

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Steva M. Lević

**INKAPSULACIJA AROMA U KARNAUBA
VOSKU, ALGINATU I
POLIVINIL-ALKOHOLU**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF AGRICULTURE

Steva M. Lević

**AROMA ENCAPSULATION IN CARNAUBA
WAX, ALGINATE AND POLYVINYL
ALCOHOL**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

Mentor:

dr Viktor Nedović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije:

dr Mališa Antić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

dr Branko Bugarski, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Tehnološko-metalurški fakultet

dr Verica Đorđević, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu-Tehnološko-metalurški fakultet

dr Vladimir Pavlović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije:

Zahvaljujem se mentoru, profesoru Viktoru Nedoviću na pomoći i podršci koju mi je pružio u toku izrade teze. Takođe, zahvaljujem se članovima Komisije, profesorima dr Mališi Antiću, dr Branku Bugarskom, dr Vladimiru Pavloviću kao i dr Verici Đorđević na pomoći i podršci koju su mi pružili u toku izrade teze. Posebnu zahvalnost dugujem profesorima dr Vesni Rakić, dr Nevenki Rajić, dr Aleksandru Marinkoviću i dr Dušanu Mijinu na pomoći u eksperimentalnom delu rada. Želeo bih da se zahvalim i dr Tatjani Šolević Knudsen, dr Miodragu Mitriću, dr Nini Obradović i dr Ivani Pajić-Lijaković na pomoći u realizaciji eksperimenata i tumačenju rezultata. Veliku zahvalnost dugujem i dragim koleginicama i kolegama na Poljoprivrednom fakultetu i Tehnološko-Metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu na pomoći oko realizacije ovog rada. Zahvaljujem se Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Vlade Republike Srbije na finansijskoj podršci koja je realizovana preko finansiranja aktivnosti na projektima na kojima sam učestvovao. Konačno, veliko hvala na pomoći i podršci članovima moje porodice kao i svim ljudima koji su mi pomogli u toku rada na ovoj tezi.

SADRŽAJ

UVOD	1
1. TEORIJSKE OSNOVE	6
1.1. Teorijske osnove procesa inkapsulacije	6
1.1.1. Pojam, značaj i primena inkapsulacije	6
1.1.2. Metode i tehnike inkapsulacije	10
1.2. Materijali za inkapsulaciju	29
1.2.1. Alginat	32
1.2.2. Polivinil alkohol	38
1.2.3. Karnauba vosak	41
1.3. Inkapsulacija aroma	43
1.3.1. Arome-podela, karakteristike i značaj za prehrambenu industriju	43
1.3.2. Tehnike i materijali za inkapsulaciju aroma	46
2. CILJEVI	54
3. MATERIJALI I METODE	56
3.1. Inkapsulacija etil vanilina u karnauba vosku	56
3.2. Inkapsulacija etil vanilina u Ca-alginatu metodom elektrostatičke ekstruzije	59
3.3. Inkapsulacija etil vanilina u alginatu metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrosprej	62
3.4. Inkapsulacija arome kokosa i D-limonena u Ca-alginatu metodom elektrostatičke ekstruzije	65
3.5. Inkapsulacija etil vanilina u polivinil alkoholu metodom elektrostatičke ekstruzije	71
3.6. Inkapsulacija etil vanilina u polivinil alkoholu metodom elektrostatičke ekstruzije- elektrospining	73
3.7. Inkapsulacija etil vanilina u prethodno formirane filmove na bazi polivinil alkohola dobijene metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrospininga	76
4. REZULTATI I DISKUSIJA	78
4.1. Inkapsulacija etil vanilina u karnauba vosku	78
4.2. Inkapsulacija aroma u alginatu	88
4.2.1. Inkapsulacija etil vanilina u Ca-alginatu metodom elektrostatičke ekstruzije	88
4.2.2. Inkapsulacija etil vanilina u alginatu metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrosprej	94
4.2.3. Inkapsulacija arome kokosa i D-limonena u Ca-alginatu metodom elektrostatičke ekstruzije	105
4.3. Inkapsulacija etil vanilina u polivinil alkoholu	128
4.3.1. Inkapsulacija etil vanilina u polivinil alkoholu metodom elektrostatičke ekstruzije	128
4.3.2. Inkapsulacija etil vanilina u polivinil alkoholu metodom elektrostatičke ekstruzije- elektrospining	133
4.3.3. Inkapsulacija etil vanilina u prethodno formirane filmove na bazi polivinil alkohola dobijene metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrospininga	143
5. ZAKLJUČAK	150
LITERATURA	155
PRILOZI	171
BIOGRAFIJA AUTORA	185

SPISAK OZNAKA

d , prečnik kapi

d_0 , prečnik kapljice u odsustvu elektrostatičkog polja

$D_{b(\text{suve čestice})}$, prečnik čestica nakon sušenja

D_b , prečnik vlažnih čestica

d_c , unutrašnji prečnik igle

d_{\max} , maksimalni prečnik čestica

d_{\min} , minimalni prečnik čestica

DSC, diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

E, Inkapsulaciona efikasnost

FTIR, infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

GC/FID, Gasna hromatografija sa plameno-jonizujućim detektorom

GC/MS, Gasna hromatografija sa masenim detektorom

GuIA (G), α -L-guluronska kiselina

HPLC, tečna hromatografija visokog pritiska

k , parameter koji zavisi od vremena formiranja kapi i vremena adsorpcije polimera na površini kapi

k , kinetička konstanta degradacije gela

$k_{SF(\text{sušenje})}$, Faktor skupljanja

$M(t)$, odnos mase rastvora prema masi suvog gela

ManA (M), β -D-manuronska kiselina

m_e , masa inkapsulisanog D-limonena

m_i , početna masa arome D-limonena

PVA, Polivinil alkohol

SD, standardna devijacija

SEM, skenirajuća elektronska mikroskopija

SF, Faktor sferičnosti

t_∞ , vreme do kog čestice zadržavaju strukturni integritet pri rehidraciji

TGA, termogravimetrijska analiza

U_c , kritični potencijal

w_1 , masa čestica u rehidrisanom stanju

w_2 , početna masa suvih čestica

XRD, difrakcija X zraka

$y(t)$, gustina dezintegriranih zona spajanja

β , koeficijent prigušenja

ϵ_0 , dieletrična konstanta vazduha

σ_1 , površinski napon rastvora polimera

APSTRAKT

U ovoj disertaciji je ispitivana inkapsulacija prehrambenih aroma uz primenu različitih metoda inkapsulacije i u kombinaciji sa prirodnim i sintetičkim nosačima. Cilj istraživanja je bio dobijanje inkapsulata kako tečnih tako i čvrstih aroma koje se najčešće koriste u prehrambenoj industriji. Ispitivana su tri nosača za inkapsulaciju aroma: karnauba vosak, alginat i polivinil alkohol. Kao model arome su korišćene: etil vanilin, komercijalno dostupna aroma kokosa i D-limonen.

Karnauba vosak je korišćen kao nosač za inkapsulaciju etil vanilina, pri čemu su dobijene sferne čestice čiji je prečnik uglavnom bio ispod 250 μ m. Čestice na bazi karnauba voska sa etil vanilinom su dobijene primenom disperzione (emulzifikacione) metode i disperzione tehnike (disperzija komprimovanim vazduhom). Metodom disperzije vazduhom su dobijene čestice pravilnijeg sfernog oblika sa većom inkapsulacionom efikasnošću. Takođe, termička svojstva inkapsulisanog etil vanilina su poboljšana u poređenju sa slobodnom aromom. Termičko otpuštanje inkapsulisanog etil vanilina se odigravalo na višim temperaturama (do ~270°C) u poređenju sa slobodnom aromom (do ~220°C).

Ca-alginatne čestice sa tečnim i čvrstim aromama su dobijane metodom elektrostatičke ekstruzije. Inkapsulacijom etil vanilina u Ca-alginatni matriks su ostvarena bolja termička svojstva inkapsulisane arome uz postizanje kontrolisanog termičkog otpuštanja arome u širem temperaturnom opsegu u odnosu na slobodnu aromu. Aroma kokosa i D-limonen su inkapsulisani u Ca-alginatne čestice primenom iste procedure kao i u slučaju inkapsulacije etil vanilina. Alginat je pokazao dobra emulgujuća svojstva, što je osnovni uslov za postizanje visoke inkapsulacione efikasnosti. Rezultati termičke analize su pokazali da obe arome u inkapsulisanom obliku imaju bolja termička svojstva u odnosu na slobodne arome. Rehidracija je korišćena za ispitivanje adsorpcije vode u inkapsulate uz razvoj novog modela rehidracije.

Polivinil alkohol je u kombinaciji sa alginatom korišćen za dobijanje čestica sa inkapsuliranim etil vanilinom metodom elektrostatičke ekstruzije. Primenom viših napona kod metode elektrostatičke ekstruzije-elektrospininga dobijeni su filmovi na bazi polivinil alkohola koji se sastoje od nanovlakana. Filmovi na bazi polivinil alkohola su pokazali dobra hemijska, mehanička, termička i antimikrobna svojstva.

Ključne reči: inkapsulacija, karnauba vosak, alginat, polivinil alkohol, arome

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Nauka o konzervisanju

UDK: 547.52 (043.3)

ABSTRACT

In this study, the encapsulation of food flavours by different methods combined with natural and synthetic carriers was investigated. The goal of this study was production of encapsulated forms of both, liquid and solid flavours that are commonly used in food industry. Three different carrier materials for flavour encapsulation were tested: carnauba wax, alginate and polyvinyl alcohol. Ethyl vanillin, commercial coconut flavor and D-limonen were used as model flavors.

Carnauba wax was used as carrier for encapsulation of ethyl vanillin in the form of spherical particles with size mainly below 250 μ m. Carnauba particles loading ethyl vanillin was produced by using dispersion (emulsification) method and spray congealing method (dispersion with compressed air). Particles with more regular spherical shape and higher encapsulation efficiency were produced by using spray congealing method. Also, thermal stability of encapsulated ethyl vanillin was improved compared to free flavour. Thermal release of encapsulated ethyl vanillin occurred at higher temperature (up to \sim 270 $^{\circ}$ C) compared to free flavour (up to \sim 220 $^{\circ}$ C).

Ca-alginate beads loading liquid and solid flavours were produced by electrostatic extrusion. By encapsulation of ethyl vanillin into Ca-alginate matrix better thermal properties of encapsulated flavour were achieved with controlled release in the broader temperature range compared to free flavor. Coconut flavor and D-limonene (liquid flavours) were encapsulated into Ca-alginate beads using same procedure as in the case of ethyl vanillin. Alginate showed good properties for production of stable flavours emulsion, which is critical for high encapsulation efficiency. The results of thermal stability showed that both flavours in encapsulated forms have better thermal stability compared to free flavors. Rehydration studies were used to test the water adsorption properties of encapsulates and new model of rehydration was developed.

Polyvinyl alcohol was used combined with alginate for production of particles loaded with ethyl vanillin by electrostatic extrusion. At higher voltage using electrostatic-electrospinning technique polyvinyl alcohol films with ethyl vanillin consisted of nanofibers were produced. Polyvinyl alcohol films loading ethyl vanillin showed good chemical, mechanical, thermal and antimicrobial properties.

Keywords: encapsulation, carnauba wax, alginate, polyvinyl alcohol, flavours

Academic Expertise: Biotechnical sciences

Field of Academic Expertise: The science of food preservation

UDK: 547.52 (043.3)

UVOD

Savremena proizvodnja hrane predstavlja složeni industrijski sistem, koji spaja tradicionalne i savremene tehnološke procese kao i znanja iz različitih oblasti nauke. Primarni cilj savremene proizvodnje hrane je očuvanje osnovnih fizičkih i hemijskih svojstava krajnjeg proizvoda sa jedne i postizanje visokog nivoa bezbednosti proizvoda sa druge strane. Pored toga, u toku procesa proizvodnje, mora se obratiti pažnja na senzorna svojstva proizvoda, koja u krajnjoj liniji najviše utiču na odluku potrošača za koji će se proizvod odlučiti. U toku tehnoloških procesa proizvodnje hrane, primenjuju se različiti aditivi i procesne operacije u cilju dobijanja željenih svojstava. Aditivi predstavljaju relativno skupe komponente proizvoda, čiji gubitak ili promena (pre svega hemijska) može negativno uticati na kvalitet.

Osetljivi aditivi, a posebno arome se mogu zaštititi primenom procesa inkapsulacije. Inkapsulacija se pojednostavljeno može definisati kao zaštita aktivnih komponenti kao što su vitamini, enzimi ili mikroorganizmi upotrebom odgovarajućih materijala (nosača) i tehnika inkapsulacije (Zuidam i Shimoni, 2010). Ovakav pristup zaštite aktivnih komponenti je našao široku primenu u oblastima poput farmacije, prehrambene tehnologije, fermentacione tehnologije, itd. Generalno, procesom inkapsulacije se oko aktivne komponente formira zaštitni omotač kojeg čini materijal nosača. Zaštitni omotač ima višestruku ulogu. S jedne strane fizički odvaja aktivnu komponentu od okolne sredine i na taj način joj daje dodatnu zaštitu. Pored zaštitne uloge, omotač može da bude barijera preko koje se ostvaruje kontrolisano otpuštanje aktivne komponente pod određenim uslovima. Kada je potrebno, inkapsulacija se može koristiti za maskiranje neprijatnih mirisa i ukusa ali i da bi se sprečile neželjene hemijske reakcije u proizvodu (Gouin, 2004; Zuidam i Shimoni, 2010; Fiore et al., 2012). Inkapsulacijom se mogu dobiti čestice ujednačenog oblika i veličine zavisno od njihove krajnje primene. Veličina dobijenih čestica, u zavisnosti od primenjenog postupka inkapsulacije se kreće od nekoliko nanometara do nekoliko milimetara (Zuidam i Shimoni, 2010).

Dobijanje željenih dimenzija i oblika čestica inkapsulisanog materijala se bazira na primeni odgovarajućih tehnika inkapsulacije. Inkapsulacione tehnike treba da obezbede formiranje zaštitnog sloja oko aktivne materije ali i da omoguće kontrolisanu proizvodnju čestica ujednačenih veličina. Metode kao što su sprej sušenje, oblaganje u fluidizovanom sloju ili pak primena lipozoma su dobro poznate u praksi (Thies, 2005; Zuidam i Shimoni, 2010). Pored ovih

metoda, u novije vreme se intenzivno radi i na primeni elektrostatičkog polja za dobijanje čestica i inkapsulata u širokom opsegu veličina (Nedović et al., 2001; Jaworek i Sobczyk, 2008). Pod dejstvom elektrostatičkog polja i uz upotrebu odgovarajućih materijala mogu se dobiti i vlakna čije dimenzije mogu biti svega nekoliko desetina nanometara (Reneker i Chun, 1996). Dobijanje inkapsulisanih aktivnih komponenti koje kao omotače imaju lipide se može vršiti metodama disperzije (emulzifikacije) u vodi otopljenih komponenti i hlađenjem dispergovanih kapi lipofilne faze. Pored ove metode, razvijene su i metode disperzije pomoću posebnih dizni za disperziju otopljenih komponenti u vazduhu, uz istovremeno hlađenje, očvršćavanje i formiranje čestica. Obe metode su se pokazale pogodne za dobijanje sfernih čestica na bazi lipida kao nosača (Rodriguez et al., 1999; Passerini et al., 2003; Milanovic et al., 2010; Milanovic et al., 2011a).

Karakteristike koje će aktivna materija imati nakon procesa inkapsulacije su definisane pre svega karakteristikama materijala nosača. Kao nosači u procesima inkapsulacije se mogu koristiti kako prirodni tako i sintetički materijali. Odluka koji će se materijal koristiti kao nosač zavisi pre svega od ciljeva koji se žele ostvariti procesom inkapsulacije. U slučaju inkapsulacije mikroorganizama i njihovog korišćenja u procesima fermentacije, materijal nosača mora biti inertan, da ne utiče negativno na metabolizam ćelija i da obezbedi dobra difuziona svojstva tj. protok materije u toku fermentacije (Nedović, 1999). Pojedine ćelijske kulture je potrebno dodatno zaštititi od negativnog dejstva okolne sredine. Ovo je slučaj sa probiotskim kulturama, gde je cilj da se procesom inkapsulacije stvori zaštitni omotač oko ćelije, koji je dovoljno otporan na uslove sredine koji vladaju u organima za varenje (Manojlović et al., 2010). Generalno, u prehrambenoj tehnologiji se javlja problem sredstava i hemikalija koje su dozvoljena za upotrebu u hrani. Ovo sužava listu potencijalnih materijala koji se mogu koristiti kao nosači za inkapsulaciju aditiva.

U procesima inkapsulacije aditiva hrane kao nosači se koriste polisaharidi, proteini i lipidi. Od polisaharida, primenu su našli skrob i derivati skroba, pektin, alginat, itd. Proteini, bilo životinjskog ili biljnog porekla se takođe intenzivno koriste kao nosači a izdvajaju se želatin, kolagen, proteini soje, kazein, itd. U novije vreme se intenzivno radi na razvoju nosača na bazi fosfolipida. Pored fosfolipida, od lipida koriste se još i masne kiseline i voskovi (Wandrey et al., 2010). Među voskovima, karnauba vosak se ističe svojim složenim hemijskim sastavom i dobrim tehnološkim svojstvima (Regert et al., 2005; Wandrey et al., 2010). Karnauba vosak je jedan od

najčešće izučavanih voskova kada je u pitanju inkapsulacija farmaceutskih preparata (Bodmeier et al., 1992; Özyazıcı et al., 2006; Singh et al., 2007). Pored toga, ovaj vosak je našao široku primenu i u prehrmabenoj industriji (Lakkis, 2007).

Alginat je polisaharid koji se koristi u različitim procesima inkapsulacije (Nussinovitch, 2003), pre svega živih ćelija za potrebe fermentacija ili za dobijanje inkapsulisanih probiotskih kultura (Nedović, 1999; Manojlović et al., 2010). Pored mikroorganizama, alginat se koristi i za inkapsulaciju enzima (Knezevic et al., 2002) ili pak biljnih ulja (Chan, 2011). Princip formiranja čestica na bazi alginata je da se pod dejstvom spoljašnje sile kao što je elektrostatičko polje ili neka mehanička sila izazove razbijanje mlaza alginatnog rastvora u kome se nalazi aktivna komponenta (Prüsse et al., 2008). Formirane kapi padaju u rastvor za geliranje gde dolazi do formiranja gela i finalnog oblika čestica. Kao sredstva za geliranje alginata koriste se rastvori koji sadrže divalentne jone (npr. Ca^{2+}) (Nedović, 2001). Pored toga, alginat može da stvara stabilne emulzije sa hidrofobnim komponentama, što je jedno od najvažnijih svojstava ovog polisaharida za njegovu upotrebu kao nosača za inkapsulaciju ulja (Chan, 2011a). Alginat je pokazao dobra svojstva pre svega u pogledu zaštite aditiva hrane od dejstva povišenih temperatura (Manojlović, 2008a; Manojlovic et al., 2008b). Pored toga, primenom elektrostatičke ekstruzije je moguće dobiti alginatne čestice kontrolisanih dimenzija u zavisnosti od potreba (Nedović et al., 2001).

Pored prirodnih materijala, u procesima inkapsulacije se koriste i sintetički materijali, uglavnom u obliku polimera različitih molekulskih masa i svojstava. Jedan od sintetičkih polimera koji ima veliki potencijal primene u biotehnologiji je i polivinil alkohol (PVA).

Polivinil alkohol je sintetički, hidrofilni polimer koji ima sposobnost formiranja vodoničnih veza između susednih lanaca PVA. Na ovaj način se formiraju stabilni gelovi, koji mogu sadržati različite aktivne materije ali i inkapsulisane ćelije za potrebe fermentacionih tehnologija (Bezbradica et al., 2004; Pillay et al., 2005; Bezbradica et al., 2007). Dobijanje stabilnih gelova na bazi PVA je moguće unaprediti primenom metode naizmeničnog smrzavanja-odmrzavanja, pri čemu se dobija gel zadovoljavajućih karakteristika, bez primene dodatnih hemikalija (Ariga et al., 1987). U novije vreme, PVA privlači sve veću pažnju kao materijal za izradu vlakana nanometarskih dimenzija sa inkapsulisanim lekovima ili aktivnim komponentama metodom elektrospininga (Taepaiboon, 2006; Li et al., 2013). Pored lekova, upotrebom PVA kao nosača je moguće inkapsulisati prehrambene aditive u formi nanovlakana (Kayaci i Uyar, 2012). Ovo je

posebno interesantno s obzirom da se PVA može koristiti za dobijanje tzv. aktivnih pakovanja i ambalaže (Goodship i Jacobs, 2005).

Po hemijskom sastavu, arome koje se koriste u prehrambenoj industriji mogu biti čista jedinjenja ili pak smeša jedinjenja od kojih svako daje svoj specifični doprinos utisku koji data aroma ostavlja na potrošača. Hemijska jedinjenja koja čine aromu nekog proizvoda su uglavnom lako isparljiva i često podložna negativnim uticajima tehnološkog procesa. Pored toga, promene u hemijskom sastavu aroma se mogu javiti i u fazama proizvodnje (ili izdvajanja) same arome, čuvanja ili u samom proizvodu. Negativni uticaji povišenih temperatura, naročito u dugom vremenskom periodu mogu dovesti do gubitka ili degradacije aromatičnih materija i pogoršanja kvaliteta proizvoda. Kiseonik, svetlost ili pak povišena vlažnost mogu negativno uticati na stabilnost hemijskih jedinjenja i dovesti do nastanka komponenti koje nisu poželjne. Činjenica da cene aditiva a posebno aroma učestvuju značajno u formiranju krajnje cene proizvoda, nameće potrebu njihove racionalnije upotrebe ili dodatne zaštite primenom nekog od procesa inkapsulacije.

Među metodama za inkapsulaciju aroma, svakako se izdvaja sprej sušenje. Ovo je relativno jednostavna tehnika inkapsulacije koja se bazira na primeni nosača kao što su: modifikovani škrob, maltodekstrini, kukuruzni sirup, gumi arabika, itd. Međutim, sprej sušenje ima dva bitna nedostatka. Prvo, kako se formiranje čestica sa inkapsulisanim aromom odvija na relativno visokim temperaturama, postoji opasnost od gubitka lako isparljivih komponenti. Drugo, jedan deo aktivne komponente ostane na površini čestica, što je čini podložnijom spoljašnjim uticajima (Madene et al., 2005). Nosači aroma koji se koriste za njihovu inkapsulaciju ne smeju biti štetni po ljudsko zdravlje. Pored toga, i njihova cena mora biti prihvatljiva (Van Soest, 2007). Kako raste interes za novim inkapsulisanim aromatičnim proizvodima, širi se i spektar tehnika i materijala za inkapsulaciju. Kada je cilj dobiti u vodi nerastvorne čestice, sa dobrim mehaničkim i termičkim svojstvima, dve grupe materijala nosača se ističu - hidrokoloide i lipidi. U dosadašnjim istraživanjima, alginat se pokazao kao dobar nosač za inkapsulaciju aroma. Dobijanje i optimizacija proizvodnje čestica na bazi alginata je dodatno olakšana upotrebom elektrostatičke ekstruzije (Manojlovic et al., 2008b). Od lipidnih materijala, treba pomenuti voskove kao nosače za inkapsulaciju aroma. Karnaubas vosak se svojim svojstvima posebno ističe kao pogodan nosač. Dosadašnja ispitivanja su pokazala da je uz upotrebu odgovarajućih

tehnika moguće dobiti čestice ujednačenih dimenzija i sfernog oblika (Milanovic et al., 2010; Milanovic et al., 2011a).

1. TEORIJSKE OSNOVE

U ovom poglavlju je dat pregled stručne i teorijske literature koja je neophodna za razumevanje procesa i metoda inkapsulacije kako sa aspekta šire primene, tako i sa aspekta primene u prehrambenoj industriji. Opisane su metode i tehnička rešenja inkapsulacije, materijali za inkapsulaciju kao i prikaz primene inkapsulacije u različitim oblastima nauke i industrije. Poseban osvrt je dat na primenu inkapsulacije u prehrambenoj industriji.

1.1. Teorijske osnove procesa inkapsulacije

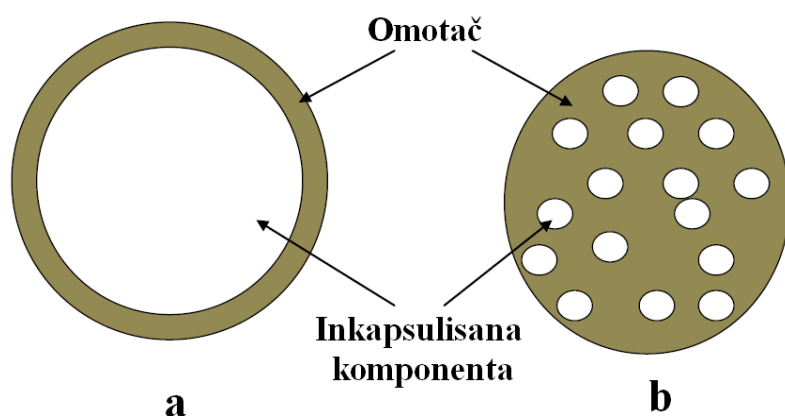
1.1.1. Pojam, značaj i primena inkapsulacije

U ovom poglavlju je dat pregled najznačajnijih metoda i tehnika inkapsulacije kao i primeri primena inkapsulacije u savremenoj biotehnologiji. Razmatran je značaj pojedinih metoda inkapsulacije kao i njihove prednosti i nedostaci s aspekta zaštite aktivne komponente. Posebna pažnja je posvećena metodama inkapsulacije baziranim na primeni elektrostatičkog polja i disperzionim metodama (na bazi emulzifikacije).

Inkapsulacija je postupak kojim se aktivne komponente fizičkim ili hemijskim putem smeštaju unutar strukture određenog nosača. Može se reći da je krajnji prizvod inkapsulacije aktivna supstanca obavijena slojem (ili slojevima) materijala nosača. Postupak inkapsulacije se generalno sastoji iz mešanja aktivne komponente sa nosačem, gde se tako dobijena smeša ekstrudira ili se emulzifikuje u cilju dobijanja kapljica koje se zatim podvrgavaju procesu očvršćavanja. Na ovaj način je moguće dobiti čestice sa inkapsulisanom supstancom čije dimenzije se kreću od nekoliko nanometara do nekoliko milimetara. Finalni produkt inkapsulacije predstavlja sistem aktivna komponenta/nosač koji se još naziva i inkapsulat. (Thies, 2005; Zuidam, i Shimoni, 2010; Augustin i Hemar, 2009).

S druge strane, inkapsulacija je daleko širi pojam i obuhvata procedure zaštite materijala raznim postupcima, pri čemu krajnji proizvod može biti različitih oblika i dimenzija. Neke procedure inkapsulacije podrazumevaju samo nanošenje zaštitnog sloja preko površine aktivne komponente. Druge pak procedure inkapsulacije podrazumevaju agregaciju već formiranih materijala.

Međusobni odnos nosač-aktivna komponenta u čestici dobijenoj inkapsulacijom je prikazan na Slici 1.1.



Slika 1.1. Osnovni tipovi čestica dobijenih inkapsulacijom. a) „rezervoar“ tip čestice; b) „matriks“ tip čestice (Zuidam i Shimoni, 2010).

Generalno, inkapsulacijom se mogu dobiti dva tipa čestica: „matriks“ i „rezervoar“ tip. Razlika između ova dva tipa čestica je u tome što se kod „rezervoar“ čestica omotač nalazi oko aktivne materije. Kod „matriks“ tipa čestica, aktivna komponenta je dispergovana u samom materijalu omotača, ali se nalazi i na površini čestice. Ukoliko je potrebno, materijal na površini čestica se može zaštititi dodatnim slojevima omotača. Pored sfernog oblika, procesom inkapsulacije je moguće dobiti i druge oblike (npr. cilindrične) ili pak čestice nepravilnog oblika (Zuidam i Shimoni, 2010).

Dimenzije čestica dobijenih procesima inkapsulacije se kreću od relativno krupnih (nekoliko milimetara) do nanometarskih veličina. Prema Thies (2005) čestice dobijene procesima inkapsulacije se po veličini mogu podeliti na: čestice veće od 1000 μm -mogu se označiti kao mikrogranule (makrokapsule); čestice čija se veličina nalazi između 1-1000 μm -nazivaju se mikrokapsule; čestice ispod 1 μm se definišu kao nanočestice. Pored čestica različitih oblika i dimenzija, sistemi za inkapsulaciju se mogu oblikovati i kao filmovi na bazi prirodnih polisaharida (Marcuzzo et al., 2010; Hambleton et al., 2011).

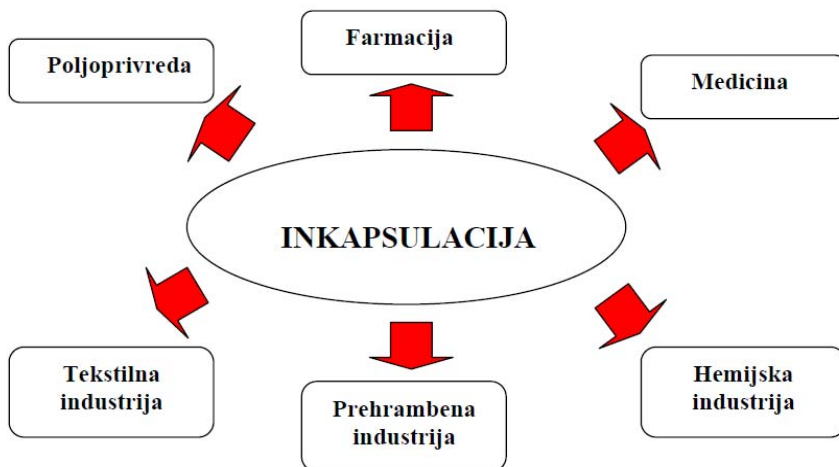
Kao što se može videti, inkapsulacija je širok pojam koji obuhvata veliki broj procedura i tehnika. Inkapsulacija se koristi u različitim oblastima industrije, pri čemu je svaka specifična primena definisana zahtevima koje proces inkapsulacije mora da ispuni pre uvođenja u proces

proizvodnje. Zuidam i Shimoni (2010) navode nekoliko generalnih prednosti primene inkapsulacije:

- Olakšano rukovanje inkapsulisanom aktivnom komponentom (npr. inkapsulacija tečnosti i dobijanje čvrstih inkapsulata koji su lakši za rukovanje);
- Zaštita aktivne komponente od nepovoljnih uslova sredine (negativni uticaj kiseonika, manji gubici pri isparavanju, itd.);
- Bolja bezbednost (inkapsulacijom se smanjuje zapaljivost pojedinih komponenti);
- Stvaranje određenih vizuelnih i teksturnih efekata (efekat na potrošača);
- Kontrolisano otpuštanje aktivne komponente;
- Maskiranje neprijatnih mirisa i generalno prikrivanje neželjenih senzornih svojstava aktivne komponente.

Pored nesumljivih prednosti, primena inkapsulacije i njeno uvođenje u nove procese proizvodnje (i nove proizvode) je ograničeno nekim nedostacima koji se pre svega odnose na relativno visoku cenu inkapsulacionih tehnologija i usložnjavanje procesa proizvodnje. Pored toga, inkapsulisane aktivne materije mogu stvoriti neke negativne promene u samom proizvodu (promenjena senzorna svojstva) ili pak da pretrpe oštećenja tokom proizvodnog procesa (Zuidam i Shimoni, 2010).

Inkapsulacija je našla široku primenu u različitim oblastima nauke i industrije (Slika 1.2).



Slika 1.2. Primena inkapsulacije u različitim oblastima industrije i nauke.

Primeri primene inkapsulacije je relativno puno i oni obuhvataju veliki broj proizvoda i tehnologija u različitim granama industrije i nauke. Oblik, veličina i svojstva inkapsulata kao i materijali za inkapsulaciju se razlikuju u zavisnosti od primene, zahteva i ciljeva inkapsulacije. Jedna od prvih komercijalnih primena inkapsulata (razvijena pedesetih godina 20. veka) je bila u štamparskoj tehnici (Zuidam i Shimoni, 2010). U primarnoj poljoprivrednoj proizvodnji se radi na inkapsulaciji pesticida a posebno herbicida (za suzbijanje korova), gde je cilj inkapsulacije kontrolisano otpuštanje (i zaštita) aktivne komponente u cilju sprečavanje rasta korovskih biljaka (Wang i Zhao, 2013). U oblasti farmacije je široko zastupljena inkapsulacija različitih lekova i aktivnih supstanci sa terapijskim efektom. Primenjuje se široki spektar materijala nosača i tehnika inkapsulacije kako bi se dobili inkapsulati željenih karakteristika (Donbrow, 1991). U tekstilnoj industriji je sve veća potražnja za novim sistemima inkapsulacije i to pre svega kao načina za kontrolisano otpuštanje parfema i omekšivača (Nelson, 2002).

Prehrambena industrija je pored farmaceutske najveći korisnik inkapsulacije i proizvoda inkapsulacije. Jedna od najvažnijih primena inkapsulacionih tehnologija u prehrambenoj industriji se odnosi na inkapsulaciju aroma i aromatičnih komponenti. U oblasti fermentacija, inkapsulacija se koristi za inkapsulaciju ćelija kvasca u procesima proizvodnje piva (Nedović, 1999), bioetanola (Nikolić et al., 2009) i prirodnih aroma (Lalou et al., 2013). Poseban segment inkapsulacije za potrebe prehrambene industrije predstavlja dodatna zaštita ćelija probiotika, gde je cilj dodatna stabilizacija i održavanje visokog broja aktivnih ćelija (Manojlović et al., 2010).

Kod odabira metoda inkapsulacije treba voditi računa o nekoliko bitnih kriterijuma: cilja inkapsulacije; karakteristike aktivne komponente; karakteristike materijala nosača; zakonske regulative; ekonomičnosti procesa itd. Sve su ovo samo neke od stavki koje se moraju uzeti u obzir pre bilo kakve upotrebe inkapsulacije ili njenog uvođenja u proces proizvodnje (Zuidam i Shimoni, 2010).

1.1.2. Metode i tehnike inkapsulacije

Prema Thies (2005) procesi inkapsulacije se mogu podeliti na procese Tipa A (hemijski procesi) i na procese Tipa B (mehanički procesi). Pored ove, postoje i druge podele koje uzimaju u obzir i druge parametre koji utiču na proces inkapsulacije kao i na samo formiranje čestica. Često je pak teško razdvojiti procese na striktne grupe jer se formiranje čestica odvija uz primenu kako fizičkih tako i hemijskih postupaka.

U procese Tipa A spadaju svi procesi inkapsulacije kod kojih se formiranje zaštitnog sloja omotača oko aktivne komponente odvija u tečnosti. Kod ovih procesa je jako važno postići dobru emulzionu stabilnost (ili stabilnost disperzije). U procese tipa A spadaju: kompleksna koacervacija; polimer/polimer inkompatibilnost; polimerizacija na površini tečno-tečno i tečno-čvrsto sistema; *in situ* polimerizacija; formiranje čestica otparavanjem rastvarača i ekstruzija sa potopljenom diznom.

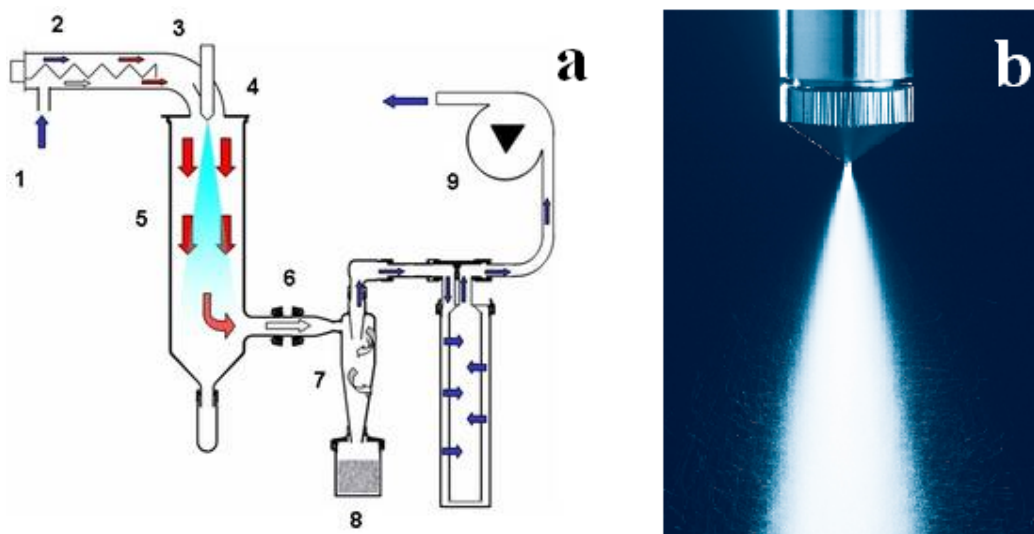
Procesi Tipa B obuhvataju: sprej sušenje; inkapsulacija u fluidizovanom sloju; centrifugalna ekstruzija; ekstruzija pomoću rortirajućeg diska; polimerizacija na tečnoj/gas ili čvrstoj/gas površini i ekstruzija pod pritiskom. Metode koje spadaju u procese Tipa B se baziraju na disperziji pripremljenog rastvora za inkapsulaciju mehaničkim procesima i naknadnim geliranjem dobijenih čestica (Thies, 2005).

U nastavku će biti dat prikaz najvažnijih tehnika inkapsulacije s aspekta njihove primene u prehrambenoj industriji. Posebna pažnja je posvećena tehnikama koje se tradicionalno koriste za inkapsulaciju aktivnih komponenti hrane kao i tehnikama koje su korišćene u eksperimentalnom delu ovog rada.

1.1.2.1. Sprej sušenje

Sprej sušenje je tehnika dobijanja inkapsulisanih proizvoda koja se bazira na raspršivanju (atomizaciji) prethodno pripremljene smeše aktivne komponente i nosača u komori koja se zagreva, pri čemu dolazi do formiranja čvrstih čestica usled otparavanja rastvarača. Može se reći da je ovo jedna od najstarijih i najzastupljenijih metoda inkapsulacije u savremenoj biotehnologiji. U procesima sprej sušenja, voda se najčešće koristi kao rastvarač za pripremu rastvora nosača ali se mogu koristiti i organski rastvarači (acetone ili etanol). Primena organskih rastvarača zahteva posebnu opreznost, a pored toga dodatno poskupljuje sam proces. Aktivna

komponenta pre same inkapsulacije može biti u obliku rastvora koji se meša sa nosačem ili je pak disergovana odnosno emulgovana sa nosačem. Šema sprej sušača i dizne za atomizaciju je prikazana na Slici 1.3. Kako bi se dobile čestice, smeša aktivne materije i nosača se raspršuje pomoću specijalne dizne pod pritiskom vazduha ili pomoću rotirajućeg atomizera. Faktori koji utiču na konačnu veličinu čestica su: svojstva rastvora koji se suši (viskozitet i površinski napon), vreme sušenja, protok i pritisak u dizni. Pored toga, na veličinu čestica se može uticati i preko vremena zadržavanja u samom uređaju. Što čestice duže ostaju u uređaju (tj. duže se suše) to se mogu sušiti čestice većih dimenzija (Zuidam i Shimoni, 2010).

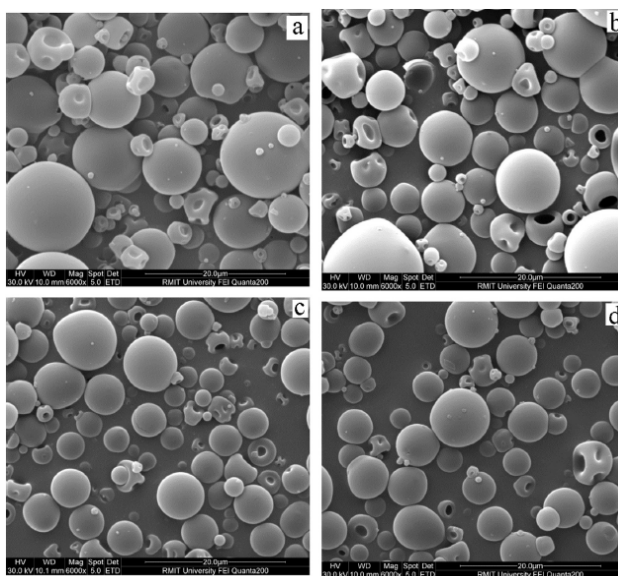


Slika. 1.3. Sprej sušenje: a) skica sprej sušača Mini Spray Dryer B-290 (BUCHI Labortechnik AG, Švajcarska), 1.Ulaz vazduha, 2.Grejač, 3.Temperaturni senzor na ulazu vazduha, 4.Dizna, 5.Komora za sušenje, 6.Temperaturni senzor na izlazu vazduha, 7.Ciklon, 8.Posuda za sakupljanje proizvoda, 9.Aspirator; b) dizna sprej sušača i formirane čestice (slike preuzete uz dozvolu sa online prezentacije kompanije BUCHI®).

Generalno, veličina čestica dobijenih metodom sprej sušenja varira od $10\mu\text{m}$ do $400\mu\text{m}$. Posebnu pažnju treba posvetiti pregrevanju materijala u toku procesa sušenja tj. inkapsulacije.

Proces sušenja se kontroliše preko kontrole temperature i protoka ulaznog i izlaznog vazduha. Temperatura ulaznog vazduha varira u opsegu od 150-220°C dok se temperatura izlaznog vazduha kreće u opsegu 50-80°C (Zuidam i Shimoni, 2010).

Materijali nosača koji se koriste u procesima inkapsulacije sprej sušenjem moraju da pruže dobru temperaturnu zaštitu aktivnoj komponenti ali i da budu dobro rastvorljivi u vodi i da imaju pristupačnu cenu. Od materijala koji se koriste kao nosači pri inkapsulaciji sprej sušenjem treba izdvojiti: guma arabiku, proteine mleka, želatin, proteine soje, maltodekstrine, itd. U novije vreme se radi i na dobijanju inkapsulisanih sistema koji su otporniji prema vodi (tj. teže se rastvaraju) kako bi se omogućilo kontrolisano otpuštanje aktivnih materija iz nosača (Gharsallaoui et al. 2007; Zuidam i Shimoni, 2010). Primer čestica dobijenih metodom sprej sušenja je dat na Slici 1.4.



Slika 1.4. Slike čestica dobijenih metodom sprej sušenja na bazi proteinskih izolata surutke iz rastvora različitih pH vrednosti (Duongthingoc et al., 2013), (slike preuzete uz dozvolu izdavača Elsevier).

Za prehrambenu industriju posebno je interesantna inkapsulacija probiotika metodom sprej sušenja. Probiotske kulture se mogu inkapsulisati primenom različitih nosača kao što su obrano mleko (Radulović et al., 2012), maltodekstrini ili neka od prirodnih guma (Manojlović et al., 2010). Neke lako isparljive i temperaturno osetljive komponente aroma mogu se degradirati ili

pak ispariti iz smeše u toku samog procesa, što zahteva posebnu pažnju i odabir odgovarajućeg režima sušenja (Bertolini et al., 2001).

1.1.2.2. Sprej hlađenje

Sprej hlađenje je metoda inkapsulacije koja se bazira na raspršivanju smeše aktivne komponente i nosača, pri čemu je nosač u otopljenom stanju. Nakon disperzije, čestice se hlade i formiraju svoj finalni oblik. Aktivna komponenta može biti rastvorena ili dispergovana u otopljenom nosaču pre samog procesa inkapsulacije. Formiranje čestica je slično kao i kod sprej sušenja, samo što nema otparavanja vode već se čestice formiraju hlađenjem otopljenog nosača. Formiranje čestica (pre samog očvršćavanja) se može izvršiti upotrebom dizni, rotirajućeg diska ili koekstruzijom (Zuidam i Shimoni, 2010). Metoda sprej hlađenja je korišćena za inkapsulaciju lekova u lipidne nosače, pri čemu su dobijeni inkapsulati kasnije korišćeni za formulacije tableta (Savolainen et al., 2003). Dobijanje čestica se može vršiti i primenom ultrazvuka kao metode za disperziju materijala pre očvršćavanja (Passerini et al., 2006).

Opisana metoda inkapsulacije je korišćenja u ovom radu za dobijanje lipidnih mikročestica na bazi karnauba voska. Detaljnije o ovoj metodi je dato u Poglavlju 4.1.

1.1.2.3. Liofilizacija

Uklanjanje rastvarača na niskim temperaturama (ispod tačke mržnjenja rastvarača) pod vakumom se može koristiti za dobijanje inkapsulisane aktivne komponente, koja ostaje zarobljena unutar strukture nosača. Kod procesa inkapsulacije liofilizacijom, smeša nosača (koji je rastvoren u pogodnom rastvaraču-najčešće vodi) i aktivne komponente se prvo zamrzne a zatim se pod vakumom i uslovima redukovane temperature vrši direktno otparavanje rastvarača sublimacijom. Temperature koje se koriste za zamrzavanje materijala pre liofilizacije se kreću u opsegu od -90 do -40°C. Nakon sušenja, dobijena osušena masa se dalje može obrađivati u zavisnosti od potreba (npr. mlevenjem). Zbog činjenice da se proces vodi pod vakumom, da zahteva primenu niskih temperatura a i zbog dužine procesa, liofilizacija se smatra dosta neekonomičnom u poređenju sa npr. sprej sušenjem (Zuidam i Shimoni, 2010). S druge strane, neke osetljive komponente a posebno žive ćelije (npr. bakterije) su jako osetljive i zahtevaju posebnu pažnju pri inkapsulaciji. Primena liofilizacije za inkapsulaciju bakterija je našla primenu

kod inkapsulacije bioloških senzora (Tessema et al., 2006). Pored živih ćelija, liofilizacija je korišćena za inkapsulaciju polifenola uz upotrebu maltodekstrina kao nosača (Sanchez et al., 2013). Posebano polje primene liofilizacije je naknadno sušenje inkapsulisanih aktivnih komponenti dobijenih nekom drugom metodom inkapsulacije. Ovde se liofilizacija javlja na kraju procesa inkapsulacije, kao finalni proces obrade već inkapsulisanog materijala. Chan (2011a) je koristio liofilizaciju kao metodu sušenja inkapsulisanog ulja koje je prethodno zarobljeno u obliku sfernih čestica na bazi kalcijum alginata. Na ovaj način su dobijene osušene čestice sa visokim sadržajem ulja i sa zadovoljavajućim karakteristikama posebno u poređenju sa česticama koje su sušene klasičnim sušenjem na povišenoj temperaturi.

Kao što je već rečeno, proces liofilizacije se odvija na temperaturama koje su ispod tačke mržnjenja rastvarača. Međutim, uklanjanje rastvarača (tj. njegovo otparavanje) i formiranje čvrste strukture inkapsulisanog materijala je moguće voditi i na temperaturama koje su iznad tačke mržnjenja rastvarača. Ovi procesi sušenja se takođe izvode pod vakuumom ali su za razliku od liofilizacije jeftiniji i značajno su kraći (Zuidam i Shimoni, 2010).

1.1.2.4. Oblaganje aktivne komponente zaštitnim slojem

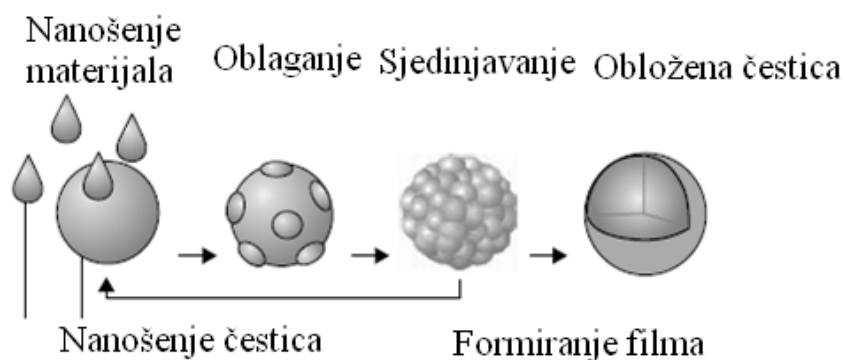
Proces oblaganja aktivne komponente (koja je u čvrstom agregatnom stanju) se može realizovati na dva načina: 1) Oblaganjem u bubnju i 2) Oblaganjem u fluidizovanom sloju.

Oblaganje u bubnju

Nanošenje zaštitnog sloja oko aktivne komponente metodom oblaganja u bubnju se bazira na dispergovanju materijala omotača (koji je u tečnom stanju) na površinu čvrste aktivne komponente, pri čemu je aktivna komponenta u pokretu tj. kreće se u bubnju koji rotira. Materijal se ravnomerno nanosi na površinu aktivne materije i formira zaštitni film. Na ovaj način je moguće oblagati prehrambene (npr. šećerni film preko površine proizvoda) i farmaceutske proizvode (Woznicki i Grillo, 1989; Park i Yeo, 2006; Krogars et al., 2002).

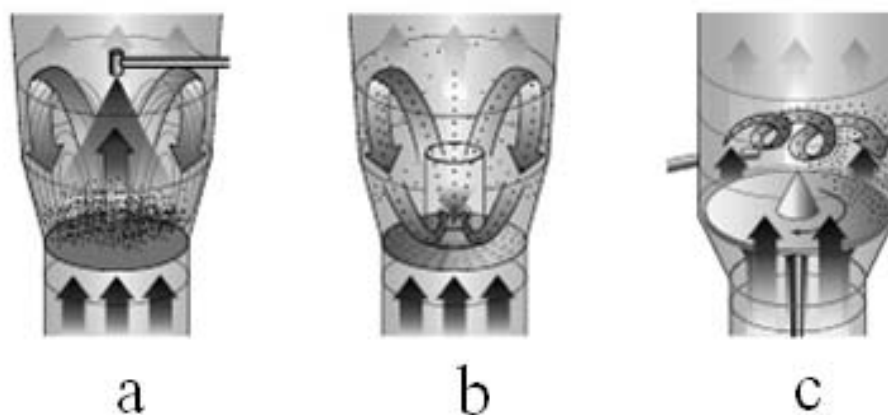
Oblaganje u fluidizovanom sloju

Oblaganje u fluidizovanom sloju je proces stvaranja zaštitnog omotača oko čvrste aktivne supstance koja se nalazi u fluidizovanom stanju, pri čemu se zaštitni materijal raspršuje po aktivnoj supstanci. Princip formiranja zaštitnog filma metodom oblaganja u fluidizovanom sloju je dat na Slici 1.5.



Slika 1.5. Princip metode inkapsulacije oblaganjem u fluidizovanom sloju (slike (uz modifikacije) preuzete uz dozvolu sa online prezentacije kompanije Glatt®).

Promenom fizičkih parametara, pre svega temperature (može se regulisati temperatura u komori kao i temperatura materijala omotača i vazduha), dolazi do formiranja čvrstog omotača na površini aktivne materije. Ostali parametri koji utiču na proces oblaganja su protok omotača, sastav omotača (pre svega udeo vode) i protok vazduha. Kao omotači se koriste derivati celuloze, dekstrini, proteini, različite lipidne materije, itd. Generalno, materijal koji se nanosi na površinu čvrste aktivne komponente se može dispergovati sa dna ili sa vrha komore u kojoj se vrši oblaganje (Zuidam i Shimoni, 2010) ili se materijal nosača može uvoditi u komoru tangencijalno (Dewettinck i Huyghebaert, 1999; Lakkis, 2007) (Slika 1.6). Kod oblaganja u fluidizovanom sloju treba voditi računa da nastaju fine čestice koje se moraju uklanjati putem filtera (Zuidam i Shimoni, 2010).



Slika 1.6. Različite konfiguracije sistema oblaganja u fluidizovanom sloju: a) disperzija omotača sa vrha komore; b) disperzija omotača sa dna komore; c) disperzija omotača tangencijalno, (slike (uz modifikacije) preuzete uz dozvolu sa online prezentacije kompanije Glatt®).

Primenom ovog načina oblaganja je moguće zaštititi osetljive komponente od negativnih uticaja sredine. Fiore et al. (2012) su pokazali da se oblaganjem natrijum hlorida u fluidizovanom sloju uz korišćenje lipofilnih omotača može značajno uticati na smanjenje nastanka produkata Maillard-ovih reakcija u pekarskim proizvodima.

Aglomeracijom u fluidizovanom sloju se postiže uvećanje dimenzija čestica čije prvobitne dimenzije nisu pogodne za dalju upotrebu. Turchiuli et al. (2005) i Fuchs et al. (2006) su pokazali da se aglomeracija već pripremljenih čestica inkapsulisanog ulja može efikasno obaviti u fluidizovanom sloju. U oba istraživanja je ulje primarno inkapsulisano metodom sprej sušenja a zatim je vršena aglomeracija dobijenih čestica u fluidizovanom sloju.

1.1.2.5. Inkapsulacija primenom ekstrudera

Kombinovanjem materijala nosača (u otopljenom stanju) i ekstrudera, moguće je dobiti inkapsulisanu aktivnu komponentu u različitim oblicima i dimenzijama, pri čemu se formiranje konačne forme inkapsulata bazira na očvršćavanju nosača nakon ekstruzije. Sam ekstruder je uređaj u kome se obavlja topljenje materijala nosača i njegova homogenizacija sa aktivnom komponentom. Ekstruder se sastoji iz nepokretnog dela (cevi) i rotora koji se nalazi u cevi i koji rotira, pri čemu se u različitim sekcijama ekstrudera obavlja homogenizacija, topljenje i finalno

oblikovanje materijala. Kao nosači se mogu koristiti: skrobovi, šećeri, maltodekstrini, derivati celuloze, lipidi i proteini (Zuidam i Shimoni, 2010). Posebno treba istaći skrobove kao pogodno nosače za ovaj tip inkapsulacije. Skrobovi su korišćeni kao materijali omotača za inkapsulaciju-ekstruziju pesticida (Carr et al., 1993) i bilnog ulja metodom ekstruzije sa ekstruderima (Yilmaz et al., 2001).

Drugi tip procesa koji je sličan ekstruziji i koji takođe koristi otopljene nosače se može definisati kao injektovanje otopljenog materijala (pod pritiskom) kroz prethodno definisani otvor (ili otvore) u ohlađeni rastvarač kojim se vrši dehidratacija i finalno formiranje inkapsulata. Razlika u odnosu na ekstruziju sa ekstruderom je u tome što se ovde ne koristi klasični ekstruder (sa rotorom) već se ekstruzija vrši u vertikalnom uređaju za ekstruziju (injektovanje). Od materijala nosača najčešće se koriste glukozni sirup ili šećeri a kao rastvarači tečni azot ili izopropanol. Finalna veličina čestica kod ovog procesa je u opsegu 0.2-2mm. Generalno, primenom ove metode se uglavnom dobijaju u vodi rastvorljive čestice sa inkapsulisanim materijalom dok se u određenim slučajevima (primenom modifikovanih nosača) može smanjiti rastvorljivost nosača i na taj način stabilizovati inkapsulisani materijal u vodenoj sredini (ukoliko je to cilj) (Zuidam i Shimoni, 2010).

1.1.2.6. Koacervacija

Koacervacija odnosno stvaranje koacervata se koristi kod sistema kod kojih je aktivna komponenta nerastvorna u vodi (Thies, 2005). Kako bi se formirali koacervati, potrebno je stvoriti sistem kod koga je aktivna komponenta dispergovana u npr. polimernom rastvoru ili sistemu nosača (tj. nosaču), koji se zatim prevodi putem variranja parametara sistema (npr. pH, temperatura) u formu tečnog filma koji obavija aktivnu komponentu. Formiranje tečnog filma nosača se javlja na površini dispergovane aktivne komponente (koja može biti u čvrstom ili tečnom agregatnom stanju). Dobijene kapsule (koacervati) se dalje mogu dodatno gelirati (očvršćavati) ili pak sušiti do praškaste forme (Thies, 2005; Zuidam i Shimoni, 2010). Izgled formiranih koacervata koji kao aktivnu komponentu imaju ulje dat je na Slici 1.7.

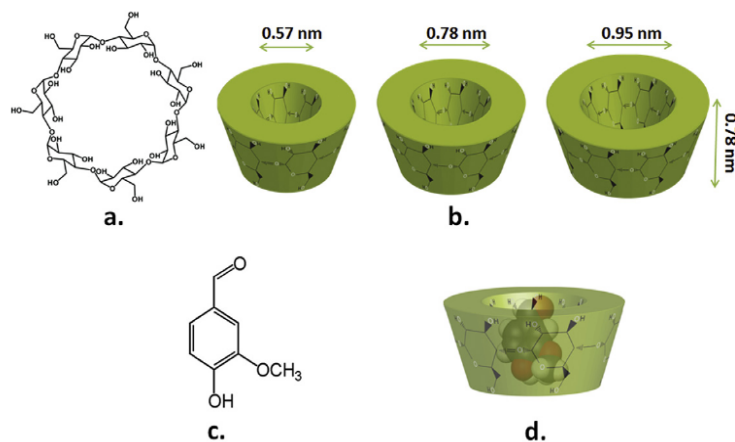


Slika 1.7. Ulje inkapsulisano metodom koacervacije (Gouin, 2004) (slika preuzeta uz dozvolu izdavača Elsevier).

Ukoliko se koristi više od dva polimera (suprotnih naelektrisanja), onda se proces naziva kompleksna koacervacija. U praksi se dosta koristi sistem guma arabika i želatin za dobijanje kompleksnih koacervata iz emulzija. Pored gume arabike, mogu se koristiti i drugi prirodni materijali koji su negativno naelektrisani (Zuidam i Shimoni, 2010).

1.1.2.7. Molekulska inkluzija

Molekulska inkluzija predstavlja metodu inkapsulacije koja se bazira na zadržavanju aktivne komponente unutar šupljina koje formiraju molekuli nosača. Svakako najpoznatiji i najrašireniji postupak inkapsulacije molekulskom inkluzijom predstavlja zadržavanje aktivne komponente unutar strukture ciklodekstrina. Formiranje ciklodekstrina je enzimski proces (enzim ciklodekstrin glukozotransferaza), pri kome se molekuli glukoze (poreklom iz skroba) povezuju α 1-4 vezama uz formiranje cikličnih oligosaharida tj. ciklodekstrina. Ciklodekstrini se dele prema broju molekula glukoze koje sadrže na: α (6 molekula), β (7 molekula) i γ (8 molekula) (Szente i Szejtli, 2004; Goh et al., 2009; Zuidam i Shimoni, 2010). Prikaz strukture ciklodekstrina i primer inkapsulacije aktivne komponente (vanilina) u strukuru ciklodekstrina je prikazan na Slici 1.8.



Slika 1.8. a) Hemijska struktura β ciklodekstrina; b) Struktura i okvirne dimenzije α , β i γ ciklodekstrina; c) Hemijska struktura vanilina; d) inkapsulirani vanilin unutar strukture ciklodekstrina (Kayaci i Uyar, 2012), (slike preuzete uz dozvolu izdavača Elsevier).

Zbog malog prostora koji zatvaraju molekuli glukoze pri formiranju ciklodekstrina ostaje relativno mali prostor za smeštanje aktivne supstance, što svakako umanjuje mogućnost njihove primene u procesima inkapsulacije. Pored toga, regulative nekih zemalja i organizacija ograničavaju upotrebu ciklodekstrina u proizvodima, što je takođe jedna od prepreka njihovoj široj upotrebi (Szente i Szejtli, 2004; Zuidam i Shimoni, 2010). U nekim slučajevima je dozvoljena njihova upotreba u procesima inkapsulacije (npr. aroma) ili tamo gde je potrebna zaštita aktivnih komponenti od oksidacije, dejstva svetlosti ili visoke temperature. Pored toga, ciklodekstrini (bez aktivne supstance) mogu se koristiti za modifikacije fizičkih svojstava hrane ili pak da maskiraju nepoželjna senzorna svojstva proizvoda (Szente i Szejtli, 2004).

Formiranje kompleksa između aktivne komponente i molekula ciklodekstrina tj. sam proces inkapsulacije se može realizovati na više načina: metodom koprecipitacije, metodom taloženja, metodom paste i metodom suvog mešanja (Hedges, 1998).

Od ostalih materijala koji se mogu upotrebiti u procesima inkapsulacije molekulskom inkluzijom treba pomenuti amilozu (inkapsulacija lipida) i β -laktoglobulin (Zuidam i Shimoni, 2010).

1.1.2.8. Lipozomi

Lipozomi predstavljaju nosače koji se sastoje iz fosfolipidnih membrana unutar kojih se smešta aktivna komponenta. Formiranje lipozoma se odvija u uslovima intenzivnog mešanja fosfolipida u vodenoj fazi. U osnovi, lipozomi nastaju kao rezultat interakcija (hidrofilno-hidrofobno) između fosfolipida i vode, pri čemu je aktivna komponenta u vodenoj fazi ili je pak vezana za membranu lipozoma. Lipozomi predstavljaju sisteme za inkapsulaciju aktivnih komponenti kod kojih se finalne dimenzije inkapsulata kreću od nekoliko nanometara do nekoliko mikrona. Za dobijanje lipozoma koriste se koloidni mlinovi ili postupak mikrofluidizacije. Kao materijali za dobijanje lipozoma dosta se koriste lecitin i holesterol. Mana lipozoma je u tome što vremenom mogu postati nestabilni i mogu stvarati krupnije agregate. Inkapsulisani proizvodi na bazi lipozoma su našli primenu pre svega u farmaceutskoj industriji a manje u proizvodnji hrane (Zuidam i Shimoni, 2010). U novije vreme se radi na korišćenju lipozoma kao nosača sa inkapsulaciju biološki aktivnih komponenti, pri čemu se kombinuje više metoda dobijanja inkapsulata (Isailović et al., 2013).

1.1.2.9. Emulzifikacija

Emulzije predstavljaju sastavne delove prehrambenih proizvoda, čija su priprema i stabilnost predmet brojnih istraživanja. Emulzije su dvofazni sistemi koji se sastoje od uljane i vodene faze. Osnovni uslov postojanja emulzije je uspostavljanje takvog sistema kod koga nema razdvajanja faza. Emulzije se uobičajeno pripremaju pomoću homogenizatora različitih konstrukcija. Osnovni zahtev koji se postavlja pred proces emulzifikacije je da se nakon pripreme emulzije određeno vreme zadrži njena stabilnost.

Ova metoda inkapsulacije je posebno pogodna za inkapsulaciju aroma i u mastima rastvorljivih vitamina (Appelqvist et al., 2007; Zuidam i Shimoni, 2010). Emulzifikacija se može koristiti i za dobijanje polimernih čestica, pri čemu je priprema emulzije jedan od koraka u proizvodnji (Poglavlje 1.1.2.10). Dalje, dobijene emulzije se mogu obrađivati i procesuirati drugim metodama inkapsulacije. Tako na primer, emulzije koje sadrže dispergovane kapljice arome (Soottitawat et al., 2005) ili pak ulja (Fuchs et al., 2006) mogu se dalje sušiti metodom sprej sušenja. Priprema stabilnih emulzija a posebno odabir odgovarajućih nosača je jedan od bitnih uslova za inkapsulaciju lipofilnih komponenti metodom liofilizacije (Kaushik i Roos,

2007). Pored toga, stabilne emulzije su bitne i kod dobijanja inkapsulata koji sadrže ulje i koji se dobijaju metodom ekstruzije uz primenu polisaharida kao nosača (Chan, 2011a).

Emulzifikacija se može primeniti i za dobijanje čvrstih lipidnih čestica sa inkapsulisanom aktivnom materijom. Princip metode se sastoji u tome da se otopljeni lipidni materijali (masti ili vosak) disperguju u vodi a zatim se hlade, pri čemu nastaju čvrste čestice sa inkapsulisanom aktivnom komponentom. Nedostatak ovog koncepta inkapsulacije je činjenica da može doći do nepotpune inkapsulacije ukoliko je aktivna komponenta rastvorljiva u vodi. (Zuidam i Shimoni, 2010). Ovaj postupak inkapsulacije je ispitivan u cilju zaštite osetljivih komponenti pre svega aroma i to kako u čvrstom tako i u tečnom stanju. Pokazalo se da se postupak dobijanja lipidnih čestica metodom emulzifikacije (disperzije) u otopljenom stanju može uspešno primeniti uz postizanje visoke inkapsulacione efikasnosti (Milanovic et al., 2010; Milanović, 2011b).

