

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Alenka SLATINEK

**MIKROKAPSULIRANJE EKSTRAKTA  
GRANATNEGA JABOLKA (*Punica granatum* L.)**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Alenka SLATINEK

**MIKROKAPSULIRANJE EKSTRAKTA GRANATNEGA JABOLKA**  
**(*Punica granatum* L.)**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

**MICROENCAPSULATION OF POMEGRANATE EXTRACT**  
**(*Punica granatum* L.)**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes: Field Food Science and Technology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Živilstvo. Delo je bilo opravljeno na Biotehniški fakulteti, Oddelku za živilstvo, Katedri za biokemijo in kemijo živil.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Natašo Poklar Ulrich, za recenzentko prof. dr. Tatjano Košmerl.

Mentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrich

Recenzentka: prof. dr. Tatjana Košmerl

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Alenka Slatinek

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

- ŠD Du2
- DK UDK 664.022:615.014.6:547.56(043)=163.6
- KG živilsko inženirstvo/kapsulacija/mikrokapsule/granatno jabolko/*Punica granatum* L./rastlinski ekstrakti/alginat/pektin/fenolne spojine/antocianini
- AV SLATINEK, Alenka, dipl. inž. živ. in preh. (UN)
- SA POKLAR ULRIH, Nataša (mentorica)/ KOŠMERL, Tatjana (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2015
- IN MIKROKAPSULIRANJE EKSTRAKTA GRANATNEGA JABOLKA (*Punica granatum* L.)
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo)
- OP XI, 64 str., 24 pregl., 36 sl., 35 vir.
- IJ sl
- JII sl/en
- AI V okviru magistrskega dela smo z enkapsulatorjem Büchi B-395 Pro izdelali mikrokapsule iz alginata in mešanice alginata ter pektina. V mikrokapsule smo poskusili vključiti ekstrakt granatnega jabolka (*Punica granatum* L.). Naš namen je bil, da naredimo čim manjše in stabilne mikrokapsule, ki bi lahko zadržale večje količine ekstrakta granatnega jabolka. Z optimiranjem koncentracije polimera, razmerjem alginata in pektina ter velikostjo šob smo izdelali mikrokapsule, ki so zadržale 20–30 % ekstrakta granatnega jabolka, vendar žal ne v tolikšni meri, da bi mikrokapsule lahko vključili v matrico živila in spremljali, ali ima enkapsuliran ekstrakt granatnega jabolka vpliv na podaljšanje obstojnosti živila. Antioksidativno aktivnost ekstrakta granatnega jabolka (prostega in kapusliranega) smo določili z ABTS-metodo. Iz mikrokapsul smo sproščanje polifenolnih spojin določali še s Folin-Ciocalteu reagentom. S spektrofotometrično metodo smo določali skupne antocianine ter s HPLC-metodo identificirali posamezne antocianine v ekstraktu granatnega jabolka. Z vsemi metodami smo potrdili, da je kombinacija alginata in pektina v razmerju 7 : 3 najbolj učinkovita za kapsuliranje ekstrakta granatnega jabolka (v primerjavi z uporabo enega samega polimera ali uporabo drugega razmerja alginata in pektina). Določali smo še, koliko ekstrakta dejansko ostane v mikrokapsulah po liofilizaciji in rehidraciji. Pričakovali smo, da bodo rezultati podobni teoretičnim, a žal temu ni bilo tako.

### KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2  
DC UDK 664.022:615.014.6:547.56(043)=163.6  
CX food engineering/encapsulation/microcapsules/pomegranate/*Punica granatum* L./plant extracts/alginate/pectin/phenolic compounds/anthocyanins  
AU SLATINEK, Alenka  
AA POKLAR URLIH, Nataša (supervisor)/KOŠMERL, Tatjana (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2015  
TY MICROENCAPSULATION OF POMEGRANATE EXTRACT (*Punica granatum* L.)  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)  
NO XI, 64 p., 24 tab., 36 fig., 35 ref.  
LA sl  
AI sl/en  
AB As part of this master thesis we produced microcapsules from alginate and alginate-pektin with encapsulator Büchi B-395 Pro. We tried to encapsulate the extract of pomegranate (*Punica granatum* L.). Our main goal was to make very small and stable microcapsules which could contain more extract of pomegranate. By optimizing the concentration of the polymer, the ratio of alginate and pectin and size of the nozzle we have produced microcapsules that retained 20 - 30 % of the extract of pomegranate – unfortunately not enough to include them into the matrix of the food and possibly monitor if extract of pomegranate have an extension resistance. The antioxidant activity of the encapsulated extract of pomegranate and the free extract of pomegranate was determined with ABTS method. With the Folin-Ciocalteu reagent we determined polyphenolic compounds that released from the microcapsules. With the spectrophotometric method we determined total anthocyanins and with HPLC method we identified specific anthocyanins in pomegranate extract. With all the methods used we could confirm that the combination of alginate and pectin in the ration of 7 : 3 is the most effective for encapsulation of the extract of pomegranate (compared with the use of a single polymer or using other ratio of alginat and pectin). After lyophilization and rehydration we determined how many extract actually stays in microcapsules. We expected results similar to the theoretical predictions but unfortunately this was not the case.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>XI</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN NALOGE .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 MIKROKAPSULIRANJE .....	3
<b>2.1.1 Postopki izdelave mikrokapsul .....</b>	<b>5</b>
2.1.1.1 Metode ekstruzije curka tekočine .....	5
<b>2.1.2 Ogrodni materiali za kapsuliranje .....</b>	<b>7</b>
2.1.2.1 Alginat .....	8
2.1.2.1.1 Viri in pridobivanje alginata .....	8
2.1.2.1.2 Struktura alginata .....	8
2.1.2.1.3 Tvorba gela .....	9
2.1.2.1.4 Aplikacije alginata .....	9
2.1.2.2 Pektin .....	10
2.1.2.2.1 Viri in pridobivanje pektina .....	10
2.1.2.2.2 Struktura pektina .....	10
2.1.2.2.3 Lastnosti pektina .....	11
2.1.2.2.4 Aplikacije pektina .....	11
2.1.2.3 Alginat-pektin sistem .....	12
<b>2.1.3 Uporaba kapsuliranih dodatkov v živilstvu .....</b>	<b>12</b>
2.2 GRANATNO JABOLKO ( <i>Punica granatum</i> L.) .....	12
<b>2.2.1 Zgodovina .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.2 Hranljivost in sestava .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.3 Lastnosti granatnega jabolka .....</b>	<b>13</b>
2.3 ANTIOKSIDANTI .....	14
<b>2.3.1 Vloga antioksidantov v živilih .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.2 Vloga antioksidantov pri ljudeh .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.3 Vitamin C .....</b>	<b>15</b>
2.4 POLIFENOLNE SPOJINE .....	16
<b>2.4.1 Flavonoidi .....</b>	<b>16</b>
2.4.1.1 Antocianini .....	17
2.4.1.2 Antocianini v granatnem jabolku .....	17
2.4.1.3 Pomen antocianinov kot naravnih barvil .....	18

<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 MATERIALI .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.1 Sok.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.2 Polimeri .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.3 Reagenti .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.4 Standardi antocianinov .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.5 Aparature .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.6 Pribor .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.7 Priprava koncentriranega soka granatnega jabolka.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.8 Priprava polimernega materiala .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.9 Priprava raztopin .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.10 Priprava standardnih raztopin antocianinov za HPLC-analizo .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 METODE .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.1 Priprava liofilizata granatnega jabolka.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.2 Priprava kapsul v CaCl<sub>2</sub> .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.3 Priprava kapsul z ekstraktom granatnega jabolka.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.4 Določanje antioksidativne aktivnosti z metodo ABTS .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.5 Folin-Ciocalteu metoda za določanje skupnih fenolnih spojin.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.6 Določanje antocianinov .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.6.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC-metoda).....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.6.2 Spektrofotometrično določanje skupnih antocianinov .....</b>	<b>30</b>
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 POSKUS PRIPRAVE MIKROKAPSUL BREZ EKSTRAKTA .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.1 Poskus priprave mikrokapsul iz alginata .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.1.1 Parametri mikrokapsulatorja Büchi B-395 Pro .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.1.1.1 Poskus priprave mikrokapsul iz 1,5 % raztopine alginata.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1.1.1.2 Poskus priprave mikrokapsul iz 2 % raztopine alginata .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.2 Priprave mikrokapsul iz mešanice alginata in pektina.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 PRIPRAVA MIKROKAPSUL Z EKSTRAKTOM GRANATNEGA JABOLKA .....</b>	<b>39</b>
<b>4.2.1 Stabilnost mikrokapsul, napolnjenih z ekstraktom granatnega jabolka, pripravljenih iz 1,5 % raztopine alginata .....</b>	<b>39</b>
<b>4.2.2 Stabilnost mikrokapsul, napolnjenih z ekstraktom granatnega jabolka, pripravljenih iz 2 % raztopine alginata .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2.3 Primerjava sproščanja ekstrakta granatnega jabolka iz 1,5- in 2 % raztopine alginatnih mikrokapsul, pripravljenih z uporabo 80 in 120 µm velikima šobama.....</b>	<b>42</b>
<b>4.3 VPLIV RAZLIČNIH pH CaCl<sub>2</sub> NA SPROŠČANJE EKSTRAKTA GRANATNEGA JABOLKA IZ MIKROKAPSUL .....</b>	<b>43</b>
<b>4.4 IZBIRA OPTIMALNIH PARAMETROV ZA IZDELAVO MIKROKAPSUL Z EKSTRAKTOM GRANATNEGA JABOLKA .....</b>	<b>47</b>
<b>4.4.1 Merjenje antioksidativne aktivnosti ekstrakta granatnega jabolka v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> z ABTS-metodo .....</b>	<b>48</b>
<b>4.4.2 Določanje skupnih polifenolnih spojin s Folin-Ciocalteu metodo .....</b>	<b>49</b>
<b>4.4.3 HPLC-metoda .....</b>	<b>50</b>
<b>4.4.4 Spektrofotometrično določanje skupnih antocianinov .....</b>	<b>51</b>
<b>4.4.5 Primerjava ABTS, Folin-Ciocalteu in spektrofotometrične metode .....</b>	<b>52</b>

4.5 DOLOČITEV EKSTRAKTA GRANATNEGA JABOLKA V MIKROKAPSULAH PO LIOFILIZACIJI .....	53
4.6 DOLOČANJE POSAMEZNIH ANTOCIANINOV S HPLC-METODO .....	55
<b>5 SKLEPI .....</b>	<b>57</b>
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>59</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>61</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1: Morfološke lastnosti mikrokapsul; vgrajena aktivna snov je lahko bodisi enakomerno dispergirana po celotnem volumnu delca bodisi se nahaja le v jedru delca (Zvonar in Gašperlin, 2011) .....	3
Slika 2: Princip delovanja mikrokapsulatorja Büchi B-395 Pro (Büchi, 2014). ....	6
Slika 3: Struktorna formula alginata (Alborzi, 2012).....	8
Slika 4: Struktura delno metiliranega pektina (Alborzi, 2012). ....	11
Slika 5: Funkcionalne lastnosti in zdravstveni učinki granatnega jabolka (Viuda-Martos in sod., 2010). .....	14
Slika 6: Struktorna formula in shema označevanja posameznih mest v molekulah antocianinov (Lee in sod., 2005). .....	17
Slika 7: Strukturne formule antocianinov v granatnem jabolku, 1: cianidin-3-glukozide; 2: cianidin-3,5-diglukozid; 3: delfinidin-3-glukozid; 4: delfinidin-3,5-diglukozid; 5: pelargonidin-3-glikozid; 6: pelargonidin-3,5-diglukozid (Viuda-Martos in sod., 2010) ...	18
Slika 8: Mikrokaspulator Büchi B-395 Pro v laboratoriju. ....	21
Slika 9: UV-Vis spektorfotometer v laboratoriju za kemijo in biokemijo živil. ....	21
Slika 10: HPLC v laboratoriju za kemijo in biokemijo živil.....	22
Slika 11: Umeritvena krivulja št. 1 odvisnosti absorbance (pri 734 nm) od masne koncentracije soka granatnega jabolka.....	27
Slika 12: Umeritvena krivulja št. 2 odvisnosti absorbance (pri 734 nm) od masne koncentracije soka granatnega jabolka.....	28
Slika 13: Umeritvena krivulja odvisnosti absorbance (pri 765 nm) od masne koncentracije soka granatnega jabolka.....	29
Slika 14: Umeritvena krivulja odvisnosti ploščine antocianina od koncentracije.....	30
Slika 15: Neustrezne mikrokapsule, ki smo jih posneli pri 40-kratni povečavi, narejene z mikrokapsulatorjem Büchi B 395 Pro, pri spremnjanju parametrov hitrosti pretoka raztopine, frekvence in napetosti (preglednica 7, a-f). .....	33
Slika 16: Ustrezne mikrokapsule, posnete pri 40-kratni povečavi, narejene z mikrokapsulatorjem Büchi B-395 Pro pri spremnjanju parametrov hitrosti pretoka raztopine, frekvence in napetosti (preglednica 7, g-l). .....	34

Slika 17: Neustrezne mikrokapsule, posnete pri 40-kratni povečavi, narejene z mikrokapsulatorjem Büchi B-395 Pro pri spreminjanju parametrov hitrosti pretoka raztopine, frekvence in napetosti (preglednica 7, m-s).....	34
Slika 18: Mikroskopska slika mikrokapsul, narejenih iz 1,5 % raztopine alginata z različno velikimi šobami (1: 80 µm; 2: 120 µm; 3: 200 µm in 4: 450 µm). .....	35
Slika 19: Mikroskopska slika mikrokapsul, narejenih iz 2 % raztopine alginata z različno velikimi šobami (1:80 µm; 2: 120 µm in 3: 200 µm).....	36
Slika 20: Mikrokapsule, pripravljene pri različnih razmerjih alginata in pektina, posnete s svetlobnim mikroskopom. ....	38
Slika 21: Sproščanje ekstrakta granatnega jabolka iz mikrokapsul, pripravljenih iz 1,5 % raztopine alginata, narejenih z uporabo različno velikih šob (80, 120 in 200 µm), v odvisnosti od časa vzorčenja. ....	40
Slika 22: Sproščanje ekstrakta granatnega jabolka iz mikrokapsul, pripravljenih iz 2 % raztopine alginata, z uporabo različno velikih šob (80, 120 in 200 µm), v odvisnosti od časa vzorčenja.....	41
Slika 23: Primerjava odvisnosti sproščanja ekstrakta granatnega jabolka iz 1,5 % in 2 % mikrokapsul, narejenih iz 80 in 120 µm velikima šobama.....	43
Slika 24: Delež sproščenega ekstrakta granatnega jabolka iz mikrokapsul različnih razmerij alginata in pektina v 0,1 M CaCl <sub>2</sub> s pH 3,5 (T = 25 °C), ter ekstrakt v 0,1 M CaCl <sub>2</sub> s pH 3,5, določenega z ABTS-metodo, v odvisnosti od časa vzorčenja. ....	45
Slika 25: Delež sproščenega ekstrakta granatnega jabolka iz mikrokapsul različnih razmerij alginata in pektina v 0,1 M CaCl <sub>2</sub> s pH 7,0 (T = 25 °C), ter ekstrakt v 0,1 M CaCl <sub>2</sub> s pH 7,0, določenega z ABTS-metodo, v odvisnosti od časa vzorčenja. ....	45
Slika 26: Sprememba barve ekstrakta granatnega jabolka v različnih pH 0,1 M CaCl <sub>2</sub> (T = 25 °C), v levi časi je pH 0,1 M CaCl <sub>2</sub> 7,0, v desni časi je pH 0,1 M CaCl <sub>2</sub> 3,5.....	46
Slika 27: Mikrokapsule, pripravljene iz 2 % mešanice alginata in pektina v razmerju 7 : 3, posnete pod mikroskopom pri 100-kratni povečavi. ....	48
Slika 28: Delež sproščenega ekstrakta granatnega jabolka v 0,1 M CaCl <sub>2</sub> (pH 3,5; T = 25,0 °C) iz kapsul v odvisnosti od časa vzorčenja. ....	48
Slika 29: Delež sproščenih polifenolnih spojin iz mikrokapsul v 0,1 M CaCl <sub>2</sub> , s pH 3,5 pri T = 25 °C v odvisnosti od časa vzorčenja. ....	49
Slika 30: Delež sproščenih skupnih antocianinov v 0,1 M CaCl <sub>2</sub> s pH 3,5 (T = 25 °C), ki smo jih detektirali s HPLC-metodo, in odstotek skupnih antocianinov, ki so teoretično še ostali v mikrokapsulah.....	50

Slika 31: Delež sproščenih skupnih antocianinov v 0,1 M CaCl <sub>2</sub> s pH 3,5 odvisno od časa vzorčenja.....	51
Slika 32: Primerjava sproščanja ekstrakta granatnega jabolka iz mikrokapsul, ki smo ga določili z ABTS, Folin-Ciocalteu in spektrofotometrično metodo. ....	52
Slika 33: Delež sproščanja antioksidativne aktivnosti iz liofiliziranih in rehidriranih mikrokapsul odvisen od časa vzorčenja (T = 25 °C). Antioksidativna aktivnost, določena po ABTS-metodi (A) in po Folin-Ciocalteu metodi (B). .....	53
Slika 34: Prikaz mikrokapsul po liofilizaciji in rehidraciji po 3, 48 in 72 urah. Pod oznako 1a-3a so mikrokapsule iz alginata, pod 1b-3b pa mikrokapsule, pripravljene iz mešanice alginat-pektina. ....	54
Slika 35: Kromatogram antocianinov v granatnem jabolku naših vzorcev.....	55
Slika 36: Graf razmerij med posameznimi antocianini v soku granatnega jabolka in 0,1 M CaCl <sub>2</sub> (pH 3,5) po kapsulaciji. Del-2-Glu: delfinidin-di-glukozid, Cy-2-Glu: cianidin-di-glukozid, Del-3-Glu: delfinidin-3-glukozid, Pel-2-Glu: pelargonidin-di-glukozid, Cy-3-Glu: cianidin-3-glukozid, Del-Cl: delfinidin klorid, Cy-Ar/Cy-Ks: cianidin-arabinozid ali cianidin-ksilozid. ....	56

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Metode mikrokapsuliranja (Zvonar in Gašperlin, 2011) .....	5
Preglednica 2: Volumen koncentriranega soka granatnega jabolka, reagentov za umeritveno krivuljo št. 1 (ABTS in pufer s pH 7,0) in vrednosti izmerjenih absorbanc pri 734 nm .....	26
Preglednica 3: Volumen koncentriranega soka granatnega jabolka, reagentov za umeritveno krivuljo št. 2 (ABTS in pufer s pH 7,0) in vrednosti izmerjenih absorbanc pri 734 nm .....	27
Preglednica 4: Volumen koncentriranega soka granatnega jabolka, reagentov za umeritveno krivuljo (Folin-Ciocalteu, $\text{Na}_2\text{CO}_3$ in vode) in vrednosti izmerjenih absorbanc pri 765 nm.....	28
Preglednica 5: Volumen raztopine standarda cianidin-3-glukozida in mobilne faze ter koncentracija in ploščina vrha cianidin-3-glukozida, katerega smo uporabili za pripravo umeritvene krivulje.....	30
Preglednica 6: Območja parametrov na mikrokapsulatorju Büchi B-395 Pro (pretok, frekvenca in napetost) pri različno velikih šobah, ki smo jih uporabili v našem eksperimentu.....	32
Preglednica 7: Območja parametrov na mikrokapsulatorju Büchi B-395 Pro pri pripravi mikrokapsul z uporabo 1,5 % raztopine alginata in 120 $\mu\text{m}$ velike šobe.....	35
Preglednica 8: Parametri na mikrokapsulatorju Büchi B-395 Pro pri pripravi mikrokapsul z uporabo 1,5 % raztopine alginata in različno velikih šob.....	35
Preglednica 9: Parametri na mikrokapsulatorju Büchi B-395 Pro pri pripravi mikrokapsul, z uporabo 2 % raztopine alginata in različno veliki šob.....	36
Preglednica 10: Razmerja alginata in pektina (v deležih), ki smo jih uporabili pri poskusu z mešanico alginat-pektina. ....	37
Preglednica 11: Parametri na mikrokapsulatorju Büchi B-395 Pro pri poskusih z uporabo različnih razmerij alginat-pektina in velikostjo 120 $\mu\text{m}$ šobe, pri 1,5 % raztopini mešanice alginata in pektina.....	38
Preglednica 12: Sproščanje ekstrakta granatnega jabolka iz 1,5 % alginatnih mikrokapsul, narejenih z uporabo različno velikih šob.....	39
Preglednica 13: Sproščanje ekstrakta granatnega jabolka iz 2 % alginatnih mikrokapsul, narejenih z uporabo različno velikih šob.....	41

Preglednica 14: Parametri na mikrokapsulatorju Büchi B-395 Pro, pri izdelavi mikrokapsul iz 1,5 in 2 % raztopine alginata, z uporabo različno velikih šob, ter koncentracija ekstrakta granatnega jabolka in velikost kapsul pri T = 25,0 °C .....	42
Preglednica 15: Parametri na mikrokapsulatorju Büchi B-395 Pro pri pripravi mikrokapsul iz različnih razmerij polimerov (alginat-pektina), pri različnih vrednostih pH CaCl <sub>2</sub> ter koncentracijah ekstrakta granatnega jabolka.....	44
Preglednica 16: Deležlung und sproščanja ekstrakta granatnega jabolka iz 2 % (alginat-pektin) mikrokapsul v 0,1 M CaCl <sub>2</sub> pri pH 3,5 in 7,0, iz mikrokapsul, narejenih iz različnih razmerij alginata in pektina pri T = 25,0 °C.....	44
Preglednica 17: Parametri na mikrokapsulatorju pri izdelavi »optimalnih« mikrokapsul .	47
Preglednica 18: Sproščanje ekstrakta granatnega jabolka iz mikrokapsul, pripravljenih iz 2 % raztopine alginata in 2 % mešanice alginata in pektina v razmerju 7 : 3, z uporabo 120 µm šobe, v odvisnosti od časa vzorčenja. Sproščanje antioksidativne aktivnosti smo določili z ABTS-metodo (pH 3,5; T = 25 °C) .....	48
Preglednica 19: Sproščanje polifenolnih spojin granatnega jabolka iz mikrokapsul, pripravljenih iz 2 % raztopine alginata in 2 % mešanice alginata in pektina v razmerju 7 : 3, z uporabo 120 µm šobe, v odvisnosti od časa vzorčenja.....	49
Preglednica 20: Sproščanje skupnih antocianinov granatnega jabolka iz mikrokapsul, pripravljenih iz 2 % raztopine alginata in 2 % mešanice alginata in pektina v razmerju 7 : 3, z uporabo 120 µm šobe, v odvisnosti od časa vzorčenja.....	51
Preglednica 21: Delež sproščenega ekstrakta granatnega jabolka v CaCl <sub>2</sub> (pH 3,5; T = 25 °C), določnega z ABTS, Folin-Ciocalteu in spektrofotometrično metodo, in delež teoretično določenega ekstrakta v mikrokapsulah.....	52
Preglednica 22: Delež sproščenega ekstrakta granatnega jabolka iz liofiliziranih in rehidriranih mikrokapsul po 15, 60, 1440 in 2880 minutah, določenega z metodama ABTS in Folin-Ciocalteu .....	53
Preglednica 23: Številke pikov na kromatogramu in ime identificiranega antocianina s kraticami .....	55
Preglednica 24: Razmerja med posameznimi antocianini v analiziranem soku in 0,1 M CaCl <sub>2</sub> (pH 3,5; T = 25 °C) v različnih poskusih.....	56

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b>ABTS</b>	2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina
<b>Alg</b>	alginat
<b>DE</b>	stopnja esterifikacije (angl. Degree of esterification)
<b>EFSA</b>	Evropska agencija za varnost hrane (angl. European Food Safety Authority)
<b>FC</b>	Folin-Ciocalteu reagent
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>G</b>	guluronska kislina
<b>GalA</b>	galakturonska kislina
<b>GRAS</b>	splošno priznan kot varen (angl. Generally recognized as safe)
<b>Hepes</b>	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
<b>HM</b>	visoko metilirani (angl. High methoxyl)
<b>HPLC</b>	tekocinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. High performance liquid chromatography)
<b>LM</b>	nizko metilirani (angl. Low methoxyl)
<b>M</b>	manuronska kislina
<b>Pek</b>	pektin
<b>pKa</b>	disociacijska konstanta kisline (angl. Acid dissociation constant)
<b>Troloks</b>	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kislina

## 1 UVOD

Mikrokapsuliranje je hitro razvijajoča se tehnologija, ki se uporablja za pakiranje različnih snovi. Gre za proces, kjer se eno snov (aktivno snov oz. učinkovino) obda oz. obloži z drugo snovjo (ogrodnim materialom oz. steno) in pri tem nastanejo delci na mikrometrskem oz. nanometrskem nivoju. V živilski in prehranski industriji se metode kapsulacije uporabljajo predvsem za vključevanje naravnih snovi, kot so polifenolne spojine, vitamini, barvila, hlapni aditivi, encimi itd. v živila, kar jim omogoča večjo stabilnost in obstojnost. Namen mikrokapsuliranja aktivnih spojin je zaščita pred zunanjimi vplivi, kot so kisik, voda, vlaga, svetloba, pH, temperatura itd., ter vključevanje mikrokapsul z aktivnimi spojinami v živila, kjer imajo pomembno funkcijo preprečevanja oksidacije, funkcijo barvila ter arome in druge. Mikrokapsuliranje omogoča boljše rokovanie z aktivno spojino ter nadzorovan sproščanje spojin v živilu (Akhavan-Mahdavi in Mahdi-Jafari, 2014). Dandanes se je razvilo veliko metod za pripravo mikrokapsul. Metoda, ki se uporablja, je odvisna od lastnosti aktivne spojine (ali je plinasta, tekoča ali v prahu, ali je polarna/nepolarna, itd.) in od ogrodnega materiala ter cilja, kamor se bodo mikrokapsule vključile (Zuidam in Shimon, 2010).

Antioksidanti, kot so vitamini, polifenolne spojine, kot so flavonoidi in antocianidini, preprečujejo oz. upočasnujejo oksidacijo maščob in senzorične spremembe ter preprečujejo nekatere bolezni pri ljudeh, kot so rak, arterioskleroza, vnetja in kardiovaskularne bolezni. Flavonoidi so polifenolne spojine, ki se nahajajo pretežno v semenih in sadežih rastlin in v pijačah, kot so čaj, vino in pivo. Polifenolne spojine imajo zaradi svojega redoks potenciala pomembno vlogo pri nevtralizaciji radikalov in oksidantov. Ta lastnost polifenolnih spojin predstavlja njihovo antioksidativno aktivnost. Zaradi pozitivnih lastnosti na človekovo zdravje in preprečevanja oksidacije ter zmanjševanja uporabe sintetičnih antioksidantov živilska industrija teži k uporabi naravnih antioksidantov, ki so bogati s polifenolnimi spojinami in vitaminimi, ter jih vključuje v živila, da bi bila funkcionalna. Ker veliko naravnih antioksidantov ni stabilnih, lahko negativno vplivajo na barvo in aroma hrane, zato jih pakirajo v mikrokapsule (Lupo in sod., 2013).

Barva izdelka je za potrošnika ena najpomembnejših lastnosti živila, saj daje prvi vtis kvalitete izdelka. V živilski industriji se vse bolj uporabljajo barvila, ki so naravnega izvora, med drugim tudi antocianine. Antocianini so naravna barvila rastlin in so zelo razširjena skupina spojin. Nahajajo se v cvetovih, sadju, zelenjavni, listih in koreninah. Antocianini rastline različno obarvajo, od rdeče do vijolične in modre ter vseh odtenkov teh barv. Spadajo v skupino polifenolnih spojin in podskupino flavonoidov. So snovi, ki delujejo antioksidativno, protimikrobnno, antikancerogeno in protivnetno ter so iz zdravstvenega vidika zelo koristne. Zunanji dejavniki, kot so pH, kovinski ioni,

izpostavitev svetlobi, temperatura, kisik in encimska aktivnost lahko vplivajo na spremembo barve in na stabilnost antocianinov (Özkan in Bilek, 2014).

