tekućine
- disperzibilnost – disperzija aglomerata uz malo miješanja
- topljivost – otapanje topljivih aglomerata u tekućini

Instant proizvodi mogu se opisati kao aglomerati koji se moraju raspršiti i/ili brzo otopiti u hladnoj, kao i u toploj vodi ili mlijeku, s minimalnim miješanjem i bez nastajanja grudica, zaostajanja neotopljenog proizvoda te tvorbe taloga (Schubert, 1993). Aglomeracija praškastih proizvoda se koristi kako bi se poboljšala instant svojstva. Postupak se naziva instantizacija i primjenjuje se u proizvodnji mliječnih proizvoda (vruća čokolada, instant mlijeko, kakaov

prah), pića (čaj, kava) ili proizvoda na bazi škroba (juhe, umaci, koncentрати, dječja hrana) (Vissotto i sur., 2010). Primjenjuje se za poboljšanje transportnih svojstava proizvoda (tecičnost), vizualnih i senzorskih svojstava proizvoda te smanjenja gustoće i sposobnosti stvaranja kolača tijekom skladištenja. Fizikalna svojstva aglomeriranih proizvoda kao što su veličina čestica, poroznost, topljivost, močivost, oblik i nasipna gustoća ovise o tipu aglomeracije i primijenjenim parametrima procesa (Barkouti i sur., 2013). Dobar instant napitak ne sadrži čestice koje plutaju na površini niti talog na dnu posude nakon minimalnog miješanja.

Proces aglomeracije može se provoditi u kombinaciji s različitim tehnološkim operacijama kao što su sušenje, uparavanje i raspršivanje. Najčešće korišteni postupci aglomeracije mogu se podijeliti u sljedeće skupine:

- Aglomeracija pod tlakom – tabletiranje
- Aglomeracija rasta – peletiranje, granuliranje
- Aglomeracija sa sušenjem – aglomeracija raspršivanjem

Svaki od navedenih postupaka aglomeracije može se podijeliti na mokre, odnosno suhe, aglomeracijske metode, ovisno o tome jesu li u procesu korištene vezivne tekućine. Ukoliko se radi o mokroj aglomeraciji, odnosno o metodi gdje se vezivno sredstvo koristi u tekućem obliku, često se koristi izraz „granuliranje“ (Dhanalakshmi i sur., 2011).

3.6.2. Granuliranje u fluidiziranom sloju

Granuliranje u fluidiziranom sloju jedan je od najprikladnijih procesa za dobivanje aglomerata visoke poroznosti i dobre mehaničke otpornosti na rukovanje i pakiranje (Turchiuli i sur, 2005). Često se opisuje kao „one pot system“ odnosno „sistem jedne posude“ jer se svi osnovni koraci unutar procesa odvijaju u istoj komori. Voda ili vezive tvari raspršuju se pomoću mlaznice u kombinaciju fluidizirajućeg sloja čestica i vrućeg zraka, čime se na površini čestica formira tekući sloj koji omogućava međusobno sljepljivanje čestica. Kad se takva vlažna čestica u fluidizirajućem sloju sudari s drugom česticom između njih se formira tekući most. Naknadnim sušenjem otapalo isparava, a između čestica se formira čvrsti most uslijed skrućivanja vezivnog sredstva. Vezivno sredstvo raspršuje se u obliku otopine na površinu čestica, a ako je ono dostupno u praškastom obliku može se i izravno miješati s česticama. Vezivna sredstva predstavljaju svojevrsna ljepila čestica te se koriste kod aglomeriranja netopljivih čvrstih čestica kako bi se omogućilo stvaranje mosta među njima, a tokom

granuliranja omogućuju povećanje veličine čestice, čime se omogućava dobra protočnost mješavine tokom proizvodnog procesa, te omogućuju dobru kohezivnost prahova (Barbosa-Canovas i sur., 2005; Turchiuli i sur., 2005). Ovisno o položaju sapnica, postoje tri načina provedbe granuliranja u fluidiziranom sloju: gornjim raspršivanjem, donjim raspršivanjem i raspršivanjem unutar fluidizirajućeg sloja (Turchiuli i sur., 2005).

Granuliranje u fluidiziranom sloju gornjim raspršivanjem jedna je od najistraživanijih i najčešće korištenih metoda. Konvencionalno oblaganje gornjim raspršivanjem slično je sušenju u fluidiziranom sloju. Čestice praha struje u fluidizacijskoj komori dok sapnica na njih raspršuje otopinu oblagajućih čestica (slika 10). Obložene čestice putuju kroz zonu oblaganja u ekspanzijsku komoru nakon čega se vraćaju u fluidizacijski dio komore i dalje kruže kroz proces (Jones, 1994).

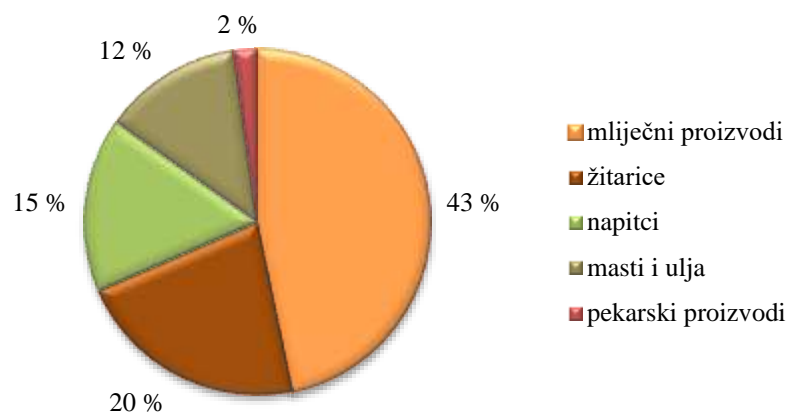


Slika 10. Prikaz granuliranja u fluidiziranom sloju gornjim raspršivanjem (Anonymous 3, 2016)

Primjena gornjeg raspršivanja pokazuje najveće mogućnosti primjene u prehrambenoj industriji zbog jednostavnosti, velikog volumena punjenja i prilagodljivosti (Benković i sur., 2011). Glavni nedostatak oblaganja gornjim raspršivanjem jest nemogućnost kontrole udaljenosti koju kapljice prijeđu prije nego se vežu na čestice jezgre. Također se javlja problem vezan uz isparavanje organskogotapala (Jones, 1985).

3.7. Funkcionalna hrana

Pojam funkcionalne hrane prvi puta se pojavljuje u Japanu 1984. godine, a vrlo brzo koncept je prihvaćen i u SAD-u i Europi te se u skladu s ubrzanim razvojem znanosti razvijala i proizvodnja funkcionalnih proizvoda. Japan, SAD i Europa su tri dominantna tržišta koja doprinose više od 90 % ukupne prodaje funkcionalnih proizvoda u svijetu (Bigliradi i Galati, 2013). Današnje tržište funkcionalne hrane može se kategorizirati u sljedeće glavne skupine (slika 11):



Slika 11. Kategorizacija tržišta funkcionalne hrane (Sanguansri i Augustin, 2009)

Tržište je doživjelo nevjerojatan rast od oko 100 % u razdoblju od 2010. do 2017. godine zbog povećane svijesti potrošača i interesa za promicanjem zdrave prehrane i načina života. Kao primjeri prodanih funkcionalnih proizvoda mogu se navesti: kruh sa cjelovitim žitaricama i vlaknima, mlijeko obogaćeno kalcijem i vitaminom D, voćni sokovi obogaćeni vitaminom C, margarin s fitosterolima, prebiotici (korijen cikorije i češnjak), probiotici (jogurt i kefir), jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama i slično (Kaur i Singh, 2017).

Koncept funkcionalne hrane razvijen je iz slijedećih razloga: poboljšavanja općeg stanja organizma, smanjivanja rizika od pojave nekih bolesti i/ili upotrebe u liječenju određenih bolesti. To je pridonijelo povećanju potražnje potrošača za funkcionalnom hranom (Day i sur., 2009). Posebno se javlja interes za obogaćivanjem proizvoda bioaktivnim komponentama biljnog podrijetla predstavljenih kao „multifunkcionalni dodaci prehrani“, zbog terapijskog učinka na organizam (Shahidi i Naczk, 2003) te se u razvoju nove funkcionalne hrane potiče na uporabu tradicionalne hrane i biljaka (Hacke i sur., 2016; Soltani i sur., 2017; Ramos i sur., 2017). Učinkovitost funkcionalne hrane u sprječavanju bolesti ovisi o očuvanju stabilnosti,

bioaktivnosti i biorasploživosti aktivnih spojeva (Betoret i sur., 2016). Ti zahtjevi predstavljaju veliki izazov jer mali udio molekula ostaje dostupan nakon oralne primjene, obično zbog nedovoljnog vremena zadržavanja u želucu, niske propusnosti i/ili topljivosti u crijevima, kao i nestabilnosti pod uvjetima procesa prerade ili probave hrane (van Laere i sur., 2000). Razvoj funkcionalne hrane postaje sve veći izazov, budući da mora ispunjavati očekivanja potrošača za proizvodima koji su istodobno senzorski prihvatljivi i zdravi. Funkcionalni sastojci, kao što su izolirani bioaktivni spojevi ili koncentrirani ekstrakti iz prirodnih izvora, mogu se ugraditi u konvencionalnu hranu, pružajući nove funkcionalne kategorije proizvoda i nove komercijalne mogućnosti. Međutim, izazov predstavlja osiguravanje stabilnosti, aktivnosti i biorasploživosti funkcionalnih sastojaka nakon procesiranja hrane i skladištenja (Morais i sur., 2018).

U posljednje vrijeme zbog ubrzanog načina života na tržištu su sve popularniji funkcionalni napitci i instant proizvodi koje karakterizira brza i jednostavna priprema. Zbog niskog udjela vode instant proizvodi nisu podložni kvarenju i kontaminaciji te gubitku nutrijenata čime im se produžuje rok trajnosti. Na tržištu se tako mogu naći različiti praškasti napitci kao što su instant kava, mlijeko u prahu, različiti instant čokoladni napitci, a u novije vrijeme i instant čajevi, energetska pića te nutricionističke mješavine za piće koje se koriste kao zamjena za obrok (Fellows, 2000; Nantz i sur., 2006). U tablici 1 prikazani su neki primjeri funkcionalnih proizvoda obogaćeni različitim bioaktivnim komponentama.

Tablica 1. Pregled funkcionalnih prehrambenih proizvoda obogaćenih s inkapsuliranim aktivnim sastojcima

Aktivna tvar/sastojak	Proizvod u koji je implementirana aktivna tvar/sastojak	Referenca
Ekstrakt Mate čaja <i>(Ilex paraguariensis L.)</i> Polifenoli iz sjemenki nara punikalagini) Ekstrakt sjemenki grejpfruta Klorogenska kiselina ekstrakta zelene kave <i>(Coffea canephora L.)</i>	Instant povrtna juha	Córdoba i sur., 2013
	Sladoled	Çam i sur., 2014
	Keksi	Davidov-Pardo i sur., 2015
	Instant kava	Corso i sur., 2016

Vitamini A i C, željezo, inulin	Instant kava	Benković i sur., 2014	
	Likopen	Kolač/biskvit	Rocha i sur., 2012
	Probiotička kultura <i>L. casei</i>	Sok od mrkve	Petreska-Ivanovska i sur., 2014
	Probiotička kultura <i>L. reuteri</i>	Čokoladni soufflé	Malmo i sur., 2013
	Bakterije mliječne kiseline	Kuhano mesno tijesto	Pérez-Chabela i sur., 2013
	Ekstrakt lista djeteline	Sojino ulje	Chatterjee i Bhattacharjee, 2013
	Polifenoli biljke stolisnika (<i>Achillea millefolium</i> L.)	Čokolada	Belščak-Cvitanović i sur., 2012
	Ekstrakt kore šipka (<i>Punica granatum</i> L.)	Sok od jabuke	Altunkaya i sur., 2013
	Probiotici	Mliječni proizvodi	Amine i sur., 2014
			Sohail i sur., 2012
		Voćni sokovi i drugi proizvodi od voća	Sohail i sur., 2012
	Prah različitih varijeteta rogača (<i>Ceratonia siliqua</i> L.)	Mlijeko u prahu	Krasaekoopt i Watcharapoka, 2014
			Srouer i sur., 2015
	Brašnasta banana (<i>Musa paradisiaca</i> L.) i golublji grašak (<i>Cajanus cajan</i> (L.) Millsp)	Proteinsko-energetski instant napitak	Bonilla i sur., 2016
Ekstrakt matičnjaka (<i>Melissa officinalis</i> L.)	Kolači/pekarski proizvodi	Caleja i sur., 2018	
Alkoholni ekstrakt šampinjona (<i>Agaricus biosporus</i>)	Jogurt	Francisco i sur., 2018	

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

4.1.1. Uzorci

U svrhu inkapsulacije polifenolnih spojeva, u ovom radu korišteni su sušeni listovi maslačka (*Taraxacum officinale* L.) (berba 2014. godina), podrijetlom iz Koprivničko-križevačke županije isušeni ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (berba 2015. godina), podrijetlom s Visa. Uzorci su kupljeni u trgovini specijaliziranoj za prodaju ljekovitog bilja, Suban d.o.o. (Strmec Samoborski, Hrvatska). Biljni uzorci prije ekstrakcije su usitnjeni do praškaste teksture te prosijani u svrhu postizanja ujednačene veličine čestica.

Za formuliranje praškastih mješavina namijenjenih pripremi napitaka korišten je alkalizirani kakaov prah smanjenog udjela masti (10-12 %) (Kraš d.d., Zagreb, Hrvatska). Isti kakaov prah korišten je kao dodatni materijal u sustavu alginatnog i pektinskog nosača. Za pripremu napitaka korišteno je mlijeko 'z bregov (2,8 % m.m.).

4.1.2. Kemikalije

Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke (p.a.) čistoće.

Inkapsulacija

- Natrijeva sol alginske kiseline niske viskoznosti (Sigma-Aldrich Company Ltd., Dorset, Velika Britanija)
- Pektin Classic CU 902 (Herbstreith & Fox KG, Neuenbürg/Württ., Njemačka)
- Kalcijev klorid, Gram mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Natrij citrat, T.T.T. d.o.o. (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Alkalizirani kakaov prah smanjenog udjela masti (10-12 %) Kraš d.d., (Zagreb, Hrvatska).

Granuliranje u fluidiziranom sloju

- Alkalizirani kakaov prah smanjenog udjela masti (10-12 %) Kraš d.d., (Zagreb, Hrvatska)
- Maltodekstrin, DE 16-19.9 (Cargill, Inc., Wayzata MN, SAD).
- Sojin lecitin u prahu (Cargill, Inc., Wayzata MN, SAD)

Određivanje udjela vode, topljivosti i disperzibilnosti

- Kvarcni pijesak (opran i žaren), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela ukupnih polifenola i ukupnih flavonoida

- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina (37 %-tna), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Formaldehid, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina, Sigma Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

Određivanje udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina

- Klorovodična kiselina (37 %-tna), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev nitrit, Gram-mol d.o.o.(Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev molibdat, Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- Natrijev hidroksid, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kafeinska kiselina, Sigma Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

Određivanje udjela flavan-3-ola metodom s vanilinom

- Klorovodična kiselina (37 %-tna), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Metanol, Mallinckrodt Baker B.V. (Amsterdam, Nizozemska)
- Vanilin, Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- (+)- katehin, Sigma Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

Određivanje udjela proantocijanidina metodom Bate-Smith

- n-butanol, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina (37%-tna), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Amonijželjezo(II)sulfatdodekahidrata, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- (-)- Epikatehin, Sigma Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

Određivanje udjela ukupnih tanina

- Natrijev karbonat dekahidrat, Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- Natrijev acetat trihidrat, Alkaloid, AD (Skopje, Makedonija)
- Octena kiselina (80%-tna), Alkaloid, AD (Skopje, Makedonija)

- Folin – Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Kazein, Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- Taninska kiselina, Sigma Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

- Etanol (96%-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev persulfat, Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeve soli (ABTS), Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Sigma Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

- Metanol, Mallinckrodt Baker B.V. (Amsterdam, Nizozemska)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH), Fluka (St. Gallen, Švicarska)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Sigma Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

HPLC analiza

- Redestilirana voda, AQUA pro injectione (Zagreb, Hrvatska)
- *o*-fosforna kiselina, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Metanol, Mallinckrodt Baker B.V. (Deventer, Nizozemska)
- Teobromin, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd (Tokyo, Japan)
- Kafein, Fluka (St. Gallen, Švicarska)
- Čikorinska kiselina, Sigma Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- Ružmarinksa kiselina, Sigma Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

4.1.3. Pribor i aparatura

Priprema ekstrakta

- Električni mlinac za kavu, United Favour Development (Kowloon, Hong Kong)
- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)

- Plamenik s azbestnom mrežicom
- Termometar, štoperica
- Čaše volumena 250 do 500 mL, menzura volumena 500 mL, stakleni štapić
- Metalno cjedilo, gaze

Inkapsulacija

- Plastična šprica volumena 5 mL, igla 23-27 G
- Čaše volumena 50 - 250 mL
- Metalno cjedilo, špatule
- Magneti
- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Magnetna miješalica, IKA C-Mag HS 7 (Staufen, Njemačka)
- Liofilizator, Martin Christ GmbH (Osterode am Harz, Germany)
- Uređaj za sušenje raspršivanjem, Büchi mini B-290 (Büchi Labortechnik AG, Švicarska)

Granuliranje u fluidiziranom sloju

- Čaše volumena 100-500 mL
- Magneti, stakleni štapić
- Peristaltička pumpa, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co (Eberstadt, Njemačka)
- Granulator s fluidiziranim slojem Uni-Glatt, Glatt GmbH (Binzen, Njemačka)
- Magnetna miješalica, IKA C-Mag HS 7 (Staufen, Njemačka)

Priprema napitaka na bazi kakaovog praha

- Čaše volumena 200 mL, stakleni štapić, staklena menzura 250 mL
- plamenik s azbestnom mrežicom
- termometar

Određivanje veličine čestica

- Laboratorijska tresilica, Analysette 3 PRO, FRITSCH (Idar Oberstein, Njemačka)
- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)

Određivanje udjela vode, topljivosti, disperzibilnosti

- Aluminijske posudice s poklopcima, termometar, eksikator, pinceta
- Plastične epruvete volumena 13-50 mL, čaše volumena 50 mL
- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Laboratorijski sušionik, Tehnica (Železniki, Slovenija)
- Centrifuga SL 8/ 8R, Thermo Scientific (Suzhou, Kina)

Određivanje nasipne gustoće i karakteristika tečenja prahova

- Volumetar i stakleni cilindar (250 mL), Engelsmann (Ludwigshafen, Njemačka)
- Uređaj za određivanje tečnosti prahova (Powder Flow Analyzer), Stable Micro Systems, (Godalming, Surrey, Velika Britanija)

Određivanje močivosti

- Čaše volumena 250 mL, stakleni štapić, štoperica

Određivanje boje čestica

- Kolorimetar, CM-700d, CM- A177, Konica Minolta (Tokio, Japan)
- Kiveta za određivanje boje

Određivanje spektrofotometrijskih metoda

- Staklene epruvete, staklene čaše volumena 250 mL, staklene menzure 50 mL i 250 mL
- Odmjerne tikvice volumena 10-500 mL
- Automatske mikropipete volumena 10-1000 μ L (Gilson, SAD), staklene pipete volumena 5 mL i 10 mL, propipete
- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Centrifuga SL 8/ 8R, Thermo Scientific (Suzhou, Kina)
- Kiveta za spektrofotometrijsko mjerenje
- Spektrofotometar Helios γ , ThermoSpectronic (Cambridge, Velika Britanija)
- Uređaj za homogenizaciju reakcijske smjese (Vortex V-1 plus), bioSanMedical-Biological Research & Technologies (Riga, Latvija)

HPLC analiza

- Celulozno-acetatni mikrofilteri veličine pora 0,45 µm (CA-45/25), Machery-Nagel (Düren, Njemačka)
- HPLC vijale s pripadajućim navojnim čepovima sa septom, Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)
- HPLC-PDA sustav Agilent 1200 Series (tekućinski kromatograf visoke učinkovitosti s PDA („Photo Diode Array“) detekcijom), Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)
- HPLC kolona ACE Excel 5 SuperC18 (250 x 4.6 mm, 5µm), Advanced Chromatography Technologies (Aberdeen, Škotska)

Senzorska analiza

- Čaše volumena 200 mL, stakleni štapić, staklena menzura 250 mL
- plamenik s azbestnom mrežicom
- termometar

4.2. Metode rada

4.2.1. Priprema polifenolnih ekstrakata maslačka i ružmarina

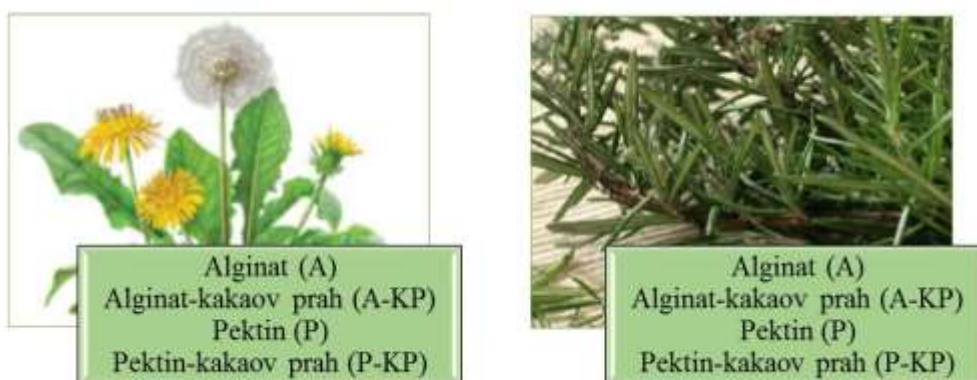
Ekstrakti maslačka (M) i ružmarina (R) pripremljeni su prelijevanjem 20 g usitnjenog uzorka s 200 mL destilirane vode, temperature 80°C. Ekstrakcija se provodila kroz vremenski period od 30 minuta uz konstantno miješanje i pri konstantnoj temperaturi od 80°C. Nakon ekstrakcije ekstrakti su procijeđeni kroz metalno cjedilo s nekoliko slojeva gaze te nadopunjeni do volumena od 200 mL i ohlađeni na sobnu temperaturu. Pripremljenim ekstraktima određen je udjel polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet.

4.2.2. Inkapsulacija polifenolnih ekstrakata maslačka i ružmarina

4.2.2.1. Inkapsulacija polifenolnih ekstrakata maslačka i ružmarina primjenom ionskog geliranja

Kao nosači za inkapsulaciju polifenolnih ekstrakata maslačka i ružmarina ionskim geliranjem korišteni su prirodni biopolimeri alginat i pektin. Zbog razlika u viskoznosti

alginatnih i pektinskih otopina, te u svrhu dobivanja sferičnih hidrogel čestica, otopina alginata pripremljena je u udjelu od 4% (w/v), a otopina pektina u udjelu od 6% (w/v). Obje otopine pripremljene su ekstraktu maslačka i ružmarina te ostavljene na magnetskoj miješalici do potpunog otapanja. Zbog poroznosti alginatnih i pektinskih hidrogelova, isti su često kombinirani s drugim biopolimernim materijalima. U ovom radu, u svrhu poboljšanja poroznosti te time sprječavanja otpuštanja bioaktivnih spojeva iz sustava nosača, alginat i pektin kombinirani su s kakaovim prahom, prirodnim materijalom koji do sada nije bio korišten u svrhu inkapsulacije. Kakaov prah otopljen je u udjelu od 20% (w/v) u ekstraktima maslačka i ružmarina, nakon čega je pomiješan s otopinama alginata i pektina u omjeru 20:80 (w/w). Pripremljeni binarni sustavi nosača homogenizirani su na magnetskoj miješalici tijekom 30 min pri 40°C. Na ovaj način, pripremljeno je 8 različitih otopina nosača za inkapsulaciju ionskim geliranjem (slika 12).



Slika 12. Pripremljeni alginatni i pektinski sustavi s inkapsuliranim polifenolnim ekstraktima maslačka i ružmarina

Postupak inkapsulacije ionskim geliranjem proveden je ukapavanjem odgovarajuće otopine nosača u otopinu gelirajućeg medija, koju je činila 3 %-tna (w/v) otopina kalcijeva klorida u ekstraktu maslačka i ružmarina. Otopina nosača (25 mL) prenesena je u plastičnu špricu volumena 5 mL te istiskivana kroz iglu od 23-27 G u otopinu gelirajućeg medija koja se konstantno miješala, pri čemu je uslijed interakcije guluronskih jedinica alginata i kalcijevih iona došlo do formiranja sferičnih kuglica alginatnog i pektinskog gela. Nakon formiranja čestica, iste su u svrhu očvršćivanja miješane na magnetskoj miješalici dodatnih 30 minuta, nakon čega su izdvojene iz otopine gelirajućeg medija, isprane ekstraktom maslačka ili ružmarina i spremljene u ekstrakt na +4°C na tamnom mjestu.

4.2.2.2. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije ukupnih polifenola

Dobivenim hidrogel česticama na bazi alginata i pektina određena je učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola. Udjel ukupnih polifenolau formiranim hidrogel česticama na bazi alginata i pektina određen je otapanjem 0,5 g hidrogel čestica u 2%-tnoj otopini natrijevog citrata (w/v), uz snažno miješanje na magnetskoj miješalici, do potpunog otapanja hidrogel čestica. Udjel ukupnih polifenola u otopini razbijenih čestica određen je primjenom Folin-Ciocalteau reagensa (poglavlje 4.4.1.). Učinkovitost inkapsulacije polifenola (%) izračunata je kao omjer udjela ukupnih polifenola u otopini citrata razbijenih čestica i udjela istih spojeva u početnim otopinama sustava nosača pripremljenih u ekstraktu maslačka i ružmarina. Za svaku biljnu vrstu odabran je jedan sustav koji je imao najveći postotak inkapsulacije ukupnih polifenola, te su te čestice odabrane za obogaćivanje praškastih mješavina na bazi kakaovog praha. U tu svrhu odabrane čestice (maslačak - sustav alginat - kakaov prah, ružmarin - sustav pektin - kakaov prah) su liofilizirane.