Opisana metoda inkapsulacije je korišćenja u ovom radu za dobijanje lipidnih mikročestica na bazi karnauba voska. Detaljnije o ovoj metodi je dato u Poglavlju 4.1.

1.1.2.10. Inkapsulacija u polimerne mikrosfere

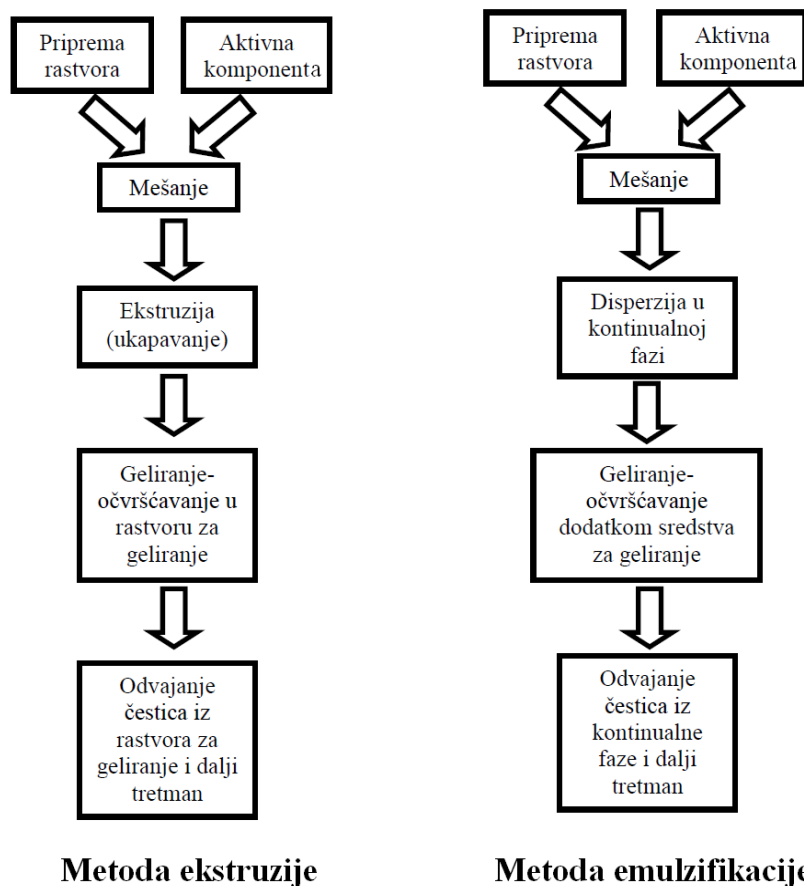
U literaturi se pod pojmom *mikrosfera* obično podrazumeva čestica na bazi biopolimera koja sadrži aktivnu komponentu. Ovakvi sistemi su intenzivno proučavani kao nosači ćelija, enzima, aditiva za hranu, etarskih i jestivih ulja, itd. (Nedović, 1999; Manojlović, 2008a; Zuidam i Shimoni, 2010, Chan, 2011a). Najzastupljeniji tip mikrosfera su čestice na bazi kalcijum alginata. Priprema mikrosfera na bazi kalcijum alginata je relativno jednostavna i generalno ne izaziva oštećenja aktivne komponente. Ovo je posebno važno ako se inkapsulišu žive ćelije, enzimi ili pak aktivne materije koje su osetljive na dejstvo povišenih temperatura (Manojlović, 2008a; Zuidam i Shimoni, 2010).

Metode dobijanja mikrosfera na bazi polimernih nosača se mogu podeliti u dve grupe:

- Metoda ekstruzije (ukapavanja);
- Metoda emulzifikacije.

Šematski prikaz metoda dobijanja polimernih mikrosfera dat je na Slici 1.9. Kao što se može videti, dobijanje polimernih čestica sa inkapsulisanom aktivnom komponentom se odvija u fazama, pri čemu se može konstatovati da svaka od prikazanih metoda ima svoje prednosti i mane, pre svega kada je u pitanju kontrola veličine čestica.

Dobijanje čestica metodom ekstruzije se bazira na disperziji polimernog rastvora (sa dispergovanom aktivnom komponentom) kroz kapilaru (najčešće iglu), pri čemu dolazi do formiranja kapi koje padaju u rastvor za geliranje. Na ovaj način je moguće dobiti polimerne mikrosfere na bazi alginata, ali i ostalih prirodnih polimera (Zuidam i Shimoni, 2010).



Slika 1.9. Šematski prikaz metoda dobijanja polimernih mikrosfera sa inkapsulisanom aktivnom komponentom.

Alginat je posebno pogodan za dobijanje mikročestica metodom ekstruzije jer sa divalentnim jonima (npr. Ca^{2+}) gradi stabilne gelove. Više o svojstvima alginata i njegovoj primeni u procesima inkapsulacije je dato u Poglavlju 4.2.

Kada je u pitanju alginat, uobičajeno je da se kao nosač koristi u obliku vodenih rastvora koncentracije 0.6-4.0%. U literaturi se najčešće koristi natrijum alginat u smeši sa aktivnom komponentom. Smeša se ukapava u rastvor za geliranje (najčešće 0.05-1.5 M rastvor kalcijum

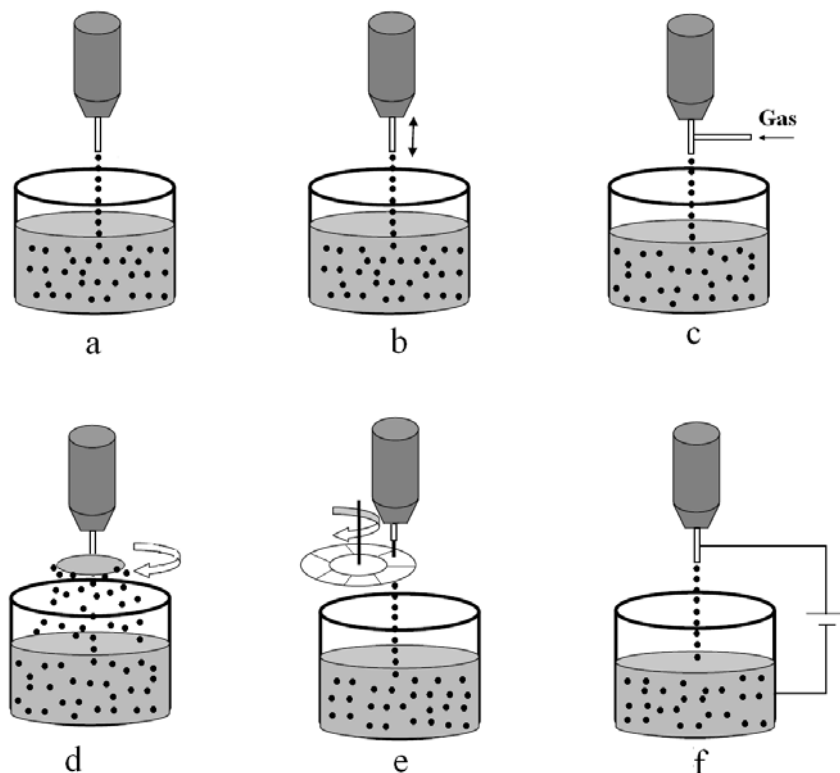
hlorida). Tako se dobijaju sferne čestice Ca-alginata koje mogu sadržati različite aktivne komponente i biokatalizatore (Nedović, 1999; Manojlović, 2008a; Zuidam i Shimoni, 2010).

Emulziona tehnika se bazira na primarnom formiranju emulzije u npr. biljnom ulju pre samog geliranja alginata. Ovaj metod je lakše primeniti u industrijskim uslovima ali se mora voditi računa da na površini formiranih sfera zaostaje ulje koje se mora odvojiti pre daljih tretmana i postupaka (Zuidam i Shimoni, 2010).

U nastavku je izvršena podela ekstruzionih postupaka s posebnim osvrtom na elektrostatičku ekstruziju koja je korišćena kao jedna od metoda inkapsulacije u ovom radu.

1.1.2.11. Ekstruzione metode i tehnike inkapsulacije

Ekstruzione tehnike inkapsulacije poslednjih godina su postale veoma zastupljene u procesima kod kojih je cilj dobijanje sfernih čestica na bazi polimernih materijala. Razvijeno je više metoda, kao što su: metoda ukapavanja; vibraciona metoda; metoda ukapavanja uz dejstvo sekundarnog toka vazduha; raspršivanje pomoću rotirajućeg ravnog diska; presecanje mlaza pomoću rotirajućeg diska i elektrostatička ekstruzija (Nedović, 1999). Šematski prikaz ekstruzionih metoda inkapsulacije prikazan je na Slici 1.10.



Slika 1.10. Ekstruzione tehnike: a) Metoda ukapavanja; b) Vibraciona metoda; c) Metoda ukapavanja uz dejstvo sekundarnog toka vazduha; d) Raspršivanje pomoću rotirajućeg ravnog diska; e) Presecanje mlaza pomoću rotirajućeg diska; f) Elektrostaticka ekstruzija (Nedović, 1999; Zuidam i Shimoni, 2010).

Metoda ukapavanja

Metoda ukapavanja pripremljene smeše nosača i aktivne komponente u rastvor za geliranje je najjednostavnija ekstruziona metoda (Slika 1.10a). Metoda se bazira na formiranju kapi polimer/aktivna komponenta na vrhu igle pod dejstvom gravitacione sile. Formirana kap se otkida sa vrha igle i pada u rasvor za geliranje. U toku procesa, neophodno je potiskivati pripremljeni materijal kroz iglu kako bi proces tekao neometano. Ovom metodom je moguće dobiti čestice prečnika od 2 do 3 mm. Mane ove metode su mali kapacitet i relativno veliki prečnik dobijenih čestica.

Vibraciona metoda

Vibraciona metoda se zasniva na primeni vibracija za formiranje kapi, koje nakon otkidanja sa vrha igle padaju u rastvor za geliranje (Slika 1.10b). U toku procesa, igla vibrira, što dovodi do prekidanja mlaza i formiranja kapi. Veličina čestica se reguliše podešavanjem frekvencije vibracija i brzine protoka tečnosti kroz iglu. Prednost ove metode je što se mogu dobiti čestice prečnika manjeg od 1 mm. Pored toga, ova metoda je pogodna za proizvodnju čestica kada se zahteva veća količina inkapsulisanog materijala.

Metoda ukapavanja uz dejstvo sekundarnog toka vazduha

Ova metoda se bazira na uvođenju sekundarnog toka vazduha u nivou otvora igle (Slika 1.10c). Na ovaj način je moguće dobiti čestice čiji prečnik može biti u rasponu od 0.2 do 3 mm. Nedostaci ove metode su nemogućnost postizanja velikih kapaciteta i neujednačenost veličine čestica. Poseban problem se javlja kada se koriste rastvori polimera većih koncentracija, pri čemu dolazi do prekida toka, posebno pri korišćenju igala manjih prečnika.

Metoda raspršivanja pomoću rotirajućeg ravnog diska

Metoda raspršivanja pomoću rotirajućeg ravnog diska je pogodna za proizvodnju čestica iz jako viskoznih suspenzija. Princip metode je u raspršivanju suspenzije pomoću diska koji rotira velikom brzinom (Slika 1.10d). Prečnik čestica se može regulisati podešavanjem brzine proticanja suspenzije i brzine rotiranja diska. Pored toga, veličina čestica zavisi i od prečnika diska i karakteristika suspenzije.

Metoda presecanja mlaza

Metoda presecanja mlaza se bazira na formiranju čestica pomoću rotora koji preseca mlaz tečnosti. Rotor se sastoji iz žičanih segmenata koji udarajući u mlaz tečnosti formiraju najpre segmente cilindričnog oblika koji dobijaju sferni oblik padajući ka rastvoru za geliranje (Slika 1.10e). Ova metoda je pogodna za proizvodnju čestica iz viskoznih rastvora polimera kao i za

procesu gde se zahteva veći kapacitet. Primenom ove metode je moguće dobiti uniformne čestice, prečnika manjih od 1 mm.

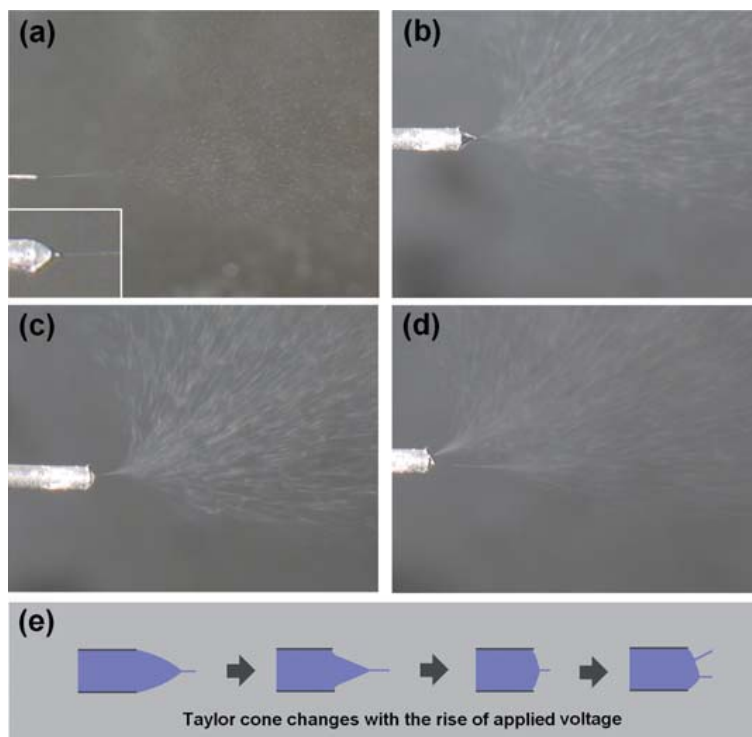
Elektrostatička ekstruzija

Elektrostatička ekstruzija se zasniva na primeni elektrostatičkog polja za proizvodnju kapi relativno malih dimenzija. Čestice nastaju kao posledica dejstva elektrostatičnog polja na tok tečnosti (Slika 1.10f). Kada nije primenjen napon, tj. kada čestice nastaju samo pod dejstvom gravitacije, kap koja se formira na vrhu igle se uvećava sve dok njena težina ne savlada površinski napon tečnosti pri čemu dolazi do otkidanja kapi. Kod elektrostatičke ekstruzije formiranje kapi (u slučaju alginata) dolazi kada sila elektrostatičkog polja nadvlada površinski napon tečnosti, pri čemu dolazi do otkidanja kapi, koja pod dejstvom gravitacije pada u rastvor za geliranje (Poncelet et al., 1999; Manojlović, 2008a; Kostić et al., 2012).

Elektrostatičko polje deluje na tok tečnosti (na vrhu kapilare), pri čemu se formirana kap sve više izdužuje u oblik konusa (tzv. Tejlorov konus) (Slika 1.11). Daljim dejstvom elektrostatičkog polja, tečnost se izdužuje u oblik „vlakna“, od koga se formiraju kapi koje padaju u rastvor za geliranje. Primena elektrostatičkog potencijala omogućava dobijanje sfernih alginatnih čestica sa različitim aktivnim inkapsulisanim komponentama. Osnovna prednost ove metode nad ekstruzijom bez primene elektrostatičkog polja je kontrola veličine čestica i dobijanje čestica željenog prečnika. Ovom metodom je moguće dobiti čestice mikrometarskih veličina (Nedović et al., 2001; Manojlović, 2008a; Kostić et al., 2012).

Na veličinu dobijenih čestica utiču pre svega fizičke karakteristike rastvora polimera, prečnik igle, rastojanje između igle i rastvora za geliranje, protok tečnosti i primenjeni napon (Bugarski et al., 1994; Nedović, 1999; Nedović et al., 2001, Kostić et al., 2012). Kada se govori o parametrima rastvora, viskozitet rastvora polimera koji se koriste kao nosači predstavlja jedan od najvažnijih reoloških parametara koji utiču na formiranje čestica pri elektrostatičkoj ekstruziji. Ovo je posebno vidljivo na primeru ekstruzije Na-alginata i dobijanju Ca-alginatnih čestica. Naime, sa povećanjem koncentracije alginata u rastvoru raste i viskozitet samih rastvora, što dovodi do otežavanja procesa ekstruzije. Pri relativno malim koncentracijama alginata (do 2%) mogu se pri određenim protocima dobiti uniformne čestice sfernog oblika sa prečnicima manjim

od 100 μ m. Međutim, sa povećanjem koncentracije alginata, raste i viskozitet rastvora što dovodi do formiranja izduženih tj. čestica nepravilnog oblika (Nedovic et al., 2006).



Slika 1.11. Efekat primenjenog napona na formiranje Tejlorovog konusa pri: a) 6 kV, b) 8 kV, c) 10 kV, d) 12 kV. e) Šema uticaja promene napona na formiranje konusa (Yu et al., 2011), (slike preuzete uz dozvolu izdavača RSC).

Pored parametara rastvora, na veličinu formiranih kapi (a samim tim i finalnih čestica) najveći uticaj ima samo elektrostatičko polje. Prečnik kapi (d) koja se dobija pod dejstvom elektrostatičkog polja je definisan izrazom:

$$d = d_0 \sqrt[3]{1 - \left(\frac{U^2}{U_c^2}\right)} \quad (1.1)$$

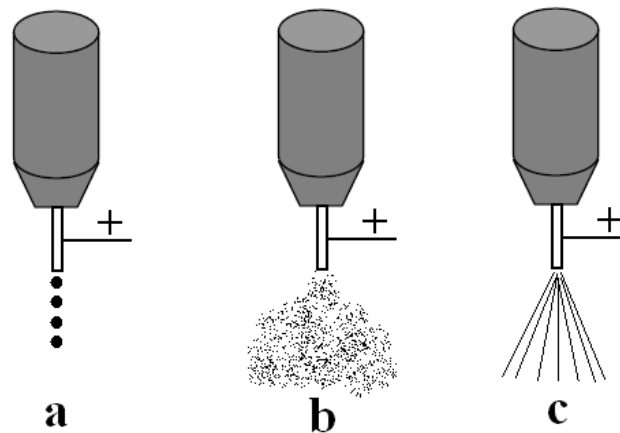
gde je d_0 prečnik kapi u odsustvu elektrostatičkog polja ($U = 0$) a U_c je kritični potencijal.

Veličina koja se uzima kao mera dejstva elektrostatičkog polja na tok tečnosti je kritični potencijal (U_c) na vrhu igle (kapilare), pri kome dolazi do formiranja kapi.

$$U_c = \sqrt{\frac{d_c \sigma_l}{k \epsilon_0}} \quad (1.2)$$

gde je d_c unutrašnji prečnik igle, σ_l površinski napon rastvora polimera, ϵ_0 dielektrična konstanta vazduha, dok k predstavlja parameter koji zavisi od vremena formiranja kapi i vremena adsorpcije polimera na površini kapi. Sam kritični potencijal zavisi od više parametara kao što su: rastojanje između vrha igle i kolektora (rastvora za geliranje, suprotno naelektrisan u odnosu na iglu), površinski napon tečnosti, protok rastvora, viskozitet rastvora, prečnik igle, polaritet i geometrija sistema za inkapsulaciju (Poncelet et al., 1999; Nedović et al., 2002; Kostić et al., 2012).

Primenom elektrostatičkog polja se pored mikročestica mogu dobiti i vlakna ili pak čestice koje su nanometarskih veličina (Slika 1.12).



Slika 1.12. Različiti postupci inkapsulacije bazirani na primeni elektrostatičkog polja: a) elektrostatička ekstruzija; b) elektrosprej; c) elektrospining. Igle (kapilare) su na ovoj šemi povezane na izvor pozitivnog naelektrisanja, dok se na suprotnom kraju nalazi kolektor povezan na izvor negativnog naelektrisanja.

Primenom visokog napona dolazi do formiranja polimernog mlaza na vrhu igle koji je privučen suprotno naelektrisanim kolektorom. Kada elektrostatička sila savlada površinski napon tečnosti, dolazi do formiranja Tejlorovog konusa sa čijeg vrha se odvaja polimerna „nit“. U toku puta od vrha igle do površine kolektora dolazi do formiranja polimernog vlakna uz istovremeno isparavanje rastvarača (Reneker et al., 1996; Ramakrishna et al., 2005; Qin et al., 2012).

Elektrostatička ekstruzija, kao metoda za inkapsulaciju široko je primenjivana u različitim oblastima biotehnologije. Generalno, primena elektrostatičke ekstruzije se može podeliti na oblasti biologije, inženjerstva tkiva, farmacije, fermentacija i inkapsulacija aktivnih hemijskih supstanci (npr. aroma, ekstrakata bilja, itd.) (Kostić et al., 2012). U kombinaciji sa odgovarajućim nosačima, elektrostatička ekstruzija predstavlja jako pogodnu metodu za inkapsulaciju ćelija i enzima. Nedović et al. (2001) su pokazali da je primenom elektrostatičke ekstruzije moguće dobiti čestice kalcijum alginata koje pružaju optimalne uslove za rast ćelija kvasca. Knezevic et al. (2002) su koristili elektrostatičku ekstruziju za imobilizaciju lipaze. Dobijeni imobilisani enzim je primenjen za hidrolizu palminog ulja, sa mogućnošću ponovne upotrebe enzima nakon reakcije. U kombinaciji sa različitim nosačima, elektrostatička ekstruzija (i modifikacije ove metode) je korišćena za imobilizaciju hepatocita u kombinovanom matriksu katjonskih i anjonskih polimera (Zhou et al., 2005), odnosno u kalcijum alginatni matriks (Xie i Wang, 2007). Elektrosparing kao tehnika za inkapsulaciju se može primeniti i za inkapsulaciju aroma. Camerlo et al. (2013) uspešno su inkapsulisali limonen u nanovlakna na bazi polivinil alkohola. Isti materijal je primenjen i kao nosač (u kombinaciji sa ciklodekstrinima) za inkapsulaciju vanilina (Kayaci i Uyar, 2012).

1.2. Materijali za inkapsulaciju

Inkapsulacijom biološki aktivnih materija, lekova, aditiva i biokatalizatora generalno se postiže veća hemijska i fizička stabilnost ili u slučaju ćelija (npr. kvasci, bakterije, itd.) bolja biokatalitička svojstva i otpornost na spoljašnje uticaje. Kako bi se udovoljilo specifičnim zahtevima koji se postavljaju pred inkapsulacione tehnologije, prvo je potrebno definisati koji materijali (materijali nosača) se mogu koristiti za inkapsulaciju datog tipa aktivne komponente ili biokatalizatora. Karakteristike materijala koji se koriste kao nosači u procesu inkapsulacije imaju najveći uticaj na svojstva inkapsulisane aktivne komponente. Koji materijal i u kom obliku primeniti za dati tip inkapsulacije je odluka koja mora biti doneta na bazi pažljivih analiza i istraživanja. Materijali koji se mogu primeniti u procesima inkapsulacije su brojni i njihova podela na pojedine grupe je krajnje uslovna. Koji materijal će se koristiti kao nosač aktivne komponente zavisi od vrste materijala koji treba da se inkapsuliše kao i od proizvoda ili procesa u kome će se inkapsulisani proizvod primenjivati. Materijali koji se koriste kao nosači za

inkapsulaciju prehrambenih aditiva moraju da zadovolje stroge kriterijume bezbednosti i da naravno budu odobreni za primenu u prehrambenoj industriji.

Svojstva materijala kao što su dobra kompatibilnost sa aktivnim sastojkom, dobro formiranje filmova, kontrolisano propuštanje gasova i vodene pare su svakako među najvažnijim koje materijal nosača treba da poseduje. Takođe, mogu se primeniti dva ili više materijala, pri čemu jedan na primer daje dobra mehanička svojstva, dok drugi predstavlja dobru barijeru za kiseonik. Ovakav pristup omogućava da se postignu željeni rezultati kombinovanjem poželjnih svojstava različitih materijala. Konačno, cena materijala i njihova dostupnost diktira koji će se materijal koristiti kao nosač aktivne komponente (Wandrey et al., 2010; Zuidam i Shimoni, 2010).

U Tabeli 1.1. je data podela materijala (na bazi njihovog porekla) koji se mogu upotrebiti kao nosači u procesima inkapsulacije.

Tabela 1.1. Podela materijala nosača prema poreklu (Wandrey et al., 2010).

Materijali biljnog porekla	Materijali životinjskog i mikrobnog porekla	Materijali dobijeni od morskih organizama	Ostali materijali
Skrob i derivati	Ksantan	Karagenan	Parafin
Celuloza i derivati	Gelan	Alginat	Polivinilpirolidon
Biljni ekstrudati (npr. guma arabika)	Dekstran		Polivinil alkohol
Biljni ekstrakti (npr. galaktomanani)	Hitozan		Oksidi silicijuma
Polisaharidi	Kazein		Oksidi aluminijuma
Gluten	Proteini surutke		
Biljni izolati (npr. izolati soje)	Želatin		
Masne kiseline	Masne kiseline		
Alkoholi	Alkoholi		
Voskovi	Voskovi		
Fosfolipidi	Fosfolipidi		
	Gliceridi		

Generalno, materijali nosača za inkapsulaciju se dele na ugljene hidrate, proteine, lipide, sintetičke i neorganske materijale. U nastavku je dat pregled i svojstva materijala nosača korišćenih u ovom radu: alginata, polivinil alkohola i karnauba voska.

U procesima inkapsulacije, ugljeni hidrati su najčešće primenjivani materijali nosača. Najzastupljeniji ugljeni hidrati u procesima inkapsulacije su: glukoza, fruktoza, saharoza,

laktoza, maltodekstrini, skrob i celuloza. Kako su ugljeni hidrati široko zastupljeni u prirodi, to ih čini izuzetno pogodnim za primenu u procesima inkapsulacije.

Posebno važna grupa ugljenih hidrata koja se koristi za inkapsulaciju su polisaharidi. Često se u literaturi sreću različiti nazivi za ovu veliku grupu jedinjenja kao npr. gume ili hidrokoloidi.

Od proteina se za potrebe inkapsulacije najviše upotrebljavaju gluten, kazein, proteini surutke i želatin (Wandrey et al., 2010).

Lipidi se takođe koriste u procesima inkapsulacije, gde pre svega dolaze do izražaja njihova hidrofobna svojstva. Ovo je heterogena grupa jedinjenja u koju spadaju supstance koje se veoma razlikuju po hemijskoj strukturi i karakteristikama. Od lipida u procesima inkapsulacije se koriste: masti, ulja, voskovi i fosfolipidi (Wandrey et al., 2010).

Može se reći da su sa aspekta inkapsulacije voskovi jedna od najznačajnijih grupa jedinjenja. Voskovi se prema poreklu dele na prirodne i veštačke. U grupu prirodnih voskova spadaju biljni, životinjski i voskovi fosilnog (mineralnog) porekla (Endlein i Peleikis, 2011; Jenkins i Friedman, 1949). U grupu biljnih voskova spadaju voskovi koji nastaju kao posledica metabolizma biljaka. Jedan od najvažnijih biljnih voskova (sa tehnološkog aspekta) je karnauba vosak. Pored karnauba voska, treba pomenuti i ostale biljne voskove koji potiču iz biljnog materijala kao što su cvetovi, plodovi i seme. Ovde od značajnih voskova treba izdvojiti kandelila vosak i japanski vosak, koji su po hemijskom sastavu manje složeni u poređenju sa karnauba voskom (Regert et al., 2005).

Od sintetičkih materijala koji se mogu koristiti u procesima inkapsulacije treba pomenuti polivinil pirolidon (PVP), koji se ističe dobrim svojstvima kada je u pitanju formiranje filmova. Pored toga, PVP se odlikuje dobrim termičkim svojstvima (Wandrey et al., 2010). Pored PVP-a, od sintetičkih polimera se još koristi i PVA u kombinaciji sa alginatom kako bi se dobile čestice traženih svojstava (Bezbradica et al., 2004).

1.2.1. Alginat

Istorijski gledano, alginat je relativno dugo poznat kao materijal u čistom obliku. Ovaj polisaharid prvi je otkrio E.E.C. Stanford 1881. godine pri analizi algi.

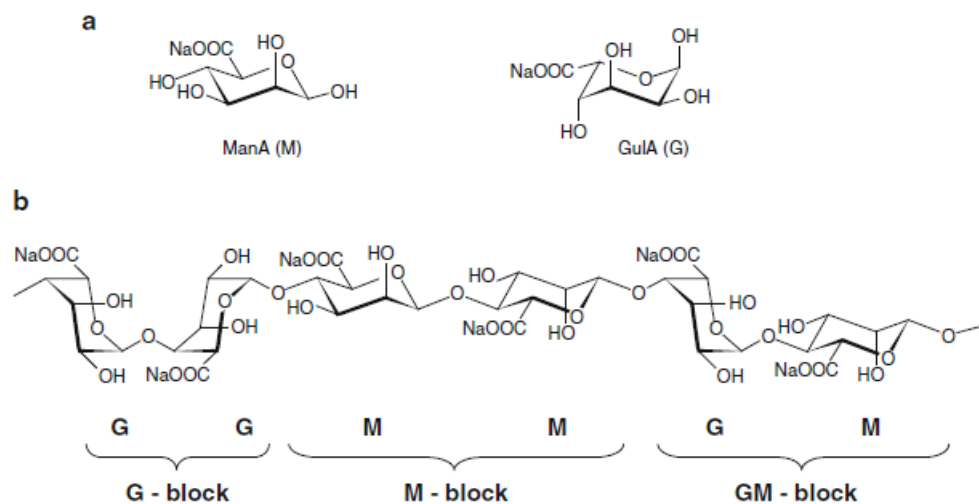
Komercijalni alginati se dobijaju iz algi koje se vade iz mora. Veliki proizvođač alginata je Norveška, mada se proizvodi i u drugim delovima sveta. Proces dobijanja alginata se sastoji iz vađenja algi iz mora, mlevenja biomase, kiselinskog pranja (uklanjanje nečistoća), ekstrakcija (u baznoj sredini) i filtracija. Postoji više proizvoda koji se mogu dobiti ovim procesom. Dalja prerada obično ide preko prevođenja alginske kiseline (slabo rastvorna u vodi) u njene soli, pri čemu se mogu dobiti (u zavisnosti od tretmana), natrijum-, kalijum- ili kalcijum alginat (Dreher, 2001).

Najzastupljeniji i komercijalno najznačajniji je alginat koji se dobija iz braon morskih algi (može dostići i do 40% suve materije algi). Vrste smeđih algi iz kojih se izdvajaju komercijalni alginati su: *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* i *Ascophyllum nodosum*. Komercijalno manje značajne vrste su: *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Eclonia maxima*, *Lesonia nigrascens* i *Sargassum sp.* Alginat ima važnu funkciju u strukturi tkiva algi. Ovaj polisaharid je smešten u intracelularnom matriksu u obliku gela, koji sadrži jone natrijuma, kalcijuma, magnezijuma, stroncijuma i barijuma. Osnovna funkcija ovih gelova jeste da daju čvrstinu i savitljivost koja je algama neophodna za rast u uslovima koji vladaju u moru.

Pored alginata iz algi, treba pomenuti da se i neke bakterijske vrste mogu koristiti za sintezu ovog polisaharida. Neke vrste iz roda *Pseudomonas* i *Azotobacter* u kontinualnim kulturama mogu dati značajne količine alginata (Nedović, 1999; Donati i Paoletti, 2009).

Alginati u hemijskom pogledu predstavljaju grupu jedinjenja sa kompleksnom strukturom, koja je definisana pre svega sastavom i organizacijom subjedinica. Generalno se može reći da su alginati linearni polisaharidi koji su rastvorni u vodi i koji se sastoje od ostataka β -D-manuronske (*M*) i α -L-guluronske kiseline (*G*), koji su međusobno povezani 1,4-glikozidnim vezama (Slika 1.13a) (Nedović, 1999; Donati i Paoletti, 2009).

U strukturi samog alginata postoje blokovi sastavljeni od β -D-manuronske (*M*) i α -L-guluronske kiseline (*G*), čiji sadržaj ima veliki uticaj na svojstva alginata i alginatnih gelova (Slika 1.13b).



Slika 1.13. Konformacija β -D-manuronske-ManA (M) i α -L-guluronske kiseline-GuIA (G) (a); Sastav blokova kod alginata (b) (Donati et al., 2009), (slike (uz modifikacije) preuzete uz dozvolu izdavača Springer).

Sastav i veličina pojedinih blokova određuju fizička svojstva alginata. Sastav blokova unutar strukture alginata je odgovoran pre svega za svojstva alginatnih gelova. Što se tiče uticaja strukture blokova na lance molekula i njihovu interakciju, može se reći da je ovaj uticaj bez značaja jer su u oglecima dobijeni skoro isti rezultati za različite strukture blokova.

Alginat u obliku soli (npr. Na-alginat) je rastvoran u vodi, pri čemu se dobijaju viskozni rastvori. Rastvorljivost alginata zavisi od sadržaja soli, pri čemu u slučaju povećanih koncentracija pojedinih soli (npr. KCl) može doći i do razdvajanja faza u rastvoru alginata. Može se reći da prisustvo pojedinih soli smanjuje rastvorljivost alginata u vodi, čak i u koncentracijama manjim od 0,1M. S druge strane, ovo se može iskoristiti za izdvajanje i prečišćavanje alginata. Pored soli, na rastvorljivost alginata utiče i pH vrednost rastvora, pri čemu je efekat posebno izražen u kiseloj sredini gde može doći do razdvajanja faza. Ova pojava je izraženija kod alginata koji u svom sastavu imaju više MG subjedinica nego kod onih kod kojih dominiraju G i M subjedinice. Viskozitet alginatnih rastvora zavisi od dužine alginatnog lanca, odnosno molekulske mase. Sa povećanjem molekulske mase, raste i viskozitet alginatnih rastvora. Ovo je posebno važno kod primene alginata u prehrambenoj industriji (Donati i Paoletti, 2009).

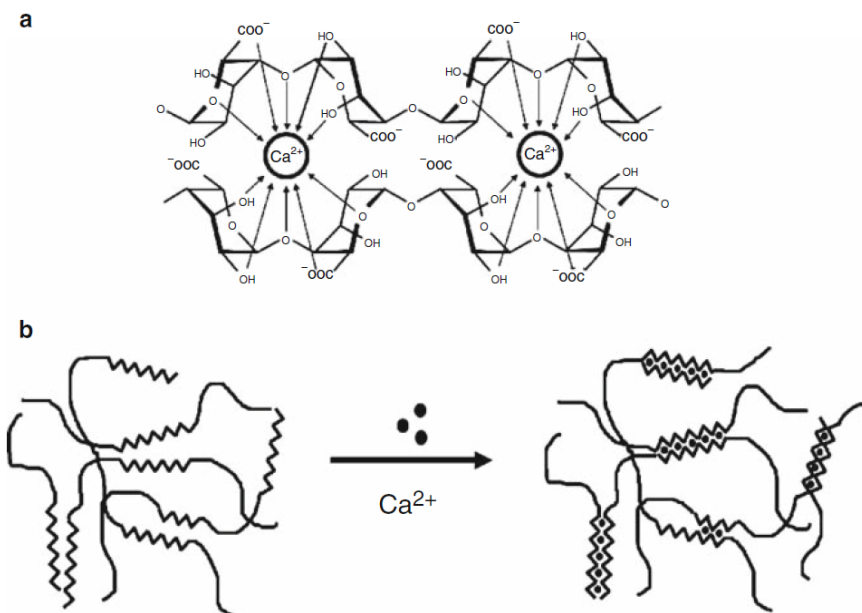
Dobijanje polimernih gelova zavisi od niza činilaca a pre svega je uslovljeno svojstvima samih polimera i metodom (mehanizmom) geliranja. Mehanizam formiranja polimernih gelova se generalno može podeliti u sledeće grupe:

- Hemotropni gelovi-formiraju se hemijskim interakcijama unutar molekula. Primeri gelova dobijenih ovim mehanizmom su: polistirenske ili poliakrilne jonoizmenjivačke soli ili umreženi dekstrani;
- Jonotropni gelovi-formiraju se putem izmene jona. Primeri gelova dobijenih ovim mehanizmom su: sistemi alginat/polilisin i sistemi na bazi hitozana i polifosfata.
- Helatotropni gelovi-formiraju se putem stvaranja helatnih reakcija. Primeri gelova dobijenih ovim mehanizmom su: alginatni gelovi umreženi sa divalentnim jonima;
- Solvotropni gelovi-formiraju se putem izmene sastava rastvarača. Primeri gelova dobijenih ovim mehanizmom su koacervati.
- Termotropni gelovi-formiraju se zagrevanjem početnog polimera. Primeri gelova dobijenih ovim mehanizmom su modifikovani gelovi na bazi hidroksietil celuloze;
- Psihrotrofni gelovi-formiraju se hlađenjem (ne smrzavanjem) početnog polimera. Primeri gelova dobijenih ovim mehanizmom su gelovi na bazi: želatina, skroba, agara i karagenana.
- Kriotropni gelovi-formiraju se smrzavanjem početnog polimera. Primer gelova dobijenih ovim mehanizmom su gelovi na bazi polivinil alkohola (Lozinsky et al., 2003).

Mehanizam formiranja alginatnih gelova

Jedno od najpoznatijih svojstava alginata je formiranje gelova u prisustvu određenih katjona. Ovo svojstvo alginata je jedno od ključnih za njihovu primenu u različitim oblastima biotehnologije. Alginati ispoljavaju specifičan afinitet prema vezivanju određenih katjona. Ovaj

afinitet prema katjonima bi mogao da se predstavi: $Pb^{2+} > Cu^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Mn^{2+} > > Mg^{2+}$. Mehanizam formiranja alginatnih gelova je prvenstveno vezan za G blokove unutar molekula alginata. Interakcija G blokova pri formiranju gelova se može pokazati na primeru Ca^{2+} katjona (Slika 1.14):



Slika 1.14. Mehanizam formiranja alginatnog gela jonima Ca^{2+} (Model “kutije za jaja”) (a); Šema interakcije između lanaca alginata pri formiranju gela (b) (Donati et al., 2009), (slike (uz modifikacije) preuzete uz dozvolu izdavača Springer).

U literaturi se model formiranja alginatnog gela u reakciji sa dvovalentnim katjonima često naziva Model “kutije za jaja” (Egg-box model). U reakciju stupaju po dva G bloka iz svakog od dva lanca alginata i formiraju spoj (čvor). Mehanička otpornost alginatnih gelova dobijenih u reakciji sa dvovalentnim katjonima zavisi pre svega od strukture i veličine molekula alginata. Kao što je već rečeno, u formiranju alginatnih gelova, najvažniju ulogu imaju G blokovi. Pokazalo se da visok sadržaj α -L-guluronske kiseline u lancu alginata povoljno utiče na mehaničku stabilnost gela. Pored toga, učestalost GG blokova u molekulu alginata takođe je značajno sa stanovišta mehaničke stabilnosti gela (Nedović, 1999; Donati i Paoletti, 2009).

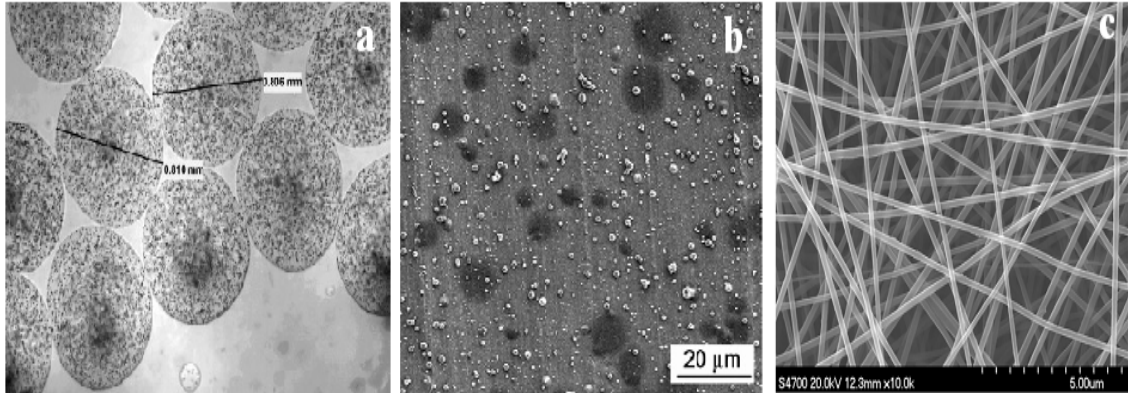
Pored geliranja dvovalentnim jonima, alginati u određenim vrednostima pH mogu dati tzv. kiselinske gelove. I u slučaju kiselinskih gelova, pretpostavka je da je za njihovo formiranje odgovoran sadržaj G blokova u molekulu alginata (Donati i Paoletti, 2009).

Alginatni gelovi dobijeni geliranjem sa dvovalentnim katjonima su ispitivani kako za potrebe inkapsulacije različitih aktivnih komponenti, tako i za inkapsulaciju biokatalizatora. Proces formiranja čestica (obično sfernog oblika) na bazi alginata i u prisustvu dvovalentnih jona je relativno jednostavan. Uobičajeno je da se rastvor alginata u kome je i aktivna komponenta propušta kroz kapilaru, pri čemu se na vrhu kapilare formiraju kapi koje se otkidaju i padaju u tzv. rastvor za geliranje, gde dolazi do zamene jona i formiranje gela kao što je prethodno objašnjeno. U literaturi se kao sredstvo za geliranje alginata najčešće koristi vodeni rastvor CaCl_2 . Pri formiranju alginatnog gela u reakciji sa dvovalentnim katjonima, dolazi do kontrakcije zapremine čestica i gubitka vode. Ovo je posebno izraženo kod alginata sa smanjenim sadržajem GG blokova. Sama procedura je jednostavna i ne utiče negativno na svojstva inkapsulisane materije, što je posebno bitno u slučaju inkapsulacije živih ćelija. Kada je reč o veličini alginatnih čestica, u literaturi se mogu naći podaci da ona varira od $200\mu\text{m}$ do 3mm . Veličina zavisi pre svega od primene inkapsulisane aktivne materije ali i od svojstava alginatnog rastvora i primenjene tehnike inkapsulacije (Nedović, 1999; Nedović 2001).

Difuzione karakteristike alginatnih gelova tj. veličina njihovih pora su važan faktor kada je u pitanju prenos materije kroz gel i stabilnost inkapsulisane aktivne materije. U literaturi postoje različiti podaci za veličinu pora kod alginatnih gelova. Generalno se može reći da pore dostižu veličinu do 200nm . Na veličinu pora utiče više faktora, a pre svega struktura i koncentracija alginata, kao i kinetika formiranja gela. Difuzione karakteristike gela su bitne pre svega zbog transporta materija kod sistema sa imobilisanim ćelijama (Nedović, 1999).

U oblasti biotehnologije, alginatni gelovi se najčešće koriste u obliku sfernih čestica različitih dimenzija. U praksi se za dobijanje alginatnih čestica koriste tehnike koje se baziraju na primeni spoljašnje sile za dispergovanje alginata u obliku kapi koje padaju u rastvor za geliranje gde dobijaju konačni oblik i dimenzije (Nedović et al., 2001; Prüsse et al., 2008).

Alginat omogućava rad sa različitim tehnikama inkapsulacije. Primenom elektrostatičkog polja pri višim razlikama potencijala moguće je dobiti različite oblike kao što su mikročestice (Bonino et al., 2011) ili pak nanovlakna (Ma et al., 2012) (Slika 1.15).



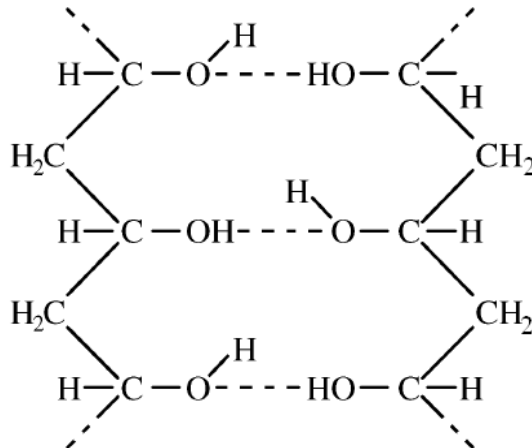
Slika 1.15. Primeri sistema inkapsulacije koji se baziraju na alginatu kao nosaču: a) Alginatne čestice sa inkapsulisanim ćelijama kvasca (Nikolić et al., 2009); b) Mikročestice alginata (Bonino et al., 2011); c) Nanovlakna na bazi alginat/polietilen oksid (Ma et al., 2012) (slike (uz modifikacije) preuzete uz dozvolu izdavača Elsevier).

Alginat u formi gela dobijenog umrežavanjem pomoću Ca^{2+} jona se može koristiti za inkapsulaciju živih ćelija za potrebe fermentacija, dobijanje inkapsulisanih probiotskih kultura (Nedović, 1999; Manojlović et al., 2010), ćelija kvasca (Nikolić et al., 2009) ili pak enzima (Knezevic et al., 2002). Pored svojstva formiranja gelova u prisustvu dvovalentnih katjona, rastvori alginata su se pokazali i kao dobri stabilizatori emulzija. Ovo svojstvo alginatnih rastvora je od ključnog značaja pri inkapsulaciji hidrofobnih aktivnih materija, a pre svega biljnih ulja. U ovom slučaju alginat ima dvostruku ulogu: stabilizuje emulziju pre inkapsulacije tj. sprečava razdvajanje faza i ujedno služi kao nosač za inkapsulaciju (Chan, 2011a).

1.2.2. Polivinil alkohol

Polivinil alkohol (PVA) je sintetički polimer koji je zahvaljujući svojim karakteristikama našao brojne primene u raznim oblastima industrije i nauke. Sinteza PVA je prvi put izvršena 1924. godine i to hidrolizom polivinil acetata. Danas se PVA dobija po sličnom, kontinualnom postupku sinteze. PVA se obično dobija u obliku belog praha, koji je bez mirisa i ukusa. U zavisnosti od stepena hidrolize, PVA se može dobiti kao delimično ili potpuno hidrolizovan. PVA se rastvara u vodi, dok mu je rastvorljivost u organskim rastvaračima slaba (Saxena, 2004). Stepem hidrolize ima veliki uticaj na svojstva PVA. Sa povećanjem stepena hidrolize, opada rastvorljivost u vodi, povećava se mehanička otpornost i otpornost na rastvarače (Goodship i Jacobs, 2009).

Jedno od najvažnijih svojstava PVA je spontano formiranje vodoničnih veza između OH grupa susednih lanaca polimera rastvorenog u vodi (Wittlich et al., 2004). Pored toga, dodatak borata takođe može da dovede do umrežavanja PVA i formiranja gelova (Liang et al., 2009). Molekulska struktura PVA i mehanizam formiranja vodoničnih veza su dati na Slici 1.16.



Slika 1.16. Struktura PVA i mehanizam spontanog formiranja vodoničnih veza u molekulu PVA (Wittlich et al., 2004), (slika preuzeta uz dozvolu izdavača Kluwer Academic Publishers).

Spontanom geliranjem PVA na temperaturama iznad 0°C formiraju se slabi, nestabilni gelovi, koji nisu pogodni za upotrebu (Wittlich et al., 2004). Pored toga, upotreba bora kao sredstva za

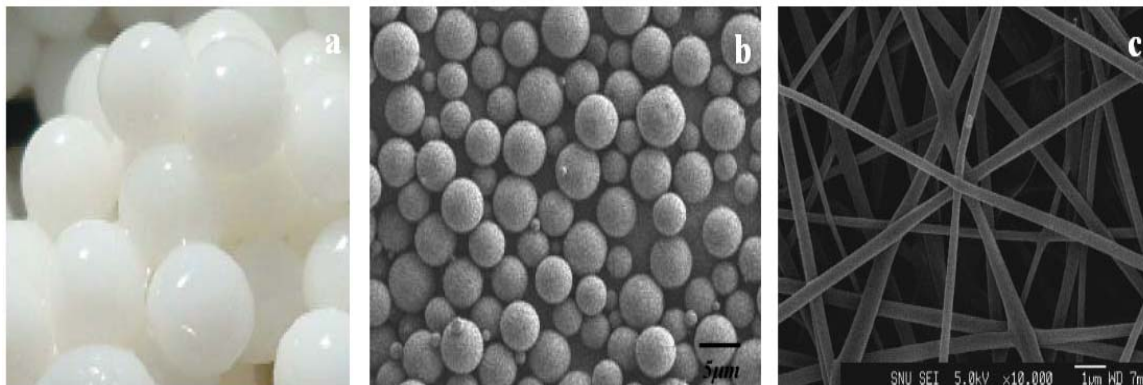
geliranje je nepoželjna zbog rizika po zdravlje (Zaijun et al., 2006). Poboljšanje svojstava PVA gelova je moguće ostvariti korišćenjem metode smrzavanja-otapanja. Ova procedura dovodi do formiranja znatno jačih vodoničnih veza, pri čemu dobijeni gelovi imaju veću mehaničku otpornost (Wittlich et al., 2004). Gelovi dobijeni metodom smrzavanja-otapanja se u literaturi još nazivaju i „krio gelovi“. Krio gelovi se dobijaju smrzavanjem monomera ili polimera. Karakteriše ih porozna struktura koja pokazuje dobre difuzione karakteristike, što je od velikog značaja za inkapsulaciju biokatalizatora. Suštinski, za dobijanje krio gelova je bitna kristalizacija rastvarača, koja omogućava formiranje konačne strukture nakon otapanja (Lozinsky et al., 2003).

Pored metode smrzavanja-otapanja, na tržištu je moguće naći komercijane materijale na bazi PVA koji se mogu koristiti za inkapsulaciju različitih biokatalizatora. LentiKat® predstavlja posebno pripremljeni PVA nosač kod koga se umrežavanje vrši gubitkom vode u već formiranim česticama i njihovom naknadnom regeneracijom u posebnom rastvoru. Pomenuti sistem inkapsulacije omogućava dobijanje visoko aktivnih biokatalizatora uz zadovoljavajuću mehaničku čvrstinu čestica (Wittlich et al., 2004; Bezbradica et al., 2007).

Polivinil alkohol je našao široku primenu u različitim oblastima industrije. Koristi se kod proizvodnje stakla za automobile, kao vezivo za boje, u proizvodnji deterdženata kao i u proizvodnji polimernih emulzija. Takođe, koristi se u tekstilnoj industriji, u građevinarstvu kao sredstvo za ojačanje betona, proizvodnju užadi, u proizvodnji papira i za degradabilne kese za otpad. U procesima inkapsulacije, PVA je ispitivan kao nosač za inkapsulaciju aktivnih materija za potrebe primarne poljoprivredne proizvodnje. Ovde je akcenat na kontrolisanom otpuštanju aktivne materije i na biodegradaciji PVA. Delimično hidrolizovani PVA je našao primenu u prehrambenoj industriji, gde se koristi kao zaštita proizvoda od dejstva vlage. Pored zaštite od vlage, PVA predstavlja i dobru barijeru za kiseonik i druge spoljašnje uticaje, pri čemu može da maskira ukus i miris proizvoda. Prema podacima koji se mogu naći u literaturi, PVA se dodaje u tablete koje se koriste kao dodatak ishrani. Pored ovih proizvoda, PVA se primenjuje i u proizvodnji čokolade, sladoleda i nekih mlečnih proizvoda kao i u nekim proizvodima na bazi žitarica (Saxena, 2004).

Dobijanje inkapsuliranih sistema na bazi PVA se može vršiti uz primenu različitih metoda kako bi se dobili željeni oblici inkapsulata i dimenzije sistema (Slika 1.17.). Elektrostatička ekstruzija se koristi kao jedna od metoda za dobijanje širokog opsega veličina čestica kao i za inkapsulaciju različitih aktivnih komponenti (Levic et al., 2013). Pored toga što se koristi za

dobijanje mikročestica, PVA se može koristiti kao nosač i kod drugih metoda inkapsulacije kao što je disperzija pomoću gasa sa naknadnim geliranjem (Yang et al., 2008). Posebnu pažnju u novije vreme privlače filmovi na bazi PVA dobijeni procesom elektrosponinga. U osnovi, ovi filmovi se sastoje od velikog broja nanovlakana koja formiraju mrežu tj. osnovnu strukturu filma (Hong et al., 2007).



Slika 1.17. Primeri sistema inkapsulacije koji se baziraju na polivinil alkoholu kao nosaču: a) čestice PVA/alginat sa inkapsulisanim enzimom (Nunes et al., 2010); b) PVA čestice sa Fe₂O₃ (Yang et al., 2008); c) PVA nanovlakna sa AgNO₃ (Hong, 2007) (slike (uz modifikacije) preuzete uz dozvolu izdavača Springer (Slika 1.17a), i Wiley (Slika 1.17b-c)).

U novije vreme se sve više radi na novim materijalima kako bi se dobila biodegradabilna ambalaža i ujedno našla zamena za postojeće plastične materijale. Polivinil alkohol je jedan od materijala koji se izučavaju kao potencijalni materijal za dobijanje biodegradabilne plastike (Goodship i Jacobs, 2009).

U ostalim oblastima biotehnologije, PVA je istraživani kao nosač za inkapsulaciju različitih aktivnih materija i biokatalizatora. U obliku posebno dizajniranih čestica, PVA je korišćen za imobilizaciju ćelija kvasca i njihovu primenu u primarnoj fermentaciji piva. Ostvareni rezultati pokazuju da PVA predstavlja dobru sredinu za rast ćelija kvasca (Bezbradica et al., 2007). Pored mikroorganizama, PVA je ispitivan i kao nosač za imobilizaciju enzima (Nunes et al., 2010). Hidrogelovi na bazi PVA se koriste u medicini kao nosači lekova, za izradu implanta i aktivnih zavoja za tretman rana (Goodship i Jacobs, 2009).

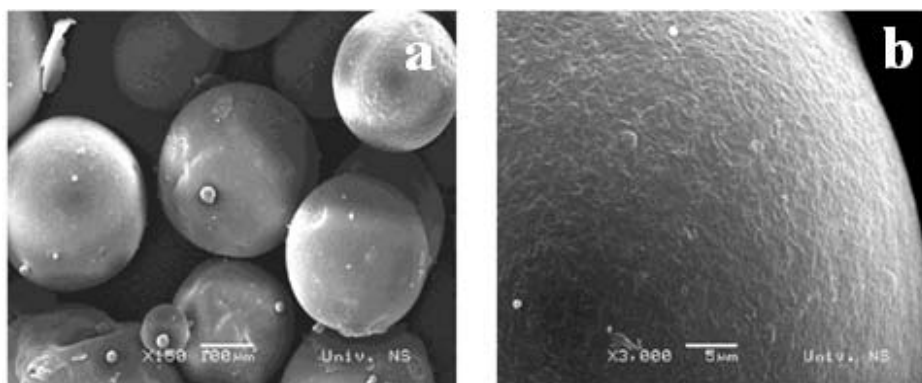
1.2.3. Karnauba vosak

Karnauba vosak je prirodni produkt metabolizma Karnauba palme (*Copernicia prunifera*), čija su prirodna staništa severo-istočne oblasti Brazila. Sam vosak se može opisati kao biljna izlučevina, koja se nalazi na površini listova. Sa aspekta metabolizma same biljke vosak predstavlja barijeru koju biljka proizvodi kako bi sprečila gubitak vode tokom sušnog perioda vegetacije. Vosak se sakuplja sa površine listova (koji su prethodno osušeni) u obliku praha. Voštani prah se zatim otapa i oslobađa nečistoća, potom se prevodi u čvrsto stanje hlađenjem i na kraju prerađuje (najčešće lomi) u ljuspice i kao takav se uglavnom može naći u prodaji. Postoje dve osnovne klase karnauba voska sa više podklasa. Ova klasifikacija je izvršena na bazi starosti sirovine tj. lišća sa koga se sakuplja vosak. Prva klasa je klasa voska dobijena od lišća koje raste u sredini i još uvek nije otvoreno pri berbi a druga klasa se dobija sakupljanjem voska za otvorenog lišća. Dalje podele klasa su bazirane na boji voska i sadržaju vlage (Jenkins i Friedman, 1949).

Karnauba vosak se smatra jednim od najtvrdih voskova. Takođe ima izuzetno visoku tačku topljenja, koja je se obično kreće oko 82-86°C (Lakkis, 2007).

Prema hemijskom sastavu, karnauba vosak predstavlja složenu smešu različitih organskih materija. Od komponenti koje karnauba vosak sadrži treba izdvojiti alkohole koji u svojoj strukturi imaju od 28 do 34 ugljenikova atoma, pri čemu se prema raspoloživim podacima dobijenim gasnohromatografskom analizom izdvaja alkohol sa 34 C atoma kao glavna komponenta među alkoholima. Pored toga, karnauba vosak u svom sastavu ima i manje količine palmitinske i stearinske kiseline. U hemijskoj strukturi karnauba voska pored alkohola dugog lanca, zastupljeni su i estri dugog lanca koji mogu imati od 48 do 62 ugljenikova atoma, pri čemu je najzastupljeniji estar sa 56 C atoma. Takođe, karnauba vosak sadrži i masne kiseline koje sadrže od 16 do 30 ugljenikova atoma (Regert et al., 2005).

Karnauba vosak se zbog svojih svojstava meša sa drugim voskovima u cilju poboljšanja njihovog kvaliteta i zadovoljenja specifičnih tehnoloških zahteva (Lakkis, 2007). U procesima inkapsulacije, karnauba vosak je korišćen kao nosač u kombinaciji sa aromama kao aktivnim komponentama. Metodom disperzije u vodi otopljenog voska i arome dobijene su sferne čestice uz veliku inkapsulacionu efikasnost (Slika 1.18) (Milanovic et al., 2010; Milanović, 2011b).



Slika 1.18. a) SEM slike čestica karnauba voska sa inkapsulisanom aromom; b) površina čestica karnauba voska sa inkapsulisanom aromom (Milanovic et al., 2010), (slika preuzeta uz dozvolu izdavača MDPI).

Posebno treba istaći primenu karnauba voska za inkapsulaciju farmaceutskih komponenti. Zbog svojih svojstava, karnauba vosak se relativno jednostavno može primeniti kao nosač za dobijanje čestica uz upotrebu različitih disperzionih tehnika (Albertini et al., 2010; Kheradmandnia et al., 2010; Balducci et al., 2011).

1.3. Inkapsulacija aroma

1.3.1. Arome-podela, karakteristike i značaj za prehrambenu industriju

Arome su veoma zastupljene u prehrambenoj industriji i predstavljaju jednu od najvažnijih grupa aditiva. Kako bi se regulisalo koja aroma i u kojoj količini sme da bude zastupljena u nekom proizvodu, donose se odgovarajuće odredbe i pravilnici. Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za arome za prehrambene proizvode (2006), definiše arome na sledeći način: " Arome su materije koje se koriste ili su namenjene za korišćenje pri proizvodnji namirnica da bi im se dao miris, odnosno ukus, a obuhvataju aromatične supstance, aromatične preparate, arome termičkog tretmana, arome dima i njihove mešavine".

Prema istom pravilniku, aromatične supstance se dele na:

- a) „Prirodno aromatične supstance koje se dobijaju odgovarajućim fizičkim (uključujući destilaciju i ekstrakciju rastvaračima), enzimskim ili mikrobiološkim postupcima iz materijala biljnog ili životinjskog porekla, koji može biti u sirovom obliku ili prerađen tradicionalnim postupcima za pripremanje hrane (uključujući sušenje, torefakciju i fermentaciju)“;
- b) „Prirodno identične aromatične supstance koje se dobijaju hemijskim sintezama ili hemijskim postupcima izolovanja, pri čemu su hemijski identične sa supstancama koje su prirodno prisutne u odgovarajućem materijalu biljnog ili životinjskog porekla (iz tačke a)“;
- c) „Veštačke aromatične supstance koje se dobijaju hemijskim sintezama, pri čemu nisu hemijski identične sa supstancama koje su prirodno prisutne u odgovarajućem materijalu biljnog ili životinjskog porekla (iz tačke a)“.

Pravilnik daje i definicije za aromatične preparate: „Aromatični preparati su koncentrovani ili nekoncentrovani proizvodi u koje ne spadaju aromatične supstance, koji imaju aromatična svojstva, a dobijaju se odgovarajućim fizičkim (uključujući destilaciju i ekstrakciju rastvaračima), enzimskim ili mikrobiološkim postupcima iz materijala biljnog ili životinjskog porekla u sirovom obliku ili posle prerade tradicionalnim postupcima za pripremanje hrane (uključujući sušenje, torefakciju i fermentaciju)“.

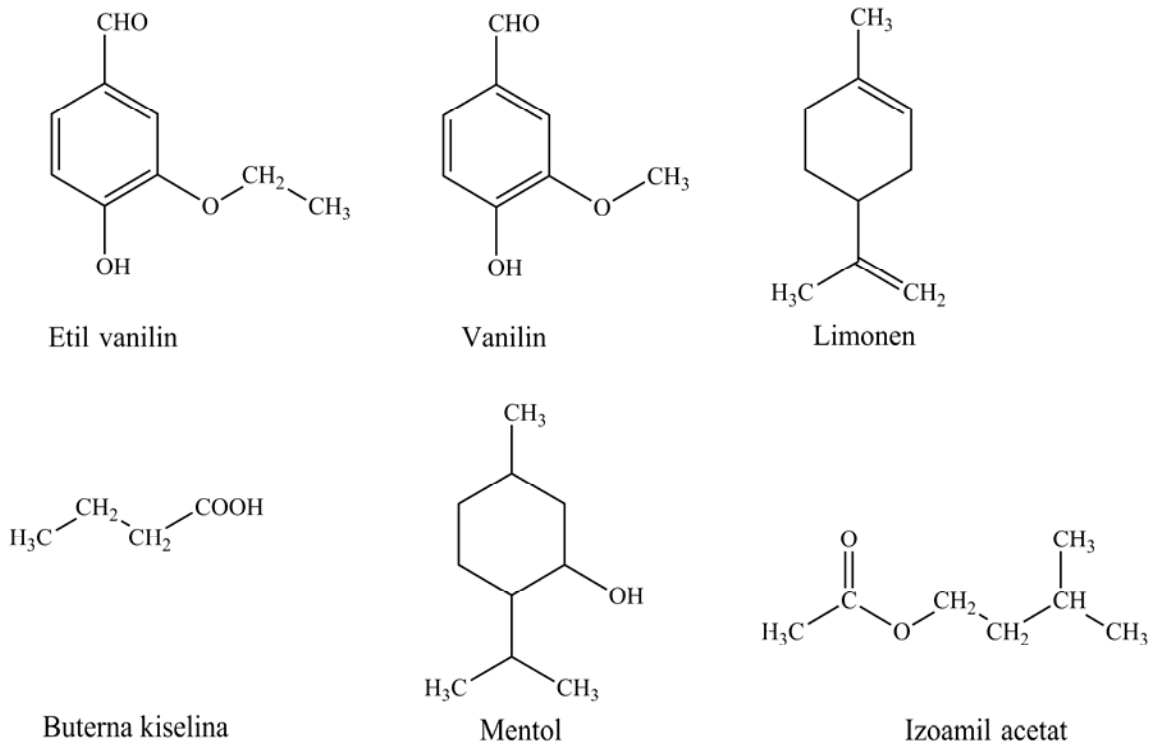
Arome termičkog tretmana su definisane kao: „Arome termičkog tretmana su proizvodi koji se dobijaju u skladu sa principima dobre proizvođačke prakse zagrevanjem najduže 15 minuta na temperaturi od najviše 180°C mešavine sastojaka koji sami ne moraju da imaju aromatična svojstva i od kojih najmanje jedan sadrži amino grupu i najmanje jedan je redukujući šećer“.

Na kraju, arome dima se po ovom pravilniku definišu: „Arome dima su ekstrakti dima koji se koristi u tradicionalnim postupcima dimljenja hrane, a obuhvataju primarne arome dima i izvedene arome dima“. Pored odredbi koje definišu šta su arome, isti Pravilnik definiše i supstance koje se ne smatraju aromama:

- 1) „Jestive supstance i proizvodi koji su namenjeni za konzumiranje kao takvi ili posle rekonstitucije“;
- 2) „Supstance koje imaju isključivo sladak, kiseo ili slan ukus“;
- 3) „Materijali biljnog ili životinjskog porekla koji imaju aromatična svojstva, kada se ne koriste kao sirovina za proizvodnju aroma“ (Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za arome za namirnice, 2006).