Granatno jabolko (*Punica granatum* L.) je bogat vir polifenolnih spojin in antocianinov, ki se lahko uporabljamjo kot naravne komponente v živilih. Polifenolne spojine granatnega jabolka s svojo antioksidativnostjo, ki je trikrat večja kot v drugih sadežih, rdečem vinu in zelenem čaju, vplivajo na preprečevanje oksidacije maščob in s tem podaljšujejo rok uporabnosti živilom. Antocianini dajejo živilom intenzivno barvo, s tem dajejo izdelku kakovost in privabljamjo potrošnike (Robert in sod., 2010). S svojimi funkcionalnimi in zdravstvenimi učinki, ki jih imajo spojine v različnih delih sadeža, se granatno jabolko lahko uvršča v skupino funkcionalnih živil. Spojine, ki jih vsebuje, delujejo antioksidativno, antikancerogeno, antihepatotoksično, preprečujejo kardiovaskularne bolezni, pozitivno vplivajo na kožo in ustno votlino ter imajo protimikrobne, protivnetne in protivirusne lastnosti (Viuda-Martos in sod., 2010). Granatna jabolka se uporabljamjo v sveži ali predelani obliki kot sokovi, marmelade, žejeji, sirupi, omake in aditivi, ki izboljšajo okus in barvo živila (Zarei in sod., 2011).

## 1.1 NAMEN NALOGE

V raziskavi smo proučevali stabilnost mikrokapsul, v katere smo vgradili ekstrakt granatnega jabolka. Za merjenje stabilnosti smo uporabili ABTS, Folin-Ciocalteu, HPLC in spektrofotometrično metodo. Namen magistrskega dela je bil najti optimalen material za ogrodje mikrokapsul, ki ne bo reagiral z vsebino in bo odporen na zunanje vplive (temperatura, pH, vlaga). Določiti smo žeeli ustrezno velikost mikrokapsul za čim bolj učinkovito delovanje ekstrakta granatnega jabolka kot antioksidanta in barvila. Naš namen je bil tudi preveriti obnašanje uporabljenih materialov gotovega izdelka v matrici živila.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

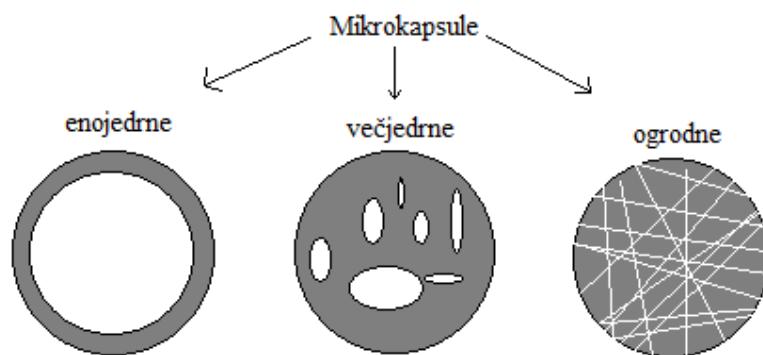
- Predvidevamo, da bodo kombinacije polisaharidov primernejše za kapsuliranje kot uporaba samo enega polisaharida.
- Predvidevamo, da bo velikost kapsul med 20–200  $\mu\text{m}$  najprimernejša za kapsuliranje.
- Predvidevamo, da se bo obstojnost testnega izdelka z dodatkom kapsul granatnega jabolka podaljšala.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 MIKROKAPSULIRANJE

Mikrokapsuliranje je proces, pri katerem zelo drobne kapljice, trdne delce ali zračne mehurčke obdamo oz. obložimo s kontinuiranim slojem polimera, lipida ali drugih ustreznih snovi. Če je velikost nastalih delcev v mikrometrskem nivoju, le-ti ustreza širši definiciji mikrokapsul, ki zajema s postopkom mikrokapsuliranja izdelane delce mikrometrskih velikosti (Zvonar in Gašperlin, 2011).

Obstaja tudi ožja definicija mikrokapsul, ki zajema morfološke lastnosti nastalih delcev in mikrokapsule definira kot majhne, trdne delce okroglih oblik, velikosti 1–1000 (2000)  $\mu\text{m}$ , ki so sestavljeni iz jedra in ovojnice. Morfološke lastnosti mikrokapsul so odvisne predvsem od sestave jedra, ki je lahko trdno, tekoče ali plinasto, ter od procesa izdelave. Po širši definiciji so mikrokapsule lahko tako pravilnih kot tudi nepravilnih oblik, na osnovi njihove morfološke sestave pa jih delimo na enojedrne, večjedrne in ogrodne mikrokapsule (Slika 1). Pri ogrodnem oz. matriks tipu mikrokapsul sta mikrokapsulirana snov in ogrodni material enakomerno porazdeljena po celotnem volumnu delca. Za enojedrne in večjedrne mikrokapsule, ki ustrezajo tudi ožji definiciji mikrokapsul, pa je značilno, da lahko v njihovi strukturi jasno razločimo eno ali več jader, ki ga/jih obdaja ovojnica (Zvonar in Gašperlin, 2011).



Slika 1: Morfološke lastnosti mikrokapsul; vgrajena aktivna snov je lahko enakomerno dispergirana po celotnem volumnu delca bodisi se nahaja le v jedru delca (Zvonar in Gašperlin, 2011).

Mikrokapsuliranje je bilo pred 60 leti prvotno uporabljeno na področju biotehnologije za pripravo ogrodnega materiala za celice, ki naj bi omogočal boljšo in hitrejšo separacijo metabolitov. Danes se omenjena tehnologija široko uporablja v farmaciji, zlasti za sproščanje zdravil in cepiva, ter v živilski in prehranski industriji (El-Abbassi in sod., 2014). V živilski in prehranski industriji to metodo uporabljajo predvsem za vgrajevanje aktivnih sestavin in njihovega nadzorovanega sproščanja (Deladino in sod., 2008). Ta vidik je pomembno izhodišče, saj se lahko iz naravnih in varnih materialov ter sistemov embalaže podaljša rok uporabe hitro pokvarljivim živilom (sadju, zelenjavi, mesu, ribam, mlečnim izdelkom itd.), ne da bi to zmanjšalo njihove lastnosti, kakovost in higieno. Z vgrajevanjem določenih aktivnih snovi lahko prikrijemo neprijeten okus in vonj ter zaščitimo aktivno sestavino pred zunanjimi vplivi, kot so kisik, voda, svetloba in drugi dejavniki, ki vplivajo na stabilnost aktivnih snovi (Robert in sod., 2010). Zavedati se je treba, da je z ekonomskoga vidika to draga tehnologija, zato je njeni uporabo potrebno tehtno utemeljiti (Zvonar in Gašperlin, 2011). Kapsulirali so že veliko snovi, med drugim, aminokisline, vitamine, minerale, antioksidante, barvila, eterična olja, encime in sladila (Deladino in sod., 2008).

Prednosti mikrokapsuliranja v živilski industriji (Zuidam in Shimoni, 2010; Nedović in sod., 2011; Kunz in sod., 2003):

- vgrajena aktivna spojina je zavarovana pred različnimi vplivi iz okolja (vlaga, UV-žarki, encimi itd.).
- Kontrolirane in nastavljive lastnosti aktivne snovi (velikost delcev, struktura, barva itd.).
- Preprečevanje nezaželenih interakcij z živilom.
- Prekrivanje okusa in vonja aktivne spojine.
- Kontrolirano in ciljno sproščanje aktivne spojine.
- Preprečevanje oz. upočasnjevanje procesov razgradnje aktivne spojine, kot so hidroliza in oksidacija, in s tem podaljšanje roka uporabe in povečanje stabilnosti.
- Povečanje biološke vrednosti živila.

Slabosti mikrokapsuliranja v živilski industriji (Zuidam in Shimoni, 2010):

- dodatni (višji) stroški.
- Večja zahtevnost proizvodnega procesa in dobavnega postopka.
- Zavračanje in nesprejemljivost s strani potrošnikov.
- Problem stabilnosti mikrokapsul med predelavo in skladiščenjem izdelkov.

### 2.1.1 Postopki izdelave mikrokapsul

Prve mikrokapsule so bile izdelane z metodo, imenovano kompleksna koacervacija, do danes pa se je razvilo in izpopolnilo še mnogo drugih metod. Metode mikrokapsuliranja lahko v grobem razdelimo na kemijske, fizikalno-kemijske in fizikalno-mehanske. Ne glede na mehanizem nastanka mikrokapsul lahko vsako izmed metod razdelimo v tri osnovne korake: vgradnja učinkovine, oblikovanje mikrokapsul in stabiliziranje le-teh (Zvonar in Gašperlin, 2011; Kunz in sod., 2003).

Preglednica 1: Metode mikrokapsuliranja (Zvonar in Gašperlin, 2011).

KEMIJSKE METODE	FIZIKALNO-KEMIJSKE METODE	FIZIKALNO-MEHANSKE METODE
Medfazna polimerizacija	Koacervacija in ločitev faz	Metode ekstruzije curka tekočine
In situ polimerizacija	Tehnologije s superkritičnimi fluidi	Metoda sušenja z razprševanjem ("Spray drying")
	Metode emulgiranja s sledečim odstranjevanjem topila oz. strjevanjem notranje faze	Mikrokapsuliranje z iztiskanjem talin
	Oblaganje plast na plast	Oblaganje z razprševanjem

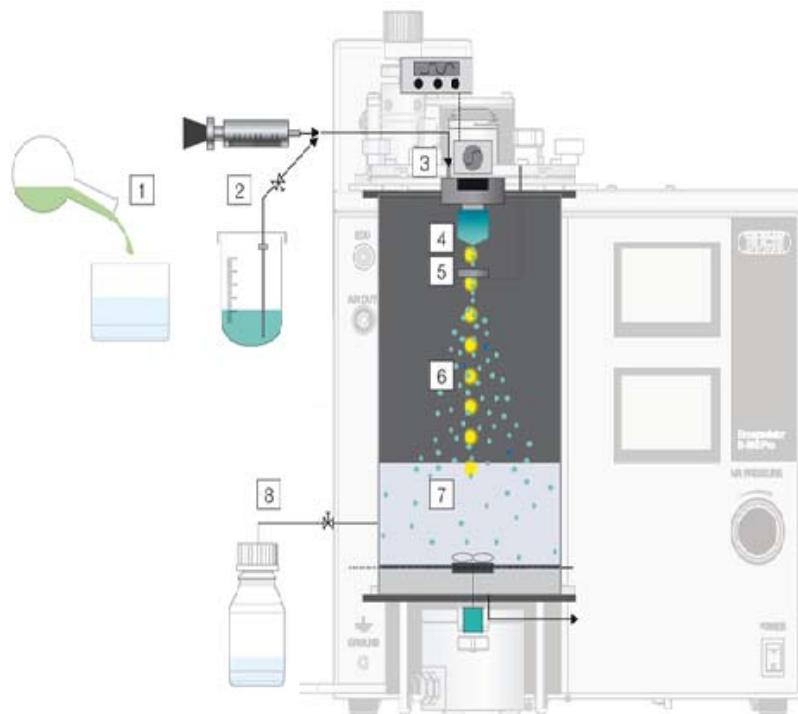
#### 2.1.1.1 Metode ekstruzije curka tekočine

Metode ekstruzije curka tekočine so osnovane na principu razbitja laminarnega curka tekočine v enako velike kapljice z uporabo različnih tehnik. Pri enostavnih metodah ekstruzije črpamo raztopino ogrodnega polimera skozi enojno šobo. Laminarni curek tekočine nato razbijemo v drobne kapljice z uporabo različnih tehnik. Ovojnico nastalih kapsul nato utrdimo s termičnim/kemijskim premreženjem, ohlajanjem, odparevanjem ali drugimi primernimi postopki (Zvonar in Gašperlin, 2011). Pri metodi z vibrirajočo membrano se laminarni curek tekočine razbije na enakomerno velike kapljice pod vplivom nihanja membrane, ki se nahaja nad šobo enkapsulatorja. Nastale kapljice oz. mikrokapsule nato potujejo skozi električno polje, pri tem se njihova površina nabije, kar privede do odbojnih sil med mikrokapsulami, ki preprečujejo njihovo zlepljanje med padanjem v raztopino premreževanja. Velikost mikrokapsul je odvisna od procesnih spremenljivk (velikost šob, hitrost pretoka raztopin, amplitudo in frekvence nihanja membrane) in lastnosti aktivne snovi ter ogrodnega materiala. Prednost tega postopka je nastanek mikrokapsul z ozko porazdelitvijo velikosti in možnost izdelave v aseptičnih pogojih (Zvonar in Gašperlin, 2011). Pri tem postopku je omejitev viskoznost raztopine, ki ne sme biti previsoka; primerna viskoznost raztopine je do 2 % m/m. Visoka viskoznost namreč onemogoča ustrezno vibracijo in lahko povzroči zamašene šobe (Zuidam in Shimon, 2010).

Nastanek mikrokapsul je lahko tudi posledica razbijanja curka tekočine pod vplivom delovanja elektrostatskih sil. Elektrostatska ekstruzija je kot metoda mikrokapsuliranja primerna zlasti takrat, ko želimo izdelati zelo majhne mikrokapsule. Na velikost ter naboj na površini slednjih lahko vplivamo z ustrezno izbiro parametrov (hitrost pretoka, velikost šobe, električnega naboja, ipd.), lastnostmi raztopine ogrodnega materiala ter celotnega sistema. Glavna pomanjkljivost te metode je nizka produktivnost, ki ovira njeno uporabo v industriji (Zvonar in Gašperlin, 2011; Zuidam in Shimon, 2010).

Princip delovanja mikrokapsulatorja Büchi B-395 Pro v korakih (Büchi, 2014):

1. korak: Mešanje aktivne snovi in ogrodnega materiala.
2. korak: Brizganje oz. črpanje mešanice (brizga ali zračni tlak).
3. korak: Vibriranje/nihanje membrane, kjer se curek tekočine razbije.
4. korak: Tvorba kapljic.
5. korak: Potovanje kapljic skozi električno polje in razpršitev kapljic.
6. korak: Nadzor tvorbe kapljic s stroboskopsko svetilko.
7. korak: Tvorba mikrokapsul s pomočjo polarizacije v raztopini ali z želiranjem.
8. korak: Zbiranje mikrokapsul.



Slika 2: Princip delovanja mikrokapsulatorja Büchi B-395 Pro (Büchi, 2014).

Splošna pravila izdelave mikrokapsul (Büchi, 2014):

- velikost izdelanih mikrokapsul je odvisna od premera šobe. Velja, da je velikost kapsul približno enaka dvakratni velikosti šobe.
- Višja hitrost pretoka polimera raztopine daje večje mikrokapsule in obratno.
- Uporaba višjih frekvenc daje manjše kapsule in obratno.
- Čim večja je viskoznost uporabljeni raztopine, tem večja hitrost pretoka je potrebna za doseg kontinuiranega laminarnega curka tekočine.
- Pri izdelavi manjših kapsul je potrebna nižja električna napetost.
- Nižje frekvence so potrebne pri uporabi raztopin z višjo viskoznostjo.
- Pri uporabi raztopin z višjo viskoznostjo se tvorijo večje kapsule.
- Viskoznost alginata in pektina narašča z njuno koncentracijo.

### 2.1.2 Ogrodni materiali za kapsuliranje

V živilski industriji je zelo pomembna izbira primerenega ogrodnega materiala, kajti imeti mora ustrezne lastnosti, ki zagotavljajo mehansko stabilnost, in biti kemijsko ustrezen za potrošnika oz. na splošno priznan kot varen (angl. Generally Recognized As Safe, GRAS), da omogoča njihovo uporabo tudi v prehranske namene. Treba je poudariti, da so varnostni predpisi v prehranski industriji strožji kot v farmacevtski in kozmetični industriji, saj se materiali uporabljajo v večjih količinah, posledično pa številne komponente, ki se uporabljajo za kapsulacijo farmacevtikov, v živilski industriji niso primerne (Smole Možina in sod., 2012; Nazzaro in sod., 2012). Glede na namen ter tehnologijo kapsuliranja se v živilski industriji kot ogrodni materiali uporabljajo različne naravne snovi, polisaharidi, proteini in lipidi, ki so lahko rastlinskega, morskega, živalskega in mikrobnega izvora. Vsaka skupina materialov ima določene prednosti in slabosti; posledično pa zato številna ogrodja vključujejo kombinacijo različnih materialov. Izbira ogrodnega materiala večinoma temelji na pričakovanih končnih lastnosti mikrokapsul, na lastnosti jedrnega materiala, procesu kapsulacije, stroških ter na odobritvi materiala s strani organizacij FDA (Food and Drug Administration) v ZDA oz. EFSA (European Food Safety Authority) v Evropi (Smole Možina in sod., 2012). Optimalen material za kapsuliranje mora imeti naslednje lastnosti: dobre reološke lastnosti (npr. nizko viskoznost pri velikih koncentracijah), lahko rokovanje med samim procesom mikrokapsuliranja, nikakršnih kemijskih interakcij z aktivno snovjo med pripravo in skladisčenjem kapsul, nuditi mora maksimalno zaščito aktivnih komponent proti dejavnikom okolja ter imeti visoko sposobnost dispergiranja oz. razprševanja (Kunz in sod., 2003). Med obilico danes dostopnih ogrodnih materialov ali oblog postajajo vedno bolj zanimivi nekateri naravni polisaharidi, katerih glavne prednosti v primerjavi s sinteznimi so netoksičnost, široka dostopnost in cenovna ugodnost (Zvonar in Gašperlin, 2011). Praviloma se z eno vrsto ogrodnega materiala ne more zagotoviti želena funkcija in stabilnost mikrokapsul, zato se zahteva kombinacija dveh ali več ogrodnih materialov (Kunz in sod., 2003).

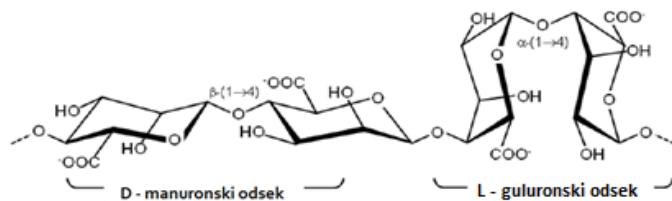
### 2.1.2.1 Alginat

#### 2.1.2.1.1 Viri in pridobivanje alginata

Alginat je bil prvič opisan leta 1881 na univerzi v Standfordu. Je najbolj razširjen polisaharid v rjavih algah. Pridobivajo ga iz različnih vrst rjavih alg, zardi česar se alginati med sabo razlikujejo v strukturi in lastnostih. Alginat v algah predstavlja del skeleta, ki daje mehansko trdnost in prožnost tkiva. *Pseudomonas* in *Azotobacter* sta dva rodova bakterij, ki proizvajata zunajcelični polimerni material – alginat (Alborzi, 2012). Za pridobivanje alginata iz rjavih alg le-te sperejo z raztopino natrijevega, kalcijevega stroncijevega, barijevega ali magnezijevega karbonata, pri čemer se alginat pretvorji v natrijeve, kalcijeve, stroncijeve, barijeve ali magnezijeve soli (Alborzi, 2012; Smrdel in sod., 2008). Po odstranitvi vseh trdih delcev alg soli oborimo z dodatkom klorovodikove kisline. Alginska kislina je tako nevtralizirana in ponovno preoblikovana v alginat. Nato se takšen alginat posuši in zmelje (Alborzi, 2012).

#### 2.1.2.1.2 Struktura alginata

Kemijsko je alginat linearen nerazvejan polisaharid, sestavljen iz monomernih enot, beta-D manuronske kisline (M) in alfa-L guluronske kisline (G), povezanih z  $\beta(1 \rightarrow 4)$  glikozidno vezjo (Zam in sod., 2013). Fizikalne lastnosti alginata so odvisne od molekulske mase in sestave (razmerja med monomernimi enotami in dolžine posameznih blokov). Slednjo pogojuje vrsta organizma in del alge, iz katerega se alginat pridobiva (Smrdel in sod., 2008). Regije alginata s prevladajočo  $\beta$ -D manuronsko kislino tvorijo razširjeno linearno strukturo, medtem ko deli s prevladajočo  $\alpha$ -L guluronsko kislino tvorijo upognjeno verigo. Natrijev alginat z višjo vsebnostjo G-blokov proizvaja močne toge gele, alginat z nižjo vsebnostjo G-blokov pa šibkejše, bolj prilagodljive, elastične gele (Alborzi, 2012).



Slika 3: Strukturna formula alginata (Alborzi, 2012).

#### 2.1.2.1.3 Tvorba gela

Alginska kislina je v neionizirani obliki v vodi netopna, medtem ko je topnost njenih soli odvisna tako od pH kot vrste prisotnih kationov.

Alginat lahko tvori dve vrsti gelov – kislinski gel v kislem in ionotropni gel v prisotnosti večivalentnih kationov.

- **Kislinski gel:** pridobimo ga z zniževanjem pH raztopine pod pKa guluronske kisline (pKa = 3,65) in manuronske kisline (pKa = 3,38). Pri tem preide raztopina alginata iz stanja soli v stanje gela in nastane t. i. kislinski gel, ki je domnevno stabiliziran z intramolekularnimi vodikovimi vezmi (Smrdel in sod., 2008).
- **Ionotropni gel:** pridobimo z interakcijo večivalentnih kationov, kot so  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  ipd., in polimernih verig. Pri ionotropnem geliranju se izmenjujejo natrijevi ioni s solmi guluronskih kislin, ki najprej povežejo, nato pa preuredijo odseke guluronskih kislin (Smrdel in sod., 2008). Nastala tridimenzionalna struktura je dodatno stabilizirana z vodikovimi vezmi in spominja na škatlo za jajca (Zam in sod., 2013).

Trdnost gela pogojujejo velikost G-blokov in koncentracija kalcijevih ionov. Običajno je gel z večjo vsebnostjo G-blokov trd, ampak krhek, gel z visoko vsebnostjo M-blokov pa mehkejši in bolj elastičen (Alborzi, 2012).

#### 2.1.2.1.4 Aplikacije alginata

Alginat nima nobene hranilne vrednosti, ker ga encimi vzdolž našega prebavnega trakta ne morejo razgraditi. Zaradi njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti in netoksičnosti imajo alginati širok spekter uporabe. Alginati zagotavljajo viskoznost tekočin, tvorijo gele, stabilizirajo pene in emulzije ter zagotavljajo strjevanje omak, marmelad, krem, sladoledov in ostalih živil z nizko vsebnostjo maščob. Razni premazi iz alginata zavirajo oksidacijo lipidov in drugih snovi v živilih. Predvsem se uporablja v proizvodnji že predelane hrane, zlasti sadja in konzerviranih živil.

Prve aplikacije alginata v živilski industriji so bile v sladolednih izdelkih. Dodatek alginata v sladoled zmanjša velikost ledenih kristalov in s tem zagotovi gladko strukturo (Alborzi, 2012). Zaradi sposobnosti tvorbe gela in nabrekanja ter še nekaterih drugih lastnosti se lahko uporablja za pripravo dostavnih sistemov s kontroliranim sproščanjem. Ta aplikacija ima pomembno vlogo tako v farmaciji kot tudi v živilski industriji, kjer se s pomočjo mikro/nano- kapsul iz alginata pripravljajo različne dostavne in ogrodne sisteme (Smrdel in sod., 2008).

## 2.1.2.2 Pektin

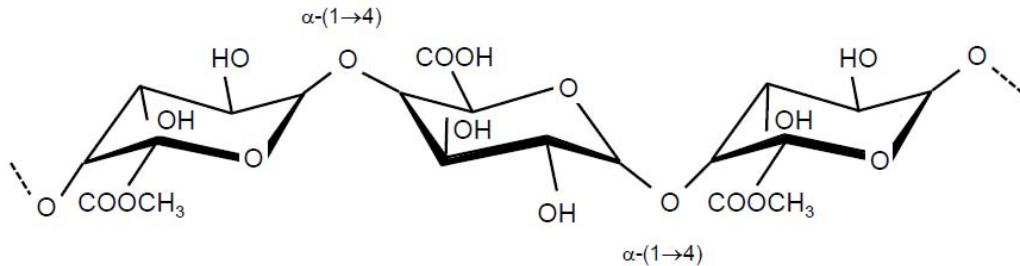
### 2.1.2.2.1 Viri in pridobivanje pektina

Leta 1825 je pektin prvi izoliral in opisal Henery Bracannot (Srivastava in Malviya, 2011). Pektin je naravna sestavina višjih rastlin, ki predstavlja eno tretjino suhe celične stene. V glavnem se nahaja v obliki pektinske snovi oz. protopektina, ki ni topen v vodi. Protopektin je nepogrešljiv del rastlinske celične stene, saj deluje kot nekakšen cement in hidratijski element za celulozno mrežo. Komercialno dostopni pektini večinoma izvirajo iz lupin citrusov ali jabolčnih tropin. Najvišjo kakovost dosegajo pektini pridobljeni iz limoninih in limetinih lupin (Alborzi, 2012). Vsebnost, struktura in kemijska sestava pektina se razlikuje od vrste rastlin in od starosti rastline ter tudi od različnih delov rastline (Srivastava in Malviya, 2011).

Na kemijsko sestavo, količino in kakovost končnega materiala vplivajo tudi metode oz. pogoji ekstrakcije pektina. Le-tega iz rastline ekstrahiramo z vročo vodo s pH okoli 2. Pridobljen ekstrakt se s pomočjo centrifugiranja in filtracije prečisti. Iz bistrega ekstrakta se pektin obori z alkoholom ali polivalentnim kationom, navadno je to aluminijev pektat. Nato se dobljena oborina spere, posuši in zmelje v prah (Alborzi, 2012; Kač in Jurca, 1994).

### 2.1.2.2.2 Struktura pektina

Strukturno je pektin polisaharid, sestavljen iz enot galakturonske kisline (GalA), med seboj povezanih z  $\alpha(1\rightarrow4)$  glikozidno vezjo. Mnoge od galakturonskih kislin so zaestrene z metanolom, molekulska teža in stopnja zaestrenosti pa določata njegove lastnosti (Zam in sod., 2013). Stopnja esterifikacije je (DE) razmerje med zaestrenimi in vsemi galakturonskimi kislinami v molekuli, ki se giblje 0–100 %. Pektin z DE > 50 % se imenuje visoko metilirani (HM), z DE < 50 % pa nizko metilirani (LM). Komercialno uporabni pektini imajo DE 60–75 % za HM in 20–40 % za LM (Alborzi, 2012).



Slika 4: Struktura delno metiliranega pektina (Alborzi, 2012).

#### 2.1.2.2.3 Lastnosti pektina

Osnovna lastnost pektina, tako visoko (HM) kot nizko metiliranega (LM) je, da v prisotnosti sladkorjev, kislin ali Ca<sup>2+</sup> ionov tvori gele. Je tudi topen v vodi. Ko suh prah pektina pride v stik z vodo, ima težnjo k zelo hitri hidrataciji, pri čemer tvori grude. Hidratacijo zmanjšamo z dodatkom sladkorjev, kislin (nizek pH) in Ca<sup>2+</sup> (Alborzi, 2012). Pektin tvori gele tako, da se deli homogalakturonu križno povežejo in s tem tvorijo tridimenzionalno mrežo, v kateri so ujeti voda in druge molekule. Na topnost, tvorbo gela in viskoznost pektinske raztopine vplivajo različni faktorji, kot so temperatura, tip pektina, stopnja esterifikacije, pH, sladkorji in ostali topljenci ter kalcij. Z dodatkom kislin se ionizacija karboksilnih skupin prekine, kar se kaže v zmanjšanju hidratacije karboksilnih skupin. To pomeni, da če zmanjšamo ionizacijo, se polisaharidne molekule ne odbijajo več po celotni dolžini verige in se povežejo ter tvorijo gel. Največjo stabilnost gela dobimo pri pH 4, med tem ko je v bazičnem okolju nestabilen. HM pektin je stabilen samo pri sobni temperaturi. Z višanjem temperature ali pH, se začno cepiti vezi in s tem padajo želirne lastnosti (Srivastava in Malviya, 2011).

