

# Mikroinkapsulacija soka aronije: utjecaj sastava omotača na zadržavanje polifenola i hlapljivih komponenata

---

Ćorković, Ina

Doctoral thesis / Disertacija

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:333423>

Rights / Prava: [Attribution-ShareAlike 4.0 International/Imenovanje-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Ina Ćorković**

**MIKROINKAPSULACIJA SOKA ARONIJE: UTJECAJ SASTAVA**  
**OMOTAČA NA ZADRŽAVANJE POLIFENOLA I HLAPLJIVIH**  
**KOMPONENATA**

**DOKTORSKI RAD**

Osijek, srpanj, 2024.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DOKTORSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Doktorski studij Prehrambena tehnologija i nutricionizam

Smjer: Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambene tehnologije

Katedra za tehnologiju voća i povrća

Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

UDK: 544.773.43 : 663.813: 634.74(043.3)

543 : 663.813:634.74(043.3)

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Znanstvena grana:** Inženjerstvo

**Tema rada** je prihvaćena na I. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 31. 10. 2022.

**Mentor:** prof. dr. sc. *Mirela Kopjar*

### MIKROINKAPSULACIJA SOKA ARONIJE: UTJECAJ SASTAVA OMOTAČA NA ZADRŽAVANJE POLIFENOLA I HLAPLJIVIH KOMPONENATA

*Ina Ćorković, 0065038787*

**Sažetak:** Mikroinkapsulacija je proces koji se koristi za povećanje stabilnosti aktivnih spojeva. Obzirom da su polifenoli i hlapljive komponente nestabilne, primjenjuju se različite inkapsulacijske tehnike kako bi se postiglo njihovo očuvanje. Cilj ovog istraživanja bio je pripremiti mikročestice s alginatnim omotačem bez i s dodatkom pululana, pektina, hitozana, kabroksimetil celuloze ili ksantan gume. Sok aronije odabran je kao izvor polifenola i hlapljivih komponenata, a mikročestice su pripremljene pomoću *Encapsulatora B-390*. Ispitivan je utjecaj različitog sastava omotača i vremena kompleksiranja (30 ili 90 minuta) u otopini za geliranje na definirane parametre. Koncentracije ukupnih polifenola, proantocijanidina, antocijanina, antioksidacijska aktivnost i inhibicija enzima određene su spektrofotometrijski. Koncentracije individualnih polifenola određene su HPLC analizom, a hlapljivih spojeva GC-MS analizom. Strukturne promjene utvrđene su FTIR analizom. Dodatak pululana uzrokovao je povećanje koncentracije ukupnih polifenola, dok je u slučaju ostalih nosača utjecaj na polifenole ovisio o količini dodanog biopolimera. Iz dobivenih rezultata zaključeno je da mikroinkapsulacija polifenola i hlapljivih komponenata ovisi o sastavu omotača, a u nekim slučajevima i o vremenu kompleksiranja u otopini za geliranje. Alginatne mikročestice mogu se koristiti kao sastojak funkcionalne hrane. Međutim, važna je pravilna formulacija omotača zbog stvaranja interakcija s polifenolima i hlapljivim komponentama koje utječu na njihovo zadržavanje.

**Ključne riječi:** mikroinkapsulacija, alginat, biopolimeri, polifenoli aronije, hlapljivi spojevi aronije

**Rad sadrži:** 141 stranica  
37 slika  
20 tablica  
0 priloga  
218 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

- |   |               |
|---|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Anita Pichler</i>             | predsjednik   |
| 2. prof. dr. sc. <i>Josip Šimunović</i>           | član          |
| 3. prof. dr. sc. <i>Marko Jukić</i>               | član          |
| 4. prof. dr. sc. <i>Daniela Čačić Kenjeric</i>    | zamjena člana |
| 5. izv. prof. dr. sc. <i>Frane Čačić Kenjeric</i> | zamjena člana |

**Datum obrane:** 29. srpnja 2024.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu te u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

DOCTORAL THESIS

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**Faculty of Food Technology Osijek**  
**Doctoral Study Food Technology and Nutrition**  
**Department of Food Technologies**  
**Subdepartment of Fruits and Vegetables Technology**  
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia  
UDC: 544.773.43 : 663.813: 634.74(043.3)  
543 : 663.813:634.74(043.3)

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Thesis subject** was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. 1 held on 31 October 2022.

**Mentor:** *Mirela Kopjar*, PhD, professor

### MICROENCAPSULATION OF CHOKEBERRY JUICE: EFFECT OF COATING COMPOSITION ON RETENTION OF POLYPHENOLS AND VOLATILES

*Ina Ćorković*, 0065038787

**Summary:** Microencapsulation is a process used to enhance the stability of polyphenols and volatiles. This study aimed to prepare hydrogel beads with alginate coating without and with the addition of pullulan, pectin, chitosan, carboxymethylcellulose or xanthan gum. Chokeberry juice was selected as a source of polyphenols and volatiles and beads were prepared using *Encapsulator B-390*. Effects of different coating compositions and duration of complexation (30 or 90 minutes) with the hardening solution on the defined parameters were investigated. Concentrations of total polyphenols, proanthocyanidins, anthocyanins, antioxidant activity and inhibition of enzymes of beads were determined spectrophotometrically. Individual polyphenols were determined using HPLC analysis, while volatiles were determined using GC-MS analysis. Structural changes were studied using FTIR analysis. The addition of pullulan caused an increase in the concentration of total polyphenols, while in the case of other carriers, the influence on polyphenols depended on the amount of added biopolymer. Results showed that encapsulation of actives depended on the coating composition, and, in some cases, on the time of complexation. Beads may be used as an ingredient in functional foods. However, the proper formulation of coating is important as it interacts with polyphenols and volatiles and influences their retention.