Arome su po svom hemijskom sastavu složene smeše isparljivih organskih supstanci. Javljaju se u sva tri agregatna stanja i obično se radi o supstancama male molekulske mase. Od najvažnijih grupa jedinjenja u sastav aroma mogu ući: ugljovodonici, alkoholi, aldehidi, ketoni, estri, kiseline, itd. Većina supstanci koje ulaze u sastav aroma su lipofilne prirode, mada ima i hidrofilnih jedinjenja (Zuidam i Heinrich, 2010). Primeri nekih od organskih jedinjenja koja ulaze u sastav aroma su dati na Slici 1.19.

Etil vanilin (3-etoksi-4-hidroksibenzaldehid) je karakterističan po mirisu na vanilu. Ova sintetička aroma je našla primenu kako u prehrambenoj industriji tako i u kozmetičkim proizvodima. Prednost etil vanilina je u tome što ima intenzivniji miris u odnosu na vanilin (3-metoksi 4-hidroksibenzaldehid), koji je za razliku od etil vanilina prirodni produkt. Treba reći da je etil vanilin manje rastvoran u vodi u odnosu na vanilin (Burdock, 2009; Hussain et al., 2001).



Slika 1.19. Hemijska struktura nekih od najvažnijih jedinjenja koja ulaze u sastav aroma.

Limonen je nađen u mnogim biljkama i etarskim uljima a posebno se po sadržaju ovog jedinjenja ističu citrusi. Ova tečna aroma je našla široku primenu u prehrambenoj industriji (Burdock, 2009; Sahraoui et al., 2011) ali u novije vreme i kao potencijalno sredstvo protiv ćelija tumora (Nakaizumi et al., 1997; Uedo et al., 1999; Del Toro-Arreola et al., 2005). Mentol je jedinjenje čiji miris odgovara mirisu nane (mente). Buterna kiselina se, kao što joj i samo ime sugeriše, odlikuje mirisom koji odgovara mirisu maslaca, dok izoamil acetat ima miris koji najviše odgovara mirisu banana i kruške (Burdock, 2009; Zuidam i Heinrich, 2010). Ovo je primer nekih od najvažnijih aroma i komponenti aroma koje se sreću u prehrambenoj industriji. U nastavku je dat pregled najvažnijih metoda inkapsulacije aroma.

1.3.2. Tehnike i materijali za inkapsulaciju aroma

U procesima inkapsulacije aroma se koriste različite tehnike i materijali u cilju dobijanja željenih svojstava inkapsulata. Neke od tehnika inkapsulacije aroma se primenjuju intenzivno na industrijskom nivou, dok su druge razmatrane samo kroz potencijalnu primenu i istraživanja.

Procesom inkapsulacije aroma mogu se postići sledeći efekti: lakše manipulisanje tokom proizvodnje i primene, bezbednija upotreba i stvaranje određenih kako vizuelnih tako i teksturnih efekata kod proizvoda u koje su dodate inkapsulisane arome.

Značaj inkapsulacije se ogleda i u tome što ona postaje ekonomski sve značajnija u sektoru proizvodnje i prodaje aroma. Prema nekim procenama, tržište aroma na svetskom nivou je vredelo u 2008. oko 20.5 milijardi dolara, dok je 20-25% svih prodatih aroma bilo u obliku inkapsulata. Inkapsulisane arome se na tržištu mogu naći u različitim oblicima. Oko 90% svih inkapsulisanih aroma se proizvodi metodom sprej sušenja (Zuidam i Heinrich, 2010).

Neke arome su podložne negativnim uticajima sredine i može doći do njihove promene u smislu hemijske transformacije i formiranja nepoželjnih produkata. Tako na primer, limonen je podložan oksidativnoj degradaciji koja može dovesti do gubitka karakterističnog mirisa ovog jedinjenja (Soottitantawat et al., 2003). Inkapsulacija bi mogla da bude sredstvo za zaštitu osetljivih komponenti aroma od neželjenih hemijskih promena ili pak kao sredstvo za njihovo kontrolisano otpuštanje.

U nastavku je dat pregled najvažnijih metoda za inkapsulaciju aroma koje se već primenjuju u industriji kao i novih metoda razvijenih poslednjih godina.

Sprej sušenje (sprej sušenje sa aglomeracijom). Metoda sprej sušenja je sa industrijske tačke gledišta najznačajnija metoda inkapsulacije aroma. Prema literaturnim podacima, i do 90% celokupne proizvodnje inkapsulisanih aroma se realizuje metodom sprej sušenja. Pre samog procesa inkapsulacije, priprema se emulzija arome i nosača (u obliku vodenog rastvora), koja se zatim disperguje u komori uređaja za sprej sušenje u struji toplog vazduha (160-220°C). Posebnu pažnju treba posvetiti karakteristikama materijala za inkapsulaciju koji mora da je rastvoran u vodi i da omogućava stvaranje stabilnih emulzija. Kao materijali za inkapsulaciju se koriste monosaharidi, disaharidi, maltodekstrini, modifikovani skrobovi, prirodne gume (npr. guma arabika), proteini mleka kao i mešavine materijala (Zuidam i Heinrich, 2010); Chen et al., 2013).

Stepen inkapsulacije aroma metodom sprej sušenja zavisi od karakteristika arome i materijala nosača. Veća koncentracija materijala nosača generalno daje bolje rezultate kada je u pitanju zadržavanje aroma unutar strukture nosača (Zuidam i Heinrich, 2010). Pokazano je da je i odnos nosač:aroma značajan za inkapsulacionu efikasnost, i prema nekim literaturnim podacima najbolji rezultati se postižu kada je taj odnos 4:1 (Chen et al., 2013). Takođe, različiti stepen modifikacije nosača utiče na svojstva inkapsulisane aktivne materije (Baranauskienė et al., 2007).

Svojstva arome su veoma bitna kada je u pitanju stepen inkapsulacije tj. količina inkapsulisane arome nakon procesa sprej sušenja. Lako isparljive komponente pokazuju veći gubitak u procesu sprej sušenja u poređenju sa komponentama koje imaju veću molekulsku masu i koje su manje isparljive. Gubici su svakako neizbežni i mogu se kontrolisati dodatkom veće količine arome pre inkapsulacije kako bi nakon sprej sušenja sadržaj inkapsulisane arome bio u definisanim granicama. Još jedan od važnih parametara je i veličina kapljica arome ukoliko se kao početni sistem za inkapsulaciju koriste emulzije. Manje kapljice arome (1-2 μ m) su bolje, jer je pokazano se u tom slučaju dobijaju bolji rezultati u pogledu stepena inkapsulacije arome. Dodatkom šećera i sirupa je moguće postići bolje rezultate kako u pogledu efikasnosti inkapsulacije, tako i u pogledu tehnoloških svojstava dobijenih inkapsulata. Pokazano je takođe da se kombinovanjem nosača mogu dobiti bolji rezultati nego ako se koristi samo jedan nosač (Zuidam i Heinrich, 2010). Sprej sušenje se može kombinovati i sa drugim metodama inkapsulacije. Moguće je pre samog sušenja formirati sistem aroma/ciklodekstrin, koji se zatim dodatno tretira sprej sušenjem (Fang et al., 2013).

Sprej sušenje se odlikuje brojnim prednostima u odnosu na druge tehnike koje se koriste za inkapsulaciju aroma. Pre svega, ova tehnika je već dugo u upotrebi sa velikim izborom materijala i uređaja. Takođe, pruža dobre uslove za automatizaciju a odlikuje se i niskim operacionim troškovima. Arome dobijene ovim procesom se mogu čuvati od 6-12 meseci, što zavisi od temperature i vlažnosti vazduha.

Nedostaci ove tehnike su primena visokih temperatura pri izvođenju procesa inkapsulacije, što za posledicu može da ima gubitak lako isparljivih komponenti ili pak formiranje nepoželjnih produkata oksidacije aktivne komponente (arome). Ono što bi se isto moglo smatrati za nedostatak ove tehnike a pogotovo kada se radi o inkapsulaciji aroma jeste činjenica da se primenom postojećih materijala kao nosača dobijaju čestice koje su rastvorljive u vodi. Ovo je

generalno nepovoljno svojstvo kada se teži kontrolisanom otpuštanju aroma. Formiranje suviše malih čestica takođe može biti negativno sa aspekta njihove primene. Ovaj problem se može delimično rešiti primenom metode aglomeracije, pri čemu se čestice dobijene sprej sušenjem aglomerišu i tako prevode u čestice većih dimenzija (Zuidam i Heinrich, 2010).

Oblaganje u fluidizovanom sloju. Ova tehnika se bazira na tretmanu već postojećih, čvrstih čestica, koje se u uređajima za oblaganje u fluidizovanom sloju dodatno zaštićuju omotačem i to najčešće lipidnim materijalima (npr. voskovima). Ova metoda se može koristiti i kao nastavak sprej sušenja, ukoliko se čestice dalje tretiraju (oblažu) dodatnim slojem omotača. Pored lipida, na površinu čestica se mogu nanositi i polimerni materijali pri čemu se formira čvrsti polimerni omotač. Od polimernih materijala mogu se koristiti derivati celuloze, prirodne gume i proteini. Osnovna prednost ovog procesa se ogleda u tome što se aktivna komponenta može dodatno zaštititi naknadnim oblaganjem pogodnim omotačem. Nedostaci metode su pre svega dugo trajanje procesa (u nekim slučajevima i do 20 sati) i zbog relativno velike potrošnje materijala za oblaganje (Zuidam i Heinrich, 2010).

Sprej hlađenje. Metoda sprej hlađenja se može koristiti kod inkapsulacionih procesa kod kojih se kao nosači koriste lipidne materije. Ovo je značajna metoda jer se po nekim procenama i do 10% inkapsuliranih aroma proizvodi ovom tehnikom. Proces započinje pripremom otopljene smeše lipida i arome koja se disperguje u posebnoj komori u kojoj se ujedno vrši hlađenje i formiranje čestica sa inkapsulisanom aromom. Ova metoda se može koristiti i za dodatnu zaštitu već pripremljenih inkapsuliranih aroma u formi mikročestica. Važan parameter je tačka topljenja materijala nosača koji se mora otopiti pre disperzije. Metoda je pogodna za procese gde se aroma oslobađa u toku termičkog tretmana proizvoda. U toku termičkog tretmana, lipidni omotač se topi i oslobađa aromu u proizvod. Ovaj proces ima prednost u odnosu na disperziju u vodenoj fazi (emulzifikacioni proces) arome i otopljenog lipidnog nosača iz razloga što se jedan deo arome gubi tj. ostaje u vodenoj fazi nakon procesa inkapsulacije (Zuidam i Heinrich, 2010).

Injektovanje i ekstruzija u otopljenom stanju. Ove dve tehnike su slične iz dva razloga. Prvi je što se kod obe koriste otopljeni materijali nosača, koji hlađenjem postaju čvrsti i na taj način obavijaju aktivnu komponentu. Druga sličnost između ove dve metode je to što se kod obe

koriste isti materijali kao nosači: saharoza, maltodekstrini, glukozni sirup i modifikovani skrobovi. Suštinska razlika je u tehničkom izvođenju samog postupka. Kod injektovanja se smeša nosača i arome zagreva do 140°C a zatim se potiskuje kroz otvore pod pritiskom nakon čega očvršćava. Postupak je u osnovi isti kao i kod dobijanja tvrdih bombona. Daljim mehaničkim tretmanom se postiže smanjenje veličine čestica do željenih dimenzija. Kao sredstvo za hlađenje se u novije vreme sve češće koristi tečni azot kao zamena za izopropanol koji se tradicionalno koristio kod ovog postupka. Metodom injektovanja se dobija oko 2% inkapsulisanih aroma, pri čemu se na tržištu može naći veliki izbor inkapsulata dobijenih ovom metodom. Sadržaj arome u inkapsulatima dostiže i do 30% (Zuidam i Heinrich, 2010).

Ekstruzijom u otopljenom stanju se vrši inkapsulacija aroma u ugljenohidratnim nosačima uz primenu konvencionalnih ekstrudera sa rotorima. Oko 2-3% svih inkapsulisanih aroma se proizvodi ovim postupkom inkapsulacije. Kao što je već rečeno, ovaj proces inkapsulacije je sličan procesu injektovanja u otopljenom stanju sa tom razlikom što se kod ekstruzije koriste horizontalni ekstruderi. Postupak se sastoji od potiskivanja kroz ekstruder otopljene smeše nosača i arome pri čemu je moguće kontrolisati temperaturu procesa. Produkti ekstruzije se prihvataju i hlade, s tim što ih je kasnije moguće usitniti do željene veličine. Proces ekstruzije u otopljenom stanju je veoma fleksibilan i omogućava primenu tečnih aroma, emulzija na bazi aroma ili pak već inkapsulisanih aroma. Mana ove metode je relativno mali udeo arome u ukupnoj masi inkapsulata koja ne prelazi 10% (Zuidam i Heinrich, 2010). Modifikacije ove metode uključuju uvođenje dodatne inkapsulacije pre same ekstruzije. Kao nosači u primarnoj inkapsulaciji se mogu koristiti ciklodekstrini (Yuliani et al., 2006).

Generalno, zbog sastava nosača, inkapsulati dobijeni primenom ove dve metode su rastvorljivi u vodi, pri čemu je moguće smanjiti njihovu rastvorljivost primenom polimera velikih molekulskih masa (npr. natrijum alginata u kombinaciji sa kalcijumom) ili uvođenjem plastifikatora (Zuidam i Heinrich, 2010).

Koacervacija. Ovaj postupak inkapsulacije se bazira na formiranju zaštitnog omotača oko kapljica emulgovane arome putem izdvajanja faza tj. razdvajanja faze koja sadrži veću koncentraciju polimera od one sa manjom koncentracijom. Ovo se postiže variranjem parametara u toku procesa, od kojih su temperatura i pH najvažniji za uspešno dobijanje koacervata. Usled promena parametara sredine, dolazi do destabilizacije komponenti, koje se izdajaju iz rastvora,

pri čemu formiraju sloj oko kapljica arome. Danas se uglavnom za inkapsulaciju aroma koristi kompleksna koacervacija, kod koje se koristi veći broj polimera sa različitim naelektrisanjem. Najčešći materijali nosača koji se koriste u ovom tipu inkapsulacije su želatin i guma arabika. Pored gume arabike, mogu se još koristiti i karboksimetil celuloza, pektin i alginat. S druge strane, želatin se može zameniti biljnim proteinima. Ukoliko se koristi želatin, naknadno se može dodatno stabilizovati omotač putem delovanja transglutaminaze. U literaturi se mogu naći i podaci o korišćenju glutar aldehida kao sredstva za umrežavanje želatina, ali regulative pre svega u Evropskoj Uniji zabranjuje njegovu upotrebu u hrani.

Jedna od prednosti ove metode je i potencijalno visok sadržaj inkapsulisane arome koji može dostići i do 90%. Dobijeni koacervati mogu se koristiti za otpuštanje arome kako pod dejstvom pritiska, tako i pod dejstvom povišene temperature ili pak rastvaranjem omotača u vodenoj sredini (Zuidam i Heinrich, 2010). U procesima koacervacije se kao materijali za inkapsulaciju koriste želatin i guma arabika (Lv et al., 2014). Kao nosači kod ove metode se mogu koristiti i proteini mleka u kombinaciji sa karboksimetil celulozom za inkapsulaciju aroma (Koupantsis et al., 2014). Sojini izolati se takođe koriste u procesima inkapsulacije etarskih ulja procesom koacervacije (Jun-xia et al., 2011).

Inkapsulacija aroma u polimerne čestice. Polimerne čestice koje mogu da služe kao nosači za inkapsulaciju aroma privlače veliku pažnju poslednjih godina. Ova metoda inkapsulacije se odlikuje jednostavnošću i velikim izborom materijala i tehnika za dobijanje čestica. Od materijala, pre svega se koriste alginat, karagenan, želatin, agar, itd. Suština metode je da se aroma koja je dispergovana u nosaču zarobi unutar strukture nosača putem formiranja gela. Na ovaj način se dobija tzv. matriks tip inkapsulata. Uvođenjem neke od tehnika inkapsulacije moguće je dobiti čestice željenih dimenzija i oblika kako bi se zadovoljili specifični zahtevi. Od tehnika inkapsulacije, prvenstveno se koriste metoda emulzifikacije i metoda ekstruzije. Obe metode u slučaju inkapsulacije aroma imaju svoje prednosti i mane. Kod metode emulzifikacije, disperzija se vrši u uljanoj fazi, koja se nakon formiranja čestica mora ukloniti. Variranjem parametara procesa, moguće je postići relativno visok sadržaj arome u česticama koji može dostići i do 50%. Emulzifikacija omogućava dobijanje relativno malih čestica (od nekoliko mikrona do nekoliko hiljada mikrona) dok se kod klasične metode ekstruzije dobijaju čestice daleko većih dimenzija. Stepem inkapsulacije varira u zavisnosti od svojstava arome i materijala

nosača. Primećeno je da ukoliko raste koncentracija nosača, postižu se bolji rezultati kada je u pitanju inkapsulaciona efikasnost. Međutim, povećanjem koncentracije nosača, menja se pre svega viskozitet rastvora, što otežava proces dobijanja čestica (Zuidam i Heinrich, 2010). S druge strane, primena polimernih čestica je pokazala niz prednosti kada je u pitanju inkapsulacija aroma. Tako na primer, termička stabilnost inkapsulisanih aroma se povećava njihovom inkapsulacijom. Ovo se manifestuje preko kinetike otpuštanja u toku zagrevanja inkapsulata, pri čemu inkapsulisana aroma gubi masu na višim temperaturama u odnosu na slobodnu aromu. Pored toga, uvođenjem novih postupaka za dobijanje čestica moguće je postići željene veličine i oblike finalnog inkapsulata. Dodatnim sušenjem čestica, uklanja se voda i na taj način se dobija sistem koji je jednostavniji za čuvanje i upotrebu (Manojlovic et al., 2008b; Levic et al., 2013). Pored čestica koje su matriks tipa, modifikacijom ove metode je moguće dobiti i tzv. rezervoar tip inkapsulata. Ovo se postiže procesom koekstruzije, pri čemu se koriste posebno dizajnirane igle-dizne u obliku koncentričnih cevi. Pri ekstruziji, kroz unutrašnju kapilaru se potiskuje aktivna komponenta tj. aroma a kroz spoljašnju kapilaru se potiskuje materijal nosača. Formiranjem kapi, aroma ostaje zarobljena unutar gela nosača u obliku kompaktne celine, tj. kapi. Kao nosači se koriste alginat, karagenan, želatin ili pak lipidni materijali (Zuidam i Heinrich, 2010; Zuidam i Shimoni, 2010).

Inkapsulacija aroma u ciklodekstrinima. Ova metoda inkapsulacije se još naziva i molekulska inkluzija, zbog specifične strukture ciklodekstrina i načina na koji se aktivna komponenta smešta unutar strukture ciklodekstrina. Ovo je moguće s obzirom da ciklodekstrini unutar svoje ciklične strukture imaju lipofilni deo u koji je moguće smestiti molekule određene veličine. Proces inkapsulacije se obično izvodi na povišenoj temperaturi 60-80°C u vodenoj sredini kako bi se olakšalo rastvaranje ciklodekstrina. U toku procesa se dodaje aroma koja se inkapsuliše, uz intenzivno mešanje. Prednost upotrebe ove metode za inkapsulaciju aroma je u činjenici da ciklodekstrini imaju malu moć upijanja vlage (manje su hidroskopni od konvencionalnih praškastih inkapsulata) i da ujedno štite aromu od uticaja kiseonika. Pored toga, ciklodekstrini pružaju dobru zaštitu od svetlosti, toplote i u znatnoj meri sprečavaju isparavanje aktivne komponente. Glavni nedostatak ove metode je relativno mali sadržaj arome koja može da se veže u strukturu ciklodekstrina, pri čemu sadržaj arome ne prelazi 10%. Još jedan problem vezan za primenu ciklodekstrina u prehrambenoj industriji je vezan za zakonska rešenja koja

ograničavaju njihovu upotrebu na svega nekoliko proizvoda (Zuidam i Heinrich, 2010). Metoda inkapsulacije na bazi ciklodekstina je pokazala da je moguće inkapsulisati arome uz postizanje visoke inkapsulacione efikasnosti (Ciobanu et al., 2013.). Pored toga, ova metoda se može koristiti za primarnu inkapsulaciju aroma, koje se zatim koriste za naknadnu inkapsulaciju drugim postupcima (Kayaci i Uyar, 2012).

Kristalizacija/precipitacija. Ove tehnike se baziraju na primeni različitih materijala koji kristališu (precipitiraju) iz zasićenih rastvora, pri čemu mogu zarobiti aktivnu komponentu unutar svoje strukture. Jedan od primera ovakvih sistema je primena šećernog sirupa sa visokom koncentracijom šećera koji se tokom hlađenja prevodi u kristale. U toku kristalizacije, aroma ostaje zarobljena unutar iskristalisane šećerne mase. Pored šećera, mogu se koristiti i proteini (npr. proteini mleka) pri čemu se precipitacija obavlja promenom pH vrednosti rastvora proteina tj. dostizanjem izoelektrične tačke proteina. Pre same inkapsulacije neophodno je formirati stabilnu emulziju arome (Zuidam i Heinrich, 2010). Za ovaj tip inkapsulacije se pored životinjskih mogu koristiti i biljni proteini. Zein, protein iz kukuruza se pokazao kao pogodan nosač za inkapsulaciju etarskih ulja putem izmene faza, nakon čega se može vršiti liofilizacija rastvora (Parris et al., 2005).

Ostali sistemi za inkapsulaciju aroma. U literaturi se mogu sresti i načini inkapsulacije aroma koji ne podrazumevaju ni jednu od opisanih metoda za formiranje inkapsulata. Jedna od takvih metoda je i zadržavanje arome unutar ćelija kvasca. Kod ove metode, ćelije kvasca se uz mešanje u vodi dovode u kontakt sa aromom (ili etarskim uljem) pri čemu komponente arome prodiru kroz membranu i raspoređuju se unutar ćelije (Dardelle et al., 2007; Zuidam i Heinrich, 2010). Ovo je moguće pre svega zbog sadržaja lipofilnih komponenti u strukturi ćelije kvasca. Aroma ostaje zadržana unutar ćelija upravo zahvaljujući svojstvima lipida koje ćelija ima u svom sastavu. Glavno ograničenje ove metode je propustljivost ćelijske membrane za jedinjenja koja moraju imati odgovarajuću molekulska masu. Pored toga, efikasnost zadržavanja aroma unutar strukture ćelija zavisi od temperature na kojoj se inkapsulacija vrši. Ako je temperatura procesa viša, vezaće se više arome. Isto važi i za otpuštanje arome koje je veće ukoliko je temperatura viša. Ova tehnika se pokazala posebno interesantnom za inkapsulaciju aroma za potrebe proizvoda u suvom stanju. Naime, osušene ćelije kvasca (nakon inkapsulacije) znatno bolje

zadržavaju aromu od ćelija u rehidrisanom stanju. Međutim, sa povećanjem sadržaja vode u sredini u kojoj je dodata inkapsulisana aroma, oslobađanje je intenzivnije. Isto se odnosi i na proizvode koji sadrže emulzifikatore. Na tržištu se mogu naći komercijalni preparati inkapsulisane arome u ćelijama kvasca. Ova tehnika se dodatno nadograđuje upotrebom sprej sušenja za dobijanje finalnog oblika inkapsulisane arome (Zuidam i Heinrich, 2010)

Pored ćelija kvasca, za inkapsulaciju aroma se mogu koristiti i čestice amorfnog silicijuma. Ovi sistemi inkapsulacije su interesantni s obzirom da se mogu koristiti za primarnu inkapsulaciju aroma, koje se zatim koriste u konvencionalnim postupcima inkapsulacije. Priprema čestica amorfnog silicijuma je relativno jednostavna, pri čemu se najčešće koristi postupak koji se bazira na hidrolizi tetraetil ortosilikata. U toku formiranja gela na bazi silicijuma, dodaju se arome, koje kako se smanjuje porozitet gela ostaju zarobljene unutar silikatne matrice. Optimizacija ove metode je neophodna, s obzirom na širok spektar derivata silicijuma koji se mogu koristiti i koji mogu značajno poboljšati efikasnost ove metode (Zuidam i Heinrich, 2010).

2. CILJEVI

Problematika koja je razmatrana u ovom radu je vezana za inkapsulaciju aroma sa ciljem dobijanja inkapsuliranih sistema pogodnih za različite potencijalne primene. Ispitivanja su obuhvatila primenu karnauba voska, alginata i polivinil alkohola kao nosača za inkapsulaciju aroma. Za dobijanje inkapsuliranih aroma korišćene su tehnike bazirane na disperziji mešavine aroma/nosač. Uzimajući u obzir podatke dobijene analizom literature kao i značaja koji arome kao aditivi hrane imaju, postavljeni su sledeći ciljevi rada:

1. Inkapsulacija aroma u karnauba vosku kao nosaču za inkapsulaciju i dobijanje lipidnih mikročestica sa inkapsuliranim aromom. Dobijanje inkapsulata koji kao nosač imaju karnauba vosak se bazira na disperziji mešavine otopljenog voska i aktivne komponente (u ovom slučaju arome) u formi malih kapi, koje hlađenjem dobijaju finalni oblik. Nakon hlađenja i očvršćavanja, aktivna komponenta je zarobljena unutar strukture nosača (voska). Ovako formirane čestice su mehanički stabilne i relativno jednostavne za dalju upotrebu. Kako karnauba vosak ima veoma visoku tačku topljenja, to stvara problem pri konstrukciji sistema za dobijanje čestica na bazi ovog voska. Od metoda za dobijanje čestica na bazi voskova (i generalno lipida), najčešće se koriste postupci disperzije (emulzifikacije) u vodi i disperzije u vazduhu. Kod metode emulzifikacije otopljena mešavina vosak/aktivna materija se disperguje u zagrejanom vodi uz mešanje. Formirane otopljene kapi voska sa aktivnom komponentom se dalje hlade kako bi se formirao finalni oblik čestica. Metoda disperzije u vazduhu je bazirana na mehaničkoj disperziji otopljene smeše vosak/aktivna komponenta u obliku kapi koje dalje očvršćavaju u atmosferi vazduha. Ovakvi postupci inkapsulacije su pogodni u slučaju kada je aktivna komponenta lipofilne prirode. Karnauba vosak je u ovom radu korišćen za inkapsulaciju arome etil vanilina primenom metode disperzije (emulzifikacije) u vodi i metodom disperzije vazduhom. Etil vanilin je odabran kao aktivna komponenta jer se radi o aromi koja je pogodna za rad u uslovima povišene temperature. Dobijene čestice su ispitivane kako sa aspekta veličine i morfologije, tako i sa aspekta termičke i hemijske stabilnosti inkapsulirane arome. Praćene su i promene u termičkim i hemijskim svojstvima nosača kako bi se ispitaio uticaj postupaka inkapsulacije na stabilnost karnauba voska. Ispitivanje i poređenje dve metode za dobijanja čestica treba da omogući jednostavniji razvoj formulacija za inkapsulaciju lipofilnih aroma u obliku lipidnih mikročestica.

2. Inkapsulacija aroma u alginatu u obliku Ca-alginatnih čestica. U ovom radu je alginat korišćen za inkapsulaciju aroma u čvrstom (etil vanilin) i tečnom agregatnom stanju (aroma kokosa i D-limonen). Alginat je korišćen i kao stabilizator emulzija i suspenzija aroma i kao nosač za inkapsulaciju. Veličina čestica je kontrolisana upotrebom elektrostatičkog polja koje je uspostavljeno između igle za ekstruziju i rastvora za geliranje. Ispitivan je uticaj promene jačine elektrostatičkog polja na morfološka svojstva čestica. Glavni cilj ovog dela istraživanja je dobijanje čestica malih dimenzija uz modifikacije rastvora za inkapsulaciju i uvođenje elektrostatičke ekstruzije-elektrosprej tehnike u proces inkapsulacije aroma. Cilj je bio da se modifikacijom rastvora alginata (uvođenjem etanola kao rastvarača arome) izvrši i promena reoloških svojstava rastvora alginata. Na ovaj način je moguće primeniti visoke napone pri ekstruziji rastvora alginata i arome, tj. moguće je dobiti čestice inkapsulisane arome metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrospreja. Analize dobijenih inkapsulisanih aroma su vršene pre svega s aspekta termičke stabilnosti, rehidracionog kapaciteta hidrogelova i hemijske stabilnosti inkapsulisanih aroma. Posebna pažnja je posvećena upravljanju i kontroli procesa inkapsulacije sa naglaskom na postizanje određeneih veličina čestica. Pored toga, praćeni su i svi relevantni reološki parametri rastvora i emulzija korišćenih za inkapsulaciju.

3. Polivinil alkohol je razmatran kao nosač aroma s ciljem formiranja novih inkapsulata, pre svega na nivou mikro i nanosistema. U kombinaciji sa alginatom i uz primenu elektrostatičke ekstruzije, PVA je korišćen za dobijanje čestica sa inkapsulisanim etil vanilinom, koje su dodatno procesuirane naknadnim geliranjem metodom smrzavanja-otapanja. Cilj je bio pokazati stabilnost ovako dobijenih sistema, pre svega s aspekta termičke i hemijske stabilnosti. U drugom delu je primenom postupka elektrostatičke ekstruzije-elektrospininga vršena inkapsulacija etil vanilina u PVA u obliku nanovlakana. Očekivani finalni proizvod je PVA film koji se sastoji od velikog broja nanovlakana sa inkapsulisanim aromom. Dobijanje nanovlakana je vršeno iz rastvora arome i PVA, što je zahtevalo modifikaciju rastvora polimera uvođenjem etanola kao rastvarača arome. Ova istraživanja treba da omoguće da se stekne uvid u formiranje složenih nanosistema kao i da pruže podatke o tome šta se događa (sa aspekta fizičkih i hemijskih karakteristika) sa aktivnom komponentom prilikom formiranja ovakvih sistema. Kod dobijenih inkapsulata su praćene morfološke, hemijske, termičke i mehaničke karakteristike inkapsulisane arome.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Inkapsulacija etil vanilina u karnauba vosku

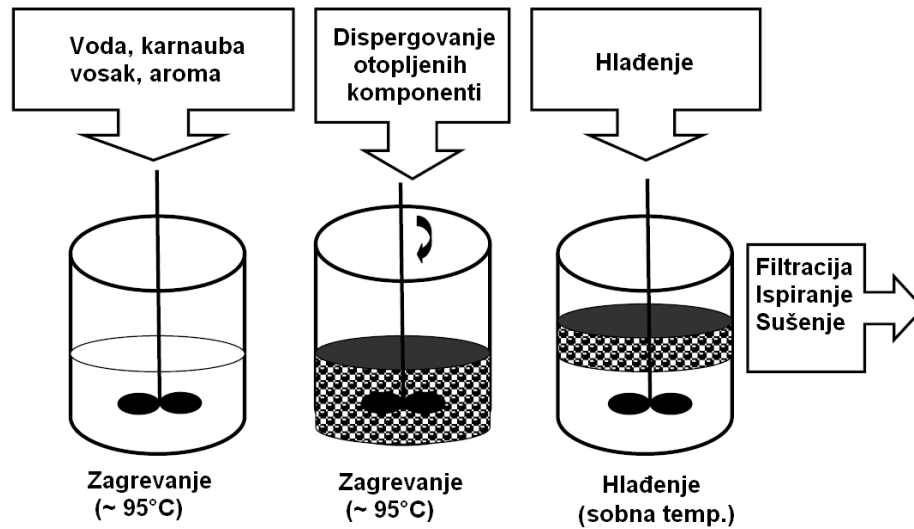
Materijali

Karnauba vosak (Carl Roth, Nemačka) je korišćen u obliku u kome je dobijen od proizvođača, bez posebnog prečišćavanja. Etil vanilin (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India) je korišćen kao model aroma. Ostale hemikalije koje su korišćene u radu su bile čistoće koja odgovara p.a. kvalitetu.

Inkapsulacija etil vanilina u karnauba vosku metodom disperzije (emulzifikacije) otopljenih komponenti u vodi

Inkapsulacija etil vanilina u karnauba vosku metodom disperzije (emulzifikacije) otopljenih komponenti u vodi je vršena u nekoliko koraka (Slika 3.1). Prvi korak je otapanje komponenti sistema, tj. karnauba voska (nosač) i etil vanilina (aktivna komponenta). Obe supstance su otapane na temperaturi koja je viša od tačke topljenja voska (tačka topljenja voska je viša od tačke topljenja arome). Komponente su prethodno pomešane i otopljene na temperaturi od ~95°C u vodenom kupatilu. U drugom koraku su otopljene komponente dodate u prethodno zagrejanu destilovanu vodu (~95°C), a zatim je vršena homogenizacija mehaničkim homogenizatorom Ultra Turrax® (Janke and Kunkel Ika-Labortechnik, Nemačka) pri 10000 o/min u trajanju od 2 minuta. U trećem koraku je (nakon isteka perioda homogenizacije) u disperziju voska i arome dodata destilovana voda ohlađena na 5°C. Mešalica je potom isključena i disperzija je ostavljena da se ohladi do sobne temperature. Ostali parametri procesa su: koncentracija lipofilne faze u vodi je iznosila 2,5%w/w.; odnos karnauba vosak:etil vanilin=80:20. U cilju poređenja, po istom postupku su pripremljene i čestice bez arome.

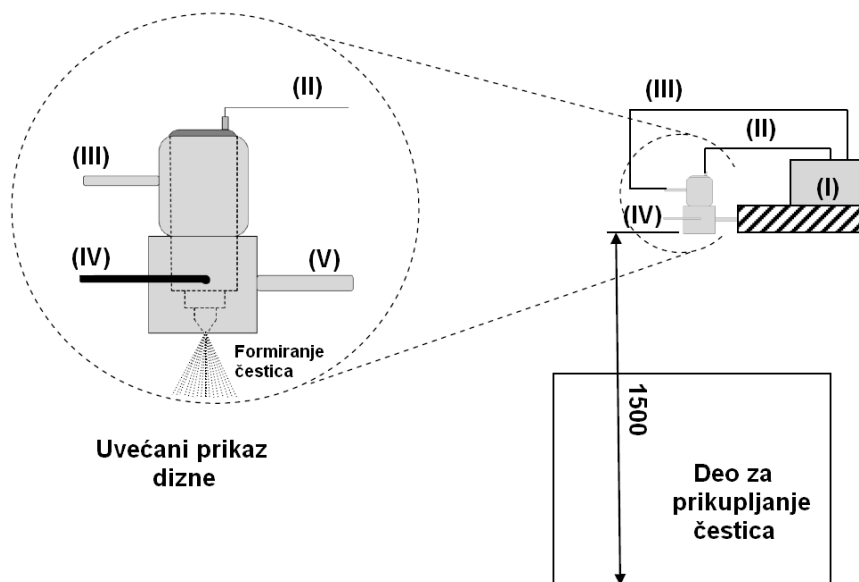
Nakon hlađenja, disperzija je filtrirana na vakum filteru i ostavljena da se suši na sobnoj temperaturi u trajanju od 72 časa. Čestice su nakon sušenja čuvane u zatvorenim posudama na 4°C.



Slika 3.1. Šema procesa inkapsulacije etil vanilina metodom disperzije (emulzifikacije) komponenti u vodi.

Inkapsulacija arome u karnauba vosku metodom disperzije otopljenih komponenti komprimovanim vazduhom

Tehnika dobijanja lipidnih mikročestica komprimovanim vazduhom se vrši u jednom koraku uz pomoć posebno konstruisane dizne (Slika 3.2). Princip rada dizne je sličan onom koji je dat od strane Albertini et al. (2008). Razlika je u tome što je kod dizne pomenutih autora čitav sklop dizne opremljen grejačima dok se ovde prikazana dizna (Slika 3.2) greje samo jednim grejačem, pri čemu se vazduh za disperziju predgreva (posebnim grejačem) i zagrejan uvodi u diznu. Razlog za uvođenje zagrevanja dizne ili za korišćenje predgrejanog vazduha je u tome što otopljeni lipofilni materijal (npr. karnauba vosak) brzo očvršćava na sobnoj temperaturi i može dovesti do blokade dizne tokom rada. U ovom radu je vazduh predgrevan na temperaturu od 120°C pomoću električnog grejača montiranog ispred dizne. Sama dizna ima svoj električni grejač koji reguliše temperaturu materijala (110°C) i održava ga u otopljenom stanju tokom procesa inkapsulacije. Kao izvor vazduha je korišćen kompresor koji je povezan sa grejačem vazduha putem creva, na kojem je pre samog grejača montiran odvajač ulja i vlage. Pritisak komprimovanog vazduha je u toku procesa održavan na 1 bar (mereno na izlazu iz kompresora).



Slika 3.2. Šema procesa pripreme inkapsulisanog etil vanilina u karnauba vosku metodom disperzije pomoću vazduha. (I) kontrolna jedinica, (II) kontrolna temperaturna sonda, (III) električno napajanje grejača, (IV) priključak za komprimovani vazduh i (V) držač dizne.

Pre procesa inkapsulacije, karnauba vosak i etil vanilin su mešani u odnosu 80:20. Mešavina je dodata u gornji deo dizne, dok zagrejani vazduh prolazi kroz diznu u toku čitavog procesa kako bi se izbeglo rasturanje materijala i formiranje velikih kapi. Kapi formirane disperzijom su slobodno padale na ravnu površinu sa koje su sakupljane nakon procesa inkapsulacije. U cilju poređenja, pripremljene su i čestice bez arome. Dobijeni uzorci su čuvani u zatvorenim posudama na 4°C.

Analitičke metode

Analiza veličina čestica je vršena na uređaju Mastersizer 2000 (Malvern, Velika Britanija) sa jedinicom za merenje Hydro 2000 μP (Malvern, Velika Britanija). Pored instrumentalnog praćenja veličine čestica, vršena je i analiza veličine inkapsulata metodom prosejavanja (5min, ručno) uz upotrebu sita standardnih dimenzija (oznake po US standardu): 35, 80 i 140. Rezultati su predstavljeni kao udeo pojedinih frakcija koje su se zadržale na datom situ nakon prosejavanja.

Morfologija uzoraka je ispitivana skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) (JEOL JSM-6390LV, Japan) uz prethodno nanošenje zlata na uređaju BALTEC SCD 005.

Sadržaj etil vanilina u česticama dobijenim metodama disperzije u vodi i komprimovanim vazduhom je određivan metodom HPLC. Ekstrakcija arome iz čestica je vršena etanolom (96%v/v) uz disperziju čestica homogenizatorom Ultra-Turrax® T25 (Janke and Kunkel Ika-Labortechnik, Nemačka) pri 20000 obrtaja u minuti. Ekstrakcija je vršena u tri stepena sa po 15ml etanola. Ekstrakti su sakupljeni i filtrirani kroz filter papir. Pre same HPLC analize, uzorci su još jednom filtrirani kroz filter 0.45µm. Analiza sadržaja etil vanilina u ekstraktima je vršena na tečnom hromatografu SpectralSYSTEM P4000 opremljenim sa detektorom SpectralSYSTEM UV1000 i kolonom Zorbax SB C8 (150mm x 4,6mm, veličina čestica 5µm). Uslovi HPLC analize: merenja su vršena na talasnoj dužini od 280nm (na sobnoj temperaturi), pri protoku mobilne faze (metanol:voda=70:30v/v, 0,1% mravlja kiselina) od 1ml/min, zapremina injektovanog uzorka je iznosila 20µl. Inkapsulaciona efikasnost (%) je određena kao odnos mase inkapsulisanog etil vanilina i polazne mase arome.

Analiza FTIR spektara uzoraka je urađena na FTIR spektrometru Bomem-Hartmann & Braun (SAD). Pre analize, uzorci su pripremani u obliku KBr peleta na hidrauličnoj presi i odmah analizirani pri rezoluciji od 4cm⁻¹ i u opsegu 4000-600cm⁻¹.

Analiza difrakcije X-zraka (XRD) je vršena na difraktometru Philips 1050 sa Ni-filterom Cu Ka radijacijom i Bragg-Brentano fokusnom geometrijom. Analiza je vršena u opsegu 5 - 70° 2θ sa korakom od 0.05° i vremenom izlaganja od 6 s po koraku.

Termogravimetrijska analiza uzoraka je realizovana na termogravimetrijskoj vagi Setaram's system TG/DSC111 (Francuska). Analiza je vršena u atmosferi kiseonika. Termogravimetrijska analiza je vršena pri brzini zagrevanja od 5 °C/min do 300°C (do 250°C za čist etil vanilin).

3.2. Inkapsulacija etil vanilina u Ca-alginatu metodom elektrostatske ekstruzije

Materijali

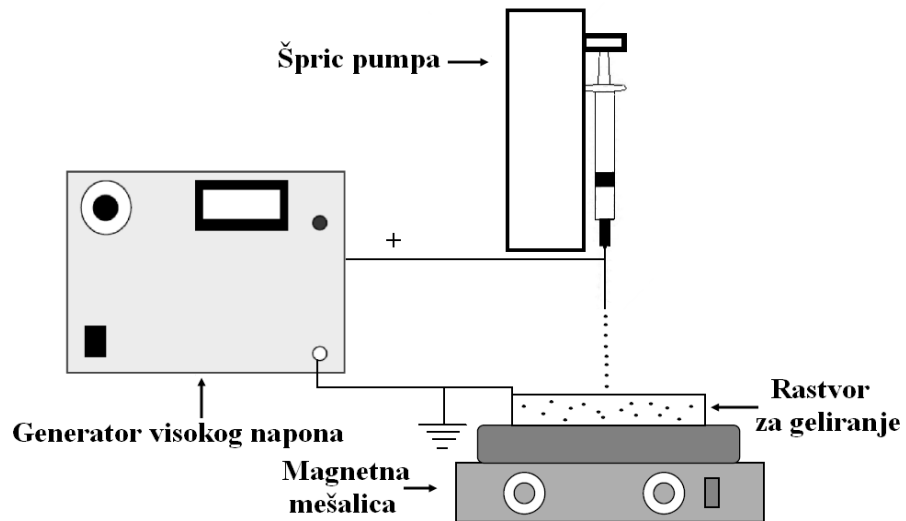
U eksperimentima inkapsulacije su kao nosači korišćeni natrijum alginat srednjeg viskoziteta (deklarisani viskozitet 2% rastvora na 25°C je 3500 cps) (SIGMA, SAD). Kao aktivna komponenta je korišćen etil vanilin (3-etoksi-4-hidroksibenzaldehid) (Aroma, Srbija). Kao

sredstvo za geliranje je korišćen kalcijum hlorid dihidrat (Analytica, Češka Republika). Ostale hemikalije koje su korišćene u radu su bile čistoće koja odgovara p.a. kvalitetu.

Procedura inkapsulacije etil vanilina u Ca-alginatne čestice metodom elektrostatičke ekstruzije

Kao nosač u procesu inkapsulacije je korišćen rastvor Na-alginata koncentracije 0,02 g/mL, koji je pripreman rastvaranjem polimera (komercijalno dostupan u obliku praha) u destilovanoj vodi (na sobnoj temperaturi) uz mešanje na magnetnoj mešalici. Neposredno pre same inkapsulacije je vršena priprema smeša Na-alginat/etil vanilin. Početni sadržaj arome u odnosu na rastvor alginata je bio 10%w/w i 20%w/w. Mešenje alginata i arome je vršeno na magnetnoj mešalici u trajanju od 10 minuta.

Inkapsulacija etil vanilina je vršena prema proceduri koja je opisana u literaturi (Manojlovic et al., 2008b; Nedovic et al., 2001). Šema procesa dobijanja čestica elektrostatičkom ekstruzijom je data na Slici 3.3. Ekstruzija smeša za inkapsulaciju je vršena kroz pozitivno naelektrisanu iglu od nerđajućeg čelika sa ravnim vrhom (14G). Protok smeše (70mL/h) za inkapsulaciju je kontrolisan špric pumpom (Razel Scientific Instruments, SAD). Vodeni rastvor kalcijum hlorida (15mg/mL) je korišćen za geliranje (dobijanje Ca-alginata) pri čemu je rastvor spojen sa (-) konekcijom na generatoru napona (Model 30R, Bertan Associates, SAD). Rastojanje između vrha igle i površine rastvora za geliranje je podešeno na 2,5cm.



Slika 3.3. Šema inkapsulacije etil vanilina procesom elektrostatičke ekstruzije.

Nakon inkapsulacije, dobijene čestice su ostavljene u rastvoru za geliranje još dodatnih 60 minuta kako bi se proces geliranja tj. formiranja Ca-alginata završio. Čestice su zatim ispirane destilovanom vodom, filtrirane i ostavljene da se suše na 25°C u toku 24 časa. Osušene čestice su zatim zatvorene u plastične sudove i čuvane do daljih analiza na 4°C.

Analitičke metode

Morfološke karakteristike čestica sa inkapsulisanim etil vanilinom su ispitivane binokularnom lupom Leica XTL-3400D (Leica, Nemačka), opremljenom kamerom Leica-DC 300 (Leica, Nemačka) i računarskim programom za merenje veličine objekata Leica-IM 1000 (Leica, Nemačka). Za analizu dimenzija je uziman uzorak od najmanje 30 čestica koje su merene odmah nakon sušenja.

Provera stabilnosti inkapsulata je vršena rehidracijom osušenih čestica u destilovanoj vodi i fosfatnom puferu (10 mM, pH 7.4). Odmerena količina čestica je rehidrisana u 20ml vode ili fosfatnog pufera na laboratorijskoj tresilici pri 100o/min u trajanju od 12h. Analiza rezultata je vršena preko praćenja morfoloških promena inkapsulata.

Kinetika sušenja je praćena putem sušenja odmerene mase čestica na sobnoj temperaturi do postizanja konstantne mase čestica.

Termička analiza (TGA) dobijenih uzoraka je vršena na uređaju SDT Q-600 (TA Instrument, SAD). Analize su vršene u atmosferi vazduha pri protoku gasa od 0.1 L/min i pri brzini zagrevanja od 10 °C/min.

Analiza FTIR spektara uzoraka je vršena prema proceduri datoj u Poglavlju 3.1.

3.3. Inkapsulacija etil vanilina u alginatu metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrosprej

Materijali

U eksperimentima inkapsulacije etil vanilina u alginatu metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrosprej je kao nosač korišćen natrijum alginat niskog viskoziteta (deklarisani viskozitet 2% rastvora na 25°C je 250 cps) (SIGMA, SAD). Kao aktivna komponenta (aroma) korišćen je etil vanilin (HiMedia, India). Ostale hemikalije koje su korišćene u radu su bile čistoće koja odgovara p.a. kvalitetu.

Priprema rastvora za inkapsulaciju

Natrijum alginat je rastvoren u destilovanoj vodi u koncentraciji od 2%w/w uz mešanje na magnetnoj mešalici do potpunog rastvaranja.

Smeša etanola (96%v/v) i vode (etanol:voda=70:30) je korišćena za rastvaranje etil vanilina. Radni rastvori etil vanilina su pripremani u smeši etanola i vode, pri čemu je koncentracija arome iznosila 10%w/v i 5%w/v.

Sastav rastvora za inkapsulaciju je prikazan u Tabeli 3.1. Rastvori za inkapsulaciju su pripremani tako što su mešani rastvor alginata i radni rastvori etil vanilina. Rastvori su homogenizovani na magnetnoj mešalici u trajanju od 5 minuta i uz dodatak 2ml smeše etanol voda kako bi se obezbedilo potpuno rastvaranje arome, tako da je konačna zapremina rastvora iznosila 5ml.

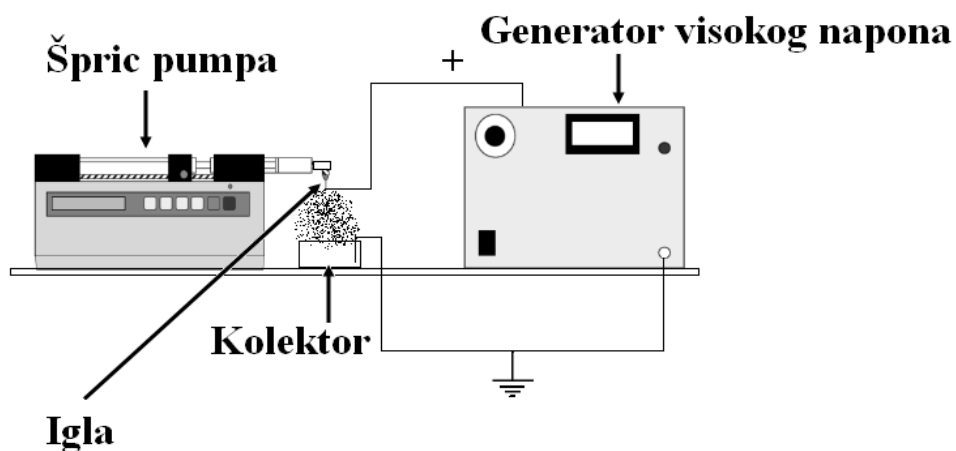
Tabela 3.1. Sastav uzoraka za inkapsulaciju metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrosprej.

Uzorak	Sastav uzorka	Alginat/etanol	Aroma (%w/v)	Provodljivost (ms/cm)	Protok (mL/h)
S ₁	Alginat	100/0	- ^b	4.06	1
S ₂	Alginat/etanol	70/30 ^a	- ^b	0.48	1
S ₃	Alginat /aroma	70/30 ^a	5	0.49	1
S ₄	Alginat/aroma	70/30 ^a	10	0.48	1
S ₅	Alginat /aroma	70/30 ^a	5	- ^c	0,3
S ₆	Alginat /aroma	70/30 ^a	10	- ^c	0,3

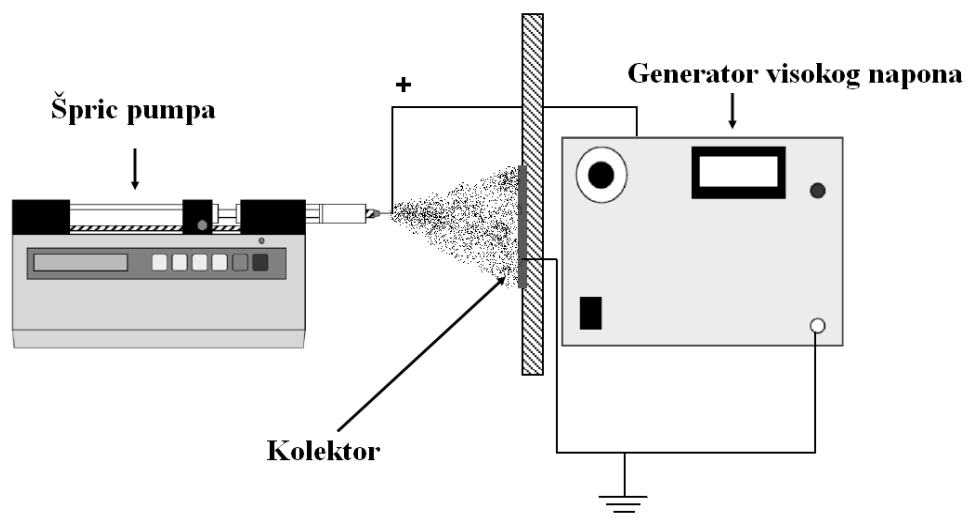
^a Dodatno dodato 2mL etanola ; ^b Uzorak bez arome; ^c Nije mereno

Procedura inkapsulacije etil vanilina u alginatu metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrosprej

Za inkapsulaciju etil vanilina u alginatni matriks je korišćen postupak elektrostatičke ekstruzije-elektrosprej čija je šema prikazana na Slici 3.4 i Slici 3.5. Kod vertikalnog sistema (Slika 3.4) je kao kolektor korišćen vodeni rastvor kalcijum hlorida koncentracije 15mg/mL. Kod horizontalnog sistema (Slika 3.5) je kao kolektor korišćena aluminijska folija. Špric pumpa (Pump 11, Harvard Apparatus, SAD) je korišćena za regulaciju protoka rastvora za inkapsulaciju. Na špric pumpu je montiran špric (5mL) sa ravnom iglom od nerđajućeg čelika (18G). Elektrostatički potencijal (23kV) između vrha igle (+) i kolektora (-) je uspostavljen pomoću generatora visokog napona Model 30R (Bertan Associates, SAD). Kolektori su kod oba sistema postavljeni na rastojanju od 15cm od vrha igle. Nakon procesa inkapsulacije, uzorci dobijeni korišćenjem horizontalnog sistema su sušeni 24h na sobnoj temperaturi. Cilj sušenja je bio uklanjanje eventualno zaostalih rastvarača iz uzoraka. Uzorci su čuvani u zatvorenim sudovima na temperaturi od 4°C.



Slika 3.4. Šema inkapsulacije metodom elektrostatička ekstruzija-elektrosprej sa rastvorom za geliranje kao kolektorom (vertikalni sistem).



Slika 3.5. Šema inkapsulacije metodom elektrostatička ekstruzija-elektrosprej sa čvrstim kolektorom (horizontalni sistem).

Analitičke metode

Provodljivost rastvora je merena na sobnoj temperaturi konduktometrom InoLab[®] 720 (WTW, Nemačka).

Viskozitet pripremljenih rastvora je ispitivan na uređaju za reološka ispitivanja Discovery Hybrid Rheometer HR-2 (TA Instruments, SAD) u opsegu 100 to 1000 s⁻¹.

Skenirajući elektronski mikroskop (SEM) (JEOL JSM-6390LV) je korišćen za ispitivanje morfoloških karakteristika uzoraka nakon inkapsulacije po proceduri datoj u Poglavlju 3.1.

Analiza FTIR spektara odabranih uzoraka je vršena na spektrometru Bomem-Hartmann & Braun (SAD) po proceduri datoj u Poglavlju 3.1.

Analiza difrakcije X-zraka (XRD) je vršena na difraktometru Philips 1050 sa Ni-filterom Cu Ka radijacijom i Bragg-Brentano fokusnom geometrijom po proceduri datoj u Poglavlju 3.1..

Termogravimetrijska analiza (TGA) je vršena na uređaju SETARAM SETSYS Evolution-1750 (Francuska). Termogravimetrijske analize su vršene u atmosferi vazduha (protok vazduha-16 cm³/min), u temperaturnom opsegu od 30 do 300°C i pri brzini zagrevanja od 10°C/min.

3.4. Inkapsulacija arome kokosa i D-limonena u Ca-alginatu metodom elektrostatičke ekstruzije

Materijali

Kao model arome su korišćene: aroma kokosa (komercijalno dostupna) i D-limonen (HiMedia Laboratories Pvt.Ltd, Indija). Natrijum alginat (srednjeg viskoziteta) je korišćen kao nosač i njegove karakteristike su date u Poglavlju 3.2. Kao sredstvo za geliranje je korišćen kalcijum hlorid dihidrat (Acros Organics, SAD). Za ekstrakciju arome kokosa iz inkapsulata je korišćen dihlor-metan (HPLC čistoće) (SIGMA) dok je za ekstrakciju D-limonena korišćen n-heksan (HPLC čistoće) (Carlo Erba Reagenti SpA (Italija). Ostale hemikalije koje su korišćene u radu su bile čistoće koja odgovara p.a. kvalitetu.

Priprema emulzija Na-alginat/aroma kokosa i Na-alginat/D-limonen (priprema tečnih sistema)

Tečni sistemi je izraz koji je u ovom radu upotrebljavan kako bi se napravila razlika između rastvora i emulzija s jedne strane i formiranih čestica nakon inkapsulacije (čvrsti sistemi) s druge strane. Priprema rastvora natrijum alginata i emulzija Na-alginat/aroma je vršena neposredno pre

samog procesa inkapsulacije. Kao nosač za inkapsulaciju je upotrebljen Na-alginat u koncentraciji od 0,02 g/mL i 0,03 g/mL. Rastvori Na-alginata su pripremani tako što je odmerena količina polimera rastvorena u destilovanoj vodi i mešana na magnetnoj mešalici. Sledeći korak je mešanje Na-alginata sa aromom u cilju dobijanja stabilnih emulzija (videti ispod). Sastav formulacija korišćenih u eksperimentima kao i uslovi elektrostatičke ekstruzije prikazani su u Tabeli 3.2.

Tabela 3.2. Sastav rastvora i emulzija korišćenih pri inkapsulaciji aroma kao i primenjeni napon pri ekstruziji.

Formulacija	Uzorak*	Koncentracija Na-alginata (g/mL)	Koncentracija arome (%w/w)	Primenjeni napon (kV)
1	$A_{0.02}^0$	0,02	0	0
2	$A_{0.03}^0$	0,03	0	0
3	$K_{0.02}^5 ; L_{0.02}^5$	0,02	5	0
4	$K_{0.03}^5 ; L_{0.03}^5$	0,03	5	0
5	$K_{0.02}^{10} ; L_{0.02}^{10}$	0,02	10	0
6	$K_{0.03}^{10} ; L_{0.03}^{10}$	0,03	10	0
7	$A_{0.02}^0$	0,02	0	6,5
8	$A_{0.03}^0$	0,03	0	6,5
9	$K_{0.02}^5 ; L_{0.02}^5$	0,02	5	6,5
10	$K_{0.03}^5 ; L_{0.03}^5$	0,03	5	6,5
11	$K_{0.02}^{10} ; L_{0.02}^{10}$	0,02	10	6,5
12	$S_{0.03}^{10} ; L_{0.03}^{10}$	0,03	10	6,5

*A, alginat (bez arome); K, formulacija sa aromom kokosa; L, formulacija sa D-limonenom; Vrednosti u indeksu datog uzorka su koncentracije alginata, dok su vrednosti u eksponentu koncentracije arome.

Emulzije su pripremane primenom mehaničkog homogenizatora Ultra-Turrax® T25 (Janke and Kunkel Ika-Labortechnik, Nemačka) pri 10000 o/min u trajanju od 5 minuta.

Analitičke metode (tečni sistemi)

Viskozitet rastvora i emulzija je određen odmah nakon pripreme (homogenizacije) uzoraka rotacionim viskozimetrom Rheotest 2 (MLW, Nemačka) u opsegu 0 - 1300 s⁻¹.

Provodljivost tečnosti je merena konduktometrom InoLab[®] 720 (WTW, Nemačka) na sobnoj temperaturi, odmah nakon pripreme, odnosno homogenizacije u slučaju emulzija.

Stabilnost emulzija je ispitivana prema proceduri koju je opisao Chan (2011a) i koja je razvijena namenski za praćenje stabilnosti emulzija u procesima inkapsulacije. Praćenje stabilnosti emulzija je vršeno tako što je odmerena zapremina emulzije (~ 50 mL) alginat/aroma ostavljena u menzuri 1 sat. Nakon jednog sata, merene su zapremine formiranih faza. Stabilnost emulzija je izračunata kao količnik zapremine preostale emulzije i početne zapremine emulzije. Stabilnost emulzije je izražena u %.

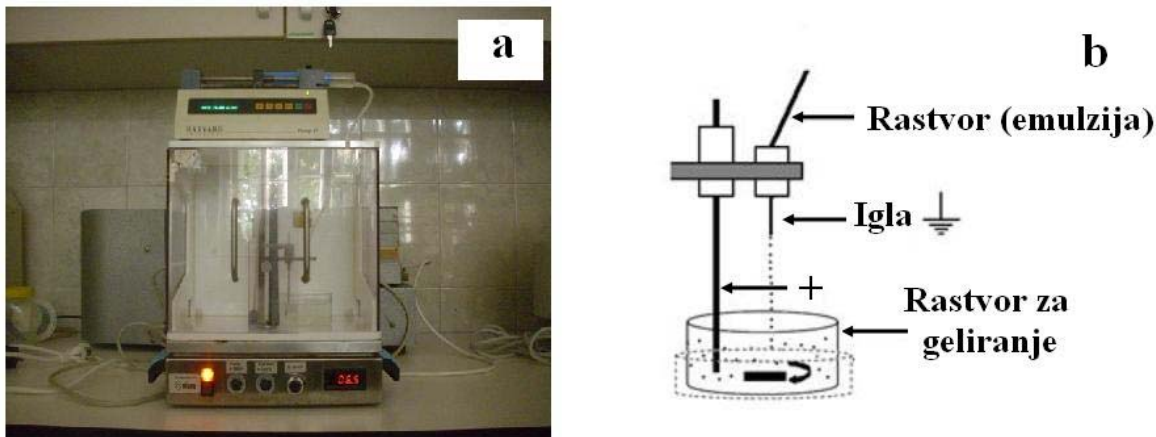
Veličina kapljica arome u emulziji je određivana svetlosnim mikroskopom Olympus CX41RF (Japan) koji je opremljen kamerom Olympus U-CMAD3 (Japan) i računarskim programom za merenje dimenzija na snimljenim objektima "Cell^A" (Olympus, Japan).

Procedura inkapsulacije arome kokosa i D-limonena u Ca-alginatu

Inkapsulacija arome kokosa i D-limonena u Ca-alginatu je vršena odmah nakon pripreme emulzija kako bi se izbegao eventualni negativni uticaj razdvajanja faza na inkapsulacionu efikasnost. Pored čestica sa inkapsulisanim aromom, pripremane su i čestice bez arome i tretirane po istoj proceduri. Čestice bez arome su u daljem toku eksperimenata korišćene za procenu efekta koji dodatak arome ima na ispitivane karakteristike čestica (videti ispod).

Sama priprema inkapsulisanih tečnih aroma je vršena prema proceduri inkapsulacije primenom elektrostatičkog polja koju su prethodno opisali Nedović et al. (2001) i Levic et al. (2013). Elektrostatička ekstruzija rastvora i emulzija je realizovana na jedinici za elektrostatičku ekstruziju VAR V1 (Nisco Engineering Inc., Švajcarska). Šema procesa elektrostatičke ekstruzije je prikazana na Slici 3.6. Špric pumpa Pump 11 (Harvard Apparatus, SAD) je korišćena za transport fluida do inkapsulacione jedinice. Ekstruzija je vršena kroz iglu (sa ravnim vrhom) od nerđajućeg čelika (22G). Sistem je tako podešen da je vrh igle na odstojanju od 2,5cm od površine rastvora za geliranje. Kao rastvor za geliranje je korišćen vodeni rastvor kalcijum hlorida koncentracije 0,015 g/mL. U eksperimentima su proizvedene čestice sa primenom elektrostatičkog potencijala (6,5kV) kao i čestice bez elektrostatičkog potencijala (0kV). Protok tečnosti je održavan na konstantnoj vrednosti od 70ml/h. Nakon formiranja, čestice su ostavljane u rastvoru za geliranje još 60 minuta kako bi se završio proces formiranja Ca-alginata. Nakon

perioda geliranja, čestice su odvojene iz rastvora CaCl₂, ispirane destilovanom vodom i sušene na 25 °C u trajanju od 48h kako bi se dobile suve čestice.



Slika 3.6. a) Jedinica za inkapsulaciju VAR V1 sa špic pumpom; b) Šema dela uređaja VAR V1 za dobijanje čestica elektrostatičkom ekstruzijom.

Analitičke metode (čvrsti sistemi)

Morfološke karakteristike vlažnih čestica su ispitivane svetlosnim binokularnim mikroskopom XTL-3 400D (Leica, Nemačka), koji je opremljen kamerom DC 300 (Leica, Nemačka) i računarskim programom za merenje dimenzija objekata IM 1000 (Leica, Nemačka). Za potrebe merenja dimenzije uziman je uzorak od 30 čestica, pri čemu je tačnost merenja iznosila $\pm 10 \mu\text{m}$. Prečnik čestica je izračunat kao srednja vrednost maksimalnog prečnika (d_{max}) i minimalnog prečnika (d_{min}) koji je normalan na d_{max} .

Odstupanja od sfernog oblika, koja se mogu javiti kao posledica uticaja različitih faktora pri proizvodnji čestica, je procenjeno korišćenjem Faktora sferičnosti (SF) koji je određivan na bazi procedure opisane u literaturi (Chan et al., 2009). Kao osnova za određivanje Faktora sferičnosti su korišćene dimenzije čestica dobijene merenjem pomoću svetlosnog mikroskopa, dok je za izračunavanje korišćena Jednačina 3.1:

$$SF = \frac{d_{max} - d_{min}}{d_{max} + d_{min}} \quad (3.1)$$

gde je sa d_{max} označen maksimalni prečnik a sa d_{min} minimalni prečnik čestica koji je normalan na d_{max} .