#### 2.1.2.2.4 Aplikacije pektina

Pektin ima široko območje uporabe. V živilski industriji se pogosto uporablja kot stabilizator in gostilno sredstvo. Uporablja se pri proizvodnji marmelad, želejev, pekovskih in konditorskih izdelkov, sadnih pihač, sadnih jogurtov, omak itd. Kot nadomestek maščobe ali sladkorja se uporablja v nizkokaloričnih živilih. Podobno kot alginat je primeren za vključevanje v kislá živila, saj je stabilen pri nizkih pH vrednostih. V farmacevtski industriji se uporablja kot prenašalec aktivnih snovi po prebavnem traku točno do specifičnega mesta v debelem črevesju, kjer ga lahko razgradijo samo pektolitični encimi. Do sproščanja aktivne spojine v zgornjem prebavnem traktu ne pride, ker je pektin nerazgradljiv z želodčnimi encimi. Pektine uporabljajo tudi v drugih aplikacijah kot na

primer v proizvodnji užitnih filmov, kot nadomestek papirja, v proizvodnji pen in mehčal, za pripravo membran za ultracentrifugiranje in elektrodializo (Alborzi, 2012).

#### 2.1.2.3 Alginat-pektin sistem

Razmerje med alginatom in pektinom, stopnja zaestrenosti pektina in razmerje manuronske in guluronske kisline v alginatu so dejavniki, ki vplivajo na mehanske lastnosti mešanice gelov (alginat-pektin). Čeprav sinergistične interakcije med alginatom in pektinom niso popolnoma razumljive, se sklepa, da je vzrok interakcij heterogeno združenje G-blokov alginata z metilnimi estri visoko metiliranega pektina. Posledica sinergije med alginatom in pektinom je nastanek bolj povezanih in stabilnih gelov, kot so tisti iz samega alginata (Alborzi, 2012). Mešanica alginat-pektina se uporablja predvsem za kapsulacijo aktivnih snovi pri nadzorovanem sproščanju v farmaciji in živilski tehnologiji (Audebrand in sod., 2003).

#### 2.1.3 Uporaba kapsuliranih dodatkov v živilstvu

Glavni kriteriji, ki usmerjajo razvoj oz. izbiro aktivnih snovi za kapsulacijo v različne nosilne materiale, so fizikalne, kemijske in biološke lastnosti učinkovin, ki kljub uporabnosti niso idealne oz. imajo številne omejitve (npr. (ne)topnost, (nezaželena) aroma ipd.), so neobstojne oz. občutljive na okoljske razmere v živilu oz. v njegovi proizvodnji (npr. svetlobo, kisik, matriks živila, tehnološke postopke, kot je toplotna obdelava, sušene ipd.) ali v prebavnem traktu (encimi, kislota, alkalinost, ipd.). Vsi ti dejavniki močno zmanjšujejo njihovo aktivnost in biorazpoložljivost. Zato je eden od najpogostejših ciljev kapsulacije aktivnih snovi njihova zaščita in posledično izboljšana obstojnost in biorazpoložljivost. K omenjenemu lahko odločilno prispeva tudi kontrolirano sproščanje aktivnih snovi, kar prav tako lahko omogoča kapsulacija v ustrezne materiale. Posebna skupina bioaktivnih snovi, ki jim s kapsulacijo v različne materiale lahko bistveno izboljšamo uporabnost v živilstvu in prehrani, so različni polifenoli oz. njihove mešanice, ki so glavna sestavina fenolnih izvlečkov iz različnih rastlinskih materialov. Zanimanje zanje v živilstvu zaradi številnih oblik bioaktivnega delovanja zelo narašča, enako velja tudi za različne načine ohranjanja njihovega delovanja (Smole Možina in sod., 2012).

### 2.2 GRANATNO JABOLKO (*Punica granatum* L.)

Granatno jabolko je gost listopadni grm iz družine *Punicaceae*, ki lahko zraste 3 do 4 metre v višino. Veje so tanke in trnove, listje je temno zeleno in ima sijaj. Cvet je oranžnordeče barve, v obliki hruške, zvona ali vase. Plod ima debelo gladko lupino, v katerih je več kot 100 semen, ki so v predelih obdani s tankimi belkastimi stenami. Semena

so oglata in svetlo do temno rožnate barve. Barva semena je odvisna od sorte granatnega jabolka (MacLean in sod., 2014).

Sadež granatnega jabolka je eden izmed najstarejših užitnih vrst sadja, njegova uporaba se iz leta v leto povečuje. Vzrok za vse večjo uporabo so predvsem njihove antioksidativne, protimikrobnne, antikancerogene in antivirusne lastnosti ter hranilna vrednost, ki dobro vpliva na zdravje ljudi (Gadže in sod., 2012). Uporablja se v sveži ali predelani obliki kot sok, marmelade, žejeji, sirup, omake in dodatki, ki izboljšajo okus in barvo živila, ter v obliki kapsul ali tablet v medicinske namene. Komercialno dosegljiv sok granatnega jabolka ima antioksidativno aktivnost, ki je trikrat večja kot v drugih sadnih sokovih, rdečem vinu in zelenem čaju (Viuda-Martos in sod., 2010; Zarei in sod., 2011).

### **2.2.1 Zgodovina**

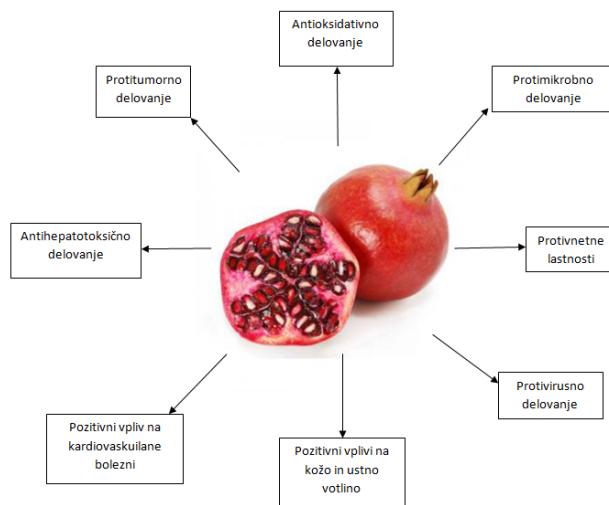
Izvor granatnega jabolka sega približno 4000 let nazaj v centralno Azijo in Perzijo (MacLean in sod., 2014). Ker plod vsebuje veliko semen, je že od nekdaj simbol plodnosti. Kot rastlina je granatno jabolko zelo dolgo živa in obrodi desetletja. Gojijo ga v tropskih in subtropskih regijah, predvsem v Iranu, Izraelu, Indiji, na Kitajskem, Japonskem, v Rusiji, Ameriki in ostalem bližnjem in daljnem vzhodu (Zarei in sod., 2011).

### **2.2.2 Hranljivost in sestava**

Peške granatnih jabolk so bogate z vitaminom C in dober vir vlaknin. Njihova energijska vrednost je približno 72 kcal/301 kJ na 100 g (Teixeira da Silva in sod., 2013). Užitni del granatnega jabolka predstavlja 55–60 % skupne mase sadeža, odvisno od sorte, od tega je 75–85 % soka in 15–25 % peške (Ismail in sod., 2014). Je vir velike količine sladkorjev, od katerih prevladujeta fruktoza (3,5–5,96 g/100g) in glukoza (3,4–6,40 g/100g), pektina, vitaminov, polisaharidov, polifenolnih spojin in mineralov, predvsem kalija, natrija, kalcija, bakra, mangana, žezeza, cinka, svinca in kadmija (Gadže in sod., 2012). Semena so bogat vir polinenasičenih maščobnih kislin (linolenske, linolne ter punične) in drugih (oleinske, stearinske in palmitinske). Vsebujejo tudi beljakovine, vlaknine ter druge snovi v sledovih (Viuda-Martos in sod., 2010).

### **2.2.3 Lastnosti granatnega jabolka**

S svojimi funkcionalnimi in zdravstvenimi učinki, ki jih imajo spojine v različnih delih sadeža, se granatno jabolko uvršča v skupno funkcionalnih živil. Spojine oz. snovi, ki jih vsebuje granatno jabolko, delujejo antioksidativno, protitumorno, antihepatotoksično in pozitivno vplivajo na kardiovaskularna obolenja, kožo in ustno votlino ter imajo protimikrobnne, protivnetne in protivirusne lastnosti (Viuda-Martos in sod., 2010).



Slika 5: Funkcionalne lastnosti in zdravstveni učinki granatnega jabolka (Viuda-Martos in sod., 2010).

Oksidacijski procesi v živilih so eden od glavnih krivcev za zmanjšanje kakovosti živilskih proizvodov (oksidacija vitaminov in esencialne maščobne kisline). S svojimi antioksidativnimi lastnostmi oz. spojinami je granatno jabolko zanimiv sadežev za uporabo v živilski in prehranski industriji, saj predstavlja vir različnih polifenolnih spojin (antocianine, izomere punikalagina itd.), ki vežejo proste radikale in s tem preprečujejo oksidacijo (Viuda-Martos in sod., 2010).

S svojimi protimikrobnimi lastnostmi granatno jabolko zavira rast bakterij *Staphylococcus aureus*, na meticilin odporni *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Listeria monocitogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* in virus gripe H3N2 ter kvasovke *Candida albicans* (Endo in sod., 2012).

### 2.3 ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti so tiste sestavine živil oz. dodatki živilom, ki delujejo kot lovilci radikalov, tvorijo kelate s kovinskimi ioni, ali kot reducenti preprečujejo ali zmanjšujejo pojav žarkosti živil in drugih oksidativnih sprememb senzoričnih ali prehranskih lastnosti živil. Dietetiki in nutricionisti pa definirajo antioksidante kot snovi, ki ščitijo telo pred kvarnim vplivom prostih radikalov, kovinskih ionov in raznih drugih oksidantov. Za živilske tehnologe so antioksidanti predvsem aditivi in sestavine živil, ki podaljšujejo uporabnost le-teh, za strokovnjake v medicini in fiziologiji pa so predvsem snovi, ki sodelujejo pri obrambi organizma pred potencialno škodljivimi oksidirajočimi snovmi (Vidrih in Kač, 2000).

### **2.3.1 Vloga antioksidantov v živilih**

Oksidacijske reakcije v živilih so ene izmed največjih krivcev zmanjševanja kakovosti in sprejemljivosti živilskih proizvodov. Vzrok za oksidacijske procese v živilih so encimi iz družine oksidoreduktaz, toplota, ionizirajoča sevanja, svetloba in kovinski ioni. Oksidacijski procesi privedejo do znatne izgube prehranske vrednosti živila, saj oksidira veliko vitaminov in esencialnih maščobnih kislin, vplivajo na senzorične lastnosti živil – spremembo barve, tekture in okusa ter na samo obstojnost živila. Posledica vsega tega je zavnitev proizvodov s strani potrošnika (Viuda-Martos in sod., 2010). Za preprečitev oksidacije in zmanjšanje senzoričnih in prehranskih sprememb se živilom dodajajo antioksidanti, ki so lahko naravnega ali sintetičnega izvora. Dandanes se vse bolj teži k uporabi naravnih antioksidantov, ki izvirajo predvsem iz rastlin (sadja, zelenjave in zelišč), čeprav je uporaba sintetičnih antioksidantov učinkovitejša in stabilna, vendar ne povsem varna za zdravje ljudi (Deladino in sod., 2008). Dodajanje naravnih antioksidantov v živila lahko spremeni barvo in okus le-teh, zato se vse bolj uporablajo tehnike mikrokapsuliranja teh aktivnih snovi. S tem se antioksidant zaščiti pred vplivom okolja in nadzorovano oz. prirejeno sprošča v živilo (Lupo in sod., 2013). Glavni predstavniki naravnih antioksidantov so: vitamin C, tokoferoli (vitamin E), flavonoidi in druge polifenolne spojine (flavanoli, flavoni, tanini itd.), karotenoidi ( $\beta$ -karoten in vitamin A), koencim Q 10, selen, cink in razni antioksidacijski encimi (Pandel-Mikuš in Poljšak, 2005).

### **2.3.2 Vloga antioksidantov pri ljudeh**

Neustrezna prehrana, stres in pomanjkanje gibanja so glavni dejavniki razvoja številnih kroničnih bolezni. Mnoge zdravstvene težave lahko pripišemo kisiku. Element, ki omogoča življenje, ga pomaga tudi uničevati. Nenehne kisikove reakcije povzročajo mašenje žil, spreminjajo zdrave celice v maligne, pospešujejo okvare sklepov, kvarijo živčni sistem in posledica tega je znižan imunski sistem in z leti akumulacija celičnih poškodb. Oksidanti oz. prosti radikali se pojavljajo v različnih oblikah. Nekateri so produkti normalnega metabolizma, nastajajo pri dihanju ali imunskeih reakcijah, veliko pa jih prihaja iz okolja kot ionizirajoče sevanje, delci v onesnaženem zraku, pesticidi, cigaretni dim itd. V našem organizmu sta glede na izvor dve vrsti antioksidantov: endogeni in eksogeni. Endogeni so tisti, ki jih človeško telo ustvari samo (glutation katalaza itd.). Eksogene, ki jih telo ni sposobno ustvariti, se vnaša z ustrezno prehrano. Na raven endogenih antioksidantov se ne da vplivati, lahko pa se antioksidativni potencial celic poveča z eksogenimi antioksidanti. Številne učinkovite antioksidante vsebuje predvsem hrana rastlinskega izvora (sadje, zelenjava, žita, oreščki, rastlinska olja, kalčki, semena) (Pandel-Mikuš in Poljšak, 2005).

### **2.3.3 Vitamin C**

Vitamin C ali L-askorbinska kislina je najmočnejši antioksidant med vitaminimi, topnimi v vodi. Je eden od najbolj raziskanih in največkrat omenjenih vitaminov. Najbogatejši vir vitamina C je raznovrstno sadje in zelenjava. Največ ga je v jagodičevju (črni ribez,

aronija), češnjah, višnjah, granatnem jabolku, plodovih citrusov, listnati zelenjavi, papriki, zelju, paradižniku in krompirju (Pandel-Mikuš in Poljšak, 2005). V živilski industriji je vsestransko uporaben, predvsem kot konzervans, ki ohranja barvo, aroma in teksturo proizvodov ter izboljša obstojnost izdelkov. Kot antioksidant ga uporabljam pri proizvodnji piva, sadnih sokov, vina, konzerviranega sadja in zelenjave, pri pakiranju mesnih izdelkov, v industriji moke pa za povečevanje pecilne kapacitete in videza kruha. Estri L-askorbinske kisline se uporabljam za antioksidativno zaščitno maščob in olj (Rudan-Tasič, 2000).

## 2.4 POLIFENOLNE SPOJINE

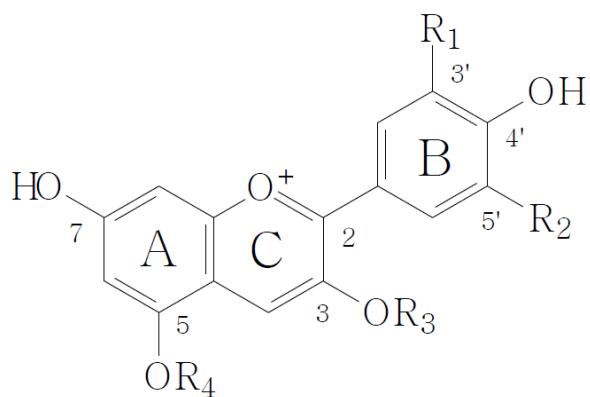
Polifenolne spojine so sekundarni metaboliti rastlin, ki se sintetizirajo po pentozna fosfatni, šikimatni ali fenilpropanoidni poti v rastlinah (Oven in sod., 2011). Te spojine imajo izjemno pomembno fiziološko in morfološko vlogo v rastlinah, saj so pomembne pri rasti in reprodukciji rastlin, prispevajo k obrambi rastlin pred škodljivci in drugimi stresnimi dejavniki ter prispevajo k barvi in senzoričnim karakteristikam sadja in zelenjave. Vsebnost polifenolnih spojin je odvisna od vrste rastline, kultivarja, deloma pa tudi od rastišča (vsebnost hranljivih snovi v zemlji), podnebnih razmer (temperatura, svetloba, količina padavin), agrotehničnih dejavnikov, načina predelave in skladiščenja (Viuda-Martos in sod., 2010).

### 2.4.1 Flavonoidi

Flavonoidi so največja skupina rastlinskih polifenolnih spojin, saj predstavljajo več kot polovico vseh, ki se nahajajo v naravi. Flavonoidi so polifenolne spojine z majhno molekulsko maso, zgrajene iz 15 C-atomov. Osnovno spojino flavonoidov sestavljajo strukture, ki jih označimo s C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Strukturno so flavonoidi sestavljeni iz dveh aromatskih obročev – A in B – ki sta povezana z mostom iz treh ogljikov v obliki heterocikličnega obroča C (Viuda-Martos in sod., 2010; Oven in sod., 2011). Med seboj se razlikujejo po stopnji oksidacije C-obroča, po razporeditvi hidroksilnih in metoksi skupin ter po vezanih sladkorjih. V rastlinah so flavonoidi rdeči, beli, in rumeni pigmenti cvetov, sadežev, lubja in korenin. Zaradi gorenega okusa odganjajo parazite in ker lahko absorbirajo UV-svetlubo, delujejo kot zaščita rastline pred UV-žarki (Abram, 2000). V skupino flavonoidov uvrščamo tudi antocianine, ki so najpomembnejša vodotopna skupina rastlinskih pigmentov v granatnem jabolku (Viuda-Martos in sod., 2010).

#### 2.4.1.1 Antocianini

Antocianini so najpomembnejša skupina vodotopnih pigmentov, ki jih najdemo v mnogih vrstah sadja, zelenjave, žit in cvetja. Prav ti pigmenti dajejo rastlinam sijoče odtenke rdeče, vijolične in modre barve. Antocianine najdemo v vakuolah rastlinskih celic, kjer so ločeni od encimov in ostalih celičnih struktur v citoplazmi (Shipp in Abdel-Aal, 2010). Najpogostejsi antocianini so pelargonidin, cianidin, peonidin, delfinidin, petunidin in malvidin, ki se med seboj razlikujejo v različnih funkcionalnih skupinah (monosaharidi), vezanih na mestih 3 in 5 v obroču B (Lee in sod., 2005).

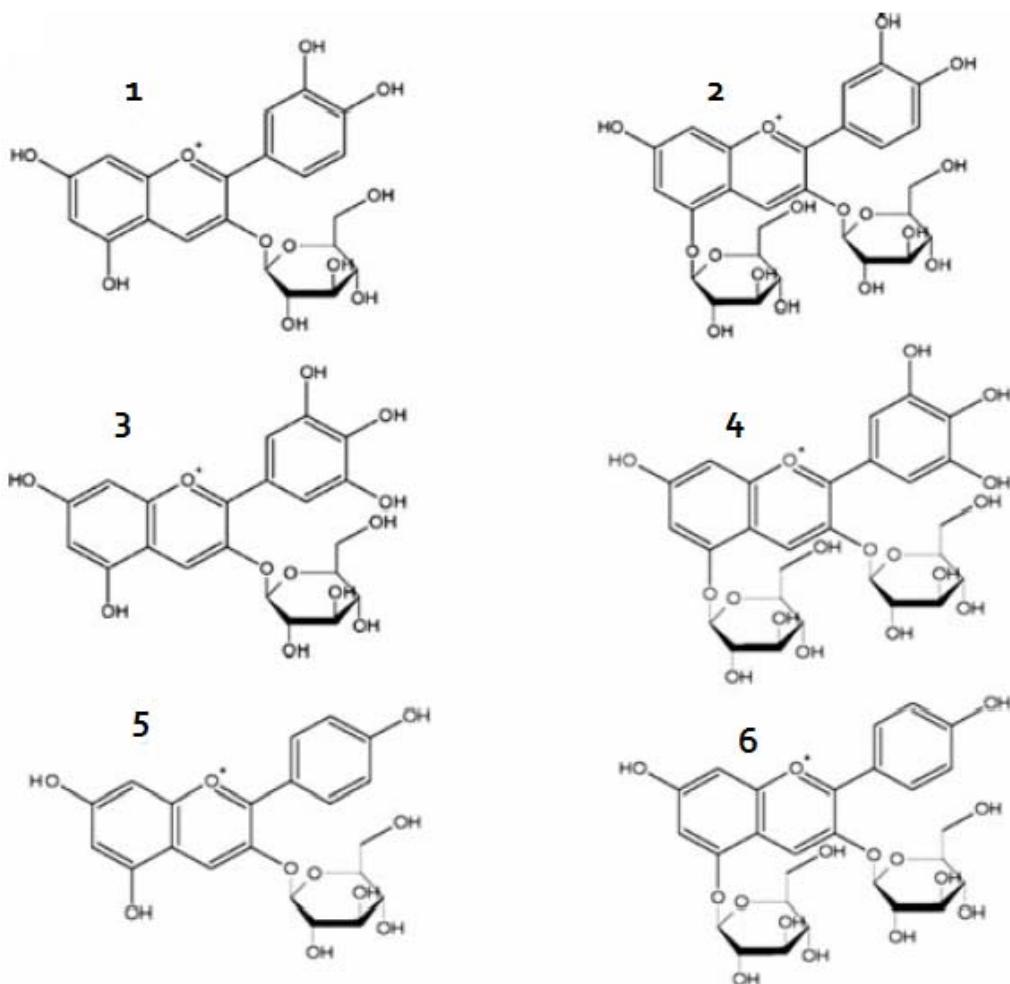


Slika 6: Strukturna formula in shema označevanja posameznih mest v molekulah antocianinov (Lee in sod., 2005).

Antocianini vplivajo na barvo živila, ki je ena izmed ključnih značilnosti za kakovost. Poleg tega pa so dokazani tudi njihovi pozitivni vplivi na zdravje ljudi. Delujejo antioksidativno, protimikrobnno, antikancerogeno in protivnetno in imajo pozitivne učinke na delovanje nevronov (Robert in sod., 2010; Özkan in Bilek, 2014).

#### 2.4.1.2 Antocianini v granatnem jabolku

Antocianini so največja in najpomembnejša skupina flavonoidov v granatnem jabolku, so snovi, ki sadežu dajejo rdečo barvo. V granatnem jabolku prevladujejo cianidin-3-glukozid, cianidin-3,5-diglukozid, delfinidin-3-glukozid, delfinidin-3,5-diglukozid, pelargonidin-3-glikozid in pelargonidin-3,5-diglukozid (Viuda-Martos in sod., 2010).



Slika 7: Strukturne formule antocianinov v granatnem jabolku, 1: cianidin-3-glukozide; 2: cianidin-3,5-diglukozid; 3: delfinidin-3-glukozid; 4: delfinidin-3,5-diglukozid; 5: pelargonidin-3-glikozid; 6: pelargonidin-3,5-diglukozid (Viuda-Martos in sod., 2010).

#### 2.4.1.3 Pomen antocianinov kot naravnih barvil

Barva živila je za potrošnika ena najpomembnejših vizualnih lastnosti, saj daje prvi vtis o kvaliteti izdelka. Barvila, ki jih v ta namen v živilski industriji uporabljajo, so naravnega ali sintetičnega izvora (Akhavan-Mahdavi in Mahdi-Jafari, 2014). V živilski industriji se vse bolj teži k uporabi naravnih barvil, pridobljenih iz rastlin. V zadnjih 20 letih se je zakonodaja o uporabi in dodajanju sintetičnih barvil precej zaostriла, s tem pa se je povečala tudi ozaveščenost potrošnika o varnosti živil. V mnogih državah so že omejili uporabo sintetičnih barvil v prehrani ljudi. Posledica je večje zanimanje za razvoj naravnih barvil (Özkan in Bilek, 2014).

Antocianini, ki so prisotni tudi v granatnem jabolku, so skupina pigmentov, ki so odgovorni za rdeče, vijolične in modre barve v rastlinah. Zaradi nizke toksičnosti imajo

velik potencial, da se za uporabljajo kot naravna barvila. V primerjavi s sintetičnimi barvili so nestabilni, kar predstavlja glavni problem pri njihovi uporabi in se lahko pokaže kot sprememba barve med procesiranjem in skladitvenjem. Dejavniki, ki vplivajo na spremembo barve in njihovo stabilnost so pH, kovinski ioni, svetloba, temperatura, kisik in encimi (Özkan in Bilek, 2014). Antocianini so občutljivi na spremembo pH – to se odraža tudi v njihovi nizki biorazpoložljivosti. Stabilni so pri nizkih vrednostih pH (3,5) in s tem tudi v želodcu. Pri višjih pH vrednostih (nevtralnem in bazičnem okolju) se hitro razgradijo in s tem se hranilna vrednost in biorazpoložljivost antocianinov zmanjša. Zaradi njihove nestabilnosti v različnih pH okoljih poteka veliko študij, ki preučujejo, kako jih stabilizirati in s tem ohraniti pravotno barvo izdelka in njegovo kakovost ter ohraniti snovi, ki so koristne za zdravje ljudi. Za povečanje njihove stabilnosti je vse bolj pomembna tehnika mikrokapsuliranja (Akhavan-Mahdavi in Mahdi-Jafari, 2014).

V živilski industriji antocianine kot naravno barvilo uporabljajo predvsem pri slaščicah, sladkarijah, sladoledih, jogurtih, ribjih izdelkih in drugih živilih, kot so kremna in želatinasta živila, sokovi, likerji, konzervirano sadje, žvečilni gumiji itd. Antocianine se lahko vključi v mikrokapsule in tako pripravi stabilna naravna barvila za živila. To je že leta 2004 poskusil Ersus, ko je mikrokapsule z antocianini uporabil v jogurtu in sokovih (Özkan in Bilek, 2014).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Sok

Uporabili smo sok granatnega jabolka, ki je bil iztisnjen 20. 12. 2012 in skladiščen v zamrzovalniku pri temperaturi -20 °C. Oznaka posode: GRANATNO JABOLKO 20. 12. 2012 (1). Poreklo iztisnjениh granatnih jabolk je Izrael.

##### 3.1.2 Polimeri

- Alginat (Natrijeva sol alginske kislina iz rjavih alg, Sigma, Velika Britanija),
- Pektin (Citrusni pektin 26–30 % esterificiran Št. 732, Wild, Nemčija).