**Key words:** microencapsulation, alginate, biopolymers, chokeberry polyphenols, chokeberry volatiles

**Thesis contains:** 141 pages  
37 figures  
20 tables  
0 supplements  
218 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. <i>Anita Pichler</i> , PhD, prof.                  | chair person |
| 2. <i>Josip Šimunović</i> , PhD, prof.                | member       |
| 3. <i>Marko Jukić</i> , PhD, prof.                    | member       |
| 4. <i>Daniela Čačić Kenjerić</i> , PhD, prof.         | stand-in     |
| 5. <i>Frane Čačić Kenjerić</i> , PhD, associate prof. | stand-in     |



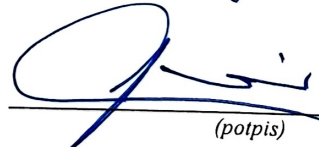
**Defense date:** 29 July 2024

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek; Rector's office, University of Osijek; University Library in Zagreb and in University Library in Osijek

# DOKTORSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA

29. srpnja 2024.

**Pred Povjerenstvom za obranu doktorskog rada:**

- |    |                                       |             |  |
|----|---------------------------------------|-------------|--|
| 1. | <b>prof. dr. sc., Anita Pichler</b>   | predsjednik | <br>_____<br>(potpis) |
| 2. | <b>prof. dr. sc., Josip Šimunović</b> | član        | <br>_____<br>(potpis)  |
| 3. | <b>prof. dr. sc., Marko Jukić</b>     | član        | <br>_____<br>(potpis)  |

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Mireli Kopjar na uloženom trudu i udijeljenim savjetima bez kojih izrada ovog rada ne bi bila moguća. Od srca zahvaljujem svojoj obitelji, prijateljima, Anti i svima ostalima koji su se našli na mom putu tijekom svih godina školovanja i pružili mi svoju podršku i ohrabrenje.*

Ovaj rad financiran je od strane Hrvatske zaklade za znanost unutar projekta IP-2019-04-5749 „Formuliranje, priprema i testiranje biopolimernih gelova kao nositelja bioaktivnih i hlapljivih komponenata u inovativnim funkcionalnim proizvodima“, Razvoj karijera mladih istraživača - Izobrazba novih doktora znanosti (DOK-2020-01-4205).

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	5
2.1. ARONIJA: BOTANIČKA SVOJSTVA I KEMIJSKI SASTAV .....	6
2.2. HLAPLJIVE KOMPONENTE .....	8
2.1.1. Inkapsulacija hlapljivih komponenata .....	10
2.1.2. Sadržaj hlapljivih komponenata u aroniji .....	10
2.3. POLIFENOLI.....	11
2.4. POLIFENOLI ARONIJE .....	12
2.4.1. Flavonoidi prisutni u aroniji .....	18
2.4.2. Proantocijanidni prisutni u aroniji .....	19
2.4.3. Antocijanini prisutni u aroniji.....	19
2.4.4. Fenolne kiseline prisutne u aroniji.....	20
2.5. ZDRAVSTVENI ASPEKTI POLIFENOLA ARONIJE .....	20
2.6. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST POLIFENOLA .....	22
2.7. INHIBICIJA ENZIMA .....	26
2.7.1. Inhibicija $\alpha$ -amilaze .....	26
2.7.2. Inhibicija $\alpha$ -glukozidaze .....	27
2.8. STABILNOST POLIFENOLA.....	29
2.9. MIKROINKAPSULACIJA .....	30
2.9.1. Ionsko geliranje .....	31
2.9.2. Proizvodnja alginatnih mikročestica primjenom uređaja za mikroinkapsulaciju.....	32
2.9.3. Polimeri kao nosači za inkapsulaciju .....	34
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	42
3.1. ZADATAK RADA .....	43
3.2. MATERIJALI .....	46
3.3. METODE.....	47
3.3.1. Priprema alginatnih mikročestica .....	47
3.3.2. Ekstrakcija uzoraka za spektrofotometrijske analize i HPLC analizu .....	48
3.3.3. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola .....	48
3.3.4. Određivanje sadržaja monomernih antocijanina .....	49
3.3.5. Određivanje sadržaja proantocijanidina.....	49
3.3.6. Analiza polifenolnih spojeva HPLC metodom .....	50
3.3.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti .....	51
3.3.8. Inhibicija enzima $\alpha$ -amilaze.....	52