Promene u veličini čestica koje su nastale kao posledica sušenja su izražene preko vrednosti Faktora skupljanja ($k_{SF(sušenje)}$), koji je izračunat na bazi literaturnih podataka pomoću Jednačine 3.2 (Chan et al., 2011b):

$$k_{SF(sušenje)} = D_b - D_{b(suve čestice)} / D_b \quad (3.2)$$

gde je D_b prečnik vlažnih a $D_{b(suve čestice)}$ je prečnik čestica nakon sušenja.

Morfološke karakteristike površine suvih čestica su ispitivane skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) JEOL JSM-6390LV prema proceduri datoj u Poglavlju 3.1.

Analiza komponenti arome kokosa je vršena metodom gasne hromatografije/masene spektrometrije. Analize su rađene za slobodnu i inkapsulisanu aromu kokosa. Inkapsulisana aroma kokosa je pre analize ekstrahovana iz suvih Ca-alginatnih čestica (videti ispod). Inkapsulaciona efikasnost u slučaju D-limonena je određivana na bazi podataka dobijenih gasno-hromatografskom analizom sadržaja D-limonena u osušnim česticama. Pre gasno-hromatografske analize je vršena ekstrakcija arome iz čestica. Približno pola grama suvih čestica je rastvoreno u 40 ml vodenog rastvora natrijum citrata koncentracije 0,015 g/ml. Zatim je dodat metilen hlorid (5ml) za ekstrakciju arome kokosa, odnosno n-heksan (5 ml) za ekstrakciju D-limonena. Ekstrakcija je vršena na 45°C u vodenom kupatilu u trajanju od 15 minuta uz povremeno mešanje. Rastvaranje čestica i ekstrakcija su vršene u zatvorenim staklenim sudovima. Nakon ekstrakcije, uzorci su hladjeni do sobne temperature a zatim centrifugirani na 4000 o/min u trajanju od 20 minuta kako bi se odvojila ekstrahovana aroma od vodenog dela uzorka.

Uzorci arome kokosa i uzorci dobijeni ekstrakcijom inkapsulisane arome kokosa su analizirani tehnikom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS). GC-MS analize su vršene na gasnom hromatografu Agilent 7890N (SAD) opremljenom sa HP5-MS kapilarnom kolonom (30 x 0,25 mm, 0.25 µm film); temperaturni program: 40 °C u trajanju 9 min; zatim 4 °C/min do 65 °C; potom 9 °C/min do 285 °C za 12 min, sa helijumom kao nosećim gasom (protok gasa 1,5 cm³ min⁻¹). Gasni hromatograf je povezan sa masenim detektorom Agilent 5975C (70 eV). Preliminarne analize uzoraka su rađene u TIC modu. Pojedinačni pikovi

su identifikovani poređenjem sa literaturnim podacima na bazi masenih spektara (NIST spektralna baza). Detaljne analize ciljanih komponenti su rađene u SIM modu, koji obuhvata sledeće m/z odnose: $m/z = 85$ (γ -laktoni) i $m/z = 152$ (vanilin).

Sadržaj D-limonena je određivan metodom gasne hromatografije i uz primenu standardne krive za izračunavanje koncentracije arome. U analizi je korišćen gasni hromatograf Agilent 4890D (SAD) sa HP-5MS 30m×0,25mm kapilarnom kolonom i plameno-jonizujućim detektorom (FID). Kao noseći gas je korišćen vodonik sa konstantnim protokom od 1 cm³/min. U toku analize je korišćen sledeći temperaturni program: 9 minuta na 40 °C; zatim pri 15 °C/min do 150 °C i održavano 2 min. Temperatura injektora je iznosila 250°C, dok je temperatura detektora održavana na 300°C. Standardna kriva je dobijena korišćenjem sedam rastvora standarda D-limonena koji su analizirani pod istim uslovima kao i uzorci inkapsulisane arome. Obrada podataka dobijenih gasno-hromatografskom analizom je vršena računarskim programom GC Chem Station.

Inkapsulaciona efikasnost (E) je izračunata korišćenjem Jednačine 3.3:

$$E = m_e / m_i \times 100\% \quad (3.3)$$

gde je m_e masa inkapsulisanog D-limonena a m_i je početna masa arome. Svi uzorci su analizirani u duplikatu i inkapsulaciona efikasnost je prikazana kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD).

Rehidracija osušenih čestica je vršena u destilovanoj vodi i fosfatnom puferu (10 mM, pH 7.4). Odmerena količina suvih čestica je potopljena u 20 mL odgovarajuće tečnosti, pri čemu je korišćena laboratorijska tresilica za ravnomerno mešanje uzoraka pri 100 o/min, na sobnoj temperaturi. Kinetika rehidracije je praćena tako što su uzorci u tačno definisanim vremenskim intervalima odvajani od tečnosti, kratko ostavljeni na filter papiru (kako bi se uklonila površinska voda) a zatim mereni na analitičkoj vagi. Step rehidracije (M_t) je izračunat na bazi Jednačine 3.4:

$$M(t) = (w_1 - w_2) / w_2 \quad (3.4)$$

gde je w_1 masa čestica u rehidrisanom stanju a w_2 je početna masa suvih čestica.

Infracrveni spektar (FTIR) suvih čestica je analiziran na Bomem-Hartmann & Braun (SAD) FTIR spektrometru. Uzorci (1mg) su prethodno homogenizovani i presovani u obliku odgovarajućih tableta uz dodatak KBr (150mg). Snimanje spektara je vršeno u opsegu 4000-600 cm^{-1} , pri rezoluciji od 4 cm^{-1} . FTIR spektri slobodne arome kokosa i slobodnog D-limonena su snimljeni korišćenjem ćelije za tečne uzorke na bazi NaCl.

Termogravimetrijska analiza uzoraka je realizovana na termogravimetrijskoj vagi Setaram's system TG/DSC111 (Francuska). Analiza je vršena u atmosferi helijuma (protok helijuma je iznosio 30 ml/min, pri 1 atm), brzina zagrevanja 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Uzorci na bazi D-limonena su dodatno analizirani pomoću masenog spektrometra (Thermostar, Pfeifer, sistem sa kapilarnom konekcijom) koji je povezan sa termogravimetrijskom vagom. Vršena je simultana termogravimetrijska i analiza masenih spektara D-limonena (korišćenjem podataka o masenom spektru ovog jedinjenja koji je dostupan u bazi podataka Spectral Database for Organic Compounds, AIST (SDBS)).

Statistička obrada podataka je vršena računarskim programom SPSS 17.0. Dobijeni rezultati (veličina kapljica arome i veličina čestica) su ispitivani analizom varijanse (ANOVA) ($p < 0,001$). Srednje vrednosti su dodatno analizirane Tukey HSD testom.

3.5. Inkapsulacija etil vanilina u polivinil alkoholu metodom elektrostatičke ekstruzije

U eksperimentima inkapsulacije su kao nosači korišćeni polivinil alkohol (PVA) (rastvoran u toploj vodi, Molekulska masa =70.000-100.000) i natrijum alginat srednjeg viskoziteta (deklarisani viskozitet 2% rastvora na 25 $^{\circ}\text{C}$ je 3500 cps) (Sigma-Aldrich, SAD). Kao aktivna komponenta (aroma) je korišćen etil vanilin (Aroma, Srbija). Kalcijum hlorid dihidrat (Analytica, Češka Republika) je korišćen kao sredstvo za geliranje alginata i dobijanje kalcijum alginata. Ostale hemikalije koje su korišćene u radu su bile čistoće koja odgovara p.a. kvalitetu.

Priprema rastvora za inkapsulaciju

Rastvor polivinil alkohola koncentracije 0,1 g/ml je pripremljen rastvaranjem polimera u destilovanoj vodi uz zagrevanje (70 $^{\circ}\text{C}$) i mešanje na magnetnoj mešalici. Rastvor natrijum alginata koncentracije 0,02 g/ml je dobijen njegovim rastvaranjem u destilovanoj vodi na sobnoj

temperaturi uz mešanje na magnetnoj mešalici. Nakon pripreme pojedinačnih rastvora, PVA i Na-alginat su mešani u odnosu 1:4 kako bi se dobila smeša polimera koja je dalje korišćena za inkapsulaciju etil vanilina.

Postupak inkapsulacije etil vanilina elektrostatičkom ekstruzijom u nosaču na bazi polivinil alkohola i natrijum alginata

Čestice pa bazi PVA/alginat sa inkapsulisanim etil vanilinom su dobijene metodom elektrostatičke ekstruzije koja je opisana u Poglavlju 3.2. Etil vanilin je inkapsulisan u koncentraciji od 10%w/w i 20%w/w. Nakon inkapsulacije i perioda geliranja alginata, čestice su isprane sa destilovanom vodom, filtrirane na filter papiru a zatim su prebačene u suncokretovo ulje i zamrznute u periodu od 12 časova. Nakon perioda smrzavanja, čestice su odmrznute na 4°C a potom su odvojene od ulja i isprane sa destilovanom vodom. Vlažne čestice su sušene na sobnoj temperaturi do konstantne mase.

Analitičke metode

Morfološke karakteristike čestica sa inkapsulisanim etil vanilinom su ispitivane binokularnom lupom Leica XTL-3400D (Leica, Nemačka), opremljenom kamerom Leica-DC 300 (Leica, Nemačka) i računarskim programom za merenje veličine objekata Leica-IM 1000 (Leica, Nemačka) prema proceduri datoj u Poglavlju 3.2.

Stabilnost inkapsulata je ispitivana rehidracijom čestica prema proceduri datoj u Poglavlju 3.2.

Kinetika sušenja je praćena prema proceduri datoj u Poglavlju 3.2.

Termička analiza (TGA) dobijenih uzoraka je vršena na uređaju SDT Q-600 (TA Instrument, SAD). Analize su vršene u atmosferi vazduha pri protoku gasa od 0,1 L/min i pri brzini zagrevanja od 10 °C/min.

Analiza FTIR spektara uzoraka je vršena na FTIR spektrometru Bomem-Hartmann & Braun (SAD) prema proceduri datoj u Poglavlju 3.2.

3.6. Inkapsulacija etil vanilina u polivinil alkoholu metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrospining

Materijali

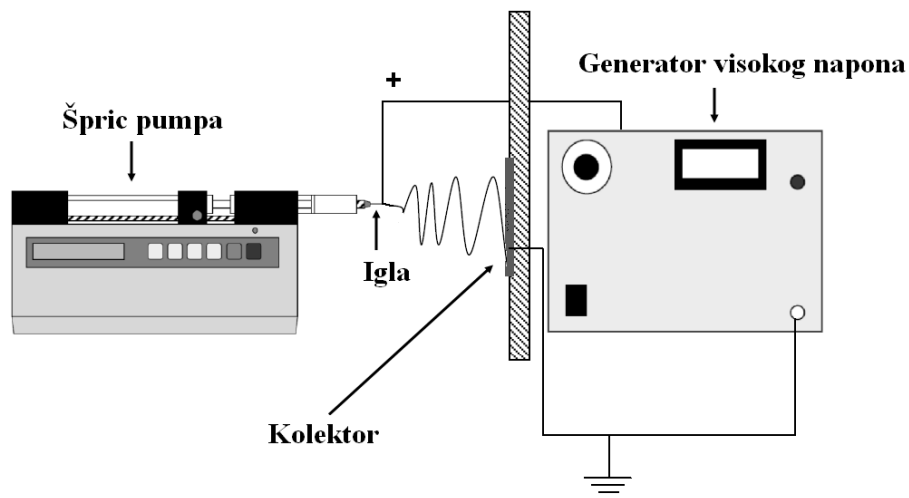
Kao nosač u eksperimentima je korišćen polivinil alkohol (PVA) (Molekulska masa=70.000-100.000), koji je rastvorljiv u toploj vodi (Sigma-Aldrich, SAD). Kao model aroma je korišćen etil vanilin (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indija). Ostale hemikalije koje su korišćene u radu su bile čistoće koja odgovara p.a. kvalitetu.

Priprema rastvora PVA i etil vanilina

U eksperimentima je kao rastvarač za etil vanilin korišćen rastvor etanola i vode u odnosu 70:30. Radni rastvor etil vanilina (20%w/v) je pripreman tako što je izmerena masa arome rastvorena u smeši vode i etanola. Radni rastvor PVA (0,15 g/ml) je pripreman tako što je izmerena masa polimera rastvorena u destilovanoj vodi uz zagrevanje na 80°C. Rastvori za inkapsulaciju su pripremani tako što su radni rastvori etil vanilina i PVA mešani prema odnosima datim u Tabeli 3.3. Smeše polimera i arome su mešane na magnetnoj mešalici u trajanju od 15 minuta uz dodatak 2ml rastvora voda/etanol kako bi se obezbedilo potpuno rastvaranje arome, tako da je finalna zapremina rastvora iznosila 5ml.

Postupak inkapsulacije

Za inkapsulaciju etil vanilina u PVA matriks je korišćen postupak čija je šema prikazana na Slici 3.7. Špric pumpa (Pump 11, Harvard Apparatus, SAD) je korišćena za regulaciju protoka rastvora za inkapsulaciju. Na špric pumpu je u horizontalni položaj montiran špric (5ml) sa ravnom iglom od nerđajućeg čelika (18G). Elektrostatički potencijal između vrha igle (+) i kolektora (-) je uspostavljen pomoću generatora visokog napona Model 30R (Bertan Associates, SAD). Kao kolektor je korišćena aluminijumska folija koja je postavljena na rastojanju od 10cm od vrha igle. Nakon procesa inkapsulacije, uzorci su sušeni 24h na sobnoj temperaturi. Cilj sušenja je bio uklanjanje eventualno zaostalih rastvarača iz uzoraka.



Slika 3.7. Šema inkapsulacije etil vanilina u polivinil alkoholu metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrospininga.

Analitičke metode

Morfologija uzoraka je ispitivana skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) (JEOL JSM-6390LV) uz prethodno nanošenje zlata na uređaju BALTEC SCD 005. Za određivanje dimenzija vlakana su korišćene slike dobijene SEM analizom a samo merenje je vršeno programom ImageJ. Debljina uzoraka (nakon skidanja sa Al-folije) je određivana mikrometerskim zavrtanjem.

Termička svojstva odabranih uzoraka su ispitivana metodom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC) na uređaju DSC-50 (SHIMADZU, Japan). Masa ispitivanog uzorka je bila 10mg, dok je brzina zagrevanja iznosila 10°C/ min. Sve analize su vršene u atmosferi vazduha.

Termogravimetrijska analiza (TGA) je vršena na uređaju SETARAM SETSYS Evolution-1750 (Francuska). Termogravimetrijske analize su vršene u atmosferi vazduha, pri brzini zagrevanja od 10°C/min.

Analiza FTIR spektara odabranih uzoraka je vršena na spektrometru Bomem-Hartmann & Braun (SAD). Uzorci su pre analize homogenizovani sa KBr i pripremljeni u obliku odgovarajućih peleta. Analiza spektara je vršena u opsegu 4000-600 cm^{-1} i pri rezoluciji od 4 cm^{-1} .

Analiza difrakcije X-zraka (XRD) je vršena na difraktometru Philips 1050 sa Ni-filterom Cu Ka radijacijom i Bragg-Brentano fokusnom geometrijom. Analiza je vršena u opsegu $5 - 70^\circ 2\theta$ sa korakom od 0.05° i vremenom izlaganja od 6 s po koraku.

Analiza mehaničkih svojstava odabranih uzoraka je vršena na uređaju Autograph AG-X Plus High Speed Universal Testing Machine (SHIMADZU). Sva ispitivanja su vršena na sobnoj temperaturi pri brzini od 1,0 mm/min. Dimenzije uzoraka su iznosile: $\sim 1\text{cm} \times 2\text{cm} \times \sim 30\text{-}60\mu\text{m}$ (širina \times dužina \times debljina).

Tabela 3.3. Sastav rastvora korišćenih za inkapsulaciju metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrospininga.

Sastav rastvora	PVA/etanol	Koncentracija arome
PVA rastvor	100/0	-
PVA/etanol	70/30*	-
PVA/aroma	70/30*	20**

* *Naknadno dodato 2ml etanola*

** *Koncentracija radnog rastvora arome*

Statistička analiza prečnika nanovlakana je vršena poređenjem t-testom srednjih vrednosti prečnika uzoraka sa i bez inkapsulisane arome korišćenjem računarskog programa SPSS 17.0.

3.7. Inkapsulacija etil vanilina u prethodno formirane filmove na bazi polivinil alkohola dobijene metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrospininga

Materijali

U eksperimentima su korišćeni materijali koji su opisani u Poglavlju 3.6.

Priprema rastvora PVA i etil vanilina

Radni rastvori PVA (0,10g/ml) su pripremani prema proceduri datoj u poglavlju 3.6. Radni rastvor etanola je smeša etanol:voda=70:30. Radni rastvori etil vanilina su pripremani rastvaranjem 10%w/v (viša koncentracija arome u rastvoru za tretiranje vlakana) i 5%w/v (niža koncentracija arome u rastvoru za tretiranje vlakana) arome u radnom rastvoru etanola.

Postupak inkapsulacije

Prazni (bez inkapsulisane arome) PVA filmovi su dobijeni prema proceduri datoj u Poglavlju 3.6, s tim što je primenjeni napon iznosio 20kV. Nakon sušenja, filmovi su potapani u radne rastvore etil vanilina i etanola (prethodno ohlađeni na -25°C) uz dodatak 20% glicerola (85% glicerol), a zatim su zajedno održavani na -25°C u trajanju od 12h. Nakon ovog tretmana, filmovi su održavani u rastvorima na 4°C u trajanju od 12h. Filmovi su zatim sušeni na sobnoj temperaturi u trajanju od 24h. Dobijeni filmovi su čuvani u zatvorenim posudama na 4°C do daljih analiza.

Analitičke metode

Analize morfologije uzoraka (SEM), FTIR i XRD analize su rađene prema proceduri datoj u Poglavlju 3.6. Količina inkapsulisanog etil vanilina (data kao masa arome/masa filma) je određivana metodom HPLC-a po proceduri datoj u Poglavlju 3.1. Pre analiza, aroma je ekstrahovana iz filmova tako što je 50mg filma podvrgnuto ekstrakciji u 96% etanolu (10ml) u trajanju od 3 sata, uz povremeno mešanje.

Termogravimetrijska analiza je realizovana prema proceduri datoj u Poglavlju 3.1.

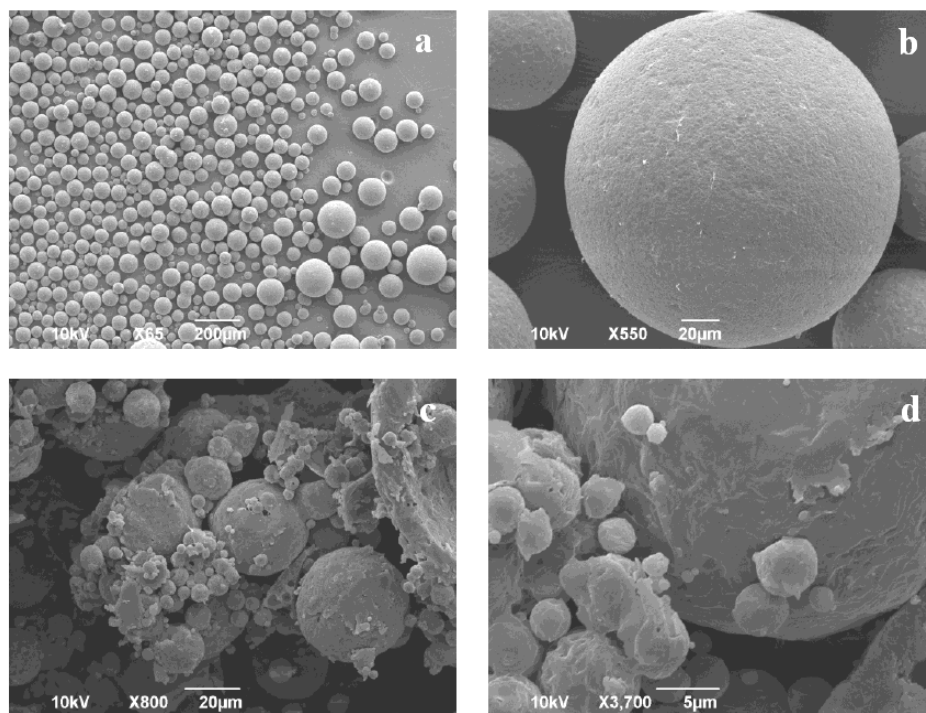
Za ispitivanje antimikrobnih svojstava korišćena je jedna Gram pozitivna bakterija, (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) i jedna Gram negativna bakterija (*Escherichia coli* ATCC 25922). Svi ispitivani mikroorganizmi su osvežavani u MHB 24h kako bi se postigla koncentracija od oko 1×10^7 CFU/ml. Od svake kulture mikroorganizama 100 μ l suspenzije je zasejano na MHA. Na površinu agara postavljeni su diskovi prečnika 6mm, negativna kontrola, pozitivna kontrola-ampicilin 10mcg, kao i ispitivani filmovi (prethodno sterilisani UV zracima u laminarnoj komori u trajanju od po 45min za svaku stranu filma). Kao negativna kontrola korišćeni su diskovi koji su natopljeni samo sa 10 μ l fiziološkog rastvora. Petri kutije sa bakterijama su inkubirane na 37°C u trajanju od 24h, posle čega su izmereni prečnici zona inhibicije (zajedno sa diskovima).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Inkapsulacija etil vanilina u karnauba vosku

U ovom poglavlju je opisana inkapsulacija etil vanilina u karnauba vosku metodama disperzije otopljenog voska i arome. Korišćene su metode disperzije (emulzifikacije) u vodi i metoda disperzije pomoću vazduha. Dobijeni uzorci su ispitivani sa stanovišta morfologije i dimenzija čestica (SEM i analiza dimenzija čestica), inkapsulacione efikasnosti (HPLC), hemijskih i strukturnih svojstava (FTIR i XRD) i termičkih svojstava (DSC/TGA). Karnauba vosak se pokazao pogodnim za dobijanje sfernih čestica sa inkapsulisanim aromom. Metoda disperzije vazduhom se generalno pokazala kao pogodnija za dobijanje čestica pravilnog-sfernog oblika. Hemijske analize su pokazale da karnauba vosak i etil vanilin zadržavaju svoja hemijska i strukturna svojstva nakon inkapsulacije. Termička analiza je pokazala da je procesom inkapsulacije postignuta veća termička stabilnost inkapsulisane arome koja se ogledala kroz sporiji gubitak arome na povišenim temperaturama u poređenju sa neinkapsulisanim aromom.

Čestice dobijene metodama disperzije u vodi i pomoću vazduha su analizirane skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) i rezultati su prikazani na Slici 4.1. Rezultati mikroskopske analize su pokazali da čestice dobijene metodom emulzifikacije imaju manje pravilan (sferni) oblik u odnosu na čestice dobijene metodom disperzije pomoću vazduha. Ovakvi rezultati odstupaju od literaturnih podataka za isti tip procesa i nosača (Milanović, 2011b). Naime, dobijene čestice su u većoj meri pokazale nepravilan oblik tj. veće odstupanje od sfernog oblika. Razlog za ovu pojavu treba tražiti u činjenici da je proces disperzije u vodi realizovan pri znatno većem broju obrtaja mešalice ali i sa znatno većim sadržajem arome u odnosu na karnauba vosak. Pored toga, u slučaju čestica dobijenih disperzijom u vodi, izražena je pojava grupisanja u krupnije agregate. Treba naglasiti da su uzorci analizirani bez prethodnog prosejavanja kako bi se što manje uticalo na morfološka svojstva čestica. Agregacija čestica nije primećena kod uzoraka dobijenih metodom disperzije pomoću vazduha. Agregacija čestica je verovatno uslovljena prisustvom vode koja se naknadno uklanja sušenjem. Voda omogućava povezivanje čestica, koje ostaju u obliku agregata i nakon sušenja. Na većim uvećanjima se može primetiti da je površina čestica dobijenih metodom disperzije vazduhom relativno glatka, dok je površina čestica dobijenih disperzijom u vodi naborana.

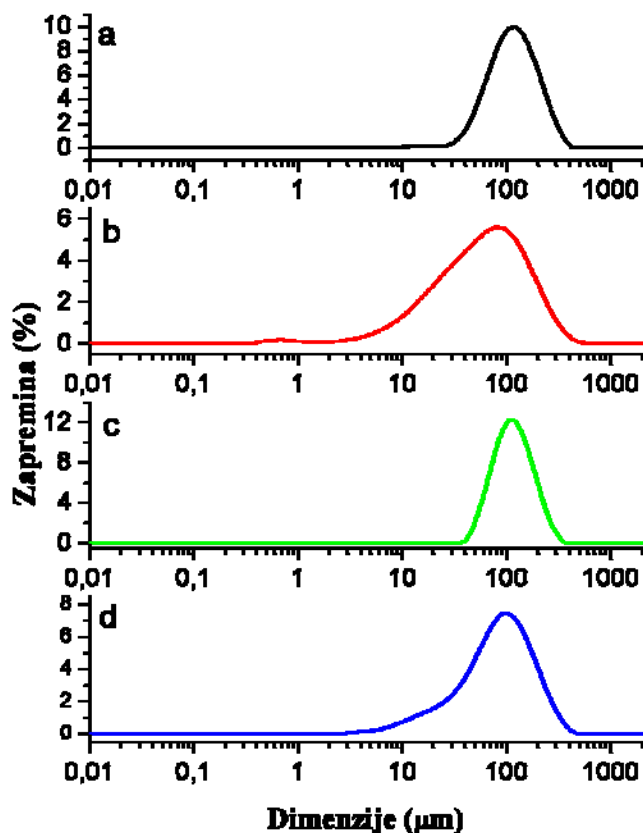


Slika 4.1. SEM slike čestica (pri različitim uvećanjima): (a,b)-čestice sa inkapsulisanom aromom dobijene disperzijom pomoću vazduha; (c,d)-čestice sa inkapsulisanom aromom dobijene disperzijom u vodi.

Pored toga što omogućava dobijanje čestica pravilnijeg oblika, metoda disperzije vazduhom se pokazala jednostavnijom za rad, posebno kada je reč o kasnijem tretmanu čestica jer se nakon procesa inkapsulacije čestice sakupe i skladište do dalje upotrebe. S druge strane, metoda emuzifikacije je jednostavnija s aspekta tehničkih rešenja i kontrole jer ne zahteva složeni sistem za dobijanje čestica. Potencijalne mane metode disperzije vazduhom su pre svega vezane za problem formiranja finih čestica, koje je potrebno ukloniti iz vazdušne struje jer predstavljaju potencijalni gubitak u prinosu čestica. Metoda disperzije (emulzifikacije) u vodi je zahtevnija kada je u pitanju tretman čestica nakon disperzije jer je potrebno čestice sušiti nakon procesa.

Raspored veličine čestica na bazi karnauba voska (sa i bez inkapsulisane arome) je prikazan na Slici 4.2. Distribucija veličina čestica je relativno ujednačena pri čemu su se uzorci dobijeni metodom disperzije vazduhom pokazali uniformnijim. Vrednosti za $d(0,9)$ su: 211,90µm (prazne) i 236,16µm (sa aromom) za čestice dobijene disperzijom vazduhom; 211,43µm (prazne) i 191,56µm (sa aromom) za čestice dobijene metodom disperzije u vodi. Kao što se može videti,

najveći broj izmerenih čestica (90% izmerenih) se nalazi ispod 250 μm za obe metode inkapsulacije.



Slika 4.2. Raspodela dimenzija čestica na bazi karnauba voska dobijenih metodama: metoda disperzije vazduhom (a-sa aromom, c-bez arome); metoda disperzije u vodi (b-sa aromom, d-bez arome).

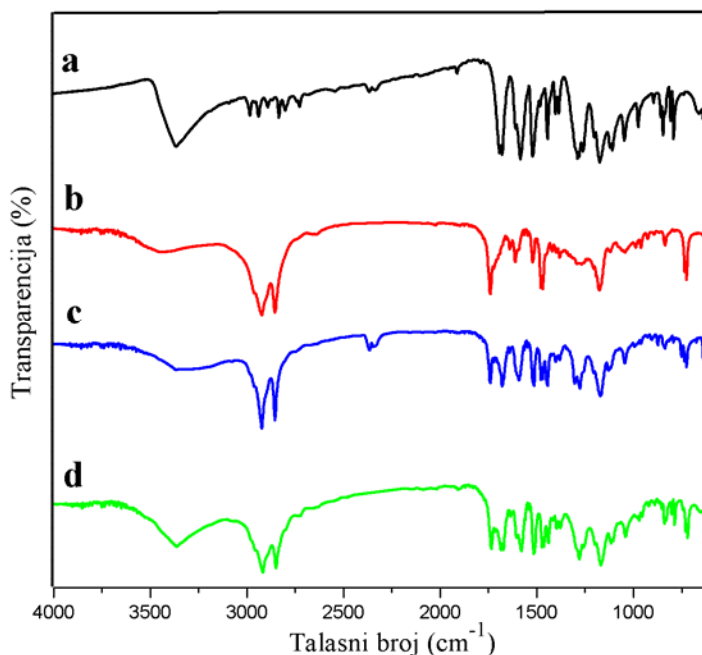
Kod metode analize veličine čestica pomoću seta standardnih sita su generalno dobijeni rezultati koji pokazuju da kod svih formulacija čestica (i primenjenih metoda inkapsulacije), najveći deo (procenat) uzorka otpada na dve frakcije koje ostaju na sitima sa otvorima 177 μm , odnosno 105 μm . Kod čestica dobijenih metodom emulzifikacije (sa i bez arome) na ove dve frakcije otpada >90% uzorka. Slični rezultati su dobijeni i u slučaju fracionisanja čestica dobijenih metodom disperzije vazduhom. Udeo frakcija ispod 105 μm , odnosno iznad 500 μm je u proseku bio ~5%, pri čemu je kod uzoraka dobijenih metodom disperzije u vodi primećeno izdvajanje krupnijih agregata (>500 μm) koji su se formirali tokom disperzije-hlađenja i tokom sušenja čestica.

Može se konstatovati da pod definisanim uslovima, primenom obe metode inkapsulacije moguće dobiti čestice relativno ujednačenih veličina. U literaturi se za slične sisteme inkapsulacije mogu naći podaci da se u zavisnosti od uslova disperzije i primene emulzifikatora najveći deo dobijenih čestica na bazi karnauba voska nalazi u frakciji čiji se prečnici kreću u opsegu 210-360 μm (Milanovic et al., 2010). Rezultati ostvareni u ovom radu pokazuju da se primenom intenzivnog mešanja-homogenizacije pri disperziji u vodi i bez upotrebe emulzifikatora mogu dobiti čestice čije su dimenzije manje od onih koje se mogu naći u literaturnim podacima.

Inkapsulaciona efikasnost ostvarena kod metode disperzije (emulzifikacije) u vodi je iznosila 5,07 \pm 0,04%, dok je u slučaju čestica dobijenih disperzijom vazduhom ostvarena inkapsulaciona efikasnost etil vanilina od 67,05 \pm 13,39%. Ukoliko se vrednosti za inkapsulacionu efikasnost kod metode disperzije u vodi uporede sa onima iz literature za isti sistem inkapsulacije (Milanovic et al., 2010), može se videti da su one znatno niže. Razlozi za nisku inkapsulacionu efikasnost su verovatno visoki udeo arome u polaznoj smeši (20%) u odnosu na nosač, kao i intenzivna homogenizacija-disperzija u odsustvu emulzifikatora. S druge strane, metoda disperzije vazduhom je dala zadovoljavajuće rezultate za inkapsulacionu efikasnost, što je ističe kao pogodnu za inkapsulaciju aktivnih komponenti sa sličnim svojstvima kao i etil vanilin i uz primenu karnauba voska kao nosača.

FTIR spektri neinkapsulisanog i inkapsulisanog etil vanilina (u karnauba vosku) su prikazani na Slici 4.3. U FTIR spektru neinkapsulisanog etil vanilina mogu se uočiti više karakterističnih traka. Na 3360 cm^{-1} je traka koja potiče od fenolne OH grupe. Trake na \sim 2900 cm^{-1} potiče od aromatičnih C-H vibracija i alifatičnih C-H vibracija iz OCH₂ grupe. Razdvojena traka karakteristična za benzaldehide (C=O vibracija) se može uočiti na oko 1680 cm^{-1} (González-Baró et al., 2008). Ostale trake u spektru su: C=C (karakteristična za aromatska jedinjenja) udružena sa C-H deformacionom vibracijom u ravni na 1580 cm^{-1} (Vieira et al., 2006); traka na 1515 cm^{-1} koja potiče od C-H vibracije iz -CHO grupe povezana sa deformacijom u ravni aromatičnog prstena. Trake na 1438 cm^{-1} i 1400 cm^{-1} potiču od CH deformacije iz CH₃ grupe (Mohamad Ibrahim et al., 2009). Region između 1500 cm^{-1} do 1400 cm^{-1} je karakterističan za vibracije -CH- (iz -CH₂) (Roczniak et al., 1983). Traka na 1380 cm^{-1} je povezana sa deformacijom u ravni fenolne OH grupe (González-Baró et al., 2008). Vibracija koja potiče od C-O-C se u spektru javlja kao intenzivna traka na 1280 cm^{-1} . Traka na 1168 cm^{-1} potiče od C=O grupe, dok traka na

1116 cm^{-1} potiče od aromatične C-H deformacije u ravni. Vibracije u oblasti od 786 cm^{-1} do 852 cm^{-1} su karakteristične za C-H (González-Baró et al., 2008).



Slika 4.3. FTIR spektri uzoraka na bazi karnauba voska i etil vanilina: a) Neinkapsulisani etil vanilin; b) Čestice karnauba vosak/aroma dobijene disperzijom pomoću vazduha; c) Čestice karnauba vosak/aroma dobijene disperzijom u vodi; d) Smeša karnauba voska i etil vanilina.

U FTIR spektru karnauba voska (PRILOG 1) se uočava traka u opsegu 3600-3200 cm^{-1} koja potiče od OH grupe. Vibracije koje potiču od C-H veze se javljaju u spektru kao trake u opsegu 3000-2800 cm^{-1} . Ostale trake se vezuju za sledeće veze: 1780-1700 cm^{-1} (C=O); 1480-1300 cm^{-1} (C-H); 1300-900 cm^{-1} (C-O) i 750-700 cm^{-1} (C-H) (Suter et al., 1999). Poređenjem spektara karnauba voska i čestica bez arome se može zaključiti da nema značajnih promena u FTIR spektru nosača koje bi nastale kao posledica formiranja čestica.

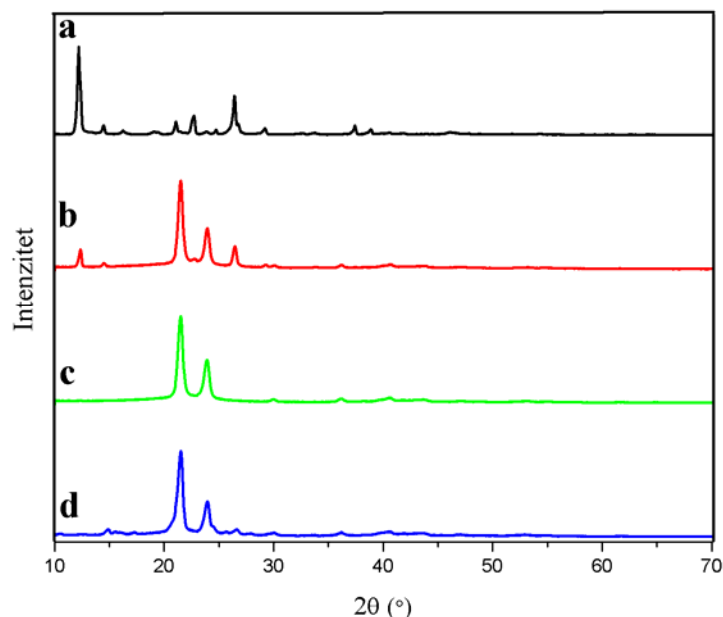
Kod spektara koji su dobijeni FTIR analizom čestica sa inkapsulisanom aromom kao i smeše etil vanilina i karnauba voska uočavaju se pre svega trake koje potiču od karnauba voska koje preklapaju one koje potiču od inkapsulisanog etil vanilina. Mogu se uočiti promene kod pozicije traka OH grupa arome u inkapsulatima, dok se kod smeše aroma/vosak pozicija date trake ne menja. Preklapanja traka u FTIR spektru između nosača i aktivne komponente predstavljaju

prepreku u tumačenju dobijenih rezultata. Iz tih razloga se ne može pouzdano proceniti koje interakcije se javljaju između arome i nosača (Milanović, 2011b).

Difraktogrami dobijeni XRD analizom neinkapsulisanog etil vanilina, inkapsulisane arome u česticama na bazi karnauba voska kao i smeša arome i voska su prikazani na Slici 4.4. U difraktogramu slobodnog etil vanilina se mogu uočiti sledeći pikovi: $2\theta=12.2^\circ$, $2\theta=14.5^\circ$, $2\theta=21.1^\circ$, $2\theta=22.7^\circ$, $2\theta=26.4^\circ$, $2\theta=29.2^\circ$, $2\theta=37.45^\circ$, $2\theta=38.85^\circ$. Difraktogram dobijen difrakcijom X zraka neinkapsulisanog etil vanilina jasno pokazuje kristalnu strukturu ove arome i u saglasnosti je sa prethodno objavljenim rezultatima (Li et al., 2008).

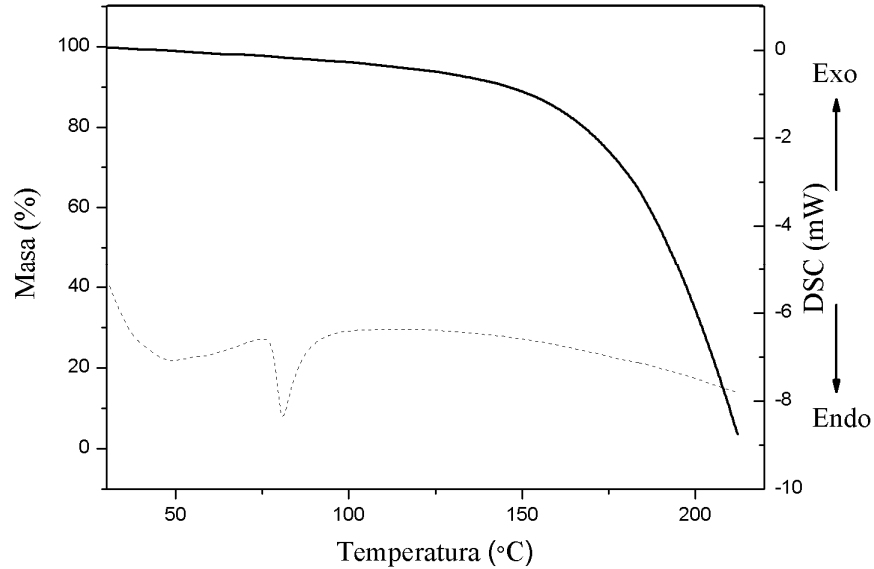
Analizom difraktograma inkapsulisanog etil vanilina se može zaključiti da je većina pikova koji potiču od arome zaklonjena pikovima koji potiču od nosača tj. karnauba voska. Na bazi dobijenih rezultata difrakcije X zraka ne može se sa sigurnošću reći da je došlo do promena u kristalnoj strukturi inkapsulisane arome. Ako se pogleda difraktogram čestica dobijenih metodom disperzije vazduhom (Slika 4.4b), može se uočiti da se javljaju neki od karakterističnih pikova za aromu: $2\theta=12.2^\circ$, $2\theta=26.4^\circ$ i $2\theta=29.2^\circ$. Ostali pikovi su preklapljeni pikovima koji potiču od karnauba voska.

U PRILOGU 2 su dati rezultati XRD analize karnauba voska i čestica dobijenih metodom emulzifikacije i disperzije vazduhom bez inkapsulisane arome. Rezultati pokazuju da dati procesi dobijanja čestica nemaju značajnijeg uticaja na strukturu karnauba voska. Ovi podaci su u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživača koji su takođe potvrdili da proces dobijanja čestica metodom emulzifikacije nema uticaja na strukturalna svojstva karnauba voska (Milanović, 2011a).



Slika 4.4. Difrakogrami uzoraka na bazi karnauba voska i etil vanilina: a) Neinkapsulisani etil vanilin; b) Čestice karnauba vosak/aroma dobijene disperzijom pomoću vazduha; c) Čestice karnauba vosak/aroma dobijene disperzijom u vodi; d) Smeša karnauba voska i etil vanilina.

Kako je sa tehnološkog aspekta termička stabilnost proizvoda jedna od najvažnijih karakteristika, vršena su ispitivanja termičkih svojstava dobijenih inkapsulata odgovarajućim tehnikama analize. Termička stabilnost slobodne, inkapsulisane arome i nosača je ispitivana metodom termogravimetrije/diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (TGA/DSC). Na Slici 4.5. su prikazane TGA i DSC krive slobodnog (neinkapsulisanog etil vanilina). Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da slobodna aroma pokazuje gubitak mase u čitavom temperaturnom opsegu, s tim što je on posebno intenzivan iznad 150°C. Uzorak čiste arome je do 210°C izgubio ~95% mase. Rezultati DSC analize su pokazali da etil vanilin pokazuje endotermni maksimum na 80,7°C što predstavlja temperaturu topljenja arome. Dobijena vrednost tačke topljenja čiste arome je približna literaturnim podacima za tačku topljenja čistog etil vanilina (Burdock, 2009).

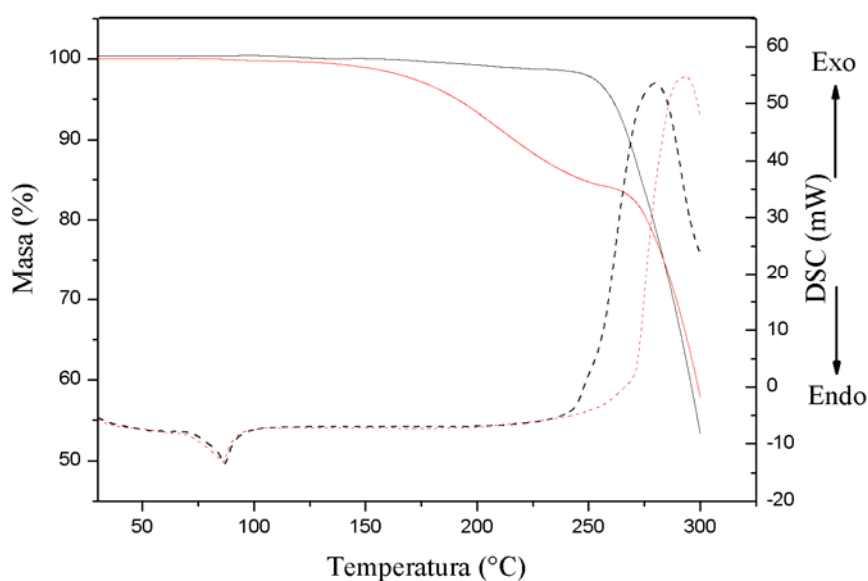


Slika 4.5. TGA (crna puna linija) i DSC (crna isprekidana linija) krive slobodnog (neinkapsulisanog) etil vanilina.

Termička analiza inkapsulisanog etil vanilina je data na Slici 4.6. Gubitak mase uzoraka dobijenih disperzijom vazduhom počinje nakon 150°C, što je za oko 20°C manje nego u slučaju čestica dobijenih metodom disperzije u vodi. Ovo je donekle očekivano s obzirom na veći sadržaj arome kod čestica dobijenih metodom disperzije vazduhom. Veći sadržaj etil vanilina utiče na promenu strukture čestica, što za posledicu ima i promenu termičkih svojstava čestica. Kod čestica dobijenih metodom disperzije u vodi pad mase počinje nakon 170°C ali je ovaj gubitak mase daleko manji nego u slučaju čestica dobijenih metodom disperzije vazduhom. Ova pojava se može objasniti pre svega činjenicom da ove čestice sadrže manje aktivne komponente tj. arome. Efekat inkapsulacije na termička svojstva etil vanilina se ogleda pre svega kroz kontrolisano termičko otpuštanje arome na povišenim temperaturama. Kao što je već ranije rečeno, najveći deo slobodne arome se oslobodi do nešto iznad 200°C. U slučaju inkapsulisane arome, proces termičkog otpuštanja etil vanilina se javlja na višim temperaturama i u znatno širem temperaturnom opsegu, što je posebno izraženo kod čestica dobijenih metodom disperzije vazduhom, kod kojih je gubitak mase do 210°C (temperatura do koje ispari 95% slobodne arome) oko 10%. Gubitak mase se dalje nastavlja sve do temperature ~270°C, od koje dalje kreće proces termičke dekompozicije karnauba voska. Kod čestica dobijenih metodom disperzije

u vodi, pad mase do 250°C je manji od 5%, što je u direktnoj vezi sa činjenicom da su čestice dobijene ovom metodom pokazale manju inkapsulacionu efikasnost u poređenju sa česticama dobijenim metodom disperzije vazduhom. Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koji se mogu naći u literaturi (Milanovic et al., 2010).

Drugi pad mase se javlja nakon ~270°C (čestice dobijene metodom disperzije u vodi), odnosno nakon 280°C (čestice dobijene disperzijom vazduhom). Ovaj gubitak mase se može povezati sa procesima termičkog dekomponovanja nosača tj. karnauba voska (Milanovic et al., 2010).



Slika 4.6. TGA (pune linije) i DSC (isprekidane linije) krive čestica karnauba voska sa inkapsulisanim aromom: čestice dobijene disperzijom u vodi (crne linije); čestice dobijene disperzijom vazduhom (crvene linije).

Rezultati DSC analize inkapsulisane arome pokazuju dva karakteristična maksimuma. Prvi maksimum kod čestica dobijenih metodom disperzije u vodi se javlja na 86,74°C, dok se kod čestica dobijenih metodom disperzije vazduhom ovaj maksimum javlja na 85,86°C. Ova dva endotermna pika odgovaraju procesu topljenja materijala čestica (arome i nosača) (Milanovic et al., 2010). Druga dva maksimuma se javljaju na 279,47°C (čestice dobijene disperzijom u vodi) i na 293°C (čestice dobijene disperzijom vazduhom). Ova dva egzotermna maksimuma odgovaraju pre svega procesu dekompozicije voska i zaostale arome. Može se zaključiti da

dodatak arome nije značajnije uticao na tačku topljenja čestica u poređenju sa čistim voskom (za čist karnauba vosak videti PRILOG 3). Mora se naglasiti da na tačku topljenja čitavog sistema (aroma/nosač) primarni uticaj ima nosač tj. karnauba vosak, što je i očekivano s obzirom da je sadržaj voska veći u odnosu na etil vanilin. Aroma ispoljava svoj uticaj na termička svojstva čestica u onoj meri u kojoj je zastupljena tj. zadržana nakon inkapsulacije.

Pored analize slobodnog i inkapsulisanog etil vanilina, vršena je i analiza karnauba voska kao i praznih čestica (bez inkapsulisane arome) dobijenih po istim postupcima kao i čestice sa inkapsulisanom aromom. Cilj ovih analiza je bio da se utvrdi uticaj nosača na termička svojstva inkapsulisane arome ali i da se ispita uticaj procesa dobijanja čestica na svojstva karnauba voska. Kao što je već rečeno, karnauba vosak pokazuje značajan gubitak mase usled termičke degradacije na temperaturama preko 250°C (PRILOG 3) mada se u slučaju čestica dobijenih metodom disperzije vazduhom (PRILOG 4) gubitak mase javlja u nešto širem temperaturnom opsegu. Analiza DSC krive čistog karnauba voska u temperaturnom intervalu od 30°C do 300°C pokazuje dva temperaturna maksimuma: prvi je endotermni pik na 87,19°C koji se vezuje za proces topljenja voska; drugi maksimum se javlja na 281,56°C kao egzotermni, verovatno kao posledica termičke degradacije voska. Čestice karnauba voska bez inkapsulisane arome pokazale su slična termička svojstva kao i karnauba vosak, uz minimalna odstupanja koja se mogu uočiti na TGA i DSC krivama. Prikazani rezultati pokazuju da procesi dobijanja čestica na bazi karnauba voska ne utiču značajnije na termička svojstva samog nosača.

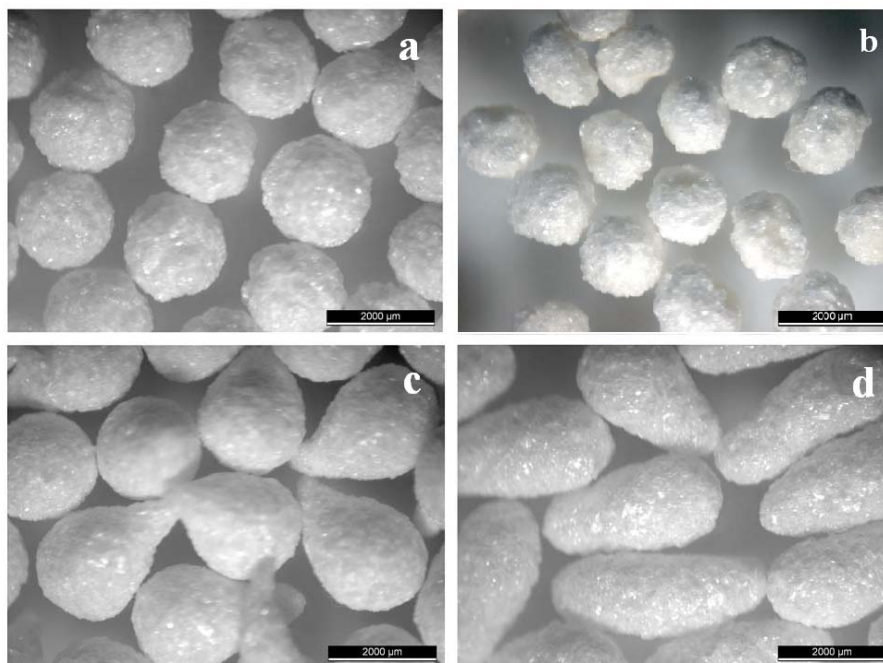
Može se zaključiti da se procesom inkapsulacije etil vanilina u karnauba vosak postiže nekoliko pozitivnih efekata. Prvo, čestice sa inkapsulisanom aromom imaju određeni, stabilni oblik, što olakšava potencijalnu primenu. Naime, etil vanilin je u slobodnom stanju u obliku praha, koji bi mogao da predstavlja problem pri rukovanju i doziranju u primeni. S druge strane, čestice sa inkapsulisanom aromom imaju kao što je rečeno stabilan oblik i veličinu, te su sa tog aspekta pogodnije za rukovanje. Glavna prednost inkapsulacije etil vanilina u karnauba vosku je unapređena termička stabilnost inkapsulisane arome u odnosu na slobodni (neinkapsulisani) etil vanilin. Rezultati pokazuju efekat kontrolisanog termičkog otpuštanja inkapsulisane arome u širokom temperaturnom opsegu. Konačno, sam proces inkapsulacije ne utiče značajnije na strukturalna svojstva inkapsulisane arome i nosača.

4.2. Inkapsulacija aroma u alginatu

U ovom poglavlju su predstavljeni rezultati inkapsulacije aroma u nosačima na bazi alginata. Inkapsulacija je vršena metodom elektrostatičke ekstruzije uz korišćenje čvrstih (etil vanilin) i tečnih aroma (komercijalna aroma kokosa i D-limonen) kao aktivnih komponenti. Uzorci su nakon inkapsulacije sušeni i analizirani sledećim metodama (u zavisnosti od svojstava uzoraka i prisutne arome): gasna hromatografija sa FID i MS detektorima, skenirajuća elektronska mikroskopija, svetlosna mikroskopija, termogravimetrija, FTIR spektroskopija i XRD analiza. Pored toga, vršena je analiza reoloških i drugih svojstava rastvora koji su relevantni sa stanovišta formiranja finalnih formi inkapsulata. Kod sistema sa tečnim aromama vršena su i ispitivanja rehidracije čestica i dobijeni rezultati su korišćeni za formiranje modela rehidracije čestica. Rezultati su pokazali da alginat predstavlja dobar nosač za inkapsulaciju čvrstih i tečnih aroma. Posebno se pokazao pogodnim za formiranje stabilnih suspenzija i emulzija aroma, što je jedan od ključnih uslova za dostizanje visoke inkapsulacione efikasnosti. Rezultati su pokazali da se inkapsulacijom postiže bolja termička stabilnost aroma.

4.2.1. Inkapsulacija etil vanilina u Ca-alginatu metodom elektrostatičke ekstruzije

Inkapsulacija etil vanilina je vršena metodom elektrostatičke ekstruzije uz korišćenje Ca-alginata kao nosača. Stvaranje gela Ca-alginata je vršeno izmenom jona Na^+ (iz alginata) jonima Ca^{2+} iz rastvora CaCl_2 (rastvor za geliranje). Nakon formiranja, čestice su sušene na sobnoj temperaturi i dalje analizirane. Srednji prečnik vlažnih čestica sa 20% arome je iznosio $2,41 \pm 0,04\text{mm}$. Nakon sušenja, došlo je do smanjenja prečnika čestica (za oko 18%) kao posledica isparavanja vode. Ovo smanjenje prečnika nije uticalo na oblik čestica (Slika 4.7a). Međutim, kod čestica sa 10% inkapsulisane arome je došlo do narušavanja oblika koje je praćeno i sa značajnijim smanjenjem prečnika, koji je nakon sušenja iznosio $\sim 1,5\text{mm}$ (Slika 4.7b). Smanjenje prečnika i oblika čestica se može objasniti time da čestice sa 10% inkapsulisane etil vanilina sadrže više vode koja isparava tokom sušenja nego čestice sa 20% arome, pa je time i efekat smanjenja prečnika veći kod čestica sa manje inkapsulisane arome.



Slika 4.7. Slike suvih čestica Ca-alginata sa inkapsulisanim etil vanilinom: a) čestice sa 20% arome; b) čestice sa 10% arome; c) čestice sa 30% arome; d) čestice sa 40% arome.

Kontrolni uzorak praznih čestica je nakon sušenja pokazao značajno narušavanje oblika usled gubitka vode. Pored promene oblika, nakon sušenja čestice bez arome su ostale grupisane u agregate. Ova pojava nije primećena kod čestica koje sadrže 20% etil vanilina verovatno usled efekta koji dodatak etil vanilina ima na morfologiju i strukturu čestica. Može se reći da u ovom slučaju etil vanilin ima ulogu punioca i da na taj način stabilizuje oblik i veličinu čestica nakon sušenja. Međutim, kada je udeo etil vanilina prešao 20%, tj. kada je vršena inkapsulacija sa 30% i 40% etil vanilina, došlo je do poremećaja u sferičnosti čestica (Slika 4.7c,d). Narušavanje sfernog oblika čestica koje sadrže 30% i 40% arome je verovatno uslovljeno promenama u reološkim karakteristikama rastvora nakon dodatka arome (Chan et al., 2009). Mora se uzeti u obzir da je pored izmenjenih karakteristika rastvora na formiranje izduženih čestica svakako imala uticaj i primena elektrostatičkog polja koje deluje na mlaz tečnosti povlačeći ga prema izvoru suprotnog naelektrisanja (u ovom slučaju rastvora za geliranje). Elektrostatičko polje izdužuje mlaz tečnosti (u ovom slučaju alginat/aroma) pri čemu se formiraju nepravilne (izdužene) kapi koje padaju u rastvor za geliranje i zadržavaju nepravilan oblik. Pokazalo se da 20% etil vanilina predstavlja maksimalnu količinu arome koja se može inkapsulisati u Ca-alginatu a da se zadrži sferni oblik čestica. Dobijanje sfernih čestica je jedna od glavnih prednosti elektrostatičke

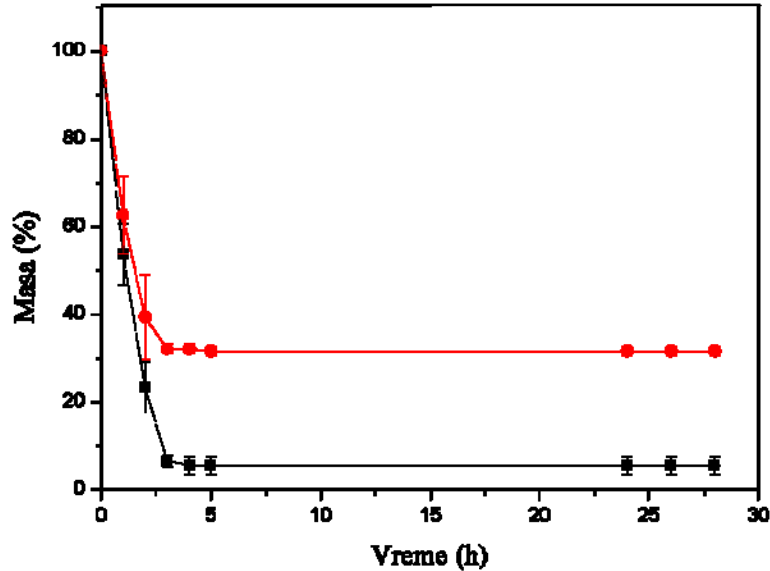
ekstruzije u kombinaciji sa alginatom kao nosačem. Sferne čestice su poželjne kada se želi postići kontrolisano otpuštanje i ujedno zadovoljavajući vizuelni efekat.

Test rehidracije u vodi je pokazao da čestice sa inkapsulisanom aromom zadržavaju svoj oblik. S druge strane, rehidracija u fosfatnom puferu je pokazala da dolazi do potpunog rastvaranja čestica i gubitka strukture Ca-alginata. U Poglavlju 4.2.3 je dat mehanizam dejstva vode i jona iz fosfatnog pufera na struktura svojstva Ca-alginata. Stabilizacija strukture Ca-alginata u cilju bolje otpornosti prema jonima i sprečavanja dezintegracije matriksa su vršeni dodakom PVA i njegovim geliranjem metodom smrzavanja-otapanja (Poglavlje 4.3.1).

Takođe, ispitivan je i uticaj sastava čestica na kinetiku isparavanja vode, tj. na njen transport kroz strukturu Ca-alginata. Rezultati praćenja kinetike sušenja su dati na Slici 4.8. Prema prikazanim rezultatima, masa čestica je postala konstantna nakon ~3 sata sušenja. Dati rezultati merenja gubitka mase čestica su dalje testirani korišćenjem teorijskog modela predloženog od strane Lyn i Ying (2010). Model se bazira na predpostavci da je gubitak mase posledica difuzije zasićene vodene pare sa površine čestica ka spoljašnjem vazduhu pri ambijentalnoj relativnoj vlažnosti. Vreme potrebno da se masa čestica ujednači (t_2) tj. postane konstantna u toku sušenja se može izračunati putem Jednačine 4.1:

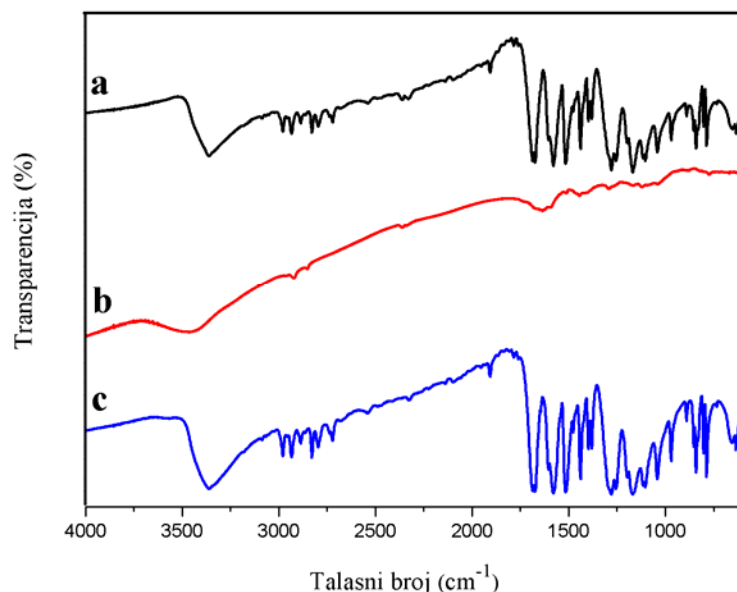
$$t_c = K \frac{3 \left(\frac{4}{3} \pi \rho M_0^2 f \right)^{1/3}}{8 \pi D_v C_{sat} (1 - R_h / 100)} \quad (4.1)$$

Uslovi za primenu modela: koeficijent difuzije (D_v) = 0.256 cm² s⁻¹, koncentracija vodene pare na površini čestica (C_{sat}) = 23 g m⁻³ (za temperaturu od 25°C i normalni atmosferski pritisak) (Perry, 1950; Lange, 1999). Ostali parametri: f = 0.75 (Lee et al., 2003), empirijski faktor (K) = 2.8 (Lyn i Ying, 2010), gustina čestica (ρ) = 1.0 g cm⁻³, početna masa vode (M_0) = 8.1 mg, relativna vlažnost (R_h) = 0.7 (relativna vlažnost vazduha 70%). Na bazi ovih podataka je izračunata vrednost t_c po Jednačini 4.1 za Ca-alginatne čestice i ona je iznosila 186 minuta, što je približno jednako vrednosti dobijenoj eksperimentalnim merenjem. Pokazalo se da teorijski model može da pruži zadovoljavajuće vrednosti za proračun vremena pri kome se masa čestica ustaljuje.



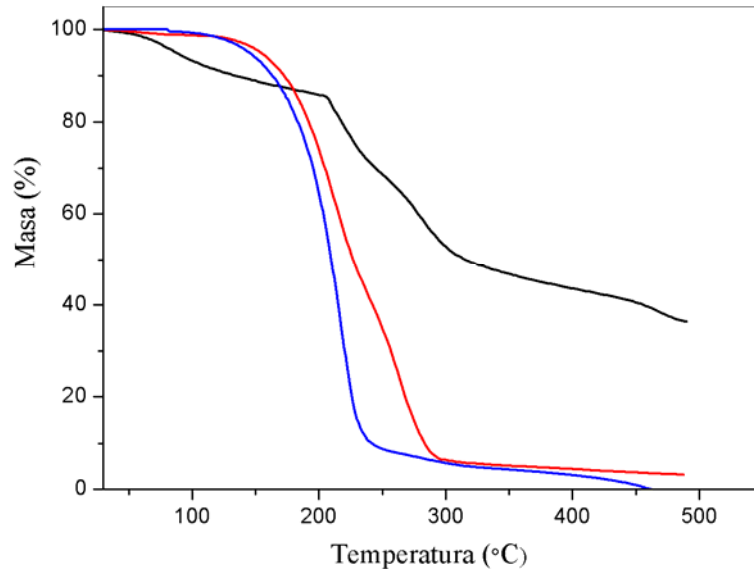
Slika 4.8. Kinetika sušenja čestica: prazne čestice Ca-alginata (■); čestice Ca-alginata sa 20% inkapsulisanog etil vanilina (●).

Moguće hemijske interakcije između inkapsulisane arome i Ca-alginata su ispitivane FTIR spektroskopijom i dobijeni spektri su prikazani na Slici 4.9. Analiza FTIR spektara i objašnjenje za pojedine trake kod neinkapsulisanog etil vanilina su dati u Poglavlju 4.1. U FTIR spektru Ca-alginata se javlja karakteristična traka na 3450 cm^{-1} koja potiče od -OH grupa u molekulu alginata. Ova traka je u slučaju inkapsulisane arome zaklonjena trakom koja potiče od fenolne grupe etil vanilina. Trake koje se javljaju oko 1625 cm^{-1} i oko 1450 cm^{-1} u spektru Ca-alginata potiču od prisustva karboksilnog anjona (Huang et al., 1999; Ribeiro et al., 2004; Singh et al., 2009). Trake koje se javljaju u oblasti $1200\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$ su karakteristične za prirodne polisaharide (Singh et al., 2009). U spektru inkapsulisane arome dominiraju trake koje potiču od etil vanilina i one u potpunosti preklapaju trake koje potiču od Ca-alginata. Iz rezultata se može zaključiti da nema jakih hemijskih interakcija između inkapsulisane arome i Ca-alginata, već da se obe komponente u inkapsulatima ponašaju kao odvojene faze.