##### 3.1.3 Reagenti

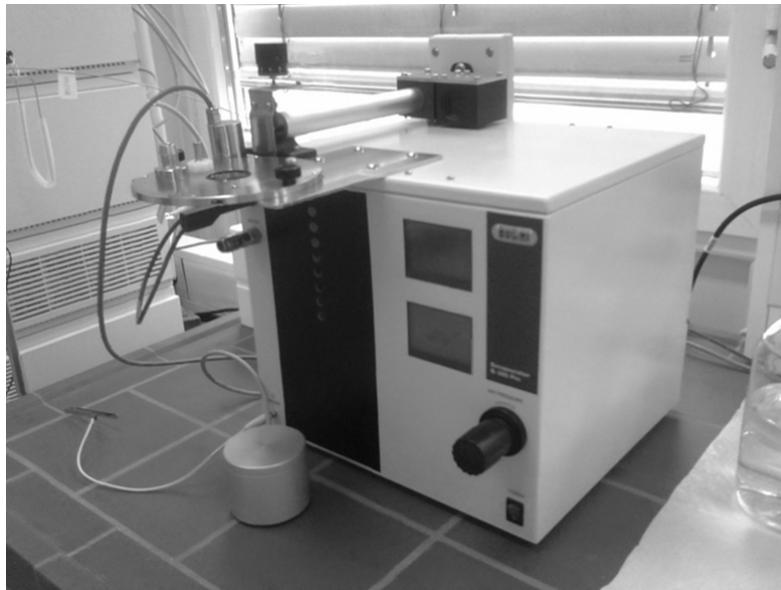
- Kalcijev klorid; CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (Pro analysi, Nemčija),
- Tween (Sigma, Amerika),
- 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina; ABTS (Sigma, Amerika),
- Manganov (IV) oksid; MnO<sub>2</sub> (Kemika, Jugoslavija),
- Pufer: Hepes (Sigma, Amerika),
- Natrijev hidroksid; NaOH (Merck, Nemčija),
- Tekoč dušik (Messer, Griesheim, Nemčija),
- Citronska kislina (Merck, Nemčija),
- Kalijev klorid; KCl,
- Natrijev acetat; CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na x 3H<sub>2</sub>O,
- Klorovodikova kislina (Merck, Darmstadt, Nemčija),
- Folin-Ciocalteu reagent (Fluka, Buchs, Švica),
- Natrijev karbonat; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,
- Mravljična kislina (Kemika, Hrvaška),
- Acetonitril,
- Metanol (J.T.Baker, Nizozemska).

##### 3.1.4 Standardi antocianinov

- Cianidin 3-glukozid,
- Cianidin klorid,
- Malvidin 3-glukozid,
- Malvidin klorid,
- Delfnidin 3-glukozid,
- Delfnidin klorid,
- Peralgonidin 3-glukozid,
- Peonidin 3-glukozid.

### 3.1.5 Aparature

- Mikrokapsulator B-395 Pro (Büchi, Švica),



Slika 8: Mikrokapsulator Büchi B-395 Pro v laboratoriju.

- Mikroskop s programom MODIC,
- Liofilizator Christ, (Alpha 1-2 LD plus, Nemčija),
- UV-Vis Spektrofotometer (Varian Cary 100 Bio, model 8453, Avstralija),
  - območje valovnih dolžin delovanja 190 nm–900 nm z natančnostjo +/- 0,2 nm
  - dvožarkovno delovanje,
  - Cary WinUV analitska programska oprema,



Slika 9: UV-Vis spektrofotometer v laboratoriju za kemijo in biokemijo živil.

- HPLC-sistem, ki ga sestavlja:
  - X-Act 4-kanalna razplinjevalna enota (Jour research, Švedska),
  - črpalka (Knauer K-1001, Nemčija),
  - avtomatski podajalnik (Marathon XT, Spark-Holland, Nizozemska),
  - komunikacijski vmesnik (ValueChrome, Bio-Rad, ZDA),
  - 1260 DAD detektor (Knauer UV-Vis, Nemčija),
  - osebni računalnik s programsko opremo EuroChrom 2002,



Slika 10: HPLC v laboratoriju za kemijo in biokemijo živil.

- analitska tehtnica (Mettler Toledo AT201, Švica),
- pH-meter (HI 221 Hanna instruments, Italija),
- vibracijski stresalnik (Vibromix, Tehnica Železniki, Slovenija),
- ultrazvočna kopel,
- centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415c, Nemčija),
- centrifuga (Hettich Rotanta 460R, Nemčija),
- mikrovalovna pečica,
- hladilnik,
- zamrzovalnik.

### 3.1.6 Pribor

- Stekleni inventar: čaše, bučke, merilni valji, steklene palčke, viale (HPLC), petrijevke, lij, steklene palčke.
- Plastični inventar: 50 mL falkonke, 15 mL falkonke, epice, tehtalne ladjice, kapalke, plastične čaše.
- Ostalo: avtomatske pipete, tipsi, rokavice, zaščitna halja, magneti, aluminijasta folija, brizgalke, filtri, štoparica, alkoholni flomastri.

### 3.1.7 Priprava koncentriranega soka granatnega jabolka

Liofilizat soka granatnega jabolka smo deliofilizirali z dodatkom milliQ vode. Količino vode smo dodali glede na želeno koncentracijo soka granatnega jabolka in suhe mase liofilizata. Liofilizatu smo dodali ustrezno količino milliQ vode, da smo pripravili raztopino z ustrezno koncentracijo (1–200 mg/mL), premešali in za 15 minut dali v ultrazvočno kopel, da smo dobili homogeno raztopino. Nato smo koncentriran sok centrifugirali 10 minut pri 4000 obr./min. Z avtomatsko pipeto smo prenesli supernatant v svežo falkonko in še enkrat centrifugirali 5 minut pri 4000 obr./min., nato pa supernatant spet prenesli v svežo falkonko. S centrifugiranjem smo odstranili netopne snovi, ki bi nas pri sami pripravi kapsul in analizi sproščanja motile.

### 3.1.8 Priprava polimernega materiala

- Alginat: za pripravo 3 % raztopine alginata smo v čašo natehtali 3 g alginata v prahu in dolili 100 mL milliQ vode. Čašo smo prekrili z aluminijasto folijo in na mešalu mešali čez noč. Za pripravo 1 %, 1,5 % ali 2 % raztopine alginata smo izhodno 3 % raztopino alginata razredčili z milliQ vodo.
- Pektin: za pripravo 3 % raztopine pektina smo v čašo natehtali 3 g pektina v prahu in dolili 100 mL milliQ vode. Čašo smo prekrili z aluminijasto folijo in na mešalu mešali čez noč. Za pripravo 1 %, 1,5 % ali 2 % raztopine pektina smo izhodno 3 % raztopino pektina razredčili z milliQ vodo.
- Alginat-pektin: mešanico alginat-pektina smo pripravili tako, da smo zmešali isto koncentracijo alginata in pektina v želenem razmerju (alginat:pektin = 4 : 1, 7 : 3, 3 : 2, 1 : 1, 2 : 3, 3 : 7, 1 : 4).

### 3.1.9 Priprava raztopin

- 0,1 M raztopina  $\text{CaCl}_2$ : v čašo smo natehtali 14,702 g  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$  ( $M = 147,02 \text{ g/mol}$ ), dodali 700 mL milliQ vode in premešali. Raztopino smo prelili v 1000 mL bučko in dopolnili z milliQ vodo do oznake. Izmerili smo pH raztopine  $\text{CaCl}_2$ , ki je bil 5,5. Dodali smo 1–2 % tweena na 1000 mL raztopine  $\text{CaCl}_2$ . Z dodatkom tweena smo znižali površinsko napetost raztopine.
- 0,1 M raztopina  $\text{CaCl}_2$  (pH 7,0): v čašo smo natehtali 14,702 g  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ , dodali 700 mL milliQ vode in premešali. pH raztopine smo umerili na 7,0 z 10 M NaOH. Raztopino smo nato prenesli v 1000 mL bučko.
- 0,1 M raztopina  $\text{CaCl}_2$  (pH 3,5): v čašo smo natehtali 14,702 g  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ , dolili 700 mL milliQ vode ter premešali. pH raztopine smo umerili na 3,5 s 50%-citronska kislino. Raztopino smo nato prenesli v 1000 mL bučko.
- 50%-citronska kislina: v 100 mL bučko smo natehtali 50 g citronke in dodali milliQ vodo do oznake.
- ABTS: Natehtali smo 25,2 mg ABTS-reagenta in ga raztopili v 10 mL milliQ vode in dodali 50 mg  $\text{MnO}_2$  v prahu, na vrtinčniku smo raztopino mešali 10 minut.

Raztopino smo nato centrifugirali 5 minut pri 3000 obr./min. Bistro raztopino, ki vsebuje ABTS, smo filtrirali skozi 0,2 µm filter.

- 10 mM HEPES pufer (pH 7,0): za pripravo 10 mM HEPES pufra smo natehtali 1,21 g hepesa, dodali milliQ vodo do 400 mL in premešali. Z dodatkom 10 M raztopine NaOH smo pH raztopine HEPES pufra uravnali na pH 7,0.
- 25 mM kalijev klorid: natehtali smo 1,9 g KCl v čašo, dodali 980 mL milliQ vode in premešali na mešalu. Z dodatkom 0,1 M HCl smo pH raztopine uravnali na 1,0. Po umeritvi smo prelili v litrsko bučko ter do oznake dolili milliQ vodo.
- 0,4 M acetatni pufer (pH 4,5): v čašo smo natehtali 54,43 g CH<sub>3</sub>COONa x 3 H<sub>2</sub>O in dodali 960 mL milliQ vode. S pH-metrom smo izmerili pH raztopine ter z 0,1 M HCl umerili pH na 4,5. Raztopino smo prelili v litrsko bučko in dodali vodo do oznake.
- Reagent Folin-Ciocalteu: v 15 mL falkonko smo odpipetirali 3 mL reagenta Folin-Ciocateu in 6 mL milliQ vode ter epruveto zavili v aluminijasto folijo.
- 20 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> reagent: v merilno bučko smo natehtali 20 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in dolili milliQ vodo do oznake.
- Mobilna faza A: milliQ voda : mravljinčna kislina, 97 : 3 (v/v).
- Mobilna faza B: acetonitril : metanol, 85 : 15 (v/v).

### 3.1.10 Priprava standardnih raztopin antocianinov za HPLC-analizo

- Standard cianidin 3-glukozid (0,5 mg/mL): v vialo smo odpipetirali 10 µL standarda in 90 µL 3%- mravljinčne kisline ter premešali.
- Standard cianidin klorid (0,5 mg/mL): v vialo smo odpipetirali 10 µL standarda in 90 µL 3%- mravljinčne kisline ter premešali.
- Standard malvidin 3-glukozid (0,5 mg/mL): v vialo smo odpipetirali 10 µL standarda in 90 µL 3%- mravljinčne kisline ter premešali.
- Standard malvidin klorid (0,5 mg/mL): v vialo smo odpipetirali 10 µL standarda in 90 µL 3%- mravljinčne kisline ter premešali.
- Standard delfnidin 3-glukozid (0,5 mg/mL): v vialo smo odpipetirali 10 µL standarda in 90 µL 3%- mravljinčne kisline ter premešali.
- Standard delfnidin klorid (0,5 mg/mL): v vialo smo odpipetirali 10 µL standarda in 90 µL 3%- mravljinčne kisline ter premešali.
- Standard peragonidin 3-glukozid (0,5 mg/mL): v vialo smo odpipetirali 10 µL standarda in 90 µL 3%- mravljinčne kisline ter premešali.
- Standard peonidin 3-glukozid (0,5 mg/mL): v vialo smo odpipetirali 10 µL standarda in 90 µL 3%- mravljinčne kisline ter premešali.

### 3.2 METODE

#### 3.2.1 Priprava liofilizata granatnega jabolka

Sušenje z zmrzovanjem je potekalo v liofilizatorju. Zmrznen sok granatnega jabolka smo prenesli v 50 mL plastične falkonke, ki smo jih napolnili do 1/3. Pokrili smo s tančevino, ponovno zmrznili s tekočim dušikom in liofilizirali približno 30 ur. Liofilitirane vzorce smo po liofilizaciji shranili v zamrzovalnik pri temperaturi  $-20^{\circ}\text{C}$  do nadaljnje uporabe.

##### Določanje preostanka po liofilizaciji:

Določanje suhe mase snovi po liofilizaciji ( $m_{\text{suhe snovi}}$ ). Označene 50 mL falkonke smo stehtali pred dodatkom soka granatnega jabolka ( $m_{\text{falkonke}}$ ), po dodatku soka granatnega jabolka ( $m_{\text{pred liof.}}$ ) in po končani liofilizaciji ( $m_{\text{po liof.}}$ ). Razlika med maso po končani liofilizaciji in maso prazne falkonke nam da maso suhe snovi soka granatnega jabolka:

$$m_{\text{suhe snovi}}(g) = m_{\text{po liof.}}(g) - m_{\text{falkonke}}(g) \quad \dots(1)$$

#### 3.2.2 Priprava kapsul v $\text{CaCl}_2$

- Kapsule iz alginata: najprej smo določili želeno koncentracijo alginata 1 %, 1,5 % ali 2 %. Želeno koncentracijo smo pripravili tako, da smo 3 % raztopino alginata redčili z ustrezno količino vode, nato dobro premešali na mešalu. Po končanem mešanju smo raztopino alginata napolnili v 60 mL injekcijsko brizgo z navojem. Navili smo jo na mikrokapsulator, kjer smo z regulacijo parametrov ustvarili ustrezne kapljice, ki so se v stiku s  $\text{CaCl}_2$  spremenile v mikrokapsule.
- Kapsule iz pektina: najprej smo določili želeno koncentracijo pektina 1 %, 1,2 %, 1,5 % ali 2 %. Želeno koncentracijo smo pripravili tako, da smo 3 % raztopino pektina redčili z ustrezno količino vode, nato dobro premešali na mešalu. Po končanem mešanju smo pektin napolnili v 60 mL injekcijsko brizgo z navojem. Navili smo jo na mikrokapsulator, kjer smo z regulacijo parametrov ustvarili ustrezne kapljice, ki so se v stiku s  $\text{CaCl}_2$  spremenile v mikrokapsule.
- Kapsule alginat-pektina: ko smo določili želeno koncentracijo mešanice alginata in pektina, smo zmešali enako koncentracijo obeh polimerov v želenem razmerju (alginat : pektin = 4 : 1, 7 : 3, 3 : 2, 1 : 1, 2 : 3, 3 : 7, 1 : 4). Mešanico smo napolnili v 60 mL brizgo z navojem ter s pomočjo enkapsulatorja napravili mikrokapsule v  $\text{CaCl}_2$ .

### 3.2.3 Priprava kapsul z ekstraktom granatnega jabolka

Iz liofilizata granatnega jabolka smo pripravili koncentriran (1–200 mg/mL) sok granatnega jabolka, postopek je že opisan (3.1.7). Želeno koncentracijo soka (1–200 mg/mL) smo zmešali z ustreznim polimernim materialom: alginatom ali mešanico alginat-pektina. Mešanico smo nato napolnili v 60 mL brizgo z navojem ter z mikrokapsulatorjem naredili mikrokapsule v  $\text{CaCl}_2$ .

### 3.2.4 Določanje antioksidativne aktivnosti z metodo ABTS

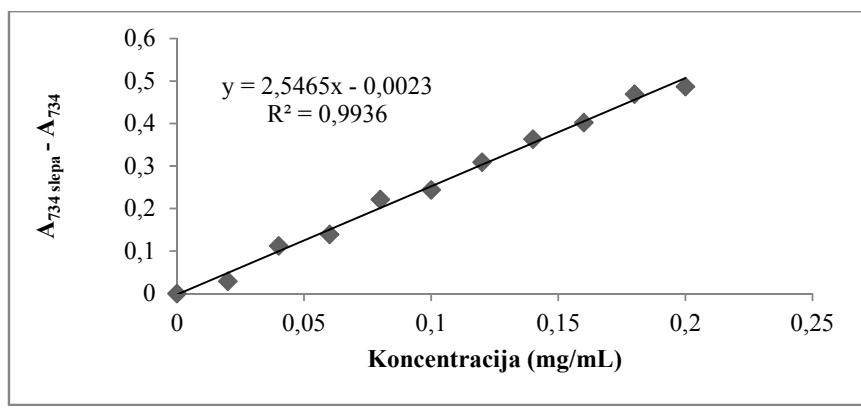
Metoda z reagentom ABTS je danes med najbolj razširjenimi metodami za indirektno določanje antioksidativne aktivnosti lipofilnih in hidrofilnih antioksidantov. ABTS-reagent je stabilen v raztopinah. Tvori se pri oksidaciji med ABTS in manganovim dioksidom ter močno absorbira pri valovni dolžini med 600 in 750 nm. Je modrozelene barve, zato ga lahko enostavno spektrofotometrično določimo. Če so prisotni antioksidanti, ki so donorji vodika, se ABTS reducira, kar vodi do razbarvanja (Zulueta in sod., 2008). Določanje antioksidativne aktivnosti je potekalo s pomočjo ABTS-reagenta po prirejenem postopku. V 1 mL centrifugirko smo dodali vzorec, ABTS-reagent 0,050 mL in pufer (hepes) do 1 mL, premešali in po 30 minutah izmerili abosrbanco pri 734 nm. Za slepi vzorec smo uporabili milliQ vodo.

#### Priprava umeritvene krivulje št. 1 z ABTS-reagentom:

Za pripravo umeritvene krivulje št. 1 (odvisnost absorbance od koncentracije) smo uporabili 1 mg/mL koncentriran sok granatnega jabolka. V 15 mL falkonko smo natehtali 12,08 mg liofilizata granatnega jabolka ter dodali 12,08 mL milliQ vode, premešali in centrifugirali 5 minut pri 3000 obr./min, da so se posedle netopne snovi. Supernatant smo nato prenesli v svežo 15 mL falkonko. Koncentracija tako pripravljene raztopine granatnega jabolka je bila 1 mg/mL. V enajstih mikrocentrifugirkah smo pripravili naslednje raztopine koncentriranega soka granatnega jabolka:

Preglednica 2: Volumen koncentriranega soka granatnega jabolka, reagentov za umeritveno krivuljo št. 1 (ABTS in pufer s pH 7,0) in vrednosti izmerjenih abosrbanc pri 734 nm.

V soka granatnega jabolka (1 mg/mL) ( $\mu\text{L}$ )	V ABTS-reagenta ( $\mu\text{L}$ )	V pufer pH 7,0 ( $\mu\text{L}$ )	A <sub>734</sub> (nm)
0	50	950	0,6332
20	50	930	0,6044
40	50	910	0,5210
60	50	890	0,4941
80	50	870	0,4121
100	50	850	0,3892
120	50	830	0,3240
140	50	810	0,2699
160	50	790	0,2310
180	50	770	0,1640
200	50	750	0,1464



Slika 11: Umeritvena krivulja št. 1 odvisnosti absorbance (pri 734 nm) od masne koncentracije soka granatnega jabolka.

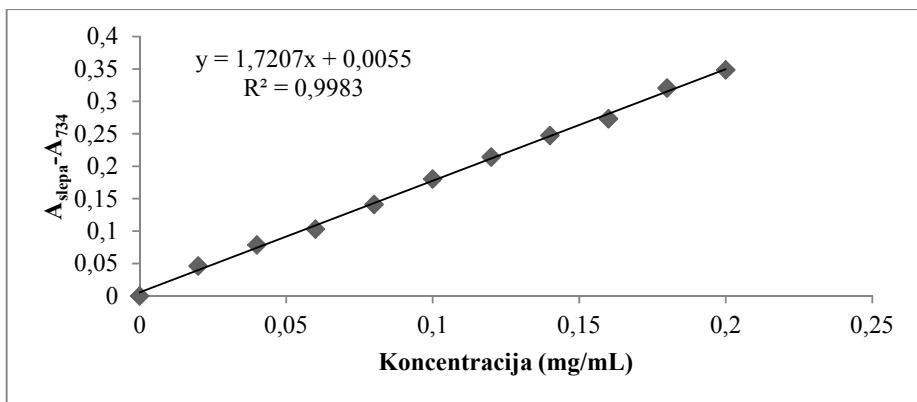
#### Priprava umeritvene krivulje št. 2 z ABTS-reagentom:

Enačbo umeritvene krivulje št. 2 smo uporabili pri izračunu koncentracij ekstrakta granatnega jabolka pri poskusih 4.3, ker smo naknadno morali narediti poskuse.

Za pripravo umeritvene krivulje št. 2 (odvisnost absorbance od koncentracije) smo uporabili 1 mg/mL koncentriran sok granatnega jabolka. V 15 mL falkonko smo natehtali 11,90 mg liofilizata granatnega jabolka ter dodali 11,90 mL milliQ vode, premešali in centrifugirali 5 minut pri 3000 obr./min, da so se posedle netopne snovi. Supernatant smo nato prenesli v svežo 15 mL falkonko. Koncentracija tako pripravljene raztopine granatnega jabolka je bila 1 mg/mL. V enajstih mikrocentrifugirkah smo pripravili naslednje raztopine koncentriranega soka granatnega jabolka:

Preglednica 3: Volumen koncentriranega soka granatnega jabolka, reagentov za umeritveno krivuljo št. 2 (ABTS in pufer s pH 7,0) in vrednosti izmerjenih absorbanc pri 734 nm.

V soka granatnega jabolka (1 mg/mL) ( $\mu$ L)	V ABTS-reagenta ( $\mu$ L)	V pufer pH 7 ( $\mu$ L)	$A_{734}$ (nm)
0	50	950	0,5938
20	50	930	0,5475
40	50	910	0,5152
60	50	890	0,4907
80	50	870	0,4526
100	50	850	0,4135
120	50	830	0,3797
140	50	810	0,3463
160	50	790	0,3206
180	50	770	0,2733
200	50	750	0,2451



Slika 12: Umeritvena krivulja št. 2 odvisnosti absorbance (pri 734 nm) od masne koncentracije soka granatnega jabolka.

### 3.2.5 Folin-Ciocalteu metoda za določanje skupnih fenolnih spojin

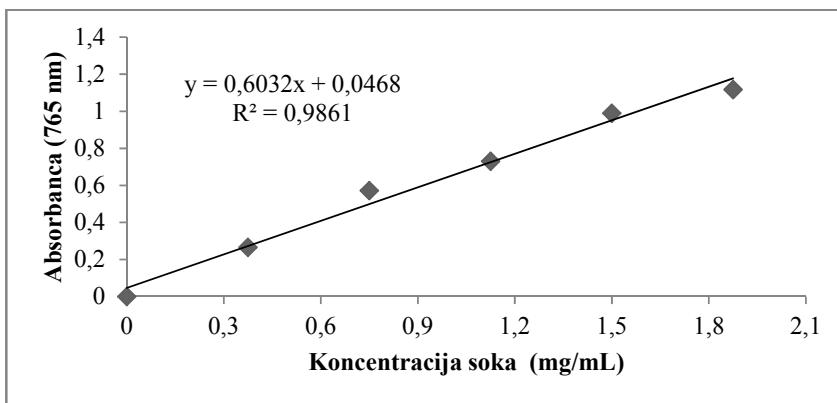
Določitev po Folin-Ciocalteu metodi temelji na oksidaciji fenolnih spojin v alkalnem mediju ob pomoči reagenta (fosfomolibdenska-fosfovolframova kislina) v modroobarvan kompleks, ki absorbira svetlobo pri 765 nm. Postopek določitve je bil opravljen po modificirani metodi, opisani v literaturi (Gutfinger, 1981), na naslednji način: odvzeli smo 0,1 mL vzorčka, mu dodali 0,125 mL Folin-Ciocalteu reagenta in mešali 3 minute. Nato smo dodali 0,125 mL natrijevega karbonata (20 % raztopina), dopolnili z vodo do 1 mL (0,650 mL) in centrifugirali 4 minute pri 5000 obr./min. Po 40 minutah smo izmerili absorbenco pri valovni dolžini 765 nm proti slepemu vzorcu.

#### Priprava umeritvene krivulje (sok granatnega jabolka):

Za pripravo umeritvene krivulje (odvisnost absorbance od koncentracije) smo uporabili 187,5 mg/mL koncentriran sok granatnega jabolka, ki smo ga imeli od predhodnih analiz. Za pripravo umeritvene krivulje smo koncentriran sok granatnega jabolka morali 10-krat redčiti. V šestih mikrocentrifugirkah smo pripravili naslednje raztopine koncentriranega soka granatnega jabolka:

Preglednica 4: Volumen koncentriranega soka granatnega jabolka, reagentov za umeritveno krivuljo (Folin-Ciocalteu,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in vode) in vrednosti izmerjenih absorbanc pri 765 nm.

$V_{\text{soka granatenga}}$ jabolka (18,75 mg/mL) ( $\mu\text{L}$ )	$V_{\text{Folin-Ciocalteu}}$ (mL)	$V_{\text{Na}_2\text{CO}_3}$ (mL)	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ (mL)	$A_{765}$ (nm)
0	0,125	0,125	0,750	0
20	0,125	0,125	0,730	0,2655
40	0,125	0,125	0,710	0,5716
60	0,125	0,125	0,690	0,7301
80	0,125	0,125	0,670	0,9896
100	0,125	0,125	0,650	1,1173



Slika 13: Umeritvena krivulja odvisnosti absorbance (pri 765 nm) od masne koncentracije soka granatnega jabolka.

### 3.2.6 Določanje antocianinov

Za določanje antocianinov sta uveljavljeni dve metodi: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) in spektrofotometrična oz. UV-Vis spektroskopija. Z UV-Vis spektroskopijo dobimo podatke o celokupni sestavi vseh antocianinov, kjer imajo vsi absorpcijski maksimum pri podobnih valovnih dolžinah, kar otežuje podrobnejše vrednotenje. Določanje s HPLC-metodo pa nam da informacijo o vsebnosti posameznih antocianinov.

#### 3.2.6.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC-metoda)

Posamezne antocianine granatnega jabolka v  $\text{CaCl}_2$  smo določili z metodo HPLC, z uporabo HPLC-sistema Agilent 1260 z binarno črpalko (G1312B), avtomatskim vzorcevalnikom (G1367E) in UV-Vis 1260 DAD detektorjem (G4212B) ter kolono Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 mm x 150,0 mm x 3,5  $\mu\text{m}$ , Agilent), zaščiteno z Eclipse XDB C18 (4,6 mm x 12,5 mm x 5,0  $\mu\text{m}$ , Agilent).

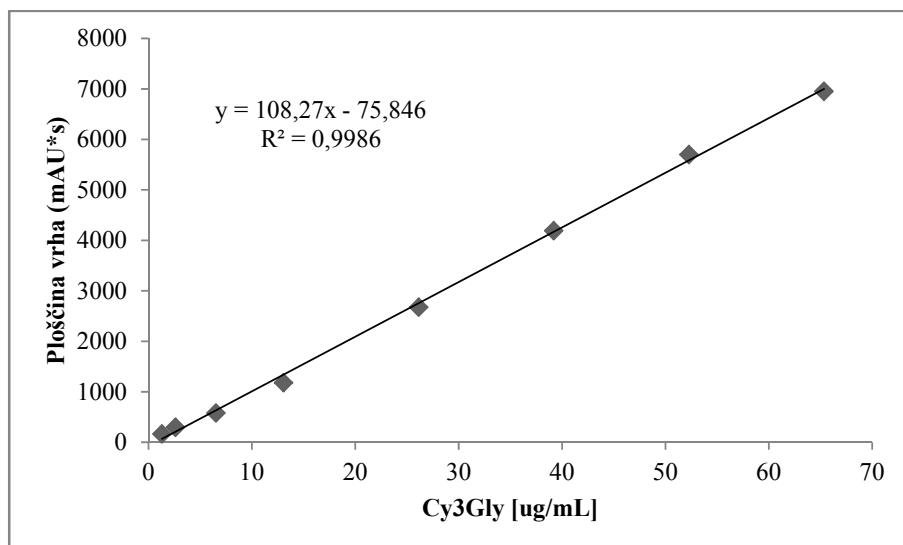
Metoda HPLC temelji na različnih razmerjih injicirane mobilne faze A in B. Mobilna faza A je vodna faza in jo pri naši analizi predstavlja 3 % mravljinčna kislina ( $\text{HCOOH}$ ). Mobilna faza B je organska faza, pri naši analizi mešanica acetonitrila in metanola (85 : 15, v/v). Izločanje poteka od bolj polarne spojine proti manj polarnim spojinam.

Antocianine ločimo pri 40 °C z naslednjo sestavo mobilne faze: 0–13 min, 5–8 % B; 13–25 min, 8–9 % B; 25–45 min; 9–13 % B, 45–46 min, 13–100 % B; 46–48 min, 100 % B; 48–49 min, 100–5 % B; 49–55 min, 5 % B. Pretok mobilne faze je bil 0,800 mL/min, ki smo ga v 25 min povečali na 1,0 mL/min. Volumen injiciranja mobilne faze je 10  $\mu\text{L}$ . UV-Vis spektre smo posneli med 200–600 nm (Constantin, 2012).