4.2.2.3. Inkapsulacija polifenolnih ekstrakata maslačka i ružmarina primjenom sušenja raspršivanjem

Sustavi nosača s najvećim postotkom zadržavanja polifenola također su odabrani kao otopine za inkapsulaciju ekstrakta maslačka (alginat-kakaov prah) i ružmarina (pektin-kakaov prah) primjenom sušenja raspršivanjem. U ovom slučaju, alginat u ekstraktu maslačka i pektin u ekstraktu ružmarina pripremljeni su u udjelu od 4 % (w/v) te miješani na magnetskoj miješalici do potpunog otapanja. Koncentracija biopolimera odabrana je u svrhu adekvatnog i kontinuiranog raspršivanja otopine nosača kroz mlaznicu uređaja. I ovdje, kakaov prah pomiješan je s otopinama alginata i pektina u omjeru 20:80 (w/w) te homogeniziran na miješalici tijekom 30 min pri 40 °C. Tako pripremljene otopine (200 g), uz konstantno miješanje, podvrgnute su sušenju raspršivanjem u laboratorijskom uređaju Büchi mini B-290 (Büchi Labortechnik AG, Švicarska) prema navedenim parametrima: promjer mlaznice za raspršivanje 0,7 mm; ulazna temperatura zraka za sušenje 130 ± 3 °C; izlazna temperatura 56 ± 2 °C; protok zraka 536 L/h; protok ulazne otopine 8 mL/min; atomizacijski tlak 6 psi; brzina pumpe 30 %.

Dobiveni inkapsulirani ekstrakti maslačka i ružmarina sakupljeni su nakon hlađenja, spremljeni u odgovarajuće polietilenske vrećice i skladišteni pri temperaturi od 4 °C na suhom i tamnom mjestu.

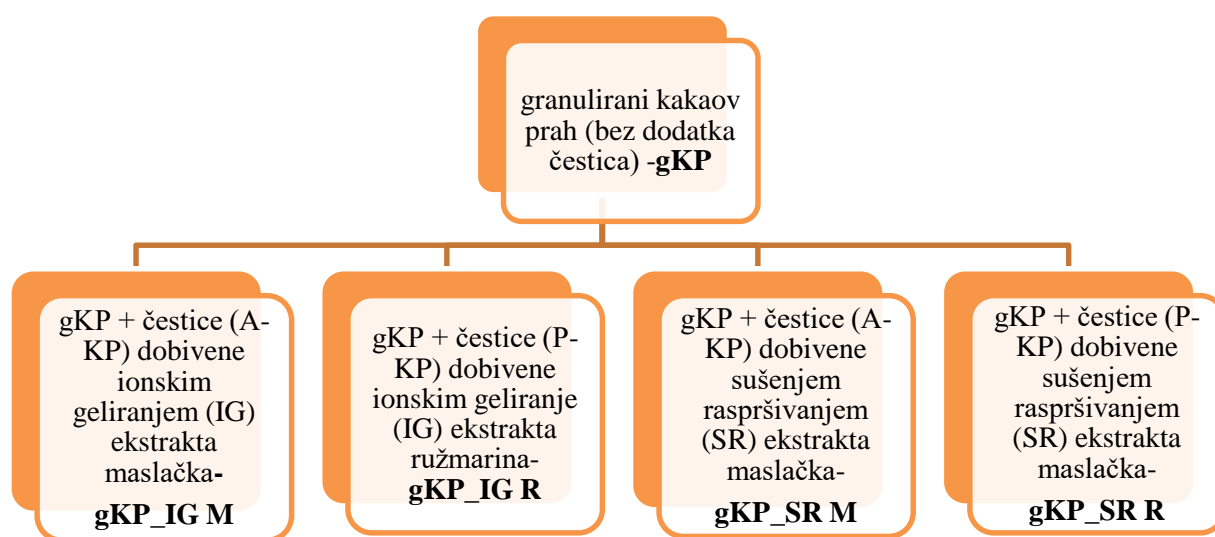
4.2.3. Granuliranje u fluidiziranom sloju

Granuliranje praškastih mješavina na bazi kakaovog praha provedeno je u laboratorijskom granulatoru s fluidiziranim slojem Uni-Glatt, GlattGmbH (Binzen, Njemačka), uz primjenu postupka mokrog granuliranja. Uzorak kakaovog praha koji nije bio podvrgnut procesu granuliranja (negrulirani kakaov prah) koristio se kao kontrolni uzorak (oznaka KP). Kao vezivo korišten je maltodekstrin (DE 16-19.9) dobiven enzimskom konverzijom škroba kukuruza, u koncentraciji od 8 % (w/w) računato na suhu masu u sustavu. Lecitin je dodan u sustav kao emulgator, u koncentraciji od 2 % (w/w) računato na ukupnu suhu masu u sustavu, pri čemu je otopljen u vodi zajedno s maltodekstrinom. Tijekom procesa granuliranja, 60 g otopine maltodekstrina i lecitina peristaltičkom pumpom doziralo se u granulator u kojem se nalazio fluidizirani sloj kakaovog praha (300 g). U slučaju obogaćenih uzoraka, kakaov prah je skupa s inkapsuliranim sustavima doziran u granulator, pri čemu je udjel dodanih liofiliziranih čestica iznosio 5 % ukupne mase kakaovog praha koja je ulazila u sustav. Otopina veziva se nakon ulaska u granulator dvo-fluidnim raspršivačem odozgo („top-spray“ mode, gornje raspršivanje) dodavala u fluidizirani sloj sustava koji se želio okrupniti. Vrijeme doziranja veziva iznosilo je između 525 i 608 sekundi, dok je maseni protok veziva bio 8,96 g/min za čisti granulirani uzorak kakaovog praha te 7,70 g/min za obogaćene uzorke kakaovog praha. U tablici 2. nalaze se procesni parametri korišteni u postupku granuliranja.

Tablica 2. Procesni uvjeti mokrog granuliranja u fluidiziranom sloju za praškaste mješavine na bazi kakaovog praha

Procesni uvjeti	Vrijednost	Jedinica
Promjer otvora sapnice	0,8	mm
Širina mlaza (regulirana i iskazana pozicijom gornjeg elementa raspršivača)	2,0	Okretaja od 0.-og položaja/najužeg mlaza
Temperatura ulaznog zraka	50	°C
Tlak zraka za raspršivanje veziva	1	bar
Volumni protok zraka zafluidizaciju	3,73 E ⁻²	m ³ /s

Nakon postupka granuliranja, formulirane su sljedeće praškaste mješavine namijenjene pripremi napitaka na bazi kakaovog praha (slika 13):



Slika 13. Granulirane praškaste mješavine namijenjene pripremi napitaka na bazi kakaovog praha

Nakon skupljanja uzoraka, isti su spremljeni u odgovarajuće plastične posude na tamno mjesto pri sobnoj temperaturi, gdje su čuvani kroz šest mjeseci.

4.2.4. Priprema napitaka na bazi kakaovog praha za određivanje bioaktivnog profila

Praškaste mješavine na bazi kakaovog praha pripremljene su s vodom i mlijekom (2,8 % m.m.), simulirajući uobičajeni način pripreme u kućanstvu (prema uputama proizvođača instant kakaovih proizvoda). Za pripremu, 15 g uzorka preliveno je s 200 mL kipuće destilirane vode, odnosno s 200 mL mlijeka zagrijanog na temperaturu 80-90 °C te povremeno miješano 5 minuta staklenim štapićem. Uzorci pripremljeni s vodom centrifugirani su 5 min na 8000 rpm-a, nakon čega je skupljen supernatant koji se dalje koristio za određivanje bioaktivnog profila.

Kod uzoraka pripremljenih s mlijekom, nakon miješanja 5 min, određeni alikvot uzorka pomiješan je s 5 puta većim volumenom metanola, s ciljem uklanjanja proteina iz mlijeka te u svrhu dobivanja bistrih ekstrakata potrebnih za adekvatno provođenje analiza. Nakon miješanja s metanolom, uzorak se centrifugirao 5 min na 8000 rpm-a, nakon čega je odvojen supernatant koji se koristio za daljnje analize.

Kod uzoraka koji su obogaćeni česticama s inkapsuliranim polifenolima maslačka i ružmarina (gKP_IG M i gKP_IG R, gKP_SR M, gKP_SR R), 15 g praškaste mješavine sadržavalo je točno 5 % (w/w) liofiliziranih čestica.

Svi napitci pripremljeni su u duplikatu te im je ispitan bioaktivni sastav (udjel polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet) odmah nakon pripreme te nakon 6 mjeseci skladištenja praškastih mješavina.

4.3. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika praškastih mješavina na bazi kakaovog praha

4.3.1. Veličina čestica

Veličina čestica određena je granulometrijskom analizom. Prahovi su prosijavani pomoću laboratorijske tresilice Analysette 3 PRO (FRITSCH, Njemačka) s amplitudom vibracije od 1,5 mm i s vremenskim intervalom prosijavanja od 3 sekunde. Uzorci su prosijani kroz seriju sita veličine 1,25 mm, 1,12 mm, 1,00 mm, 900 µm, 710 µm, 355 µm, 180 µm i 125 µm koja su međusobno povezana i smještena na vibrirajuću podlogu. Nakon provedenog prosijavanja, izračunat je % frakcije zaostale na odgovarajućem situ.

4.3.2. Udjel vode

Udjel suhe tvari, odnosno vode, određen je prema modificiranoj metodi AOAC 930.15 (AOAC, 1990). Sušenjem uzorka do konstantne mase mjeri se masa suhe tvari, budući da dolazi do isparavanja slobodne vode na temperaturi od 105 °C. Udjel suhe tvari izračunava se u odnosu na početnu masu uzorka koji se suši.

U prethodno izarene, osušene i izvagane aluminijske posudice s kvarcnim pijeskom i poklopcem odvagana je 1 g ($\pm 0,0001$) uzorka. Uzorci su sušeni na 105 °C do konstantne mase. Nakon isteka vremena sušenja, posudice se poklope u sušioniku i prenesu u eksikator gdje se hlade na sobnoj temperaturi i važu na analitičkoj vagi. Udjel vode u uzorcima izračuna se iz gubitka mase prema formuli:

$$\% \text{ vode} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} * 100 \quad [1]$$

gdje je:

m_1 – masa prazne aluminijske posudice (g)

m_2 – masa aluminijske posudice s uzorkom prije sušenja (g)

m_3 – masa aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost mjerenja ($n=2$) s pripadajućom standardnom devijacijom.

4.3.3. Topljivost

Topljivost se odnosi na brzinu i opseg u kojem se sastojci čestica praha otapaju u vodi (Aguilera i sur., 1995). Topljivost je određena prema modificiranoj metodi Takashia i Seibia (1998). 2,5 g uzorka suspendirano je u 25 mL destilirane vode temperature 30 °C. Suspenzija je povremeno miješana 30 minuta, a nakon toga centrifugirana 15 minuta na 8000 rpm-a. Cijeli volumen dobivenog supernatanta kvantitativno je prenesen u prethodno izarene aluminijske posudice te sušen na 105 °C do konstantne mase. Mjerenje je provedeno u paralelama, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost mjerenja ($n=2$) s pripadajućom standardnom devijacijom.

Za određivanje topljivosti u vodi (%) koristi se masa osušenog uzorka prema formuli:

$$\% \text{ topljivosti} = \frac{m_3 - m_1}{m_2} * 100 \quad [2]$$

gdje je:

m1 – masa praznog lončića (g)

m2 – masa uzorka (g)

m3 – masa lončića s uzorkom nakon sušenja (g)

4.3.4. Disperzibilnost

Disperzija opisuje lakoću kojom se prah može distribuirati kao jedinstvene čestice preko površine i kroz smjesu rekonstituirane vode (Aguilera i sur., 1995).

Disperzibilnost je određena prema modificiranoj metodi Jinapong i suradnika (2008). 1 g svakog uzorka dodan je u 10 mL destilirane vode sobne temperature. Otopina se miješala 15 sekundi pokretima naprijed-nazad i potom centrifugirala 10 minuta na 8000 rpm-a, nakon čega je 1 mL skupljenog supernatanta kvantitativno prenesen u prethodno izžarene aluminijske posudice te sušen na 105 °C do konstantne mase. Mjerenje je provedeno u paralelama, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost mjerenja (n=2) s pripadajućom standardnom devijacijom.

Disperzibilnost je određena prema formuli:

$$\% \text{ disperzibilnosti} = \frac{(10+a) * \% S.TV}{a * \frac{100-b}{100}} \quad [3]$$

gdje je:

a – masa uzorka (praha) (g)

S.TV. – suha tvar supernatanta dobivenog nakon centrifugiranja (%)

b – udjel vode u uzorku (prahu)

4.3.5. Nasipna gustoća

Nasipna gustoća je određena prema modificiranoj metodi Murakamija i suradnika (2001). Uzorak je usipan u plastični cilindar volumena 250 mL. Zabilježena je masa praznog cilindra, masa cilindra napunjenog uzorkom i očitana je volumen koji je zauzeo uzorak. Nasipna gustoća („bulk density“) u g/cm³ određena je kao omjer mase uzorka u cilindru i volumena uzorka u cilindru prema formuli:

$$\text{Nasipna gustoća (g/cm}^3\text{)} = \frac{\text{muzorak (g)}}{\text{Vuzorak (cm}^3\text{)}} \quad [4]$$

Cilindar je zatim namješten na volumetar te je očitani volumen koji je uzorak zauzeo nakon 10 udaraca („loose density“ volumen) i nakon 100 udaraca („tapped density“ volumen). Vrijednosti za „loose“ i „tapped“ gustoću (g/cm³) izražene su kao omjer mase uzorka usipanog u cilindar i očitanih volumena nakon 10 udaraca („loose“), odnosno 100 udaraca („tapped“). Mjerenje je provedeno u triplikatu te su rezultati izraženi kao srednja vrijednost (n=3) mjerenja s pripadajućom standardnom devijacijom.

Preko vrijednosti nasipnih gustoća određuju se Carr indeks koji predstavlja svojstvo tečenja (Carr, 1965) i Hausnerov omjer (HR) kao svojstvo kohezivnosti (Hausner, 1967). To su bezdimenzijske veličine pomoću kojih se određuje kompresibilnost praškastih proizvoda. Carr indeks i Hausnerov omjer izračunavaju se preko dobivenih vrijednosti za nasipnu gustoću (ρ_{bulk}) i gustoću nakon protresivanja 100 puta (ρ_{tapped}). Rezultati za Carr indeks i Hausnerov omjer izraženi su kao srednja vrijednost (n=3) mjerenja s pripadajućom standardnom devijacijom. Formula za izračunavanje Carr indeksa je:

$$\text{Carr indeks} = \frac{(\rho_{\text{tapped}} - \rho_{\text{bulk}})}{\rho_{\text{tapped}}} * 100 \quad [5]$$

Ovisno o vrijednosti Carr indeksa, uzorci se svrstavaju u kategorije navedene u tablici 3.

Tablica 3. Karakterizacija tecivosti prahova prema Carr indeksu

Carr indeks	Tecivost
< 15	vrlo dobra
15-20	dobra
20-35	dovoljna
35-45	loša
>45	vrlo loša

Formula za izračunavanje Hausnerovog omjera je:

$$HR = \frac{\rho_{tapped}}{\rho_{bulk}} \quad [6]$$

Ovisno o vrijednosti HR omjera, uzorci se svrstavaju u kategorije navedene u tablici 4.

Tablica 4. Karakterizacija kohezivnosti prahova prema Hausnerovom omjeru (HR)

HR	Kohezivnost
<1,2	niska
1,2-1,4	srednja
>1,4	visoka

4.3.6. Indeks kohezije i sposobnost stvaranja kolača

Karakteristike tečenja prahova određene su pomoću uređaja za određivanje tecivosti prahova (Powder Flow Analyzer), proizvođača Stable Micro Systems (Godalming, Surrey, Velika Britanija). Za svaki uzorak provedena su dva testa: test kohezivnosti i test sposobnosti stvaranja kolača. Indeks kohezije određen je tzv. „quick testom“, a čvrstoća i sposobnost stvaranja kolača „caking testom“. Svaki test daje kvantitativne podatke o protoku praha na temelju različitih načina kontrola tečenja prahova.

Uređaj se sastoji od prozirnog staklenog cilindra (120 mm visina i 50 mm unutarnji promjer) i specifične rotirajuće oštrice (48 mm promjer i 10 mm visina) koja se može kretati gore i dolje uz lijevu i desnu rotaciju. Uzorci su prebačeni u cilindar na način da zauzimaju volumen od 160 mL.

Quick test provodi se u svrhu određivanja koeficijenta kohezije i indeksa kohezije. Prije provedbe same analize uzoraka, instrument je izvršio korak pripremanja uzorka u 2 ciklusa pri čemu se uklanja pritisak i „normalizira“ prah nakon usipavanja. Spuštanjem i dizanjem oštrice kroz uzorak brzinom od 20 mm/s mjeri se kohezivnost uzorka. Oštrica se spušta kroz kolonu metodom „sječanja“ i uzrokuje minimalno sabijanje uzorka. Kad se oštrica kreće prema gore kroz kolonu praha, mjeri se snaga kojom prah djeluje na bazu posude. Koeficijent kohezije

izračunava se integriranjem površine ispod negativne krivulje udaljenosti/sile pomoću Texture Exponent 32 software-a. Indeks kohezije (CI) definira se kao omjer koeficijenta kohezije i mase uzorka. Ovisno o vrijednosti indeksa kohezije, prahovi se svrstavaju u slobodno tecive (CI je ≤ 11), lako tecive (CI između 11 i 14), kohezivne (CI između 14 i 16), vrlo kohezivne (CI između 16 i 19) i izrazito kohezivne (CI > 19). Quick test je proveden jednom u tri paralele po uzorku.

Osim kohezivnosti, određena je i sposobnost stvaranja kolača „caking testom“. Sposobnost stvaranja kolača ovisi o kohezivnosti, efikasnosti pakiranja, nasipnoj gustoći materijala, interakcijama među česticama i udjelu vlage u okolini.

Instrument vrši pripremu uzorka u 2 ciklusa, a spuštanjem oštrice u narednih pet ciklusa vrši se sabijanje uzorka i stvaranje tzv. kolača. Prilikom kondicioniranja uzorka, oštrica ravna prah na vrhu stupca i mjeri visinu kolone. Kretanjem oštrice prah se sabija određenom silom. Kad se postigne određena sila, oštrica se diže, a navedeni postupak se ponavlja u naredna četiri ciklusa. U posljednjem, petom ciklusu, kad se postigne ciljana sila, oštrica mijenja smjer i reže kolač koji se formirao u cilindru. Izmjerena sila predstavlja rad potreban za rezanje kolača izražen u g mm (snaga kolača - „cake strength“), dok prosječna snaga kolača („mean cake strength“) podrazumijeva prosječnu silu potrebnu za rezanje kolača izraženu u gramima (g) (Benković i sur., 2013). Test je proveden jednom u tri paralele po uzorku.

Rezultati za indeks kohezije i sposobnost stvaranja kolača izraženi su kao srednja vrijednost (n=3) mjerenja s pripadajućom standardnom devijacijom.

4.3.7. Močivost

Močivost ili vrijeme močenja izraženo je kao vrijeme potrebno da čestice praha probiju površinu medija sobne temperature te se istalože na dno posude (Schubert, 1980). U čašu volumena 250 mL dodano je 50 mL destilirane vode sobne temperature. Uzorci su usipani preko filter papira te je mjereno vrijeme (min) da se sav prah istaloži na dno posude. Mjerenja su provedena u duplikatu (n=2).

4.3.8. Parametri boje

Određivanje boje praškastih uzoraka provedeno je difuzno reflektirajućom spektrofotometrijom na kolorimetru (Konica Minolta, Sensing, CM – 700d, CM – A177, Japan), pri čemu je dobivena reflektancija uzoraka u čitavom području vidljivog spektra te L^* ,

a^* i b^* vrijednosti. Nelinearni odnosi za L^* , a^* i b^* vrijednosti imaju zadatak imitirati logaritamski odgovor ljudskog oka. Ljudsko oko ima receptore za kratke (S), srednje (M) i duge (L) valne duljine koji su poznati kao plavi, zeleni i crveni receptori. Sukladno tome, L^* vrijednost je osvjetljenje ili svjetlosna komponenta, koja ima vrijednosti u rasponu 1-100, dok su a^* (od zelene do crvene) i b^* (od plave do žute) dvije kromatske vrijednosti u rasponu od -120 do 120 (Gökmen i Sügüt, 2007). Za potrebe analize, praškaste mješavine na bazi kakaovog praha prenesene su u odgovarajuću kivetu promjera 30 mm, tako da se u potpunosti prekrije dno posudice i formira homogeni sloj uzorka. Područje mjerenja podešeno je na 400 do 700 nm, što odgovara vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra. Kontrola mjerenja provedena je korištenjem računalne aplikacije SpectraMagic NX. Sva mjerenja izvršena su u SCI („Specular Component Included“) modu, koji predstavlja način mjerenja boje uzorka pri kojemu se uračunavaju sjene, tj. uzorak se prikazuje onako kako ga vidi ljudsko oko (Gökmen i Sügüt, 2007). Na temelju rezultata mjerenja, ukupna promjena boje (ΔE) u odnosu na referentni uzorak (negrulirani kakakov prah) izračunata je prema formuli:

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L_{ref}^*)^2 + (a^* - a_{ref}^*)^2 + (b^* - b_{ref}^*)^2} \quad [7]$$

gdje je:

ΔE - promjena boje ispitivanih uzoraka u odnosu na referentni

L^* - svjetlina boje ispitivanog uzorka u $L^*a^*b^*$ sustavu

a^* - parametar boje ispitivanog uzorka (crveno)

b^* - parametar boje ispitivanog uzorka (žuto)

L^*_{ref} - svjetlina boje referentnog uzorka (negrulirani kakaov prah)

a^*_{ref} - parametar boje referentnog uzorka (crveno) (negrulirani kakaov prah)

b^*_{ref} - parametar boje referentnog uzorka (žuto) (negrulirani kakaov prah)

Ukupna razlika u boji čestica (ΔE) predstavlja kolorimetrijski parametar koji se intenzivno koristi za karakterizaciju varijacije boje u hrani tijekom obrade (Benković i sur., 2011).

4.4. Određivanje bioaktivnog profila napitaka na bazi kakaovog praha

4.4.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s nekim reducirajućim reagensom kao što su fenoli. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfomolibdenove i fosfovolframove kiseline koji reagira s fenoksid ionom pri čemu se fenoksid ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenog molibdenovog i volframovog oksida (Singleton i sur., 1999). Nakon dva sata reakcije, u kojoj svi fenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na 765 nm (Ough i Amerine, 1988). Intenzitet obojenja direktno je proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

U staklene epruvete otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100 μ L uzorka, 500 μ L Folin-Ciocalteu reagensa (razrijediti vodom u omjeru 1:2) te 1,5 mL 20%-tne otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3) te se reakcijska smjesa u epruvetama dobro izmiješa. Tako pripremljeni uzorci ostave se stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbanacija razvijenog plavog obojenja na 765 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorci koji se ispituju, samo umjesto 100 μ L uzorka sadrži isti volumen destilirane vode. ApSORBANCIJU slijepa probe potrebno je oduzeti od apSORBANCIJE uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata. Mjerenje je provedeno u duplikatu, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ($n=2$) provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama.

Na osnovu jednadžbe baždarnog pravca, rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline (EGK)/g biljnog materijala ili mg EGK/L napitka.

$$y = 0,0010x - 0,0001 \quad [8]$$

gdje je:

y- izmjerena vrijednost apSORBANCIJE pri 765 nm.

Ako je u postupku korišten razrijeđen uzorak izračunata vrijednost morase pomnožiti s faktorom razrjeđenja originalnog uzorka.

4.4.2. Određivanje udjela ukupnih flavonoida i neflavonoida

Za taloženje flavonoidnih spojeva koristi se formaldehid koji reagira s C-6 ili C-8 na 5,7-dihidroksi flavonoidu stvarajući metilol derivate koji dalje reagiraju s drugim flavonoidnim

spojem također na C-6 ili C-8 položaju itd. Kondenzirane molekule nastale ovom reakcijom uklone se filtriranjem, a ostatak neflavonoidnih polifenola određuje se prema metodi za ukupne polifenole (Ough i Amerine, 1988).

U Eppendorf epruvete otpipetira se 0,5 mL uzorka, 250 μ L otopine klorovodične kiseline (razrijeđena s vodom 1:4) i 250 μ L formaldehida. Epruvete se zatvore, izmiješaju i ostave stajati 24 sata na mračnom i hladnom mjestu, nakon čega se u tako pripremljenim otopinama odredi udjel ukupnih neflavonoida, i to prema prethodno opisanom postupku određivanja ukupnih polifenola s Folin-Ciocalteu reagensom.

Udjel ukupnih neflavonoida izračunat je prema jednadžbi baždarnog pravca korištenoj za izračun udjela ukupnih polifenola. Rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline (EGK)/g biljnog materijala ili mg (EGK)/L napitka.

Udjel ukupnih flavonoida izračunava se kao razlika udjela prethodno određenih ukupnih polifenola i neflavonoida prema formuli:

$$\text{ukupni flavonoidi} = \text{ukupni polifenoli} - \text{ukupni neflavonoidi} \quad [9]$$

4.4.3. Određivanje udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina

Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina bazira se na reakciji kiselinske hidrolize koja je popraćena nastankom ružičasto-crvenkastog obojenja čiji se intenzitet određuje mjerenjem apsorbancije na 490 nm, pri čemu je udjel ukupnih hidroksicimetnih kiselina direktno proporcionalan intenzitetu obojenja u ispitivanom uzorku (Matkowski i sur., 2008).

Za određivanje udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina, 500 μ L uzorka pomiješa se u epruveti sa 1 mL 0,5 M klorovodične kiseline, 1 mL Arnou-og reagensa (otopina 10%-tnog natrijevog nitrita i 10%-tnog natrijevog molibdata), 1 mL 8,5 %-tne vodene otopine NaOH te se doda 1,5 mL destilirane vode. Sadržaj epruvete se zatim izmiješa te se apsorbancija odmah očita na 490 nm (Matkowski i sur., 2008). Slijepa proba umjesto uzorka sadrži destiliranu vodu. Mjerenje je provedeno u duplikatu, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti (n=2) provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama.

Na osnovu jednadžbe baždarnog pravca, rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata kafeinske kiseline (KK)/g biljnog materijala ili mg KK/L napitka.

$$y = 0,0025x + 0,0054 \quad [10]$$

gdje je:

y- izmjerena vrijednost apsorbancije pri 490 nm.

Ako je u postupku korišten razrijeđen uzorak izračunata vrijednost mora se pomnožiti s faktorom razrjeđenja originalnog uzorka.

4.4.4. Određivanje udjela flavan-3-ola metodom s vanilinom

Metoda se temelji na reakciji vanilina (*p*-hidroksibenzaldehida) s alkoholnim skupinama na položajima C-6 i C-8 u molekulama flavan-3-ola, pri čemu nastaje crveno obojeni kompleks. Intenzitet crvenog obojenja, koji se određuje spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 500 nm, direktno je proporcionalan koncentraciji flavan-3-olnih monomera (katehina) i polimera (proantocijanidina) (Price i sur., 1978).