Slika 4.9. FTIR spektri: a) Čistog (neinkapsulisanog etil vanilina); b) Kalcijum alginatnih čestica (bez arome); c) Inkapsulisanog etil vanilina (čestice sa 20% arome).

Termička stabilnost slobodnog (neinkapsulisanog) etil vanilina, čestica na bazi Ca-alginata i praznih Ca-alginatnih čestica je ispitivana metodom termogravimetrije i rezultati su prikazani na Slici 4.10. Slobodna aroma počinje da gubi masu na $\sim 140^{\circ}\text{C}$ (gubitak mase oko 5%), dok se najveći gubitak mase dostiže do $\sim 220^{\circ}\text{C}$. Termička degradacija alginata se prema literaturi odigrava u više faza: faza dehidracije; faza depolimerizacije koja je praćena raskidanjem C-O i C-C veza uz nastanak CO, CO₂, i H₂O; faza nastanka aromatičnih i ugljeničnih struktura (Parikh i Madamwar, 2006). Kod praznih čestica Ca-alginata se uočava jasna razlika između temperaturnih oblasti u kojima dolazi do gubitka mase. U prvom opsegu od 50-150°C pad mase se može povezati sa gubitkom vode koja je u interakciji sa polisaharidom (Laurienzo et al., 2005).

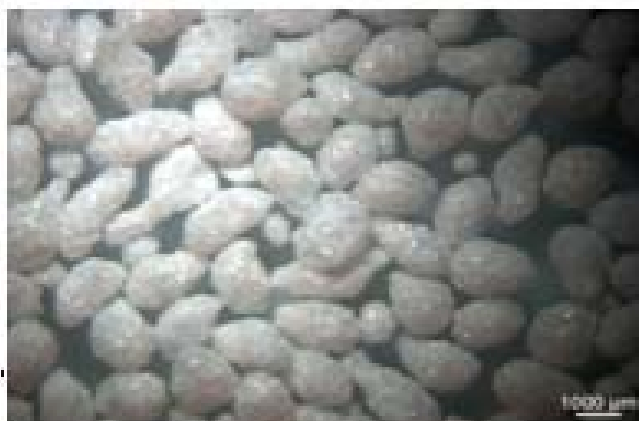


Slika 4.10. TGA krive: neinkapsulisanog (slobodnog) etil vanilina (plava linija); Ca-alginatne čestice (suve, prazne) (crna linija); Ca-alginatne čestice sa 20% inkapsulisanog etil vanilina (crvena linija).

Dekompozicija polimera počinje na oko 150°C i praćena je gubitkom mase od oko 12% u slučaju praznih čestica, odnosno 5% u slučaju čestica sa inkapsulisanom aromom. Drugi gubitak mase se uočava u temperaturnom opsegu 150-300°C i može se povezati sa daljom degradacijom alginata i oslobađanjem inkapsulisanog etil vanilina. Ako se uzme u obzir da se većina termičkih procesa u prehrambenoj industriji odigrava na temperaturama do 230°C onda se uočava prednost inkapsulacije. Naime, prema rezultatima termogravimetrijske analize, do ove temperature oko 50% etil vanilina ostaje unutar čestica, dok je do iste temperature slobodni etil vanilin pokazao gubitak mase od oko 86%. Može se zaključiti da se postupkom inkapsulacije etil vanilina unutar Ca-alginata dobija ne samo lakša manipulacija aromom (izbegava se upotreba praškaste arome) već i povećana termička stabilnost.

4.2.2. Inkapsulacija etil vanilina u alginatu metodom elektrostatske ekstruzije-elektrosprej

Rezultati su pokazali da dalje smanjenje veličine čestica Ca-alginat/etil vanilin primenom elektrostatske ekstruzije nije moguće s obzirom da se ekstruzija vrši iz suspenzije arome u alginatu. Kako su kristali arome suspendovani u alginatu, najmanja moguća veličina čestica koja se može dobiti ekstruzijom je upravo limitirana veličinom kristala arome ali i reološkim svojstvima alginata. Povećanje napona pri ekstruziji nije dovelo do značajnijeg smanjenja veličine čestica. Ekstruzija samog rastvora alginata (bez arome) je pokazala da nije moguće dobiti čestice sa umanjenim prečnikom pri datim uslovima, uz očuvanje sfernog oblika (Slika 4.11).



Slika 4.11. Čestice dobijene elektrostatskom ekstruzijom suspenzije 20% etil vanilina u alginatu pri 6,5kV.

Problem pre svega predstavlja činjenica da se pri ekstruziji suspenzije alginat/aroma mora koristiti igla velikog prečnika kako bi se obezbedio nesmetani protok suspenzije u toku ekstruzije. Ovo umanjuje mogućnost dobijanja čestica manjih dimenzija jer prema literaturnim podacima veličina čestica pored napona i protoka rastvora zavisi i od prečnika igle koja se koristi u procesu elektrostatske ekstruzije (Nedović et al., 2001).

Kako bi se prevazišao problem dobijanja čestica manjih (mikronskih) dimenzija procesom elektrostatske ekstruzije, izvršena je modifikacija rastvora alginata dodatkom smeše etanol:voda (zapreminski odnos 70:30). Na ovaj način je postignuta kako modifikacija reoloških svojstava rastvora alginata, tako i rastvaranje etil vanilina. Ovim se izbegava rad sa suspenzijom arome već

se ekstruzija vrši iz rastvora arome, što omogućava nesmetani rad pri visokim naponima. Na ovaj način je moguće primeniti visoke napone pri ekstruziji, dok se dodatno smanjenje veličine čestica postiže smanjenjem protoka rastvora. Proces elektrostatičke ekstruzije pri visokim naponima i malim protocima se još naziva i elektrosprej tehnika.

U ovom radu su ispitivana dva načina dobijanja čestica iz rastvora etil vanilina u alginatu primenom elektrostatičke ekstruzije-elektrosprej tehnike: ekstruzija u rastvor za geliranje (CaCl_2) i ekstruzija na čvrsti kolektor. Prilikom ekstruzije rastvora arome u rastvor za geliranje nije došlo do formiranja čestica. Naime, usled promena u sastavu rastvora (dodatkom etanola) došlo je do nakupljanja materijala na površini rastvora za geliranje što je dovelo do formiranja sloja koji nije dao slobodne čestice. Razlog za ovo verovatno leži u činjenici da je usled dodatka etanola došlo do promena u svojstvima alginata. Ove promene su verovatno poremetile mehanizam formiranja Ca-alginata.

S druge strane, kada je vršena ekstruzija (elektrosprej) na površinu čvrstog kolektora (Al folije), došlo je do formiranja čvrstih filmova koji se sastoje iz velikog broja čestica mikronskih dimenzija (videti ispod). Filmovi koji sadrže etil vanilin su jače vezani za površinu kolektora i bele su boje. Filmovi na bazi čistog alginata su providni i relativno lako se uklanjaju sa površine kolektora.

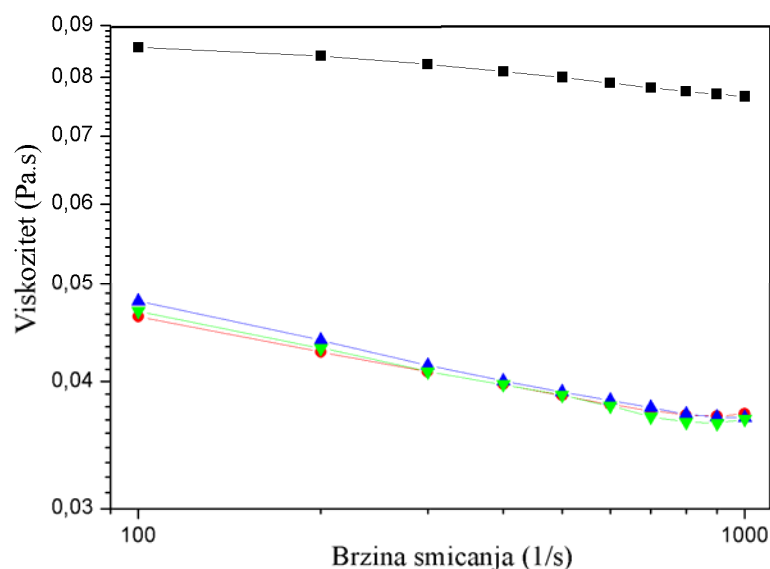
Formiranje čestica pod dejstvom elektrostatičkog polja pre svega zavisi od reoloških karakteristika sistema. Pored reoloških karakteristika, na dobijanje čestica pod dejstvom elektrostatičkog polja veliki uticaj ima i provodljivost rastvora iz kog se dobijaju čestice. Prema rezultatima merenja, provodljivost rastvora alginata opada sa dodatkom etanola ili rastvora arome. Za alginatni rastvor izmerena je provodljivost od 4,06 mS/cm dok je sa dodatkom etanola provodljivost opala za približno deset puta (na oko 0,48 μ S/cm). Ovakav rezultat je očekivan jer alginat kao negativno naelektrisani polisaharid najviše utiče na provodljivost rastvora. Dodatkom etanola i arome udeo alginata se smanjuje i dolazi do opadanja provodljivosti rastvora.

Uticaj provodljivosti rastvora na formiranje čestica pod dejstvom elektrostatičkog polja je dobro poznat u literaturi. Generalno, povećanje provodljivosti rastvora dovodi do smanjenja veličine čestica (Jaworek i Sobczyk, 2008). Ukoliko postoji potreba, provodljivost rastvora se može povećati dodatkom organskih soli (Xie et al., 2006). Međutim, rezultati ovog rada ukazuju da je moguće vršiti ekstruziju rastvora alginata sa dodatkom etanola iako je provodljivost drastično smanjena. Ovo potvrđuje ranije iznetu konstataciju da na formiranje čestica najveći

uticaj imaju reološka svojstva rastvora. Potvrda ovoga je i to što se iz rastvora alginata (bez dodatka arome ili etanola) ne mogu dobiti čestice sličnih dimenzija kao u slučaju kada se u rastvoru nalazi etanol i aroma.

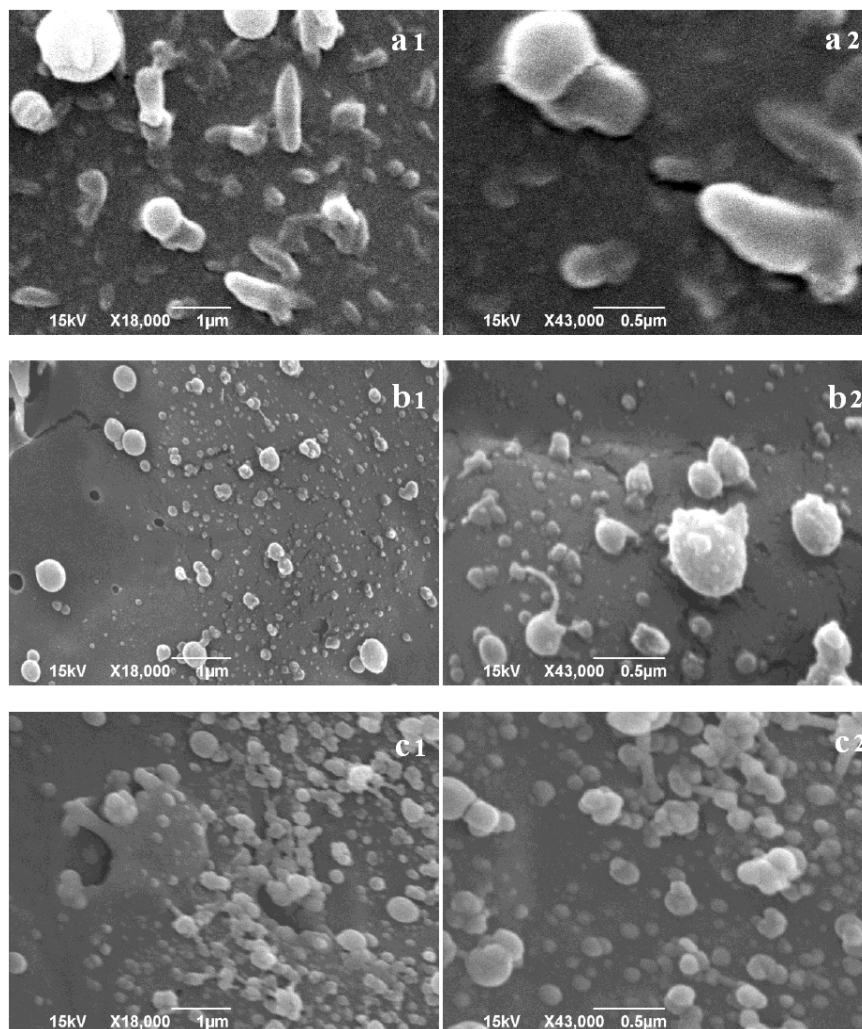
Kao što je već rečeno, na proces dobijanja čestica metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrosprej pored provodljivosti utiču još i reološka svojstva rastvora. Viskozitet je svakako najvažnija karakteristika rastvora koja se mora uzeti u obzir pri radu sa rastvorima prirodnih polisaharida. Kao što se može videti na Slici 4.12, viskozitet rastvora se smanjuje sa smanjenjem udela alginata u rastvoru za inkapsulaciju. Ova modifikacija reoloških svojstava je nastala kao posledica dodatka etanola tj. razređenjem alginatnog rastvora. Može se takođe primetiti da sa povećanjem brzine smicanja dolazi do smanjenja viskoziteta kako u rastvoru alginata tako i u rastvorima sa etil vanilinom i etanolom. Smanjenje viskoziteta alginata sa povećanjem brzine smicanja ukazuje na nenjutnovsko ponašanje alginata.

Uvođenje etanola u smešu sa alginatom se pokazalo neophodnim kako bi se rastvorio etil vanilin. Međutim, etanol nije rastvarač za alginat već naprotiv može dovesti do taloženja alginata iz rastvora, što se u procesima izdvajanja i prečišćavanja ovog polisaharida i primenjuje (Haug i Smidsrød, 1965). Kako je za rastvaranje arome korišćen razblaženi rastvor etanola, nije primećeno izdvajanje alginata iz rastvora tj. njegovo taloženje. Treba reći da se u literaturi mogu naći podaci o upotrebi etanola kao rastvarača u sistemima na bazi PVA nanovlakana dobijenih metodom elektrospininga, gde je taloženje polimera izbegnuto upravo primenom odgovarajuće koncentracije etanola uz istovremeno rastvaranje aktivne komponente (Zhang et al., 2005). Može se zaključiti da je dodatak razblaženog rastvora etanola imao povoljan efekat i to kako na rastvorljivost etil vanilina pre ekstruzije, tako i na reološka svojstva samog rastvora. Ovo je za posledicu imalo to da je predložena modifikacija omogućila dobijanje čestica mikronskih dimenzija (videti ispod), što nije bio slučaj kod nemodifikovanog (nerazblaženog) rastvora alginata.



Slika 4.12. Viskozitet rastvora u zavisnosti od brzine smicanja: 2%w/w rastvor alginata (S₁) (■); alginat/etanol (S₂) (●); alginat/aroma (S₃) (▲); alginat/aroma (S₄) (▼).

Rezultati SEM analize uzoraka dobijenih metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrosprej su dati na Slici 4.13. Slike uzoraka koji su dobijeni ekstruzijom rastvora alginat/etanol pokazuju formiranje nepravilnih čestica (Slika 4.13a). Međutim, uzorci koji u sebi sadrže inkapsulisanu aromu (S₃ i S₄) pokazuju mnogo pravilniji oblik čestica (Slika 4.13b-c). Površina uzoraka ukazuje da se formiranje čestica odvija kombinovanjem procesa disperzije pod dejstvom elektrostatičkog polja i procesa isparavanja rastvarača. Isparavanje rastvarača (etanol/voda) se odvija u toku tranzicije čestica od vrha igle do kolektora i na samom kolektoru pri naknadnom sušenju uzoraka. Može se zaključiti da se inkapsulisana aroma ponaša kao punilac koji dodatno stabilizuje oblik čestica nakon uklanjanja rastvarača.



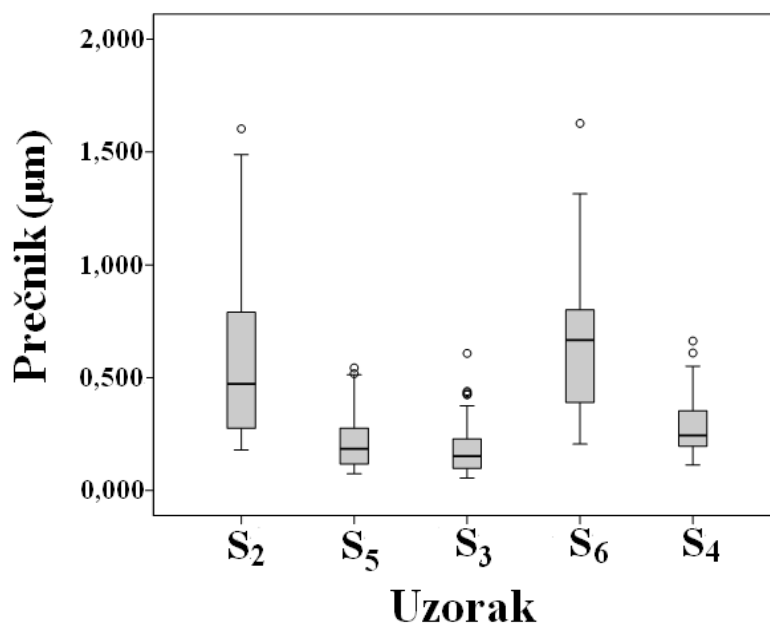
Slika 4.13. SEM slike uzoraka dobijenih elektrostatičkom ekstruzijom-elektrosprej tehnikom: a) alginat/etanol (S_2); uzorci sa inkapsulisanom aromom S_3 (b), S_4 (c). 1 i 2 označavaju manje i veće uvećanje pri snimanju.

Treba istaći da se čestice nakon formiranja grupišu u agregate. Ovo je verovatno posledica sporijeg ispravanja vode u odnosu na etanol (Yoshida and Miyashita, 2002; Park and Lee, 2009). Razlika u dinamici ispravanja vode i etanola dovodi do toga da se voda duže zadržava u česticama i ostaje u njima i nakon vezivanja za površinu kolektora. Voda koja zaostaje nakon ekstruzije je verovatni razlog formiranja agregata. Zaostala voda je uslovlila i potrebu za naknadnim sušenjem uzoraka pre daljih analiza.

Dalje smanjenje veličine čestica je pokušano sa primenom manjeg protoka, dok su ostali uslovi ekstruzije ostali isti. Prema literaturnim podacima, smanjenje protoka rastvora trebalo bi

da dovede do smanjenja veličine čestica (Jaworek and Sobczyk, 2008). Slike dobijene SEM analizom uzoraka sa inkapsulisanom aromom dobijenih primenom manjeg protoka (0,3ml/h) su date u PRILOGU 5. Rezultati morfoloških ispitivanja su pokazali da se generalno dobijaju slični oblici čestica kao u slučaju primene većeg protoka (1ml/h) kod sistema sa nižim sadržajem arome (S_5). S druge strane, kod formulacije sa većim sadržajem arome (S_6) primećene su varijacije u morfologiji čestica, koje se ogledaju pre svega u narušavanju sferičnosti čestica.

Raspodela srednjih vrednosti prečnika čestica dobijenih metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrosprej je data na Slici 4.14.



Slika 4.14. Raspodela srednjih vrednosti prečnika čestica dobijenih metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrosprej.

Srednje vrednosti prečnika čestica se kreću u rasponu $0,181 \pm 0,105 \mu\text{m}$ (S_3) do $0,667 \pm 0,342 \mu\text{m}$ (S_6). Rezultati analize varijanse prečnika čestica između različitih grupa uzoraka su dati u Tabeli 4.1. Homogeni podskupovi dobijeni naknadnim Tukey testom, prikazani su u Tabeli 4.2.

Tabela 4.1. Rezultati analize varijanse prečnika čestica između različitih grupa uzoraka (pre analize je urađena logaritamska transformacija podataka).

	Suma kvadrata	df	Srednja vrednost kvadrata	F	SIg.
Između grupa	69.084	4	17.271	64.401	.000
Unutar grupa	94.668	353	.268		
Ukupno	163.751	357			

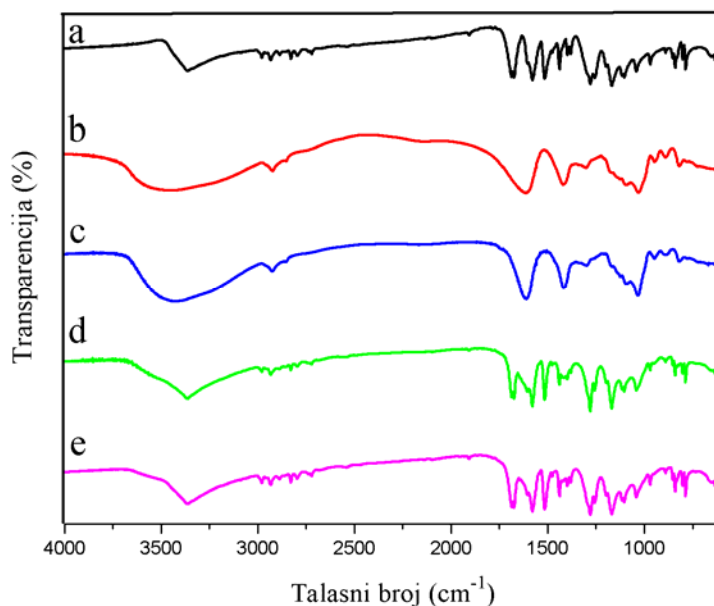
Tabela 4.2. Rezultati kategorizacije uzoraka u homogene podskupove Tukey testom (prikazane su srednje vrednosti podataka pre transformacije).

Uzorak	N	Podskup za $\alpha = 0,05$		
		1	2	3
S ₃	92	.18138		
S ₅	112	.21502	.21502	
S ₄	82		.28107	
S ₂	42			.59100
S ₆	30			.66683

Jednofaktorskom analizom varijanse, uz prethodnu transformaciju podataka (zbog odstupanja od normalne raspodele), utvrđeno je da su se prečnici čestica statistički značajno razlikovali.

Na Slici 4.15 je prikazan FTIR spektar natrijum alginata (u izvornom obliku i nakon ekstruzije), slobodnog (neinkapsulisanog) etil vanilina i inkapsulisane arome. FTIR spektar slobodnog etil vanilina pokazuje karakteristične trake koje su detaljno opisane u Poglavlju 4.1. Spektar natrijum alginata pokazuje traku na 3425 cm^{-1} koja potiče od -OH grupa u molekulu alginata. Kod spektara inkapsulisane arome ova traka je delimično zaklonjena trakom koja potiče od fenolne grupe etil vanilina. Trake na 1610 cm^{-1} i 1420 cm^{-1} potiču od prisustva karboksilnog anjona u molekulu alginata, dok su vibracije u oblasti od 1200 cm^{-1} do 1030 cm^{-1} karakteristične za prirodne polisaharide (Huang et al., 1999; Ribeiro et al., 2004; Singh et al., 2009). Spektri izvornog alginata i filma dobijenog ekstruzijom smeše alginat/etanol su skoro identični što ukazuje da dodatak etanola i sam proces ekstruzije ne utiču značajnije na FTIR spektar uzorka dobijenog ekstruzijom alginata.

U spektrima inkapsulisane arome očigledno dominiraju trake koje potiču od etil vanilina i koje preklapaju trake koje potiču od alginata. Rezultati FTIR analize pokazuju da između natrijum alginata i inkapsulisanog etil vanilina nema jakih hemijskih interakcija. Ove dve komponente u inkapsulisanom obliku najverovatnije formiraju odvojene faze.

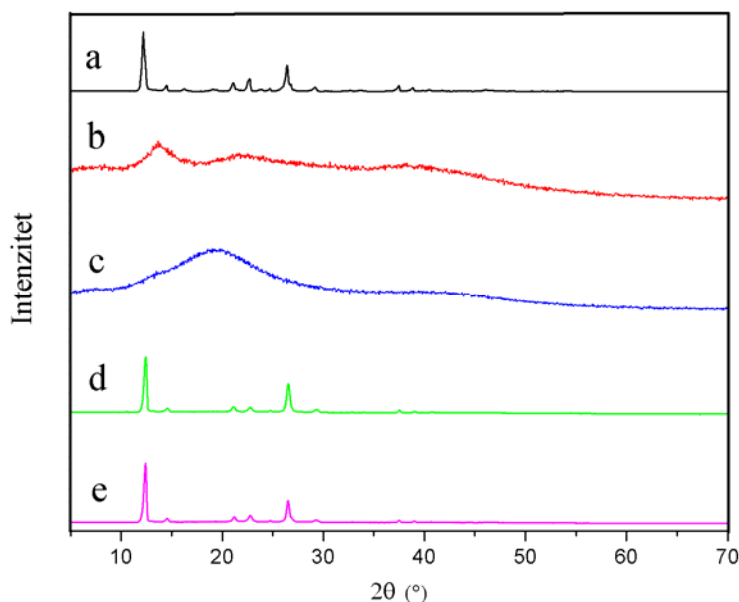


Slika 4.15. FTIR spektri: a) slobodni (neinkapsulisani) etil vanilin, b) natrijum alginat (izvorni), c) film dobijen ekstruzijom smeše alginat/etanol (S_2), d) film dobijen ekstruzijom smeše alginat/etil vanilin (S_3), e) film dobijen ekstruzijom smeše alginat/etil vanilin (S_4).

Rezultati XRD analize natrijum alginata (u izvornom obliku i nakon ekstruzije), slobodnog (neinkapsulisanog) etil vanilina i inkapsulisane arome su dati na Slici 4.16. Etil vanili pokazuje karakteristične pikove na: $2\theta=12.2^\circ$, $2\theta=14.5^\circ$, $2\theta=21.1^\circ$, $2\theta=22.7^\circ$, $2\theta=26.4^\circ$, $2\theta=29.2^\circ$ i $2\theta=37.45^\circ$. Ovakav difraktogram ukazuje na to da se slobodni (neinkapsulisani) etil vanilin javlja u kristalnom obliku. Kod natrijum alginata (izvorni) se javljaju dva široka pika na $2\theta=13.65^\circ$ i $2\theta=21.7^\circ$, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Cheong i Zhitomirsky, 2008; Dong et al., 2006). Alginat je prirodni polisaharid i njegov difraktogram pokazuje da u čvrstom obliku ima amorfnu strukturu, dok alginska kiselina može pak pokazati neka svojstva kristalne strukture (Ikeda et al., 2000)

Nakon ekstruzije, difraktogram natrijum alginata se menja što je uočljivo nestankom pika na $2\theta=13.65^\circ$ i pojavom novog pika na $2\theta=19.09^\circ$. Ovo sugeriše na formiranje nove strukture

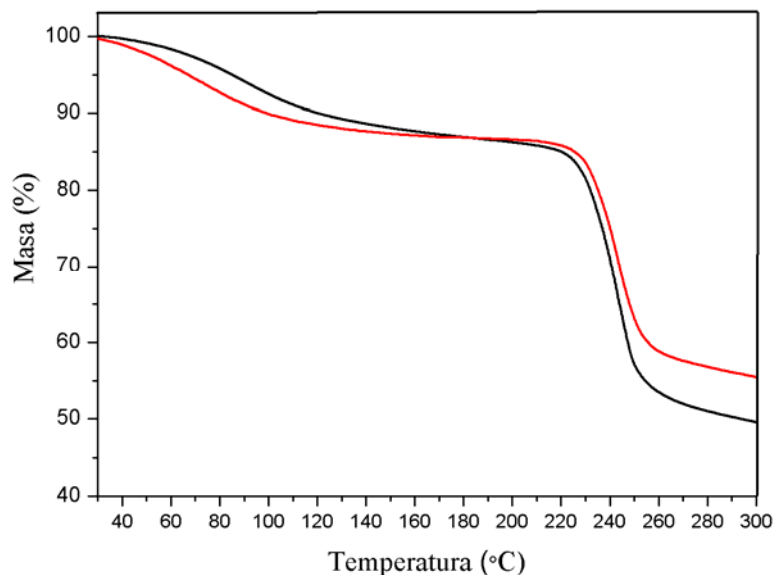
alginata koja se razlikuje od one u izvornom alginatu. Naravno, treba uzeti u obzir i to da je alginat ekstrudiran iz rastvora koji u sebi sadrži etanol, a koji s druge strane nije rastvarač za alginat, što može biti jedan od razloga za promenu u strukturi nakon ekstruzije. Difraktogrami uzoraka sa inkapsulisanom aromom pokazuju karakteristične pikove koji potiču od kristalne strukture etil vanilina i koji u potpunosti zaklanjaju pikove koji potiču od alginata. Kao što se može videti, difraktogrami inkapsulisane arome ne pokazuju značajnija odstupanja u odnosu na slobodni etil vanilin. Ovo ukazuje da etil vanilin zadržava svoju kristalnu strukturu nakon ekstruzije i pored činjenice da je dodat natrijum alginat kao nosač. Iz ovoga se može zaključiti da je formiranje čvrstih faza etil vanilina i alginata tokom ekstruzije verovatno odvojen proces koji ne utiče značajnije na strukturu inkapsulisane arome.



Slika 4.16. Difraktogrami: a) slobodni (neinkapsulisani) etil vanilin, b) natrijum alginat (izvorni), c) film dobijen ekstruzijom smeše alginat/etanol (S_2), d) film dobijen ekstruzijom smeše alginat/etil vanilin (S_3), e) film dobijen ekstruzijom smeše alginat/etil vanilin (S_4).

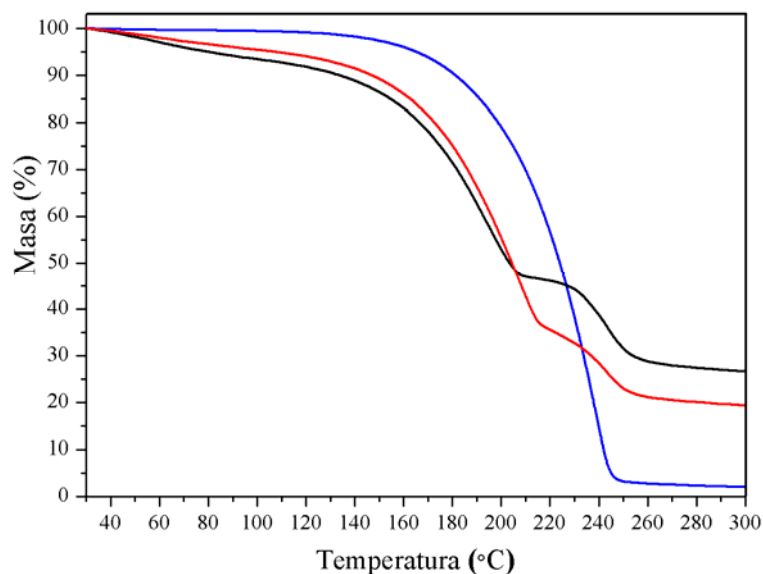
Termička stabilnost nosača (alginata) je ispitivana metodom termogravimetrije. Rezultati termogravimetrijskih analiza nosača su prikazani na Slici 4.17. U temperaturnom opsegu 50-150°C alginat kako u izvornom obliku tako i ekstrudirani pokazuje pad mase koji je verovatno povezan sa dehidracijom. Iznad 150°C dolazi do termičke dekompozicije alginata. Termička dekompozicija alginata je složen proces koji uključuje kako degradaciju polimera tako i

formiranje produkata razlaganja kao što su CO, CO₂ i H₂O (Parikh i Madamwar, 2006). Može se primetiti da nema većih razlika u dinamici gubitka mase između izvornog i ekstrudiranog alginata. Jedina značajnija razlika je u zaostaloj masi na temperaturama iznad 250°C. Iz ovoga se može zaključiti da proces ekstruzije nije značajnije uticao na termička svojstva ekstrudiranog u poređenju sa izvornim alginatom.



Slika 4.17. TGA krive: alginata (u izvornom obliku) (crna puna linija); filma dobijenog ekstruzijom smeše alginat/etanol (crvena puna linija).

Na Slici 4.18 su date TGA krive slobodnog (neinkapsulisanog) i inkapsulisanog etil vanilina. Prema ovim rezultatima, najveći pad mase u slučaju slobodne arome je u temperaturnom opsegu između 140°C i 250°C. TGA krive inkapsulisane arome pokazuju izmenjenu dinamiku gubitka mase, verovatno kao rezultat procesa inkapsulacije i uvođenja alginata kao nosača. Gubitak mase inkapsulisane arome se javlja u nižem temperaturnom opsegu (50-150°C) u poređenju sa slobodnim etil vanilinom. S druge strane, sam proces otpuštanja inkapsulisane arome se događa u širem temperaturnom opsegu u odnosu na slobodnu aromu. Ovo je pozitivan efekat inkapsulacije s obzirom da su termička svojstva inkapsulisane arome izmenjena u odnosu na slobodni etil vanilin i da je postignuta određena kontrola otpuštanja. Kontrolisano otpuštanje arome tokom termičke obrade hrane je jedna od najvažnijih prednosti koja se postiže procesom inkapsulacije (Manojlovic et al., 2008b).



Slika 4.18. TGA krive: slobodni (neinkapsulisani) etil vanilin (plava puna linija); inkapsulisani etil vanilin (S₃) (crna puna linija); inkapsulisani etil vanilin (S₄) (crvena puna linija).

Rezultati TGA analiza uzoraka inkapsulisane arome dobijeni elektrostatičkom ekstruzijom-elektrosprej tehnikom pod sniženim protokom (0,3ml/h) (uzorci S₅ i S₆) su dati u PRILOGU 6. Prikazani rezultati pokazuju da nema većih odstupanja u termičkim svojstvima ovih uzoraka u odnosu na one dobijene pod većim protokom (1ml/h).

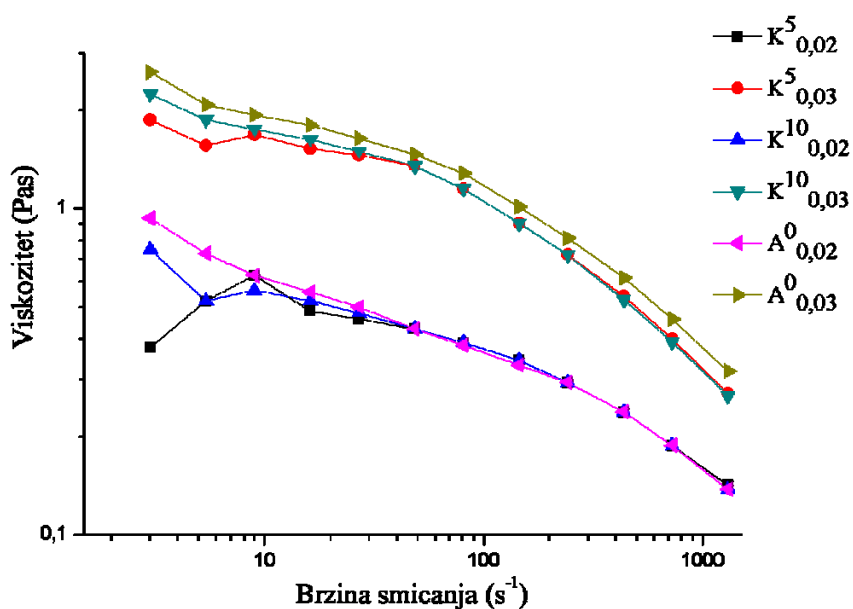
Može se zaključiti da se inkapsulacijom etil vanilina u alginatu metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrosprej mogu dobiti čestice mikronskih veličina. Ostvaren je pozitivan efekat na svojstva nosača tj. alginata preko modifikacije reoloških svojstava njegovih rastvora, što je konačno i omogućilo dobijanje čestica manjih dimenzija.

4.2.3. Inkapsulacija arome kokosa i D-limonena u Ca-alginatu metodom elektrostatičke ekstruzije

Natrijum alginat je korišćen kao nosač za inkapsulaciju tečnih aroma u obliku čestica metodom elektrostatičke ekstruzije. Finalna forma čestica je dobijena geliranjem Na-alginata u prisustvu Ca^{2+} jona, pri čemu nastaje Ca-alginat dok aktivna komponenta (aroma) ostaje zarobljena unutar strukture alginatnog gela. Pre same procedure inkapsulacije, vršena je priprema emulzija aroma i Na-alginata (tzv. tečni sistemi) uz ispitivanje pre svega reoloških svojstava emulzija. Kao aktivne komponente (arome) korišćene su komercijalno dostupne arome kokosa i D-limonen. Nakon inkapsulacije, čestice (tzv. čvrsti sistemi) su sušene na sobnoj temperaturi, a zatim je vršena analiza njihovih morfoloških karakteristika, sadržaja arome, rehidracije, hemijskih i termičkih svojstava.

Karakteristike tečnih sistema

Nakon dobijanja emulzija Na-alginat/aroma vršeno je ispitivanje reoloških svojstva, provodljivosti i stabilnosti emulzija (tečnih sistema). Ova svojstva su analizirana jer predstavljaju važne faktore koji direktno utiču na karakteristike čvrstih sistema tj. čestica Ca-alginata sa inkapsulisanim aromom dobijenih metodom elektrostatičke ekstruzije. Pored toga, analizirana su paralelno i reološka svojstva rastvora Na-alginata kako bi se utvrdio uticaj nosača na svojstva emulzija. Rezultati reoloških ispitivanja (viskoziteta) tečnih sistema (emulzija Na-alginat/aroma kokosa) su prikazani na Slici 4.19., dok su rezultati merenja viskoziteta emulzija Na-alginat/D-limonen dati u PRILOGU 7. Provodljivost rastvora i emulzija, kao i stabilnost emulzija je data u Tabeli 4.3.



Slika 4.19. Zavisnost viskoziteta rastvora Na-alginata i emulzija Na-alginat/aroma kokosa od brzine smicanja.

Viskozitet svih tečnih uzoraka je određen u opsegu brzine smicanja od 0 do 1300 s⁻¹. Kao što se može videti, viskozitet opada sa povećanjem brzine smicanja za sve tečne sisteme što ukazuje na pseudoplastično ponašanje. Može se zaključiti da ovakvo ponašanje alginata verovatno potiče od konformacijskih promena i orijentacije krutih polisaharidnih lanaca pod uticajem smicanja. Ovo je očekivano s obzirom da je alginat izgrađen od krutih lanaca koji utiču na mehanička svojstva ovog polisaharida (Lee et al., 2002).

Generalno, viskozitet Na-alginatnih rastvora i emulzija se povećava sa povećanjem koncentracije alginata. Ovakvo ponašanje je rezultat intenzivnijih interakcija između molekula alginata koje se javljaju u koncentrovanijim rastvorima sa izraženijim ne-Njutnovskim ponašanjem (Manojlović et al., 2006). U isto vreme, veće koncentracije D-limonena koji je dispergovan u Na-alginatu prouzrokuju nešto veće vrednosti viskoziteta. Kod emulzija sa aromom kokosa uticaj dodatka arome na vrednosti viskoziteta nije toliko izražen, posebno pri većim brzinama smicanja. U slučaju formulacije $K_{0,03}^{10}$ je primećeno i neznatno smanjenje viskoziteta sa dodatkom arome. D-limonen je u vodi nerastvorno jedinjenje čije dispergovane kapljice verovatno deluju kao prepreka konformacionim promenama i orijentaciji krutih

alginatnih lanaca pri smicanju. Sličan uticaj ulja na viskozitet alginata su dali Sosa-Herrera et al. (2012). Isti autori su ustanovili da dispergovane čestice ulja takođe uzrokuju povećanje viskoziteta vodenih rastvora Na-alginata. S druge strane, aroma kokosa je složenijeg hemijskog sastava (videti napred), čime mogu da se objasne i razlike u uticaju dve arome na reološka svojstva Na-alginata.

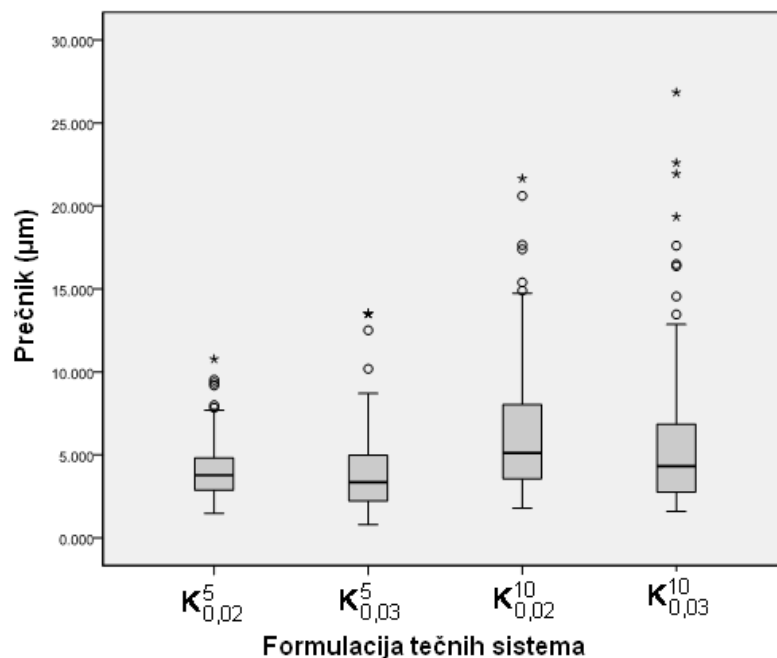
Pored viskoziteta, merena je i provodljivost rastvora alginata i emulzija kako bi se ispitao njen uticaj na formiranje čestica pod dejstvom elektrostatičkog polja. Naime, iz literature je poznato da je sa povećanjem provodljivosti polimernih rastvora (na primer dodatkom malih količina organskih soli) moguće drastično smanjiti veličinu čestica formiranih pod dejstvom elektrostatičkog polja (Xie et al., 2006). Rezultati merenja provodljivosti su prikazani u Tabeli 4.3. Natrijum-alginat je polielektrolit sa izraženom provodljivošću te su vrednosti dobijene za čist Na-alginat (uzorci $A_{0,02}^0$ i $A_{0,03}^0$) u saglasnosti sa literaturnim navodima (Jian-Wei et al., 2006). Rezultati merenja provodljivosti alginatnih rastvora su pokazali da sa povećanjem koncentracije alginata raste i provodljivost rastvora. S druge strane, sa povećanjem koncentracije aroma u emulzijama opada provodljivost. Predpostavka je da dodata aroma utiče tj. remeti sile koje se javljaju između molekula alginata te se na taj način menjaju provodna svojstva samih emulzija.

Stabilnost svih pripremljenih emulzija je praćena u period od 1 sata, što predstavlja vreme koje je dovoljno za inkapsulaciju jedne šarže pripremljene emulzije kao i za formiranje čvrstih Ca-alginatnih česica. Rezultati praćenja stabilnosti emulzija su prikazani u Tabeli 4.3. Treba istaći da na osnovu literaturnih podataka stabilnost emulzija predstavlja važnu karakteristiku sa stanovišta efikasnosti inkapsulacije kao i kvaliteta dobijenog proizvoda (Chan, 2011a). Generalno se može reći da stabilnije emulzije obezbeđuju veću inkapsulacionu efikasnost tj. bolje zadržavanje hidrofobne faze unutar hidrofilnog gela. Rezultati praćenja stabilnosti emulzija ukazuju na to da i emulzije sa 10% arome ostaju stabilne, tj. ne dolazi do razdvajanja faza, s tim što su emulzije sa aromom kokosa pokazale nešto veću stabilnost u odnosu na one sa dispergovanim D-limonenom.

Tabela 4.3. Provodljivost i stabilnost emulzija tečnih sistema.

Uzorak	Provodljivost (mS/cm)	Stabilnost emulzije (%)
$A_{0,02}^0$	3,94	- ^a
$A_{0,03}^0$	5,72	- ^a
$K_{0,02}^5$	3,52	~100
$K_{0,03}^5$	5,01	~100
$K_{0,02}^{10}$	3,07	~100
$K_{0,03}^{10}$	4,34	~100
$L_{0,02}^5$	3,67	98,7
$L_{0,03}^5$	5,44	98,0
$L_{0,02}^{10}$	3,36	97,4
$L_{0,03}^{10}$	4,95	97,5

Uticaj koncentracija Na-alginata, arome kokosa i D-limonena na veličinu kapljica dispergovane arome je prikazan na Slici 4.20. i u PRILOGU 8. Srednji prečnici dispergovanih kapi arome kokosa u Na-alginatu su se kretali u rasponu od 3,973 μm za formulaciju $K_{0,03}^5$ do 6,327 μm za formulaciju $K_{0,02}^{10}$.



Slika 4.20. Boxplot dijagram prečnika dispergovanih kapi arome kokosa u Na-alginatu.

S obzirom da podaci nisu imali normalnu raspodelu, urađena je logaritamska transformacija, a zatim je razlika između formulacija ispitana jednofaktorijalnom analizom varijanse (ANOVA). Rezultati analize pokazali su da postoji statistički značajna razlika između veličina čestica različitih formulacija ($F(3,506)=19.139$, $p<0,001$). Daljom analizom pomoću Tukey testa utvrđeno je da se srednje vrednosti mogu svrstati u dva disjunktna homogena podskupa (Tabela 4.4.)

Tabela 4.4. Homogeni podskupovi srednjih prečnika kapi dispergovane arome kokosa u Na-alginatu (dobijeni Tukey testom).

Formulacija	N	Podskup za $\alpha = 0.05$	
		1	2
$K_{0,03}^5$	132	3.973	
$K_{0,02}^5$	115	4.103	
$K_{0,03}^{10}$	125		5.738
$K_{0,02}^{10}$	135		6.327

Prethodna analiza jasno pokazuje da između formulacija sa različitom koncentracijom arome postoje statistički značajne razlike srednjih vrednosti za prečnik dispergovanih kapi u Na-alginatu.

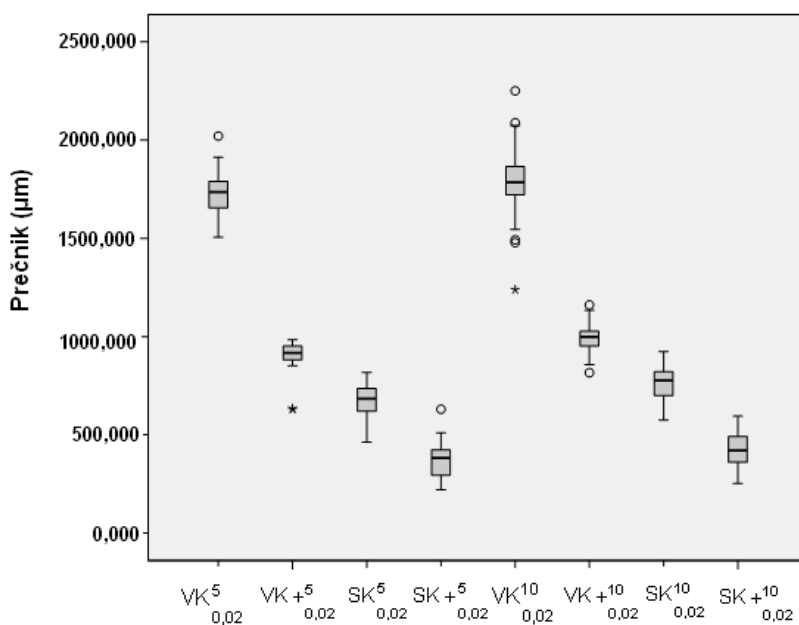
Srednja vrednost veličine kapljica dispergovanog D-limonena je bila u rasponu od $4.917\mu\text{m}$ za $L_{0,02}^5$ do $11.706\mu\text{m}$ za $L_{0,03}^{10}$. Dobijeni podaci su potom analizirani jednofaktorijalnom analizom varijanse (ANOVA), na osnovu koje je zaključeno da je razlika između veličina kapljica u četiri različite emulzije bila statistički značajna ($F(3,384)=16.680$, $p<0.001$). Srednje vrednosti su potom analizirane Tukey HSD testom kako bi se ustanovilo koje formulacije se izdvajaju po veličini kapi dispergovane arome. Post hoc poređenja primenom Tukey HSD testa pokazuju da se srednja vrednost za veličinu kapljica u rastvoru $L_{0,03}^{10}$ statistički značajno razlikuje u odnosu na ostale tri emulzije (PRILOG 9).

Rezultati pokazuju da veća koncentracija alginata prouzrokuje veću srednju vrednost veličine kapljica dispergovanih aroma. Dobijeni rezultati se razlikuju u odnosu na rezultate koji se mogu naći u literaturi. Chan (2011a) je pokazao da se manje kapljice dispergovanog ulja formiraju u rastvorima sa većom koncentracijom alginata. Može se pretpostaviti da sa povećanjem

viskoziteta Na-alginata raste i otpor efikasnom dispergovanju kapljica arome. Kako bi se dobile manje kapljice arome i samim tim postigla stabilnija emulzija potrebno je primeniti intenzivniji disperzioni postupak, poput homogenizacije pod visokim pritiskom (Kaushik i Roos, 2007).

Karakteristike čvrstih sistema

Prosečne veličine kako vlažnih tako i suvih čestica Ca-alginata sa inkapsulisanom aromom kokosa dobijene bez i sa primenom elektrostatickog potencijala su prikazane na Slici 4.21. Vrednosti prosečnih dimenzija čestica sa inkapsulisanim D-limonenom kao i praznih čestica Ca-alginata su date u PRILOGU 10 i PRILOGU 11.



Slika 4.21. Boxplot dijagram prečnika vlažnih i suvih čestica Ca-alginata sa inkapsulisanom aromom kokosa. „V“ i „S“ u oznakama formulacija označavaju vlažne i suve čestice, respektivno. „+“ označava čestice dobijene metodom elektrostaticke ekstruzije.

Dimenzije vlažnih čestica sa inkapsulisanom aromom kokosa su se kretale u opsegu od ~629µm do ~2250µm, dok je nakon sušenja ovaj opseg iznosio od ~220µm do ~924µm. Višefaktorskom analizom varijanse ispitan je uticaj svakog od značajnih faktora na prečnik čestica. Rezultati analize su prikazani u PRILOGU 12, pri čemu su podebljano označene

referentne vrednosti koje ukazuju na statistički značajan uticaj pojedinih faktora. Kao faktori su označeni: formulacija (sastav čestica), primena napona i proces sušenja. Višefaktorska analiza varijanse je pokazala da postoji značajan uticaj sva tri faktora na prečnik čestica.

Kod čestica sa inkapsulisanim D-limonenom kao i u slučaju praznih Ca-alginatnih čestica koje su dobijene bez primene elektrostatičkog polja prečnik vlažnih čestica je bio u opsegu od ~2100 do ~2350 μm . Primenom napon od 6.5 kV (ostali parametri su ostali isti) formirane su manje čestice i njihov prečnik je u opsegu od ~960 do ~1450 μm . Srednje razlike između sistema su testirane ANOV-om, na osnovu koje je utvrđeno da su vrednosti dobijene za različite sisteme međusobno statistički značajne ($F(11,839)=75.739$, $p<0.001$). Tukey post hoc test je pokazao značajnu razliku u prečniku čestica formiranih bez i pod dejstvom elektrostatičkog polja. Pored toga, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u prečniku čestica u odnosu na različit sadržaj D-limonena, kako kod vlažnih ($F(2,480)=3.912$, $p=0.021$) tako i kod suvih čestica ($F(2,356)=51.033$, $p<0.001$).

Uticaj koncentracije alginata na veličinu čestica se pokazao kao statistički značajan, pre svega kod sistema kod kojih je primenjen elektrostatički potencijal za dobijanje čestica Ca-alginata. Prema literaturnim podacima, do ovoga dolazi usled povećanja viskoziteta koncentrovanijih Na-alginatnih rastvora (Manojlović et al., 2006), dok očigledno provodljivost rastvora/emulzija nije u korelaciji sa veličinom čestica. Takođe, povećanje viskoziteta je dovelo do narušavanja uniformnosti veličine čestica. Ovo je u saglasnosti sa mehanizmima formiranja čestica pod dejstvom elektrostatičkog polja (Bugarski et al., 2006). Naime, formiranje kapi viskoznog rastvora sa vrha igle je praćeno odvajanjem jednog povezanog filameta, koji se potom cepa na veliki broj manjih kapljica nejednakih veličina.

Dobijanje čestica sa inkapsulisanim D-limonenom je generalno dalo očekivane rezultate. Tečni sistemi sa većim viskozitetom su dali izdužene čestice koje su u većoj ili manjoj meri odstupale od sfernog oblika. S druge strane, dobijanje čestica sa inkapsulisanom aromom kokosa je bilo otežano ili potpuno onemogućeno kog veće koncentracije alginata tj. u slučaju jako viskoznih rastvora polimera. Ovakvi rezultati se mogu objasniti činjenicom da je D-limonen praktično nerastvoran u vodi pa u emulzijama sa Na-alginatom verovatno formira zasebnu fazu. S druge strane, aroma kokosa je složena po sastavu (videti napred), pri čemu su neke komponente rastvorljive u vodi, što može uticati na svojstva alginata. Još u toku pripreme emulzija arome kokosa sa Na-alginatom koncentracije 0,03 g/ml primećeno da je viskozitet

dobijene emulzije jako visok u poređenju sa emulzijama na bazi alginatnog rastvora koncentracije 0,02g/ml. Uz to, u toku pripreme ovih emulzija je dolazilo do povećanja temperature emulzija (pri homogenizaciji) što verovatno indirektno ukazuje da postoje interakcije između komponenti arome i nosača. Ovakvo ponašanje tečnih sistema alginat/aroma kokosa je uslovalo da neke od formulacija (sa 10% arome i koncentracijom alginata 0,03g/ml) nije bilo moguće ekstrudirati, tj. dobiti čestice pravilnog oblika. Pod dejstvom elektrostatičkog polja dolazilo je do formiranja jako izduženih (vlaknastih) formi, koje nisu uzete u razmatranje u ovom radu. Ovde prikazani rezultati nameću potrebu razmatranja posebnih formulacija aroma sa sličnim aromatskim efektom koje ne bi uticale na svojstva nosača (u ovom slučaju na Na-alginat). Treba napomenuti da je u ovom radu korišćena komercijalno dostupna aroma kokosa, koja nije posebno formulisana za potrebe inkapsulacije u alginatnom gelu. Detekcija i odstranjivanje (zamenja) jedinjenja koja mogu reagovati sa nosačem a da se pritom u što većoj meri zadrže svojstva arome se nameće kao najprihvatljivije rešenje.

Faktor sferičnosti (SF) je korišćen kako bi se kvantitativno izrazila sferičnost čestica, pri čemu je vrednost $SF=0$ označena kao savršena sfera, dok porast ovog faktora ukazuje na narušavanje sfernog oblika. Faktori sferičnosti za vlažne i suve čestice formirane pod uticajem elektrostatičkog polja kao i za one formirane samo pod dejstvom gravitacije (bez primene elektrostatičkog polja) su prikazani u Tabeli 4.5 (za čestice sa inkapsulisanim aromom kokosa), odnosno u PRILOGU 13 (za prazne Ca-alginatne čestice i čestice sa inkapsulisanim D-limonenom).

Rezultati pokazuju da su izduženiji oblici vlažnih čestica formirani pri dejstvu elektrostatičkog polja i kada je kao nosač korišćen alginatni rastvor koncentracije 0.03 g/ml. Na osnovu ranijih istraživanja ustanovljeno je da se ekstruzijom viskoznih polimernih rastvora (tj. visoko koncentrovanih polimernih rastvora) dobijaju deformisane (nesferne) čestice, jajolikog ili oblika kapi (Prüsse et al., 2008). Formiranje čestica nepravilnog oblika je direktna posledica dejstva elektrostatičkog polja na mlaz tečnosti. Kada se primeni napon, sferni oblik tečnog meniskusa na vrhu igle se deformiše u konusni oblik. Kao rezultat, alginatni rastvor protiče kroz ovu suženu oblast povećanom brzinom, pri čemu dolazi do obrazovanja "vrata" tečnosti, čija je pojava izraženija u viskoznijim alginatnim rastvorima. Odvajanjem i dezintegracijom izduženog dela dobijaju se izdužene čestice (Poncelet et al., 1999).

Nakon sušenja, sferičnost čestica se menjala ka nepravilnim oblicima, što je ustanovljeno i na osnovu Faktora sfernosti čija se vrednost generalno povećavala u odnosu na vlažne čestice. Najveći gubitak sferičnosti nakon sušenja su pokazale čestice bez inkapsulisane arome (prazne Ca-alginatne čestice). Može se zaključiti da dodatak arome utiče na stabilizaciju oblika čestica nakon sušenja. Ova pojava je bila izraženija kod čestica sa inkapsulisanim D-limonenom.

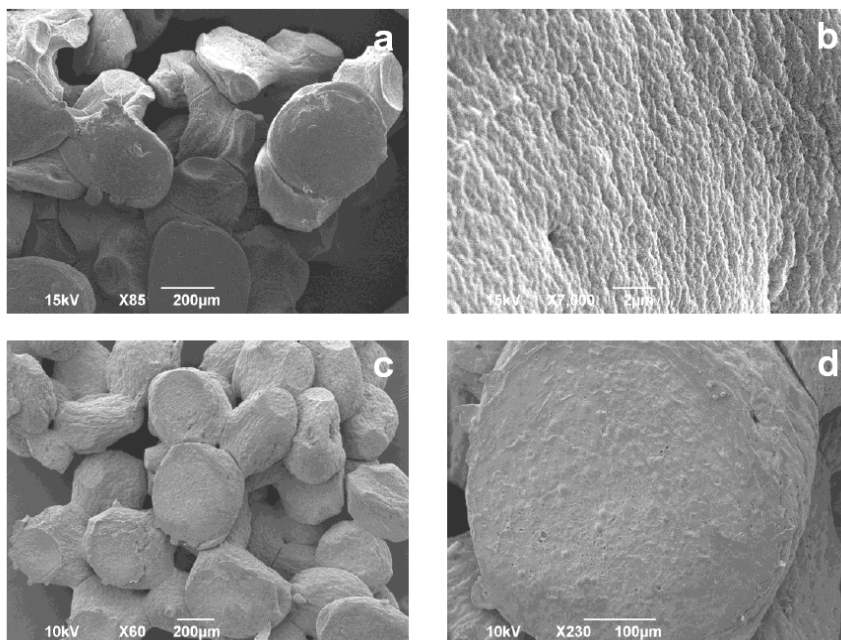
Skupljanje čestica nakon sušenja je praćeno i preko vrednosti Faktora skupljanja (k_{SF} (sušenje)). Može se zaključiti da je Faktor skupljanja u korelaciji sa količinom vode koja isparava u toku sušenja. Veća količina vode koja ispari uslovljava veće vrednosti Faktora skupljanja. S druge strane, veća koncentracija arome (posebno u slučaju D-limonena) uslovljava manje vrednosti Faktora skupljanja jer je dodatkom arome jedan deo vode izbačen iz formulacije još tokom formiranja emulzije.

Tabela 4.5. Morfološki parametri čestica Ca-alginata sa inkapsulisanom aromom kokosa.

Formulacija	Uzorak	Faktor sferičnosti (SF)		Faktor skupljanja (k_{SF} (sušenje))
		vlažne čestice	suve čestice	
1	$K_{0.02}^5$	0.001	0.06	0.68
2	$K_{0.03}^5$	-*	-	-
3	$K_{0.02}^{10}$	0.006	0.04	0.57
4	$K_{0.03}^{10}$	-	-	-
5	$K_{+0.02}^5$	0.01	0.014	0.58
6	$K_{+0.03}^5$	-	-	-
7	$K_{+0.02}^{10}$	0.001	0.015	0.57
8	$K_{+0.03}^{10}$	-	-	-

* Date formulacije nisu ekstrudirane.

Uticaj procesa sušenja na morfološke karakteristike Ca-alginatnih čestica (sa i bez inkapsulisanih aroma) je ispitivan SEM analizom (Slika 4.22 i PRILOG 14).

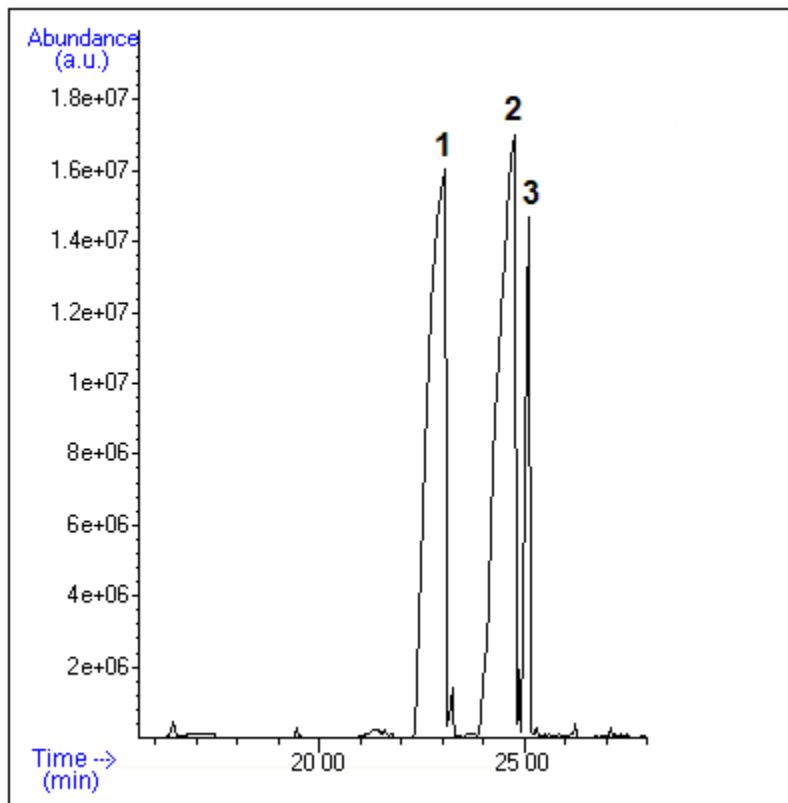


Slika 4.22. SEM slike: a) prazne (bez dodatka arome) Ca-alginatne čestice ($A_{0,02}^0$), nisko uvećanje; b) prazne (bez dodatka arome) Ca-alginatne čestice ($A_{0,02}^0$), visoko uvećanje; c) Ca-alginatne čestice (sa inkapsulisanim aromom kokosa, $K_{0,02}^{10}$), nisko uvećanje; d) Ca-alginatne čestice (sa inkapsulisanim aromom kokosa, $K_{0,02}^{10}$), visoko uvećanje.

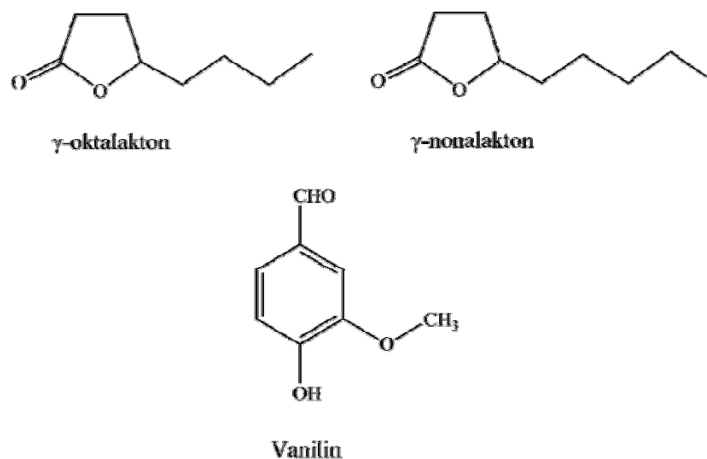
Uticaj dodatka arome na morfologiju čestica se ogleda pre svega kroz efekat stabilizacije oblika čestica nakon sušenja. Može se reći da i u slučaju dodatka arome kokosa i D-limonena, obe arome deluju kao punioci koji pomažu u očuvanju oblika čestica nakon sušenja. Pored toga, dodatak aroma utiče i na površinu samih čestica, koja postaje hrapavija u odnosu na prazne Ca-alginatne čestice.