Podatke za umeritveno krivuljo smo pridobili od Ajde Ota iz raziskave v laboratoriju za kemijo in biokemijo živil. Vsebnost antocianinov smo določili z integracijo površin kromatografskih pikov in jih izrazili kot ekvivalente cianidin-3-glukozida.

Preglednica 5: Volumen raztopine standarda cianidin-3-glukozida in mobilne faze ter koncentracija in ploščina vrha cianidin-3-glukozida, katerega smo uporabili za pripravo umeritvene krivulje.

V raz. Cy3Glu ( $\mu$ L)	V mobilne faze ( $\mu$ L)	Konc. Cy3Glu ( $\mu$ g/mL)	Ploščina vrha (mAU*s)
1	299	1,3067	166,7
2	298	2,6133	297
5	295	6,5333	581,6
10	290	13,067	1179,3
20	280	26,133	2678
30	270	39,2	4191,6
40	260	52,267	5700,4
50	250	65,333	6951,9



Slika 14: Umeritvena krivulja odvisnosti ploščine antocianina od koncentracije.

### 3.2.6.2 Spektrofotometrično določanje skupnih antocianinov

Skupno vsebnost antocianinov v vzorcu smo določili s spektrofotometrično metodo, ki so jo opisali Lee in sodelavci (2005). Vzorce smo pripravili z dvema razredčitvama, prvo razredčitev s pufrom s pH 1,0, kjer smo uporabili kalijev klorid (0,03 M, 1,9 g KCl v 980 mL milliQ vode) ter drugo s pufrom s pH 4,5, z uporabo natrijevega acetata (0,4 M, 54,4 g CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na x 3H<sub>2</sub>O v 960 mL milliQ vode). Vzorce smo razredčili v razmerju 1 : 4 s pufrom do končnega volumna 1 mL. Vsak vzorec smo izmerili pri 520 nm in 700 nm. Skupno koncentracijo antocianinov smo izračunali po formuli:

$$C_{skupni\ antocianini} = \frac{A \times W \times DF \times 10^3}{\varepsilon \times 1} \quad \dots (2)$$

in je izražena kot ekvivalent cianidin-3-glukozida.

Kjer je  $A$  absorbanca =  $(A_{\lambda_{vis-max}})_{pH\ 1,0} - (A_{\lambda_{vis-max}})_{pH\ 4,5}$ , MW je molska masa cianidin-3-glukozida (449,2 g/mol), DF je redčitveni faktor in  $\varepsilon$  je ekstinkcijski koeficient ( $L \times cm^{-1} \times mol^{-1}$ ) = 26900 za cianidin-3-glukozid, pri čemer je L širina kivete (1 cm).

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 POSKUS PRIPRAVE MIKROKAPSUL BREZ EKSTRAKTA

Pred vključitvijo ekstrakta granatnega jabolka v mikrokapsule smo morali spoznati delovanje mikrokapsulatorja Büchi B-395 Pro in kako se z njim pravilno rokuje. Da smo lahko pripravili ustrezne mikrokapsule, smo morali narediti več poskusov z alginatom, pektinom in mešanico obeh polimerov. Pri samih poskusih smo spremenjali parametre mikrokapsulatorja (hitrost pretoka raztopine, frekvenco in napetost), velikost šob in koncentracijo oz. zamreženost polimera. Cilj je bil narediti čim manjše in čim stabilnejše mikrokapsule, zato smo naredili več poskusov. Osredotočili smo se na 1,5 % in 2 % raztopino alginata oz. mešanico alginata in pektina ter na različne velikosti šob (80, 120, 200 in 450 µm).

#### 4.1.1 Poskus priprave mikrokapsul iz alginata

Najprej smo naredili veliko poskusov izključno z raztopino alginata, pri čemer smo ugotovili, na kaj moramo biti v nadaljevanju eksperimentalnega dela pozorni in pazljivi pri delu z mikrokapsulatorjem. Obliko in velikost narejenih mikrokapsul smo pogledali oz. določili pod svetlobnim mikroskopom s programom MODIC.

##### 4.1.1.1 Parametri mikrokapsulatorja Büchi B-395 Pro

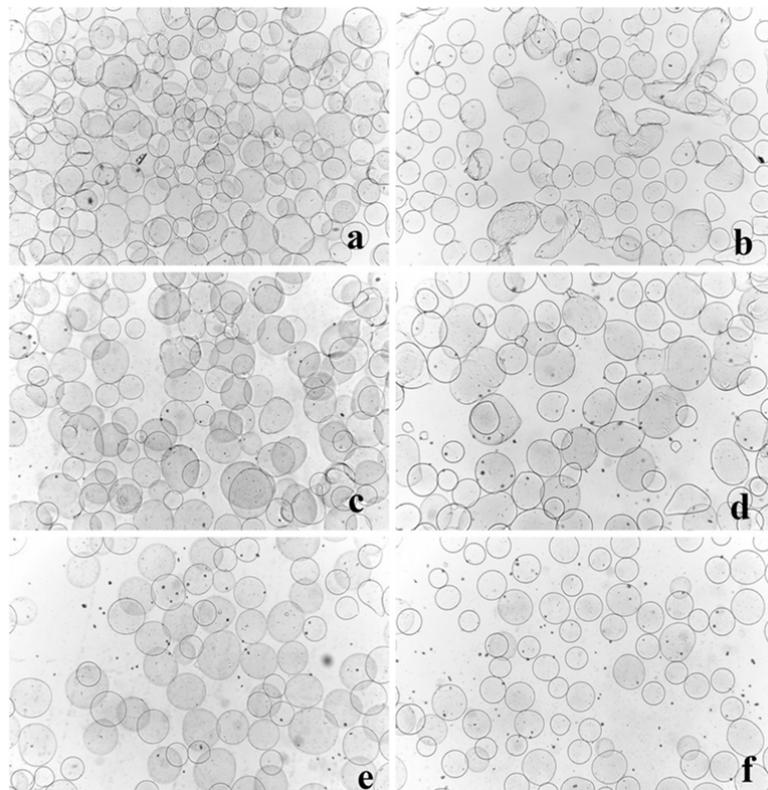
Na začetku smo morali določiti območja parametrov na mikrokapsulatorju Büchi B-395 Pro, kot so hitrost pretoka raztopine ter frekvenco in napetost, s katerimi pripravimo homogene in okrogle mikrokapsule. To smo dosegli s spremnjanjem in pravilno izbranimi kombinacijami parametrov. V preglednici 6 so podana območja parametrov, ki smo jih uporabili v eksperimentalnem delu magistrske naloge in s katerimi smo dosegli kontinuiran in pravilen curek raztopine ter posledično homogene in okrogle mikrokapsule. Vpliv na določitev parametrov ima poleg velikosti šob tudi koncentracija (viskoznost) polimernega materiala.

Preglednica 6: Območja parametrov na mikrokapsulatorju Büchi B-395 Pro (pretok, frekvence in napetost) pri različno velikih šobah, ki smo jih uporabili v našem eksperimentu.

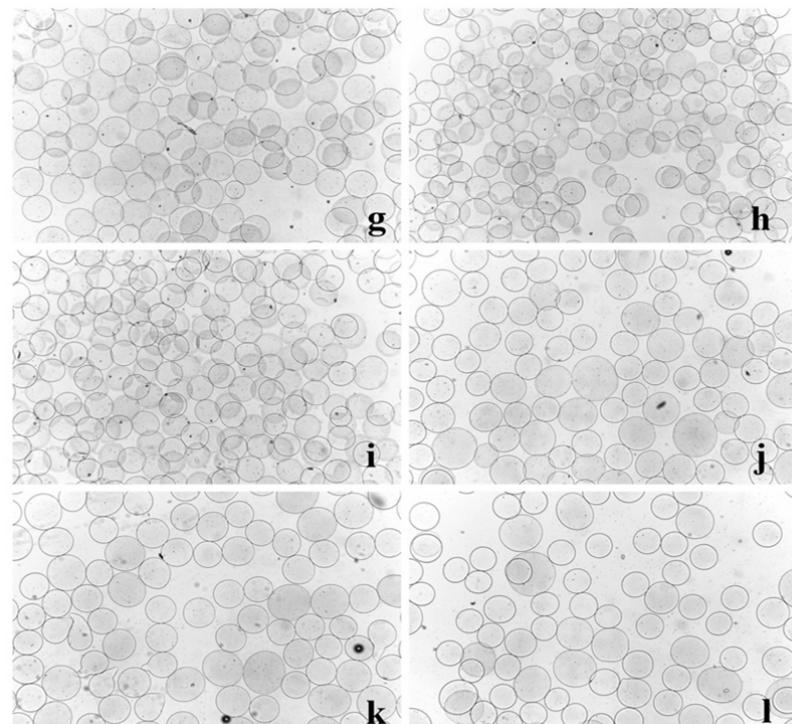
Velikost šobe	80 µm	120 µm	200 µm	450 µm
Pretok (mL/min)	1,26–2,25	2,00–3,00	3,80–4,06	12,0
Frekvanca (Hz)	3910–4500	2700–4100	900–1090	350
Napetost (V)	1030–1900	1100–2100	800–1550	2400

Območje parametrov smo določili z mnogimi poskusi, pri katerih smo spremenjali najprej samo hitrost pretoka raztopine, potem frekvenco in nato še napetost. Na podlagi oblike curka tekočine in mikroskopskih slik mikrokapsul smo se odločili, katero območje

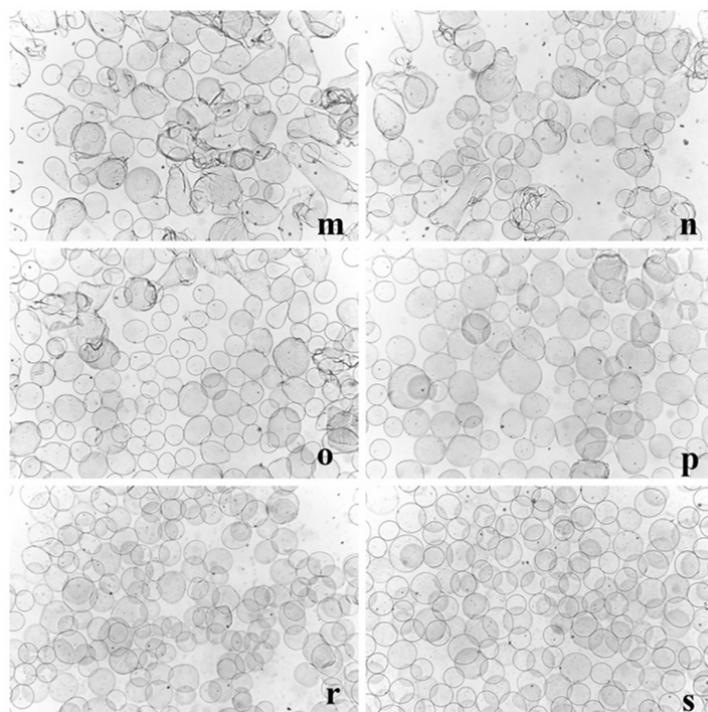
parametrov je najprimernejše. Območja parametrov na mikrokapsulatorju, ki smo jih uporabili pri določanju optimalnega območja parametrov, so podana v preglednici 7. Na sliki 15 (od a do f) in sliki 17 (od m do s) so predstavljene mikrokapsule, ki smo jih posneli s svetlobnim mikroskopom pri 40-kratni povečavi. Nekatere kombinacije parametrov niso bile optimalne in opazimo lahko, da mikrokapsule niso homogene (različne velikosti) ter so nepravilnih oblik. Sklepamo, da je vzrok za različne velikosti mikrokapsul na sliki 15 prenizka nastavitev frekvence – v teh poskusih je bila 1000 Hz. V nadaljevanju smo frekvenco povečali, tako lahko na sliki 16 pod oznako g–l opazimo bistveno bolj homogene in okrogle mikrokapsule. Območje napetosti, ki smo jo uporabili pri pripravi mikrokapsul na sliki 16, je bila 1000–1800 V. Sklepamo, da je to območje napetosti ustrezeno. Vzrok za nehomogene mikrokapsule in njihove nepravilne oblike na sliki 17 je hitrost pretoka raztopine. Pretok pri teh poskusih je bil 3,5–4,0 mL/min, na podlagi česar sklepamo, da je previsok. Najboljše območje hitrosti pretoka raztopine je 2,5–3,0 mL/min, kar lahko opazimo tudi s slike 16, kjer je bilo uporabljen to območje hitrosti pretoka raztopine. Prišli smo do zaključka, da so pri uporabi 120 µm velike šobe primerni parametri v območju, ki so predstavljeni v preglednici 7 pod oznako g–l.



Slika 15: Neustrezne mikrokapsule, ki smo jih posneli pri 40-kratni povečavi, narejene z mikrokapsulatorjem Büchi B 395 Pro, pri spremenjanju parametrov hitrosti pretoka raztopine, frekvence in napetosti (preglednica 7, a-f).



Slika 16: Ustrezne mikrokapsule, posnete pri 40-kratni povečavi, narejene z mikrokapsulatorjem Büchi B-395 Pro pri spremenjanju parametrov hitrosti pretoka raztopine, frekvence in napetosti (preglednica 7, g-l).

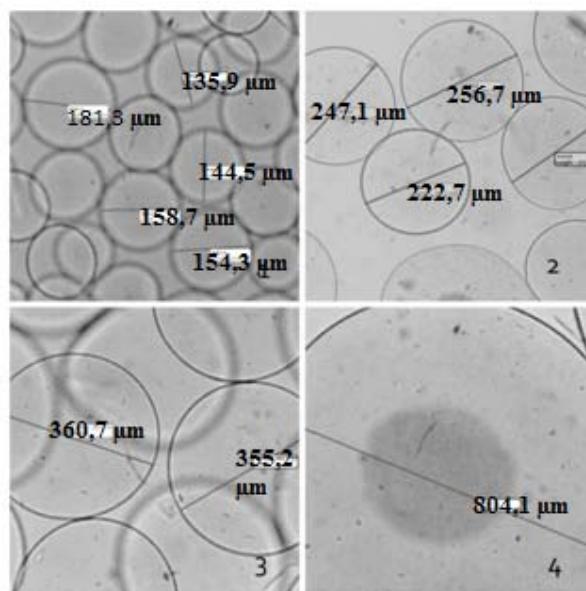


Slika 17: Neustrezne mikrokapsule, posnete pri 40-kratni povečavi, narejene z mikrokapsulatorjem Büchi B-395 Pro pri spremenjanju parametrov hitrosti pretoka raztopine, frekvence in napetosti (preglednica 7, m-s).

Preglednica 7: Območja parametrov na mikrokapsulatorju Büchi B-395 Pro pri pripravi mikrokapsul z uporabo 1,5 % raztopine alginata in 120 µm velike šobe.

Oznaka na sliki	a-f	g-l	m-s
Pretok (mL/min)	2,0–4,0	2,0–3,0	3,5–4,0
Frekvenca (Hz)	1000	2000–4100	2000–4000
Napetost (V)	500–1300	1000–2100	1000
Velikost šobe (µm)	120	120	120
Koncentracija alginata (%)	1,5	1,5	1,5

#### 4.1.1.1.1 Poskus priprave mikrokapsul iz 1,5 % raztopine alginata



Slika 18: Mikroskopska slika mikrokapsul, narejenih iz 1,5 % raztopine alginata z različno velikimi šobami (1: 80 µm; 2: 120 µm; 3: 200 µm in 4: 450 µm).

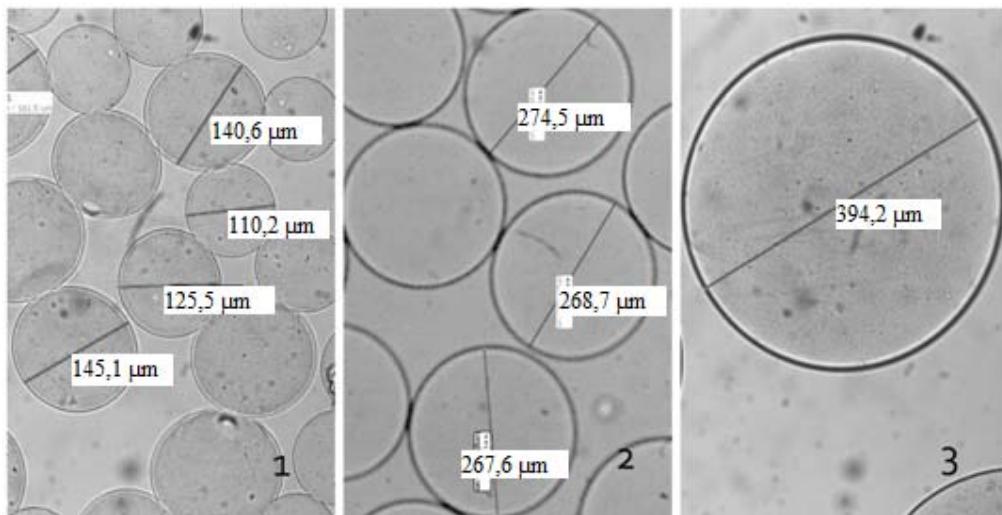
Preglednica 8: Parametri na mikrokapsulatorju Büchi B-395 Pro pri pripravi mikrokapsul z uporabo 1,5 % raztopine alginata in različno velikih šob.

Velikost šobe	80 µm	120 µm	200 µm	450 µm
Pretok tekočine (mL/min)	1,26	2,60	3,80	12,0
Frekvenca (Hz)	3910	3700	1090	350
Napetost (V)	1030	2100	800	2400
Koncentracija alginata (%)	1,5	1,5	1,5	1,5
Velikost kapsul (µm)	136–181	221–258	345–360	804

S pomočjo svetlobnega mikroskopa smo pri 100-kratni povečavi pogledali obliko mikrokapsul in izmerili njihovo velikost s programom MODIC. Težili smo k temu, da

naredimo čim manjše in čim bolj homogene mikrokapsule. To smo naredili s spremenjanjem parametrov mikrokapsulatorja. Slika 18 prikazuje mikrokapsule pod svetlobnim mikroskopom, ki so bile narejene iz 1,5 % raztopine alginata, z uporabo 80 µm, 120 µm, 200 µm in 400 µm velikimi šobami. V preglednici 8 so v zadnji vrstici predstavljene velikosti mikrokapsul. Kot je razvidno slike 18 in tudi iz preglednice 8, so najprimernejše velikosti (do 300 µm) in oblike kapsul narejene z uporabo 80 µm in 120 µm velikima šobama. Z uporabo 80 µm šobe smo naredili najmanjše mikrokapsule: 130–180 µm. S 450 µm šobo smo naredili 800 µm velike mikrokapsule, le-te pa so za naš eksperiment prevelike. V nadaljevanju eksperimentalnega dela smo uporabili šobe v velikosti 80, 120 in 200 µm.

#### 4.1.1.1.2 Poskus priprave mikrokapsul iz 2 % raztopine alginata



Slika 19: Mikroskopska slika mikrokapsul, narejenih iz 2 % raztopine alginata z različno velikimi šobami (1:80 µm; 2: 120 µm in 3: 200 µm).

Preglednica 9: Parametri na mikrokapsulatorju Büchi B-395 Pro pri pripravi mikrokapsul, z uporabo 2 % raztopine alginata in različno veliki šob.

Velikost šobe	80 µm	120 µm	200 µm
Pretok tekočine (mL/min)	2,25	2,00	4,06
Frekvenca (Hz)	4500	4100	900
Napetost (V)	1900	1100	1550
Koncentracija alginata (%)	2	2	2
Velikost kapsul (µm)	110–145	268–275	394

Z 2 % raztopino alginata smo žeeli narediti bolj stabilne mikrokapsule (z večjo zamreženostjo). Z večanjem koncentracije raztopine alginata nastajajo bolj čvrste mikrokapsule, ker je zamreževanje alginatnih verig obsežnejše. Na sliki 19 so prikazane

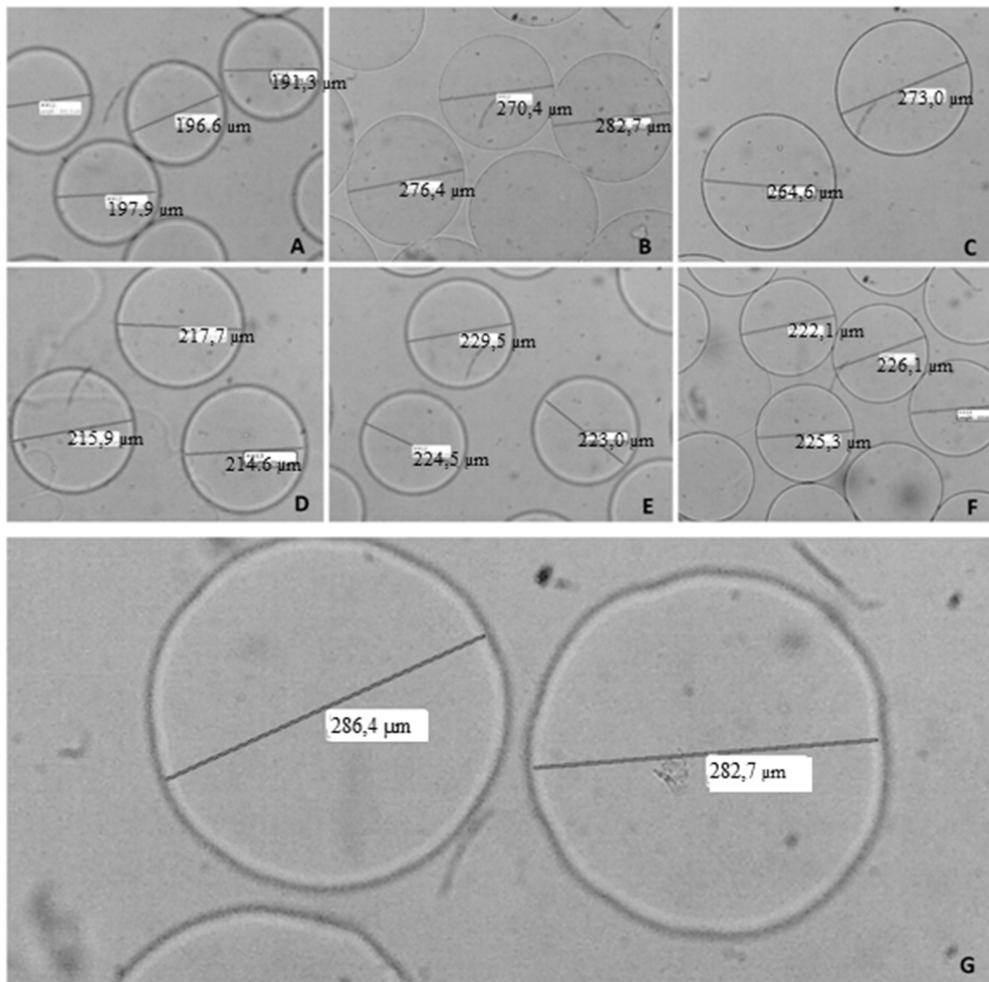
mikrokapsule, narejene z različnimi velikostmi šob (80 µm, 120 µm in 200 µm). Iz preglednice 9 je razvidno, da dobimo primerne velikosti (110–270 µm) mikrokapsul, z uporabo 80 in 120 µm velikima šobama. Velikost mikrokapsul z 80 µm veliko šobo je bila približno od 110 do 150 µm, pri uporabi 120 µm šobe pa približno 270 µm. Velikost je ena pomembnejših lastnosti mikrokapsul, kajti pri vključitvi mikrokapsul v matrico izdelka (živila) le-te ne smejo biti vizualno moteč element, hkrati pa ne smejo vplivati na teksturo izdelka (živila). Najprimernejše so zelo majhne, komaj vidne mikrokapsule. Z mikrokapsulatorjem smo pri velikosti šobe 80 µm naredili najmanjše, približno od 110 do 150 µm velike mikrokapsule, z 120 µm veliko šobo pa približno od 220 do 270 µm. Pri izdelavi mikrokapsul z uporabo 80 µm šobe se je le-ta hitro zamašila. Težavo smo poskusili odpravili tako, da smo raztopino alginata centrifugirali ali segrevali na 60 °C ter šobo večkrat temeljito sčistili pod vročo tekočo vodo ali z 10 M NaOH. Koncentracija raztopine alginata je pomembna lastnost pri sposobnosti zadrževanja ekstrakta granatnega jabolka v mikrokapsulah. Uporabili smo 1,5 in 2 % raztopino alginata. Menimo, da višja koncentracija raztopine alginata poveča stabilnost mikrokapsul. To dejstvo smo dokazali v nadaljevanju poskusa, ko smo v mikrokapsule vključili ekstrakt granatnega jabolka.

#### 4.1.2 Priprave mikrokapsul iz mešanice alginata in pektina

Znano je, da mešanice alginata in pektina tvorijo bolj stabilno povezane gele. Pripravili smo različne mešanice raztopine alginata in pektina. V preglednici 10 so podana razmerja med raztopino alginata in pektina, iz katerih smo narediti mikrokapsule.

Preglednica 10: Razmerja alginata in pektina (v deležih), ki smo jih uporabili pri poskusu z mešanico alginat-pektina.

Alginat (v %)	Pektin (v %)	Razmerje
80	20	4 : 1
70	30	7 : 3
60	40	3 : 2
50	50	1 : 1
40	60	2 : 3
30	70	3 : 7
20	80	1 : 4



Slika 20: Mikrokapsule, pripravljene pri različnih razmerjih alginata in pektina, posnete s svetlobnim mikroskopom.

Preglednica 11: Parametri na mikrokapsulatorju Büchi B-395 Pro pri poskusih z uporabo različnih razmerij alginat-pektina in velikostjo 120 µm šobe, pri 1,5 % raztopini mešanice alginata in pektina.

Oznaka	A	B	C	D	E	F	G
Razmerje alg/pek	4 : 1	7 : 3	3 : 2	1 : 1	2 : 3	3 : 7	1 : 4
Pretok tekočine (mL/min)	2,15	2,05	2,15	2,10	2,35	2,38	2,28
Frekvenca (Hz)	3930	3350	4100	3705	3950	3900	4040
Napetost (V)	1600	1300	1660	1330	1460	1850	2070
Velikost kapsul (µm)	186–201	270–276	265–273	215–218	223–230	222–226	283–286

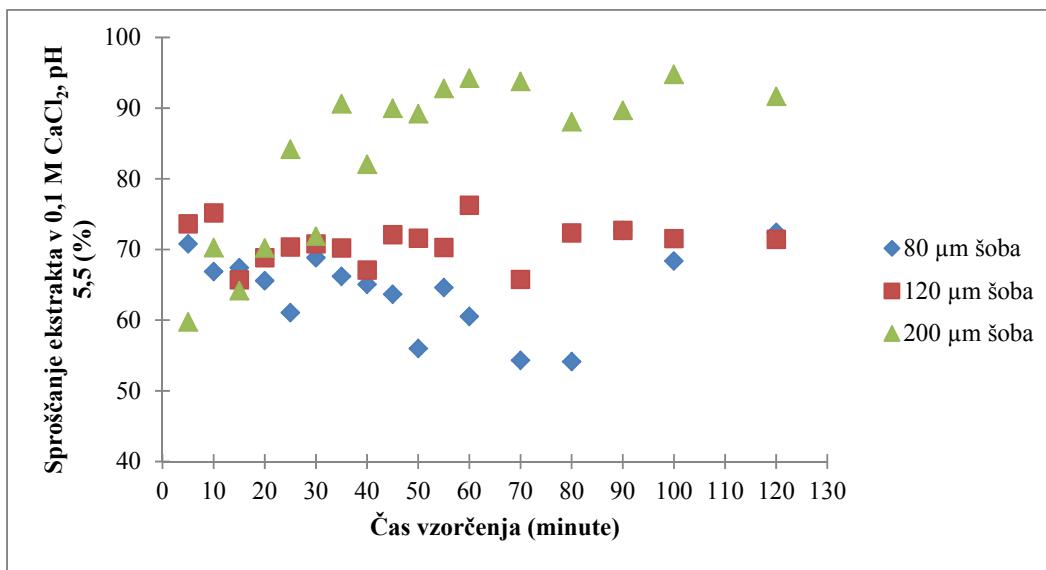
Slika 20 prikazuje mikrokapsule, ki so bile posnete s pomočjo svetlobnega mikroskopa pri 100-kratni povečavi. Mikrokapsule na sliki so narejene iz različnih razmerij raztopin alginata in pektina. Slike 20, del G, je razvidno, da ovojnica mikrokapsul ni napeta, ampak je nagubana. To je posledica uporabljenega razmerja alginata in pektina 1 : 4. Pri teh kapsulah prevladuje pektin (80 %), iz česar sklepamo, da večji delež pektina vpliva na obliko in nagubanost ovojnice mikrokapsul in s tem tudi na nestabilnost. Do podobnih zaključkov so prišli tudi Zam in sodelavci (2013), ki so ugotovljali učinkovitost kapsuliranja polifenolov. Ugotovili so, da je najprimernejše razmerje alginata in pektina 2 : 1. V nadaljevanju raziskovalnega dela smo razmerja, kjer prevladuje pektin, izločili. Osredotočili smo se na razmerja, ki vsebujejo večji delež alginata od 50 do 100 %. Za pripravo mikrokapsul iz 1,5 % mešanice polimerov smo uporabili 120 µm šobo, s tem smo se izognili težavi zamašitve šobe. V preglednici 8 so predstavljeni parametri na mikrokapsulatorju pri posameznem poskusu ter velikosti mikrokapsul, ki smo jih določili pod mikroskopom. Ugotovili smo, da na velikost mikrokapsul razmerje alginata in pektina nima vpliva, kar je razvidno iz preglednice 11. Na velikost mikrokapsul vplivajo parametri na mikrokapsulatorju in velikost šobe.