Pripremi se 4 %-tna otopina vanilina u metanolu. U tamnu epruvetu doda se 0,5 mL uzorka i 3 mL prethodno pripremljene otopine vanilina. Epruvete se stave u hladnu vodenu kupelj i nakon 5 minuta doda se 1,5 mL koncentrirane klorovodične kiseline te se reakcijska smjesa u epruveti izmiješa. Nakon 15 minuta očita se apsorbancija na 500 nm (Di Stefano i sur., 1989). Slijepa proba priprema se na isti način, posebno za svaki uzorak, ali se umjesto 4%-tne otopine vanilina dodaje čisti metanol. Mjerenje je provedeno u duplikatu, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ($n=2$) provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama. Na osnovu jednadžbe baždarnog pravca, rezultati se izražavaju kao mg (+)- katehina/g biljnog materijala ili mg (+)- katehina/L napitka.

$$\text{mg (+)-katehina/L} = 290,8 \times \Delta A \times \text{razrjeđenje} \quad [11]$$

gdje je:

ΔA = razlika apsorbancije između uzorka i slijepe probe.

4.4.5. Određivanje udjela proantocijanidina metodom Bate-Smith

Ova metoda razvijena je modifikacijom metode po Bate–Smithu (1973), a temelji se na kiselinskoj hidrolizi polimernih molekula procijanidina s klorovodičnom kiselinom, pri čemu nastaju jednostavni cijanidini. Reakcija je popraćena nastankom crvenog obojenja čiji se intenzitet mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 550 nm (Porter i sur., 1986).

1 mL uzorka razrijeđenog 1:10 u 70 %-tnom acetonu otpipetira se u staklenu vialu, nakon čega se doda 2 mL otopine butanol/HCl (95:5) i 100 µL 2 % $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ u 2 M HCl-u. Suspenzija se dobro izmiješa te zagrijava 45 minuta na 95°C. Nakon zagrijavanja, smjesa se ohladi i očita se apsorbancija na 550 nm. Slijepa proba priprema se po istom postupku, ali umjesto uzorka sadrži 70 %-tni aceton. Mjerenje je provedeno u duplikatu, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti (n=2) provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama.

Na osnovu jednadžbe baždarnog pravca, rezultati se izražavaju kao mg (-)- epikatehina/g biljnog materijala ili mg (-)- epikatehina/L napitka.

$$y = 0,00072x - 0,00068 \quad [12]$$

gdje je:

y- izmjerena vrijednost apsorbancije pri 550 nm.

Ako je u postupku korišten razrijeđen uzorak izračunata vrijednost mora se pomnožiti s faktorom razrjeđenja originalnog uzorka.

4.4.6. Određivanje udjela ukupnih tanina

Postupak određivanja bazira se na vezanju tanina na kazein (Rusak i sur., 1993). 1,5 mL uzorka pomiješa se sa 6 mL destilirane vode i dopuni s 7,5 mL acetatnog pufera (pH=5,0). Tako se dobije otopina O1. 10 mL otopine O1 miješa se sa 25 mg kazeina tijekom 60 min, pri čemu se vrši adsorpcija tanina, otopina se zatim profiltrira te se tako dobije otopina O2. U 1 mL otopine O1 doda se 0,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 8,5 mL 33 %-tne otopine natrijevog karbonata, reakcijska smjesa se dobro promiješa te se izmjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja pri 720 nm. Isti postupak ponovi se s otopinom O2. Slijepa proba priprema se na isti način, ali se umjesto uzorka dodaje destilirana voda. Svaki uzorak priprema se u dvije paralelne probe. Apsorbancija uzorka O1 odgovara udjelu ukupnih polifenola, dok razlika apsorbancija uzoraka O1 i O2 odgovara udjelu tanina (koji su vezani na kazein). Mjerenje je provedeno u duplikatu, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti (n = 2)provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama.

Na osnovu jednadžbe baždarnog pravca, rezultati se izražavaju kao mg taninske kiseline (TK)/g biljnog materijala ili mg TK/L napitka.

$$y = 0,004x + 0,0294 \quad [13]$$

gdje je:

y- izmjerena vrijednost apsorbancije pri 720 nm.

Ako je u postupku korišten razrijeđen uzorak izračunata vrijednost mora se pomnožiti s faktorom razrjeđenja originalnog uzorka.

4.4.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Ova metoda temelji se na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kationa), koji se formira bilo kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Za oksidaciju otopine ABTS-a koristi se otopina kalijevog persulfata, pri čemu se maksimum apsorbancije dostiže na valnim duljinama od 645 nm, 734 nm ili 815 nm. Dodatak antioksidansa rezultira redukcijom prethodno generiranog ABTS radikala, što uvelike ovisi o vremenu, i mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima (Re i sur., 1999).

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka pripremi se otopina ABTS+ radikala, oksidacijom vodene otopine ABTS reagensa (7 mM) s kalijevim persulfatom (140 mM) do konačne koncentracije otopine kalijevog persulfata od 2,45 mM. Budući da ABTS i kalijev persulfat reagiraju u stehiometrijskom odnosu 1:0,5, neće doći do potpune oksidacije te je stoga potrebno pripremljenu otopinu omotati folijom i ostaviti stajati preko noći (12-16 h) na sobnoj temperaturi. Na dan analize otopina se razrijedi etanolom (96%-tnim) do konačne koncentracije ABTS+ radikala od 1 %, tako da apsorbancija te otopine iznosi $0,70 \pm 0,02$.

Volumen od 40 μ L uzorka pomiješa se s 4 mL otopine ABTS+ radikala u tamnoj epruveti te se izmjeri apsorbancija na 734 nm nakon točno 6 minuta. Prije mjerenja uzoraka potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se, umjesto uzorka, 40 μ L vode pomiješa s istom količinom reagensa (4 mL otopine ABTS+ radikala). Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA , koja se koristi za izračunavanje konačnog rezultata. Mjerenje je provedeno u duplikatu, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti (n=2) provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama.

Na osnovu jednadžbe baždarnog pravca, rezultati se izražavaju kao mmol Trolox-a/g biljnog materijala ili mmol Trolox-a/L napitka.

$$y = 0,303x + 0,0006 \quad [14]$$

gdje je:

y- izmjerena vrijednost apsorbancije pri 734 nm.

Ako je u postupku korišten razrijeđen uzorak izračunata vrijednost mora se pomnožiti s faktorom razrjeđenja originalnog uzorka.

4.4.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Ova metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal radi nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). U prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji gasi slobodne radikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje otopine u žutu, što se prati mjerenjem apsorbancije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995).

U tamnu epruvetu otpipetira se 3,9 mL otopine DPPH (0,094 mmol otopina) te se doda 100 μ L uzorka, a nakon 30 minuta po dodatku uzorka mjeri se apsorbancija pri 515 nm. U drugu epruvetu, koja predstavlja slijepu probu, umjesto uzorka doda se 100 μ L metanola.

Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA , koja se koristi za izračunavanje konačnog rezultata. Mjerenje je provedeno u duplikatu, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti (n=2) provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama.

Na osnovu jednadžbe baždarnog pravca, rezultati se izražavaju kao mmol Trolox-a/g biljnog materijala ili mmol Trolox-a/L napitka.

$$y = 0,603x - 0,006 \quad [15]$$

gdje je:

y- izmjerena vrijednost apsorbancije pri 515 nm.

Ako je u postupku korišten razrijeđen uzorak izračunata vrijednost mora se pomnožiti s faktorom razrjeđenja originalnog uzorka.

4.4.9. Određivanje pojedinačnih polifenola i metilksantina primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Udjel polifenolnih spojeva prisutnih u pripremljenim napitcima na bazi kakaovog praha koji su obogaćeni inkapsuliranim ekstraktima maslačka i ružmarina, te udjel metilksantina, teobromina i kafeina, koji potječu nativno iz kakaovog praha, određeni su primjenom HPLC metode. Uzorci su prije injektiranja u kromatografski sustav razrijeđeni u odgovarajućem omjeru te profiltrirani kroz celulozno-acetatne mikrofiltre veličine pora 0,45 μm . U kromatografski sustav injektirano je 10 μL profiltriranog uzorka te je provedena analiza prema dolje navedenim uvjetima.

Analiza pojedinačnih polifenolnih spojeva provedena je kromatografijom obrnutih faza na ACE Excel SuperC18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) koloni (nepolarna stacionarna faza) na temelju različitosti u polarnosti pojedinih komponenata eluacijom polarnim otapalima (Belščak-Cvitanović i sur., 2012).

Mobilna faza: A – 0,1% *o*-fosforna kiselina u vodi

B – 0,1% *o*-fosforna kiselina u metanolu

Protok: 1 mL/min

Eluiranje: gradijentno

Detekcija: UV/VIS Photo Diode Array ($\lambda = 200\text{-}400\text{nm}$)

Temperatura kolone: sobna

Vrijeme trajanja analize: 30 min (+ 5 min post time)

Tablica 5. Gradijent otapala za HPLC analizu

t (min)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)	Protok mL/min
0	90	10	1,0
30	0	100	1,0

Izdvojeni spojevi detektirani su pomoću Photo Diode Array (PDA) detektora pri valnim duljinama od 200 do 400 nm, uz rezoluciju od 1,2 nm. Detekcija metilksantina provedena je snimanjem eluata na valnoj duljini od 278 nm, a hidroksicimetnih kiselina pri valnoj duljini od 330 nm, pri čemu su dobiveni karakteristični kromatogrami uzoraka. Identifikacija spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja (R_t) izdvojenih pikova na kromatogramima s vremenima zadržavanja vanjskih standarda te usporedbom s UVspektrima standarda (oblik

spektra i apsorpcijski maksimumi). Kvantitativno određivanje spojeva u uzorcima omogućeno je korištenjem jednadžbi baždarnih pravaca pojedinih standarda (tablica 5).

Tablica 6. Baždarni pravci identificiranih bioaktivnih spojeva u ispitivanim uzorcima

Naziv spoja	Jednadžba baždarnog pravca
Čikorinska kiselina	$y = 15,025x - 4,3467$
Ružmarinska kiselina	$y = 10,914x + 0,8559$
Teobromin	$y = 31,064x + 7,9437$
Kafein	$y = 26,197x - 8,6714$

HPLC analize provedene su u dvije paralelne probe, a rezultati su izraženi kao mg pojedinog spoja/Lnapitkate su prikazani kao srednja vrijednost (n=2) s pripadajućom standardnom devijacijom. Za prikupljanje i obradu podataka dobivenih HPLC analizom korištena je aplikacija Star Chromatography Workstation Version 5.

4.5. Senzorska analiza napitaka na bazi kakaovog praha

Senzorsku analizu napitaka na bazi kakaovog praha provelo je 10 educiranih ocjenjivača. Uzorci su pripremljeni na jednaki način kao i za eksperimentalni dio rada simulirajući uobičajeni način pripreme napitka u kućanstvu. 15 g uzorka preliveno je s 200 mL kipuće vode i mlijeka zagrijanog na temperaturu od 80 °C. Uzorci su povremeno miješani 5 minuta staklenim štapićem. Svaki panelist dobio je 30 mL toplog (60 °C) napitka pripremljenog s vodom i mlijekom te 30 mL tople (60 °C) vode za ispiranje usne šupljine između probavanja uzoraka.

Kvantitativno-deskriptivnom analizom ocjenjivali su se okus (slatkoća, gorčina, biljno, punoća okusa, naknadni okus) i ostali atributi važni za senzorsku analizu napitaka, kao što su opća prihvatljivost, prepoznatljivost kakaovog praha, izgled i boja. Svaki od nabrojenih atributa ocijenjen je korištenjem skale intenziteta od 1 do 9, gdje se 1 odnosilo na slabo izraženo svojstvo, a 9 na jako izraženo svojstvo. Lista ocjenjivanih atributa sastavljena je prema literaturi i međusobnim dogovorom panelista o prepoznatim atributima ocjenjivanih uzoraka.

4.6. Statistička analiza

Statistička analiza provedena je pomoću sustava za statistiku SPSS v. 8.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), primjenom jednosmjerne analize varijanci (one-way ANOVA), koristeći Tukey post hoc test, kako bi se utvrdio utjecaj procesa granuliranja, vrste inkapsuliranih sustava (čestice dobivene ionskim geliranjem ili sušenjem raspršivanjem) i biljnih vrsta (maslačak ili ružmarin) na fizikalno-kemijska svojstva pripremljenih praškastih mješavina te bioaktivni profil napitaka na bazi kakaovog praha. Također, isti test korišten je i za određivanje značajnih (signifikantnih) razlika u bioaktivnom sastavu u napitcima na bazi kakaovog praha ovisno o vremenu skladištenja praškastih mješavina (0. mjesec-odmah nakon pripreme i nakon 6. mjeseci skladištenja). Statistička analiza napravljena je odvojeno za napitke pripremljene s vodom i mlijekom. Razina vjerojatnosti $p < 0,05$ smatrana je značajnom.

Obrada svih rezultata napravljena je pomoću programa Microsoft Office Excel.

5. REZULTATI

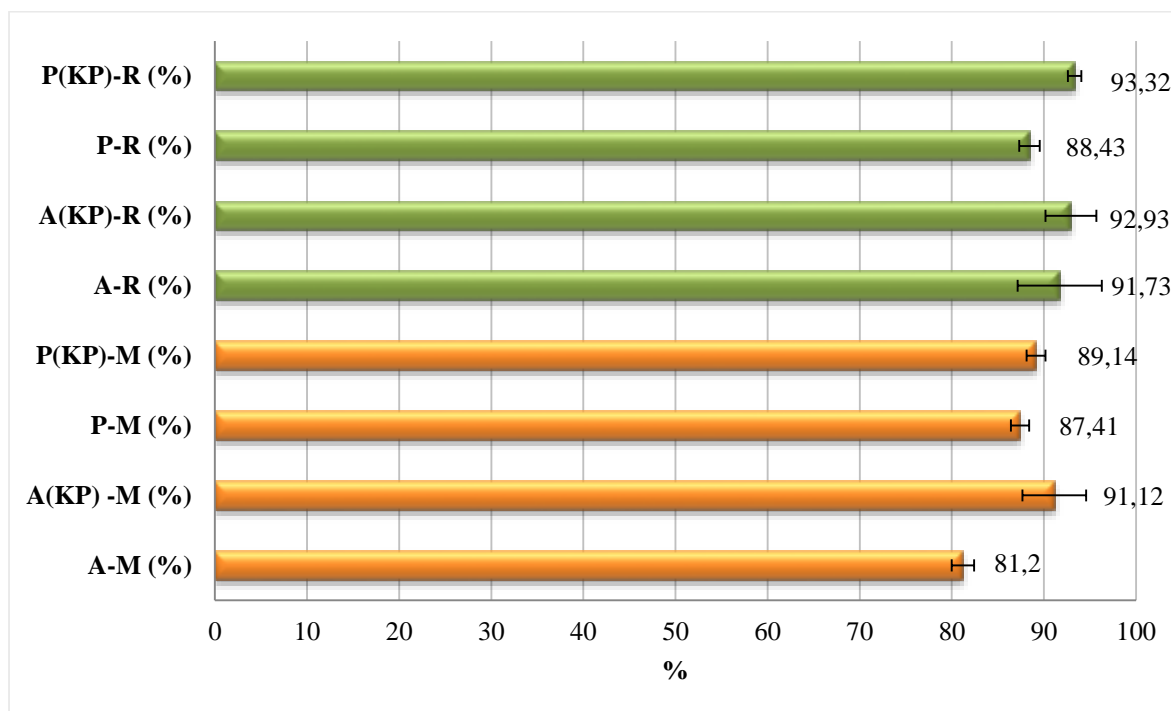
5.1. Bioaktivna karakterizacija polifenolnih ekstrakata maslačka i ružmarina

Tablica 7. Bioaktivni profil određen u ekstraktu maslačka i ružmarina

POLIFENOLNI SPOJEVI	Maslačak	Ružmarin
Ukupni polifenoli (mg EGK/g)	14,11 ± 1,10	42,84 ± 0,61
Ukupni flavonoidi (mg EGK/g)	6,85 ± 1,02	21,80 ± 0,59
Ukupne hidroksicimetne kiseline (mg kafeinske kiseline/g)	12,07 ± 0,20	51,99 ± 0,43
Flavan-3-oli (mg (+)- katehina/g)	0,35 ± 0,03	0,23 ± 0,00
Proantocijanidini (mg (-)-epikatehina/g)	5,33 ± 0,43	2,87 ± 0,08
Ukupni tanini (mg taninske kiseline/g)	1,09 ± 0,02	2,71 ± 0,08
ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET	Maslačak	Ružmarin
ABTS (mmol Trolox-a/g)	0,13 ± 0,00	0,22 ± 0,01
DPPH (mmol Trolox-a/g)	0,06 ± 0,00	0,22 ± 0,00

EGK- ekvivalenti galne kiseline

5.2. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije ukupnih polifenola



A-alginat; P-pektin; KP-kakaov prah; M-maslačak; R- ružmarin

Slika 14. Učinkovitost inkapsulacije (%) ukupnih polifenola u formuliranim hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom maslačka ili ružmarina

5.3. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika praškastih mješavina na bazi kakaovog praha

5.3.1. Određivanje veličine čestica

Tablica 8. Veličina čestica praškastih mješavina na bazi kakaovog praha određena granulometrijskom analizom

Veličina pora na situ za prosijavanje	% čestica zaostalih na situ					
	KP	gKP	gKP_IG M	gKP_IG R	gKP_SR M	gKP_SR R
1,25 mm	1,03	2,44	19,39	6,83	0,3	0,99
1,12 mm	0,8	2,36	1,87	4,03	0,65	2,45
1,00 mm	0,76	5,15	3,11	6,12	1,28	4,61
900 μm	0,92	7,21	4,59	4,85	2,06	3,13
710 μm	3,94	20,96	11,07	10,44	6,97	5,95
355 μm	14,69	41,82	34,81	30,25	29,77	29,41
180 μm	14,15	16,3	20,42	19,18	27,75	25,95
125 μm	33,82	3,57	4,51	8,24	18,99	20,81
< 125 μm	31,48	0,2	0,27	9,47	12,65	8,22

5.3.2. Određivanje udjela vode, topljivosti i disperzibilnosti

Tablica 9. Udjel vode, topljivost, disperzibilnost i močivost praškastih mješavina na bazi kakaovog praha

Uzorak	Udjel vode (%)	Topljivost (%)	Disperzibilnost (%)	Močivost (min)
KP	4,06 ± 0,07 ^{abcde}	2,07 ± 0,00 ^{abcde}	17,49 ± 0,37 ^{abcde}	7 ^a
gKP	5,05 ± 0,01 ^{afg}	2,46 ± 0,02 ^{afg}	23,24 ± 0,24 ^{afgh}	5,6 ^a
gKP_IG M	4,95 ± 0,03 ^b	2,43 ± 0,01 ^{bhi}	22,48 ± 0,08 ^{bfijk}	1440 ^a
gKP_IG R	4,65 ± 0,28 ^{cf}	2,42 ± 0,04 ^{ckj}	23,64 ± 0,13 ^{cil}	2160 ^a
gKP_SR M	4,62 ± 0,11 ^{dg}	2,69 ± 0,03 ^{dfhj}	24,11 ± 0,32 ^{dgjm}	52 ^a
gKP_SR R	4,73 ± 0,01 ^e	2,74 ± 0,03 ^{egik}	26,54 ± 0,09 ^{ehklm}	15,5 ^a

Vrijednosti označene istim slovima unutar iste kolone su signifikantno ($p < 0,05$) različite.

5.3.3. Određivanje karakteristika tečenja prahova

Tablica 10. Svojstva tečenja praškastih mješavina na bazi kakaovog praha

Vrijednosti označene istim slovima unutar iste kolone su signifikantno ($p < 0,05$) različite.

Uzorak	Nasipna gustoća (g/cm ³)	„loose”gustoća (g/cm ³)	„tapped” gustoća (g/cm ³)	Hausnerov omjer	Carr indeks	Indeks kohezije	Prosječna snaga kolača (g)
KP	0,32 ± 0,01 ^{abc}	0,34 ± 0,01 ^{abc}	0,37 ± 0,01 ^{abcd}	1,15 ± 0,03 ^a	12,89 ± 1,95 ^a	18,55 ± 0,37 ^{ab}	191,40 ± 3,21 ^{abcde}
gKP	0,43 ± 0,02 ^{ade}	0,45 ± 0,01 ^{ade}	0,51 ± 0,01 ^{aefg}	1,19 ± 0,03	15,61 ± 2,04	17,37 ± 1,28 ^{cd}	333,42 ± 4,15 ^{afgh}
gKP_IG M	0,40 ± 0,01 ^{bfg}	0,43 ± 0,01 ^{bfg}	0,47 ± 0,01 ^{behij}	1,17 ± 0,02	14,17 ± 1,46 ^b	24,84 ± 1,24 ^{acef}	403,48 ± 7,59 ^{bfijk}
gKP_IG R	0,40 ± 0,01 ^{chi}	0,44 ± 0,01 ^{chi}	0,50 ± 0,00 ^{chkl}	1,23 ± 0,02 ^a	18,65 ± 1,40 ^{ab}	26,33 ± 2,28 ^{bdgh}	383,24 ± 5,67 ^{cgil}
gKP_SR M	0,32 ± 0,00 ^{dflh}	0,34 ± 0,00 ^{dflh}	0,38 ± 0,00 ^{fik}	1,19 ± 0,01	15,78 ± 0,99	18,42 ± 0,98 ^{eg}	335,22 ± 6,63 ^{djlm}
gKP_SR R	0,33 ± 0,01 ^{egi}	0,35 ± 0,00 ^{egi}	0,40 ± 0,01 ^{dgi}	1,20 ± 0,02	16,59 ± 1,33	18,99 ± 1,11 ^{fh}	373,48 ± 3,87 ^{ehkm}

Tablica 11. Karakterizacija kohezivnosti prahova prema Hausnerovom omjeru, tecivosti prahova prema Carr indeksu i indeks kohezije praškastih mješavina na bazi kakaovog praha

Uzorak	Hausnerov omjer (kohezivnost)	Carr indeks (tecivost)	Indeks kohezije
KP	niska	vrlo dobra	vrlo kohezivan
gKP	niska	dobra	vrlo kohezivan
gKP_IG M	niska	vrlo dobra	izrazito kohezivan
gKP_IG R	srednja	dobra	izrazito kohezivan
gKP_SR M	niska	dobra	vrlo kohezivan
gKP_SR R	srednja	dobra	vrlo kohezivan

5.3.4. Određivanje parametara boje

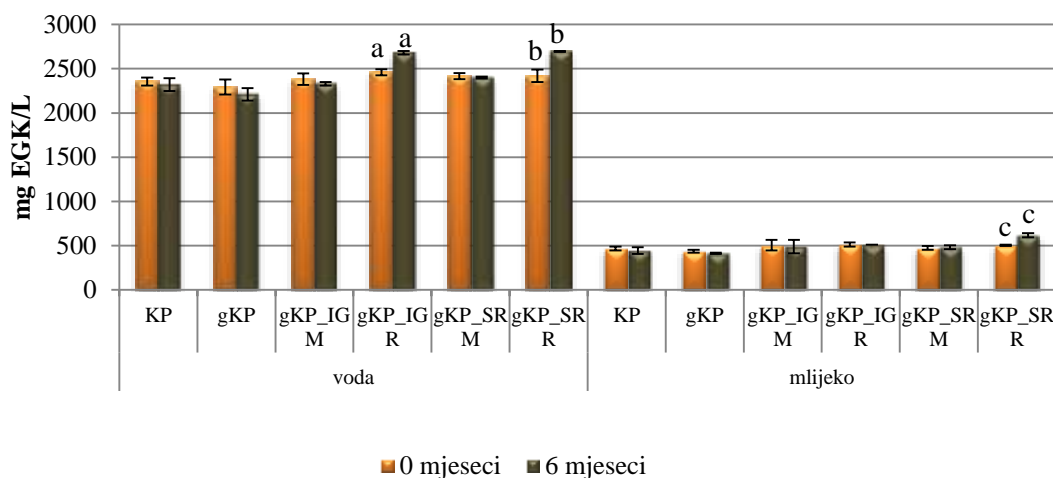
Tablica 12. Parametri boje praškastih mješavina na bazi kakaovog praha

Uzorak	L*	a*	b*	ΔE
KP	46,73 ± 0,34	13,16 ± 0,10	24,85 ± 0,35	-
gKP	50,35 ± 0,09	11,16 ± 0,03 ^a	22,15 ± 0,08 ^a	4,94 ± 0,02
gKP_IG M	51,15 ± 0,36	11,06 ± 0,11 ^a	22,17 ± 0,11 ^a	5,58 ± 0,34
gKP_IG R	49,54 ± 0,16 ^a	11,50 ± 0,09	22,11 ± 0,21 ^a	4,26 ± 0,27
gKP_SR M	49,42 ± 0,26 ^a	12,12 ± 0,11	23,28 ± 0,17 ^b	3,28 ± 0,29
gKP_SR R	47,48 ± 0,15	12,51 ± 0,04	23,54 ± 0,11 ^b	1,64 ± 0,17

Vrijednosti označene istim slovima unutar iste kolone nisu signifikantno ($p > 0,05$) različite.

5.4. Određivanje bioaktivnog profila napitaka na bazi kakaovog praha

5.4.1 Određivanje udjela ukupnih polifenola

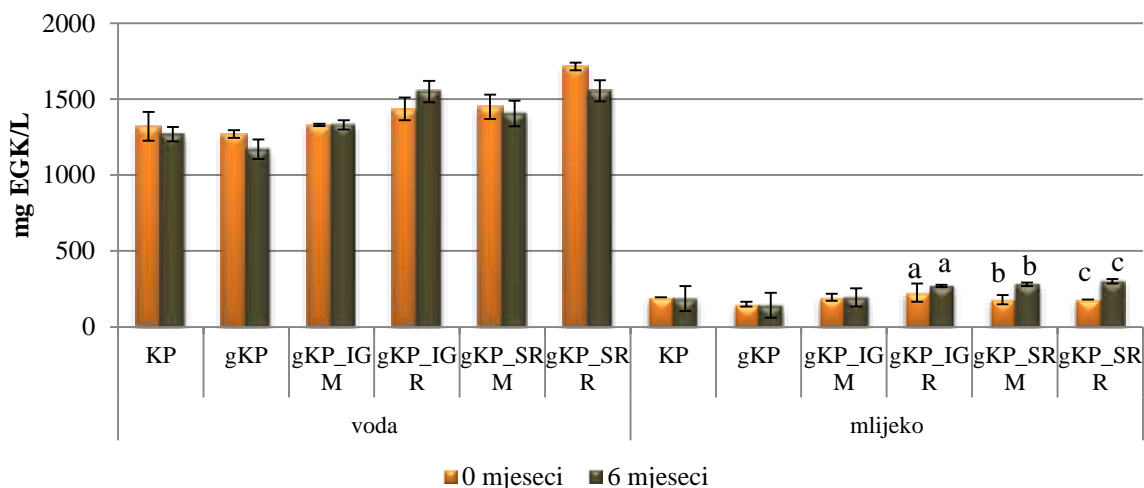


EGK-ekvivalenti galne kiseline

Vrijednosti označene istim slovima su signifikantno ($p < 0,05$) različite.