Na Slici 4.23 je prikazan hromatogram najvažnijih komponenti koje su identifikovane kao komponente arome kokosa. Maseni spektri identifikovanih jedinjenja su dati u PRILOGU 15, 16 i 17. Analizom uzoraka metodom GC/MS detektovane su sledeće komponente arome kokosa (u slobodnoj i u inkapsulisanoj aromi nakon ekstrakcije): γ -oktalakton, γ -nonalakton i vanilin. Hemijske formule najvažnijih komponenti koje su identifikovane GC/MS analizom arome kokosa su date na Slici 4.24. Jedinjenje kao što je γ -oktalakton ima miris koji se može povezati sa aromom kokosa. Ovo jedinjenje je nađeno u mnogim prirodnim namirnicama kao što su kruška, plavi sir, maslac, itd. γ -oktalakton je rastvorljiv u etanolu, dok se u vodi slabije rastvara. γ -nonalakton se takođe odlikuje mirisom koji odgovara aromi kokosa. Ovo jedinjenje je nađeno

u velikom broju namirnica, a odlikuje ga dobra rastvorljivost u etanolu, dok se u vodi ne rastvara. Oba laktona nađena u analiziranoj aromi kokosa se inače široko koriste u prehrambenoj industriji za aromatizaciju velikog broja različitih namirnica (Burdock, 2009).



Slika 4.23. Hromatogram najvažnijih jedinjenja koja su identifikovana kao komponente slobodne (neinkapsulisane) arome kokosa: γ -oktalakton (1), γ -nonalakton (2) i vanilin (3).



Slika 4.24. Hemijske formule najvažnijih komponenti koje su identifikovane GC/MS analizom arome kokosa (Burdock, 2009).

Treća identifikovana komponenta je vanilin. Vanilin je nađen u velikom broju namirnica i etarskih ulja. Odlikuje ga miris koji odgovara aromi vanile. Dobro se rastvara u etanolu, dok je u vodi slabije rastvoran. Kao aroma, koristi se u velikom broju prehrambenih proizvoda (Burdock, 2009).

Analiza uzoraka nakon ekstrakcije inkapsulisane arome je pokazala da u toku samog procesa dobijanja čestica a i kasnije tokom faze sušenja dolazi do gubitaka komponenti arome kokosa. Ovo je posebno izraženo u slučaju vanilina i γ -oktalaktona. U zavisnosti od formulacija, gubitak je iznosio i do 50%. Gubitak ove dve komponente je verovatno posledica njihove nešto veće rastvorljivosti u vodi u odnosu na γ -nonalakton. Ovaj gubitak se najverovatnije javlja tokom geliranja alginata u rastvoru CaCl₂ tj. pri formiranju čestica. Ovakva svojstva arome kokosa nameću potrebu stvaranja formulacija aroma koje bi se sastojale iz komponenti koje su manje rastvorljive u vodi i koje bi se mogle efikasnije inkapsulisati unutar alginatnog matriksa ili struktura na bazi drugih polisaharida.

Prema rezultatima prikazanim u PRILOGU 13, efikasnost inkapsulacije D-limonena unutar Ca-alginatnih čestica je iznosila od 50 do ~ 77%. Date vrednosti su nešto niže u poređenju sa literaturnim navodima o inkapsulaciji lipofilnih komponenti u čestice Ca-alginata primenom ekstruzione tehnike (Peniche et al., 2004; Chang i Dobashi, 2003; Chan 2011a). Jedno od objašnjenja umanjene inkapsulacione efikasnosti je da je alginat korišćen u ovom radu siromašan u glukuronskoj kiselini (G) (M/G=1.56), te ima manju gustinu geliranja, što rezultira manjom

efikasnošću inkapsulacije u odnosu na alginat sa visokim sadržajem glukuronske kiseline. Pored toga, ne treba zanemariti i uticaj aktivne komponente, koja se inkapsuliše, na inkapsulacionu efikasnost. Fizička i hemijska svojstva aktivne komponente mogu značajno uticati na zadržavanje pojedinih jedinjenja unutar hidrofилnog matriksa. Ovde je posebno važno uzeti u obzir prisustvo komponenti koje su rastvorljive u vodi a koje mogu slobodno difundovati kroz alginatni matriks i na taj način umanjiti inkapsulacionu efikasnost. Primer za ovo je aroma kokosa koja u sebi ima komponente koje mogu migrirati kroz alginatni matriks i tako u stvari dovesti do gubitaka aktivnih komponenti u toku ekstruzije. S druge strane, D-limonen je pokazivao očekivane rezultate za inkapsulacionu efikasnost jer je ova aroma praktično nerastvorna u vodi te je njena migracija kroz matriks nosača limitirana u toku ekstruzije i formiranja gela. Efikasnost inkapsulacije D-limonena, za obe koncentracije alginata pokazala je isti trend, tj. povećavala se sa povećanjem koncentracije arome.

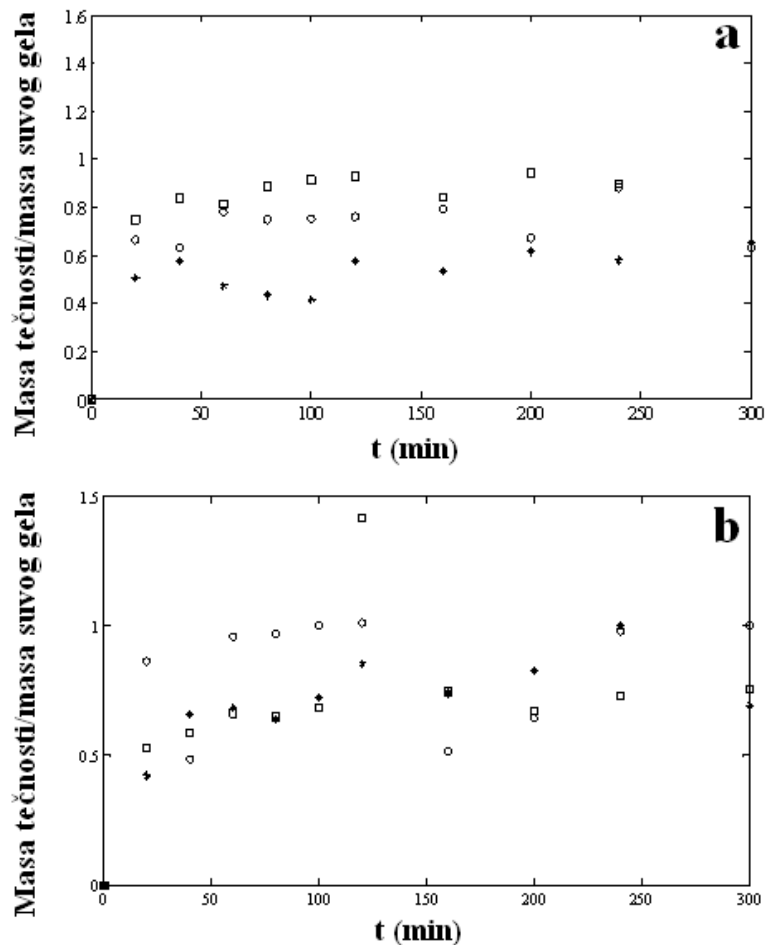
Dalja ispitivanja svojstava inkapsuliranih aroma su obuhvatala praćenje rehidracije dobijenih (suvih) čestica. Rehidracija suvih čestica je izvedena u (1) vodi i (2) fosfatnom puferu (PBS). Rezultati testova pokazuju da bubrenje čestica zavisi od sadržaja arome, veličine čestica i koncentracije alginata. Generalno, bubrenje tj. rehidracija je složen proces koji se sastoji iz podprocesa poput: (1) transporta vode i Na^+ jona i (2) dezintegracije gela delimičnom Na^+ - Ca^{2+} razmenom jona u slučaju hidratacije PBS-om. Naime, kada Ca-alginatne čestice dođu u kontakt sa vodenim rastvorom veće pH, dolazi do razmene jona, i to između Ca^{2+} jona koji formiraju gel i Na^+ jona u rastvoru. Kako su Ca^{2+} joni razmenjeni, elektrostatičko odbijanje/repuls između jonizovanih karboksilnih anjona alginske kiseline ubrzava bubrenje i eroziju alginatnog gela (Kikuchi et al., 1997). Takođe, nakon jonizacije, koncentracija suprotno naelektrisanih jona unutar polimerne mreže se povećava, kao i razlika između osmotskog pritiska unutar i izvan čestica (Kumaresh et al., 2001). Povećani osmotski pritisak je uravnotežen bubrenjem čestica. U ovom slučaju, brzina difuzije je znatno veća od brzine dezintegracije/raspadanja alginatnog gela.

Bubrenje u vodi suvih čestica uglavnom se vezuje za hidrataciju hidrofilnih grupa alginata. Na osnovu eksperimentalnih rezultata ovog rada, vreme reverzibilnog bubrenja (rehidracije) (t_w) u vodi je iznosilo ~20 min, s tim što je kod nekih sistema sa inkapsulisanom aromom kokosa dolazilo do veće disperzije tačaka. Vreme reverzibilnog bubrenja predstavlja vreme potrebno da dođe do elastične deformacije gela izazvane upijanjem vode. Nakon ovog vremena, bubrenje Ca-alginata u vodi se generalno uravnotežuje, što je prikazano na Slici 4.25 (za čestice Ca-alginata

sa inkapsulisanom aromom kokosa). Rezultati budrenja (rehidracije) u vodi praznih Ca-alginatnih čestica i čestica sa inkapsulisanim D-limonenom su dati u PRILOGU 18.

U slučaju čestica sa inkapsulisanim D-limonenom, prikazani rezultati sugerišu da je reverzibilno bubrenje izraženije za manje nego za veće čestice, što se može objasniti većom aktivnom površinom kod manjih čestica. Reverzibilno bubrenje je intenzivnije kod čestica dobijenih ekstruzijom alginatnog rastvora veće koncentracije (0.03 g/ml) u poređenju sa česticama na bazi rastvora alginata niže koncentracije (0.02 g/ml). Ovakav rezultat je u skladu sa činjenicom da veće koncentracije hidrofilnih alginatnih lanaca po čestici indukuju veću adsorpciju vode.

Dodatak (inkapsulacija) aroma u strukturu Ca-alginatnih čestica prouzrokuje smanjenje reverzibilnog bubrenja. Može se zaključiti da se inkapsulisane arome ponašaju kao fizička prepreka za transport vode kroz gel. Dodatak 5% w/w aroma u Ca-alginatne čestice (konc. alginata 0.02 g/ml) nije imao značajniji uticaj na proces bubrenja. Međutim, dodatak 10% w/w aroma kod manjih čestica (dobijenih metodom elektrostatičke ekstruzije) je doveo do disperzije eksperimentalnih podataka. Rezultati ukazuju na destabilizaciju alginatnog gela (konc. alginata 0.02 g/ml) tokom hidratacije. Ova pojava nije uočena kod većih čestica (čestica dobijenih bez primene elektrostatičke ekstruzije).



Slika 4.25. Kinetika bubrenja u vodi (□) prazne čestice Ca-alginata ($A_{0.02}^0$); (○) čestice Ca-alginata sa 5% arome kokosa ($K_{0.02}^5$); (*) čestice Ca-alginata sa 10% arome kokosa ($K_{0.02}^{10}$). a-čestice dobijene bez dejstva elektrostatičkog polja; b-čestice dobijene pod dejstvom elektrostatičkog polja.

Bubrenje (rehidracija) Ca-alginatnog gela u fosfatnom puferu se može podeliti na dva procesa: (1) reverzibilno bubrenje koje nastaje kao posledica difuzije rastvora u strukturu gela i (2) ireverzibilno bubrenje uzrokovano parcijalnim raspadanjem gela izazvanim izmenom Na^+ - Ca^{2+} jona.

Stabilnost Ca-alginata može se objasniti raspadom određenih zona čvorova mreže (eng. junction zones) u strukturi gela (Pajić-Lijaković et al., 2007). Parcijalna Na^+ - Ca^{2+} razmena jona i odgovarajući raspad zona čvorova mreže odigrava se u vremenskom intervalu $t \in (0, t_\infty)$ (gde je $t_\infty \approx 240$ min vreme do kog čestice zadržavaju strukturalni integritet). Ovo vreme trajanja

ireverzibilnog bubrenja čestica u fosfatnom puferu ukazuje na prolongirano (odloženo) oslobađanje aroma.

Gustina dezintegriranih zona čvorova mreže u Ca-alginatnom gelu je izražena kao: $y(t) \sim M(t)$, gde je $y(t)$ gustina dezintegriranih zona čvorova mreže i $M(t)$ odnos mase rastvora prema masi suvog gela koji je u vezi sa ireverzibilnim bubrenjem.

Bubrenje (rehidracija) Ca-alginatnih čestica sa i bez inkapsulisanih aroma u fosfatnom puferu je praćena korišćenjem jednačine prvog reda (Jednačina 4.1). Slična jednačina je primenjena za praćenje kinetike rehidracije različitih tipova gelova (Pasparakis i Bouropoulos, 2006; Ganji et al., 2010).

Početna jednačina za praćenje rehidracije:

$$\frac{dM(t)}{dt} = k(M_{\infty} - M(t)) \quad (4.1)$$

gde je k kinetička konstanta degradacije gela a M_{∞} masa rastvora koja je u ravnoteži sa masom suvog gela koji indukuje bubrenje, odnosno $M_{\infty} = M(t_{\infty})$. Početni uslovi su: u vremenu $t = 0$ odgovarajuća masa je $M(t = 0) = 0$

Nakon rešavanja Jednačine 1 dobija se:

$$M(t) = M_{\infty} [1 - e^{-k t}] \quad (4.2)$$

Međutim, Jednačina 4.1 bi trebalo da bude dodatno modifikovana za opisivanje ireverzibilnog bubrenja Ca-alginatnog gela koji sadrži inkapsulisane arome. Modifikacija bi trebalo da uključi efekte inkapsulisane arome na degradaciju gela. Shodno tome, parcijalni izvodi su uvedeni u Jednačinu 4.1 u cilju opisivanja datih efekata:

$${}_0^c D_t^{\beta} M(t) = k(M_{\infty} - M(t)) \quad (4.3)$$

gde je ${}_0^c D_t^{\beta}$ Kaputo-ov frakcioni diferencijal a parameter modela β predstavlja koeficijent prigušenja u opsegu $0 \leq \beta < 1$. Vrednosti niže od koeficijenta prigušenja ukazuju na veći efekat prigušenja (Podlubny, 1999). Kaputo-ov frakcioni diferencijal funkcije $M(t)$ je dat na sledeći

način (Podlubny, 1999): za $0 \leq \beta < 1$ diferencijali su ${}^C_0 D_t^\beta (M(t)) = \frac{1}{\Gamma(\beta-1)} \int_0^{t^*} \frac{M(t')^{(l)}}{(t-t')^\beta} dt'$, gde je $\Gamma(\beta-1)$ gama funkcija. Kada koeficijent prigušenja teži jedinici $\beta \rightarrow 1$, frakcioni diferencijali postaju ${}^C_0 D_t^\beta \rightarrow \frac{d}{dt}$. U takvim uslovima, efekat prigušenja bi se mogao zanemariti i Jednačina 4.1 i Jednačina 4.3 postaju iste. Nakon rešavanja Jednačine 4.3 dobija se:

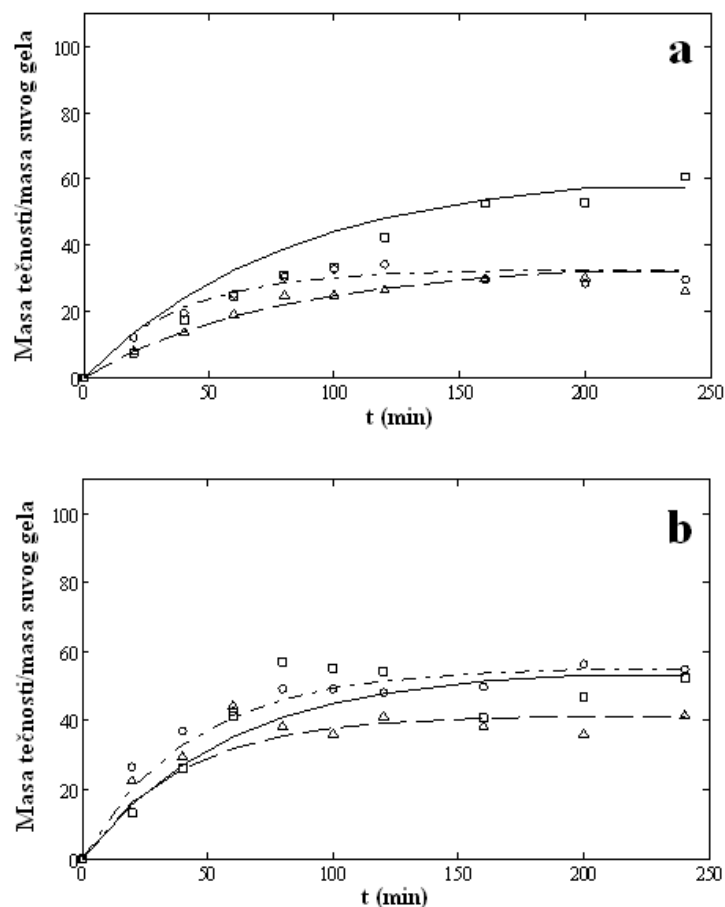
$$M(t) = M_\infty [1 - E_{\beta,1}(-kt^\beta)] \quad (4.4)$$

gde je $E_{\beta,1}(-kt^\beta)$ Mittag-Leffler-ova funkcija (Podlubny, 1999) jednaka sa:

$$E_{\beta,1}(-kt^\beta) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(-kt^\beta)^k}{\Gamma(1+\beta k)}$$

Dalje, parametri modela tj. kinetička konstanta k i koeficijent prigušenja β su određeni iz eksperimentalnih podataka i korišćenjem Jednačine 4.2 za čestice bez arome i Jednačine 4.4 za čestice sa inkapsulisanim aromom.

Matematički model i eksperimentalni podaci za rehidraciju Ca-alginatnog gela (u fosfatnom puferu) sa inkapsulisanim aromom kokosa su prikazani na Slici 4.26. Rezultati dobijeni rehidracijom praznih Ca-alginatnih čestica i čestica sa inkapsulisanim D-limonenom su prikazani u PRILOGU 19.



Slika 4.26. Kinetika bubrenja u fosfatnom puferu: a) Ireverzibilno bubrenje 0.02 g/mL Ca-alginatnih čestica sa modelom (dato kao linije) (\square) prazne čestice Ca-alginata ($A_{0.02}^0$)(puna linija); (\circ) čestice sa 5% arome kokosa ($K_{0.02}^5$)(crta-tačka linija); (Δ)čestice sa 10% arome kokosa ($K_{0.02}^{10}$) (isprekidana linija); b) Ireverzibilno bubrenje 0.02 g/mL Ca-alginatnih čestica sa modelom (dato kao linije) (\square) prazne čestice Ca-alginata ($A_{0.02}^0$)(puna linija); (\circ) čestice sa 5% arome kokosa ($K_{0.02}^5$)(crta-tačka linija); (Δ)čestice sa 10% arome kokosa ($K_{0.02}^{10}$) (isprekidana linija). a-čestice dobijene bez dejstva elektrostatičkog polja; b-čestice dobijene pod dejstvom elektrostatičkog polja.

Kao i u slučaju bubrenja u vodi, na Slici 4.26 se može videti da je bubrenje u fosfatnom puferu izražajnije za Ca-alginatne čestice manjih dimenzija u poređenju sa česticama većih dimenzija, posebno u slučaju čestica sa D-limonenom. Razlog za ovu pojavu je najverovatnije

činjenica da čestice manjih dimenzija imaju veću dodirnu površinu u odnosu na veće čestice. Ireverzibilno bubrenje Ca-alginatnih čestica (primarna koncentracija alginata 0.02 g/ml) je bilo približno isto kao i kod čestica baziranih na koncentraciji alginata od 0.03 g/ml. Rezultati ukazuju da je ireverzibilno bubrenje manje izraženo sa porastom koncentracije arome. Pretpostavka je da kapljice aroma imaju ulogu barijere za prenos rastvora što dalje onemogućuje Na⁺ jonima da popune određene delove gela i da indukuju degradaciju alginatnog gela. Po svemu sudeći, prisustvo inkapsulisane arome utiče na kinetiku rehidracije i samu degradaciju Ca-alginata u fosfatnom puferu. Ovakav složeni fenomen je opisan na osnovu ovde razvijenog matematičkog modela.

Vrednosti $M(t)$, dobijene na osnovu prethodno objašnjenog matematičkog modela su u zadovoljavajućoj korelaciji sa eksperimentalnim podacima, sa relativnom greškom od 10% za veće čestice, odnosno 15% u slučaju manjih čestica. Optimalni parametri modela koji omogućavaju najbolje poređenje između eksperimentalnih i izračunatih podataka su prikazani u Tabeli 4.6 za inkapsulisanu aromu kokosa, odnosno u PRILOGU 20 za prazne Ca-alginatne čestice i čestice sa inkapsulisanim D-limonenom.

Tabela 4.6. Parametri modela za ireverzibilno bubrenje čestica Ca-alginata sa inkapsulisanom aromom kokosa.

Sistem	$k \text{ (min}^{-\beta}\text{)}$	$\beta \text{ (-)}$
$L +_{0.02}^5$	$(2.5 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	0.98 ± 0.02
$L +_{0.02}^{10}$	$(2.5 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	0.98 ± 0.02
$L_{0.02}^5$	$(2.1 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	0.95 ± 0.02
$L_{0.02}^{10}$	$(2.1 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	0.95 ± 0.02

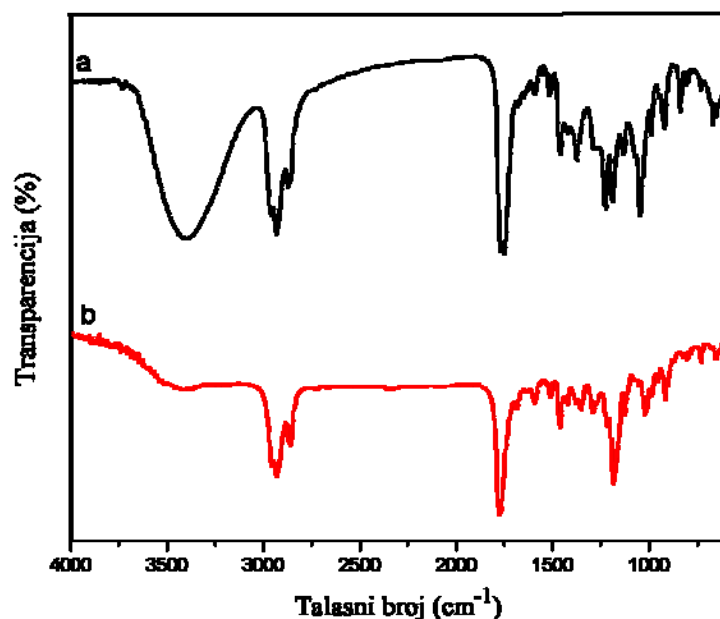
+, čestice dobijene dejstvom elektrostatickog polja

U slučaju čestica sa inkapsulisanim D-limonenom kinetička konstanta raspadanja gela k zavisi od njegove dodirne površine. Dobijena viša k vrednost za manje čestice se može objasniti upravo njihovom većom dodirnom površinom. Sa druge strane, koeficijent β zavisi od: (1) veličine čestica, (2) količine inkapsulisane arome unutar čestica i (3) koncentracije alginata. Efekat prigušenja je izraženiji kod većih čestica zbog njihove manje dodirne površine. Sa druge strane, veća količina arome povećava efekat prigušenja koji se manifestuje nižim vrednostima za koeficijent β . Ovi rezultati ukazuju da, u slučaju veće količine inkapsulisane arome, veći delovi porozne strukture gela ne podležu procesu degradacije uzrokovane difuzijom Na⁺ jona. Efekat prigušenja je bio nešto veći za 0.03 g/ml Ca-alginata u poređenju sa 0.02g/ml Ca-alginatnim

česticama. Dodatak arome kokosa slično kao u prethodnom slučaju sa D-limonenom inhibira razgradnju gela u fosfatnom puferu.

FTIR spektri čestica slobodne (neinkapsulisane) arome kokosa i čestica Ca-alginata sa inkapsulisanim aromom kokosa su prikazani na Slici 4.27. Spektri praznih Ca-alginatnih čestica, slobodnog D-limonena i Ca-alginatnih čestica sa inkapsulisanim D-limonenom su dati u PRILOGU 21. FTIR spektar arome kokosa ukazuje na složeni sastav ove komponente. S jedne strane, spektar inkapsulisane arome kokosa ukazuje na njeno prisustvo u česticama Ca-alginata. S druge strane, FTIR spektar inkapsulisane arome kokosa pokazuje nekoliko odstupanja u odnosu na slobodnu aromu. Pre svega, traka na 3398 cm^{-1} koja odgovara -OH grupama slobodne arome kokosa se ne može uočiti u spektru inkapsulisane arome. Dalje, trake u spektrima slobodne arome kokosa na 1228 cm^{-1} , 1186 cm^{-1} i 1049 cm^{-1} su preklopljene ili pak pomerene ka višim talasnim brojevima u spektru inkapsulisane arome. Ovde treba uzeti u obzir uticaj nosača, čije trake mogu preklopiti neke od traka arome ili pak obratno. Takođe, u toku inkapsulacije dolazi do gubitaka nekih komponenti arome što može uticati na promenu u FTIR spektrima inkapsulisane arome.

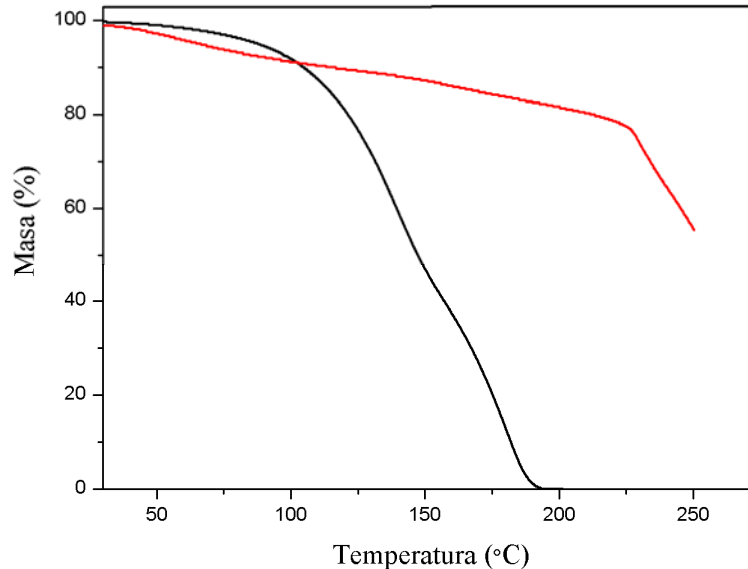
FTIR spektar Ca-alginatnih čestica sa inkapsulisanim D-limonenom (PRILOG 21) jasno pokazuje prisustvo alginata i arome. Traka na 3435 cm^{-1} potiče od -OH grupa alginata, dok se asimetrična traka na 1635 cm^{-1} i na 1431 cm^{-1} (C-O veza) javlja zbog prisustva -COOH grupe Ca-alginata. U slučaju čestica koje sadrže inkapsulisanu aromu, ove dve trake su preklopljene trakama koje potiču od molekula D-limonena. Traka na 1431 cm^{-1} je preklopljena trakom na 1436 cm^{-1} koja potiče od vibracija CH_2 grupa D-limonena, dok je ona na 1635 cm^{-1} preklopljena trakom na 1644 cm^{-1} (C=C od D-limonena) (Ribeiro et al., 2004; Zapata et al., 2009; Singh et al., 2009). Prema Singh et al. (2009), trake koje se javljaju u opsegu $1200\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$ FTIR spektra su tipične za prirodne polisaharide. Traka na oko 887 cm^{-1} (od $=\text{CH}_2$ D-limonena) takođe može biti primećena na istoj poziciji i u slučaju inkapsulisane arome. U slučaju čestica sa inkapsulisanim D-limonenom, traka koja potiče od C-H veza D-limonena je na oko 2920 cm^{-1} , što je približno poziciji odgovarajućeg maksimuma u FTIR spektru slobodnog D-limonena (Zapata et al., 2009).



Slika 4.27. FTIR spektri: a) slobodna (neinkapsulisana) aroma kokosa; b) Ca-alginatne čestice sa inkapsulisanom aromom kokosa.

Ovi rezultati jasno ukazuju da D-limonen i Ca-alginat verovatno prave samo fizičku mešavinu, pošto nisu uočene promene u FTIR spektru koje bi ukazale na hemijsku interakciju dve komponente.

Rezultati termogravimetrijske analize slobodne (neinkapsulisane) i inkapsulisane arome kokosa su dati na Slici 4.28. Rezultati TGA analize slobodne arome kokosa pokazuju ujednačen pad mase u temperaturnom opsegu od $\sim 100^{\circ}\text{C}$ do $\sim 180^{\circ}\text{C}$. S druge strane, inkapsulisana aroma kokosa pokazuje pad mase od $\sim 20\%$ u temperaturnom opsegu od $30\text{-}230^{\circ}\text{C}$. Drugi pad mase se javlja u temperaturnom opsegu $230\text{-}250^{\circ}\text{C}$. Do temperature od 250°C ukupan pad mase iznosi 45% . Proces inkapsulacije ima očigledan uticaj na termička svojstva arome. S jedne strane, smeštanje arome unutar Ca-alginatnog matriksa je svakako dovelo do pomeranja gubitka mase inkapsulisane arome ka višim temperaturama u poređenju sa slobodnom aromom. Takođe, na dinamiku gubitka mase utiče i termička degradacija samog nosača. Kao što je već prikazano u Poglavlju 4.2., u datom temperaturnom opsegu se javlja i gubitak vode koja je vezana za nosač ali i njegova degradacija ka određenim produktima. Prema prikazanim rezultatima, može se zaključiti da se ova dva procesa odvijaju istovremeno u čitavom temperaturnom opsegu.



Slika 4.28. TGA krive: slobodna (neinkapsulisana) aroma kokosa (crna puna linija); aroma kokosa inkapsulisana u Ca-alginatu ($K_{0,02}^{10}$) (puna crvena linija).

Termička stabilnost inkapsulisanog D-limonena je proučavana pomoću kombinovane termogravimetrijske/maseno spektrometrijske (TG/MS) analize. Rezultati analize prikazani su u PRILOGU 22. Kombinovana termogravimetrijska/maseno spektrometrijska analiza oslobođenih gasovitih komponenti je korišćena u cilju identifikacije karakterističnih zona oslobađanja inkapsulisanog D-limonena. Pored toga, praćeno je i oslobađanje vode iz strukture Ca-alginata. Korišćene su tri karakteristične m/z vrednosti za praćenje promena tokom termogravimetrijske analize: $(m/z)=17$ i $(m/z)=18$ za detekciju oslobođene vode i $(m/z) = 68$ za detekciju D-limonena. Ove m/z vrednosti su izabrane iz baze masenih spektara kao specifične za ciljane komponente. U slučaju čestica sa inkapsulisanom aromom, oslobađanje vode je zabeleženo u temperaturnom opsegu od 40°C do 180°C, sa maksimumom na oko 75°C i opadajućim signalom do 180°C. Ovo je u saglasnosti sa literaturnim podacima prema kojima u datom temperaturnom opsegu dolazi do gubitka vode iz strukture polisaharida (Laurienzo et al., 2005). Prema literaturnim podacima, najveći deo slobodnog D-limonena isparava do 200°C (Lević et al., 2011). Prema ovde predstavljenim rezultatima, najveći deo inkapsulisanog D-limonena se otpušta iz Ca-alginata u temperaturnom opsegu od 60°C do 200°C. Taj podatak je potvrđen posmatranjem karakteristične

m/z vrednosti ($m/z=68$) za D-limonen tokom analize. Gubitak mase u primenjenom temperaturnom opsegu je ~35%. Ovi rezultati ukazuju da je veliki deo inkapsulisanog D-limonena ostao unutar Ca-alginatnog matriksa tokom primenjenog temperaturnog režima. To je poželjan efekat inkapsulacije, naročito zbog toga što je primenjeni temperaturni opseg termalne analize u skladu sa temperaturnim režimima koji odgovaraju uslovima termičkih postupaka u proizvodnji hrane (De Roos, 2003, De Roos, 2006).

4.3. Inkapsulacija etil vanilina u polivinil alkoholu

Polivinil alkohol (PVA) je korišćen kao nosač za inkapsulaciju aroma metodom elektrostatičke ekstruzije. Kao aktivna komponenta (aroma) korišćen je etil vanilin. Osnovni cilj je bio ispitivanje mogućnosti dobijanja inkapsulata različitih veličina i karakteristika. U prvom delu, PVA je mešan sa Na-alginatom kako bi se omogućilo dobijanje sfernih čestica sa inkapsulisanim aromom. Primarno je vršeno geliranje alginata pomoću Ca^{2+} jona a zatim je naknadno primenjen metod smrzavanja-otapanja za geliranje PVA. U drugom delu je postupkom elektrostatičke ekstruzije-elektrospininga vršena inkapsulacija etil vanilina u PVA pri višim vrednostima napona. Cilj je bio dobijanje inkapsulata manjih dimenzija. U cilju dobijanja stabilnih inkapsulata, vršeno je dodatno geliranje PVA metodom smrzavanja-otapanja.

Sistemi bazirani na nosaču alginat/PVA su pod dejstvom elektrostatičkog polja omogućili formiranje sfernih čestica sa inkapsulisanim aromom. Ispitivana su termička svojstva koja su pokazala da se inkapsulacijom postiže kontrolisano otpuštanje arome na višim temperaturama u odnosu na slobodnu (neinkapsulisanu) aromu. Primenom elektrostatičke ekstruzije-elektrospininga dobijeni su filmovi koji se sastoje od nanovlakana. Dobijeni filmovi su pokazali zadovoljavajuću mehaničku i termičku stabilnost. Naknadno geliranje je omogućilo dobijanje znatno stabilnijih filmova, koji su dalje korišćeni za ispitivanje antimikrobne aktivnosti etil vanilina. Pokazalo se da PVA u kombinaciji sa etil vanilinom poseduje određena antimikrobna svojstva.

4.3.1. Inkapsulacija etil vanilina u polivinil alkoholu metodom elektrostatičke ekstruzije

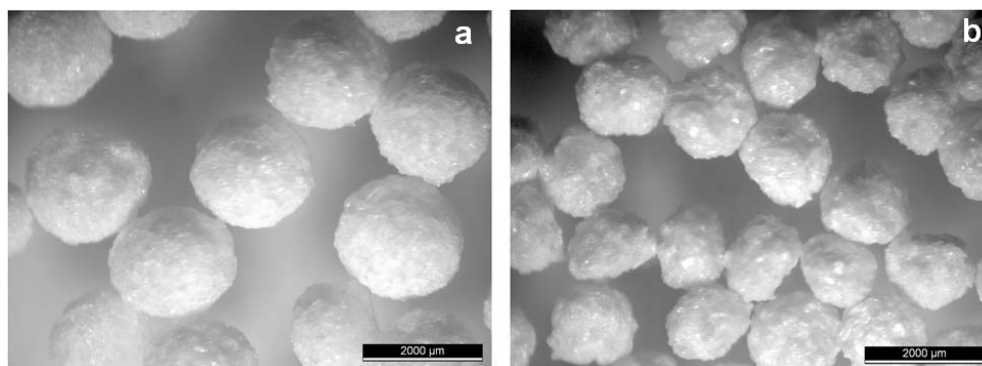
Inkapsulacija etil vanilina metodom elektrostatičke ekstruzije je vršena uz primenu mešavine alginat/PVA kao nosaša. Kao sredstvo za geliranje alginata je korišćen rastvor kalcijum hlorida, pri čemu se formira nerastvorni Ca-alginat koji daje primarni oblik čestica. Naknadno su tako dobijene čestice podvrgnute geliranju PVA metodom smrzavanja-otapanja. Završna faza pripreme čestica je bila njihovo sušenje na sobnoj temperaturi do konstantne mase.

Nakon formiranja čestica i geliranja alginata i PVA srednji prečnik vlažnih čestica sa 20% arome je iznosio $2,69 \pm 0,13$ mm. Tokom sušenja, došlo je do delimičnog smanjenja prečnika čestica usled gubitka vode. Prečnik suvih čestica je iznosio $2,02 \pm 0,16$ mm. Slike suvih čestica sa 20% inkapsulisane arome su date na Slici 4.29a. Kao što se može videti, čestice su nakon sušenja zadržale sferni oblik. Međutim, kod čestica sa 10% inkapsulisane arome (Slika 4.29b) uočeno je

značajnije narušavanje oblika nakon sušenja u odnosu na čestice sa 20% inkapsulisane arome. Razlog za ovo je verovatno to što dodatak etil vanilina stabilizuje oblik čestica preko povećanja suve materije u samim česticama. U slučaju čestica sa manje inkapsulisane arome povećan je sadržaj vode (kroz veći udeo rastvora nosača u formulaciji) u odnosu na čestice sa većim sadržajem etil vanilina. Ova voda isparava u toku sušenja, čime čestice gube deo zapremine. Usled gubitka vode dolazi i do narušavanja morfologije čestica.

Dodatak PVA nije značajnije uticao na promene oblika čestica sa inkapsulisanim aromom u poređenju sa česticama na bazi čistog Ca-alginata (Poglavlje 4.2.1). Takođe, proces geliranja PVA (metodom smrzavanja-otapanja) se pokazao pogodnim za tretman čestica Ca-alginata/PVA. Nije primećena pojava pucanja čestica ili neki drugi oblik narušavanja morfologije čestica nakon geliranja PVA.

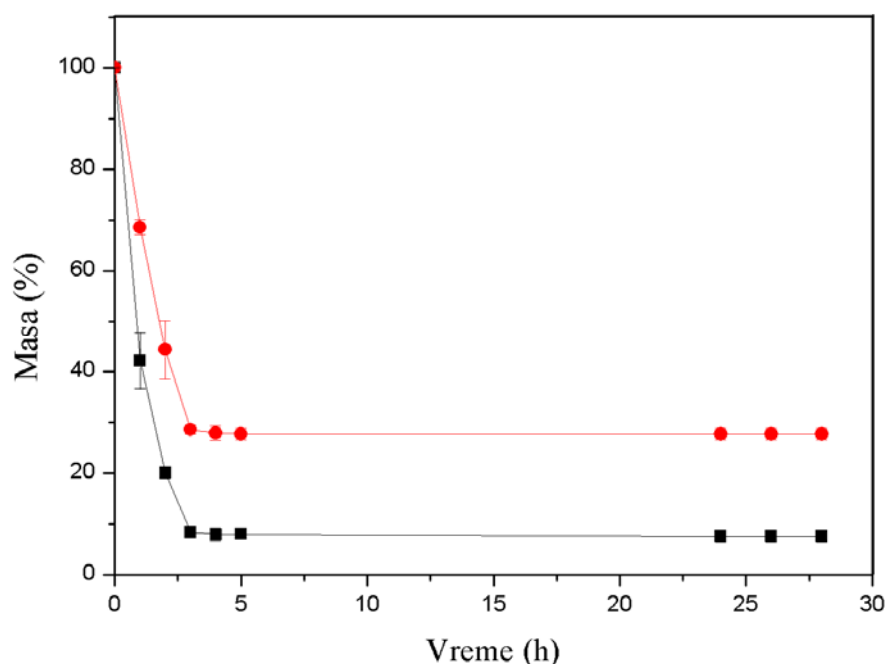
Prednost uvođenja PVA i procesa geliranja metodom smrzavanja-otapanja se ogleda u tome što su u testovima rehidracije u vodi i fosfatnom puferu čestice na bazi alginat/PVA zadržale svoj oblik. Nije primećeno ozbiljnije narušavanje strukture čestica za razliku od čestica na bazi čistog alginata pri rehidraciji u fosfatnom puferu. Može se zaključiti da dodatak PVA i njegovo geliranje dodatno stabilizuje strukturu čestica sa inkapsulisanim aromom. Kako joni deluju na Ca-alginat i rastvaraju ga, PVA stabilizuje strukturu inkapsulata. Ovo može biti od koristi za one procese gde prisustvo jona može ugroziti stabilnost inkapsulata. Dodatkom PVA i njegovim geliranjem se mogu izbeći negativni uticaji sredine na strukturu čestica i proširiti primena inkapsulata i na one sisteme u kojima može doći do rastvaranja alginatnog matriksa.



Slika 4.29. Slike čestica Ca-alginat/PVA sa inkapsulisanim etil vanilinom: a) čestice sa 20% etil vanilina; b) čestice sa 10% etil vanilina.

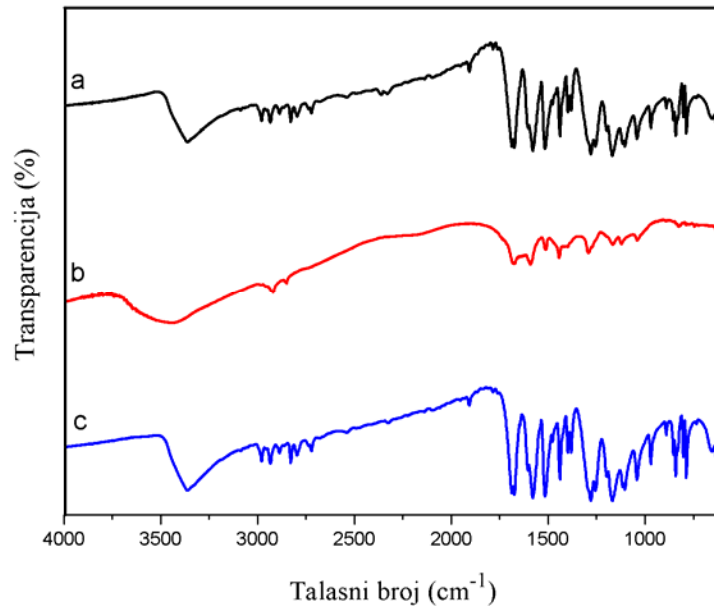
Kinetika sušenja je praćena za prazne ćestice na bazi Ca-alginat/PVA i ćestice sa 20% inkapsulisanog etil vanilina. Rezultati praćenja kinetike sušenja ćestica na sobnoj temperaturi su prikazani na Slici 4.30. Prema prikazanim rezultatima, gubitak mase ćestica u toku sušenja se ustalio nakon ~3 sata. Eksperimentalni podaci su upoređeni sa teorijskim vrednostima dobijenim primenom modela koji je objašnjen u Poglavlju 4.2.1. Model pruža mogućnost predviđanja vremena potrebnog za dostizanje ujednaćenja mase tokom sušenja kod ćestica na bazi alginata (Lyn i Ying, 2010).

Pokazalo se da se izračunate vrednosti vremena ujednaćenja mase dobijene modelom (~180min) dobro poklapaju sa vremenom koje je dobijeno eksperimentalnim putem. Prema prikazanim rezultatima, dodatak PVA i proces geliranja metodom smrzavanja-otapanja nisu znaćajno uticali na kinetiku sušenja inkapsulata.



Slika 4.30. Kinetika sušenja ćestica: prazne ćestice Ca-alginata/PVA (■); ćestice Ca-alginata/PVA sa 20% inkapsulisanog etil vanilina (●).

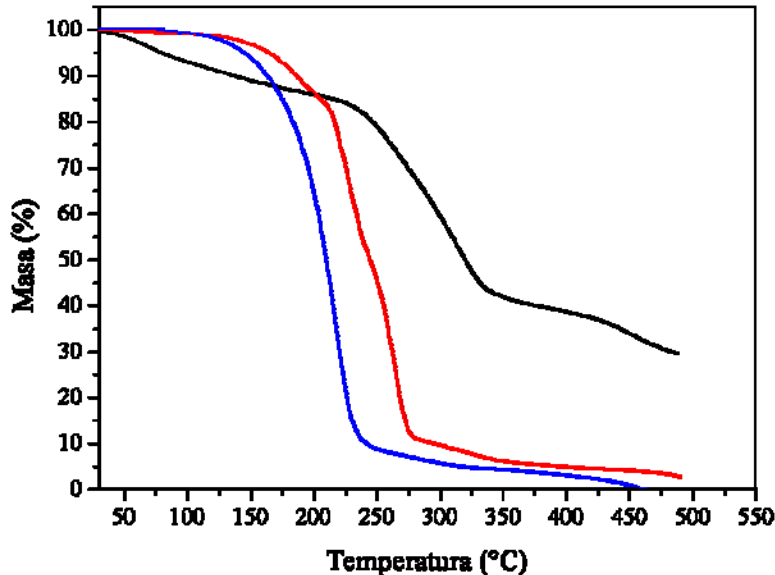
Analiza FTIR spektara je vršena nakon sušenja ćestica. Za poređenje su uzeti FTIR spektri slobodnog (neinkapsulisanog) etil vanilina, praznih ćestica na bazi Ca-alginat/PVA i ćestica sa 20% inkapsulisane arome. Rezultati FTIR analize su prikazani na Slici 4.31.



Slika 4.31. FTIR spektri: a) Čistog (neinkapsulisanog etil vanilina); b) praznih čestica na bazi Ca-alginat/PVA (bez arome); c) Inkapsulisanog etil vanilina u Ca-alginat/PVA.

FTIR spektar slobodnog etil vanilina pokazuje karakteristične trake koje su prethodno opisane u Poglavlju 4.2.1. Spektar nosača (Slika 4.31) jasno ukazuje na prisustvo alginata i PVA. FTIR spektar Ca-alginata je detaljno opisan u poglavlju 4.2.1. Dodatak PVA a posebno njegovo geliranje metodom smrzavanja-otapanja nije značajno uticao na FTIR spektar nosača. Analizom FTIR spektara nosača je primećen izostanak traka koje potiču od estarske veze kod čestica na bazi Ca-alginata/PVA dobijenih metodom smrzavanja-otapanja. U literaturi se takođe mogu naći podaci za isto odstupanje u FTIR spektru za hidrogelove i filmove dobijene istom metodom geliranja (Doria-Serrano et al., 2001). FTIR spektar inkapsulisane arome pokazuje isključivo trake koje potiču od etil vanilina dok su trake nosača preklapljene. Može se zaključiti da FTIR spektar ne daje indikacije značajnijih hemijskih interakcija između inkapsulisane arome i nosača.

Termička svojstva slobodnog (neinkapsulisanog) etil vanilina, praznih čestica Ca-alginat/PVA i inkapsulisane arome su ispitivana metodom termogravimetrije i rezultati su prikazani na Slici 4.32.



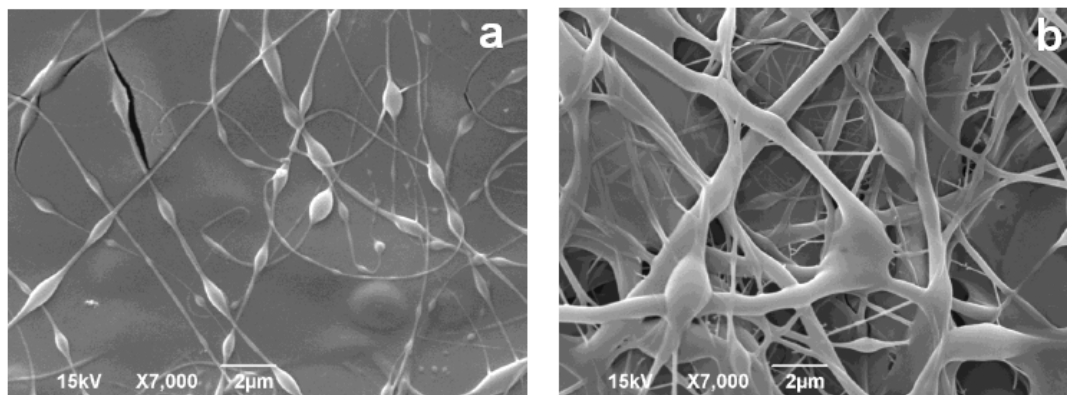
Slika 4.32. TGA krive: neinkapsulisanog (slobodnog) etil vanilina (plava puna linija); Ca-alginat/PVA čestice (suve, prazne) (crna puna linija); Ca-alginat/PVA čestice sa 20% inkapsulisanog etil vanilina (crvena puna linija).

Kao što je već pokazano u Poglavlju 4.2.1, termička degradacija polisaharida se odvija u fazama koje su praćene oslobađanjem specifičnih produkata razgradnje (Parikh i Madamwar, 2006). Kod rezultata termogravimetrijske analize nosača na bazi Ca-alginat/PVA mogu se uočiti dva pada mase sa povećanjem temperature. Prvi pad mase u opsegu 30-250°C se može povezati sa gubitkom vode koja je vezana za strukturu polimera (Laurienzo et al., 2005). Drugi pad mase se uočava u opsegu 250-350°C i može se povezati sa termičkom degradacijom nosača. Pozitivan efekat inkapsulacije vidljiv je kada se uporede termogravimetrijske krive slobodnog i inkapsulisanog etil vanilina. Naime, na temperaturi od 250°C, ostatak slobodnog etil vanilina je manji od 10% dok je u slučaju inkapsulisane arome taj ostatak iznosi ~50%. Na ovaj način je pokazano da više arome ostane sačuvano u obliku inkapsulata nego u slobodnoj formi u definisanom temperaturnom opsegu. Pored toga, ukoliko se uporede termogravimetrijske krive inkapsulata na bazi Ca-alginat/PVA i onih na bazi čistog Ca-alginata (Poglavlje 4.2.1) uočava se da je kod prve formulacije ostatak na 250°C viši. Može se zaključiti da dodatak PVA poboljšava termičku stabilnost čitavog sistema. Prema literaturnim podacima, ovo potiče od specifične kristalne strukture PVA koja nastaje pod uticajem vodoničnih veza formiranih između

hidroksilnih grupa polimera (Hassan i Peppas, 2000). Dodatnim geliranjem metodom smrzavanja-otapanja se postiže poboljšanje kristalne strukture polimera (Ricciardi et al., 2004), što za posledicu verovatno ima i poboljšanje termičkih svojstava inkapsulata.

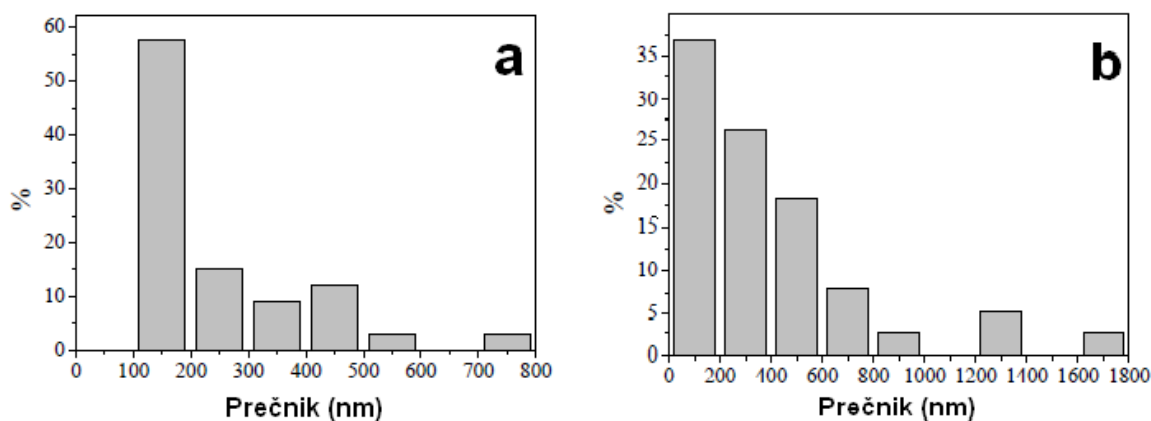
4.3.2. Inkapsulacija etil vanilina u polivinil alkoholu metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrospining

Inkapsulacija etil vanilina je realizovana primenom metode elektrostatičke ekstruzije-elektrospininga uz korišćenje polivinil alkohola (PVA) kao nosača. Ekstruzija je vršena na površinu čvrstog nosača (aluminijumska folija). Dobijeni inkapsulati su bili u obliku filmova, koji su se relativno jednostavno odvajali od površine kolektora. Filmovi bez inkapsulisane arome su bili bezbojni i providni. S druge strane, filmovi sa inkapsulisanom aromom su bili bele boje i neprozirni. Merenjem debljine je utvrđeno da je debljina filmova sa inkapsulisanom aromom iznosila $\sim 60 \mu\text{m}$, dok je debljina praznih PVA filmova bila $\sim 30 \mu\text{m}$. Dodatak arome je uticao na debljinu filmova i njihovu boju. Etil vanilin je bele boje i otuda potiče i boja filmova sa inkapsulisanom aromom. S druge strane, veća debljina filmova sa inkapsulisanom aromom se može objasniti činjenicom da tokom i nakon procesa ekstruzije dolazi do otparavanja rastvarača (voda i etanol) pri čemu zaostaje etil vanilin i PVA. Upravo dodatak arome povećava masu materijala koji ostaje nakon ekstruzije i samim tim dolazi do povećanja debljine filmova. Dalja ispitivanja morfologije PVA filmova je vršena analizom SEM fotografija praznih i uzoraka sa inkapsulisanim etil vanilinom (Slika 4.33). Rezultati merenja prečnika vlakana su prikazani na Slici 4.34.



4.33. SEM slike: a) praznih PVA filmova; b) PVA filmova sa inkapsulisanim etil vanilinom.

Slike dobijene SEM analizom ukazuju da se PVA filmovi dobijeni elektrostatičkom ekstruzijom-elektrospiningom sastoje od isprepletanih vlakana nanometarskih i mikronskih prečnika. Prečnici vlakna kod praznih PVA filmova se kreću u opsegu od 100 do 800 nm (srednja vrednost $223,9 \pm 153,85 \mu\text{m}$). Sa prikazanih SEM slika se može videti da su vlakna kod ovih filmova nepravilnog oblika i da se u strukturi samih vlakana periodično javljaju i izdužene čestice. Ovi rezultati se slažu sa literaturnim podacima za slučaj kada se ekstruzija (elektrospining) vrši iz rastvora PVA u etanolu. Naime, etanol nije rastvarač koji rastvara PVA ali utiče na svojstva rastvora polimera a pre svega na smanjenje površinskog napona tečnosti i viskoziteta. Otuda se, kao posledica promena u sastavu rastvora PVA (dodatkom etanola), mogu javiti vlakna koja u svojoj strukturi sadrže čestice (Zhang et al., 2005). Međutim, dodatak etanola je s druge strane neophodan jer je potrebno rastvoriti etil vanilin (slabo rastvoran u vodi) pre ekstruzije. Pored toga, primetno je da je došlo do spajanja vlakana, verovatno kao posledica zaostalih rastvarača (pre svega vode) koji nisu isparili u toku procesa ekstruzije (elektrospininga). Kao posledica ovoga, nedovoljno suva vlakna se u toku procesa dobijanja preklapaju i spajaju na površini kolektora. Nakon ekstruzije je vršeno dodatno sušenje filmova u cilju uklanjanja zaostalih rastvarača.



Slika 4.34. Distribucija dimenzija (prečnika) vlakana: a) praznih PVA filmova; b) PVA filmova sa inkapsulisanim etil vanilinom.

Filmovi sa inkapsulisanim etil vanilinom su prikazani na Slici 4.33b. Kao što se može videti, dodatak etil vanilina je uticao na samu strukturu vlakana ali i na njihove dimenzije. Pre svega,

primetno je značajno povećanje prečnika vlakana usled dodatka arome (100-1700nm) (srednja vrednost $387,6 \pm 350,6 \mu\text{m}$). Pored toga, vlakna su znatno izraženija u odnosu na filmove bez arome, što ukazuje da je dodatak etil vanilina pozitivno uticao na morfologiju vlakana. Preklapanje vlakana je znatno manje izraženo, verovatno kao posledica prisustva većeg procenta suve materije (dodata aroma) u rastvoru pre ekstruzije u odnosu na prazne PVA filmove.

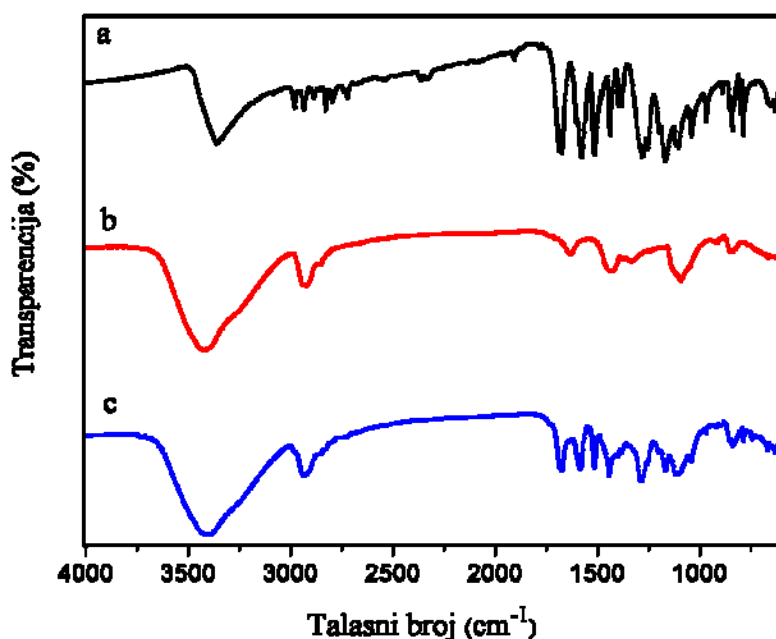
Naknadnim poređenjem t-testom je utvrđeno da je razlika u srednjim vrednostima prečnika vlakana između uzoraka bez i sa inkapsulisanom aromom statistički značajna $t(67.396)=2.504$, $p=0.015$.

Mehaničke karakteristike dobijenih filmova su ispitivane kako bi se utvrdio efekat sastava početnih rastvora na mehanička svojstva dobijenih filmova. Rezultati ispitivanja su pokazali da dodatak etil vanilina utiče značajno na mehanička svojstva filmova. Napon istezanja je kod praznih PVA filmova iznosio 8.4 ± 2.8 MPa, dok je sa dodatkom etil vanilina došlo do njegovog povećanja na 23.3 ± 4.3 MPa. Kao što je već rečeno, inkapsulisani etil vanilin deluje kao punilac i na taj način stabilizuje oblik PVA filmova tokom procesa pripreme a verovatno utiče i na mehanička svojstva samih filmova. Može se reći da mehanička svojstva filmova dobijena ovde predstavljenim postupkom zavise od brojnih faktora. Mollá et al. (2011) su pokazali da se mehanička jačina filmova na bazi Nafion/PVA (dobijenih istim postupkom kao i u ovom radu) povećava sa povećanjem debljine dobijenog filma. I u slučaju filmova PVA/etil vanilin se javljaju razlike u debljini filmova sa i bez arome, pri čemu su filmovi sa aromom veće debljine. Debljina filmova je samo jedan od faktora koji utiču na mehanička svojstva dobijenih filmova. Od ostalih faktora koji mogu uticati na mehanička svojstva filmova treba pomenuti: koncentraciju PVA i dodatak etanola (menja koncentraciju PVA).

Eventualne interakcije između komponenti filmova su ispitivane FTIR spektroskopijom. Pored toga, ova metoda je korišćena i za utvrđivanje prisustva pojedinih komponenti u strukturi filmova. FTIR spektri slobodnog (neinkapsulisanog) etil vanilina, praznog PVA filma i filma sa inkapsulisanom aromom su prikazani na Slici 4.35. Karakteristične trake koje se javljaju u spektru etil vanilina se mogu jasno uočiti, a njihovo objašnjenje je dato u Poglavlju 4.1. Trake koje se javljaju kod praznih PVA filmova su: 3423 cm^{-1} i 1640 cm^{-1} od prisutnih OH grupa; u oblasti od 3000 do 2840 cm^{-1} su trake koje potiču od CH_2 i C-H; na približno 1430 cm^{-1} je traka koja potiče od CH_2 ; C-O interakcija se povezuje sa trakom na 1091 cm^{-1} ; trake na $\sim 850 \text{ cm}^{-1}$ potiču od C-C veza (Li i Hsieh, 2006; Mansur et al., 2008; Arias et al., 2011). FTIR spektar

PVA/etil vanilin filmova u oblasti od 1750 cm^{-1} do 600 cm^{-1} jasno ukazuje na prisustvo inkapsulisane arome u strukturi filma. S druge strane, u oblasti od 4000 do 2750 cm^{-1} se mogu jasno uočiti trake koje potiču od OH, CH_2 i C–H u strukturi PVA.

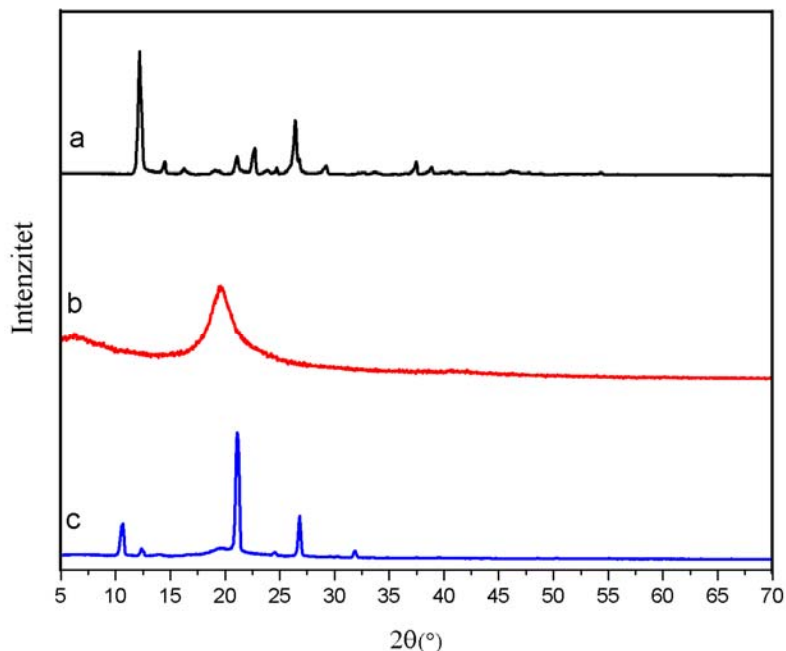
Rezultati FTIR analize PVA filmova sa inkapsulisanim etil vanilinom nisu pokazali da postoji interakcija između komponenti uzoraka. S druge strane, prisustvo PVA i arome je identifikovano preko pojave karakterističnih traka u FTIR spektru inkapsulata koje potiču od ove dve komponente.



Slika 4.35. FTIR spektri: a) slobodni (neinkapsulisani) etil vanilin; b) PVA film (prazan); c) PVA film sa inkapsulisanim etil vanilinom.