## 4.2 PRIPRAVA MIKROKAPSUL Z EKSTRAKTOM GRANATNEGA JABOLKA

### 4.2.1 Stabilnost mikrokapsul, napolnjenih z ekstraktom granatnega jabolka, pripravljenih iz 1,5 % raztopine alginata

Preglednica 12: Sproščanje ekstrakta granatnega jabolka iz 1,5 % alginatnih mikrokapsul, narejenih z uporabo različno velikih šob.

Čas vzorčenja (min)	Sproščanje (%)		
	80 µm šoba (velikost delcev: 144–162 µm)	120 µm šoba (velikost delcev: 216–276 µm)	200 µm šoba (velikost delcev: 380–400 µm)
0	0	0	0
5	71	74	60
10	67	75	70
15	67	66	64
20	66	69	70
25	61	70	84
30	69	71	72
35	66	70	91
40	65	67	82
45	64	72	90
50	56	72	89
55	65	70	93
60	61	76	94
70	54	66	94
80	54	72	88
90	73	73	90
100	68	72	95
120	72	71	92



Slika 21: Sproščanje ekstrakta granatnega jabolka iz mikrokapsul, pripravljenih iz 1,5 % raztopine alginata, narejenih z uporabo različno velikih šob (80, 120 in 200 µm), v odvisnosti od časa vzorčenja.

Po mnogih poskusih priprave mikrokapsul brez vključenega ekstrakta granatnega jabolka smo naredili tudi poskuse z ekstraktom, kjer smo lahko ugotovili, ali so mikrokapsule iz izbranih polimerov in razmerij stabilne. Sproščanje aktivne snovi oz. ekstrakta granatnega jabolka smo določili z ABTS-metodo. Z metodo smo določili antioksidativno aktivnost v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (T = 25,0 °C; pH 5,5), v katerega so padale kapljice polimerov in pri tem želirale in se spremenile v mikrokapsule. Čašo z 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pH 5,5) in kapsulami smo imeli pokrito z aluminijasto folijo ter vzorce nato shranjevali do analize v temi, pri sobni temperaturi (T = 25 °C).

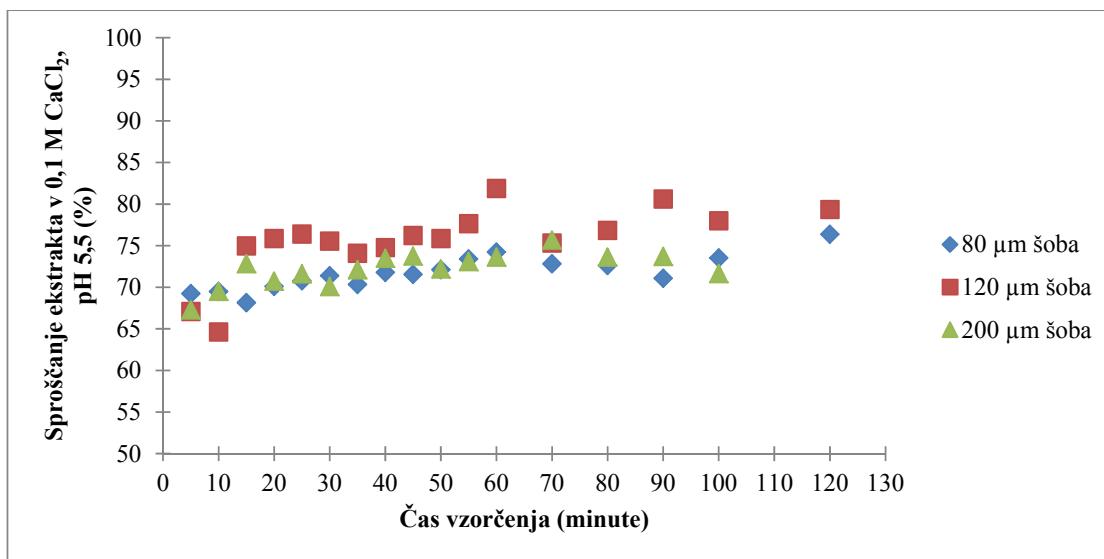
Slika 21 nam prikazuje delež sproščenega ekstrakta granatnega jabolka iz 1,5 % alginatnih mikrokapsul v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> s pH 5,5. Razvidno je, da se, neodvisno od velikosti mikrokapsul, že po petih minutah iz kapsul sprosti več kot 60 % ekstrakta. Po dveh urah vzorčenja se največ (približno 90 %) ekstrakta granatnega jabolka (in tudi najhitreje) sprosti iz kapsul narejenih z 200 µm šobo, pri čemer so bile mikrokapsule velike 380–400 µm. Iz kapsul, narejenih z 80 in 120 µm velikima šobama, se po dveh urah sprosti manjši delež ekstrakta granatnega jabolka kot iz kapsul, narejenih z uporabo 200 µm šobe, in sicer 70 %. Tekom meritev se je najpočasneje sproščal ekstrakt granatnega jabolka iz najmanjših mikrokapsul, narejenih z uporabo 80 µm šobe.

Sipanje meritev v grafu 21 je veliko in je posledica težkega vzorčenja. Morali smo počakati, da se mikrokapsule usedejo na dno čaše. Pri tem je prišlo do manjših napak. Iz rezultatov na sliki 21 je razvidno, da se ekstrakt granatnega jabolka iz mikrokapsul tekom vzorčenja sprošča v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pH 5,5; T = 25 °C).

#### 4.2.2 Stabilnost mikrokapsul, napolnjenih z ekstraktom granatnega jabolka, pripravljenih iz 2 % raztopine alginata

Preglednica 13: Sproščanje ekstrakta granatnega jabolka iz 2 % alginatnih mikrokapsul, narejenih z uporabo različno velikih šob.

Čas vzorčenja (min)	Sproščanje (%)		
	80 µm šoba (velikost delcev: 102–150 µm)	120 µm šoba (velikost delcev: 190–250 µm)	200 µm šoba (velikost delcev: 385–410)
	0	0	0
0	0	0	0
5	69	67	67
10	70	65	70
15	68	75	73
20	70	76	71
25	71	76	72
30	71	76	70
35	70	74	72
40	72	75	74
45	72	76	74
50	72	76	72
55	73	78	73
60	74	82	74
70	73	75	76
80	73	77	74
90	71	81	74
100	74	78	72
120	76	79	75



Slika 22: Sproščanje ekstrakta granatnega jabolka iz mikrokapsul, pripravljenih iz 2 % raztopine alginata, z uporabo različno velikih šob (80, 120 in 200 µm), v odvisnosti od časa vzorčenja.

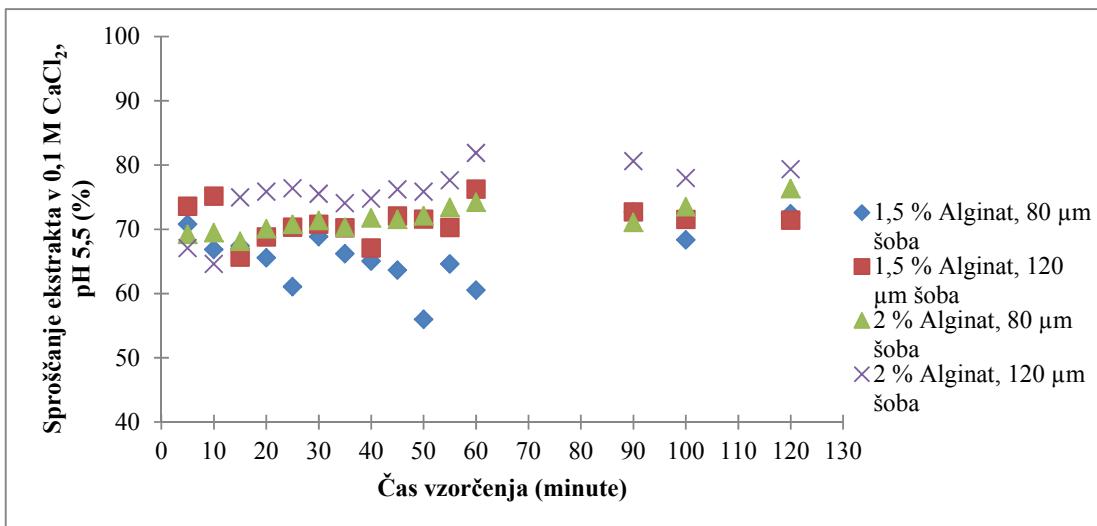
Slika 22 nam prikazuje delež sproščanja ekstrakta granatnega jabolka iz 2 % alginatnih mikrokapsul v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pH 5,5) v odvisnosti od časa vzorčenja. Delež opisanega ekstrakta smo določili z reagentom ABTS, kjer smo merili antioksidativno aktivnost spojin v granatnem jabolku. Razvidno je, da se že po petih minutah sprosti 68 % ekstrakta neodvisno od velikosti mikrokapsul. Počasi sproščanje ekstrakta narašča in po dveh urah se je največ ekstrakta granatnega jabolka sprostilo iz mikrokapsul, narejenih s 120 µm veliko šobo (približno 80 %), najmanj pa iz mikrokapsul, narejenih z 200 µm šobo, vendar so razlike v % sproščenega ekstrakta granatnega ekstrakta majhne (5 %).

#### 4.2.3 Primerjava sproščanja ekstrakta granatnega jabolka iz 1,5- in 2 % raztopine alginatnih mikrokapsul, pripravljenih z uporabo 80 in 120 µm velikima šobama.

Preglednica 14: Parametri na mikrokapsulatorju Büchi B-395 Pro, pri izdelavi mikrokapsul iz 1,5 in 2 % raztopine alginata, z uporabo različno velikih šob, ter koncentracija ekstrakta granatnega jabolka in velikost kapsul pri T = 25,0 °C.

Velikost šobe	80 µm	120 µm	80 µm	120 µm
Pretok tekočine (mL/min)	1,40	2,40	2,25	2,60
Frekvenca (Hz)	4470	3900	4500	3700
Napetost (V)	1370	1730	1900	2100
Koncentracija alginata (%)	1,5	1,5	2	2
Koncentracija ekstrakta (mg/mL)	100	50	50	50
Velikost mikrokapsul (µm)	144–162	216–276	102–150	190–250

V preglednici 14 so podane vrednosti parametrov na mikrokapsulatorju Büchi B-395 Pro, ki smo jih nastavili pri posameznem poskusu priprave mikrokapsul v poskusih (4.2.1 in 4.2.2). Uporabili smo dve različni velikosti šob (80 in 120 µm) in dve različni koncentraciji alginata (1,5 % in 2 %). Koncentracija ekstrakta granatnega jabolka pri poskusu z 1,5 % raztopino alginata in 80 µm veliko šobo je bila 100 mg/mL, pri ostalih poskusih pa 50 mg/mL. Predstavljene so tudi velikosti kapsul. Najmanjše mikrokapsule smo pripravili z 80 µm šobo (od 102 do 162 µm). S 120 µm šobo smo pripravili od 190 do 276 µm velike mikrokapsule.



Slika 23: Primerjava odvisnosti sproščanja ekstrakta granatnega jabolka iz 1,5 % in 2 % mikrokapsul, narejenih iz 80 in 120  $\mu\text{m}$  velikima šobama.

Slika 23 prikazuje primerjavo v sproščanju ekstrakta granatnega jabolka v 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  (pH 5,5) pri  $T = 25,0^\circ\text{C}$ , med 1,5 % in 2 % alginatnimi mikrokapsulami, ki so narejene z 80 in s 120  $\mu\text{m}$  šobama. Razlike v % sproščenega ekstrakta granatnega jabolka iz mikrokapsul, pripravljenih pod različnimi pogoji, niso velike, zato lahko sklepamo, da v našem primeru koncentracija alginata 1,5 % ali 2 % nima velikega vpliva na delež sproščenega ekstrakta granatnega jabolka.

Če primerjamo velikosti šob, ugotovimo, da se več ekstrakta granatnega jabolka sprosti iz mikrokapsul, ki so bile narejene s 120  $\mu\text{m}$  šobo. Mikrokapsule so večje in imajo večjo zunanjou površino. Razvidno je, da se že po 5 minutah sprosti 70 % ekstrakta granatnega jabolka iz mikrokapsul neodvisno od koncentracije alginata in/ali velikosti mikrokapsul.

#### 4.3 VPLIV RAZLIČNIH pH $\text{CaCl}_2$ NA SPROŠČANJE EKSTRAKTA GRANATNEGA JABOLKA IZ MIKROKAPSUL

Tako polimerna materiala, kot sta alginat in pektin kot tudi spojine (polifenolne spojine, vitamini itd.), ki so v granatnem jabolku, so občutljive na spremembo pH. Nekaj poskusov smo naredili v različnih pH vrednostih raztopine  $\text{CaCl}_2$ , pri kislem (3,5) in nevtralnem pH (7,0). S tem smo ugotavljali, kakšen vpliv ima določen pH na stabilnost mikrokapsul in ekstrakta v njih. Sproščanje ekstrakta v 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  smo spremljali eno uro, pri čemer smo čašo prekrili z aluminijasto folijo, da smo preprečili direkten vpliv svetlobe. Vzorce smo do nadaljnje analize shranili v temi na sobni temperaturi ( $T = 25^\circ\text{C}$ ).

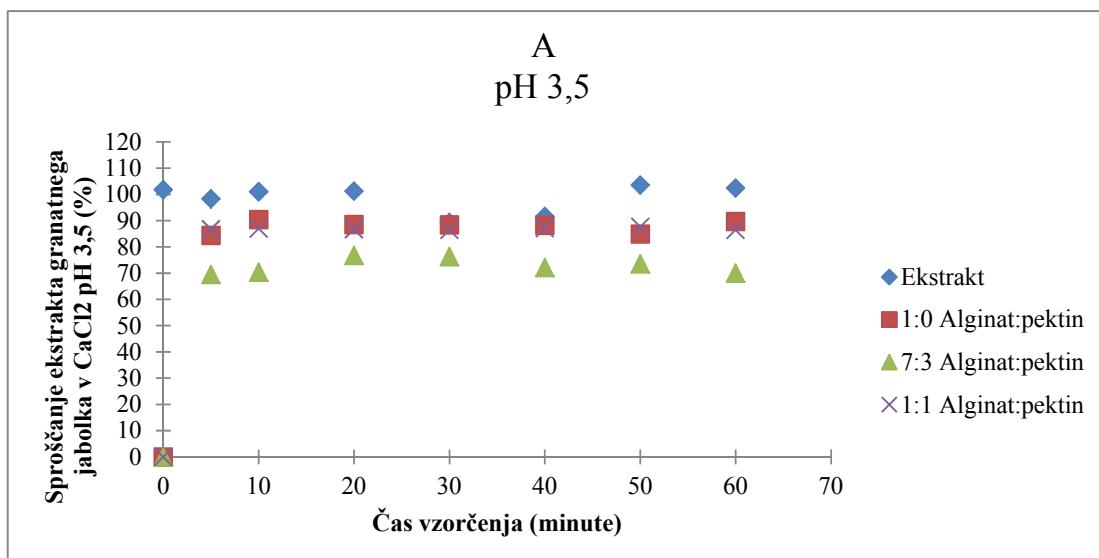
Preglednica 15: Parametri na mikrokapsulatorju Büchi B-395 Pro pri pripravi mikrokapsul iz različnih razmerij polimerov (alginat-pektina), pri različnih vrednostih pH CaCl<sub>2</sub> ter koncentracijah ekstrakta granatnega jabolka.

Razmerje polimerov	100 % alginat pH 3,5	100 % alginat pH 7,0	70 : 30 alg:pek pH 3,5	70 : 30 alg:pek pH 7,0	50 : 50 alg:pek pH 3,5	50 : 50 alg:pek pH 7,0
<b>Pretok tekočine (mL/min)</b>	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80
<b>Frekvenca (Hz)</b>	3900	3900	3900	3900	3900	3900
<b>Napetost (V)</b>	1800	1800	1800	1800	1800	1800
<b>Velikost šobe (µm)</b>	120	120	120	120	120	120
<b>Konc. polimera (%)</b>	2	2	2	2	2	2
<b>Konc. ekstrakta (mg/mL)</b>	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5

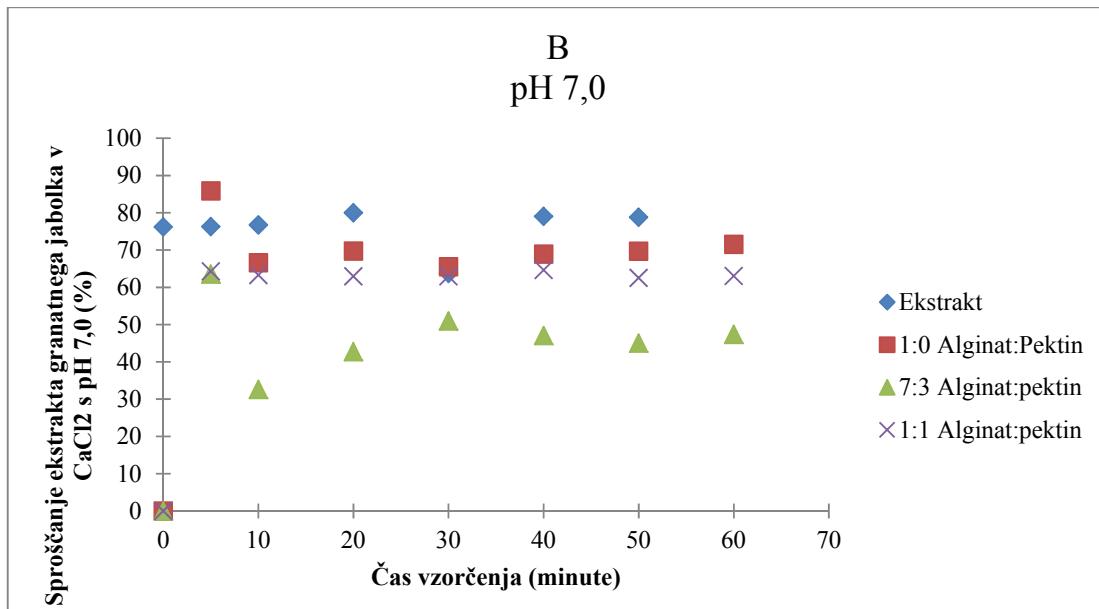
Preglednica 15 prikazuje eksperimentalne vrednosti parametrov mikrokapsulatorja Büchi B-395 Pro, ki smo jih uporabili pri izdelavi posameznega poskusa v poglavju 4.3. Za vse poskuse smo uporabili 120 µm šobo in 2 % raztopino alginata oz. mešanico alginat-pektina ter koncentracijo ekstrakta granatnega jabolka 62,5 mg/mL.

Preglednica 16: Delež sproščanja ekstrakta granatnega jabolka iz 2 % (alginat-pektin) mikrokapsul v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> pri pH 3,5 in 7,0, iz mikrokapsul, narejenih iz različnih razmerij alginata in pektina pri T = 25,0 °C.

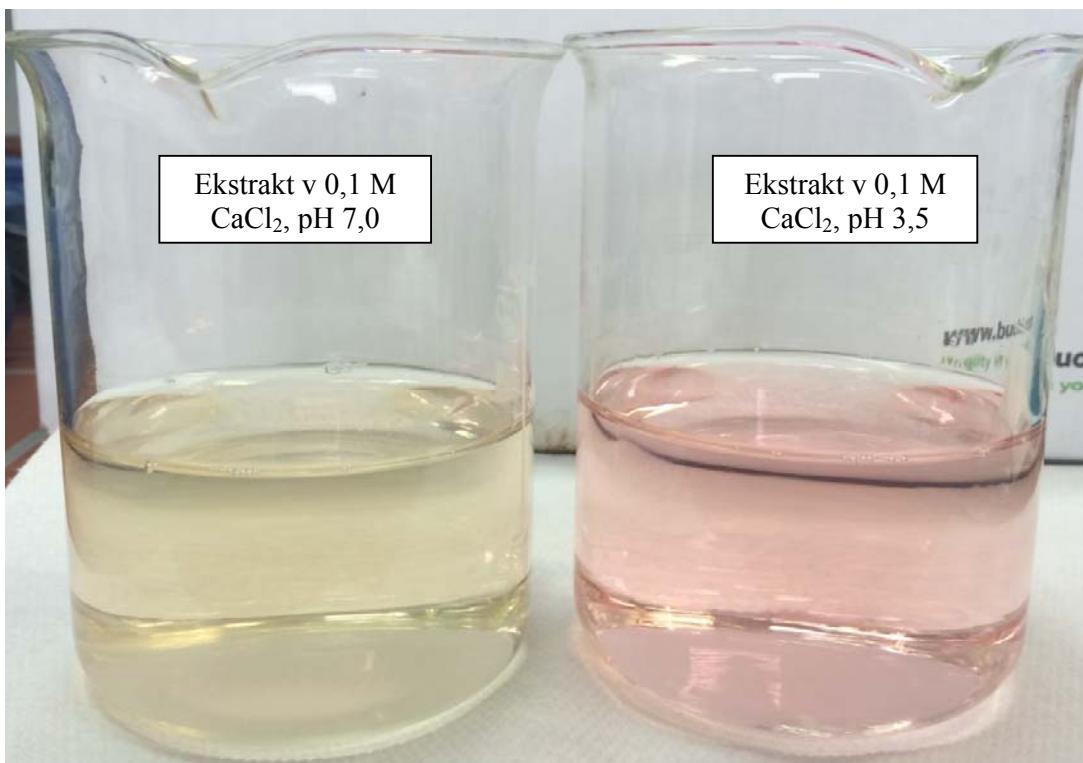
Čas vzorčenja (min)	Ekstrakt pH 3,5 (%)	Alginat (1 : 0) pH 3,5 (%)	Alginat-pektin (7 : 3) pH 3,5 (%)	Alginat-pektin (1 : 1) pH 3,5 (%)	Ekstrakt pH 7,0 (%)	Alginat (1 : 0) pH 7,0 (%)	Alginat-pektin (7 : 3) pH 7,0 (%)	Alginat-pektin (1 : 1) pH 7,0 (%)
0	102	0	0	0	76	0	0	0
5	98	84	69	87	76	86	64	64
10	101	90	70	87	77	67	32	63
20	101	89	77	87	80	70	43	63
30	89	88	76	86	64	66	51	63
40	92	88	72	87	79	69	47	65
50	104	85	74	88	79	70	45	63
60	102	90	70	87	79	72	47	63



Slika 24: Delež sproščenega ekstrakta granatnega jabolka iz mikrokapsul različnih razmerij alginata in pektina v 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  s pH 3,5 ( $T = 25^\circ\text{C}$ ), ter ekstrakt v 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  s pH 3,5, določenega z ABTS-metodo, v odvisnosti od časa vzorčenja.



Slika 25: Delež sproščenega ekstrakta granatnega jabolka iz mikrokapsul različnih razmerij alginata in pektina v 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  s pH 7,0 ( $T = 25^\circ\text{C}$ ), ter ekstrakt v 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  s pH 7,0, določenega z ABTS-metodo, v odvisnosti od časa vzorčenja.



Slika 26: Sprememba barve ekstrakta granatnega jabolka v različnih pH 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (T = 25 °C), v levi časi je pH 0,1 M CaCl<sub>2</sub> 7,0, v desni časi je pH 0,1 M CaCl<sub>2</sub> 3,5.

Sliki 24 in 25 nam prikazujeta delež sproščenega ekstrakta granatnega jabolka iz mikrokapsul, narejenih iz 100 % raztopine alginata, iz mešanice alginat-pektina v razmerju 70 : 30 in mešanice alginat-pektina v razmerju 50 : 50 ter odstotek nekapsuliranega ekstrakta v 0,1 M CaCl<sub>2</sub>. Na sliki 24 je pH v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> 3,5 (T = 25 °C), na sliki 25 pa je pH v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> 7,0 (T = 25 °C). Koncentracija polimerov je bila 2 % in velikost šobe, ki smo jo uporabili, 120 µm. Primerjali smo, kakšen vpliv ima na sproščanje ekstrakta različna vrednost pH raztopine 0,1 M CaCl<sub>2</sub>, v katero padajo kapljice, narejene iz alginata in pektina, z dodanim ekstraktom granatnega jabolka. Vrednost pH ima pomemben vpliv na stabilnost polimerov, tako na alginat kot na pektin ter tudi na stabilnost ekstrakta granatnega jabolka, še posebej na antocianine v njem. Pri nizkem pH raztopine sta alginat in pektin bolj stabilna. V kislem mediju alginatna raztopina preide iz sol v gel stanje in nastane gel, ki je stabiliziran z intramolekularnimi vodikovimi vezmi (Smrdel in sod., 2008). Tudi pri pektinu največjo stabilnost dosežemo v kislem pH (4,0), medtem ko je v bazičnem okolju nestabilen (Srivastava in Malviya, 2011). Če primerjamo sliki 24 in 25, lahko sklepamo, da nevtralen pH (7,0) ni primeren za kapsulacijo. Kajti opazimo lahko, da smo z ABTS-metodo določili samo 80 % nekapsuliranega ekstrakta v 0,1 M raztopini CaCl<sub>2</sub> s pH 7,0. Posledično je delež sproščenega ekstrakta granatnega jabolka iz mikrokapsul nižji. Na podlagi barve 0,1 M CaCl<sub>2</sub> s pH 7,0 sklepamo, da se z ekstraktom v nevtralnem mediju nekaj dogaja. Antocianini so prešli v drugačno obliko. Antocianini so

pri pH 3,5 bolj stabilni, medtem ko se pri višjih pH razgradijo in s tem se zmanjša njihova biorazpoložljivost (Akhavan-Mohdavi in Mahdi-Jafari, 2014). To prikazuje slika 26, kjer je v levi časi ekstrakt granatnega jabolka v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> s pH 7,0, v desni časi pa ekstrakt granatnega jabolka v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> s pH 3,5 (T = 25 °C) (koncentracija ekstrakta je v obeh primerih enaka). 0,1 M CaCl<sub>2</sub> s pH 7,0 (T = 25 °C) smo v nadelavanju eksperimentalnega dela izločili, saj ni primeren za kapsuliranje ekstrakta granatnega jabolka.