Slika 15. Udjel ukupnih polifenola (mg EGK/L) u napitcima na bazi kakaovog praha pripremljenih s vodom i mlijekom ovisno o vremenu skladištenja praškastih mješavina

5.4.2. Određivanje udjela ukupnih flavonoida

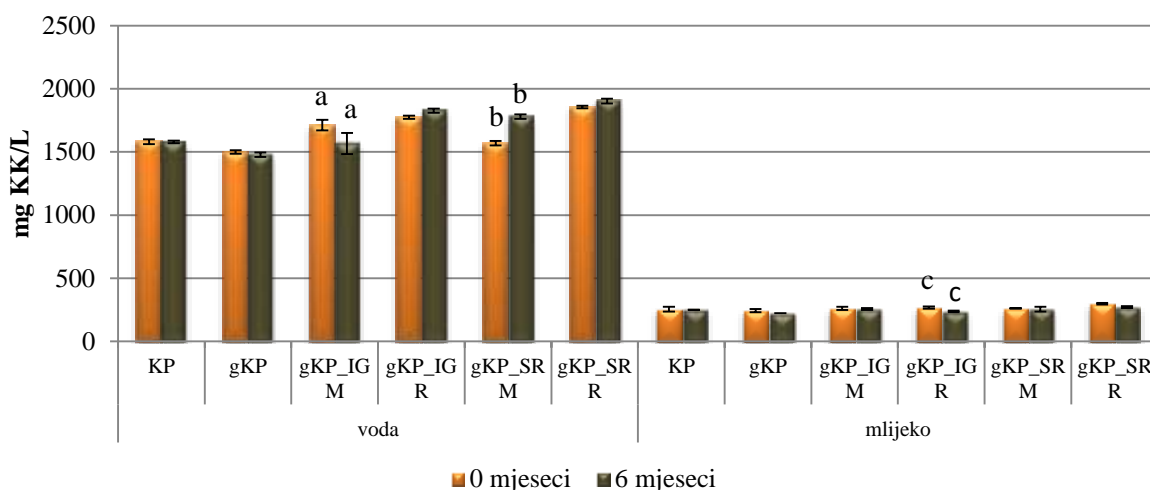


EGK-ekvivalenti galne kiseline

Vrijednosti označene istim slovima su signifikantno ($p < 0,05$) različite.

Slika 16. Udjel ukupnih flavonoida (mg EGK/L) u napitcima na bazi kakaovog praha pripremljenih s vodom i mlijekom ovisno o vremenu skladištenja praškastih mješavina

5.4.3. Određivanje udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina

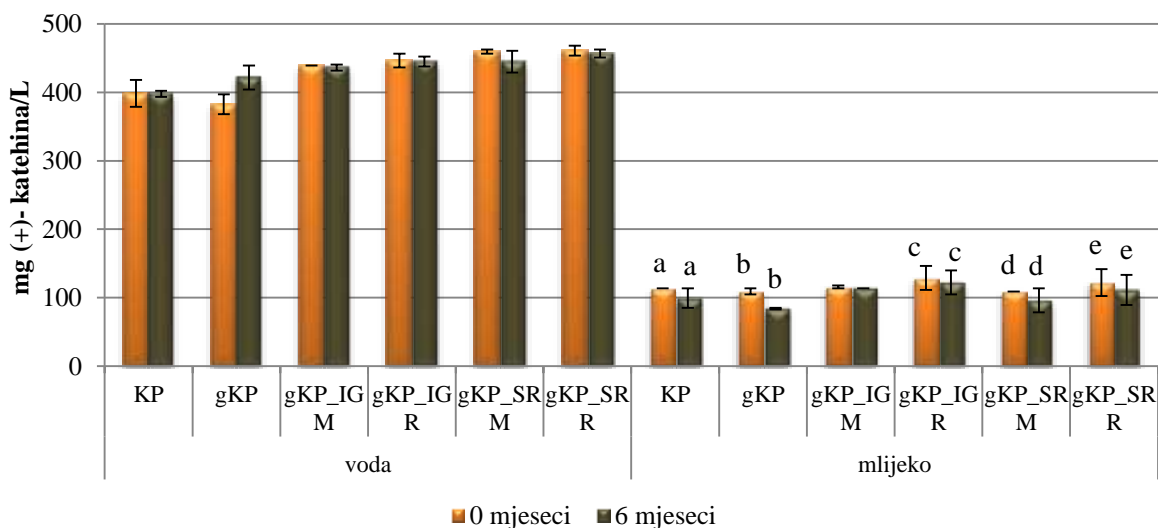


KK-kafeinska kiselina

Vrijednosti označene istim slovima su signifikantno ($p < 0,05$) različite.

Slika 17. Udjel ukupnih hidroksicimetnih kiselina (mg KK/L) u napitcima na bazi kakaovog praha pripremljenih s vodom i mlijekom ovisno o vremenu skladištenja praškastih mješavina

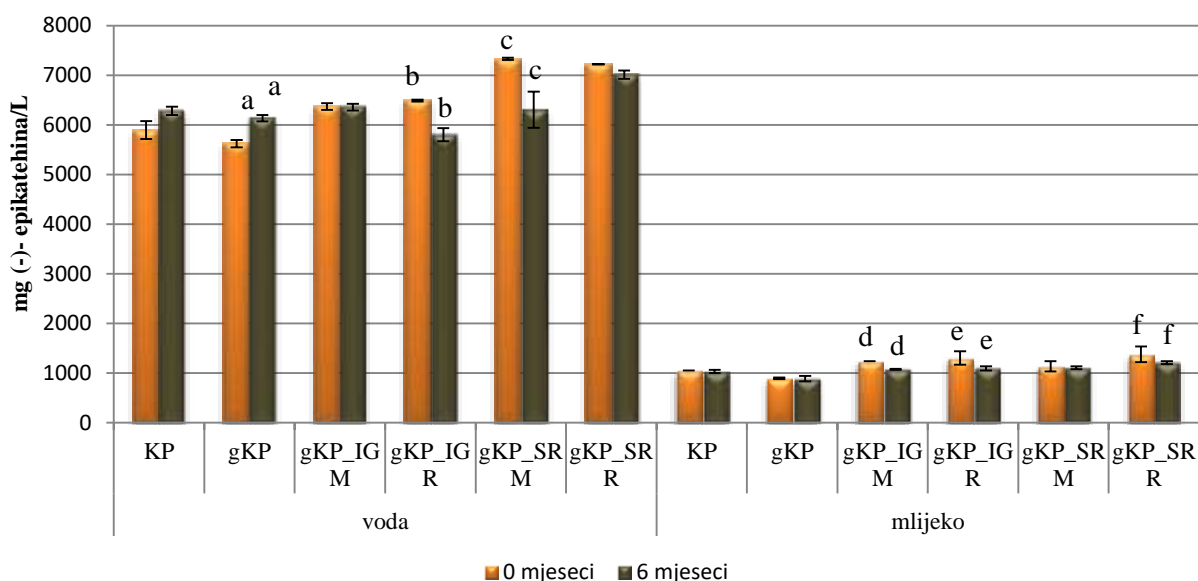
5.4.4. Određivanje udjela flavan-3-ola



Vrijednosti označene istim slovima su signifikantno ($p < 0,05$) različite.

Slika 18. Udjel flavan-3-ola (mg (+)-katehina/L) u napitcima na bazi kakaovog praha pripremljenih s vodom i mlijekom ovisno o vremenu skladištenja praškastih mješavina

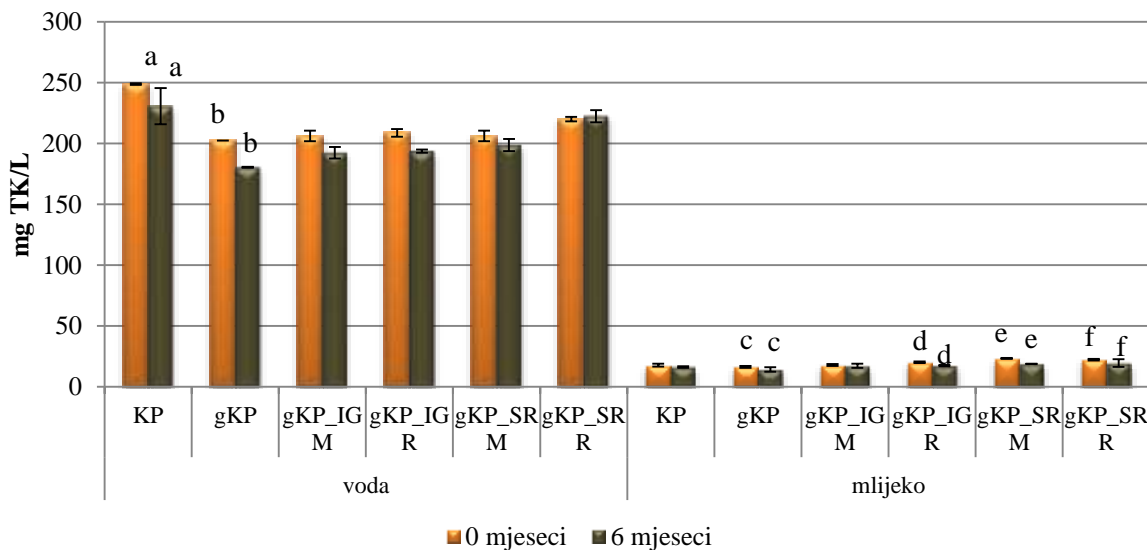
5.4.5. Određivanje udjela proantocijanidina



Vrijednosti označene istim slovima su signifikantno ($p < 0,05$) različite.

Slika 19. Udjel proantocijanidina (mg (-)- epikatehina/L) u napitcima na bazi kakaovog praha pripremljenih s vodom i mlijekomovisno o vremenu skladištenja praškastih mješavina

5.4.6. Određivanje udjela ukupnih tanina

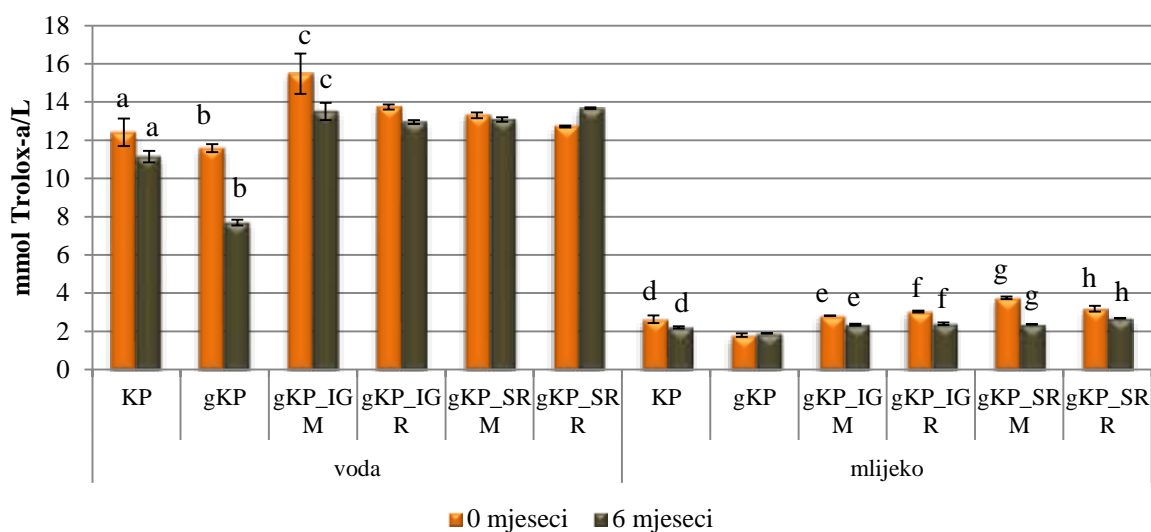


TK-taninska kiselina

Vrijednosti označene istim slovima su signifikantno ($p < 0,05$) različite.

Slika 20. Udjel ukupnih tanina (mg TK/L) u napitcima na bazi kakaovog praha pripremljenih s vodom i mlijekomovisno o vremenu skladištenja praškastih mješavina

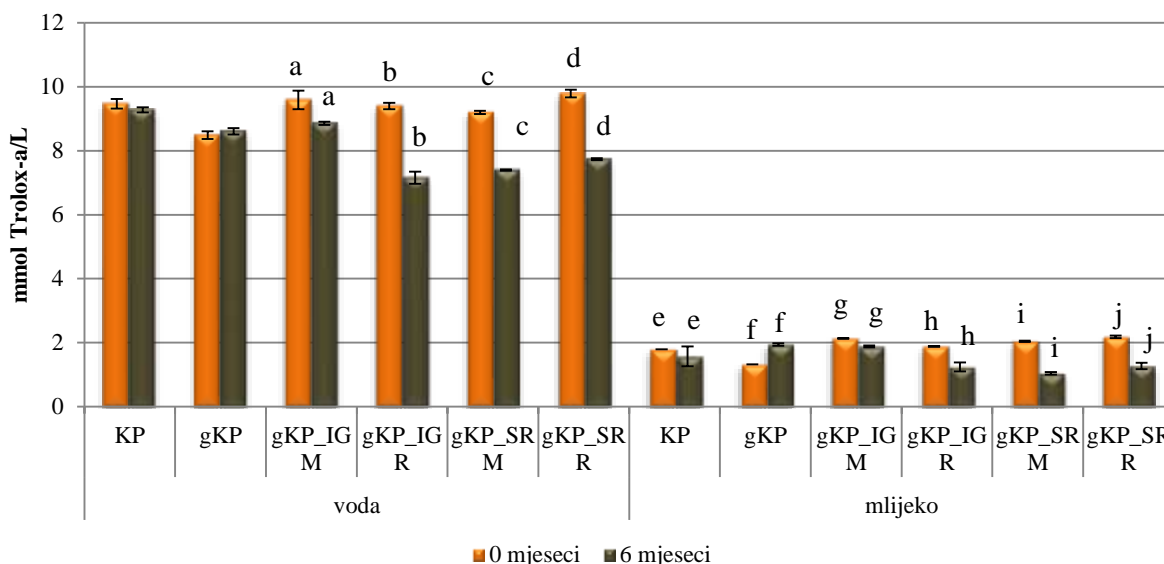
5.4.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom



Vrijednosti označene istim slovima su signifikantno ($p < 0,05$) različite.

Slika 21. Antioksidacijski kapacitet (mmol Trolox-a/L) određen ABTS metodom u napitcima na bazi kakaovog praha pripremljenih s vodom i mlijekomovisno o vremenu skladištenja praškastih mješavina

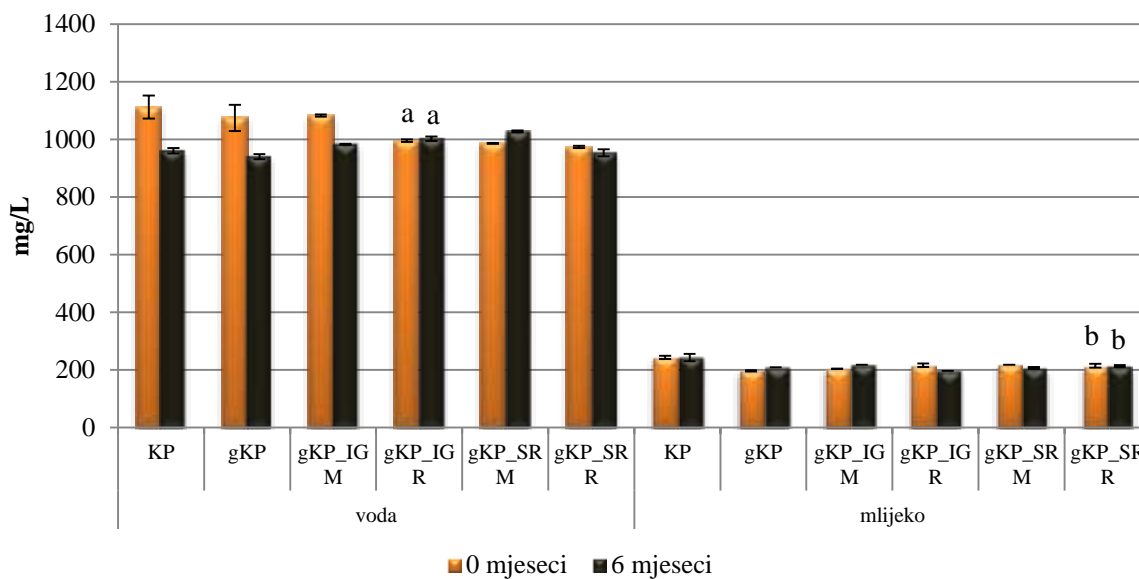
5.4.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom



Vrijednosti označene istim slovima su signifikantno ($p < 0,05$) različite.

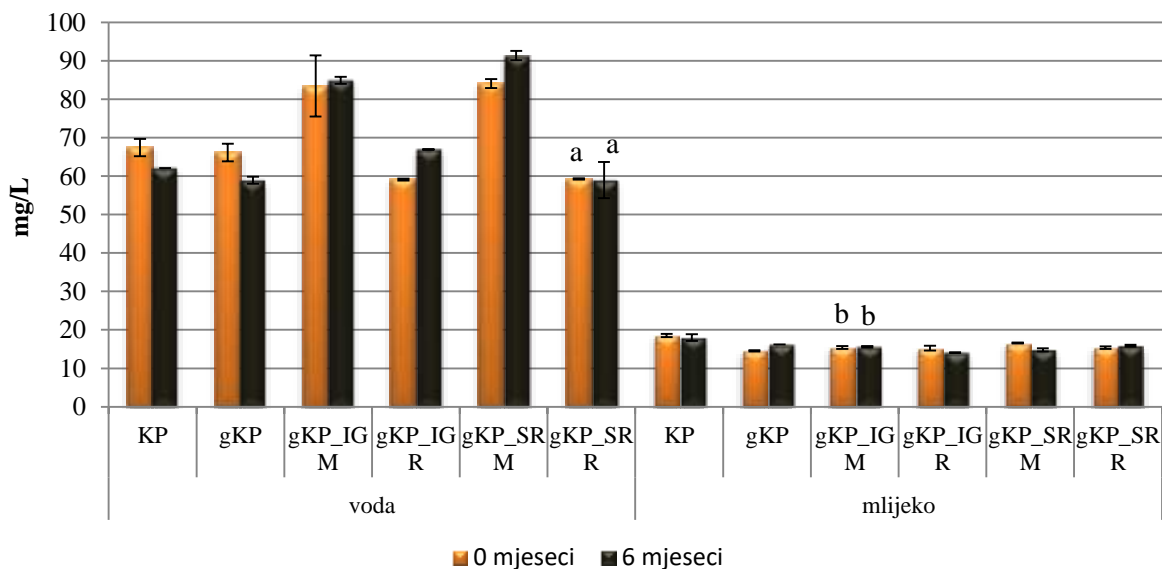
Slika 22. Antioksidacijski kapacitet (mmol Trolox-a/L) određen DPPH metodom u napitcima na bazi kakaovog praha pripremljenih s vodom i mlijekomovisno o vremenu skladištenja praškastih mješavina

5.4.9. Određivanje udjela teobromina i kafeina u napitcima na bazi kakaovog praha primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)



Vrijednosti označene istim slovima su nesignifikantno ($p > 0,05$) različite.

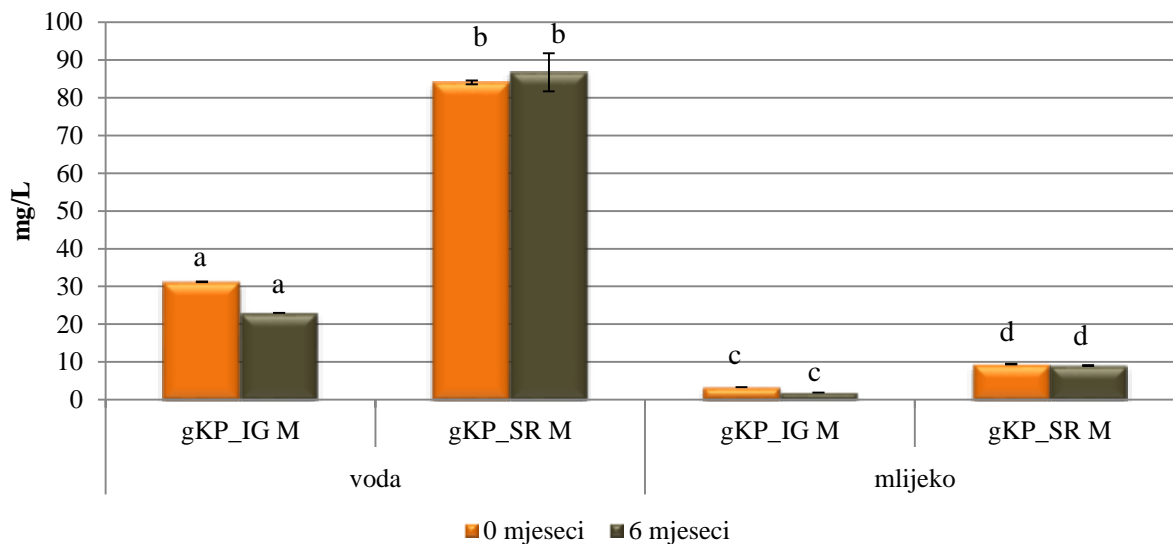
Slika 23. Udjel teobromina (mg/L) u napitcima na bazi kakaovog praha pripremljenih s vodom i mlijekom



Vrijednosti označene istim slovima su nesignifikantno ($p > 0,05$) različite.

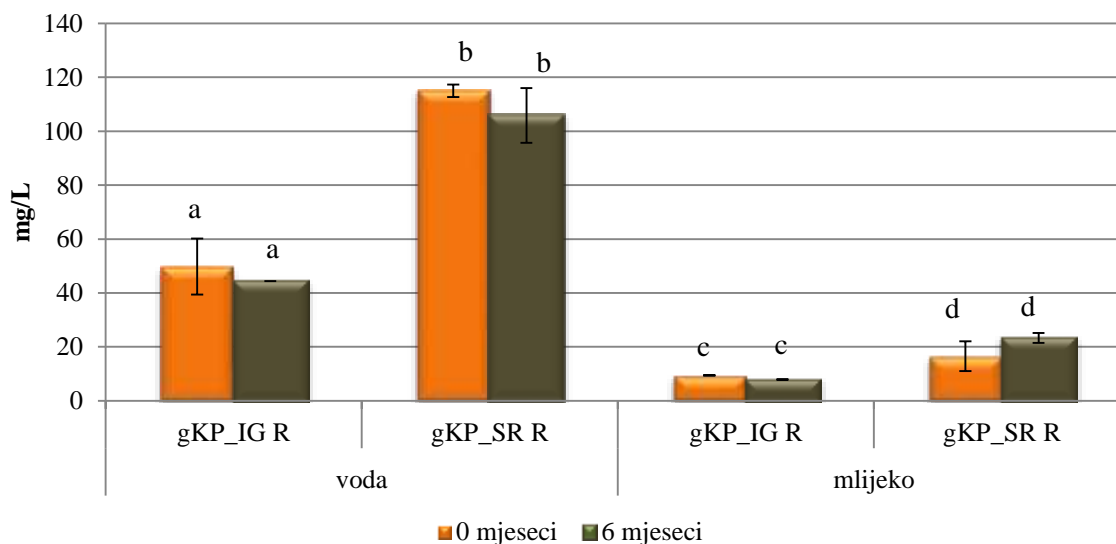
Slika 24. Udjel kafeina (mg/L) u napitcima na bazi kakaovog praha pripremljenih s vodom i mlijekom

5.4.10. Određivanje udjela čikorinske i ružmarinske kiseline u napitcima na bazi kakaovog praha obogaćenih ekstraktima maslačka i ružmarina primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)



Vrijednosti označene istim slovima su signifikantno ($p < 0,05$) različite.