Rezultati XRD analiza slobodnog (neinkapsulisanog) etil vanilina, praznih PVA filmova i filmova sa inkapsulisanom aromom su prikazani na Slici 4.36. Difraktogram slobodne arome pokazuje karakteristične pikove na difrakcionim uglovima 2θ : 12.2° , 14.5° , 21.1° , 22.7° , 26.4° , 29.2° , 37.45° i 38.85° . Kao što je već rečeno u Poglavlju 4.1, slobodni etil vanilin pokazuje karakteristične pikove u difraktogramu koji jasno ističu njegovu kristalnu strukturu. Difraktogram praznog PVA filma pokazuje široki difrakcioni pik na $2\theta=19.6^\circ$, što potvrđuje delimičnu kristalnu strukturu ovog polimera (Kayaci i Uyar, 2012). U difraktogramu

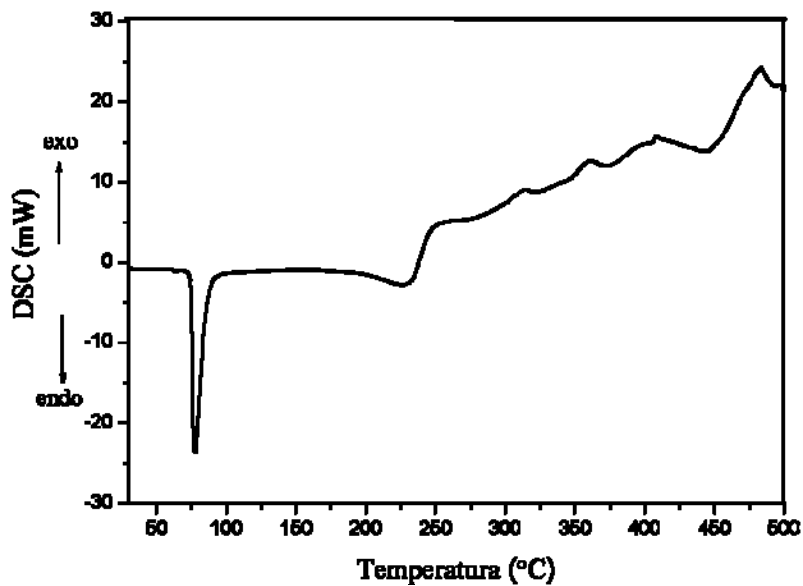
inkapsulisane arome se izdvajaju sledeći pikovi (za odgovarajući 2θ): 10.65° , 12.35° , 21.1° , 24.55° , 26.8° i 31.9° . Kada se uporede difraktogrami slobodne i inkapsulisane arome, jasno se uočavaju razlike koje verovatno nastaju kao posledica inkapsulacije unutar strukture PVA vlakana. Dva glavna faktora koja utiču na promene u strukturi inkapsulisane arome su uvođenje PVA kao nosača i uslovi koji vladaju pri ekstruziji (elektrospiningu). Naime, uslovi pri kojima se vrši kristalizacija arome u toku i nakon ekstruzije su promenjeni dodatkom PVA, koji takođe formira svoju kristalnu strukturu u toku ovog procesa ali ujedno utiče i na kristalnu strukturu etil vanilina. Drugi važan činilac koji utiče na kristalnu strukturu inkapsulisane arome je isparavanje rastvarača u toku procesa ekstruzije, koje je kompleksno s obzirom na prisustvo dva rastvarača (voda i etanol) koji uz to isparavaju različitom dinamikom. Ovde je još važno napomenuti da je sama aroma slabo rastvorna u vodi, pa se usled razlike u dinamici isparavanja rastvarača menjaju i uslovi formiranja kristala arome. Kako etanol isparava pre vode, u zaostalom rastvaraču koji se primarno sastoji od vode verovatno dolazi do formiranja agregata arome, čime se dodatno mogu objasniti razlike u kristalnoj strukturi inkapsulisanog etil vanilina u odnosu na slobodnu aromu. Bez obzira na promene u kristalnoj strukturi, može se konstatovati da inkapsulisani etil vanilin zadržava svojstva karakteristična za kristalne supstance. S druge strane, Kayaci i Uyar (2012) su pokazali da inkapsulisani vanilin u nosaču na bazi PVA nanovlakana ne pokazuje kristalnu strukturu u odnosu na slobodnu aromu. Slični rezultati se mogu naći u literaturi kada je u pitanju inkapsulacija još nekih supstanci u strukturu PVA nanovlakana (Li et al., 2013).



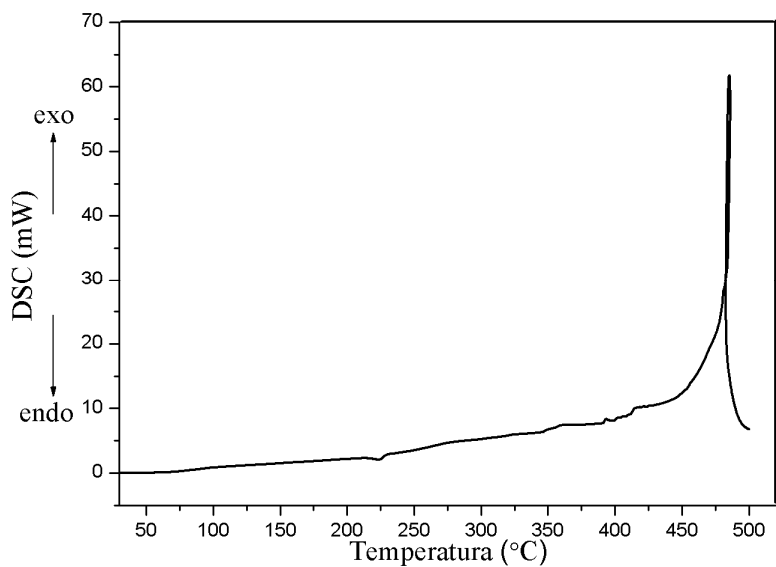
Slika 4.36. Difraktogrami: slobodni (neinkapsulisani) etil vanilin (a), PVA film (prazan) (b), PVA film sa inkapsulisanim etil vanilinom (c).

Termičke analize supstanci korišćenih u radu kao i finalnih produkata inkapsulacije su vršene u cilju ispitivanja uticaja procesa inkapsulacije na termička svojstva inkapsulisanog etil vanilina. DSC krive slobodnog etil vanilina, praznog PVA filma i PVA filma sa inkapsulisanom aromom su prikazane na Slici 4.37, Slici 4.38 i Slici 4.39, dok su karakteristični podaci dobijeni DSC analizom prikazani u Tabeli 4.7. Slobodni etil vanilin pokazuje oštar endotermni maksimum na 77.5°C (Slika 4.37), koji ukazuje na tačku topljenja arome (T_m) (Burdock, 2009). U slučaju inkapsulisanog etil vanilina (Slika 4.39), tačka topljenja je pomerenka ka nižoj temperaturi (54.9°C). Vrednosti za entalpije topljenja (ΔH_m) takođe opadaju u slučaju inkapsulisane arome. Smanjenje tačke topljenja za nanosisteme se takođe može naći u literaturnim podacima (Han et al., 2010). Arinstein et al. (2011) su pokazali da se smanjenje tačke topljenja kod polimera javlja kao posledica brzog isparavanja rastvarača u toku ekstruzije (elektrospininga), što direktno utiče na organizaciju polimernih lanaca. Kao što je već rečeno, u slučaju dobijanja PVA filmova sa inkapsulisanim etil vanilinom se menjaju uslovi koji direktno utiču na formiranje kristala arome u toku i nakon procesa inkapsulacije. Formiranjem nove kristalne strukture dolazi i do promene u termičkim svojstvima arome a pre svega u promeni tačke topljenja. Takođe, prisustvo PVA verovatno utiče na termička svojstva etil vanilina bez

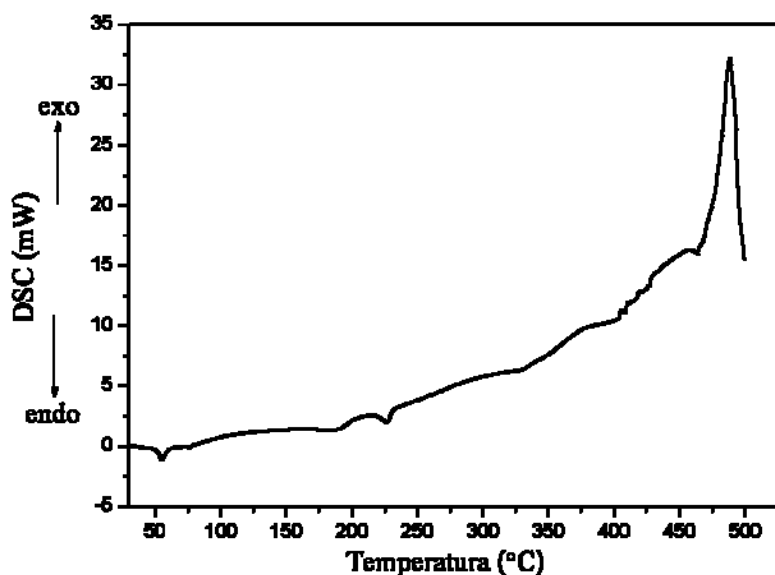
obzira na to što ove dve komponente, prema ovde iznetim rezultatima u strukturi filmova formiraju posebne faze. Kao što je već rečeno, FTIR analiza nije pokazala postojanje jake interakcije između arome i nosača.



Slika 4.37. DSC kriva slobodnog (neinkapsulisanog) etil vanilina.



Slika 4.38. DSC kriva praznog PVA filma.



Slika 4.39. DSC kriva PVA filma sa inkapsulisanim etil vanilinom.

DSC kriva praznog PVA filma (Slika 4.38) pokazuje maksimum na 227°C, koji odgovara tački topljenja polimera. Ovaj maksimum se u slučaju PVA filma sa inkapsulisanom aromom nalazi na ~226°C (Slika 4.39). Po svemu sudeći, dodatak etil vanilina nije uticao na tačku topljenja PVA filma. Takođe, prema ovde prikazanim podacima (videti ispod) najveći deo etil vanilina ispari pre nego što se dostigne tačka topljenja PVA. Time se može objasniti izostanak uticaja arome na termička svojstva PVA. Taepaiboon et al. (2006) su pokazali da različite komponente mogu uticati na termička svojstva PVA i to pre svega na kinetiku termičke degradacije polimera. Ovde treba naglasiti da se termička degradacija PVA javlja na temperaturama koje su znatno više od onih koje se generalno primenjuju u proizvodnji hrane. S druge strane, poznavanje termičke dekompozicije materijala može biti od koristi kod predviđanja ponašanja PVA kao potencijalnog ambalažnog materijala i nosača aktivnih komponenti u slučaju primene visokih temperatura. Iz tog razloga je praćena i termička degradacija PVA filmova sa inkapsulisanom aromom u temperaturnom opsegu od 30°C do 500°C. Prema ovde prikazanim rezultatima ali i literaturnim podacima, može se generalno zaključiti da u temperaturnom opsegu od 250°C do 500°C dolazi do termičke degradacije PVA i etil vanilina. Karakteristične promene u termičkim svojstvima u ovom temperaturnom opsegu su praćene preko vrednosti temperature (T_d) i entalpije (ΔH_d) termičke degradacije. Karathanos et al. (2007) su pokazali da se oksidacija vanilina na povišenim temperaturama odvija u više faza koje obuhvataju formiranje vanilinske

kiseline a na višim temperaturama (preko 300°C) dolazi do degradacije arome. Rezultati prikazani u ovom radu ukazuju da se na temperaturama iznad 250°C javljaju složene promene u DSC termogramima kako kod slobodnog tako i kod inkapsulisanog etil vanilina. Prikazani rezultati ukazuju na složeni termički proces koji verovatno uključuje i oksidaciju i termičku degradaciju arome. S druge strane, rezultati DSC analize praznog PVA filma u temperaturnom opsegu od 250°C do 500°C pokazuju egzotermni maksimum na 485.3°C. Prema Modafferi et al. (2012), promene usled dejstva visokih temperatura na PVA se mogu okarakterisati kao degradacija polimera. Termička degradacija PVA je složeni proces koji uključuje pre svega degradaciju osnovne polimerne strukture. U slučaju PVA filmova sa inkapsulisanom aromom nije primećeno značajnije odstupanje u poziciji egzotermnog maksimuma, koji se u ovom slučaju javlja na 488.8°C. Jedina promena koja je primećena se odnosi na vrednost entalpije procesa, koja se sa dodatkom arome smanjuje. Asran et al. (2010) su pokazali da dodatak drugih komponenti menja kristalnu strukturu PVA i na taj način utiče i na promenu entalpije kod dobijenih filmova.

Tabela 4.7. Podaci dobijeni DSC analizom slobodnog etil vanilina, praznog PVA filma i PVA filma sa inkapsulisanom aromom.

Uzorak	Temperaturni opseg: 30-250°C		Temperaturni opseg: 250-500°C	
	T _m (°C)	ΔH _m (kJ/g)	T _d (°C)	ΔH _d (kJ/g)
Slobodni etil vanilin	77,54	-10,00	483,51	0,22
Prazan PVA film	-	-	485,31	1,05
PVA film sa inkapsulisanom aromom	54,95 ^a	-0,0154	488,78	0,68
	226,63 ^b	-0,0224		

^a Označava prvi maksimum u DSC termogramu

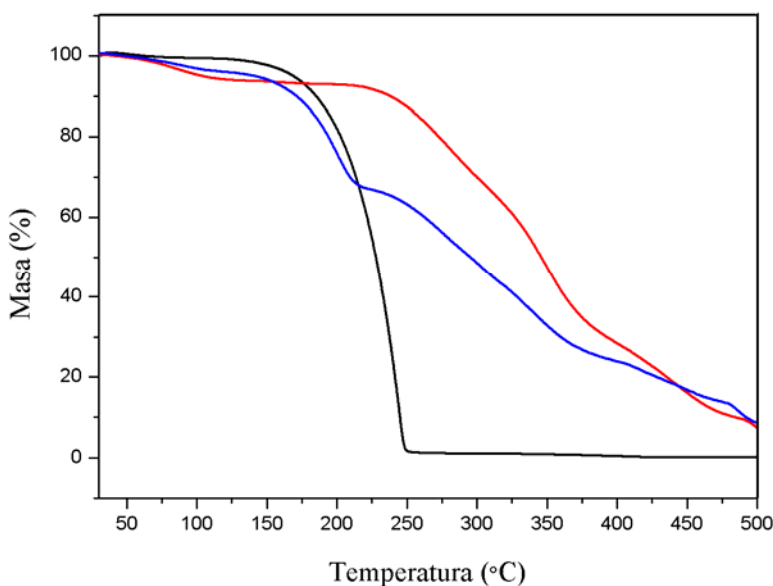
^b Označava drugi maksimum u DSC termogramu

m, Topljenje

d, Termička degradacija

Termička stabilnost dobijenih filmova i inkapsulisane arome je praćena metodom termogravimetrije i rezultati su prikazani na Slici 4.40. Prema dobijenim rezultatima, slobodni (neinkapsulisani) etil vanilin pokazuje gubitak mase u temperaturnom opsegu 150-250°C. Prazan PVA film pokazuje gubitak mase u dve temperaturne oblasti. Do 225°C gubitak mase iznosi ~10% i verovatno potiče od gubitka zaostale vode. Drugi pad mase se javlja u temperaturnom opsegu od 225°C do 500°C i vezuje se za termičku degradaciju PVA. Termogram dobijen

analizom inkapsulisanog etil vanilina pokazuje složenu dinamiku gubitka mase u poređenju sa slobodnom aromom i praznim PVA filmom. Gubitak mase kod PVA filma sa inkapsulisanom aromom se može podeliti na tri procesa: gubitak vode iz PVA, isparavanje arome i termička degradacija zaostale arome i PVA. Gubitak mase usled isparavanja arome i vode se odigrava u istoj temperaturnoj oblasti te je teško zaključiti pri kojim temperaturama dominira jedan odnosno drugi proces. Ono što svakako treba istaći je da se procesom ekstruzije (elektrospininga) utiče na termička svojstva etil vanilina. Do 250°C, uzorak sa inkapsulisanom aromom je izgubio ~37% početne mase. U isto vreme, gubitak mase kod slobodne arome iznosi 98%, dok je gubitak mase praznog PVA filma ~10%.



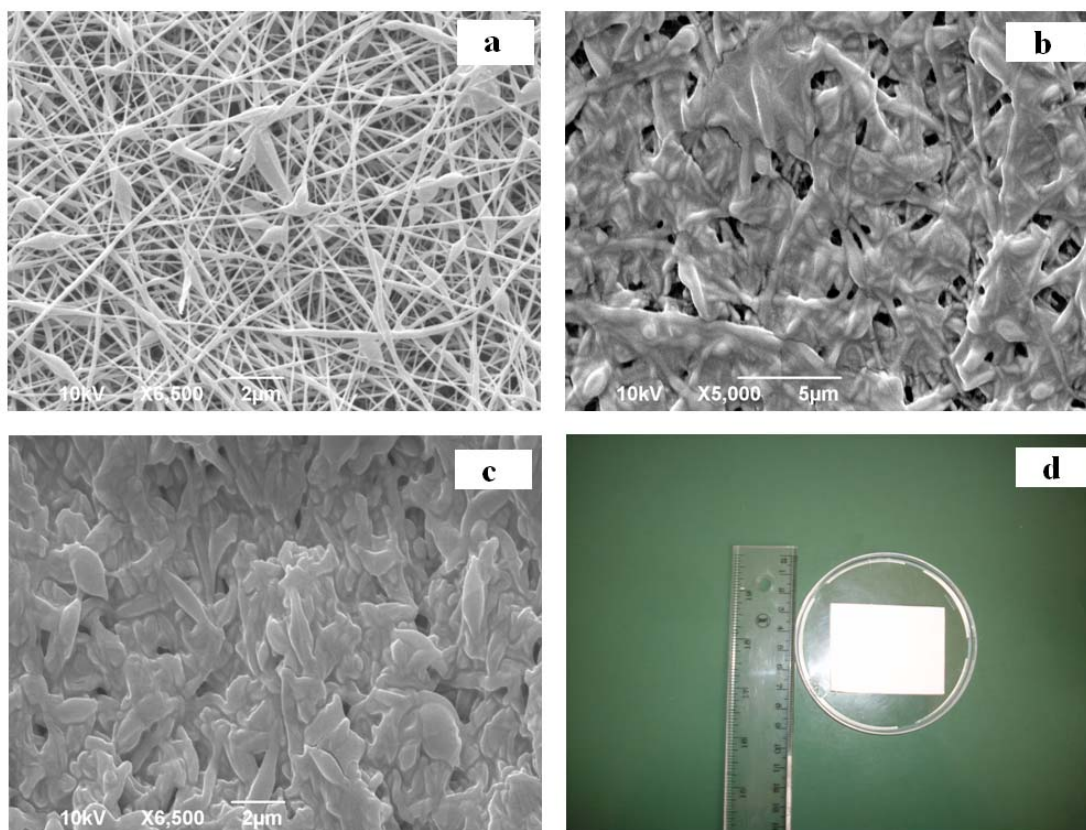
Slika 4.40. TGA krive: slobodni (neinkapsulisani) etil vanilin (crna puna linija); prazan PVA film (crvena puna linija); PVA film sa inkapsulisanim etil vanilinom (plava puna linija).

Može se zaključiti da inkapsulacija etil vanilina metodom ekstruzije (elektrospininga) u PVA kao nosaču dovodi do promena u termičkim svojstvima arome. Primetan je pozitivan efekat inkapsulacije koji se manifestuje u kontrolisanom otpuštanju inkapsulisanе arome u dužem temperaturnom intervalu u poređenju sa slobodnom (neinkapsulisanom) aromom. Pored toga, jednostavnost metode inkapsulacije kojom se dobijaju filmovi sa inkapsulisanom aktivnom komponentom otvaraju mogućnosti za inkapsulaciju i drugih materija kao i korišćenje različitih nosača. Ovo se pre svega odnosi na oblast primene ovakvih filmova kao potencijalnih materijala

ambalaže sa dodatnim-aktivnim komponentama koje takvim materijalima daju nove mogućnosti primene.

4.3.3. Inkapsulacija etil vanilina u prethodno formirane filmove na bazi polivinil alkohola dobijene metodom elektrostatske ekstruzije-elektrospininga

Inkapsulacija aroma je vršena i nanošenjem etil vanilina na već pripremljene PVA filmove. Nanošenje arome je vršeno potapanjem PVA filмова u smešu etanol/voda/glicerol/etil vanilin i termičkim tretmanom po metodi smrzavanje-otapanje. Morfološka analiza dobijenih filmova je vršena skenirajućim elektronskim mikroskopom i rezultati ove analize su dati na Slici 4.41.

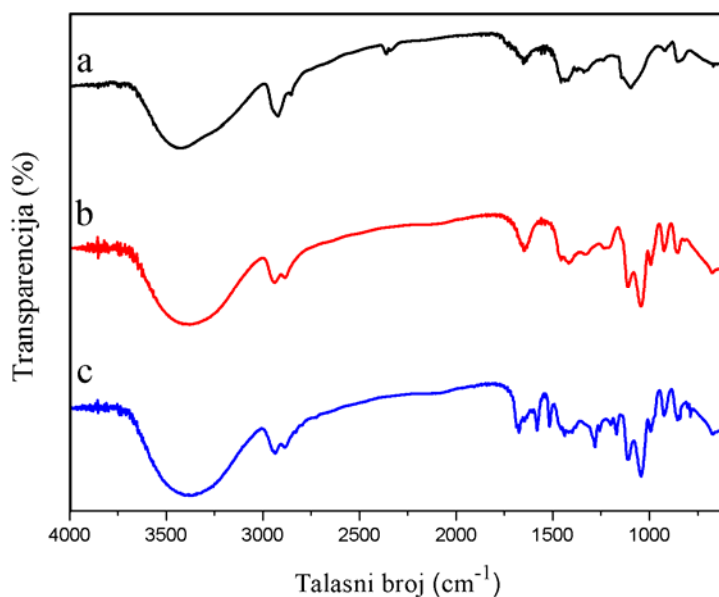


Slika 4.41. SEM slike: a) polaznog PVA filma (pre dodatka arome); b) PVA film tretiran smešom etanol/voda/glicerol; c) PVA film tretiran smešom etanol/voda/glicerol/etil vanilin. d) Fotografija praznog PVA filma.

Dobijena slika površine filma pre tretmana (Slika 4.41a) ukazuje na to da se PVA film sastoji iz isprepletanih vlakana nanometarskih veličina, čija srednja vrednost prečnika (\pm standardna

devijacija) iznosi $145,79 \pm 80,42 \mu\text{m}$. Naknadnim tretmanom PVA filmova smešama sa i bez etil vanilina (Slika 4.41b-c) došlo je do narušavanja morfologije vlakana, koja su izgubila svoj oblik, što je posebno izraženo kod formulacije sa dodatkom aromom. Ove promene u morfologiji nanovlakana nisu se odrazile značajnije na makromorfološka svojstva samih filmova koji su zadržali svoj oblik uz minimalna odstupanja u odnosu na polazni PVA film.

Ovakav pristup inkapsulaciji/imobilizaciji aktivne komponente je interesantan jer se unapred mogu formirati željeni oblici nosača na koje se naknadno nanosi aktivna supstanca. Ovim pristupom inkapsulaciji se smanjuje uticaj procesa dobijanja nosača na aktivnu komponentu. Potencijalne hemijske interakcije između PVA i inkapsulisane arome su ispitivane FTIR spektroskopijom (Slika 4.42).



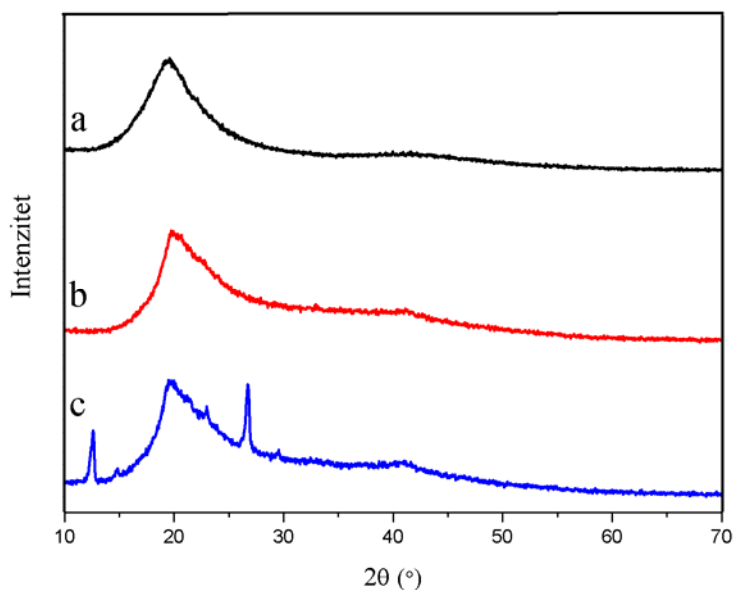
Slika 4.42. FTIR spektri: a) polaznog PVA filma (pre dodatka arome); b) PVA film tretiran smešom etanol/voda/glicerol; c) PVA film tretiran smešom etanol/voda/glicerol/etil vanilin.

Prikazani FTIR spektri pokazuju prisustvo PVA i etil vanilina u ispitivanim uzorcima (Slika 4.42c). U datom spektru se pored traka koje potiču od PVA, pojavljuju i trake etil vanilina (mada uglavnom preklapljene trakama polimera) na 1583cm^{-1} , 1517cm^{-1} i 1284cm^{-1} . FTIR spektri tretiranih PVA filmova (Slika 4.42b-c) ukazuju da je kod PVA došlo do izvesnih promena koje se ogledaju pojavom dve nove trake na $\sim 1110\text{cm}^{-1}$ i $\sim 1042\text{cm}^{-1}$. Ove trake verovatno potiču od

zaostalog glicerola koji je korišćen kao sredstvo za stabilizaciju PVA u toku procesa nanošenja arome (Spectral Database for Organic Compounds, AIST (SDBS)).

Prema ovde prikazanim rezultatima FTIR analize, može se zaključiti da PVA i etil vanilin nakon nanošenja arome i procesa geliranja polimera formiraju zasebne faze.

Difraktogrami PVA filmova (sa i bez etil vanilina) su prikazani na Slici 4.43. Difraktogram praznog PVA filma (Slika 4.43a) pokazuje široki difrakcioni pik na $2\theta=19.55^\circ$, dok se u slučaju praznog PVA filma tretiranog smešom etanol/voda/glicerol (uz proces smrzavanja-otapanja) (Slika 4.43b), ovaj pik nalazi na $2\theta=19.75^\circ$. XRD analizom praznih filmova nije utvrđen značajniji uticaj tretmana smešom rastvarača i procesa smrzavanja-otapanja na kristalnu strukturu nosača. Kao što je već naglašeno, ovakvi difraktogrami PVA ukazuju na delimičnu kristalnu strukturu ovog polimera (Kayaci i Uyar, 2012).



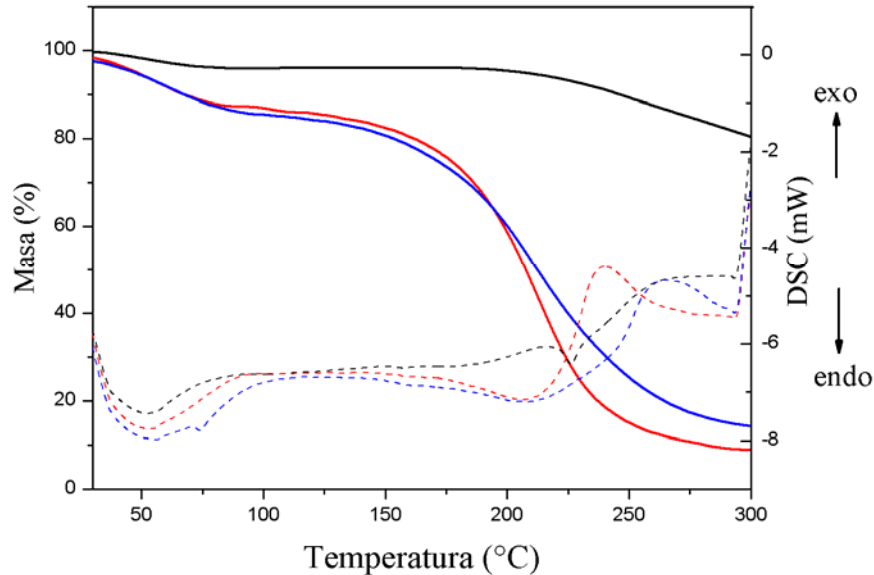
Slika 4.43. Difraktogrami: a) polazni PVA film (pre dodatka arome); b) PVA film tretiran smešom etanol/voda/glicerol; c) PVA film tretiran smešom etanol/voda/glicerol/etil vanilin.

Difraktogram PVA filma sa etil vanilinom (Slika 4.43c) pokazuje široki pik na $2\theta=19,5^\circ$ koji potiče od PVA, kao i dva oštra pika od etil vanilina na $2\theta=12,55^\circ$ i $2\theta=26,75^\circ$. Ovi rezultati ukazuju da sa dodatkom arome najverovatnije ne dolazi do promene u njenoj kristalnoj strukturi, jer su oba najintenzivnija pika koja potiču od etil vanilina (Poglavlje 4.1) vidljiva u

difraktogramu PVA filma sa aromom. Treba naglasiti da su ostali pikovi koji se javljaju kod slobodne arome u ovom slučaju preklopljeni pikom koji potiče od PVA, te iz tog razloga nije moguće dati precizniju analizu podataka dobijenih XRD analizom. Ono što se može donekle zaključiti je da verovatno etil vanilin i PVA nakon tretmana filmova formiraju posebne faze i da nije došlo do značajnijeg uticaja PVA na kristalnu strukturu arome. Ovo je u suprotnosti sa rezultatima XRD analize PVA filmova datim u poglavlju 4.3.2, koji su jasno ukazali na promene u difraktogramu etil vanilina nastalim u toku formiranja nanovlakana sa inkapsulisanim aromom metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrospininga. Razlog za ovo je verovatno to što kod naknadnog tretmana vlakana (tj. naknadnog nanošenja arome) nema velikih promena pri isparavanju rastvarača kao u slučaju elektrospininga jer je proces znatno duži. Takođe, aroma je u ovom slučaju naneta nakon formiranja PVA nanovlakana, što takođe može biti razlog odsustva uticaja PVA na kristalna svojstva etil vanilina.

Analiza sadržaja etil vanilina je pokazala da je količina zadržanog etil vanilina na/u strukturi PVA filmova (vlakana) nakon tretmana zavisila od polazne koncentracije arome u rastvoru sa kojim su filmovi tretirani. U slučaju niže koncentracije arome u rastvoru za tretiranje (5%w/v), za PVA film se vezalo (mg etil vanilina/g PVA filma) $86,98 \pm 9,21$ mg/g, dok se u slučaju veće koncentracije arome u rastvoru za tretiranje (10%w/v) za film vezalo $162,50 \pm 1,71$ mg/g.

Termička svojstva dobijenih filmova su ispitivana metodama DSC i TGA (Slika 4.44). Prema prikazanim rezultatima, jasno se uočava da se u temperaturnom opsegu u kojem su rađene analize javljaju značajne razlike u TGA termogramima praznog PVA filma i filmova koji su tretirani. Prazni PVA filmovi do 300°C pokazuju pad mase od oko 20%, dok je u slučaju filma sa aromom taj pad iznosio ~85%. Dinamika gubitka mase takođe pokazuje razlike između uzoraka koji su tretirani i praznog PVA filma. Naime, tretirani filmovi pokazuju veći pad mase u temperaturnom opsegu 30°C do 200°C (~40%), koji se može povezati sa gubitkom zaostale vode i inkapsulisane arome.

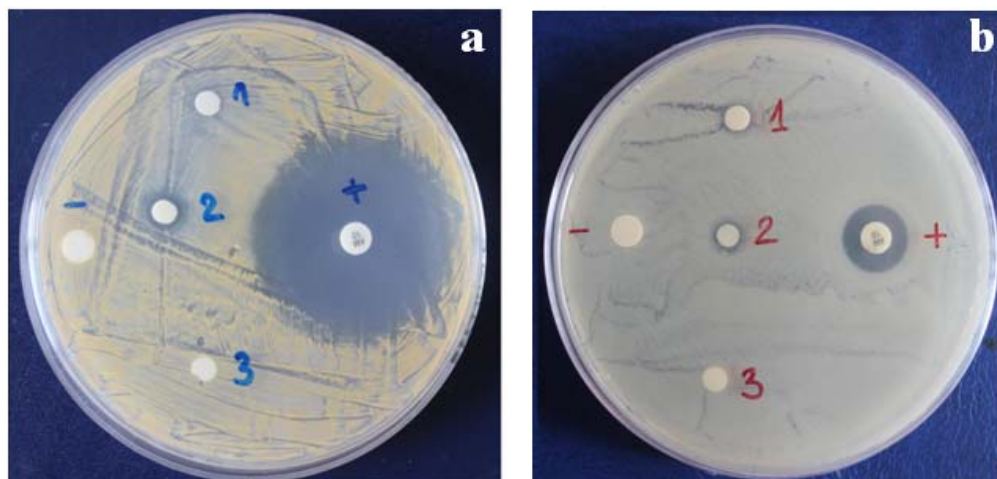


Slika 4.44. DSC (isprekidane linije) i TGA (pune linije): a) prazni PVA film (crne linije); b) PVA film tretiran smešom etanol/voda/glicerol (crvene linije); c) PVA film tretiran smešom etanol/voda/glicerol/etil vanilin (plave linije).

U istom temperaturnom opsegu prazni PVA film pokazuje pad mase od ~5%. Dalji pad mase se sa povećanjem temperature kod filma sa aromom i tretiranog praznog PVA filma može povezati sa isparavanjem zaostalog etil vanilina i glicerola. Prema Yunos i Rahman (2011), glicerol počinje da isprava (u atmosferi azota i pri brzini zagrevanja od $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$ - uslovi TGA analize) u temperaturnom opsegu $200\text{--}300^{\circ}\text{C}$. Intenzivan pad mase u slučaju tretiranih PVA filmova (sa i bez arome) se verovatno može povezati sa gubitkom zaostalog glicerola u uzorcima. Ovako složen termogram PVA filmova sa aromom ukazuje da se otpuštanje etil vanilina događa u širokom temperaturnom opsegu i da je kombinovano sa otpuštanjem vode i glicerola. Kao što je već prikazano u Poglavlju 4.3.2, termička dekompozicija PVA se odigrava na temperaturama iznad 225°C , što se može pratiti i promenama u DSC krivama iznad ove temperature. U DSC krivi PVA filma sa etil vanilinom (Slika 4.44) se na $\sim 74^{\circ}\text{C}$ može uočiti slabiji endotermni pik koji verovatno potiče od topljenja arome.

Na Slici 4.45 je dat prikaz dejstva uzoraka filmova i kontrolnih uzoraka na rast bakterijskih kultura *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Rezultati merenja prečnika inhibitornih zona oko ispitivanih uzoraka su dati u Tabeli 4.8 (U duplikatu, označeni kao *Test 1* i *Test 2*). Kao što

se može videti iz prikazanih rezultata, etil vanilin nanet na PVA filmove dobijene procesom elektrostatičke ekstruzije-elektrospininga pokazuje inhibitorno dejstvo na rast testiranih mikroorganizama. Naknadnom proverom je utvrđeno da je kod uzoraka kod kojih su uočene zone inhibicije došlo do mikrobistatičnog delovanja na ispitivane bakterije.



Slika 4.45. Efekat uzoraka na rast testiranih mikroorganizama: a) *Staphylococcus aureus*; b) *Escherichia coli*. +) ampicilin; -) negativna kontrola; 1) PVA film sa nižom koncentracijom etil vanilina; 2) PVA film sa višom koncentracijom etil vanilina; 3) PVA film tretiran (bez etil vanilina).

Prikazani rezultati ukazuju na postojanje inhibitornog efekta PVA filmova sa etil vanilinom. Efekat inhibicije rasta zavisi od koncentracije etil vanilina u rastvoru kojim je tretiran PVA film nakon dobijanja metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrospininga.

Tabela 4.8. Vrednosti merenja prečnika zona inhibicije (u mm).

Bakterijska kultura		Ampicilin (10mcg) (+)	Negativna kontrola (-)	Uzorak 1 (niža konc. arome)	Uzorak 2 (viša konc. arome)	Uzorak 3 (PVA film bez arome)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1*	33	-	-	6	-
	2**	34	-	5	7	-
<i>Escherichia coli</i>	1	13	-	5	6	-
	2	13	-	-	6	-

* Test 1

**Test 2

Sa porastom koncentracije arome u rastvoru dolazi do izraženije inhibicije rasta testiranih mikroorganizama. S druge strane, ukoliko se posmatraju prečnici inhibitornih zona, pri višim koncentracijama etil vanilin je pokazao slično dejstvo na oba testirana mikroorganizma (Tabela 4.7). Uzorak 3 (PVA tretiran bez arome) nije pokazao inhibitorno dejstvo na rast testiranih mikroorganizama. Iz ovoga se može zaključiti da inhibicija rasta bakterijskih kultura zavisi od etil vanilina i njegove koncentracije. U literaturi se mogu naći podaci o dejstvu etil vanilina i sličnih komponenti na rast mikroorganizama. Takođe, postoje podaci o dejstvu vanilina na pojedine mikrobne kulture. Yemiş et al. (2011) su pokazali da vanilin, etil vanilin i vanilinska kiselina mogu da inhibiraju rast *Cronobacter* sp. pri određenim koncentracijama i uslovima (pre svega pH i temperatura). Fitzgerald et al. (2004) navode da vanilin ispoljava bakteriostatično delovanje prema određenim bakterijskim kulturama.

Antimikrobni efekat etil vanilina je pogodna karakteristika ove supstance koja se dalje može iskoristiti kao preventiva u sprečavanju rasta nekih mikroorganizama. U kombinaciji sa PVA, ova aroma se kao što je prikazano u ovom radu može koristiti za dobijanje aktivnih filmova sa antimikrobnim dejstvom. Kako su rezultati pokazali da etil vanilin zadržava svoja svojstva (pre svega hemijska) u toku i nakon inkapsulacije/imobilizacije za PVA filmove, to otvara mogućnost daljeg unapređenja procesa kroz uvođenje drugačijih formulacija arome ili njenog kombinovanja sa drugim antimikrobnim supstancama. Pristup prethodnog formiranja nosača a zatim naknadnog nanošenja aktivne supstance otvara put za kombinovanje kako aktivnih komponenti tako i razvoju novih formulacija nosača u cilju dobijanja inkapsulata željenih karakteristika.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu je ispitivana inkapsulacija aroma u tri različita materijala: karnauba vosku, alginatu i polivinil alkoholu. Kao aktivne komponente su korišćene sledeće arome: etil vanilin, komercijalno dostupna aroma kokosa i D-limonen. Za dobijanje inkapsulata su primenjene metode disperzije u otopljenom stanju (metoda emulzifikacije i disperzija vazduhom) i elektrostatičke ekstruzije. Pored toga u radu su ispitivane i metode koje su proizašle iz elektrostatičke ekstruzije kao što su elektrosprej i elektrospining. Cilj istraživanja je bio proizvodnja hemijski stabilnih inkapsulata u što širem opsegu veličina i oblika i sa što boljim svojstvima zadržavanja date arome uz očuvanje njenih hemijskih i tehnoloških svojstava.

U prvom delu rada je ispitivana inkapsulacija etil vanilina u karnauba vosku primenom metoda disperzije u otopljenom stanju: disperzija (emulzifikacija) u vodi i metoda disperzije vazduhom pomoću, posebno za tu svrhu konstruisane dizne. Obe metode su dale slične rezultate kada je u pitanju raspodela veličine čestica, pri čemu je kod svih ispitivanih formulacija 90% čestica imalo prečnik manji od 250 μ m. Morfološkom analizom SEM snimaka je utvrđeno da se metodom disperzije vazduhom dobijaju čestice pravilnijeg (sfernog) oblika. Metodom disperzije (emulzifikacije) u vodi su dobijene čestice nepravilnog oblika tj. više odstupaju od sfernog oblika, koji se generalno smatra poželjnim kod inkapsulata. Pored toga, metoda disperzije u vodi je dala čestice koje su grupisane u agregate različitih veličina. Ova pojava nije primećena kod čestica dobijenih metodom disperzije pomoću vazduha. Rezultati analize inkapsulacione efikasnosti su pokazali da je metoda disperzije vazduhom imala bolju efikasnost zadržavanja etil vanilina (~67%) u odnosu na metodu disperzije (emulzifikacije) u vodi (~5%). Niska inkapsulaciona efikasnost kod metode disperzije u vodi je verovatno posledica gubitka arome tokom disperzije u vodi, relativno velikog udela arome u odnosu na nosač (teorijski sadržaj arome 20%), intenzivnog mešanja-homogenizacije u toku pripreme kao i odsustva emulzifikatora. Rezultati FTIR i XRD analize nisu pokazali da dolazi do hemijskih ili strukturnih promena kod etil vanilina i karnauba voska tokom procesa inkapsulacije. Termogravimetrijskom analizom je konstatovano da se inkapsulisana aroma oslobađa na višim temperaturama (>210°C) u odnosu na slobodni etil vanilin koji pokazuje pad mase od 90% do navedene temperature (čestice dobijene disperzijom vazduhom). Pad mase se odigrava u širokom temperaturnom regionu, što je povoljno sa aspekta potencijalne primene inkapsulata u realnim termičkim procesima. Sa inženjerskog aspekta, metoda disperzije u vodi se pokazala kao tehnički

jednostavnija, dok su joj mane pre svega niska inkapsulaciona efikasnost i potreba dalje obrade (sušenja) čestica nakon procesa inkapsulacije. Metoda disperzije vazduhom omogućava dobijanje čestica sfernog oblika, bez formiranja agregata i sa relativno visokom inkapsulacionom efikasnošću. Mane ove metode se ogledaju u tome što zahteva konstrukciju posebne dizne sa mogućnošću zagrevanja vazduha koji se koristi za disperziju otopljene mešavine vosak/aroma.

U drugom delu rada je analizirano korišćenje alginata kao nosača sa inkapsulaciju kako čvrstih aroma (etil vanilin), tako i tečnih aroma (aroma kokosa i D-limonen). Za dobijanje inkapsulata je primenjena metoda elektrostatičke ekstruzije a u slučaju inkapsulacije etil vanilina dodatno je uvedena i metoda elektrostatičke ekstruzije-elektrosprej. Primarni cilj je bio dobijanje inkapsulata na bazi Ca-alginata ujednačenih dimenzija (u što širem opsegu veličina) i sa maksimalnim udelom aroma u svojoj strukturi. Ca-alginat se pokazao kao pogodan nosač za inkapsulaciju etil vanilina i dobijanje suvih inkapsulata u obliku sfernih čestica (do maksimalno 20% udela arome). Srednji prečnik vlažnih čestica sa 20% arome je iznosio $2,41 \pm 0,04$ mm, dok je nakon sušenja, došlo do smanjenja prečnika čestica (za oko 18%) kao posledica isparavanja vode. Dalje povećanje udela arome je prouzrokovalo deformaciju čestica i gubitak sfernog oblika. Smanjenje udela etil vanilina u rastvorima pre inkapsulacije je dovelo do smanjenja prečnika čestica nakon sušenja, što ukazuje na to da sama aroma stabilizuje oblik čestica i da ima ulogu punioca. Termogravimetrijskom analizom je pokazano da se inkapsulacijom postiže bolje očuvanje etil vanilina, koji u inkapsulisanoj formi do 230°C gubi ~50% mase dok je u slučaju slobodne arome ovaj gubitak iznosio ~86%.

Dalje smanjenje veličine čestica, pri korišćenju elektrostatičke ekstruzije za inkapsulaciju etil vanilina u alginatu i dobijanje čestica mikronskih veličina (reda veličina nekoliko mikrona), je zahtevalo promenu u sastavu rastvora za inkapsulaciju i prevođenje etil vanilina u rastvorni oblik putem njegovog rastvaranja u 70%v/v vodenom rastvoru etanola. Ovaj pristup je doveo do promena u reološkim svojstvima rastvora alginat/etil vanilin koje su se ogledale u smanjenju viskoziteta rastvora. Ovo je rezultiralo da se u uslovima primene visokog napona na vrhu igle za ekstruziju formiraju čestice u obliku spreja koji biva privučen suprotnim naelektrisanjem kolektora (metoda elektrostatičke ekstruzije-elektrosprej). Korišćena su dva tipa kolektora: vodeni rastvor CaCl_2 i čvrst kolektor na bazi aluminijumske folije. Kod primene tečnog kolektora nije došlo do formiranja čestica u rastvoru CaCl_2 , verovatno kao posledica promene reoloških svojstava alginata (uvođenjem etanola). S druge strane, ekstruzija rastvora alginat/etil

vanilin na površinu čvrstog kolektora je rezultirala formiranjem suvih čestica čiji su se prečnici, u zavisnosti od formulacije, kretali u opsegu od $0,181 \pm 0,105 \mu\text{m}$ do $0,667 \pm 0,342 \mu\text{m}$. Termogravimetrijskom analizom je utvrđeno da se proces otpuštanja inkapsulisane arome događa u širem temperaturnom opsegu u odnosu na slobodnu aromu.

Elektrostatička ekstruzija je korišćena za inkapsulaciju arome kokosa i D-limonena u obliku Ca-alginatnih čestica. Pre same inkapsulacije vršena je priprema emulzija alginat/aroma mehaničkom homogenizacijom. Pripremljene emulzije su se pokazale kao stabilne u periodu od jednog sata, što je bio dovoljan vremenski period za formiranje inkapsulata. Viskozitet rastvora i emulzija korišćenih za inkapsulaciju je zavisio pre svega od koncentracije alginata, dok je dodatak arome značajnije uticao jedino na provodljivost emulzija. Nakon ekstruzije (sa i bez primene napona) emulzija u rastvor CaCl_2 , dimenzije vlažnih čestica sa inkapsulisanim aromom kokosa su se kretale u opsegu od $\sim 629 \mu\text{m}$ do $\sim 2250 \mu\text{m}$, dok je nakon sušenja ovaj opseg iznosio od $\sim 220 \mu\text{m}$ do $\sim 924 \mu\text{m}$. Slični rezultati su postignuti i u slučaju čestica sa inkapsulisanim D-limonenom. Primenom elektrostatičkog polja su dobijene čestice manjih dimenzija, dok je pri formulacijama sa višim koncentracijama alginata i aroma došlo do izduživanja čestica i gubitka sfernog oblika. Inkapsulaciona efikasnost kod formulacija sa D-limonenom se kretala u opsegu od ~ 50 do $\sim 77\%$. Kod inkapsulacije arome kokosa, praćeno je zadržavanje pojedinih komponenti arome unutar Ca-alginata i utvrđeno je da ono zavisi pre svega od hemijskih karakteristika svake komponente posebno. Vanilin je pokazao najveći gubitak nakon inkapsulacije od svih identifikovanih komponenti arome kokosa. Rehidracija čestica sa inkapsulisanim aromama je praćena u vodi i fosfatnom puferu. Rehidracija u vodi nije dovela do narušavanja strukture čestica. Rehidracija u fosfatnom puferu je dovela do razgradnje Ca-alginata putem izmene jona kalcijuma iz strukture čestica sa jonima natrijuma iz fosfatnog pufera. U radu je dat predlog modela rehidracije u fosfatnom puferu koji uzima u obzir i prisustvo arome kao faktora koji utiče na dinamiku rehidracije. Predloženi model je dao dobre rezultate, pre svega kod rehidracije čestica sa inkapsulisanim D-limonenom. Termičkom analizom je utvrđeno da se kod obe arome u inkapsulisanoj formi postiže kontrolisano otpuštanje pri višim temperaturama u odnosu na slobodne (neinkapsulisane) arome. Rezultati FTIR analize kako u slučaju inkapsulacije etil vanilina tako i u slučaju inkapsulacije arome kokosa i D-limonena nisu pokazali značajniju hemijsku interakciju između aroma i Ca-alginata.

Inkapsulacija aroma u polivinil alkoholu je vršena primenom metode elektrostatičke ekstruzije i metode elektrostatičke ekstruzije-elektrospininga. Kao model aroma je korišćen etil vanilin. Inkapsulacija etil vanilina metodom elektrostatičke ekstruzije je vršena uz primenu nosača na bazi alginat/polivinil alkohol. Vršena je ekstruzija smeše aroma/nosač u vodeni rastvor CaCl_2 u cilju formiranja Ca-alginata tj. primarne strukture i oblika čestica. Naknadno su čestice podvrgnute geliranju polivinil alkohola metodom smrzavanja-otapanja. Ovakav postupak je omogućio formiranje sfernih čestica sa udelom etil vanilina do 20%, čiji je prečnik u vlažnom stanju iznosio $2,69 \pm 0,13$ mm, dok je nakon sušenja došlo do delimičnog smanjenja prečnika čestica usled gubitka vode. Prečnik suvih čestica je iznosio $2,02 \pm 0,16$ mm. Smanjenje sadržaja arome u polaznoj smeši pre ekstruzije je dovelo do smanjenja prečnika čestica i narušavanja sfernog oblika. I u slučaju čestica na bazi alginat/polivinil alkohol dodatak arome je pozitivno uticao na očuvanje morfologije čestica. Analizom rezultata dobijenih FTIR analizom nisu utvrđene značajnije interakcije između etil vanilina i materijala nosača. Pozitivan efekat inkapsulacije etil vanilina u nosaču na bazi alginata i polivinil alkohola se posebno ističe kroz poboljšanje termičkih svojstava inkapsulisane arome. Pokazano je da više arome ostane sačuvano u obliku inkapsulata nego u slobodnoj formi u istom temperaturnom opsegu. Do 250°C ostatak slobodnog etil vanilina je bio manji od 10%, dok je u slučaju inkapsulisane arome taj ostatak iznosio ~50%.

Metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrospininga je vršena inkapsulacija etil vanilina u rastvorenom obliku korišćenjem 70%v/v rastvora etanola u vodi kao rastvarača za aromu. Ekstruzija je vršena na površinu čvrstog kolektora (aluminijumska folija), pri čemu su dobijeni filmovi koji se sastoje od nanovlakana čiji je prečnik u opsegu 100-1700nm, što je zavisilo pre svega od sadržaja arome u polaznom rastvoru. Analizom slika dobijenih elektronskom mikroskopijom je utvrđeno da dodatak arome dodatno stabilizuje oblik vlakana ali i poboljšava mehanička svojstva dobijenih filmova. FTIR analiza nije pokazala postojanje značajnijih interakcija između arome i nosača. Međutim, XRD analiza je pokazala da proces elektrostatičke ekstruzije-elektrospininga etil vanilina u polivinil alkoholu menja kristalna svojstva arome. Razlog za ovo su verovatno izmenjeni uslovi kristalizacije arome koja je zarobljena u strukturu nanovlakana. DSC analizom je pokazano da inkapsulacija utiče i na neka termička svojstva inkapsulisane arome, pre svega na tačku topljenja koja je manja u odnosu na slobodni etil vanilin.

Filmovi na bazi polivinil alkohola dobijeni metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrospininga su korišćeni i za naknadno nanošenje etil vanilina iz rastvora uz proces geliranja metodom smrzavanja-otapanja. Dobijeni filmovi su pokazali zadovoljavajuća termička svojstva ali i određenu antimikrobnu aktivnost na testiranim mikroorganizmima.

Rezultati proistekli iz ovog rada treba da pruže doprinos u oblasti inkapsulacije aditiva a pre svega aroma za potrebe prehrambene industrije. Razvijene formulacije za inkapsulaciju kao i kontrola procesa inkapsulacije realizovani u ovom radu treba da omoguće formiranje željenih dimenzija i oblika inkapsulisanih aroma u zavisnosti od krajnje primene. Dobijeni su inkapsulisani sistemi čije se dimenzije kreću od nekoliko desetina nanometara pa do nekoliko milimetara. Akcenat je stavljen na termičku i hemijsku stabilnost inkapsulisanih aroma. Istraživanja realizovana u ovoj disertaciji treba da doprinesu razvoju novih, pre svega nanosistema za inkapsulaciju prehrambenih aditiva.

LITERATURA

Albertini, B., Passerini, N., Pattarino, F., Rodriguez, L. (2008): New spray congealing atomizer for the microencapsulation of highly concentrated solid and liquid substances. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69: 348-357.

Albertini, B., Passerini, N., Di Sabatino, M., Monti, D., Burgalassi, S., Chetoni, P., Rodriguez, L. (2010): Poloxamer 407 microspheres for orotransmucosal drug delivery. Part I: Formulation, manufacturing and characterization. *International Journal of Pharmaceutics* 399: 71-79.

Appelqvist, I.A.M, Golding, M, Vreeker, R, Zuidam, N.J. (2007): Emulsions as delivery systems in foods. In: Lakkis, J.M. (Ed.), *Encapsulation and controlled release technologies in food systems*. Blackwell Publishing, Ames, pp. 41-81.

Arias, M., Pantojas, M.V., Perales, O., Otaño, W. (2011): Synthesis and characterization of magnetic diphasic $ZnFe_2O_4/\gamma-Fe_2O_3$ electrospun fibers. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 323: 2109-2114.

Ariga, O., Takagi, H., Nishizawa, H., Sano, Y. (1987): Immobilization of microorganisms with PVA hardened by iterative freezing and thawing. *Journal of Fermentation Technology* 65: 651-658.

Arinstein, A., Liu, Y., Rafailovich, M., Zussman, E. (2011): Shifting of the melting point for semi-crystalline polymer nanofibers. *Europhysics Letters/EPL* 93: 46001.

Asran, S.A., Henning, S., Michler, H.G. (2010): Polyvinyl alcohol–collagen–hydroxyapatite biocomposite nanofibrous scaffold: Mimicking the key features of natural bone at the nanoscale level. *Polymer* 51: 868-876.

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

Balducci, A. G., Colombo, G., Corace, G., Cavallari, C., Rodriguez, L., Buttini, F., Colombo, P., Rossi, A. (2011): Layered lipid microcapsules for mesalazine delayed-release in children. *International Journal of Pharmaceutics* 421: 293-300.

Baranauskienė, R., Bylaitė, E., Žukauskaitė, J., Venskutonis, P. R. (2007): Flavor Retention of Peppermint (*Mentha piperita* L.) Essential Oil Spray-Dried in Modified Starches during Encapsulation and Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 3027-3036.

Bertolini, A.C., Siani, A.C., Grosso, C.R.F. (2001): Stability of Monoterpenes Encapsulated in Gum Arabic by Spray-Drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 780-785.

Bezbradica, D., Matić, G., Nedović, V., Čukalović-Leskošek, I., Bugarski, B. (2004): Immobilization of Brewing Yeast in PVA/alginate Microbeads Using Electrostatic Droplet Generation, session 5, *Chemical Industry* 58: 118-120.

Bezbradica, D., Obradovic, B., Leskosek-Cukalovic, I., Bugarski, B., Nedovic, V. (2007): Immobilization of yeast cells in PVA particles for beer fermentation. *Process Biochemistry* 42: 1348-1351.

Bodmeier, R., Wang, J., Bhagwatwar H. (1992): Process and Formulation Variables in the preparation of wax microparticles by a melt dispersion technique. II. W/O/W multiple Emulsion Technique for Water-soluble Drugs. *Journal of Microencapsulation* 9: 99-107.

Bonino, A.C. Krebs, D. M., Saquing, D.C., Jeong, I.S., Shearer, L.K., Alsberg, E., Khan, A.S. (2011): Electrospinning alginate-based nanofibers: From blends to crosslinked low molecular weight alginate-only systems. *Carbohydrate Polymers* 85: 111-119.

Bugarski, B., Li, Q., Goosen, F.A.M., Poncelet, D., Neufeld, J.R., Vunjak, G. (1994): Electrostatic droplet generation: Mechanism of polymer droplet formation. *AIChE Journal* 40: 1026-1031.

Bugarski, B., Obradovic, B., Nedovic, V., Goosen, M. F. A. (2006): Electrostatic droplet generation technique for cell immobilization. In: Shu, J. P., Spasic, A. (Eds.), *Finely dispersed systems*. CRC Press, Boca Raton, pp. 869-886.

Burdock, A.G. (2009): *Fenaroli's handbook of flavor ingredients*, 6th edn. CRC Press, Boca Raton.

Camerlo, A., Vebert-Nardin, C., Rossi, M. R., Popa, M.A. (2013): Fragrance encapsulation in polymeric matrices by emulsion electrospinning. *European Polymer Journal* 49: 3806-3813.

Carr, E. M., Doane, M. W., Wing, E.R., Bagley, B.E. (1993): Starch encapsulation of biologically active agents by a continuous process. Patent br. 5,183,690.

Chan, E.S., Lee, B.B., Ravindra, P., Poncelet, D. (2009): Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. *Journal of Colloid and Interface Science* 338: 63-72.

Chan, E.S. (2011a): Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. *Carbohydrate Polymers* 84: 1267-1275.

Chan, E.S., Wong, S.L., Lee, P.P., Lee, J.S., Ti, T.B., Zhang, Z., Poncelet, D., Ravindra, P., Phan, S.H., Yim, Z.H. (2011b): Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydrate Polymers* 83: 225-232.

Chang, C. P., Dobashi, T. (2003): Preparation of alginate complex capsules containing eucalyptus essential oil and its controlled release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 32: 257–262.

Chen, Q., McGillivray, D., Wen, J., Zhong, F., Siew Young Quek, Z.S. (2013): Co-encapsulation of fish oil with phytosterol esters and limonene by milk proteins. *Journal of Food Engineering* 117: 505-512.

Cheong, M., Zhitomirsky, I. (2008): Electrodeposition of alginic acid and composite films. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 328: 73-78.

Ciobanu, A., Landy, D., Fourmentin, S. (2013): Complexation efficiency of cyclodextrins for volatile flavor compounds. *Food Research International* 53: 110-114.

Dardelle, G., Normand, V., Steenhoudt, M., Bouquerand, P.E., Chevalier, M., Baumgartner, P. (2007): Flavour-encapsulation and flavour-release performances of a commercial yeast-based delivery system. *Food Hydrocolloids* 21: 953-960.

De Roos, K.B. (2003): Effect of texture and microstructure on flavour retention and release. *International Dairy Journal* 13: 593-605.

De Roos, K.B. (2006): Understanding and controlling the behaviour of aroma compounds in thermally processed foods. *Trends in Food Science & Technology* 17: 236-243.

Del Toro-Arreola, S., Flores-Torales, E., Torres-Lozano, C., Del Toro-Arreola, A., Tostado-Pelayo, K., Ramirez-Dueñas, M. G., Daneri-Navarro, A. (2005): Effect of d-limonene on immune response in BALB/c mice with lymphoma. *International Immunopharmacology* 5: 829-838.

Dewettinck, K., Huyghebaert, A. (1999): Fluidized bed coating in food technology. *Trends in Food Science & Technology* 10: 163-168.

Donati, I., Paoletti, S. (2009): Material Properties of Alginates. In: Rehm, H.A.B. (Ed.), *Alginates: Biology and Applications*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-54.

Donbrow, M. (1991): *Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy*. CRC Press, Boca Raton.

Dong, Z., Wang, Q., Du, Y. (2006): Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release. *Journal of Membrane Science* 280: 37-44.

Doria-Serrano, M. C., Ruiz-Trevino, F. A., Rios-Arciga, C., Hernández-Esparza, M., Santiago, P. (2001): Physical characteristics of poly(vinyl alcohol) and calcium alginate hydrogels for immobilization of activated sludge. *Biomacromolecules* 2: 568-574.

Dreher, L.M. (2001): Alginate: Production, Composition, Physicochemical Properties, Physiological Effects, Safety, and Food Applications. In: Cho, S.S (Ed.), *Handbook of Dietary Fiber*. Marcel Dekker Inc., New York.

Duongthingoc, D., George, P., Katopo, L., Gorczyca, E., Kasapis, S. (2013): Effect of whey protein agglomeration on spray dried microcapsules containing *Saccharomyces boulardii*. *Food Chemistry* 141: 1782-1788.

Endlein, E., Peleikis, K.H. (2011): Natural Waxes-Properties, Compositions and Applications. *SOFW-Journal*: 137.

Fang, Z., Ruth Comino, P., Bhesh Bhandari, B. (2013): Effect of encapsulation of D-limonene on the moisture adsorption property of β -cyclodextrin. *LWT - Food Science and Technology* 51: 164-169.

Fiore, A., Troise, D.A., Mogol, A.B., Roullier, V., Gourdon, A., El Mafadi Jian, S., Hamzalıoğlu, A.B., Gökmen, V., Fogliano, V. (2012): Controlling the Maillard Reaction by Reactant Encapsulation: Sodium Chloride in Cookies. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 60: 10808-10814.

Fitzgerald, D.J., Stratford, M., Gasson, M.J., Ueckert, J., Bos, A., Narbad, A. (2004): Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology* 97: 104-113.

Fuchs, M., Turchiuli, C., Bohin, M., Cuvelier, M.E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M.N., Dumoulin, E. (2006): Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering* 75: 27-35.

Ganji, F., Vasheghani-Farahani, S., Vasheghani-Farahani, E. (2010): Theoretical description of hydrogel swelling. A Review. *Iranian Polymer Journal* 19: 375-398.

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

Goh, M.K., Mahadi, M.N., Hassan, O., Rahman, A.R.Z.N.R., Illias, M.R. (2009): A predominant β -CGTase G1 engineered to elucidate the relationship between protein structure and product specificity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57: 270-277.

González-Baró, A. C., Parajón-Costa, B. S., Franca, C. A., Pis-Diez, R. (2008): Theoretical and spectroscopic study of vanillic acid. *Journal of Molecular Structure* 889: 204-210.

Goodship V., Jacobs, D. (2005): Polyvinyl alcohol: materials, processing and applications. In: Gardiner F, (Ed.), *Rapra Review Reports* 16, Report 192. Smithers Rapra Technology Shrewsbury, Shropshire, pp. 4-16.

Goodship, V., Jacobs, D. (2009): Polyvinyl Alcohol: Materials, Processing and Applications, *Rapra Review Report Series*, Report 192, 3-23.

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

Hambleton, A., Voilley, A., Debeaufort, F. (2011): Transport parameters for aroma compounds through i-carrageenan and sodium alginate-based edible films. *Food Hydrocolloids* 25: 1128-1133.

Han, J., Branford-White, J.C., Zhu, M.L. (2010): Preparation of poly(ϵ -caprolactone)/poly(trimethylene carbonate) blend nanofibers by electrospinning. *Carbohydrate Polymers* 79: 214-218.

Hassan, C.M., Peppas, N.A. (2000): Structure and applications of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. *Advances in Polymer Science* 153: 37-65.

Haug, A., Smidsrød, O. (1965): Fractionation of alginates by precipitation with calcium and magnesium ions. *Acta Chemica Scandinavica* 19: 1221-1226.

Hedges, R. A. (1998): Industrial Applications of Cyclodextrins. *Chemical Reviews* 98: 2035-2044.

Hong, H.K. (2007): Preparation and Properties of Electrospun Poly(vinyl alcohol)/Silver Fiber Web as Wound Dressings. *Polymer Engineering & Science* 47: 43-49.

Huang, R.Y.M., Pal, R., Moon, G.Y. (1999): Characteristics of sodium alginate membranes for the pervaporation dehydration of ethanol-water and isopropanol-water mixtures. *Journal of Membrane Science* 160: 101-113.

Hussain, K., Thorsen, G., Malthé-Sørensen, D. (2001): Nucleation and metastability in crystallization of vanillin and ethyl vanillin. *Chemical Engineering Science* 56: 2295-2304.

Ikeda, A., Takemura, A., Ono, H. (2000): Preparation of low-molecular weight alginic acid by acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers* 42: 421-425.

Isailović, D.B., Kostić, T.I., Zvonar, A., Đorđević, B.V., Gašperlin, M., Nedović, A.V., Bugarski, M.B. (2013): Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 19: 181-189.

Jaworek, A., Sobczyk, A.T. (2008): Electro spraying route to nanotechnology: An overview. *Journal of Electrostatics* 66: 197-219.

Jenkins, W.H., Friedman, B.H. (1949): Modern Wax Technology. *Journal of Chemical Education* 26: 182-186.

Jian-Wei, L., Yong-Liang, Z., Zhao-Xia, G., Ping, H., Jian, Y. (2006): Electrospinning of sodium alginate with poly(ethyleneoxide). *Polymer* 47: 8026-8031.

Jun-xia, X., Hai-yan, Y., Jian, Y. (2011): Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry* 125: 1267-1272.

Karathanos, T.V., Mourtzinou, I., Yannakopoulou, K., Andrikopoulos, K.N. (2007). Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with β -cyclodextrin. *Food Chemistry* 101: 652-658.

Kaushik, V., Roos, Y. H. (2007): Limonene encapsulation in freeze-drying of gum Arabic-sucrose-gelatin systems. *LWT-Food Science and Technology* 40: 1381-1391.

Kayaci, F., Uyar, T. (2012): Encapsulation of vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanowebs: Prolonged shelf-life and high temperature stability of vanillin. *Food Chemistry* 133: 641-649.

Kheradmandnia, S., Vasheghani-Farahani, E., Nosrati, M., Atyabi, F. (2010): Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 6: 753-759.

Kikuchi, A., Kawabuchi, M., Sugihara, M., Sakurai, Y., Okano, T. (1997): Pulsed dextran release from calcium-alginate gel beads. *Journal of Controlled Release* 47: 21-29.

Knezevic, Z., Bobic, S., Milutinovic, A., Obradovic, B., Mojovic, Lj., Bugarski, B. (2002): Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isoctane system. *Process Biochemistry* 38: 313-318.