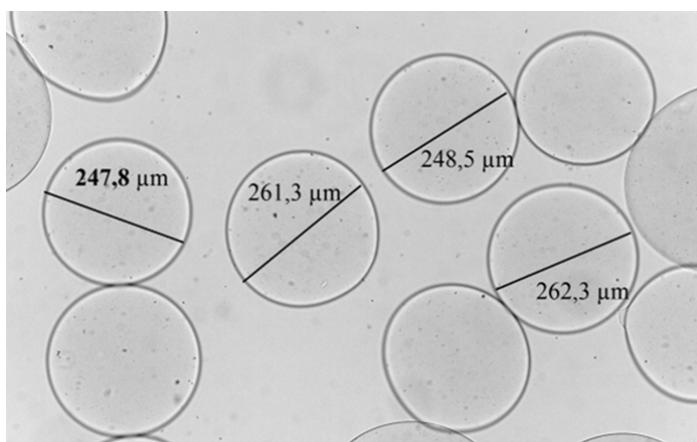
Osredotočili smo se na 0,1 M CaCl<sub>2</sub> s pH 3,5, pri katerem se je največ ekstrakta granatnega jabolka sprostilo iz mikrokapsul, narejenih izključno iz raztopine alginata in mešanice alginata in pektina v razmerju 1 : 1, kar 90 %. Najmanj se ga je sprostilo iz mikrokapsul, narejenih iz mešanice alginata in pektina v razmerju 7 : 3, približno 75 %. Do podobnih zaključkov so prišli tudi Zam in sodelavci (2013), ki so določili, da so bolj stabilne mikrokapsule narejene iz mešanice alginata in pektina v razmerju 2 : 1 kot pa 1 : 1 ali iz samo enega samega polimera.

#### 4.4 IZBIRA OPTIMALNIH PARAMETROV ZA IZDELAVO MIKROKAPSUL Z EKSTRAKTOM GRANATNEGA JABOLKA

Po mnogih poskusih in primerjavah smo določili, da je najbolj primerna kombinacija za izdelavo mikrokapsul z ekstraktom granatnega jabolka 2 % mešanica alginata in pektina v razmerju 7 : 3, pri čemer je pH raztopine 0,1 M CaCl<sub>2</sub> 3,5, pri temperaturi 25,0 °C. Naredili smo dva poskusa, in sicer iz mešanice alginata in pektina v razmerju 7 : 3 ter podali povprečja, in poskus samo z alginatom, ki nam je služil kot dokaz, da je kombinacija materialov ustreznejša. Pri izdelavi mikrokapsul smo uporabili 120 µm veliko šobo, s katero smo pripravili 240–290 µm velike mikrokapsule. Z 80 µm šobo lahko naredimo manjše mikrokapsule, ampak smo se pri tem soočali s težavo zamašitve, ki nam je pri samih poskusih povzročala preglavice. Za prikaz rezultatov smo uporabili več metod, na podlagi katerih smo izračunali odstotek sproščanja ekstrakta granatnega jabolka v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> s pH 3,5 (T = 25 °C): ABTS za merjenje antioksidativne aktivnosti, Folin-Ciocalteu metodo za merjenje skupnih fenolnih spojin, HPLC-metodo za merjenje posameznih antocianinov in spektrofotometrično metodo za merjenje skupnih antocianinov. Metode smo med samo tudi primerjali.

Preglednica 17: Parametri na mikrokapsulatorju pri izdelavi »optimalnih« mikrokapsul.

Razmerje polimerov	Alginat (1 : 0)	Alginat-pektin (7 : 3)
Pretok tekočine (mL/min)	2,85	3,00
Frekvence (Hz)	3900	3900
Napetost (V)	2000	1800
Velikost šobe (µm)	120	120
Velikost kapsul (µm)	230–266	240–280



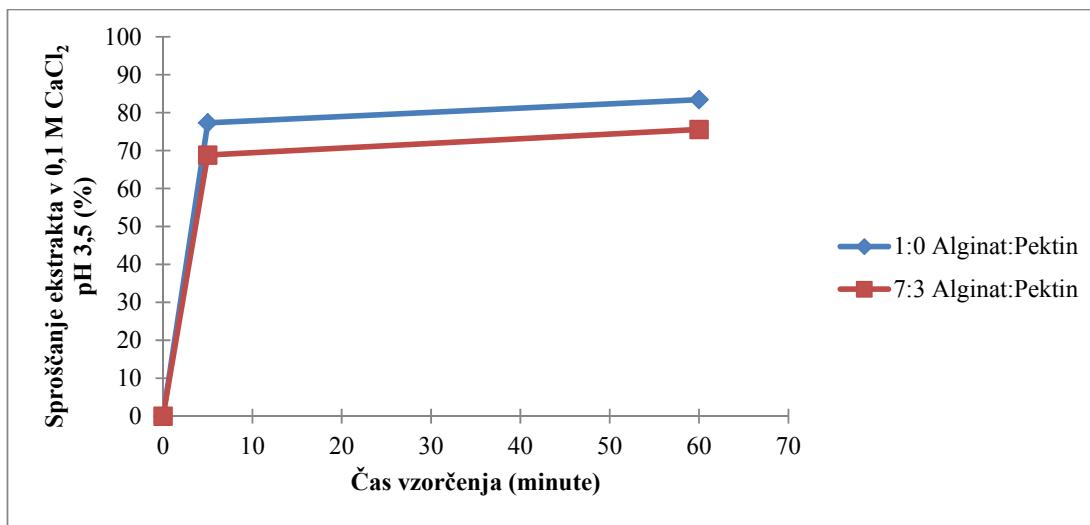
Slika 27: Mikrokapsule, pripravljene iz 2 % mešanice alginata in pektina v razmerju 7 : 3, posnete pod mikroskopom pri 100-kratni povečavi.

#### 4.4.1 Merjenje antioksidativne aktivnosti ekstrakta granatnega jabolka v 0,1 M

##### **CaCl<sub>2</sub> z ABTS-metodo**

Preglednica 18: Sproščanje ekstrakta granatnega jabolka iz mikrokapsul, pripravljenih iz 2 % raztopine alginata in 2 % mešanice alginata in pektina v razmerju 7 : 3, z uporabo 120 µm šobe, v odvisnosti od časa vzorčenja. Sproščanje antioksidativne aktivnosti smo določili z ABTS-metodo (pH 3,5; T = 25 °C).

Čas vzorčenja (min)	Sproščanje Alginat (%)	Sproščanje Alginat-pektin (%)
0	0	0
5	77	69
60	83	76



Slika 28: Delež sproščenega ekstrakta granatnega jabolka v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pH 3,5; T = 25,0 °C) iz kapsul v odvisnosti od časa vzorčenja.

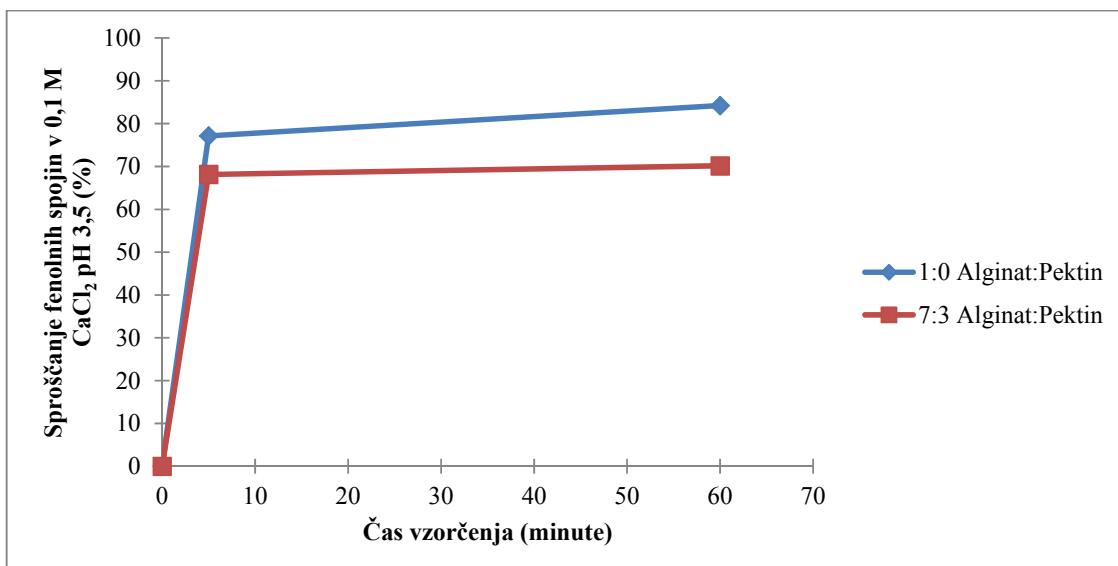
Antioksidativno aktivnost aktivnih spojin iz ekstrakta granatnega jabolka smo določali v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pH 3,5; T = 25 °C) z metodo ABTS. Več ekstrakta kot se je sprostilo iz mikrokapsul v 0,1 M CaCl<sub>2</sub>, tem večja je bila antioksidativna aktivnost.

Slika 28 prikazuje graf, iz katerega je razviden delaž sproščenega ekstrakta granatnega jabolka iz mikrokapsul narejenih iz 2 % alginata in 2 % mešanice alginata in pektina v razmerju 7 : 3. Iz mikrokapsul, narejenih iz alginata, se je sprostilo več ekstrakta granatnega jabolka kot iz mikrokapsul, narejenih iz mešanice alginat-pektina, kar smo tudi pričakovali. Iz kapsul, narejenih iz mešanice alginata, se je v eni uri sprostilo 76 % ekstrakta granatnega jabolka. Iz alginatnih mikrokapsul pa v eni uri 83 % ekstrakta granatnega jabolka.

#### 4.4.2 Določanje skupnih polifenolnih spojin s Folin-Ciocalteu metodo

Preglednica 19: Sproščanje polifenolnih spojin granatnega jabolka iz mikrokapsul, pripravljenih iz 2 % raztopine alginata in 2 % mešanice alginata in pektina v razmerju 7 : 3, z uporabo 120 µm šobe, v odvisnosti od časa vzorčenja.

Čas vzorčenja (min)	Sproščanje Alginat (%)	Sproščanje Alginat-pektin (%)
0	0	0
5	77	68
60	84	70

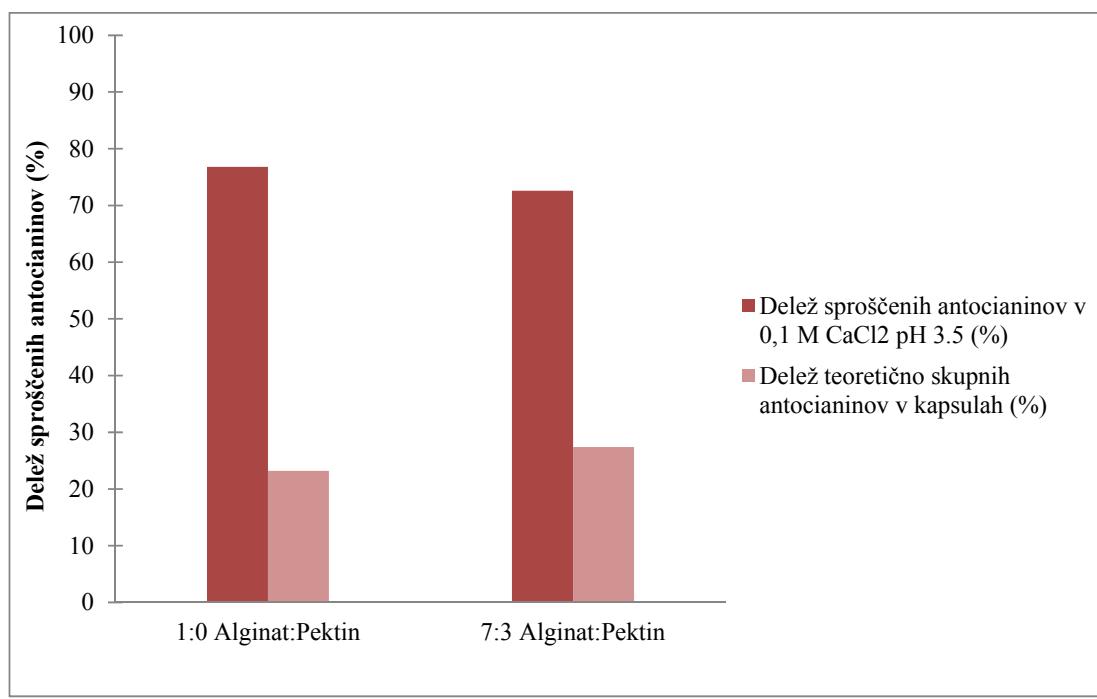


Slika 29: Delež sproščenih polifenolnih spojin iz mikrokapsul v 0,1 M CaCl<sub>2</sub>, s pH 3,5 pri T = 25 °C v odvisnosti od časa vzorčenja.

Polifenolne spojine v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pH 3,5; T = 25 °C) smo določili s Folin-Ciocalteujevim reagentom. Polifenolne spojine ekstrakta granatnega jabolka so se v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> s pH 3,5 sprostile iz mikrokapsul.

Slika 29 prikazuje delež sproščenih polifenolnih snovi ekstrakta granatnega jabolka v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pH 3,5; T = 25 °C). Razvidno je, da se iz mikrokapsul, narejenih izključno iz alginata, že v petih minutah sprosti 77 % polifenolnih spojin, po eni uri pa se iz njih sprosti 85 %, kar je, v primerjavi z mikrokapsulami, narejenimi iz mešanice alginat-pektina, bistveno več. Iz mikrokapsul mešanice alginat-pektina (7 : 3) se namreč po petih minutah sprosti 68 %, po eni uri pa 70 % polifenolnih spojin.

#### 4.4.3 HPLC-metoda



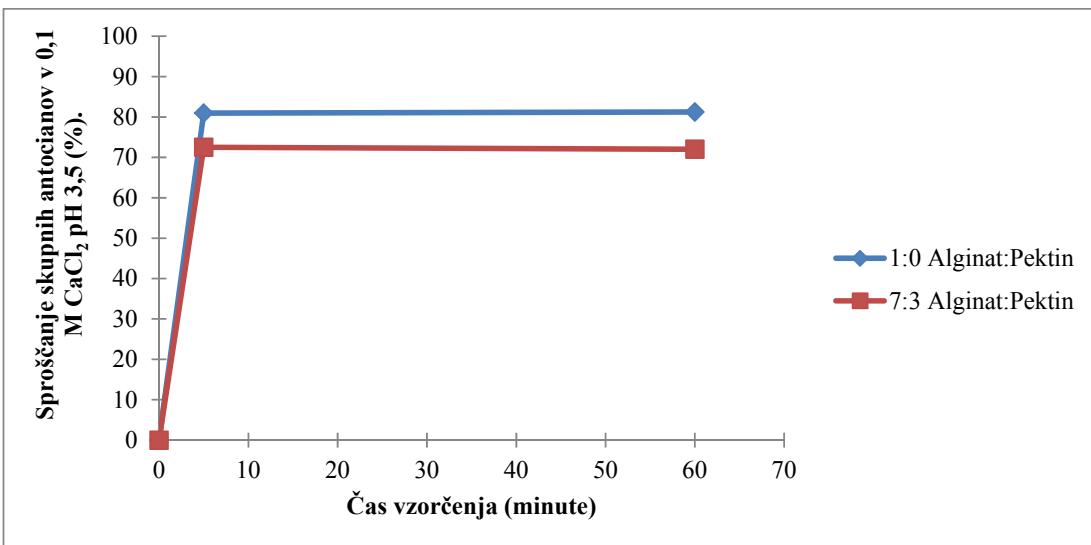
Slika 30: Delež sproščenih skupnih antocianinov v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> s pH 3,5 (T = 25 °C), ki smo jih detektirali s HPLC-metodo, in odstotek skupnih antocianinov, ki so teoretično še ostali v mikrokapsulah.

S HPLC-metodo smo analizirali sproščanje ekstrakta granatnega jabolka v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pH 3,5; T = 25 °C), saj smo hoteli določiti posamezne antocianine. Zgornji graf prikazuje delež skupnih antocianinov v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pH 3,5; T = 25 °C) in koliko jih naj bi še teoretično ostalo v samih kapsulah. Iz grafov je razvidno, da se je približno 77 % antocianinov sprostilo iz mikrokapsul, narejenih izključno iz alginata. Iz mikrokapsul, narejenih iz mešanice polimerov alginata in pektina, se je sprostilo 73 % antocianinov, v kapsulah jih je potem takem ostalo 27 %.

#### 4.4.4 Spektrofotometrično določanje skupnih antocianinov

Preglednica 20: Sproščanje skupnih antocianinov granatnega jabolka iz mikrokapsul, pripravljenih iz 2 % raztopine alginata in 2 % mešanice alginata in pektina v razmerju 7 : 3, z uporabo 120 µm šobe, v odvisnosti od časa vzorčenja.

Čas vzorčenja (min)	Sproščanje Alginat (%)	Sproščanje Alginat-pektin (%)
0	0	0
5	81	73
60	81	72

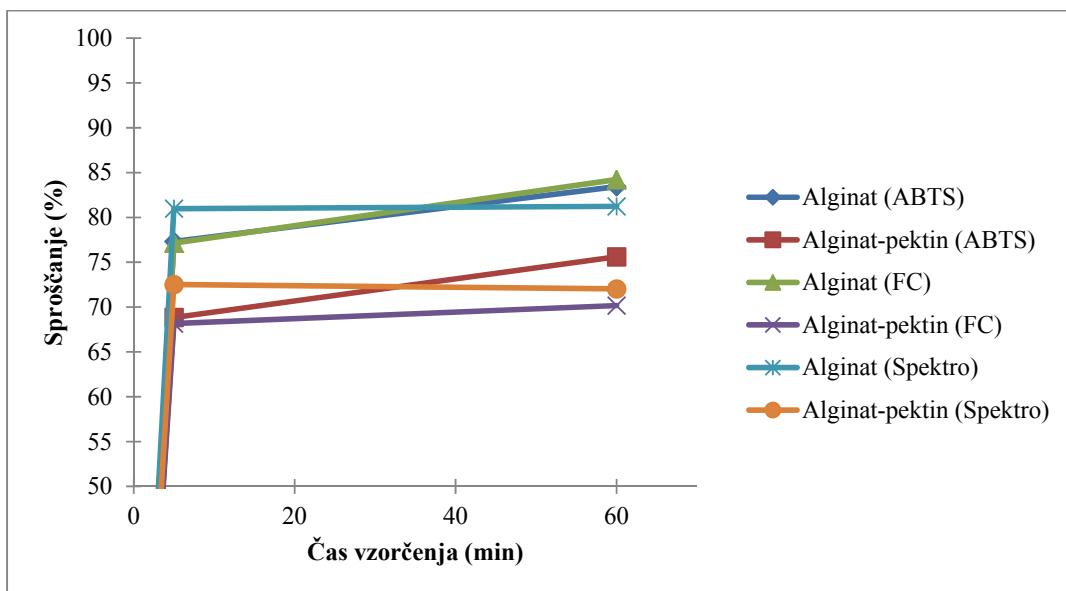


Slika 31: Delež sproščenih skupnih antocianinov v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> s pH 3,5 odvisno od časa vzorčenja.

Skupne antocianine v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pH 3,5; T = 25 °C) smo določili s spektrofotometrično metodo, povzeto po Lee in sodelavcih (2005).

Slika 31 nam prikazuje delež sproščenih skupnih antocianinov v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pH 3,5; T = 25 °C) po mikrokapsuliraju. Največ antocianinov se je sprostilo iz mikrokapsul, pripravljenih izključno iz alginata, približno 80 %. Iz mikrokapsul, narejenih iz mešanice alginat-pektina, se je sprostilo manj – 73 %. Razvidno je, da sproščanje antocianinov ni odvisno od časa, kajti že po petih minutah se je sprostila enaka količina antocianinov v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pH 3,5; T = 25 °C) kot v eni uri. Med samim poskusom smo opazili, da je bila raztopina 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pH 3,5; T = 25 °C) bolj rožnato obarvana kot same mikrokapsule, ki so bile bele oz. prozorne. Po barvi sodeč menimo, da se je veliko ekstrakta granatnega jabolka sprostilo iz mikrokapsul.

#### 4.4.5 Primerjava ABTS, Folin-Ciocalteu in spektrofotometrične metode



Slika 32: Primerjava sproščanja ekstrakta granatnega jabolka iz mikrokapsul, ki smo ga določili z ABTS, Folin-Ciocalteu in spektrofotometrično metodo.

Preglednica 21: Delež sproščenega ekstrakta granatnega jabolka v  $\text{CaCl}_2$  (pH 3,5; T = 25 °C), določnega z ABTS, Folin-Ciocalteu in spektrofotometrično metodo, in delež teoretično določenega ekstrakta v mikrokapsulah.

Metoda	ABTS		Folin-Ciocalteu		Spektrofotometrično	
<b>Poskus</b>	A	AP	A	AP	A	AP
V $\text{CaCl}_2$ (%)	83,4	75,6	84,2	70,2	81,2	72,0
<b>Teoretično v mikrokapsulah (%)</b>	16,6	24,4	15,8	29,8	18,8	28

Legenda: A=alginat, AP=alginat-pektin

Slika 32 prikazuje primerjavo deležev sproščanja, določenih s tremi metodami: ABTS, Folin-Ciocalteu in spektrofotometrično. Rezultati vseh treh metod so pokazali, da se največ ekstrakta izloči iz kapsul, narejenih iz alginata, približno med 80 in 85 %. Iz mikrokapsul, narejenih iz mešanice polimerov alginata in pektina, se v povprečju sprosti od 70 do 76 % ekstrakta, kar je za 10 % manj kot v primerjavi s kapsulami, narejenimi izključno iz alginata. V preglednici 21 so za lažjo predstavo prikazani deleži sproščenega ekstrakta granatnega jabolka v 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  (pH 3,5; T = 25 °C), ki smo jih določili z metodami. Teoretično smo izračunali odstotek ekstrakta, ki naj bi še ostal v mikrokapsulah. Predvidevamo, da je najmanj ekstrakta granatnega jabolka ostalo v alginatnih mikrokapsulah – približno 17 %, v alginat-pektinskih mikrokapsulah pa med 25 in 30 %. Povsem natančno, koliko ekstrakta granatnega jabolka naj bi bilo v mikrokapsulah, nismo mogli določiti. Poskusili smo z mnogimi metodami (mikrovalovi, ultrazvočna kopel,

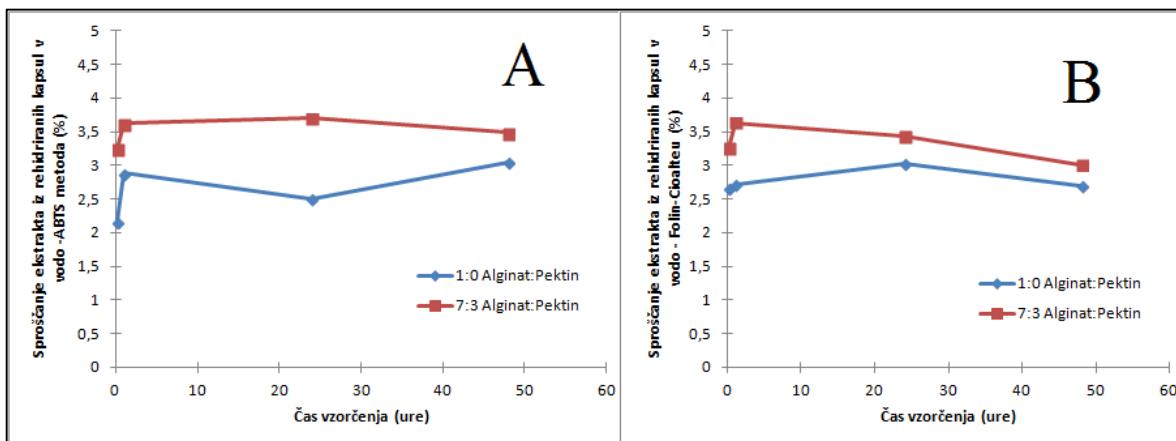
soniciranje in raztopina NaOH), ki pa žal niso bile uspešne. V nadaljevanju (4.5) so predstavljeni rezultati, kjer smo poskusili z liofilizacijo in ponovno hidracijo mikrokapsul.

#### 4.5 DOLOČITEV EKSTRAKTA GRANATNEGA JABOLKA V MIKROKAPSULAH PO LIOFILIZACIJI

Po pripravi mikrokapsul smo le-te zbrali v 50 mL falkonko in odstranili CaCl<sub>2</sub>, kolikor smo največ lahko, ter jih dvakrat sprali z milliQ vodo. Nato smo mikrokapsule zamrznili z dušikom in liofilizirali. Po enem mesecu smo jih ponovno hidrirali s 50 mL milliQ vode.

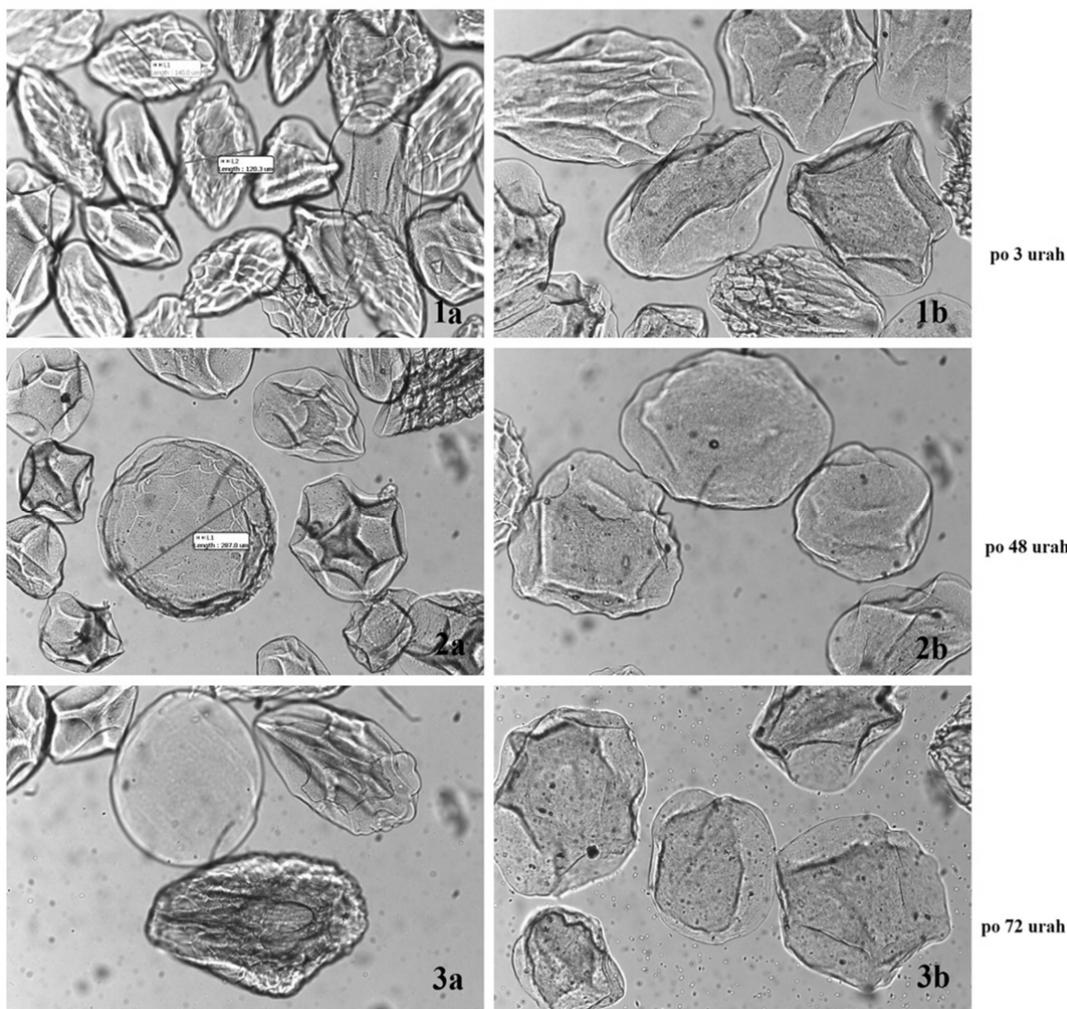
Preglednica 22: Delež sproščenega ekstrakta granatnega jabolka iz liofiliziranih in rehidriranih mikrokapsul po 15, 60, 1440 in 2880 minutah, določenega z metodama ABTS in Folin-Ciocalteu.