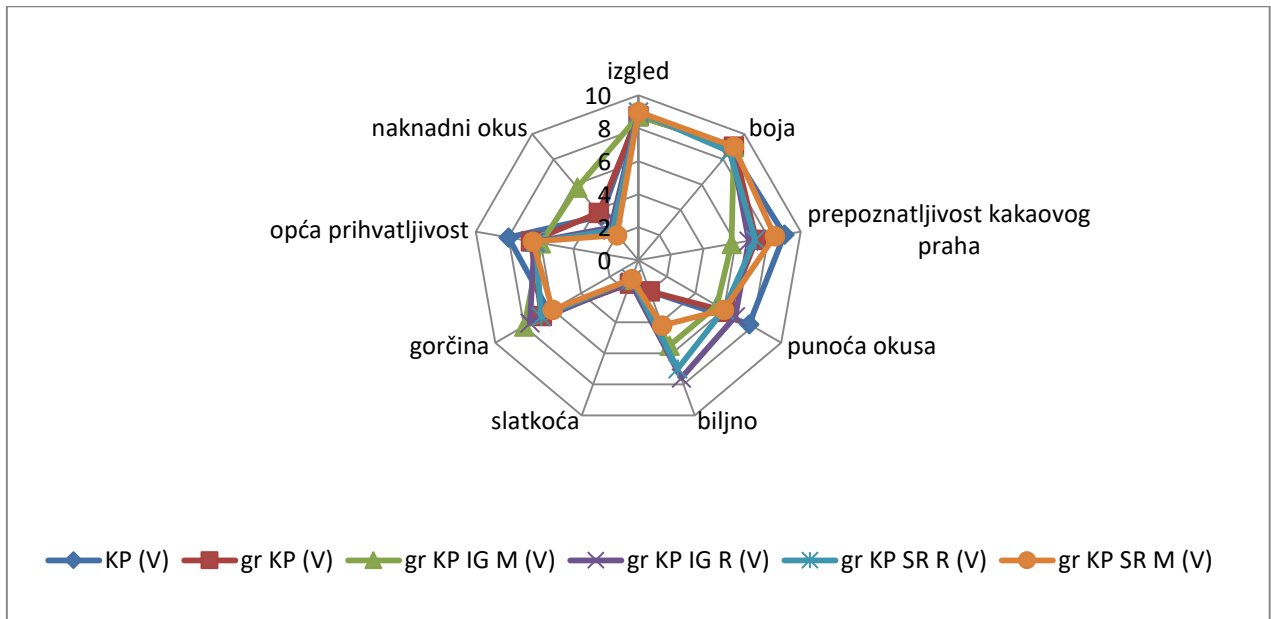
Slika 25. Udjel čikorinske kiseline (mg/L) u napitcima na bazi kakaovog praha pripremljenih s vodom i mlijekom



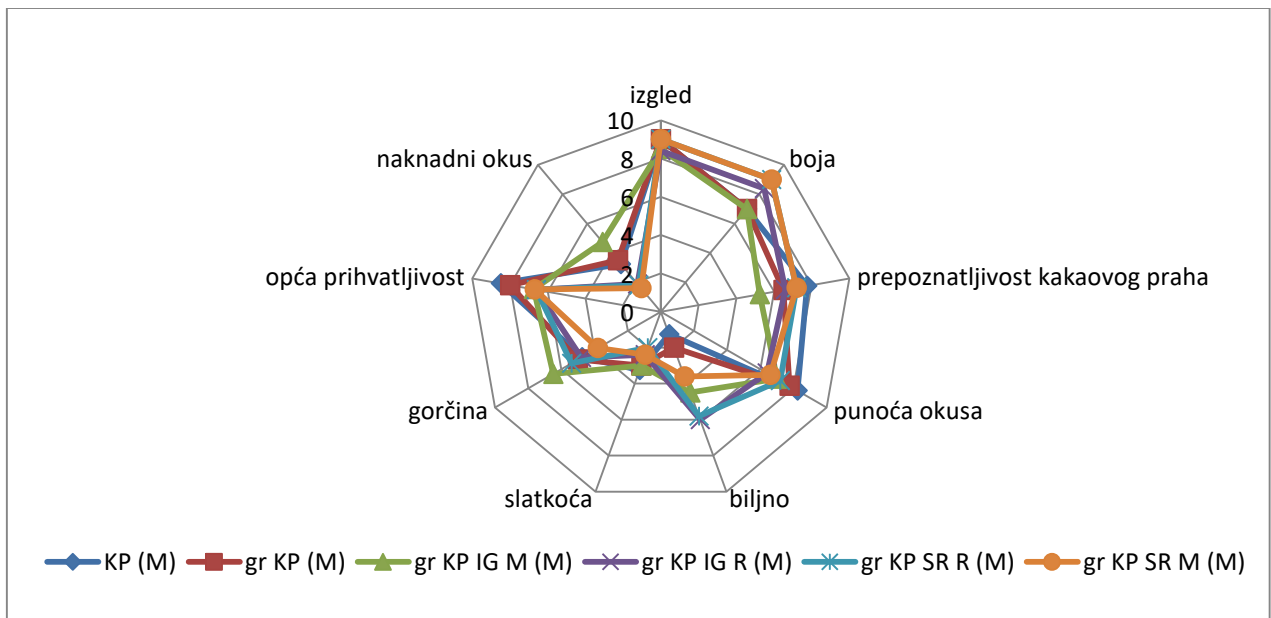
Vrijednosti označene istim slovima su signifikantno ($p < 0,05$) različite.

Slika 26. Udjel ružmarinske kiseline (mg/L) u napitcima na bazi kakaovog praha pripremljenih s vodom i mlijekom

5.5. Senzorska analiza napitaka na bazi kakaovog praha pripremljenih s vodom i mlijekom



Slika 27. Senzorska analiza napitaka na bazi kakaovog praha pripremljenih s vodom (V)



Slika 28. Senzorska analiza napitaka na bazi kakaovog praha pripremljenih s mlijekom (M)

6. RASPRAVA

6.1. Bioaktivna karakterizacija polifenolnih ekstrakata maslačka i ružmarina

Bioaktivni profil ekstrakata maslačka i ružmarina, izražen kao udjel ukupnih polifenola i flavonoida, ukupnih hidroksicimetnih kiselina, flavan-3-ola, proantocijanidina i ukupnih tanina te antioksidacijski kapacitet ekstrakata određen primjenom ABTS i DPPH metode nalazi se u tablici 7.

U ekstraktu lista maslačka udjel ukupnih polifenola iznosio je 14,11 mg EGK/g (tablica 7), što je u skladu s istraživanjem Xie i suradnika (2018). Isti autori primjenom vode kao otapala za ekstrakciju polifenola lista maslačka odredili su udjel od 10,41 mg EGK/g, dok su korištenjem vodene otopine etanola ekstrahirali znatno veći udjel od 50,93 mgEGK/g. Dobiveni rezultati ukazuju na značajan utjecaj otapala za ekstrakciju na ekstrakcijski prinos polifenola. Ipak, u ovom radu voda se koristila kao ekstrakcijsko otapalo budući da su se vodeni ekstrakti ružmarina i maslačka koristili za inkapsulaciju u polisaharidne nosače, poput alginata i pektina, koji bi se u slučaju pripreme ekstrakata s etanolnim ili metanolnim otopinama precipitirali te time ne bi bilo moguće provesti učinkovitu inkapsulaciju. Također, različiti dijelovi biljke sadrže i različite udjele polifenola, što je potvrđeno u istraživanju Xie i suradnika (2018), pri čemu je u vodenom ekstraktu stabljike maslačka dobiven udjel od 38,84 mg EGK/g uzorka, što je znatno više u odnosu na polifenole određene u ekstraktu lista maslačka. Nadalje, udjel ukupnih flavonoida u ekstraktu lista maslačka iznosio je 6,85 mg EGK/g uzorka (48,5 % udjela ukupnih polifenola), dok je udjel flavan-3-ola bio prisutan u znatno manjem udjelu (0,35 mg (+)- katehina/g). Udjel ukupnih hidroksicimetnih kiselina, najdominatnije skupine polifenola maslačka, iznosio je 12,07 mg KK/g, što je približno vrijednosti izmjerenoj u istraživanju Ivanova (2014), u kojem je određen udjel hidroksicimetnih kiselina od oko 15 mg KK/g uzorka. Udjel ukupnih proantocijanidina iznosio je 5,33 mg (-)- epikatehina/g, a ukupnih tanina 1,09 mg TK/g. Antioksidacijski kapacitet maslačka određen ABTS metodom bio je znatno veći (0,13 mmol Trolox-a/g) u odnosu na antioksidacijski kapacitet izmjeren DPPH metodom (0,06 mmol Trolox-a/g). Niska vrijednost (0,002 mmol Trolox-a/g) antioksidacijskog kapaciteta izmjernog DPPH metodom dobivena je u i istraživanju Wojdyło i suradnika (2007).

Udjel ukupnih polifenola određen u ekstraktu ružmarina iznosio je 42,84 mg EGK/g suhog uzorka. U istraživanju Erkan i suradnika (2008) u ekstraktu lista ružmarina određen je udjel ukupnih polifenola od 162 mg/g uzorka, što je znatno više u odnosu na rezultate

dobivene u ovom radu. Razlike u rezultatima mogu se pripisati korištenju različitih ekstrakcijskih uvjeta, budući da udjel polifenola značajno varira ovisno o tome koje se otapalo koristi za ekstrakciju. Za razliku od Erkan i suradnika (2008), koji su za određivanje udjela ukupnih polifenola koristili ekstrakciju po Soxhletu uz metanol kao ekstrakcijsko otapalo, u ovom radu za određivanje udjela ukupnih polifenola korištena je konvencionalna tehnika ekstrakcije s vodom. S druge strane, Alu'datti suradnici (2017) u svom istraživanju provodili su optimizaciju ekstrakcijskih uvjeta (vrijeme ekstrakcije, temperatura i otapalo) pri čemu su korištenjem smjese metanola i vode za ekstrakciju polifenola ružmarina dobili najveći udjel ukupnih polifenola od 33,32 mg/g uzorka, što je slično rezultatima dobivenim u ovom radu, dok su najniži udjel polifenola (0,52 mg/g) dobili korištenjem vode kao otapala.

Također, u ekstraktu ružmarina određen je i udjel ukupnih flavonoida od 21,8 mg EKG/g, što čini 51 % udjela ukupnih polifenola. Hidroksicimetne kiseline, kao najznačajniji polifenolni spojevi u ekstraktu ružmarina prisutne su u najvećem udjelu od 51,99 mg KK/g uzorka, dok suflavan-3-oli određeni u najmanjem udjelu od 0,23 mg (+)- katehina/g suhog uzorka. Ukupni proantocijanidini (2,87 mg (-)- epikatehina/g) i ukupni tanini (2,71 mg TK/g) prisutni su u znatno manjem udjelu u odnosu na hidroksicimetne kiseline. Antioksidacijski kapacitet ekstrakta ružmarina određen primjenom ABTS i DPPH radikala, u oba slučaja iznosio je 0,22 mmol Trolox-a/g uzorka (Tablica 7).

Analizom dobivenih rezultata može se vidjeti da je udjel svih polifenolnih spojeva, kao i antioksidacijski kapacitet određen s obje metode bio veći u ekstraktu ružmarina u odnosu na ekstrakt maslačka, a kod obje biljne vrste najdominatnija polifenolna skupina su bile ukupne hidroksicimetne kiseline, zatim s obzirom na udjel ukupni flavonoidi > proantocijanidini > ukupni tanini > flavan-3-oli.

6.2. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije ukupnih polifenola

Na slici 14 prikazana je učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola u formiranim hidrogel česticama na bazi alginata i pektina s inkapsuliranim ekstraktima maslačka i ružmarina pripremljenim ionskim geliranjem. S obzirom na poroznost alginatnog i pektinskog gela, koja često rezultira slabim zadržavanjem aktivnih spojeva unutar takvih nosača, pektinski i alginatni gel kombinirao se s kakaovim prahom, kao novim materijalom u sustavu nosača za inkapsulaciju. Pri tome su za svaku biljnu vrstu formulirana četiri inkapsulacijska sustava (čisti alginatni i pektinski te njihove kombinacije s kakaovim prahom) (slika 14). Unutar svake biljne

vrste odabrani su sustavi s najvećom inkapsulacijskom učinkovitošću ukupnih polifenola. Dodatak kakaovog praha u alginatni i pektinski gel rezultirao je povećanjem inkapsulacijske učinkovitosti ukupnih polifenola, pri čemu su isti imali najveći postotak inkapsulacije ukupnih polifenola. U slučaju inkapsuliranog ekstrakta maslačka, hidrogel čestice pripremljene s kombinacijom alginata i kakaovog praha rezultirale su najvećim stupnjem inkapsulacije (91,12 %), dok se u slučaju ekstrakta ružmarina kombinacija pektina i kakaovog praha pokazala najučinkovitijom (93,32 %), zbog čega su iste čestice liofilizirane i korištene dalje kao čestice za obogaćivanje kakaovog praha. Također, na temelju ovih rezultata, iste otopine nosača inkapsulirane su i tehnikom sušenja raspršivanjem te kao takve, zajedno s česticama dobivenim ionskim geliranjem, korištene kao sustavi za obogaćivanje.

6.3. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika praškastih mješavina na bazi kakaovog praha

6.3.1. Određivanje veličine čestica

Granulometrijskom metodom određena je veličina čestica praškastih mješavina na bazi kakaovog praha. Uzorci su prosijavani kroz seriju sita pri čemu je određen % čestica zaostalih na situ. Iz dobivenih rezultata prikazanih u tablici 8, može se zaključiti da se postupkom granuliranja povećala i veličina čestica. Zbog provedenog postupka granuliranja povećao se postotak zaostalih čestica na situ veličine pora 1,25 mm, posebice kod uzoraka obogaćenih polifenolima ružmarina i maslačka tehnikom ionskog geliranja. Kod sita veličine pora < 125 μm taj postotak se smanjuje postupkom granuliranja, što ukazuje da je došlo do stvaranja aglomerata veličine veće od veličine polaznih čestica. Kod uzorka KP najveći udjel čestica bio je veličine 125 μm (33,82 %) i < 125 μm (31,48 %), što je bilo i za očekivati, budući da ovaj uzorak nije išao u proces granuliranja. Kod granuliranog KP, kao i kod granuliranih obogaćenih uzoraka kakaovog praha najveći udjel čestica bio je veličine > 355 μm < 710 μm . Na situ veličine pora 1,25 mm veći udjel čestica zaostao je kod uzoraka dobivenih tehnikom ionskog geliranja (gKP_IG M – 19,39 %; gKP_IG R – 6,83 %) u odnosu na udjel zaostalih čestica kod uzoraka dobivenih sušenjem raspršivanjem (gKP_SR M – 0,3 %; gKP_SR R – 0,99 %). Usporedbom dobivenih rezultata vidljivo je da su čestice dobivene ionskim geliranjem bile veće u odnosu na čestice dobivene sušenjem raspršivanjem, što je očekivan rezultat s obzirom na to da su liofilizirane čestice dobivene ionskim geliranjem bile veličine 1-2 mm, te su uzorci

dobiveni sušenjem raspršivanjem imali veličinu čestica sličniju uzorku kakaovog praha (KP) i granuliranog kakaovog praha (gKP).

6.3.2. Određivanje udjela vode, topljivosti, disperzibilnosti i močivosti

Udjel vode važan je pokazatelj kvalitete kakaovog praha, jer se u prisutnosti prekomjerne količine vlage može pogoršati okus praha te povećati mogućnost mikrobioškog kvarenja. Općenito, prahovi zbog niskog udjela vode nisu podložni kontaminaciji, oksidaciji, reakcijama posmeđivanja i gubitcima hranjivih tvari (Fellows, 2000; Nantz i sur., 2006). Udjel vode u ispitivanim uzorcima prikazan je u tablici 9. U odnosu na čisti uzorak kakaovog praha, granulirani uzorci sadržavali su veći udjel vode, pa je time najniži udjel vode sadržavao uzorak čistog kakaovog praha (4,06 %), zbog čega se i signifikantno ($p < 0,05$) razlikovao od ostalih uzoraka (Tablica 9). Najviši udjel vode sadržavao je kontrolni granulirani uzorak kakaovog praha (5,05 %). Dodatak inkapsuliranih sustava rezultirao je očekivanim smanjenjem udjela vode u odnosu na kontrolni granulirani uzorak (gKP), jer su inkapsulirani sustavi sadržavali veći udjel suhe mase sirovina odnosno liofilizirane inkapsulirane čestice.

Topljivost i disperzibilnost su parametri koji karakteriziraju instant proizvode. Topljivost je važan parametar kod konzumacije proizvoda jer utječe na senzorska svojstva i samu percepciju okusa, dok disperzibilnost utječe na izgled prehrambenih proizvoda (Shittu i Lawal, 2007).

Topljivost ispitivanih praškastih mješavina kretala se od 2,07 % do 2,74 % (Tablica 9). Postupak granuliranja u fluidiziranom sloju rezultirao je značajnim povećanjem topljivosti, budući da je uzorak KP, koji nije išao u proces granuliranja imao signifikantno ($p < 0,05$) niži postotak topljivosti (2,07 %) od ostalih granuliranih uzoraka. Ovakav rezultat je očekivan, budući da dodatak maltodekstrina i lecitina u praškaste mješavine rezultira povećanjem topljivosti. Shittu i Lawal (2007) također su dokazali da se dodatkom šećera u granulirane praškaste mješavine na bazi kakaovog praha znatno poboljšava njihova topljivost, budući da šećer predstavlja najtopljiviju komponentu. Topljivost kakaovog praha u radu Belščak-Cvitanović i suradnika (2010) iznosila je 2,12 %, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu. Iako je topljivost važno svojstvo kakaovog praha namijenjenog za pripremu napitaka takvi proizvodi se ne otapaju u potpunosti, zbog čega je i topljivost praškastih mješavina na bazi kakaovog praha određena u ovom radu prilično niska. Naime, kakaov prah sadrži i značajnu količinu netopljivih spojeva, poput proteina (18,6 %) i masti (21 %) (Shittu i

Lawal, 2007; Omobuwajo i sur., 2000), odnosno zbog prisustva hidrofobnih kristala masti na vanjskoj strani čestica kakaovog praha isti nije u potpunosti topljiv. Vrsta dodanih inkapsulata (IG ili SR) utjecala je na topljivost pripremljenih granuliranih praškastih mješavina. Naime, mješavine s česticama dobivenim ionskim geliranjem imale su nesigifikantno ($p > 0,05$) nižu topljivost od kontrolnog granuliranog uzorka (gKP), dok su uzorci s česticama dobivenim sušenjem raspršivanjem bile karakterizirane sa sigifikantno ($p < 0,05$) većom topljivošću. Dodatak biljne vrste nije utjecao na topljivost granuliranih mješavina, budući da unutar iste vrste inkapsuliranih sustava nije bilo značajne razlike u topljivosti ispitivanih uzoraka.

I u slučaju disperzibilnosti (tablica 9), uzorak čistog KP imao je sigifikantno ($p < 0,05$) niži postotak disperzibilnosti (17,49 %) u odnosu na ostale granulirane uzorke (22,48 %-26,54 %). U istraživanju Szulc i Lenart (2013), granulacija je poboljšala disperzibilnost mliječnih prahova, također došlo do poboljšanja disperzibilnosti praškastih kakaovih mješavina u istraživanju Shittu i Lawal (2007) te sojinog mlijeka u prahu u istraživanju Jinapong i suradnika (2008), što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu. Dodatak inkapsuliranih sustava različito je utjecao na postotak disperzibilnosti u usporedbi s kontrolnim granuliranim KP (gKP), ovisno o vrsti inkapsuliranog sustava i biljnoj vrsti. Primjerice, u odnosu na gKP (23,24 %), uzorak gKP_IG M imao je sigifikantno ($p < 0,05$) nižu disperzibilnost (22,48 %), dok je dodatak čestica dobiven sušenjem raspršivanjem rezultirao povećanom disperzibilnošću (24,11 % - gKP_SR M i 26,54 % - gKP_SR R).

Dobiveni rezultati ukazuju da je postupak granuliranja u fluidiziranom sloju rezultirao poboljšanim instant svojstvima (topljivost, disperzibilnost) formuliranih praškastih mješavina, što je i bila svrha ovog rada, budući da su granulirani uzorci imali sigifikantno ($p < 0,05$) veće vrijednosti za topljivost i disperzibilnost u odnosu na negranulirani uzorak kakaovog praha.

Uspoređujući rezultate za vrijeme močenja prikazane u tablici 9, može se vidjeti da se vrijeme močenja kod svih uzoraka sigifikantno ($p < 0,05$) razlikuje. Najkraće vrijeme od 5 minuta i 36 sekundi potrebno da čestice praha probiju površinu vode imao je kontrolni granulirani uzorak kakaovog praha (gKP) (Tablica 9). Dodatak inkapsuliranih sustava rezultirao je duljim vremenom močivosti, gdje su uzorci s ionsko geliranim česticama imali najdulje vrijeme potrebno da čestice potonu na dno posude (gKP_IG R – 2160 min). Dodatak inkapsuliranih sustava u praškaste mješavine otežao je probijanje površine vode te su dobiveni rezultati očekivani zbog same težine čestica dobivenih ionskim geliranjem. Hla i Hoge Kamp (1999) dokazali su da se smanjenjem veličine čestica povećava vrijeme močenja, što je u skladu s rezultatima dobivenim za čisti KP te kontrolni granulirani uzorak (gKP), budući da KP karakterizira manja veličina čestica i dulje vrijeme močivosti u odnosu na gKP (veće čestice,

kraće vrijeme močenja). No, s druge strane, praškaste mješavine koje su među ispitivanim uzorcima imale najveću veličinu čestica (čestice dobivene ionskim geliranjem) imale su i najduže vrijeme močenja, što se ne poklapa s rezultatima Hla i Hoge Kamp (1999). Ipak, ovi rezultati mogu se pripisati veličini (1-2 mm) liofiliziranih čestica dobivenih ionskim geliranjem koje su zaostajale na površini medija te je bilo potrebno duže vrijeme da potonu na dno. Visoki udjel masti također je jedan od čimbenika koji može utjecati na vrijeme močivosti instant proizvoda, a kakaov prah sadrži 10-25 % masti. Drugi čimbenik koji može utjecati na otežanu močivost kakaovog praha može se pripisati njegovoj kapilarnoj strukturi koja može onemogućiti prodor vode zahvaćanjem rupica zraka (Omobuwajo i sur., 2000).

6.3.3. Određivanje karakteristika tečenja prahova

Svojstva tečenja prahova vrlo su važna pri rukovanju i procesima prerade, kao što su protjecanje iz spremnika i silosa, prilikom transporta, miješanja, kompresije i pakiranja (Fitzpatrick i sur., 2005). Za određivanje tečnosti prehrambenih prahova najčešće se određuju svojstva poput kuta unutarnjeg trenja, kohezivnosti, kompresibilnosti, Hausnerovog omjera, te nasipne gustoće (Juliano i sur., 2006).

U ovom radu svojstva tečenja praškastih mješavina određena su primjenom različitih metoda koje su bile međusobno uspoređene.

Nasipna gustoća granuliranih uzoraka (gKP, gKP_IG M, gKP_IG R, gKP_SD R) bila je signifikantno ($p < 0,05$) veća u odnosu na KP koji nije bio podvrgnut procesu granulacije, osim u slučaju uzorka gKP_SD M, gdje je nasipna gustoća bila nesignifikantno ($p > 0,05$) manja (tablica 10). Vrsta inkapsuliranog sustava imala je značajan utjecaj na nasipnu gustoću. Mješavine obogaćene česticama dobivene ionskim geliranjem imale su signifikantno ($p < 0,05$) veću nasipnu gustoću od onih dobivenih sušenjem raspršivanjem, kao i od samog uzorka KP, što se može pripisati veličini čestica samih uzoraka. Isti trend dobiven je i u radu Belščak-Cvitanović i suradnika (2010), gdje je kakaov prah imao nižu nasipnu gustoću u odnosu na praškaste mješavine kakaovog praha pomiješane s različitim šećerima. Budući da su uzorci s česticama dobivenim ionskim geliranjem, kao i kontrolni uzorak granuliranog kakaovog praha, imali najveći postotak čestica većih od 1,25 mm, dobiveni rezultati ukazuju na ovisnost veličine čestica praškastih mješavina i nasipne gustoće. Među obogaćenim uzorcima odabir biljne vrste nije utjecao na nasipnu gustoću.

Gustoća određena nakon 10 udaraca predstavljala je „loose“ gustoću, te je ista kod granuliranih uzoraka (gKP, gKP_IG M i gKP_IG R) bila signifikantno ($p < 0,05$) veća u odnosu na uzorak KP, pri čemu je uzorak gKP imao najveću „loose“ gustoću ($0,45 \text{ g/cm}^3$) (tablica 10). I u ovom slučaju vrsta inkapsuliranog sustava imala je značajan ($p < 0,05$) utjecaj na „loose“gustoću, pri čemu su praškaste mješavine obogaćene česticama dobivenim ionskim geliranjem bile signifikantno ($p < 0,05$) veće u odnosu na čestice dobivene sušenjem raspršivanjem, a biljna vrsta imala je neznatno ($p > 0,05$) utjecaj na „loose“gustoću.

Kod određivanja nasipne gustoće nakon 100 udaraca („tapped“ gustoća), kod svih granuliranih uzoraka, osim kod uzorka gKP_SD M, ista je bila signifikantno ($p < 0,05$) veća od gustoće određene za čisti kakaov prah (KP). Najveću „tapped“ gustoću imao je uzorak gKP ($0,51 \text{ g/cm}^3$) (tablica 10). Odabir biljne vrste opet nije imao značajan ($p > 0,05$) utjecaj na vrijednost „tapped“ gustoće, dok je vrsta inkapsuliranog sustava imala značajan ($p < 0,05$) utjecaj na „tapped“ gustoću.

Carr indeks, koji karakterizira svojstvo tečenja prahova, kretao se od 12,89 za čisti KP, do 18,65 za uzorak gKP_IG R (tablica 10). Proces granuliranja rezultirao je nesignifikantno ($p > 0,05$) većim vrijednostima Carr indeksa, osim u slučaju uzorka gKP_IG R. Isti uzorak signifikantno ($p < 0,05$) se razlikovao i uzorka obogaćenog ekstraktom ružmarina (gKP_IG R). Prema klasifikaciji prikazanoj u tablici 11, svi granulirani uzorci spadaju u kategoriju dobre tečnosti, osim uzoraka gKP_IG M i čistog KP, koji spadaju u kategoriju vrlo dobre tečnosti.

Uspoređujući svojstva kohezivnosti prema Hausnerovom omjeru, najnižu vrijednost kohezivnosti također pokazuje uzorak KP (1,15), a najvišu gKP_IG R (1,23) koji je ujedno i signifikantno ($p < 0,05$) veći od uzorka KP (tablica 10). Među obogaćenim česticama vrsta inkapsuliranog sustava nije utjecala na kohezivnost praškastih mješavina, dok su uzorci obogaćeni ružmarinom (gKP_IG R i gKP_SR R) imali veće vrijednosti Hausnerovog omjera u odnosu na uzorke obogaćene maslačkom (gKP_IG M i gKP_SR M). Prema klasifikaciji opisanoj u poglavlju 4.3.6 i prikazanoj u tablici 11 svi uzorci spadaju u kategoriju niske kohezivnosti, osim uzoraka obogaćenih ružmarinom koji spadaju u kategoriju srednje kohezivnosti, pri čemu se može zaključiti da je odabir biljne vrste utjecao na svojstvo kohezivnosti praškastih mješavina.

Indeks kohezije je korisna metoda kontrole kvalitete i procjena utjecaja karakteristika praha, kao što su raspodjela čestica i oblik, uvjeta skladištenja i okoline na sposobnost prahova da aglomeriraju. Promjene kohezivnih svojstva prahova imaju značajan utjecaj na proizvodni proces što može umanjiti kapacitet proizvodnje i kvalitetu proizvoda. Rezultati za indeks kohezije prikazani su u tablici 10, iz kojih je vidljivo da je uzorak gKP (17,37) imao niži indeks

kohezije od čistog KP (18,55), no dodatak inkapsuliranih sustava rezultirao je povećanjem indeksa kohezije, gdje su uzorci obogaćeni sustavima pripremljenim ionskim geliranjem bili signifikantno ($p < 0,05$) veći od gKP i KP, kao i od korespondirajućih sustava s česticama dobivenim sušenjem raspršivanjem. Odabir maslačka ili ružmarina kao ekstrakta za inkapsulaciju u čestice ionskim geliranjem ili sušenjem raspršivanjem nije imao značajan ($p < 0,05$) utjecaj na vrijednosti indeksa kohezije. S obzirom na indeks kohezije uzorci se svrstavaju u kategoriju vrlo kohezivnih prahova, osim uzoraka obogaćenih česticama dobivenih ionskim geliranjem koji pripadaju kategoriji izrazito kohezivnih prahova budući da imaju vrijednost indeksa kohezije > 19 (tablica 11). Prema Fitzpatricku (2005), kohezivnost prahova raste sa smanjenjem veličine čestica, zbog povećane površine po jedinici mase praha i veće vjerojatnosti da se čestice međusobno povežu. Međutim prema dobivenim rezultatima u ovom radu veličina čestica nije utjecala na indeks kohezije, budući da su najveće čestice dobivene ionskim geliranjem imale i najveći indeks kohezije. Također, u istraživanju Belščak-Cvitanović i suradnika (2010) veličina čestica nije značajno utjecala na indeks kohezije. U njihovom radu, indeks kohezije kakaovog praha iznosio je 19,64, čime je karakteriziran kao izrazito kohezivan, što je opet u skladu s rezultatima ovog rada. U ovom radu među sustavima koji se obogaćeni polifenolima na vrijednost indeksa kohezije utjecao je odabir tehnike inkapsulacije, pri čemu je obogaćivanje sustava ionskim geliranjem rezultiralo povećanjem indeksa kohezije (gKP_IG M – 24,84 i gKP_IG R – 26,33) u odnosu na obogaćivanje tehnikom sušenja raspršivanjem (gKP_SR M – 18,42; gKP_SR R – 8,99) (tablica 10).