Kostić, T.I., Isailović, D.B., Đorđević, B.V., Lević, M.S., Nedović, A.V., Bugarski, M.B. (2012): Elektrostatička ekstruzija kao disperziona tehnika za inkapsulaciju ćelija i biološki aktivnih supstanci. *Hemijska industrija* 66: 505-517.

Koupantsis, T., Pavlidou, E., Paraskevopoulou, A. (2014): Flavour encapsulation in milk proteins -CMC coacervate-type complexes. *Food Hydrocolloids* 37: 134-142.

Krogars, K., Antikainen, O., Heinämäkia, J., Laitinena, N., Yliruusia, J. (2002): Tablet film-coating with amylose-rich maize starch. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 17: 23-30.

Kumaresh S.S., Anandrao R.K., Aminabhavi M.T. (2001): Chemically modified polyacrylamide-g-guar gum-based crosslinked anionic microgels as pH-sensitive drug delivery. *Journal of Controlled Release* 75: 331-345.

Lakkis, J. (2007): *Encapsulation and Controlled Release in Bakery Applications, Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*. Blackwell Publishing, Arnes.

Lalou, S., Mantzouridou, F., Paraskevopoulou, A., Bugarski, B., Levic, S., Nedovic, V. (2013): Bioflavour production from orange peel hydrolysate using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 9397-9407.

Lange, N.A., 1999. *Lange's Handbook of Chemistry*. McGraw-Hill, Inc., New York.

Laurienzo, P., Malinconico, M., Motta, A., Vicinanza, A. (2005): Synthesis and characterization of a novel alginate-poly(ethylene glycol) graft polymer. *Carbohydrate Polymers* 62: 274-282.

Lee, H.C., OH, B.D., Bae, S.W., Kim, M.H.; Lee, J.Y., Song, I.S., 2003. Partial nucleate boiling on the microscale heater maintaining constant wall temperature. *Journal of Nuclear Science and Technology* 40: 768-774.

Lee, Y. K., Bouhadir, H.K., Mooney, J.D. (2002): Evaluation of chain stiffness of partially oxidized polyguluronate. *Biomacromolecules* 3: 1129-1134.

Lević, S., Rac, V., Manojlović, V., Rakić, V., Bugarski, B., Flock, T., Krzyczmonik, E. K., Nedović, V. (2011): Limonene encapsulation in alginate/poly (vinyl alcohol). *Procedia Food Science* 1: 1816-1820.

Levic, S., Djordjevic, V., Rajic, N., Milivojevic, M., Bugarski, B., Nedovic, V. (2013): Entrapment of ethyl vanillin in calcium alginate and calcium alginate/poly(vinyl alcohol) beads. *Chemical Papers* 67: 221-228.

Li, Y., Zhang, X., Zhenga, J., Wang, X. (2008): 3-Ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde. *Acta Crystallographica Section E*: E64.

Li, L., Hsieh, Y.L. (2006): Chitosan bicomponent nanofibers and nanoporous fibers. *Carbohydrate Research* 341: 374-381.

Li, X., Kanjwal, M.A., Lin, L., Chronakis, S.I. (2013): Electrospun polyvinyl-alcohol nanofibers as oral fast-dissolving delivery system of caffeine and riboflavin. *Colloid Surface B* 103: 182-188.

Liang, S., Liu, L., Huang, Q., Yam, L.K. (2009): Preparation of single or double-network chitosan/poly(vinyl alcohol) gel films through selectively cross-linking method. *Carbohydrate Polymers* 77: 718-724.

Lozinsky, I.V., Galaev, Y.I., Plieva, M.F., Savina, N.I., Jungvid, H., Mattiasson, B. (2003): Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends in Biotechnology* 21: 445-451.

Lv, Y., Yang, F., Li, X., Zhang, X., Abbas, S. (2014): Formation of heat-resistant nanocapsules of jasmine essential oil via gelatin/gum arabic based complex coacervation. *Food Hydrocolloids* 35: 305-314.

Lyn, M.E., Ying, D.Y. 2010: Drying Model for Calcium Alginate Beads. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 49: 1986-1990.

Ma, G., Fang, D., Liu, Y., Zhu, X., Nie, J. (2012): Electrospun sodium alginate/poly(ethylene oxide) core-shell nanofibers scaffolds potential for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers* 87: 737-743.

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S. (2005): Flavour encapsulation and controlled release - a review. *Internacional Journal of Food Science & Technology* 41: 1-21.

Manojlović, V., Donlagić, J., Obradović, B., Nedović, V., Bugarski, B. (2006): Investigations of cell immobilization in alginate: rheological and electrostatic extrusion studies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81: 505-510.

Manojlović, V.B. (2008a): Imobilizacija biološki aktivnih supstanci i ćelija u mikročestičnim i nanočestičnim sistemima, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, Srbija.

Manojlovic, V., Rajic, N., Djonlagic, J., Obradovic, B., Nedovic, V., Bugarski, B. (2008b): Application of Electrostatic Extrusion - Flavour Encapsulation and Controlled Release. *Sensors* 8: 1488-1496.

Manojlović, V., Nedović, V.A., Kailasapathy, K., Zuidam, J.N. (2010): Encapsulation of Probiotics for use in Food Products. In: Zuidam, N.J., Nedovic, V.A (Eds.), *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing*. Springer, Dordrecht, pp. 269-301.

Mansur, S.H., Sadahira, M.C., Souza, N.A., Mansur, A.P.A. (2008): FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Materials Science and Engineering C* 28: 539-548.

Marcuzzo, E., Sensidoni, A., Debeaufort, F., Voilley, A. (2010): Encapsulation of aroma compounds in biopolymeric emulsion based edible films to control flavour release. *Carbohydrate Polymers* 80: 984-988.

Milanovic, J., Manojlovic, V., Levic, S., Rajic, N., Nedovic, V., Bugarski, B. (2010): Microencapsulation of Flavors in Carnauba Wax. *Sensors* 10: 901-912.

Milanovic, J., Levic, S., Manojlovic, V., Nedovic, V., Bugarski, B. (2011a): Carnauba wax microparticles produced by melt dispersion technique. *Chemical Papers* 65: 213-220.

Milanović, J. (2011b). Optimizacija postupka imobilizacije nekih aromatičnih jedinjenja. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, Srbija.

Modafferi, V., Panzera, G., Donato, A., Antonucci, P.L., Cannilla, C., Donato, N., Spadaro, D., Neri, G. (2012): Highly sensitive ammonia resistive sensor based on electrospun V₂O₅ fibers, *Sensors & Actuators B* 163: 61-68.

Mohamad Ibrahim, M. N., Sipaut, C. S., Mohamad Yusof, N. N. (2009): Purification of vanillin by a molecular imprinting polymer technique. *Separation and Purification Technology* 66: 450-456.

Mollá, S., Compañ, V., Gimenez, E., Blazquez, A., Urdanpilleta, I. (2011): Novel ultrathin composite membranes of Nafion/PVA for PEMFCs. *International Journal of Hydrogen Energy* 36: 9886-9895.

Nakaizumi, A., Baba, M., Uehara, H., Iishi, H., Tatsuta, M. (1997): d-Limonene inhibits N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine induced hamster pancreatic carcinogenesis. *Cancer Letters* 117: 99-103.

Nedović, V. (1999): Imobilisani ćelijski sistemi u fermentaciji piva. *Zadužbina Andrejević, Beograd*.

Nedović, V. A., Obradović, B., Leskošek-Čukalović, I., Trifunović, O., Pešić, R., Bugarski, B. (2001): Electrostatic generation of alginate microbeads loaded with brewing yeast. *Process Biochemistry* 37: 17-22.

Nedović, V.A., Obradović, B., Poncelet, D., Goosen, M.F.A., Leskošek-Čukalović, I., Bugarski, B. (2002): Cell immobilisation by electrostatic droplet generation. *Landbauforschung Volkenrode SH 241*: 11-17.

Nedovic, V., Manojlovic, V., Pruesse, U., Bugarski, B., Djonlagic, J., Vorlop, K.D. (2006): Optimization of the electrostatic droplet generation process for controlled microbead production – single nozzle system. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly (CI&CEQ)* 12: 53-57.

Nelson, G. (2002): Application of microencapsulation in textiles. *International Journal of Pharmaceutics* 242: 55-62.

Nikolić, S., Mojović, Lj., Rakin, M., Pejin, D. (2009): Bioethanol production from corn meal by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Fuel* 88: 1602-1607.

Nunes, P.A.M., Vila-Real, H., Fernandes, C.B. P., Ribeiro, H.L.M. (2010): Immobilization of Naringinase in PVA–Alginate Matrix Using an Innovative Technique. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160: 2129-2147.

Nussinovitch, A. (2003): *Water-Soluble Polymer Application in Food*. Blackwell Science Ltd, Oxford.

Özyazıcı, M., Gökçe, H.E., Ertan, G. (2006): Release and diffusional modeling of metronidazole lipid matrices. *European Journal of Pharma European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 63: 331-339.

Pajić-Lijaković, I., Plavšić, M., Bugarski, B., Nedović, V. (2007): Ca-alginate hydrogel mechanical transformations-The influence on yeast cell growth dynamics. *Journal of Biotechnology* 129: 446-452.

Parikh, A., Madamwar, D. (2006): Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. *Bioresource Technology* 97: 1822-1827.

Park, H.C., Lee, J. (2009): Electrosprayed polymer particles: Effect of the solvent properties. *Journal of Applied Polymer Science* 114: 430-437.

Park, K., Yeo, Y. (2006): Microencapsulation Technology. In: Swarbrick, J. (Ed.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Third Edition, Volume 1. Informa Healthcare, New York, pp. 2315-2327.

Parris, N., Cooke, H.P., Hicks, B.K. (2005): Encapsulation of Essential Oils in Zein Nanospherical Particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4788-4792.

Pasparakis, G., Bouropoulos, N. (2006): Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads. *International Journal of Pharmaceutics* 323: 34-42.

Passerini, N., Perissutti, B., Albertini, B., Voinovich, D., Moneghini, M., Lorenzo Rodriguez, L. (2003): Controlled release of verapamil hydrochloride from waxy microparticles prepared by spray congealing. *Journal of Controlled Release* 88: 263-275.

Passerini, N., Albertini, B., Perissutti, B., Rodriguez, L. (2006): Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel. *International Journal of Pharmaceutics* 318: 92-102.

Peniche, C., Howland, I., Corriolo, O., Zaldívar, C., Argüelles-Monal, W. (2004): Formation and stability of shark liver oil loaded chitosan/calcium alginate capsules. *Food Hydrocolloids* 18: 865–871.

Perry, J.H. (1950): *Chemical Engineer's Handbook*, 4th ed. McGraw-Hill, Inc., New York.

Pillay, V., Sibanda, W., Danckwerts, P.M. (2005): Sequential design of a novel PVA-based crosslinked ethylenic homopolymer for extended drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 301: 89-101.

Podlubny, I. (1999): *Fractional Differential Equations*, Mathematics in Science and Engineering. Academic Press Inc., San Diego.

Poncelet, D., Babak, V., Neufeld, R.J., Goosen, M., Bugarski, B. (1999): Theory of electrostatic dispersion of polymer solution in the production of microgel beds containing biocatalyst. *Advances in Colloid Interface Science* 79: 213-228.

Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za arome za namirnice. (2006): Službeni list SCG, br. 17/2006, Beograd.

Prüsse, U., Bilancetti, L., Bučko, M., Bugarski, B., Bukowski, J., Gemeiner, P., Lewinska, D., Manojlovic, V., Massart, B., Nastruzzi, C., Nedovic, V., Poncelet, D., Siebenhaar, S., Tobler, L. Azzurra Tosi, Alica Vikartovská, Klaus-Dieter Vorlop (2008): Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chemical Papers* 62: 364-374.

Qin, X., Wu, D. (2012): Effect of different solvents on poly(caprolactone) (PCL) electrospun nonwoven membranes. *Journal Thermal Analysis and Calorimetry* 107: 1007-1013.

Radulović, Z., Mirković, N., Bogović-Matijašič, B., Petrušić, M., Petrović, T., Manojlović, V., Nedović, V. (2012): Quantification of viable spray-dried potential probiotic lactobacilli using real-time PCR. *Archives of Biological Sciences* 64: 1465-1472.

Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, E.W., Lim, C.T., Ma, Z. (2005): *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. World Scientific Publishing, Singapore.

Regert, M., Langlois, J., Colinart, S. (2005): Characterisation of Wax Works of Art by Gas Chromatographic Procedures. *Journal of chromatography A* 1091: 124-136.

Reneker, H.D., Chun, I. (1996): Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology* 7: 216-223.

Ribeiro, C.C., Barrias, C.C., Barbosa, M.A. (2004): Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices. *Biomaterials* 25: 4363-4373.

Ricciardi, R., Auriemma, F., Gaillet, C., De Rosa, C., Lauprêtre, F. (2004): Investigation of the crystallinity of freeze/thaw poly (vinyl alcohol) hydrogels by different techniques. *Macromolecules* 37: 9510-9516.

Roczniak, C., Biernacka, T., Skarżyński, M. (1983): Some properties and chemical structure of phenolic resins and their derivatives. *Journal of Applied Polymer Science* 28: 531-542.

Rodriguez, L., Passerini, N., Cavallari, C., Cini, M., Sancin, P., Fini, A. (1999): Description and preliminary evaluation of a new ultrasonic atomizer for spray-congealing processes. *International Journal of Pharmaceutics* 183: 133-143.

Sahraoui, N., Abert Vian, M., El Maataoui, M., Boutekedjiret, C., Chemat, F. (2011): Valorization of citrus by-products using Microwave Steam Distillation (MSD). *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12: 163-170.

Sanchez, V., Baeza, R., Galmarini, V.M., Zamora, C.M., Chirife, J. (2013): Freeze-Drying Encapsulation of Red Wine Polyphenols in an Amorphous Matrix of Maltodextrin. *Food and Bioprocess Technology* 6: 1350-1354.

Savolainen, M., Jenny, H., Khoo, C., Löqvist, K., Dahlvist, C., Glad, H., Juppo, A.M. (2003): Evaluation of polar lipid-hydrophilic polymer microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 262: 47-62.

Saxena, S.K. (2004): Polyvinyl Alcohol (PVA), Chemical and Technical Assessment (CTA), 61st JECFA, FAO.

Singh, B., Sharma, D.K., Gupta, A. (2009): A study towards release dynamics of thiram fungicide from starch-alginate beads to control environmental and health hazards. *Journal of Hazardous Materials* 161: 208-216.

Singh, R., Poddar, S.S., Chivate, A. (2007): Sintering of Wax for Controlling Release From Pellets, *AAPS PharmSciTech*. 8: Article 74, E175-E183.

Soottitantawat, A., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., Linko, P. (2003): Microencapsulation by spray-drying: Influence of emulsion size on the retention of volatile compounds. *Journal of Food Science* 68: 2256-2262.

Soottitantawat, A., Bigeard, F., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., Linko, P. (2005): Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated D-limonene by spray drying. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6: 107-114.

Sosa-Herrera, M.G., Lozano-Esquivel, I.E., Ponce de León-Ramírez, Y.R., Martínez-Padilla, L.P. (2012): Effect of added calcium chloride on the physicochemical and rheological properties of aqueous mixtures of sodium caseinate/sodium alginate and respective oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids* 29: 175-184.

Spectral Database for Organic Compounds, AIST (SDBS). (2013): http://sdbs.riondb.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi.

Suter, A.F. & Co. (1999): Carnauba Wax (FTIR spectra). In: Derrick, R.M., Stulik, D., Landry, M.J. (Eds.), *Infrared Spectroscopy in Conservation Science*. Getty Publications, Los Angeles, pp. 184-185.

Szente, L., Szejtli, J. (2004): Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology* 15: 137-142.

Taepaiboon, P., Rungsardthong, U., Supaphol, P. (2006): Drug-loaded electrospun mats of poly(vinyl alcohol) fibres and their release characteristics of four model drugs. *Nanotechnology* 17: 2317-2329.

Tessema, A.D., Rosen, R., Pedazur, R., Belkin, S., Gun, J., Ekeltchik, I., Lev, O. (2006): Freeze-drying of sol-gel encapsulated recombinant bioluminescent *E. coli* by using lyo-protectants. *Sensors and Actuators B* 113: 768-773.

Thies, C. (2005): Microencapsulation. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, (4 izdanje) 16, pp. 317-327.

Turchiuli, C., Fuchs, M., Bohin, M., Cuvelier, M.E., Ordonnaud, C. Peyrat-Maillard, M.N., Dumoulin, E. (2005): Oil encapsulation by spray drying and fluidised bed agglomeration. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6: 29-35.

Uedo, N., Tatsuta, M., Iishi, H., Baba, M., Sakai, N., Yano, H., Otani, T. (1999): Inhibition by d-limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Letters* 137: 131-136.

Van Soest, J.G.J. (2007): Encapsulation of Fragrances and Flavours: a Way to Control Odour and Aroma in Consumer Products. In: Berger., R.G. (Ed.), *Flavours and Fragrances-Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 439-453.

Vieira, E.F.S., Cestari, A.R., de Santos, E.B., Rezende, C.X. (2006): Measurement of cation binding to immobilized vanillin by isothermal calorimetry. *Journal of Colloid and Interface Science* 298: 74-78.

Wandrey, C., Bartkowiak, A., Harding, E.S. (2010): Materials for Encapsulation. In: Zuidam, N.J., Nedovic, V.A (Eds.), *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing*. Springer, Dordrecht, pp. 31-100.

Wang, X., Zhao, J. (2013): Encapsulation of the Herbicide Picloram by Using Polyelectrolyte Biopolymers as Layer-by-Layer Materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 3789-3796.

Wittlich, P., Capan, E., Schlieker, M., Vorlop, K.D., Jahnzi, U. (2004): Entrapment in Lentikats®. Encapsulation of various biocalalysts - bacteria, fungi, yeast or enzymes into polyvinyl alcohol based hydrogel particles. In: Nedović, V., Willaert, R. (Eds.), *Fundamentals of*

Cell Immobilisation Biotechnology (Focus on Biotechnology). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 53-63.

Woznicki, J.E., Grillo, M.S. (1989): Coatings based on polydextrose for aqueous film coating of pharmaceutical food and confectionary products, Patent. br. 4,802,924.

Xie, J., Lim, K.L., Phua, Y., Hua, J., Wang, C.H. (2006): Electrohydrodynamic atomization for biodegradable polymeric particle production. *Journal of Colloid and Interface Science* 302: 103-112.

Xie, J., Wang, C.H. (2007): Electrospray in the dripping mode for cell microencapsulation. *Journal of Colloid and Interface Science* 312: 247-255.

Yang, C., Guan, Y., Xing, J., Shan, G., Liu, H. (2008): Preparation and Characterization of Monodispers Superparamagnetic Poly(vinyl alcohol) Beads by Reverse Spray Suspension Crosslinking. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 46: 203-210.

Yemiş, G.P., Pagotto, F., Bach, S., Delaquis, P. (2011): Effect of Vanillin, Ethyl Vanillin, and Vanillic Acid on the Growth and Heat Resistance of *Cronobacter Species*. *Journal of Food Protection* 12: 2000-2228.

Yilmaz, G., Jongboom, R.O.J., Feil, H., Hennink, W.E. (2001): Encapsulation of sunflower oil in starch matrices via extrusion: effect of the interfacial properties and processing conditions on the formation of dispersed phase morphologies. *Carbohydrate Polymers* 45: 403-410.

Yoshida, M., Miyashita, H. (2002): Drying behavior of polymer solution containing two volatile solvents. *Chemical Engineering Journal* 86: 193-198.

Yu, D.G., Williams, R.G., Yang, H.J., Wang, X., Yang, M.J., Li, Y.X. (2011): Solid lipid nanoparticles self-assembled from electrosprayed polymer based microparticles. *Journal of Materials Chemistry* 21: 15957-15961.

Yuliani, S., Torley, J.P., D'Arcy, B., Nicholson, T., Bhandari, B. (2006): Extrusion of mixtures of starch and D-limonene encapsulated with b-cyclodextrin: Flavour retention and physical properties. *Food Research International* 39: 318-331.

Yunos, M.Z.B, Rahman, W.A.W.A. (2011): Effect of Glycerol on Performance Rice Straw/Starch Based Polymer. *Journal of Applied Sciences* 11: 2456-2459.

Zaijun, Li., Cui Zhengwei, C., Jian, T. (2006): The Determination of Boron in Food and Seed by Spectrophotometry Using a New Reagent 3,4-dihydroxyazomethine-H. *Food Chemistry* 94: 310-314.

Zapata, B.R., Villa, L.A., Montes de Correa, C., Williams, T.C. (2009): In situ Fourier transform infrared spectroscopic studies of limonene epoxidation over PW-Amberlite. *Applied Catalysis A* 365: 42-47.

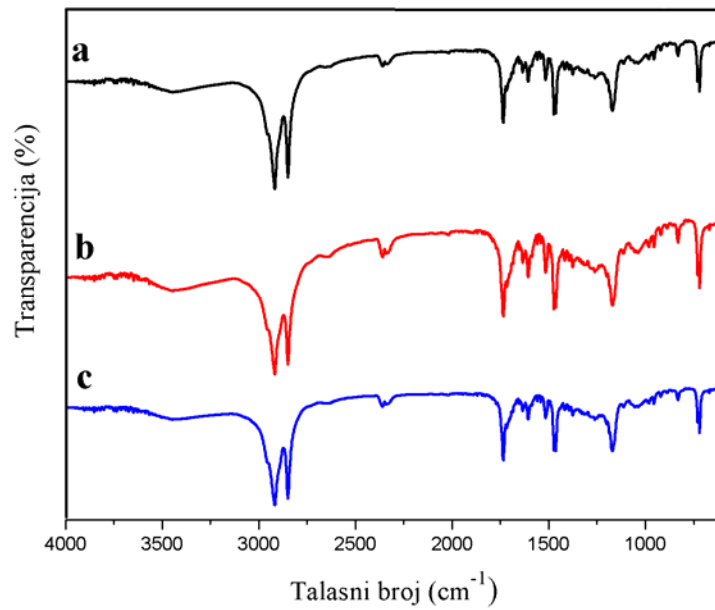
Zhang, C., Yuan, X., Wu, L., Han, Y., Sheng, J. (2005): Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *European Polymer Journal* 41: 423-432.

Zhou, Y., Sun, T., Chan, M., Zhang, J., Han, Z., Wang, X., Toh, Y., Chen, P., Yu, H. (2005): Scalable encapsulation of hepatocytes by electrostatic spraying. *Journal of Biotechnology* 117: 99-109.

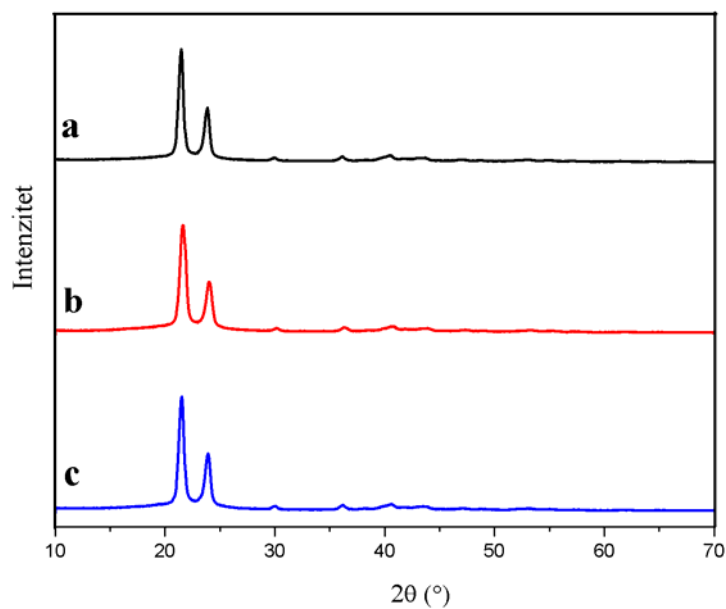
Zuidam, J.N., Heinrich, E. (2010): Encapsulation of Aroma. In: Zuidam, N.J., Nedovic, V.A (Eds.), *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing*. Springer, Dordrecht, pp. 127-160.

Zuidam, N.J. i Shimoni, E. (2010): Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In: Zuidam, N.J., Nedovic, V.A (Eds.), *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing*. Springe, Dordrecht, pp. 3-29.

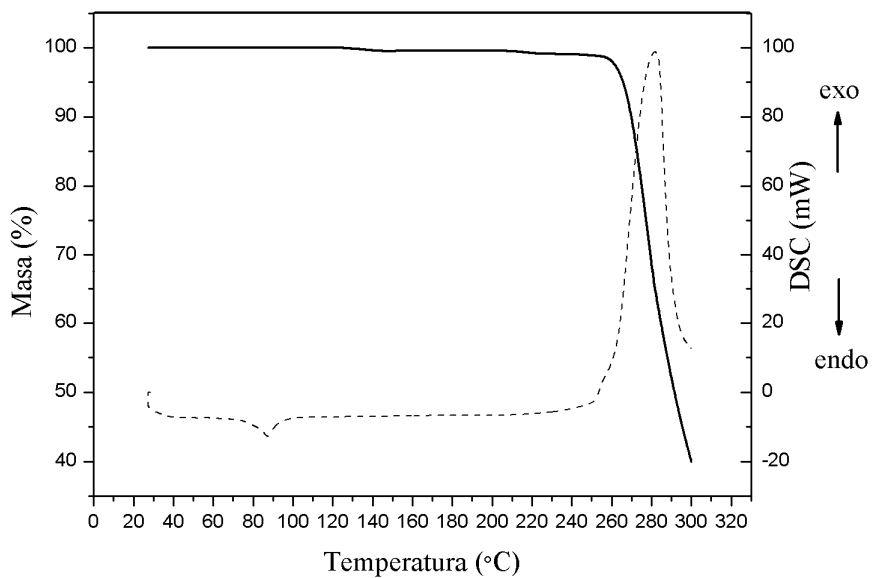
PRILOZI



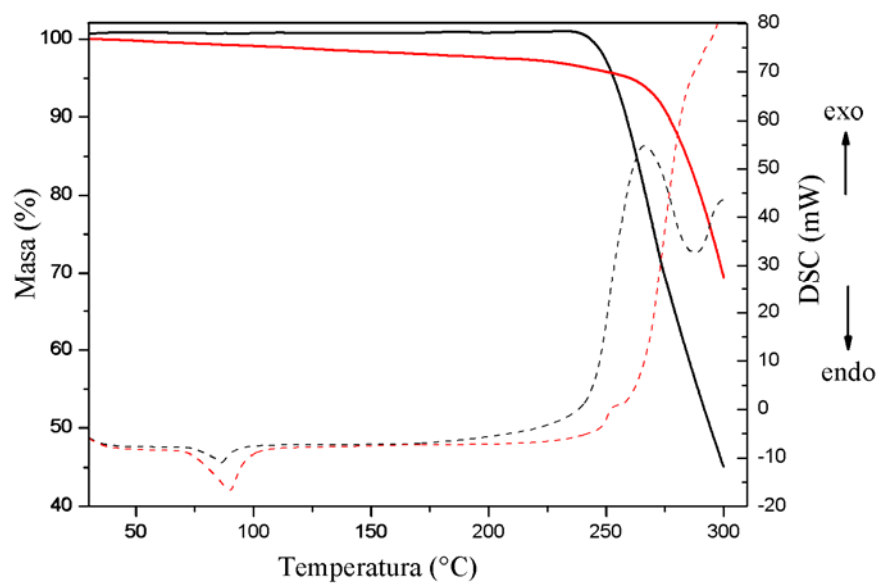
PRILOG 1. FTIR spektri nosača: a) Karnauba vosak; b) Čestice karnauba voska dobijene disperzijom pomoću vazduha (bez inkapsulisane arome); c) Čestice karnauba voska dobijene disperzijom u vodi (bez inkapsulisane arome).



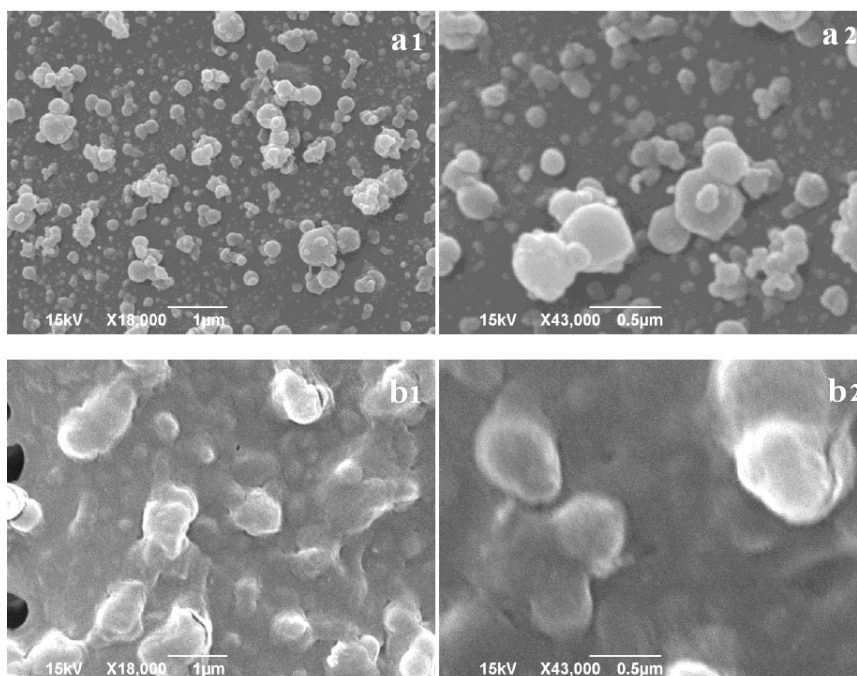
PRILOG 2. Difraktogrami nosača na bazi karnauba voska: a) Karnauba vosak; b) Čestice karnauba voska dobijene disperzijom pomoću vazduha (bez inkapsulisane arome); c) Čestice karnauba voska dobijene disperzijom u vodi (bez inkapsulisane arome).



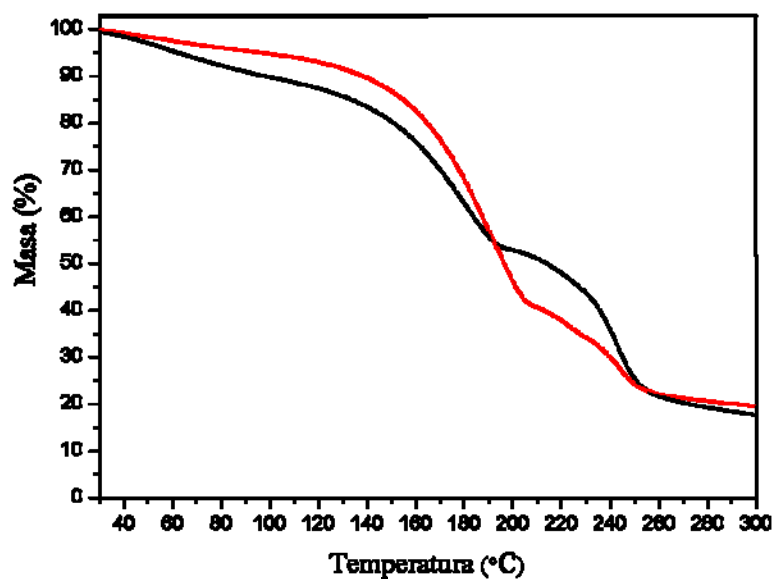
PRILOG 3. TGA (crna puna linija) i DSC (crna isprekidana linija) krive karnauba voska.



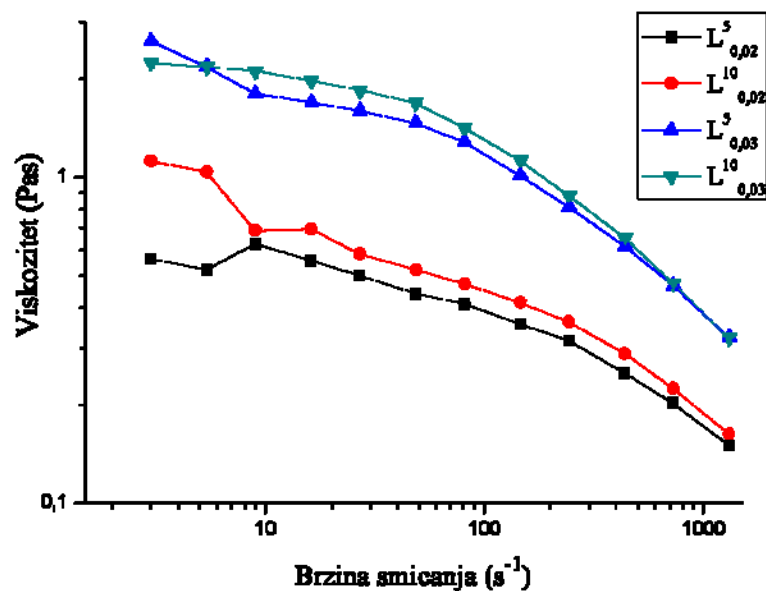
PRILOG 4. TGA (pune linije) i DSC (isprekidane linije) krive praznih čestica karnauba voska: čestice dobijene disperzijom u vodi (crne linije); čestice dobijene disperzijom vazduhom (crvene linije).



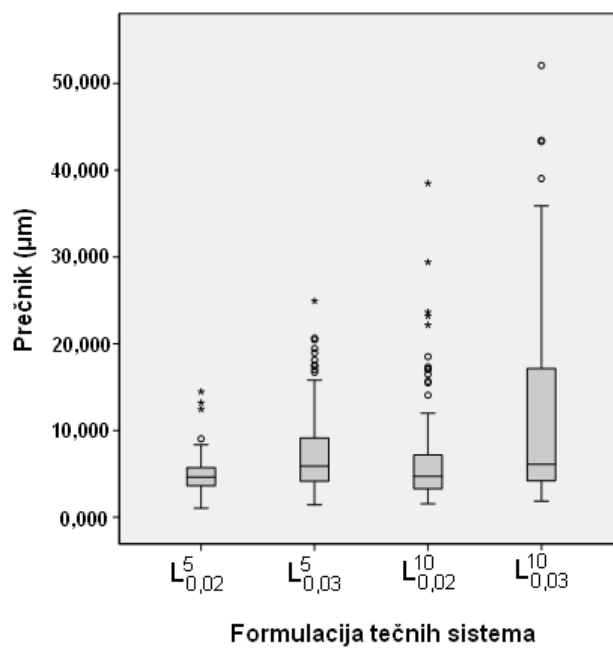
PRILOG 5. SEM slike uzoraka inkapsulisanog etil vanilina u alginatu dobijenih metodom elektrostatičke ekstruzije-elektrosprej: uzorci S₅ (a), S₆ (b). 1 i 2 pokazuju niže i više uvećanje pri SEM analizi.



PRILOG 6. TGA krive inkapsulisanog etil vanilina (metoda elektrostatička ekstruzija-elektrosprej (redukovani protok od 0,3ml/h): S₅ (crna puna linija); S₆ (crvena puna linija).



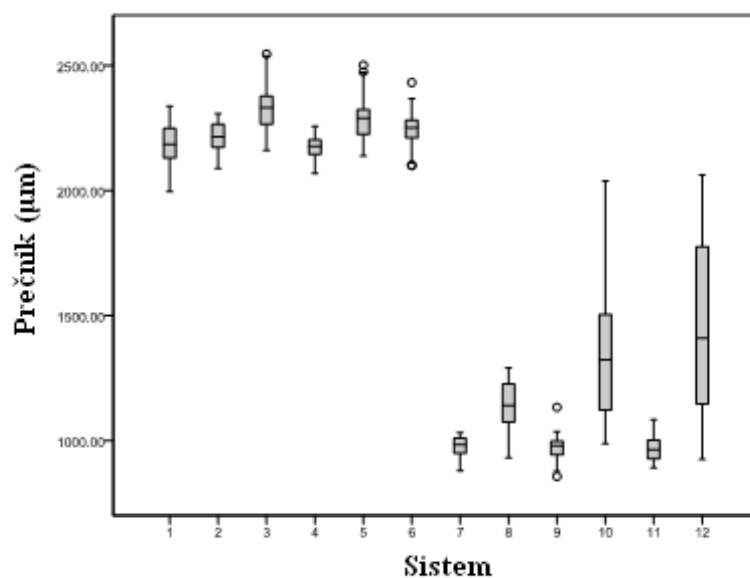
PRILOG 7. Zavisnost viskoziteta emulzija alginat/D-limonen od brzine smicanja.



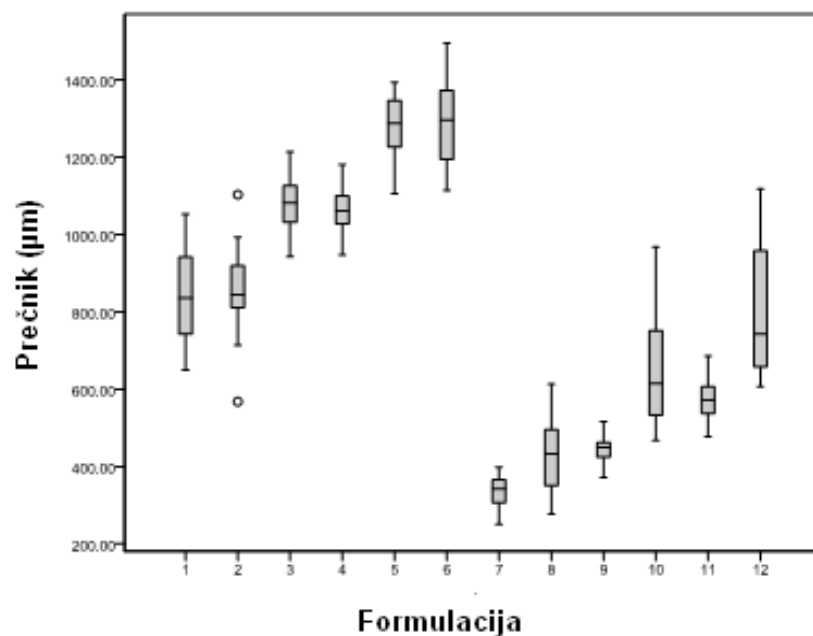
PRILOG 8. Boxplot dijagram prečnika dipergovanih kapi D-limonena u Na-alginatu.

PRILOG 9. Homogeni podskupovi srednjih prečnika kapi dispergovanog D-limonena u Na-alginatu (dobijeni Tukey testom).

Formulacija	N	Podskup za alfa = 0.05		
		1	2	3
$L_{0.02}^5$	97	4,916		
$L_{0.03}^5$	97	6,866	6,866	
$L_{0.02}^{10}$	97		7,502	
$L_{0.03}^{10}$	97			11,706



PRILOG 10. Boxplot dijagram prečnika vlaznih čestica Ca-alginata i Ca-alginata sa inkapsulisanim D-limonenom.



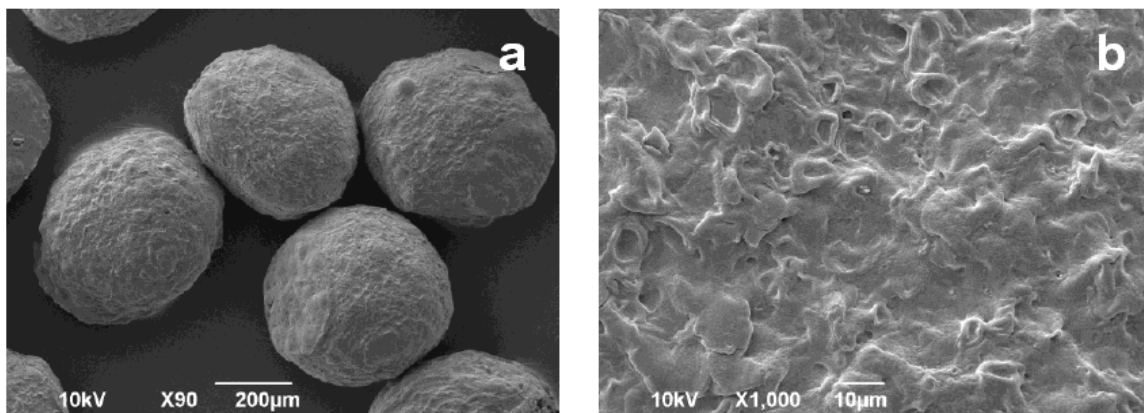
PRILOG 11. Boxplot dijagram prečnika suvih čestica Ca-alginata i Ca-alginata sa inkapsulisanim D-limonenom.

PRILOG 12. Rezultati višefaktorske analize varijanse prečnika čestica Ca-alginata sa inkapsulisanom aromom kokosa. Podebljano su označene referentne vrednosti koje ukazuju na statistički značajan uticaj pojedinih faktora.

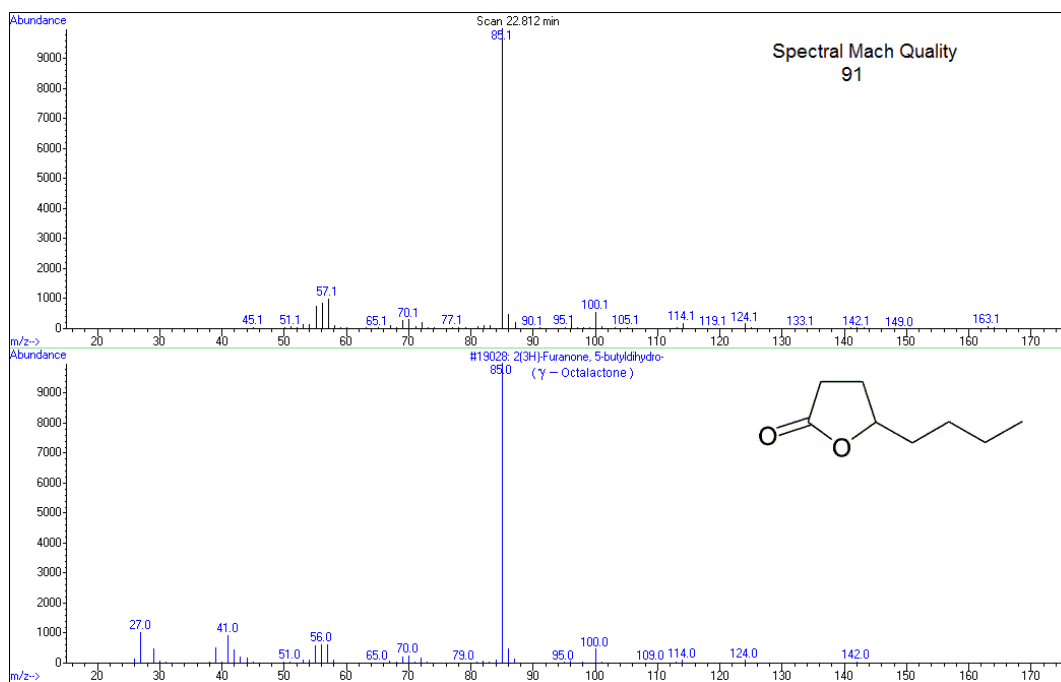
Faktor	F	Sig.
Formulacija	62.933	.000
Sušenje	7506.317	.000
Napon	3758.340	.000
Formulacija- Sušenje	.320	.572
Formulacija - Napon	.044	.833
Sušenje -Napon	718.794	.000
Formulacija- Sušenje- Napon	1.513	.219

PRILOG 13. Morfološke karakteristike i inkapsulaciona efikasnost formulacija na bazi Ca-alginatnih čestica dobijenih bez i pod dejstvom elektrostatičkog potencijala. Znak “+” označava primenu elektrostatičkog potencijala za dobijanje date formulacije čestica. Prikazane formulacije obuhvataju prazne Ca-alginatne čestice i čestice sa inkapsulisanim D-limonenom.

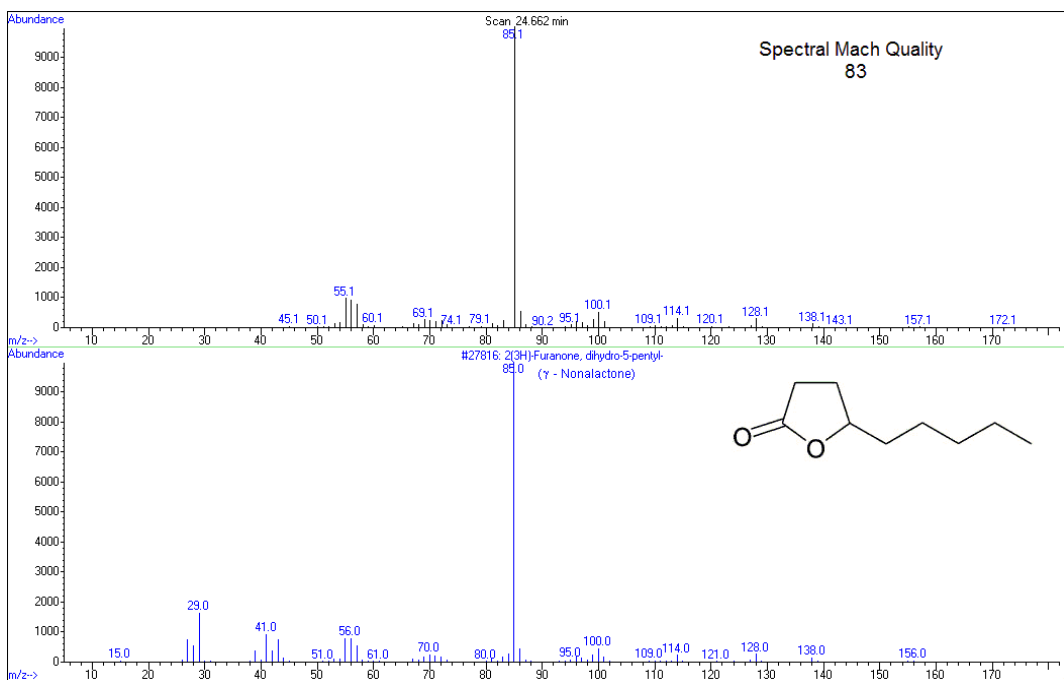
Formulacija	Uzorak	Faktor sfernosti za čestice		Faktor skupljanja (k_{SF} (sušenje))	Inkapsulaciona efikasnost (%)
		vlažne	suve		
1	$VA_{0.02}^0$	0,008	0,10	0,61	-
2	$VA_{0.03}^0$	0,004	0,054	0,61	-
3	$VL_{0.02}^5$	0,023	0,051	0,54	$54,5 \pm 10,7$
4	$VL_{0.03}^5$	0,01	0,032	0,51	$63,4 \pm 4,4$
5	$VL_{0.02}^{10}$	0,012	0,019	0,44	$70,3 \pm 0,7$
6	$VL_{0.03}^{10}$	0,006	0,067	0,43	$68,3 \pm 5,6$
7	$VA_{+0.02}^0$	0,01	0,07	0,66	-
8	$VA_{+0.03}^0$	0,003	0,188	0,62	-
9	$VL_{+0.02}^5$	0,016	0,048	0,54	$60,6 \pm 5,5$
10	$VL_{+0.03}^5$	0,16	0,165	0,51	$52,7 \pm 3,0$
11	$VL_{+0.02}^{10}$	0,016	0,055	0,41	$77,3 \pm 3,7$
12	$VL_{+0.03}^{10}$	0,21	0,183	0,44	$67,1 \pm 4,8$



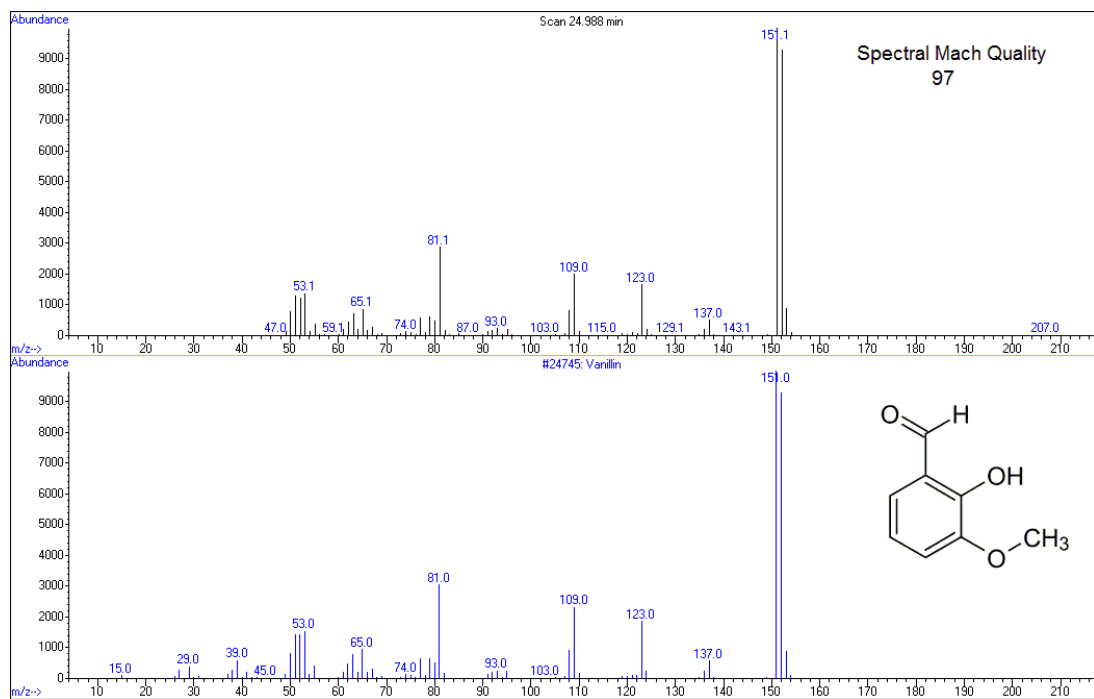
PRILOG 14. SEM slike: a) Ca-alginatne čestice (sa inkapsulisanim D-limonenom, $L_{0,02}^5$), nisko uvećanje; b) Ca-alginatne čestice (sa inkapsulisanim D-limonenom, $L_{0,02}^5$), visoko uvećanje.



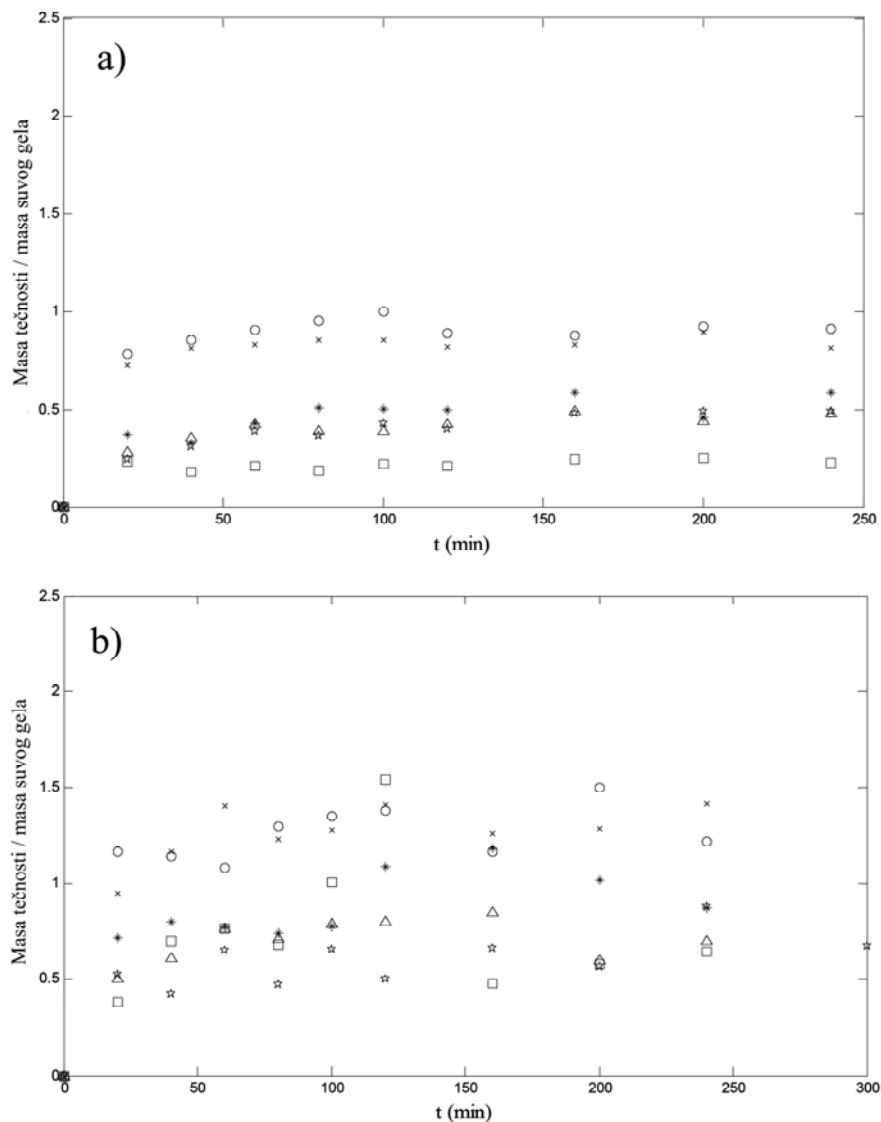
PRILOG 15. Maseni spektar γ -oktalaktona: komponenta pod oznakom 1 u hromatogramu slobodne arome kokosa (iznad), i spektar sa najboljim poklapanjem iz NIST-ove spektralne baze (ispod).



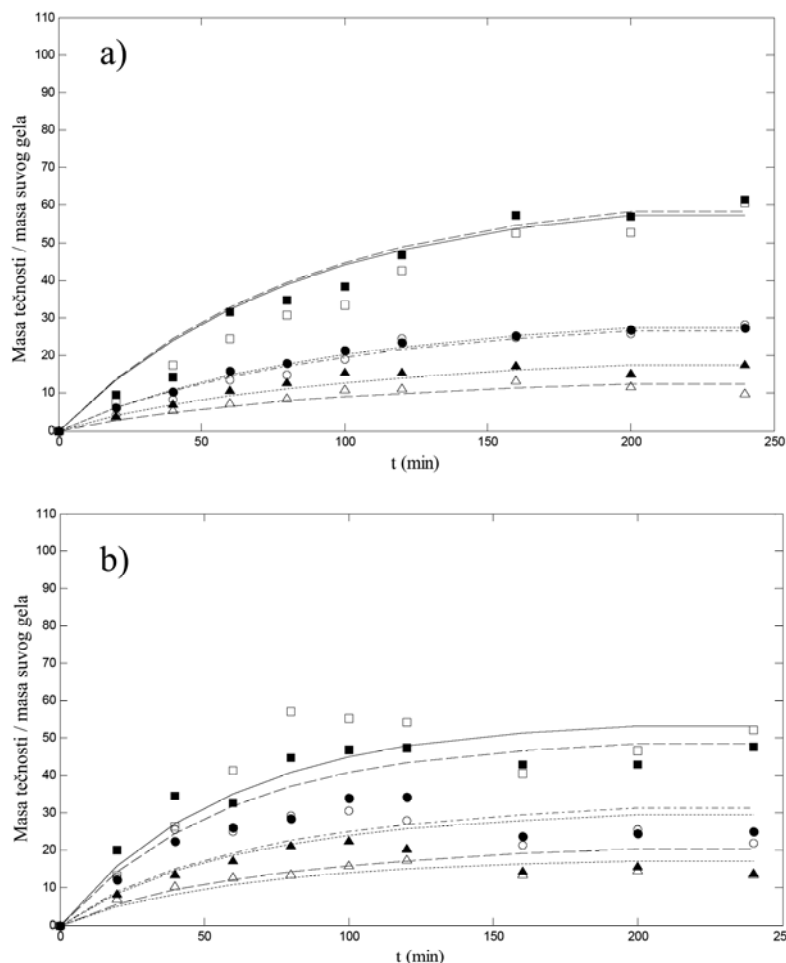
PRILOG 16. Maseni spektar γ -nonalaktona: komponenta pod oznakom 2 u hromatogramu slobodne arome kokosa (iznad), i spektar sa najboljim poklapanjem iz NIST-ove spektralne baze (ispod).



PRILOG 17. Maseni spektar vanilina: komponenta pod oznakom 3 u hromatogramu slobodne arome kokosa (iznad), i spektar sa najboljim poklapanjem iz NIST-ove spektralne baze (ispod).



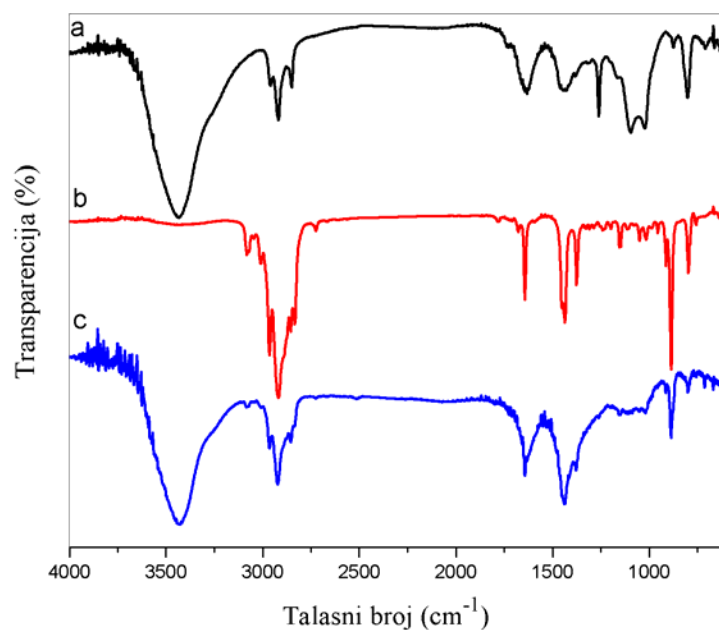
PRILOG 18. a) Reverzibilno bubrenje (u vodi): 0.02 g/mL Ca-alginata (x-prazne čestice; Δ-čestice sa 5%w/w D-limonena; □- čestice sa 10%w/w D-limonena) i 0.03 g/mL Ca-alginata (○-prazne čestice; * - čestice sa 5%w/w D-limonena; ☆- čestice sa 10%w/w D-limonena). a) čestice dobijene bez primene elektrostatičke ekstruzije; b) čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom.



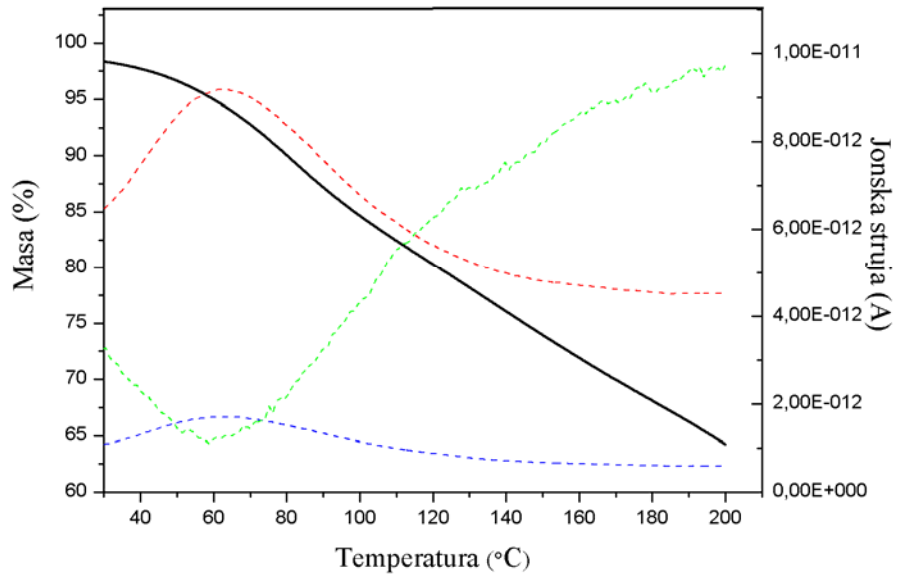
PRILOG 19. Kinetika bubrenja u fosfatnom puferu: a) 0.02 g/mL Ca-alginata sa odgovarajućim modelom (dato kao linije) : □-prazne čestice (puna linija), ○-čestice sa 5w/w D-limonena (tačkasta linija), Δ-čestice sa 10%w/w D-limonena (isprekidana linija sa kraćim i dužim crticama i tačkicama). Čestice od 0.03g/ml Ca-alginata: ■-prazne čestice (isprekidana linija), ●- čestice sa 5w/w D-limonena (isprekidana tačkasta linija), ▲-Čestice sa 10%w/w D-limonena (kratka isprekidana linija sa tačkicama). b) 0.02 g/ml Ca-alginata sa odgovarajućim modelom (dato kao linije) : □-prazne čestice (puna linija), ○-Česticesa 5w/w D-limonena (tačkasta linija), Δ-čestice sa 10%w/w D-limonena (isprekidana linija sa kraćim i dužim crticama i tačkicama). Čestice od 0.03g/ml Ca-alginata: ■-prazne čestice (isprekidana linija), ●- čestice sa 5w/w D-limonena (isprekidana tačkasta linija), ▲-čestice sa 10%w/w D-limonena (kratka isprekidana linija sa tačkicama). a) čestice dobijene bez primene elektrostatičke ekstruzije; b) čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom.

PRILOG 20. Parametri modela za ireverzibilno bubrenje praznih čestica Ca-alginata i čestica sa inkapsulisanim D-limonenom.

Formulacija	Uzorak	k (min^{-1})	β (-)
1	$A_{0.02}^0$	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	1
2	$A_{0.03}^0$	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	1
3	$L_{0.02}^5$	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	0.95 ± 0.01
4	$L_{0.03}^5$	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	0.94 ± 0.01
5	$L_{0.02}^{10}$	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	0.92 ± 0.01
6	$L_{0.03}^{10}$	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	0.91 ± 0.01
7	$A_{0.02}^0$	$(1.7 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	1
8	$A_{0.03}^0$	$(1.7 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	1
9	$L_{0.02}^5$	$(1.7 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	0.95 ± 0.02
10	$L_{0.03}^5$	$(1.7 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	0.92 ± 0.02
11	$L_{0.02}^{10}$	$(1.7 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	0.93 ± 0.02
12	$L_{0.03}^{10}$	$(1.7 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	0.90 ± 0.02



PRILOG 21. FTIR spektari: a) prazne Ca-alginatne čestice; b) slobodni (neinkapsulisani) D-limonen; c) Ca-alginatne čestice sa inkapsulisanim D-limonenom ($L_{0.02}^{10}$).



PRILOG 22. TGA/MS krive: Inkapsulisani D-limonen u Ca-alginatnim česticama ($L_{0,02}^{10}$)-TGA (puna crna linija); Jonska struja: (m/z)=68 (isprekidana zelena linija), (m/z)=18 (isprekidana crvena linija), (m/z)=17 (isprekidana plava linija).

BIOGRAFIJA AUTORA

Steva M. Lević je rođen 08.01.1981. godine u Aleksandrovcu, Republika Srbija. Diplomirao je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2005. godine sa opštim uspehom 8,78 (osam sedamdeset osam) u toku studija i ocenom 10 (deset) na diplomskom ispitu.

Doktorske akademske studije na istom fakultetu upisao je 2007. godine, smer Prehrambena tehnologija. Zaposlen je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu na radno mesto asistenta. Učesnik je na dva domaća i više internacionalnih projekata.

Autor je i koautor pet naučnih radova objavljenih u uglednim inostranim časopisima i preko 15 naučnih radova u međunarodnim i domaćim časopisima sa recenzijom i u zbornicima radova sa međunarodnih i domaćih skupova.

Član je Udruženja prehrambenih tehnologa Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Steva Lević

Број индекса или пријаве докторске дисертације 07/39

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

"Inkapsulacija aroma u karnauba vosku, alginatu i polivinil alkoholu"

- резултат сопственог истраживачког рада.
- да предложена докторска дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 23.05.2014.

Steva Lević

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације

Име и презиме аутора Steva Lević

Број индекса или пријаве докторске дисертације 07/39

Студијски програм Prehrambena tehnologija

Наслов докторске дисертације "Inkapsulacija aroma u karnauba vosku, alginatu i polivinil alkoholu"

Ментор Prof. dr Viktor Nedović

Потписани/а Steva Lević

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 23.05.2014.

Steva Lević

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

"Inkapsulacija aroma u karnauba vosku, alginatu i polivinil alkoholu"

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на крају).

У Београду, 23.05.2014.

Потпис докторанда