Čas vzorčenja (h)	ABTS		Folin-Ciocalteu		
	Poskus	Alginat	7 : 3 Alginat-Pektin	Alginat	7 : 3 Alginat-Pektin
0,25		2,17	3,24	2,66	3,25
1		2,88	3,62	2,72	3,64
24		2,50	3,70	3,02	3,43
48		3,04	3,49	2,70	3,01



Slika 33: Delež sproščanja antioksidativne aktivnosti iz liofiliziranih in rehidriranih mikrokapsul odvisen od časa vzorčenja (T = 25 °C). Antioksidativna aktivnost, določena po ABTS-metodi (A) in po Folin-Ciocalteu metodi (B).

Graf A na sliki 33 prikazuje deleže določene antioksidativne aktivnosti v milliQ vodi, določene z ABTS-metodo po rehidraciji mikrokapsul, graf B pa delež sproščenih fenolnih spojin iz rehidriranih mikrokapsul, določenih s Folin-Ciocalteu metodo. Vzorčenje je potekalo po 15, 60, 1440 in 2880 minutah rehidracije. Spiranje ekstrakta granatnega jabolka je bilo zelo majhno, in sicer 2,5–4 % v obeh primerih.

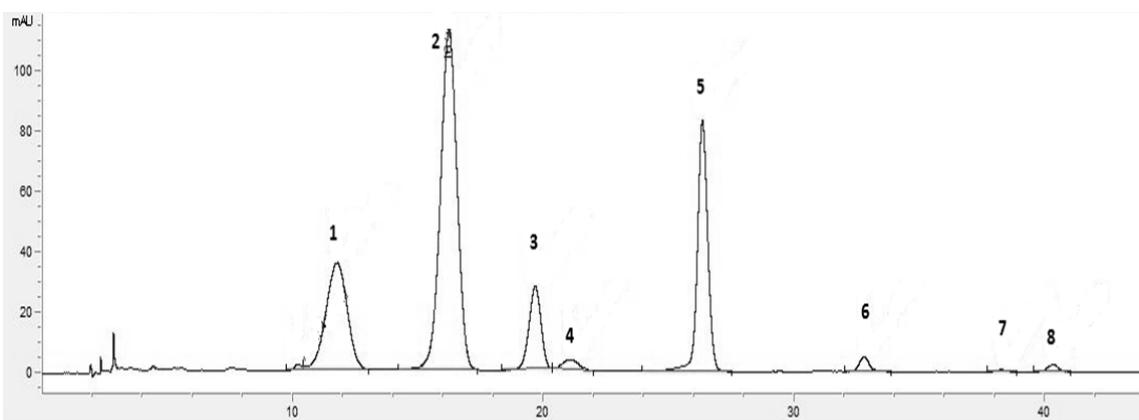


Slika 34: Prikaz mikrokapsul po liofilizaciji in rehidraciji po 3, 48 in 72 urah. Pod oznako 1a-3a so mikrokapsule iz alginata, pod 1b-3b pa mikrokapsule, pripravljene iz mešanice alginat-pektina.

Slika 34 prikazuje mikrokapsule, posnete pod svetlobnim mikroskopom pri 100-kratni povečavi. Mikrokapsule so bile liofilizirane in nato ponovno rehidrirane v milliQ vodi. Zgornji dve sliki (1a in 1b) prikazujeta mikrokapsule po treh urah rehidracije. Razvidno je, da so kapsule nepravilnih oblik in skrčene, iz česar sklepamo, da niso dovolj namočene z vodo. Sliki 2a in 2b predstavljata mikrokapsule po 48 urah rehidracije. Pod oznako 3a in 3b so mikrokapsule po 72 urah v vodi. Opazimo, da so oblike mikrokapsul bolj okrogle in manj izsušene, ampak vseeno nimajo takšne oblike kot na začetku, ko so bile homogene okrogle oblike.

#### 4.6 DOLOČANJE POSAMEZNIH ANTOCIANINOV S HPLC-METODO

S HPLC smo določili profil in posamezne antocianine v ekstraktu granatnega jabolka, ki smo ga uporabili v našem eksperimentalnem delu.



Slika 35: Kromatogram antocianinov v granatnem jabolku naših vzorcev.

Kromatogram na sliki 35 prikazuje profil antocianinov v ekstraktu granatnega jabolka. Analiza je pokazala isti profil antocianinov pri vseh vzorcih, razlike so samo v njihovi v količini. Na podlagi ujemanja retencijskih časov standardov in podatkov iz literature smo določili 8 antocianinov, kot so cianidin-di-glukozid, cianidin-3-glukozid delphinidin-di-glukozid, delphinidin-3-glukozid, pelargonidin-di-glukozid, delphinidin klorid, cianidin-arabinozid in/ali cianidin-ksilozid ter malvidin-3-glukozid. Kateri vrh pripada kateremu antocianinu, je predstavljeno v preglednici 23. Z zvezdico (\*) so označeni antocianini, katerih s standardi nismo mogli določiti s HPLC-analizo, smo jih pa poskusili določiti s pomočjo literature.

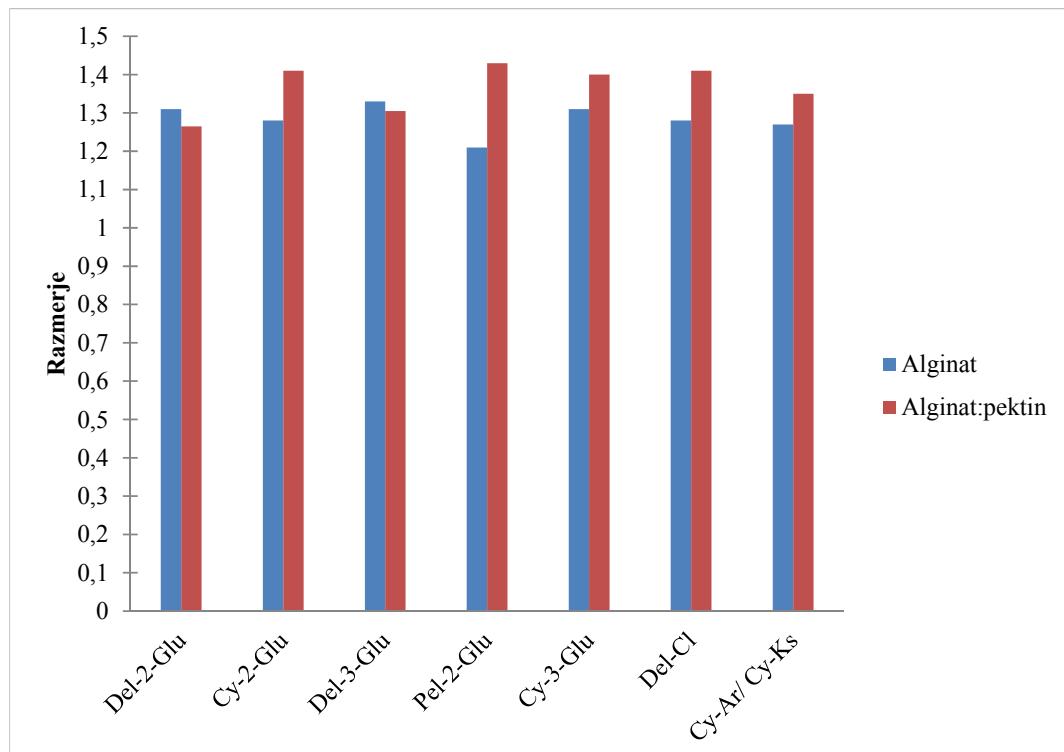
Preglednica 23: Številke pikov na kromatogramu in ime identificiranega antocianina s kraticami.

Številka pika	Identificiran antocianin
1	delphinidin-di-glukozid* (Del-2-Glu)
2	cianidin-di-glukozid* (Cy-2-Glu)
3	delphinidin-3-glukozid (Del-3-Glu)
4	pelargonidin-di-glukozid* (Pel-2-Glu)
5	cianidin-3-glukozid (Cy-3-Glu)
6	delphinidin klorid (Del-Cl)
7	cianidin-arabinozid ali cianidin-ksilozid* (Cy-Ar ali (Cy-Ks))
8	malvidin-3-glukozid (Mal-3-Glu)

\*najverjetneje

Preglednica 24: Razmerja med posameznimi antocianini v analiziranem soku in 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pH 3,5; T = 25 °C) v različnih poskusih.

Antocianin	Del-2-Glu	Cy-2-Glu	Del-3-Glu	Pel-2-Glu	Cy-3-Glu	Del-Cl	Cy-Ar/Cy-Ks	Mal-3-Glu
Alginat	1,31	1,28	1,33	1,21	1,31	1,28	1,27	1,27
Alginat-pektin	1,265	1,41	1,305	1,43	1,4	1,41	1,35	1,265

Slika 36: Graf razmerij med posameznimi antocianini v soku granatnega jabolka in 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pH 3,5) po kapsulaciji. Del-2-Glu: delfinidin-di-glukozid, Cy-2-Glu: cianidin-di-glukozid, Del-3-Glu: delfinidin-3-glukozid, Pel-2-Glu: pelargonidin-di-glukozid, Cy-3-Glu: cianidin-3-glukozid, Del-Cl: delfinidin klorid, Cy-Ar/Cy-Ks: cianidin-arabinozid ali cianidin-ksilozid.

Slika 36 in preglednica 24 prikazujeta razmerja med posameznimi antocianini v soku granatnega jabolka in posameznimi antocianini, ki smo jih določili v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pH 3,5; T = 25 °C) posameznih poskusov. Želeli smo ugotoviti, ali se razmerje ohranja, ali ostane kakšen antocianin bolj vezan kot drug, ali pa se vsi enako vežejo. Pri poskusu s alginat-pektinom je razmerje večje, kar je pričakovano, saj se je iz teh mikrokapsul sprostilo manj ekstrakta granatnega jabolka v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pH 3,5; T = 25 °C). Omenimo lahko, da je iz grafa razvidno, da se delfinidin-di-glukozid in delfinidin-3-glukozid manj vezeta kot pa ostali antocianini v poskusu mešanice alginat-pektina v primerjavi z alginatnimi kapsulami, kjer se razmerje bolj vidno ohranja.

## 5 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov pri izdelavi mikrokapsul z ekstraktom granatnega jabolka ne moremo potrditi vseh treh delovnih hipotez:

- Hipoteza 1: V okviru poskusa smo uporabili dva polisaharida, alginat in pektin. Osredotočili smo se na izdelavo mikrokapsul izključno iz alginata in mešanice alginata in pektina v različnih razmerjih. Na začetku magistrske naloge smo predvidevali, da bodo kombinacije polisaharidov primernejše. To lahko tudi potrdimo, saj so rezultati pokazali, da so mikrokapsule, narejene iz mešanice alginat-pektina, bolj stabilne kot mikrokapsule, narejene izključno iz alginata. Vse štiri metode, s katerimi smo določali sproščanje, so to tudi potrdile. Pri tem je potrebno omeni tudi, da vsa razmerja mešanice alginat-pektina niso bila primerna. Optimalna kombinacija oz. razmerje mešanice alginat-pektina je bila 70 % alginata in 30 % pektina. Če je bil odstotek pektina večji (npr. 80 %), se je površina kapsule nagubala in s tem postala nestabilna.
- Hipoteza 2: Pri pripravi mikrokapsul smo se osredotočili na velikosti šob 80 in 120  $\mu\text{m}$ , pri katerih velja, da je velikost kapsul približno enaka dvakratni velikosti šob. V tem primeru teoretično približno 160–240  $\mu\text{m}$ . Predvidevali smo, da bo najprimernejša velikost mikrokapsul 20–200  $\mu\text{m}$ . To hipotezo lahko delno potrdimo. Pri samem eksperimentalnem delu smo naredili nekaj poskusov z 80  $\mu\text{m}$  šobo in naredili kapsule, ki so manjše od 200  $\mu\text{m}$  ter so v primerjavi z mikrokapsulami, narejenimi s 120  $\mu\text{m}$  šobo, manjše za približno 100  $\mu\text{m}$ . Manjše kapsule so glede na stabilnost in sproščanja ekstrakta boljše, saj se iz teh kapsul sprosti manj ekstrakta. Problem, ki smo ga imeli pri pripravi mikrokapsul z 80  $\mu\text{m}$  šobo, je bila zamašitev šobe, zato smo se pri poskusu »optimalnih« pogojev osredotočili na 120  $\mu\text{m}$  šobo. Velikosti kapsul so bile od približno 240 do 290  $\mu\text{m}$ .
- Hipoteza 3: Predvidevali smo, da bomo naredili stabilne mikrokapsule z ekstraktom granatnega jabolka, ki bi jih lahko dodali v matrico testnega živila, in ugotavliali, če se mu podaljša obstojnost. To hipotezo ne moremo popolnoma potrditi, ker nismo naredili mikrokapsul, ki bi zadržale vsaj 50 % ekstrakta. V kapsulah nam je uspelo zadržati le približno 30 % ekstrakta granatnega jabolka.

Poleg že zapisanih lahko iz rezultatov oblikujemo še naslednje sklepe:

- Na stabilnost mikrokapsul z ekstraktom granatnega jabolka vpliva pH vrednost raztopine  $\text{CaCl}_2$ . Pri kislem pH (3,5) so alginat, pektin, polifenolne spojine in antocianini stabilnejši.
- Po liofilizaciji in ponovi rehidraciji se je tudi po dveh dneh rehidracije sprostilo v milliQ vodo zelo malo ekstrakta, zato sklepamo, da se iz kapsul tudi po tolikšnem času ni sprostilo veliko ekstrakta. Oblika mikrokapsul po liofilizaciji in rehidraciji po 72 urah ni enaka njihovi prvotni obliki.
- Profil antocianinov se pri uporabi različnih polimerov ne spremeni, spremeni se samo količina posameznih antocianinov. Sklepamo pa, da se delfinidin-di-glukozid in delfinidin-3-glukozid v kapsulah mešanice alginat-pektina manj vežeta kot pa v kapsulah, narejenih izključno iz alginata.

## 6 POVZETEK

Mikrokapsuliranje je proces, kjer eno snov obdamo z drugo snovjo in pri tem nastanejo delci na mikrometrskem nivoju. Namen mikrokapsuliranja aktivnih snovi je zaščita pred zunanjimi vplivi, kot so kisik, voda, svetloba, pH, temperatura itd., ter vključevanje mikrokapsul v živila. Kot aktivno snov smo uporabili ekstrakt granatnega jabolka. Ekstrakt je bogat vir polifenolnih spojin in antocianinov, ki se lahko uporablajo kot naravne komponente v živilih. Polifenolne spojine s svojo antioksidativno lastnostjo vplivajo na preprečevanje oksidacije maščobe in s tem se podaljša obstojnost živila.

V prvem delu magistrske naloge smo naredili veliko poskusov priprave mikrokapsul iz alginata in mešanice alginat-pektina, pri tem smo spoznali delovanje mikrokapsulatorja B395-Pro. Obliko in velikost mikrokapsul smo določili s pomočjo svetlobnega mikroskopa in programa MODIC. Primerne velikosti mikrokapsul za vgrajevanje ekstrakta granatnega jabolka smo naredili z uporabo 80 in 120 µm velikima šobama. Velikosti mikrokapsul, ki so bile narejene z 80 µm šobo, so bile v obsegu od 110 do 185 µm, velikosti s 120 µm šobo pa v območju od 230 do 290 µm. Ugotovili smo, da vsa razmerja mešanice alginat-pektina niso primerna za kapsuliranje. Primerna so razmerja, kjer prevladuje alginat. Že iz slik smo lahko opazili nagubanost površine mikrokapsul, kjer je prevladoval pektin, kar posledično vpliva na nestabilnost mikrokapsul.

V drugem delu magistrske naloge smo v polimer alginat in mešanico polimera vključili ekstrakt granatnega jabolka ter naredili mikrokapsule v 0,1 M CaCl<sub>2</sub>. Z ABTS-metodo smo določili antioksidativno aktivnost v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pH 5,5) in pri tem določili, koliko ekstrakta granatnega jabolka se je sprostilo iz mikrokapsul. S tem smo hoteli dokazati, ali so uporabljeni polimeri in uporabljeni razmerja med polimeri primerna, za pripravo stabilnih kapsul. Določili smo, da je mešanica polimerov alginat-pektina v razmerju 7 : 3 najbolj primerna za kapsuliranje ekstrakta granatnega jabolka. Kajti v primerjavi z mikrokapsulami, narejenimi izključno iz alginata, se je sprostilo približno 10 % več ekstrakta kot iz mikrokapsul, narejenih iz mešanice. Pomemben vpliv na določitev antioksidativne aktivnosti je imel tudi pH CaCl<sub>2</sub>. Poskuse smo naredili v pH 3,5 in pH 7,0. Pri pH 7,0 je stabilnost antocianinov in polimerov (alginata in pektina) manjša, saj so vsi stabilni v kislem mediju.

Pri izdelavi »optimalnih« mikrokapsul smo določali antioksidativno aktivnost z ABTS-metodo, skupne polifenolne spojine s Folin-Ciocalteu metodo, posamezne antocianine s HPLC-metodo in skupne antocianine z spektrofotometrično metodo. Iz omenjenih metod smo določili tudi sproščanje ekstrakta granatnega jabolka iz mikrokapsul v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pH 3,5; T = 25 °C). S tem smo opredelili, ali so bile mikrokapsule stabilne ali ne. Z vsemi štiri metodami smo potrdili, da je kombinacija polimerov primernejša oz. stabilnejša za vključevanje ekstrakta v mikrokapsule.

Zanimalo nas je, ali se v liofiliziranih kapsulah ekstrakt ohrani. Naredili smo poskus, kjer smo mikrokapsule, ki so bile narejene v »optimalnih« poskusih, zbrali ter jih liofilizirali. Po dobrem mesecu shrambe mikrokapsul v zamrzovalniku smo jih ponovno hidrolizirali z milliQ vodo. Z ABTS in Folin Ciocalteu metodo smo določali antioksidativno aktivnost in fenolne spojine v vodi. Sproščanje je bilo zelo nizko, kar lahko nakazuje, da se ekstrakt ni sprostil ali smo ga izgubili tekom poskusa.

Z metodo HPLC smo določili profil ekstrakta granatnega jabolka, ki se je sprostil iz mikrokapsul v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pH 3,5; T = 25 °C). Profil vseh vzorcev je bil podoben, spremenjala se je samo velikost vrhov. S pomočjo retencijskih časov standardov smo lahko potrdili 4 antocianine: delfinidin-3-glukozid, cianidin-3-glukozid, delfinidin klorid in malvidin-3-glukozid.

Namen magistrskega dela je bil tudi, da narejene mikrokapsule vključimo v matrico izbranega živila (v našem primeru navadni jogurt). Pri tem bi spremljali, ali imajo kakšen vpliv na podaljšanje obstojnosti ali ne, ter tudi če lahko te mikrokapsule uporabimo kot naravno barvilo. Žal nismo naredili tako stabilnih mikrokapsul in tega dela eksperimenta nismo izvedli.

## 7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L., (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23–32
- Akhavan-Mahdavi S., Mahdi-Jafari S. 2014. Microencapsulation of anthocyanins by spray drying; a review. V: 1st International e-conference on novel food processing. Mashhad, 26-27 February 2013. Mashhad, Ferdowsi University of Mashhad: 14 str. [http://confbank.um.ac.ir/modules/conf\\_display/conferences/iecfp2013/240\\_2.pdf](http://confbank.um.ac.ir/modules/conf_display/conferences/iecfp2013/240_2.pdf) (oktober, 2014)
- Alborzi S. 2012. Encapsulation of fenolic acid in sodium alginate-pektin-poly (ethylene oxide) electrospun fibers to increase its stability. Doctoral Dissertation. Ontario, The University of Guelph, Food Science: 154 str.
- Audebrand M., Garnier C., Kolb M., Axelos M.A.V. 2003. Gelation of pectin-alginate mixture: ultrastructure and rheological properties. V: Proceedings of the 3rd international symposium on food rheology and structure, Zürich, 9-13 February 2003. Fischer P., Marti I., Windhab E.J. (eds.). Zürich, Swiss Federal Institute of Technology Zürich: 517–518
- Büchi. 2014. Encapsulator B-395 / B-395 Pro Laboratory Guide. Flawil, Büchi, Labortechnik AG: 60 str. [http://www.buchi.com/en/system/files/downloads/Encapsulator\\_Laboratory\\_Guide\\_en\\_A.pdf](http://www.buchi.com/en/system/files/downloads/Encapsulator_Laboratory_Guide_en_A.pdf) (April, 2014)
- Constantin O. E. 2012. Scientific report for exchange visit to the Department of food science and technology. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za biokemijo in kemijo živil: 4 str. (neobjavljeno)
- Deladino L., Anbinder P.S., Navarro A.S., Martino M.N. 2008. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. Carbohydrate Polymers, 71: 126–134
- El-Abbassi A., El-Fadeli S., El-Bouzidi L., Lahrouni M., Nauman K. 2014. Recent advances in microencapsulations of bioactive compounds. V: Recent progress in medicinal plants, Vol. 41: Analytical and processing techniques. Govil J.N. (ed.). New Delhi, Studium Press: 129-146

- Endo E. H., Ueda Nakamura T., Nakamura C. V., Filho B. P. D. 2012. Activity of spray-dried microparticles containing pomegranate peel extract against *Candida albicans*. *Molecules*, 17: 10094–10107
- Gadže J., Voća S., Čmelik Z., Mustać I., Ercisli S., Radunić M. 2012. Physico-chemical characteristics of main pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in dalmatia region of Croatia. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 85: 202–206
- Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 58: 966–968
- Kač M., Jurca S. 1994. Pektin – kemijske in fizikalne lastnosti, uporaba v živilstvu. V: Aditivi – 'Dodatki-Tehnologija-Zdravje'. 16. Bitenčevi živilski dnevi, Bled, 9. in 10. junij 1994. Raspored P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 229–232
- Kunz B., Krückeber S., Weißbrodt J. 2003. Chancen und Grenzen der Mikroverkapselung in der modernen Lebensmittelverarbeitung. *Chemie Ingenieur Technik*, 75, 11: 1733–1740
- Lee J., Durst R.W., Wrolstad R.E. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88, 5: 1269–1278
- Lupo B., Maestro A., Porras M., Gutierrez J.M. 2013. Preparation of alginate microspheres by emulsification/internal gelation to encapsulate cocoa polyphenols. *Food Hydrocolloids*, 38: 56–65
- MacLean D., Martino K., Scherm H., Horton D., Westerfield B. 2014. Pomegranate production. UGA extension: Circular 997. Georgia, University of Georgia: 12 str.  
<http://extension.uga.edu/publications/detail.cfm?number=C997> (oktober, 2014)
- Nazzaro F., Orlando P., Fratianni F., Coppola R. 2012. Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 23: 182–186
- Nedović V., Kalušević A., Manojlović V., Lević S., Bugarski B. 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1: 1806–1815
- Pandel-Mikuš R., Poljšak B. 2005. Funkcionalna hrana v zdravi prehrani. *Obzornik zdravstvene nege*, 39: 201–207

Robert P., Gorena T., Romero N., Sepulveda E., Chavez J., Saenz C. 2010. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. International Journal of Food Science and Technology, 45: 1386–1394

Rudan-Tasič D. 2000. Vitamin C, vitamin E in koencim Q10. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 39–51

Oven P., Vek V., Poljanšek I. 2011. Flavonoidi lesa in drevesne skorje. Les, 63, 11-12: 412–417

Özkan G., Bilek S.E. 2014. Microencapsulation of natural food colourants. International Journal of Nutrition and Food Sciences, 3, 3: 145–156

Shipp J., Abdel-Aal E.M. 2010. Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. Open Food Science Journal, 4: 7–22

Smole Možina S., Istenič K., Poklar Ulrich N. 2012. Nanoinkapsuliranje v živilski industriji: materiali in primeri. V: Nanotehnologije in nanoživila. 27. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana 26. september 2012. Demšar L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 49–65

Smrdel P., Bogataj M., Mrhar A. 2008. Alginat v dostavnih sistemih s prirejenim sproščanjem. Farmacevtski vestnik, 59: 293–301

Srivastava P., Malviya R. 2011. Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry – An overview. Indian Journal of Natural Products and Resources, 2, 1: 10–18

Teixeira da Silva J.A., Rana T.S., Narzary D., Verma N., Meshram D.T., Ranade S.A. 2013. Pomegranate biology and biotechnology: A review. Scientia Horticulturae, 160: 87–107

Vidrih R., Kač M., 2000. Analitika antioksidatov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 101–114

- Viuda-Martos M., Fernandez-Lopez J., Perez-Alvarez J.A. 2010. Pomegranate and its many functional components as related to human health: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 6: 637–654
- Zam W., Bashour G., Abdelwahed W., Khayata W. 2013. Formulation and in-vitro release of pomegranate peels polyphenols microbeads. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 4, 9: 3536–3540
- Zarei M., Azizi M., Bashir-Sadr. Z. 2011. Evaluation of physicochemical characteristics of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit during ripening. *Fruits*, 66, 2: 121–129
- Zuidam N. J., Shimoni E. 2010. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. V: *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. Zuidam N.J., Nedović V.A. (eds.). New York, Springer: 3-29
- Zulueta A., Esteve M.J., Frigola A. 2008. ORAC and TEAC assays camparision to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114: 310–316
- Zvonar A., Gašperlin M., 2011. Pregled metod izdelave mikrokapsul za farmacevtsko uporabo. *Farmacevtski vestnik*, 62: 131–138

## ZAHVALA

»Ni dovolj samo vedeti;  
znanje je treba tudi uporabljati.  
Ni dovolj hoteti, treba je tudi narediti.«

(Johann Wolfgang von Goethe)

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Nataši Poklar Ulrich za strokovno pomoč, nasvete, pregledo in spodbudo pri nastajanju magistrske naloge

Hvala, recenzetki prof. dr. Tatjani Košmerl za hiter in temeljit pregled magistrske naloge.

Katji Istenič, Ajdi Ota in dr. Mihaeli Skrt, hvala za strokovno pomoč in nasvete pri izvedbi eksperimentalnega dela na katedri za Biokemijo in kemijo živil ter hvala tudi za moralno podporo.

Zahvaljujem se Lini Burkan Makivić, za hiter pregled virov in tehnični del magistrske naloge.

Hvala sošolcem, sošolkam, sostanovalкам in sostanovalcem za prijetnih 5 let študija, kjer smo doživeli veliko lepih in tudi težkih trenutkov. Hvala vam za vsa skupna doživetja, druženja, smeh in potovanja, zaradi katerih mi bo študij ostal v lepem spominu.

Posebna zahvala gre moji družini, ki mi je s finančno in moralno podporo omogočila brezskrben študij. Hvala za potrpežljivost, vzpodbudne besede, čustveno in moralno podporo.

Hvala tudi vsem najožjim sorodnikom in prijateljem, ki ste mi kakorkoli pomagali pri uresničitvi mojih želja. Hvala, ker ste mi v najtežjem trenutku v življenju stali ob strani in me podpirali pri nadaljevanju študija.