Sposobnost stvaranja kolača predstavlja tendenciju čestica praha da formiraju velike aglomerate što je važno tijekom skladištenja i transporta (Benković i sur., 2011). Signifikantno ($p < 0,05$) veću sposobnost stvaranja kolača imali su svi granulirani uzorci, gdje je dodatak inkapsuliranih sustava rezultirao većom prosječnom snagom kolača. Opet, kod uzoraka s ionsko geliranim česticama, bila je potrebna najveća prosječna sila za rezanje kolača, odnosno ovi uzorci pokazali su najveću sposobnost stvaranja kolača (gKP_IG M-403,48; gKP_IG R-383,24 g). Ovdje je i odabir sustava za inkapsulaciju i biljne vrste imao značajan utjecaj na sposobnost stvaranja kolača, budući da su obogaćene granulirane mješavine međusobno bile signifikantno ($p < 0,05$) različite. Općenito, prahovi s manjim veličinama čestica pokazuju visoku kohezivnost zbog povećanja površine i jačanja van der Waalsovih interakcija što može dovesti do veće osjetljivosti na stvaranje kolača (Fitzpatrick, 2005). To su potvrdili rezultati ovog rada, gdje su izrazito kohezivni uzorci imali najveću prosječnu snagu stvaranja kolača.

6.3.4. Određivanje parametara boje

Određivanje boje kakaovog praha koristi se u svrhu procjene kvalitete (Ilangantileke i sur., 1991). Također, postojanost boje proizvoda je važan parametar za proizvođače jer odražava sliku stalne kvalitete proizvoda. Varijacije u boji između različitih šarži proizvoda mogu stvoriti dojam nedosljedne proizvodnje i kontrole kvalitete. Boja proizvoda koji sadrži kakaove dijelove također je pokazatelj okusa proizvoda, zbog odnosa između boje, količine kakaovih dijelova te stupnja alkalizacije pri čemu dolazi do promjene okusa. Prirodni kakaov prah ima svijetlu do srednje smeđu boju, međutim tijekom procesa alkalizacije dolazi do potamnijavanja kakaovih dijelova, smanjuje se gorčina te dolazi do povećanja disperzibilnosti kakaovog praha (Benković i sur., 2011).

U tablici 12 prikazani su rezultati izmjerenih parametara boje (L^* , a^* , b^* , ΔE) praškastih mješavina na bazi kakaovog praha. Uzorci podvrgnuti procesu granuliranja bili su svijetliji od uzorka čistog KP, zbog čega su imali i veće L^* vrijednosti. Promjena svjetline je očekivana jer se postupkom granuliranja dodaje određeni udjel vode te se potom vrši sušenje pri povišenoj temperaturi što dovodi do diskoloracije uzorka. Također, do posvjetljenja kakaovog praha može doći i uslijed fluktuacije temperature prilikom provedbe granuliranja (Benković i Bauman, 2011). Korištenjem tehnike ionskog geliranja, dodatak maslačka (gKP_IG M – 51,15) rezultirao je signifikantno ($p < 0,05$) svijetlijim uzorkom u odnosu na uzorak obogaćen ružmarinom (gKP_IG R – 49,54), što je zabilježeno i kod tehnike sušenja raspršivanjem (gKP_SR M – 49,42 > gKP_SR R – 47,48).

Najvišu a^* i b^* vrijednost imao je čisti KP, budući da je ovaj uzorak bio i najtamniji. Dodatak inkapsuliranih sustava sušenjem raspršivanjem rezultirao je signifikantnim ($p < 0,05$) povećanjem a^* vrijednosti (crveno obojenje), kao i b^* vrijednosti (žuto obojenje) u odnosu na tehniku ionskog geliranja, gdje su u oba slučaja dobivene niže vrijednosti parametara a^* i b^* . Usporedbom granuliranih sustava kod parametra b^* sustavi dobiveni sušenjem raspršivanjem bili su signifikantno ($p < 0,05$) različiti u odnosu na ostale granulirane sustave.

Ukupna promjena boje (ΔE) kod svih uzoraka bila je signifikantno ($p < 0,05$) različita. Kod parametra ΔE , ispitivao se utjecaj procesa granuliranja na ukupnu promjenu boje, zbog čega se uzorak čistog kakaovog praha (KP) koristio kao referentni uzorak. U odnosu na referentni uzorak, najmanja promjena boje određena je kod sustava pripremljenih pomoću sušenja raspršivanjem (gKP_SR M – 3,28 i gKP_SR R – 1,64), a očekivano najveća promjena boje određena je kod sustava s česticama dobivenim ionskim geliranjem (gKP_IG M – 5,58 > gKP_IG R – 4,26).

6.4. Određivanje bioaktivnog profila napitaka na bazi kakaovog praha

6.4.1 Određivanje udjela ukupnih polifenola

Na slici 14 prikazan je udjel ukupnih polifenola u napitcima na bazi kakaovog praha pripremljenih s vodom i mlijekom ovisno o vremenu skladištenja praškastih mješavina. Uspoređujući rezultate udjela ukupnih polifenola uzorci s inkapsuliranim sustavima maslačka i ružmarina imali su veći udjel ukupnih polifenola u odnosu na uzorke čistog granuliranog kakovog praha, što je i očekivano s obzirom na sam udjel polifenola prisutnih u ekstraktima maslačka i ružmarina. Također, budući da su polifenolni spojevi maslačka i ružmarina inkapsulirani u alginatni i pektinski nosač kombiniran s kakaovim prahom, jedan dio polifenola kakaovog praha također se ekstrahirao prilikom same pripreme uzorka, što je u određenoj mjeri doprinjelo ukupnom udjelu polifenola obogaćenih uzoraka. Uzorak s česticama obogaćenim ružmarinom kod obje inkapsulacijske tehnike imao je veći udjel ukupnih polifenola u odnosu na uzorke obogaćene maslačkom. Najveći udjel ukupnih polifenola imao je uzorak gKP_IG R (2461 mg EGK/L) pripremljen s vodom, kao i s mlijekom (511,5 mg EGK/L), a najmanji udjel imao je kontrolni uzorak gKP (2293,5 mg EGK/L - voda i 436,5 mg EGK/L - mlijeko). Uzorak KP, koji nije bio podvrgnut procesu granuliranja, imao je veći udjel ukupnih polifenola (2353,5 mg EGK/L) u odnosu na granulirani uzorak gKP (2293,5 mg EGK/L), što se može pripisati degradaciji dijela polifenola manje otpornih na povišene temperature korištene prilikom procesa granuliranja (50 °C). Kod uzoraka obogaćenih polifenolima ružmarina udjel ukupnih polifenola je bio nesigifikantno ($p > 0,05$) veći u odnosu na uzorke obogaćene polifenolima maslačka, pri čemu odabir inkapsulacijske tehnike nije imao sigifikantan ($p < 0,05$) utjecaj na udjel ukupnih polifenola. Isti trend vidljiv je i kod uzoraka pripremljenih s mlijekom. U istraživanju Belščak-Cvitanović i suradnika (2010) u kakaovom napitku koji je pripremljen s vodom udjel ukupnih polifenola iznosio je 977,27 mg EGK/L, što je znatno niže od udjela dobivenog u ovome radu.

Nakon šest mjeseci skladištenja u većini uzoraka došlo je do smanjenja udjela ukupnih polifenola, uz pojedine fluktuacije (gKP_IG R i gKP_SR R–voda; gKP_SR R– mlijeko). Sličan trend, u standardnim uvjetima skladištenja kroz duže vremensko razdoblje, zabilježen je i u radu Sang i suradnika (2005), gdje je također došlo do smanjenja udjela polifenola u napitcima čaja, kao i antioksidacijskog kapaciteta. Istraživanje Zhu i suradnika (2002) pokazalo je da su autooksidacija i epimerizacija dvije glavne reakcije odgovorne za nestabilnost polifenolnih spojeva pri standardnim eksperimentalnim uvjetima.

Usporedbom dobivenih rezultata, može se vidjeti da napitci pripremljeni s vodom sadrže značajno ($p < 0,05$) veći udjel ukupnih polifenola u odnosu na napitke pripremljene s mlijekom, a isti je trend vidljiv i kasnije kod svih ispitivanih skupina polifenolnih spojeva. Jedan od potencijalnih razloga može se pripisati interakciji polifenolnih spojeva i proteina mlijeka, što rezultira smanjenjem raspoloživosti bioaktivnih komponenti, a posljedično i smanjenjem udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta. Isto potvrđuju i mnogi drugi modeli razvijeni od strane različitih autora koji smatraju da se formiranje polifenol–protein kompleksa bazira na slabim interakcijama između polifenolnog aromatskog prstena i bočnog lanca aminokiseline, indicirajući kako je asocijacija polifenola i proteina površinski fenomen (Von Staszevski i sur., 2011). Također, ovo potvrđuje i istraživanje Komes i suradnika (2015) u kojem se pokazalo da napitci kavovina pripremljeni s vodom sadrže znatno veći udjel ukupnih polifenola od kavovina pripremljenih s mlijekom, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu.

6.4.2. Određivanje udjela ukupnih flavonoida

Udjel ukupnih flavonoida u napitcima na bazi kakaovog praha pripremljenih s vodom i mlijekom prikazani su na slici 16. Kod udjela ukupnih flavonoida vidljiv je isti trend kao i kod udjela ukupnih polifenola. Također, i u ovom slučaju vidljiv je znatno veći udjel ukupnih flavonoida kod uzoraka koji su obogaćeni maslačkom i ružmarinom, pri čemu su i ovdje uzorci obogaćeni s ružmarinom imali signifikantno ($p < 0,05$) veći udjel u odnosu na uzorke s maslačkom. Najveći udjel ukupnih flavonoida kod uzoraka pripremljenih s vodom određen je u uzorku gKP_SR R (1715 mg EGK/L), a najmanji u uzorku gKP (1270 mg EGK/L), što je posljedica degradacije polifenola prilikom procesa granuliranja. Obogaćivanje uzoraka česticama pripremljenim sušenjem raspršivanjem rezultiralo je signifikantno ($p < 0,05$) većim udjelom ukupnih flavonoida u odnosu na udjel ukupnih flavonoida u uzorcima obogaćenim ionskim geliranjem. U uzorcima pripremljenim s mlijekom najveći udjel flavonoida određen je u uzorku s ionsko geliranim česticama (gKP_IG R–225 mg EGK/L), a najmanji također u uzorku gKP (150 mg EGK/L). U slučaju pripreme napitaka s mlijekom signifikantno ($p < 0,05$) veći udjel flavonoida dobiven je obogaćivanjem uzoraka tehnikom ionskog geliranja u odnosu na obogaćivanje uzoraka sušenjem raspršivanjem.

Vrijeme skladištenja praškastih mješavina utjecalo je na smanjenje udjela ukupnih flavonoida kod gotovo svih uzoraka. U uzorcima pripremljenim s vodom nakon skladištenja od 6. mjeseci došlo je do nesignifikantnog ($p > 0,05$) smanjenja udjela ukupnih flavonoida u

odnosu na početne vrijednosti (0. mjesec), uz pojedine fluktuacije. Kod uzoraka obogaćenih sušenjem raspršivanjem došlo je do značajnije degradacije ukupnih flavonoida nakon skladištenja u odnosu na iste pripremljene tehnikom ionskog geliranja. Kod uzoraka s mlijekom, vrijednosti početnih udjela ukupnih flavonoida uzoraka gKP_IG R, gKP_SR M i gKP_SR R signifikantno ($p < 0,05$) su se razlikovale u odnosu na vrijednosti dobivene nakon šest mjeseci skladištenja.

6.4.3. Određivanje udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina

Na slici 17 prikazan je udjel ukupnih hidroksicimetnih kiselina u napitcima na bazi kakaovog praha. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su uzorci obogaćeni maslačkom i ružmarinom imali veći udjel ukupnih hidroksicimetnih kiselina u odnosu na neobogaćene uzorke KP i gKP, što je i očekivano s obzirom na to da su hidroksicimetne kiseline najdominatnija skupina maslačka i ružmarina. Uspoređujući rezultate obogaćenih uzoraka vidljivo je da su uzorci obogaćeni ružmarinom imali signifikantno ($p < 0,05$) veće vrijednosti u odnosu na vrijednosti uzoraka obogaćenih maslačkom, što je i očekivan rezultat s obzirom na to da je vodeni ekstrakt ružmarina imao znatno veći udjel hidroksicimetnih kiselina u odnosu na ekstrakt maslačka. Također, odabir inkapsulacijske tehnike utjecao je na dobivene rezultate kod uzoraka obogaćenih ružmarinom, pri čemu je upotreba sušenja raspršivanjem rezultirala povećanjem udjela hidroksicimetnih kiselina. Najveći udjel hidroksicimetnih kiselina kod uzoraka pripremljenih s vodom imao je uzorak gKP_SR R (1854,4 mg KK/L), a najmanji udio imao je uzorak gKP (1498,4 mg KK/L). Isti trend vidljiv je i kod uzoraka pripremljenih s mlijekom.

Kod uzoraka pripremljenih s vodom, vrijednost nakon šest mjeseci skladištenja značajno ($p < 0,05$) se smanjila kod uzorka obogaćenog maslačkom (gKP_IG M – 1566,4 mg EGK/L) u odnosu na početnu vrijednost (0. mjesec – 1712,4 mg EGK/L), a kod uzoraka s mlijekom udjel hidroksicimetnih kiselina nakon skladištenja uzorka gKP_IG R signifikantno ($p < 0,05$) se smanjila u odnosu na početnu vrijednost. Taj isti uzorak, nakon šest mjeseci skladištenja bio je signifikantno ($p < 0,05$) manji u odnosu na uzorak gKP_SR R.

6.4.4. Određivanje udjela flavan-3-ola

Dominantni spojevi u kakaovom prahu i kakaovim proizvodima su flavonoidi, od kojih su najznačajniji flavan-3-oli i proantocijanidini koji doprinose visokom antioksidacijskom kapacitetu kakaovog praha i njegovom pozitivnom utjecaju na zdravlje (Wollgast i Anklam, 2000).

Rezultati analize udjela flavan-3-ola u napitcima pripremljenima s vodom i mlijekom prikazani su na slici 18. Prema dobivenim rezultatima i u ovom slučaju vidljivo je da su uzorci s inkapsuliranim sustavima imali signifikantno ($p < 0,05$) veće udjele flavan-3-ola u odnosu na uzorke KP i gKP, pri čemu je najveći udjel dobiven u uzorku gKP_SR R (460,92 mg (+)-katehin-a/L), a najmanji u uzorku gKP (382,4 mg (+)-katehina/L) pripremljenima s vodom. U ovom radu udjel flavan-3-ola u čistom kakaovom prahu iznosio je 398,4 mg (+)-katehina /L, dok je u istraživanju Belščak-Cvitanović i suradnika (2010) određen udjel od 231,33 mg (+)-katehina/L. Kod uzoraka s vodom odabir inkapsulacijske tehnike utjecao je na vrijednosti udjela flavan-3-ola, pri čemu su uzorci s česticama dobivenim sušenjem raspršivanjem imali nesignifikantno ($p > 0,05$) veće vrijednosti u odnosu na ionsko gelirane čestice. Kod uzoraka obogaćenih ružmarinom udjel flavan-3-ola bio je nesignifikantno ($p > 0,05$) veći u odnosu na udjel flavan-3-ola kod uzoraka obogaćenih maslačkom. Najveći udjel flavan-3-ola u slučaju pripreme uzorka s mlijekom imao je uzorak gKP_IG R (128,68 mg(+)-katehina/L). U ovom slučaju ionsko gelirane čestice pokazale su signifikantno ($p < 0,05$) veći udjel flavan-3-ola u odnosu na čestice dobivene sušenjem raspršivanjem. Kod napitaka pripremljenih s mlijekom, uzorci obogaćeni ružmarinom imali su signifikantno ($p < 0,05$) veći udjel flavan-3-ola u odnosu na uzorke s maslačkom.

Nakon šest mjeseci skladištenja uzoraka vrijednosti udjela flavan-3-ola u napitcima pripremljenim s vodom su se nesignifikantno ($p > 0,05$) razlikovale u odnosu na vrijednosti početnih uzoraka. Kod uzoraka pripremljenih s mlijekom, za razliku od uzoraka pripremljenih s vodom, vrijednosti udjela flavan-3-ola nakon skladištenja uzoraka signifikantno ($p < 0,05$) su se smanjile u odnosu na početne vrijednosti uzoraka, osim kod uzorka gKP_IG M.

6.4.5. Određivanje udjela proantocijanidina

Proantocijanidini su polimeri flavan-3-ola međusobno povezanih ugljikovom vezom koja nije podložna hidrolizi (Wollgast i Anklam, 2000). Za određivanje proantocijanidina koristi se oksidativna depolimerizacija kondenziranih tanina (proantocijanidina) koja je katalizirana kiselinom, do nastanka crveno obojenih antocijanidina (Porter i sur, 1986).

Uvidom u rezultate prikazane na slici 19 može se vidjeti porast udjela proantocijanidina kod obogaćenih uzoraka, pri čemu je najveći udjel kod uzoraka pripremljenih s vodom uočen kod uzorka gKP_SR M (7328,89 mg (-)- epikatehina/L) te kod uzorka gKP_SR R (1378,75 mg (-)- epikatehina/L) pripremljenog s mlijekom. S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da odabir biljne vrste nije imao utjecaj na udjel proantocijanidina, za razliku od odabira inkapsulacijske tehnike korištene za imobilizaciju polifenolnih ekstrakata koja je imala signifikantan ($p < 0,05$) utjecaj na udjel proantocijanidina. I u slučaju pripreme uzoraka s vodom i mlijekom, najmanji udjel proantocijanidina određen je kod uzorka gKP (voda - 5620,56 mg (-)- epikatehina/L; mlijeko - 894,39 mg (-)- epikatehina/L), budući da je isti bio podvrgnut procesu granuliranja, zbog čega je vjerojatno došlo do degradacije proantocijanidina osjetljivih na povišene temperature te je u skladu s tim određen manji udjel proantocijanidina u odnosu na uzorak čistog kakaovog praha koji nije prošao proces granuliranja.

Kod vodenih napitaka vrijeme skladištenja uzoraka kroz šest mjeseci imalo je signifikantan ($p < 0,05$) utjecaj na udjel proantocijanidina kod uzoraka gKP, gKP_IG R, gKP_SR M, pri čemu je došlo do smanjenja njihovog udjela, osim u slučaju gKP, gdje se vrijednost signifikantno ($p < 0,05$) povećala što bi se moglo pripisati utjecaju ljudskog faktora prilikom pripreme napitaka i provedbe same analize. Kod mliječnih napitaka, vrijednosti uzoraka gKP_IG M, gKP_IG R te gKP_SR R su se signifikantno ($p < 0,05$) smanjile nakon šestomjesečnog skladištenja uzoraka praškastih mješavina na bazi kakaovog praha.

6.4.6. Određivanje udjela ukupnih tanina

Na slici 20 prikazani su rezultati udjela ukupnih tanina u napitcima na bazi kakaovog praha pripremljenih s vodom i mlijekom. Iz rezultata dobivenih pripremom napitaka s vodom vidljivo je da je najveći udjel ukupnih tanina imao uzorak čistog kakovog praha (248,75 mg TK/L), a najmanji udjel određen je u uzorku gKP (202,5 mg TK/L), pri čemu se može zaključiti da je postupak granuacije značajno ($p < 0,05$) utjecao na smanjenje udjela tanina. Usporedbom rezultata udjela ukupnih tanina granuliranih uzoraka vidljivo je signifikantno ($p < 0,05$) povećanje udjela ukupnih tanina kod uzorka obogaćenog ružmarinom (gKP_SR R – 220 mg TK/L) u odnosu na neobogaćeni granulirani uzorak kakaovog praha (gKP). U slučaju pripreme uzoraka s mlijekom najveći udjel tanina imao je obogaćeni uzorak gKP_SR M (23,26 mg TK/L) koji je imao signifikantno ($p < 0,05$) veću vrijednost u odnosu na ostale uzorke. Odabir inkapsulacijske tehnike sušenja raspršivanjem u svrhu obogaćivanja uzoraka pripremljenih s

mlijekom, utjecao je na siginifikantno ($p < 0,05$) povećanje udjela ukupnih tanina u odnosu na uzorke obogaćene tehnikom sušenja raspršivanjem.

Kod uzoraka (KP i gKP) pripremljenih s vodom vrijednost udjela ukupnih taninasignifikantno ($p < 0,05$) se smanjila nakon šest mjeseci skladištenja svih uzoraka, dok je kod pripreme uzoraka s mlijekom uočena signifikantno ($p < 0,05$) manja vrijednost nakon skladištenja kod sljedećih uzoraka: gKP, gKP_IG R, gKP_SR M i gKP_SR R.

6.4.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Udjel polifenola u kakaovom prahu koji utječe na antioksidacijsku aktivnost ovisi o tehnikama prerade kakaovih zrna kao što su fermentacija, alkalizacija, prženje te čak i vrsta kakovog zrna (Arteel i sur., 2000).

U ispitivanim uzorcima određen je antioksidacijski kapacitet primjenom ABTS metode te su rezultati ispitivanih uzoraka prikazani na slici 21. Iz grafičkog prikaza rezultata vidljivo je da su obogaćeni uzorci pokazali veći antioksidacijski kapacitet što je i očekivano zbog utjecaja dodanih polifenola maslačka i ružmarina. Kod vodenih uzoraka signifikantno ($p < 0,05$) veći antioksidacijski kapacitet imao je uzorak obogaćen s ionsko geliranim česticama u koje je inkapsuliran ekstrakt maslačka (gKP_IG M – 15,48 mmol Trolox-a/L) u odnosu na ostale uzorke. Kod uzoraka pripremljenih s mlijekom najveći antioksidacijski kapacitet određen je u uzorku gKP_SR M (3,76 mmol Trolox-a/L). Svi obogaćeni uzorci pripremljeni s mlijekom imali su signifikantno ($p < 0,05$) veći antioksidacijski kapacitet u odnosu na neobogaćene uzorke kakaovog praha i granuliranog kakaovog praha (KP i gKP).

S vremenom skladištenja uzoraka signifikantno ($p < 0,05$) se smanjio antioksidacijski kapacitet kod gotovo svih uzoraka, osim kod sljedećih uzoraka pripremljenih s vodom gKP_IG R, gKP_SR M i gKP_SR R, te kod gKP pripremljenog s mlijekom. Tijekom skladištenja došlo je do smanjenja antioksidacijskog kapaciteta, kao i kod udjela polifenolnih spojeva, što je očekivan rezultat budući da su za antioksidacijski kapacitet različitih vrsta proizvoda najodgovorniji upravo polifenolni spojevi.

6.4.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Uzorcima na bazi kakaovog praha osim ABTS metodom, antioksidacijski kapacitet određen je i primjenom DPPH metode te su rezultati prikazani na slici 22. Najveći

antioksidacijski kapacitet kod vodenih, a i mliječnih napitaka, određen ovom metodom imao je uzorak gKP_SR R (9,79 mmol Trolox-a/L- voda; 2,18 mmol Trolox-a/L- mlijeko). Obogaćivanjem uzoraka polifenolima ružmarina tehnikom sušenja raspršivanjem dobivene su signifikantno ($p < 0,05$) veće vrijednosti u odnosu na iste pripremljene tehnikom ionskog geliranja. Prema dobivenim rezultatima antioksidacijskog kapaciteta uzoraka pripremljenih s vodom i mlijekom vidljivo je da odabir biljne vrste nije imao utjecaj na vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom.

Šestomjesečno skladištenje praškastih mješavina rezultiralo je signifikantnim ($p < 0,05$) smanjenjem antioksidacijskog kapaciteta kod obogaćenih uzoraka pripremljenih s vodom, dok kod uzoraka KP i gKP nije zabilježen znatan utjecaj. Kod uzoraka pripremljenih s mlijekom nakon skladištenja značajno ($p < 0,05$) se smanjio antioksidacijski kapacitet kod svih uzoraka, osim kod uzorka gKP, gdje se antioksidacijski kapacitet signifikantno ($p < 0,05$) povećao, što bi se i u ovom slučaju moglo pripisati utjecaju ljudskog faktora prilikom pripreme napitka i provedbe analize.

Usporedbom rezultata dobivenih ABTS i DPPH metodama, kod uzoraka pripremljenih s vodom, vidljivo je da su rezultati dobiveni ABTS metodom bili veći u odnosu na DPPH metodu, što se može pripisati činjenici da ABTS reagira i s lipofilnim te hidrofilnim skupinama, dok DPPH reagira samo s hidrofilnim skupinama (Sricharoen i sur., 2015).

Uzorci praškastih mješavina na bazi kakaovog praha pripremljeni s mlijekom pokazuju znatno niži antioksidacijski kapacitet u odnosu na uzorke pripremljene s vodom, što prati rezultate dobivene za polifenolne spojeve, a takav trend također se može pripisati stvaranju kompleksa protein-polifenol. U istraživanju Niseteo i suradnika (2012) u instant napitku cappuccina pripremljenom s vodom izmjeren je viši antioksidacijski kapacitet u odnosu na isti prelihen s mlijekom.

6.4.9. Određivanje udjela teobromina i kafeina u napitcima na bazi kakaovog praha primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Kakaovi proizvodi, osim polifenolnim spojevima, bogati su i ostalim bioaktivnim sastojcima, poput metilksanta, koji su u udjelu od 3,2 % prisutni u odmašćenom nezaslađenom sastavu čokolade (Belščak i sur., 2009). Metilksantini prisutni u kakaovom prahu su kafein (1,3,7-trimetilksantin) i teobromin (3,7-dimetilksantin), a pripisuje im se fiziološki učinak na

različite sustave u tijelu, uključujući središnji živčani sustav, probavni, dišni i mokraćni sustav (Nehling i sur., 1992; Spiller i sur., 1998; Caudle i sur., 2001).

U svim ispitivanim napitcima, HPLC analizom identificirani su te kvantificirani metilksantini teobromin i kafein.

Udjel teobromina u napitcima na bazi kakaovog praha prikazan je na slici 23. Najveći udjel teobromina u uzorcima pripremljenim s vodom imao je uzorak čistog kakaovog praha (KP), s udjelom od 1111,77 mg/L napitka, dok je najmanji određen u uzorku gKP_SR R, u udjelu od 973,56 mg/L napitka. Udjel teobromina određen u uzorku čistog kakaovog praha (KP) bio je signifikantno ($p < 0,05$) veći od udjela teobromina u ostalim uzorcima. Kod obogaćenih uzoraka i tehnike ionskog geliranja dobiven je signifikantno ($p < 0,05$) veći udjel teobromina u odnosu na obogaćivanje uzoraka primjenom tehnike sušenja raspršivanjem. Kod uzoraka pripremljenih s mlijekom signifikantno ($p < 0,05$) veći udjel teobromina imao je uzorak KP (243,62 mg/L), a u odnosu na ostale uzorke signifikantno ($p < 0,05$) manji udjel imao je uzorak gKP (197,15 mg/L). U slučaju obogaćenih uzoraka s mlijekom, odabir inkapsulacijske tehnike u svrhu obogaćivanja uzoraka nije imao signifikantan ($p < 0,05$) utjecaj na udjel teobromina.

Nakon skladištenja uzoraka udjel teobromina se značajno ($p < 0,05$) smanjio u odnosu na početne udjele kod svih uzoraka, osim kod uzorka gKP_IG R pripremljenog s vodom i uzorka KP i gKP_SR R s mlijekom.

Na slici 24 prikazan je udjel kafeina određen u napitcima na bazi kakaovog praha. Prema dobivenim rezultatima vidljiv je signifikantno ($p < 0,05$) veći udjel kafeina kod uzoraka obogaćenih s maslačkom (gKP_IG M-83,45 mg/L; gKP_SR M-84,12 mg/L) u odnosu na ostale uzorke, pri čemu je najmanji udjel određen u uzorku gKP_IG R (59,10 mg/L). Isti trend vidljiv je i kod mliječnih napitaka, gdje su uzorci obogaćeni maslačkom sadržavali veće udjele kafeina u odnosu na uzorke obogaćene ružmarinom.

Također, i ovdje su se vrijednosti udjela kafeina nakon skladištenja signifikantno ($p < 0,05$) smanjile u odnosu na početne vrijednosti udjela, uz pojedine fluktuacije.

Kao i kod određivanja udjela polifenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta, uzorci pripremljeni s mlijekom sadrže znatno manji udjel teobromina i kafeina zbog stvaranja kompleksa između analiziranih bioaktivnih komponenti uzoraka i proteina mlijeka čime im se smanjuje bioraspoloživost.

HPLC analizom napitaka na bazi kakaovog praha udjel teobromina bio je znatno veći u odnosu na udjel kafeina, što je u skladu s rezultatima dobivenim u istraživanju Belščak i

suradnika (2009), gdje je udjel teobromina i u vodenom i metanolnom ekstraktu bio veći u odnosu na udjel kafeina.

6.4.10. Određivanje udjela čikorinske i ružmarinske kiseline u napitcima na bazi kakaovog praha obogaćenim ekstraktima maslačka i ružmarina primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

U uzorcima obogaćenim polifenolima maslačka i ružmarina, metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) određen je udjel najznačajnijih hidroksicimetnih kiselina prisutnih u ekstraktima maslačka i ružmarina. Najzastupljenija hidroksicimetna kiselina u listu maslačka je čikorinska kiselina. Osim čikorinske maslačak u svom sastavu sadrži još klorogensku i kafeinsku kiselinu (González-Castejón i sur., 2012). U ekstraktu ružmarina najzastupljenije su ružmarinska i karnozinska kiselina (Bele i sur., 2010). U ovom radu, udjel čikorinske kiseline određen HPLC metodom u vodenom ekstraktu maslačka iznosio je 824,86 mg/L, a u ekstraktu ružmarina udjel ružmarinske kiseline iznosio je 2226,609 mg/L (rezultati nisu prikazani).

Na slici 25 prikazan je udjel čikorinske kiseline u napitcima obogaćenim polifenolima maslačka pripremljenim s vodom i mlijekom. Iz dobivenih rezultata za uzorke pripremljene s vodom može se vidjeti signifikantno ($p < 0,05$) veći udjel čikorinske kiseline u uzorku dobivenim sušenjem raspršivanjem (gKP_SR M - 84,07 mg/L) u odnosu na uzorak obogaćen ionsko geliranim česticama (gKP_IG M - 31,20 mg/L). Isti trend vidljiv je i za uzorke pripremljene s mlijekom.

Rezultati HPLC analize za udjel ružmarinske kiseline u napitcima obogaćenim ekstraktom ružmarina prikazani su na slici 26., pri čemu je vidljiv isti trend kao u slučaju određivanja udjela čikorinske kiseline.

Tehnikom sušenja raspršivanjem dobiveni su signifikantno ($p < 0,05$) veći udjeli ružmarinske kiseline u odnosu na tehniku ionskog geliranja za obje pripreme napitaka. Mogući razlog tome je što se obogaćivanjem uzoraka sušenjem raspršivanjem otopina nosača i bioaktivne tvari raspršuje direktno u uređaj pri čemu nastaju kapljice koje uklanjanjem vlage daju prah koji sadrži inkapsuliranu bioaktivnu tvar, dok se tehnikom ionskog geliranja dobivaju kapsule unutar kojih se nalazi bioaktivna tvar, te se one teže otapaju prilikom pripreme napitka.

I u slučaju određivanja udjela čikorinske i ružmarinske kiseline u napitcima obogaćenim maslačkom i ružmarinom, uzorci pripremljeni s mlijekom imali su znatno manji udjel čikorinske i ružmarinske kiseline u odnosu na udjele istih pripremljenih s vodom zbog stvaranja kompleksa polifenoli – proteini mlijeka.

6.5. Senzorska analiza napitaka na bazi kakaovog praha pripremljenih s vodom i mlijekom

Na slikama 27 i 28 prikazani su rezultati kvantitativno-deskriptivne senzorske analize kojom su se ocjenjivali atributi važni za senzorsku analizu napitaka. Nakon definiranja svih prepoznatih svojstava (izgled, boja, prepoznatljivost kakaovog praha, punoća okusa, biljni okus, slatkoća, gorčina, opća prihvatljivost, naknadni okus), ispitivani parametri ocijenjeni su skalom intenziteta od 1 do 9.

Rezultati senzorskog ocjenjivanja okusa i specifičnih atributa u napitcima pripremljenih s vodom prikazani su na slici 27. Izgled i boja bili su prihvatljivi kod svih uzoraka, dok se prepoznatljivost kakaovog praha očekivano najbolje prepoznala u uzorku čistog kakaovog praha (KP) te se ujedno u tom uzorku najviše osjetila punoća okusa. Očekivano, biljni okus najviše se osjetio kod uzoraka obogaćenih biljnim polifenolima maslačka i ružmarina, gdje je biljni okus bio više izražen kod uzoraka obogaćenih polifenolima ružmarina. Intenzitet slatkoće kod svih uzoraka bio je vrlo slabo izražen, dok je intenzitet gorčine ocijenjen visokim ocjenama kod svih uzoraka, pri čemu su najviše ocjene dobili uzorci obogaćeni ionsko geliranim česticama (gKP_IG M i gKP_IG R). Uzorak KP ocijenjen je kao najprihvatljiviji za konzumaciju. Također, napitci obogaćeni inkapsuliranim polifenolima maslačka i ružmarina, unatoč nepoznatom profilu okusa, bili su dobro prihvaćeni među panelistima, pri čemu je maslačak bio prihvatljiviji u odnosu na ružmarin. Naknadni okus najviše se osjetio u uzorku obogaćenom ekstraktom maslačka i tehnikom ionskog geliranja (gKP_IG M), a najmanje u uzorku istogekstrakta inkapsuliranom sušenjem raspršivanjem (gKP_SR M).

Rezultati senzorske analize uzoraka pripremljenih s mlijekom prikazani su na slici 28. Izgled svih uzoraka bio je zadovoljavajuć, kao i kod uzoraka s vodom, međutim atribut boje je kod nekih uzoraka s mlijekom (KP, gKP i gKP_IG M) bio lošije ocijenjen u odnosu na iste pripremljene s vodom. I kod pripreme napitaka s mlijekom, kao i s vodom, prepoznatljivost kakaovog praha bila je najviše izražena kod uzorka KP. Punoća okusa najviše se osjetila u

uzorku čistog KP te u granuliranom uzorku (gKP), a među obogaćenim uzorcima nije bilo značajnih razlika u ocjenjivanju. Kao i kod uzoraka pripremljenih s vodom, biljni okus je najviše bio izražen kod uzoraka obogaćenih ekstraktom ružmarina (gKP_IG R i gKP_SR R). Kod uzoraka pripremljenih s mlijekom intenzitet slatkoće bio je neznatno više izražen u odnosu na uzorke pripremljene s vodom, iako je i kod uzoraka s mlijekom bio zabilježen slabiji intenzitet slatkoće. Najjače izraženu gorčinu imao je uzorak gKP_IG M, pri čemu je intenzitet gorčine kod uzoraka s mlijekom bio manje izražen u odnosu na iste pripremljene s vodom. Također, prema ocjenama panelista uzorci KP i gKP pokazali su se kao najprihvatljiviji za konzumaciju u slučaju pripreme napitaka s mlijekom. Naknadni okus, koji potječe od biljnog materijala, najviše je bio izražen u uzorku gKP_IG M, a najmanje u uzorku gKP_SR M, što je bio i u slučaju pripreme napitaka s vodom.

Napitci na bazi kakaovog praha pripremljeni s mlijekom imali su veću prihvatljivost i punoću okusa u odnosu na napitke pripremljene s vodom. Atributi prepoznatljivosti kakaovog praha, biljnog okusa, gorčine i naknadnog okusa bili su jače izraženi kod napitaka pripremljenih s vodom.

7. ZAKLJUČCI

1. Ekstrakt ružmarina imao je veći udjel ukupnih polifenola i flavonoida, ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih tanina te veći antioksidacijski kapacitet određen ABTS i DPPH metodama u odnosu na ekstrakt lista maslačka.
2. Dodatak kakovog praha, kao novog materijala u sustavu nosača za inkapsulaciju, u alginatni i pektinski gel rezultirao je povećanjem inkapsulacijske učinkovitosti ukupnih polifenola. Najveću inkapsulacijsku učinkovitost ukupnih polifenola maslačka imao je sustav alginat-kakaov prah (91,12 %), dok je za ružmarin najučinkovitiji bio sustav pektin-kakaov prah (93,32 %), zbog čega su se isti koristili za obogaćivanje praškastih mješavina na bazi kakaovog praha.
3. Postupak granuliranja u fluidiziranom sloju rezultirao je poboljšanjem instant svojstava (topljivosti i disperzibilnosti) formuliranih praškastih mješavina, pri čemu su uzorci obogaćeni česticama primjenom sušenja raspršivanjem imali veću topljivost i disperzibilnost u odnosu na uzorke obogaćene s ionsko geliranim česticama.
4. Prema Carr indeksu praškaste mješavine spadaju u kategorije dobre i vrlo dobre tečnosti. Prema Hausnerovom omjeru kohezivnost praškastih mješavina je niska i srednja, dok prema indeksu kohezije praškaste mješavine na bazi kakaovog praha su karakterizirane kao vrlo kohezivne i izrazito kohezivne.
5. Postupkom granuliranja dobiveni su uzorci svijetlije boje. Ukupna promjena boje (ΔE) kod svih uzoraka bila je signifikantno ($p < 0,05$) različita, a najveća promjena boje određena je kod uzorka obogaćenog ionsko geliranim česticama s ekstraktom maslačka.
6. Uzorci obogaćeni inkapsuliranim polifenolima maslačka i ružmarina imali su veće udjele ukupnih polifenola i flavonoida, ukupnih hidroksicimetnih kiselina, flavan-3-ola i proantocijanidina te veći antioksidacijski kapacitet u odnosu na ostale uzorke, pri čemu su uzorci obogaćeni ekstraktom ružmarina imali veći udjel navedenih polifenolnih spojeva.
7. Napitci na bazi kakaovog praha pripremljeni s mlijekom imali su niži udjel svih ispitivanih polifenolnih spojeva te antioksidacijski kapacitet u odnosu na uzorke pripremljene s vodom, što se može pripisati stvaranju kompleksa polifenolnih spojeva i proteina mlijeka, čime se smanjuje raspoloživost bioaktivnih komponenti i antioksidacijskog kapaciteta.
8. Uzorak negranuliranog kakaovog praha, imao je veći udjel polifenolnih spojeva, kao i antioksidacijski kapacitet, u odnosu na neobogaćeni granulirani uzorak, što se može

pripisati primjeni povišene temperature od 50 °C u postupku granuliranja koja je dovela do određene degradacije dijela ispitivanih polifenolnih spojeva.

9. Nakon šest mjeseci skladištenja formuliranih praškastih mješavina vidljivo je blago smanjenje udjela ispitivanih bioaktivnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta, uz pojedine fluktuacije, što se može pripisati osjetljivosti polifenolnih spojeva na nepovoljne vanjske uvjete.
10. HPLC analizom napitaka na bazi kakaovog praha identificirani su metilksantini teobromin i kafein, karakteristični za kakaov prah, pri čemu je teobromin bio prisutan u većem udjelu. Skladištenjem uzoraka značajno ($p < 0,05$) se smanjio udjel teobromina i kafeina kod većine uzoraka.
11. HPLC analizom dokazana je prisutnost čikorinske kiseline u uzorcima obogaćenim ekstraktom maslačka te ružmarinske kiseline u uzorcima obogaćenim ekstraktom ružmarina, što je u skladu s dobivenim rezultatima povećanja udjela polifenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta kod uzoraka obogaćenih maslačkom i ružmarinom, pri čemu su uzorci obogaćeni tehnikom sušenja raspršivanjem imali značajno ($p < 0,05$) veće udjele čikorinske i ružmarinske kiseline.
12. Prema rezultatima senzorske analize napitci na bazi kakaovog praha pripremljeni s mlijekom imali su veću prihvatljivost i punoću okusa u odnosu na napitke pripremljene s vodom. Unatoč netipičnom profilu okusa novoformuliranih obogaćenih uzoraka, isti su bili karakterizirani visokom općom prihvatljivošću.
13. Uspješno su formulirane obogaćene granulirane praškaste mješavine na bazi kakaovog praha poboljšanih instant svojstava, izraženog bioaktivnog profila i prihvatljivih senzorskih karakteristika.

8. ZAHVALE

Prvenstveno se zahvaljujem mentorici prof.dr.sc Draženki Komes što mi je omogućila izradu i prijavu ovoga rada za Rektorovu nagradu te na njezinoj iznimnoj pomoći i vrijednim savjetima pri pisanju ovoga rada.

Najljepše se zahvaljujem asistentici Arijani Bušić, mag.ing. na podršci, strpljenju te na svom prenesenom znanju i pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada.

Posebno se zahvaljujem članovima obitelji i prijateljima na podršci, bodrenju i strpljenju.

9. LITERATURA

Ačkar Đ., Valek Lendić K., Valek M., Šubarić D., Miličević B., Babić J., Nedić I. (2013) Cocoa polyphenols: can we consider cocoa and chocolate as potential functional food? *Journal of Chemistry* **2013**: 1 – 7.

Adamiec J. (2009) Moisture sorption characteristics of peppermint oil microencapsulated by spray drying. *Drying Technology* **27(12)**: 1363 – 1369.

Aguilera J. M., Valle J. M., Karel M. (1995) Review: caking phenomena in food powders. *Trends in Food Science Technology* **6**: 149 – 154.

Al-Sereiti M. R., Abu-Amer K. M., Sen P. (1999) Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian Journal of Experimental Biology* **37**: 124 – 130.

Altunkaya A., Hedegaard R. V., Harholt J., Brimer L., Gökmen V., Skibsted L. H. (2013) Palatability and chemical safety of apple juice fortified with pomegranate peel extract. *Food & Function* **10**: 1468 – 1473.

Alu'datt M. H., Rababah T., Alhamad M., Al-Ghzawi A. L. A., Ereifej K., Gammoh S., Almajwal A., Hussein N. M., Raweshadeh M. (2017) Optimization, characterization and biological properties of phenolic compounds extracted from *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Essential Oil Research* **29(5)**: 375 – 384.

Amin A., Hamza A. A. (2005) Hepatoprotective effects of Hibiscus, Rosmarinus and Salvia on azathioprine-induced toxicity in rats. *Life Sciences* **77**: 266 – 278.

Amine K. M., Champagne C. P., Raymond Y., St-Gelais D., Britten M., Fustier P., Salmieri S., Lacroix M. (2014) Survival of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in Cheddar cheese during production and storage. *Food Control* **37**: 193 – 199.

Anonymous 1 (2013) <<https://www.erbe-medicinali.com/tarassaco.html>> Pristupljeno 1. svibnja 2018.

Anonymous 2 (2015) <<http://www.vcmhc.com/rosemary-rosmarinus-officinalis-good-as-a-food-spice-good-as-a-health-cure-part-1/>> Pristupljeno 1. svibnja 2018.

Anonymous 3 (2016) <<https://www.ispe.org/ispeak/wet-granulation-knowledge-brief>> Pristupljeno 16. ožujka 2018.

AOAC (1990) Moisture in Tobacco (966.02.). U: AOAC: Official Methods of Analysis, Helrich K., ur., Association of Official Analytical Chemists Inc. str 64.

Arteel G. E, Schroeder P, Sies H. (2000) Reactions of peroxy-nitrite with cocoa procyanidin oligomers. *Journal of Nutrition* **130(8)**: 2100 – 2104.

Augustin M. A. (2003) The role of microencapsulation in the development of functional dairy foods. *Australian Journal of Dairy Technology* **58(2)**: 156 – 160.

Augustin M. A., Hemar Y. (2009) Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews* **38(4)**: 902 – 912.

Barbosa-Cánovas G. V., Juliano, P. (2005) Physical and Chemical Properties of Food Powders. U: Encapsulated and Powdered Foods, Onwulata C., ur., CRC Press. str. 40 – 71.

Barbosa-Cánovas G. V., Ortega-Rivas E., Juliano P., Yan, H. (2005) Size Enlargement. U: Food Powders: Physical Properties, Processing and Functionality, Ortega-Rivas E., Juliano P., Yan, H., ur., Kluwer Academic/Plenum. str. 175 – 198.

Barbosa-Cánovas G. V., Ortega-Rivas E., Juliano P., Yan H. (2005) Drying. U: Food Powders: Physical Properties, Processing and Functionality, Ortega-Rivas E., Juliano P., Yan, H., ur., Kluwer Academic/Plenum. str. 271 – 304.

Barkouti A., Turchiuli C., Carcel J.A., Dumoulin E. (2013) Milk powder agglomerate growth and properties in fluidized bed agglomeration. *Dairy Science and Technology* **93**: 523 – 535.

Bate-Smith, E. C. (1973) Tannins in herbaceous leguminosae. *Phytochemistry* **12(7)**: 1809 – 1812.

Bele A. A., Jadhav V. M., Kadam V. J. (2010) Potential of tannins: a review. *Asian Journal of Plant Sciences* **9**: 209 – 214.

Belščak-Cvitanović A., Benković M., Komes D., Bauman I., Horžić D., Dujmić F., Matijašec M. (2010) Physical properties and bioactive constituents of powdered mixtures and drinks prepared with cocoa and various sweeteners. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58(12)**: 7187 – 7195.

Belščak-Cvitanović A., Komes D., Benković M., Karlović S., Hečimović I., Ježek D., Bauman I. (2012) Innovative formulation of chocolates enriched with plant polyphenols from *Rubus idaeus* L. leaves and characterization of their physical, bioactive and sensory properties. *Food Research International* **48**: 820 – 830.

Belščak A., Komes D., Horžić D., Kovačević Ganić K., Karlović D. (2009) Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International* **42(5-6)**: 707 – 716.

Benković M., Bauman I. (2011) Oblaganje čestica u prehrambenoj industriji. *Hrvatski časopis za Prehrambenu Tehnologiju, Biotehnologiju i Nutricionizam* **6(1-2)**: 13 – 24.

Benković M., Bauman I. (2013) Physical property assessment of coffee based cappuccino powder during storage. *Journal on Processing and Energy in Agriculture* **17(1)**: 17 – 19.

Benković M., Belščak-Cvitanović A., Komes D., Bauman I. (2011) Physical properties of non-agglomerated cocoa drink powder mixtures containing various types of sugar and sweetener. *Food and Bioprocess Technology* **6(4)**: 1044 – 1058.

Benković M., Srećec S., Špoljarić I., Mršić G., Bauman I. (2014) Fortification of instant coffee beverages - influence of functional ingredients, packaging material and storage time on physical properties of newly formulated, enriched instant coffee powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **95(13)**: 2607 – 2618.

Berdahl D. R., McKeague, J. (2015) Rosemary and Sage Extracts as Antioxidants for Food Preservation. U: Handbook of Antioxidants for Food Preservation, Shahidi, F., ur., Woodhead Publishing. str. 117 – 217.

Betoret E., Calabuig-Jiménez L., Barrera C., Dalla Rosa M. (2016) Sustainable Drying Technologies for the Development of Functional Foods and Preservation of Bioactive Compounds. U: Sustainable Drying Technologies, del Real-Olvera J., ur., IntechOpen. str. 37 – 57.

Bigliardi B., Galati F. (2013) Innovation trends in the food industry: the case of functional foods. *Trends in Food Science & Technolgy* **31**: 118 – 129.

Bonilla Godoy P. S., Lemos Materón C., López Gómez A. Y. (2016) Protein availability of an instant drink in base of plantain (*Musa Paradisiaca* L.) and guandul (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) meal. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriuales* **3**: 75 – 81.

Brand-Wiliams W., Cuvelier M. E., Berseti C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* **28**: 25 – 30.

Caleja C., Barros L., Barreira J. C. M., Ciric A., Sokovic M., Calhelha R. C., Beatriz, M., Oliveira P. P., Ferreira I. C. F. R. (2018) Suitability of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract rich in rosmarinic acid as a potential enhancer of functional properties in cupcakes *Food Chemistry* **250**: 67 – 74.

Çam M., İçyer N. C., Erdogan F. (2014) Pomegranate peel phenolics: microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT Food Science and Technology* **55**: 117 – 123.

Carr R. L. (1965) Evaluating flow properties of solids. *Chemical Engineering* **72**: 163 – 168.

Casanova F., Santos L. (2015) Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application - a review. *Journal of Microencapsulation* **33(1)**: 1 – 17.

- Caudle A. G., Gu Y., Bell L. N. (2001) Improved analysis of theobromine and caffeine in chocolate food products formulated with cocoa powder. *Food Research International* **34(7)**: 599 – 603.
- Chambin O., Dupuis G., Champion D., Voilley A., Pourcelot Y. (2006) Colon-specific drug delivery: Influence of solution reticulation properties upon pectin beads performance. *International Journal of Pharmaceutics* **321**: 86 – 93.
- 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. *Journal of Food Engineering* **117**: 545 – 550.
- Chen H. J., Inbaraj B. S., Chen B. H. (2012) Determination of phenolic acids and flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a post-column derivatization technique. *International Journal of Molecular Science* **13(1)**: 260 – 285.
- Córdoba A. L., Deladino L., Martino M. (2013) Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. *Carbohydrate Polymers* **95**: 315 – 323.
- Corso M. P., Vignoli J. A., Benassi M. T. (2016) Development of an instant coffee enriched with chlorogenic acid. *Journal of Food Sciences & Technology* **53**: 1380 – 1388.
- Corti R., Flammer A. J., Hollenberg N. K., Lüscher T. F. (2009) Cocoa and cardiovascular health. *Circulation* **119(10)**: 1433 – 1441.
- Daini O. A., Ogunledun A., Fagade O., Akinpelu O. S. (2003) Nutritional status of locally produced cocoa based beverages. *Nigerian Food Journal* **21**: 70 – 75.
- Day L., Seymour R. B., Pitts K. F., Konczak I., Lundin L. (2009). Incorporation of functional ingredients into foods. *Trends in Food Science & Technology* **20(9)**: 388 – 395.

Davidov-Pardo G., McClements D. J. (2015) Nutraceutical delivery systems: resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Food Chemistry* **167**: 205 – 212.

Del Baño M. J., Lorente J., Castillo J., Benavente-García O., Del Río J. A., Ortuño A., Quirin K.-W., Gerard D. (2003) Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51(15)**: 4247 – 4253.

De Muijnck L. (2005) Cocoa. U: Encapsulated and Powdered Foods, Onwulata, C., ur., CRC Press.

Desai K. G. H., Park H. J. (2005) Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology* **23(7)**: 1361 – 1394.

Dhanalakshmi K., Ghosal S., Bhattacharya S. (2011) Agglomeration of food powder and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **51(5)**: 432 – 441.

Di Stefano R., Cravero M. C., Gentilini N. (1989) Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. *L'Enotecnico* **25**: 83 – 89.

Dong F., Padua G. W., Wang Y. (2013) Controlled formation of hydrophobic surfaces by self-assembly of an amphiphilic natural protein from aqueous solutions. *Soft matter* **9**:5033 – 5941.

Duthie G. G., Pedersen M. W., Gardner P. T., Morrice P. C., Jenkinson A. M., McPhail D. B., Steele G. M. (1998) The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition* **52**: 733 – 736.

Đorđević V., Balanč B., Belščak-Cvitanović A., Lević S., Trifković K., Kalušević A., Kostić I., Komes D., Bugarski B., Nedović V. (2014) Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews* **7**: 452 – 490.

Erhatic R., Vukobratović M., Dudaš S., Mužić M. (2014) Kemijske karakteristike populacija maslačka s križevačkog i riječkog područja. *Agronomski glasnik* **3**: 127 – 136.

Erkan N., Ayranci G., Ayranci E. (2008) Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry* **110**(1): 76 – 82.

Fang Z., Bhandari B. (2010) Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science and Technology* **21**(10): 510 – 523.

Fellows J. P. (2000) Food Processing Technology: Principles and Practice, 3. izd., CRC Press. str. 481 – 482.

Fitzpatrick J. J. (2005) Food Powder Flowability. U: Encapsulated and Powdered Foods, Onwulata C., ur., CRC Press. str. 247 – 258.

Francisco C. R. L., Helenoa A. S., Fernandes P. M. I., Barreira C. M. J., Calhelhab C. R., Barros L., Gonçalves O. H., Ferreira C. F. R. I., Barreiro M. F. (2018) Functionalization of yogurts with *Agaricus bisporus* extracts encapsulated in spray-dried maltodextrin crosslinked with citric acid. *Food Chemistry* **245**: 845 – 853.

Fu S., Thacker A., Sperger D. M., Boni R. L., Buckner I. S., Velankar S., Munson E. J., Block L. H. (2011) Relevance of rheological properties of sodium alginate in solution to calcium alginate gel properties. *AAPS PharmSciTech* **12**(2):453 – 460.

Fuhrman B., Lavy A., Aviram M. (1995) Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *The American Journal of Clinical Nutrition* **61**(3): 549 – 554.

Gasparini L., Mano J. F., Reis R. L. (2014) Natural polymers for the microencapsulation of cells. *Journal of the Royal Society Interface* **11**: 20140817.

Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A., Saurel R. (2007) Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International* **40(9)**: 1107 – 1121.

Goh C. H., Heng P. W. S., Chan L.W. (2012) Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers* **88**: 1 - 12.

Gökmen V., Sügüt I. (2007) Computer-Vision Based Analysis of Colour as a Tool for Food Process Control. U: Focus on Food Engineering Research and Development, Pletney V. N., ur., Nova Publishers. str. 17 – 27.

Goldoni L. (2004) Tehnologija Konditorskih Proizvoda - Kakao i Čokolada, Kugler, str. 29 – 33.

Gomez-Estaca J., Balaguer M. P., Gavara R., Hernandez-Munoz P. (2012) Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin. *Food Hydrocolloids* **28(1)**: 82 – 91.

González-Castejón M., Visioli F., Rodriguez-Casado A. (2012) Diverse biological activities of dandelion. *Nutrition Reviews* **70(9)**: 534 – 547.

Gouin S. (2004) Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology* **15(7-8)**: 330 – 347.

Grasdalen H., Smidsrød O. (1987) Gelation of gellan gum. *Carbohydrate Polymers* **7(5)**: 371 – 393.

Greer F., Hudson R., Ross R., Graham T. (2001) Caffeine ingestion decreases glucose disposal during a hyperinsulinemic-euglycemic clamp in sedentary humans. *Diabetes* **50(10)**: 2349 – 2354.

Gruenwald J. (2009) Novel botanical ingredients for beverages. *Clinics in Dermatology* **27(2)**: 210 – 216.

Gutiérrez R., Alvarado J. L., Presno M., Pérez-Veyna O., Serrano C. J., Yahuaca P. (2010) Oxidative stress modulation by *Rosmarinus officinalis* in CCl₄-induced liver cirrhosis. *Phytotherapy Research* **24(4)**: 595 – 601.

Hacke A. C. M., Granato D., Maciel L. G., Weinert P. L., Prado-Silva L., Alvarenga V. O., de Souza Sant'Ana A., Bataglioni G. A., Eberlin M. N., Rosso N. D. (2016) Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) seeds: Chemical characterization and extraction of antioxidant and antimicrobial compounds. *Journal of Food Science* **81(9)**: 2206 – 2217.

Hartley P. A., Parfitt G. D., Pollack L. B. (1985) The role of the Van der Waals force in the agglomeration of powders containing submicron particles. *Powder Technology* **42(1)**: 35 – 46.

Hausner H. H. (1967) Friction conditions in a mass of metal powder. *International Journal of Powder Metallurgy* **3**: 7 – 13.

Hernández M. D., Sotomayor J. A., Hernández Á., Jordán M. J. (2016) Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Oils. U: Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety, Preedy V. R., ur., Academic Press. str. 677 – 686.

Hla K. P., Hogekamp S. (1999) Wetting behaviour of instantized cocoa beverage powders. *International Journal of Food Science and Technology* **34(4)**: 335 – 342.

Ilangantileke, S. G., Wahyudi, T., Bailon, G. (1991) Assessment methodology to predict quality of cocoa beans for export. *Journal of Food Quality* **14(6)**: 481 – 496.

Ivanov G. I. (2014) Polyphenols content and antioxidant activity of *Taraxacum officinale* F.H. Wigg (Dandelion) Leaves. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* **6(4)**: 889 – 893.

Jinapong N., Suphantharika M., Jamnong P. (2008) Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering* **84(2)**: 194 – 205.

Jones D. (1994) Air suspension coating for multiparticulates. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **20(20)**: 3175 – 3206.

Jones D. M. (1985) Factors to consider in fluid-bed processing. *Pharmaceutical Technology* **9**: 50 – 62.

Juliano P., Muhunthan, B., Barbosa-Canovas G. V. (2006) Flow and shear descriptors of preconsolidated food powders. *Journal of Food Engineering* **72(2)**: 157 – 166.

Kaur N., Singh D. P. (2017) Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: a literature review. *Appetite* **112**: 167 – 187.

Khan I. A., Abourashed, E. A. (2010) Leung's Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics, 3. izd., John Wiley & Sons. str. 238.

Koh Y. J., Cha D. S., Ko J. S., Park H. J., Choi H. D. (2010) Anti-inflammatory effect of *Taraxacum officinale* leaves on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells. *Journal of Medicinal Food* **13**: 870 – 878.

Komes D., Bušić A., Vojvodić A., Belščak-Cvitanović A., Hruškar M. (2015) Antioxidative potential of different coffee substitute brews affected by milk addition. *European Food Research and Technology* **241(1)**: 115 – 125.

Kowalska J., Lenart A. (2005) The influence of ingredients distribution on properties of agglomerated cocoa products. *Journal of Food Engineering* **68(2)**: 155 – 161.

Krasaekoopt W., Watcharapoka S. (2014) Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT Food Science Technology* **57**: 761 – 766.

Kurosawa T., Itoh F., Nozaki A., Nakano, Y., Katsuda S. I., Osakabe N., Tubone H., Kondo K., Itakura H. (2005) Suppressive effect of cocoa powder on atherosclerosis in Kurosawa and

Kusanagi-hypercholesterolemic rabbits. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* **12(1)**: 20 – 28.

Langer R., Peppas N. A. (2003) Advances in biomaterials, drug delivery and bionanotechnology. *Bioengineering, Food, and Natural Products* **49(12)**: 2990 – 3006.

Larossa A. P. Q., Cadaval Jr., K. D. S., Pinto, L. A. A. (2014) Influence of drying methods on the characteristics of a vegetable paste formulated by linear programming maximizing antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology* **60(1)**: 178 – 185.

Lee K. Y., Mooney D. J. (2012) Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science* **37**: 106 – 126.

Lesinger I. (1999) Ljekovitost Povrća, Voća i Začina, Pastoralni krug Alojzije Stepinac. str. 158.

Li L., Fang Y., Vreeker R., Appelqvist I. (2007) Reexamining the Egg-Box Model in Calcium-Alginate Gels with X-ray Diffraction. *Biomacromolecules* **8**: 464-468

Loncin M., Merson R. L. (1979) Food Engineering: Principles and Selected Applications, Academic Press. str. 229 – 271.

Malmö C., Stora A. L., Mauriello G. (2013) Microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 cells coated in alginate beads with chitosan by spray drying to use as a probiotic cell in a chocolate soufflé. *Food and Bioprocess Technology* **6**: 795 – 805.

Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Remesy C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition* **81(1)**: 230S – 242S.

Martín M. Á., Ramos S., Cordero-Herrero I., Bravo L., Goya L. (2013) Cocoa phenolic extract protects pancreatic beta cells against oxidative stress. *Nutrients* **5(8)**: 2955 – 2968.

Matkowski A., Tasarz P., Szypuła E. (2008) Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. *Journal of Medicinal Plants Research* **2**: 321 – 330.

Mir M. A., Sawhney S. S., Jassal M. M. S. (2013) Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals of *Taraxacum officinale*. *Wudpecker Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2(1)**: 1 – 5.

Morais R. M. S. C., Morais A. M. M. B., Dammak I., Bonilla J., Sobral P. J. A., Laguerre J.-C., Afonso M. J., Ramalhosa E. C. D. (2018) Functional dehydrated foods for health preservation. *Journal of Food Quality* **2018**: 1 – 29.

Mrkić V., Cocci E., Dalla Rosa M., Sacchetti, G. (2006) Effect of drying conditions on bioactive compounds and antioxidant activity of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**: 1559 – 1566.

Mukherjee S., Bhattacharya S. (2006) Characterization of agglomeration process as a function of moisture content using a model food powder. *Journal of Texture Studies* **37(1)**: 35 – 48.

Munin A., Edwards-Lévy F. (2011) Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics* **3**: 793 – 829.

Munjeri O., Hodza P., Osim E. E., Musabayane C. T. (1998) An investigation into the suitability of amidated pectin hydrogel beads as a delivery matrix for chloroquine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **87(8)**: 905 – 908.

Murakami H., Yoneyama T., Nakajima K., Kobayashi M. (2001) Correlation between loose density and compactibility of granules prepared by various granulation methods. *International Journal of Pharmaceutics* **216**: 159 – 164.

Nantz M. P., Rowe C. A., Nieves Jr. C., Percival S. S. (2006) Immunity and antioxidant capacity in humans is enhanced by consumption of a dried, encapsulated fruit and vegetable juice concentrate. *Journal of Nutrition* **136(10)**: 2606 – 2610.

Nehlig A., Daval J., Debry G. (1992) Caffeine and the central nervous system: mechanisms for action, biochemical, metabolic, and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews* **17(2)**: 139 – 170.

Niseteo T., Komes D., Belščak-Cvitanović A., Horžić D., Budeč M. (2012) Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition. *Food Chemistry* **134(4)**: 1870 – 1877.

Ngo S. N., Williams D. B., Head R. J. (2011) Rosemary and cancer prevention: preclinical perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **51(10)**: 946 – 954.

Omobuwajo T. O., Busari O. T., Osemwegie A. A. (2000) Thermal agglomeration of chocolate drink powder. *Journal of Food Engineering* **46(2)**: 73 – 81.

Ortega-Rivas E. (2005) Handling and Processing of Food Powders and Particulates. U: Encapsulated and powdered foods, Onwulata C., ur., CRC Press. str. 75 – 144.

Ough C. S., Amerine M. A. (1988) Methods for analysis of musts and wine, John Wiley & Sons. Inc. str. 196 – 221.

Parikh D. M., Bonck J. A., Mogavero M. (1997) Batch Fluid Bed Granulation. U: Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology, Parikh D. M., ur., Marcel Dekker Inc. str. 227 – 302.

Peleg M. (1978) Flowability of food powders and methods for its evaluation: A review. *Journal of Food Process Engineering* **1(4)**: 303 – 328.

Pérez-Chabela M. L., Lara-Labastida R., Rodríguez-Huezo E., Totosa A. (2013) Effect of spray drying encapsulation of thermotolerant lactic acid bacteria on meat batters properties. *Food and Bioprocess Technology* **6**: 1505 – 1515.

Petreska-Ivanovska T., Petrushevska-Tozi L., Grozdanov A., Petkovska R., Hadjieva J., Popovski E., Stafilov T., Mladenovska K. (2014) From optimization of synbiotic microparticles

prepared by spray-drying to development of new functional carrot juice. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **20(4)**: 549 – 564.

Porter L. J., Hrstich L., Chan B. G. (1986) The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* **25(1)**: 223 – 230.

Pravilnik o kakau i čokoladnim proizvodima (2005) *Narodne novine* **73** (NN 73/2005).

Price M. L., Van Scoyoe S., Butler L. G. (1978) A critical evaluation of vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **26**: 1214 – 1218.

Racoviță Ș., Vasiliu S., Popa M., Luca C. (2009) Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. *Revue Roumaine de Chimie* **54**: 709 – 718.

Ramljak D., Romanczyk L.J., Metheny-Barlow L.J., Thompson N., Knezevic V., Galperin M., Ramesh A., Dickson R. B. (2005) Pentameric procyanidin from *Theobroma cacao* selectively inhibits growth of human breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* **4(4)**: 537 – 546.

Ramos L. R., Santos J. S., Daguer H., Valesse A. C., Cruz A. G., Granato D. (2017) Analytical optimization of a phenolic-rich herbal extract and supplementation in fermented milk containing sweet potato pulp. *Food Chemistry* **221**: 950 – 958.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* **26**: 1231 – 1237.

Rios L. Y., Gonthier M. P., Rémésy C., Mila I., Lapierre C., Lazarus S. A., Williamson G., Scalbert A. (2003) Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *The American Journal of clinical nutrition* **77(4)**: 912 – 918.

Rocha G. A., Fávoro-Trindade C. S., Ferreira Grosso C. R. (2012) Microencapsulation of lycopene by spray drying: characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioproducts Processing* **90**: 37 – 42.

Rolin C. (1993) Pectin. U: Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives, 3. izd., Whistler R. L., Bemiller J. N., ur., Academic Press. str. 257 – 293.

Rowley J. A., Madlambayan G., Mooney D. J. (1999) Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* **20**: 45 – 53.

Rusak G., Kustrak D., Males Z., Plese N. (1993) The determination of the content of polyphenols in the aerial parts of the species *Centaurea rupestris* L. and *C. fritschii* Hayek (*Asteraceae*). *Acta Pharmaceutica* **43**: 121 – 125.

Sang S., Lee M. J., Hou Z., Ho C. T., Yang C. S. (2005) Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53(24)**: 9478 – 9484.

Sanguansri L., Augustin M. A. (2009) Microencapsulation in Functional Food Product Development. U: Functional Food Product Development, Smith J., Charter E., ur., John Wiley & Sons. str. 3 – 23.

Sasikumar B. (2012) Rosemary. U: Handbook of Herbs and Spices, Peter, K. V., ur., Woodhead Publishing in Food Science and Technology. str. 243 – 252.

Scalbert A., Williamson G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition* **22**: 2073 – 2085.

Schubert H. (1980) Processes and properties of instant powdered foods. *Food Processing Engineering* **1**: 675 – 684.

Schubert H. (1987) Food particle technology. Part I: Properties of particles and particulate food systems. *Journal of Food Engineering* **6(1)**: 1 – 32.

- Schubert H. (1993) Instantization of powdered food products. *International Chemical Engineering* **33(1)**: 28 – 45.
- Schuchmann H. (1995) Production of instant foods by jet agglomeration. *Food Control* **6(2)** 95 – 100.
- Schütz K., Carle R., Schieber A. (2006) *Taraxacum* – A review on its phytochemical and pharmacological profile. *Journal of ethnopharmacology* **107(3)**: 313 – 323.
- Serafini M., Ghiselli A., Ferro-Luzzi A. (1996) *In vivo* antioxidant effect of green and black tea in man. *European Journal of Clinical Nutrition* **50(1)**: 28 – 32.
- Seville J. K. P., Willett C. D., Knight P. C. (2000) Interparticle forces in fluidisation: A review. *Powder Technology* **113**: 261 – 268.
- Shahidi F., Naczki M. (2003) Phenolics in Food and Nutraceuticals, 13. izd., CRC Press. str. 313.
- Shittu T. A., Lawal M. O. (2007) Factors affecting instant properties of powdered cocoa beverages. *Food Chemistry* **100(1)**: 91 – 98.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **299**: 152 – 179.
- Singleton V. L., Rossi J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**: 144 – 158.
- Sohail A., Turner M. S., Prabawati E. K., Coombes A. G. A., Bhandari B. (2012) Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM encapsulated using a novel impinging aerosol method in fruit food products. *International Journal of Food Microbiology* **157**: 162 – 166.

Spiller G. A. (1998) Basic Metabolism and Physiological Effects of the Methylxanthines. U: Caffeine, Spiller G. A., ur., CRC Press. str. 225 – 231.

Sricharoen P., Techawongstein S., Chantai S. (2015) Determination of lipophilic and hydrophilic antioxidant activities in the crude extracts of ten varieties of tomatoes. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology* **20(1)**: 66 – 74.

Srouf N., Daroub H., Toufeili I., Olabi A. (2015) Developing a carob-based milk beverage using different varieties of carob pods and two roasting treatments and assessing their effect on quality characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **96**: 3047 – 3057.

Singh B. N., Kim K. H. (2005) Effects of divalent cations on drug encapsulation efficiency of deacylated gellan gum. *Journal of Microencapsulation: Micro and Nano Carriers* **22(7)**: 761 – 771.

Soltani R., Hashemi M., Farazmand A., Asghari G., Heshmat-Ghahdarijani K., Kharazmkia A., Ghanadian S. M. (2017) Evaluation of the effects of *Cucumis sativus* seed extract on serum lipids in adult hyperlipidemic patients: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Journal of Food Science* **82(1)**: 214 – 218.

Sotelo-Félix J. I., Martínez-Fong D., Muriel P., Santillán R. L., Castillo D., Yahuaca P. (2002) Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *Journal of Ethnopharmacology* **81(2)**: 145 – 154.

Sriamornsak P., Nunthanid J. (1999) Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery: II. Effect of formulation and processing variables on drug release. *Journal of Microencapsulation: Micro and Nano Carriers* **16(3)**: 303 – 313.

Staszewski V. M., Jagus R. J., Pilosof A. M. R. (2011) Characterization of Whey Protein Polyphenol Interactions by Dynamic Light Scattering. U: Proceedings of 11th International Congress on Engineering and Food. Saravacos, G., ur., Elsevier Procedia. str. 1 – 6.

Steinberg F. M., Bearden, M. M., Keen, C. L. (2003) Cocoa and chocolate flavonoids: implications for cardiovascular health. *Journal of the American Dietetic Association* **103(2)**: 215 – 223.

Szulc K., Lenart A. (2013) Surface modification of dairy powders: Effects of fluid-agglomeration and coating. *International Dairy Journal* **33**: 55 – 61.

Škrovánková S., Mišurcová L., Machů L. (2012) Antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants. *Advances in food and nutrition research* **67**: 75 – 139.

Takasi S., Seibi P. A. (1998) Paste and gel properties of prim3 corn and wheat starches with and without nitic liquids. *Cereal Chemistry* **65**: 474 – 483.

Teunou E., Vasseur J., Krawczyk M. (1995) Measurement and interpretation of bulk solids angle of repose for industrial process design. *Powder Handling Process* **7(3)**: 219 – 227.

Tomaru M., Takano H., Osakabe N., Yasuda A., Inoue K., Yanagisawa R., Ohwatari T., Uematsu H. (2007) Dietary supplementation with cacao liquor proanthocyanidins prevent elevation of blood glucose levels in diabetic obese mice. *Nutrition* **23**: 351 – 355.

Tsao R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**: 1231 – 1246.

Turchiuli C., Eloualia Z., El Mansouri N., Dumoulin E. (2005) Fluidised bed agglomeration: Agglomerates shape and end-use properties. *Powder Technology* **157**: 168 – 175.

Van het Hof K. H., De Boer H. S. M., Wiseman S. A., Lien N., Weststrate J. A., Tijburg L. B. M. (1997) Consumption of green or black tea does not increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* **66**: 1125 – 1132.

Van Laere K. M. J., Hartemink R., Bosveld M., Schols H. A., Voragen A. G. J. (2000) Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48(5)**: 1644 – 1652.

Visotto F. Z., Jorge L. C., Makita G. T., Rodrigues M. I., Meneegalli F. C. (2010) Influence of the process parameters and sugar granulometry on cocoa beverage powder steam agglomeration. *Journal of Food Engineering* **97**: 283 – 291.

Vu T.O., Galet L., Fages J., Oulahna D. (2003) Improving the dispersion kinetics of a cocoa powder by size enlargement. *Powder Technology* **130(1-3)**: 400 – 406.

Wandrey C., Bartkowiak A., Harding S. E. (2009) Materials for Encapsulation. U: Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing, Zuidam, N. J., Nedović, V. A., ur., Springer. str. 31 – 100.

Wojdyło A., Oszmian'ski J., Czemerys R. (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* **105**: 940 – 949.

Wollgast J., Anklam A. (2000) Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* **33**: 423 – 447.

Xie P. J., Huang L. X., Zhang C. H., Ding, S. S., Deng, Y. J., Wang X. J. (2018) Skin-care effects of dandelion leaf extract and stem extract: Antioxidant properties, tyrosinase inhibitory and molecular docking simulations. *Industrial Crops & Products* **111**: 238 – 246.

Yamamoto C., Neoh T. L., Honbou H., Furuta T., Kimura S., Yoshii, H. (2012) Formation of a polymer-coated inclusion complex of D-limonene and β -cyclodextrin by spray drying. *Drying Technology*. **30(15)**: 1714 – 1719.

Young J. F., Nielsen S. E., Haraldsdottir J., Daneshvar B., Lauridsen S. T., Knuthsen, P., Crozier, A., Sandstrom, B., Dragsted, L. O. (1999) Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *American Journal of Clinical Nutrition* **69**: 87 – 94.

Yu M. H., Choi J. H., Chae I.G., Im H.G., Yang S.A., More K., Lee I.S., Lee J. (2013) Suppression of LPS-induced inflammatory activities by *Rosmarinus officinalis* L. *Food Chemistry* **136 (2)**: 1047 – 1054.

Zhu Q. Y., Holt R. R., Lazarus S. A., Ensunsa J. L., Hammerstone J. F., Schmitz H. H., Keen C. L. (2002) Stability of theflavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50(6)**: 1700 – 1705.

Zuidam N. J., Shimoni E. (2010) Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. U: Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing, Zuidam N. J., Nedovic V. A., ur., Springer. str. 3 – 29.

Primjena inkapsuliranih biljnih ekstrakata za obogaćivanje praškastih mješavina namijenjenih pripremi napitaka na bazi kakaovog praha

Gabrijela Šišić

SAŽETAK: Kakaovi napitci vrlo su popularni među svim dobnim skupinama zbog bogatog nutritivnog sastava i atraktivnih senzorskih svojstava, što ukazuje na veliki potencijal kakaovog praha kao sirovine za razvoj novih funkcionalnih proizvoda. Cilj ovog rada bio je razviti funkcionalne granulirane praškaste mješavine namijenjene pripremi napitaka na bazi kakaovog praha, obogaćene biljnim ekstraktima maslačka i ružmarina, pri čemu su ekstrakti maslačka i ružmarina u svrhu zaštite bioaktivnih spojeva inkapsulirani tehnikama ionskog geliranja i sušenja raspršivanjem. Praškaste mješavine obogaćene inkapsuliranim biljnim ekstraktima pripremljene su postupkom granuliranja u fluidiziranom sloju. Obogaćenim praškastim mješavinama na bazi kakaovog praha određene su fizikalno-kemijske karakteristike, dok je napitcima pripremljenima s vodom i mlijekom, spektrofotometrijskim metodama ispitan bioaktivni profil (polifenolni spojevi i antioksidacijski kapacitet). U biljnim ekstraktima i napitcima na bazi kakaovog praha određen je i udjel pojedinačnih bioaktivnih spojeva HPLC tehnikom. Također, ispitan je utjecaj granuliranja, vrste inkapsulacijskog sustava i biljne vrste na ispitivane parametre te je ispitan bioaktivni profil napitaka nakon šest mjeseci skladištenja praškastih mješavina. U svrhu ispitivanja prihvatljivosti novoformuliranih proizvoda provedena je senzorska analiza napitaka primjenom kvantitativno deskriptivne metode. Postupak granuliranja utjecao je na poboljšanje instant svojstava (topljivost i disperzibilnost) i svojstva tečenja praškastih mješavina. U odnosu na negranulirani uzorak kakaovog praha, proces granuliranja rezultirao je smanjenjem udjela bioaktivnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta. Obogaćivanje uzoraka polifenolnim ekstraktima maslačka i ružmarina rezultiralo je povećanjem udjela polifenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta, pri čemu su uzorci s ružmarinom imali veći udjel bioaktivnih spojeva, u odnosu na iste s maslačkom. Također, napitci pripremljeni s mlijekom imali su niži udjel polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet u odnosu na iste pripremljene s vodom. Tijekom skladištenja došlo je do manjih fluktuacija u bioaktivnom sastavu i antioksidacijskom kapacitetu praškastih mješavina. Prisutnost čikorinske i ružmarinske kiseline u uzorcima obogaćenima ekstraktima maslačka i ružmarina potvrdila je dobar izbor odabranih biljnih vrsta za razvoj funkcionalnih praškastih mješavina, koja su uz izražen bioaktivni profil imala i dobra instant svojstva te prihvatljive senzorske karakteristike, što ukazuje na njihovu potencijalnu širu industrijsku primjenu.

Ključne riječi: granuliranje, inkapsulacija, kakaov napitak, maslačak, polifenoli, ružmarin

Application of encapsulated plant extracts for enrichment of powdered mixtures aimed for preparation of cocoa powder based beverages

Gabrijela Šišić

SUMMARY: Cocoa drinks are very popular among all age groups due to their rich nutritional composition and attractive sensory properties, what indicates on the great potential of cocoa powder as a raw material for the development of new functional products. The aim of this study was to develop functional granulated powdered mixtures intended for the preparation of cocoa powder based beverages, enriched with plant extracts of dandelion and rosemary, whereby the extracts of dandelion and rosemary with the purpose of protecting bioactive compounds were encapsulated by ionic gelation and spray drying techniques. Powdered mixtures enriched with encapsulated plant extracts were prepared by a fluid bed granulation process. Enriched powdered mixtures were investigated for physico-chemical properties, while bioactive profile (polyphenols and antioxidant capacity) was investigated in cocoa powder based beverages, prepared with water and milk, using spectrophotometric methods. In plant extracts and cocoa based beverages the content of individual bioactive compounds was determined by HPLC technique. Also, the influence of granulation, the type of encapsulation system and plant species on the examined parameters was examined and the bioactive profile of beverages was evaluated after six months of storage of powdered mixtures. For the purpose of testing the acceptability of newly formulated products, sensory analysis of beverages was performed using a quantitative-descriptive method. The granulation process resulted in enhanced instant properties (solubility and dispersibility) and the flow properties of powder mixtures. The granulation process caused a decrease of bioactive compounds and antioxidant capacity in comparison to ungranulated cocoa powder. Enrichment of samples with dandelion and rosemary polyphenolic extracts resulted in an increase of polyphenolic content and antioxidant capacity, whereby rosemary samples had a greater content of bioactive compounds compared to those prepared with a dandelion. Also, beverages prepared with milk had a lower content of polyphenolic compounds and antioxidant capacity compared to those prepared with water. During the storage, there were certain fluctuations in the bioactive composition and antioxidant capacity of powdered mixtures. The presence of chicoric and rosmarinic acid in enriched samples with dandelion and rosemary extracts confirmed a good selection of plant species for the development of functional powdered mixtures which beside of a pronounced bioactive profile also had a good instant properties and acceptable sensory characteristics, indicating thereby their potential in wide industrial application.

Key words: cocoa beverages, dandelion, encapsulation, granulation, polyphenols, rosemary