3.3.9. Inhibicija enzima $\alpha$ -glukozidaze.....	53
3.3.10. Analiza hlapljivih komponenata GC-MS metodom.....	54
3.3.11. FTIR-ATR analiza.....	57
3.3.12. Statistička obrada podataka.....	57
4. REZULTATI.....	58
4.1. SOK ARONIJE.....	59
4.2. SADRŽAJ UKUPNIH POLIFENOLA, ANTOCIJANINA I PROANTOCIJANIDINA U ALGINATNIM MIKROČESTICAMA.....	61
4.3. SADRŽAJ INDIVIDUALNIH POLIFENOLA U ALGINATNIM MIKROČESTICAMA.....	63
4.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST I INHIBICIJA ENZIMA $\alpha$ -AMILAZE I $\alpha$ -GLUKOZIDAZE ALGINATNIH MIKROČESTICA.....	65
4.7. SADRŽAJ HLAPLJIVIH KOMPONENATA I AROMATSKI PROFIL ALGINATNIH MIKROČESTICA.....	71
4.8. IR SPEKTRI ALGINATNIH MIKROČESTICA.....	81
5. RASPRAVA.....	84
5.1. SOK ARONIJE.....	85
5.2. SADRŽAJ UKUPNIH POLIFENOLA, ANTOCIJANINA I PROANTOCIJANIDINA U ALGINATNIM MIKROČESTICAMA.....	87
5.3. SADRŽAJ INDIVIDUALNIH POLIFENOLA U ALGINATNIM MIKROČESTICAMA.....	95
5.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST ALGINATNIH MIKROČESTICA.....	101
5.5. INHIBICIJA ENZIMA $\alpha$ -AMILAZE i $\alpha$ -GLUKOZIDAZE ALGINATNIH MIKROČESTICA.....	106
5.6. SADRŽAJ HLAPLJIVIH KOMPONENATA I AROMATSKI PROFIL ALGINATNIH MIKROČESTICA.....	109
5.7. IR SPEKTRI ALGINATNIH MIKROČESTICA.....	115
6. ZAKLJUČCI.....	118
7. LITERATURA.....	122
8. ŽIVOTOPIS.....	140

## Popis oznaka, kratica i simbola

ABTS	2, 2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (eng. <i>2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt</i> )
ANOVA	analiza varijanci (eng. <i>analysis of variance</i> )
CMC	karboksimetil celuloza
CUPRAC	kapacitet antioksidacijske redukcije bakra eng. ( <i>cupric-reducing antioxidant capacity</i> )
DMAC	4-(dimetilamino)-cinamaldehyd (eng. <i>4-(dimethylamino)-cinnamaldehyde</i> )
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (eng. <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> )
DVB/CAR/PDMS	divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (eng. <i>Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxan</i> )
EFSA	Europska agencija za sigurnost hrane (eng. <i>The European Food Safety Authority</i> )
FRAP	antioksidacijska moć redukcije feri-iona (eng. <i>ferric-reducing/antioxidant power assay</i> )
FTIR-ATR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom-tehnika prigušene totalne refleksije (eng. <i>Fourier transform infrared spectroscopy – attenuated total reflectance</i> )
GC-MS	plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (eng. <i>gas chromatography-mass spectrometry</i> )
GRAS	općenito priznati kao sigurni (eng. <i>Generally Recognized As Safe</i> )
HAT	prijenosa atoma vodika (eng. <i>hydrogen atom transfer</i> )
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (eng. <i>high-performance liquid chromatography with diode-array detection</i> )
IC <sub>50</sub>	koncentracija inhibitora koja uzrokuje 50 %-tnu inhibiciju
IR	infracrveno (eng. <i>infrared</i> )
LDL	lipoprotein niske gustoće (eng. <i>low-density lipoprotein</i> )
log P	logaritam koeficijenta oktanol voda koji pokazuje relativnu hidrofobnost komponente
LSD	Fisher-ov test najmanje značajne razlike (eng. <i>least significant difference</i> )
MW	molekulska masa
pNPG	p-nitrofenil- $\alpha$ -glukopiranozid
PTFE	politetrafluoretilen (eng. <i>polytetrafluoroethylene</i> )
RI	retencijski indeks
ROS	reaktivne vrste kisika (eng. <i>reactive oxygen species</i> )
RT	retencijsko vrijeme
SARS-CoV-2	teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2 (eng. <i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i> )
SET	prijenos elektrona (eng. <i>electron transfer</i> )
SPME	mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. <i>solid-phase microextraction</i> )
TE	ekvivalent troloxa
TPTZ	2,4,6-tris (2-piridil)-s-triazin (eng. <i>2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine</i> )
VP	tlak pare

## **1. UVOD**

Aronija (*Aronia melanocarpa*) je biljka porijeklom iz Sjeverne Amerike poznata kao bogat izvor polifenola koji su sekundarni metaboliti prisutni u raznom voću i povrću. Najzastupljeniji polifenoli soka aronije su kondenzirani tanini, antocijanini, flavonoli i fenolne kiseline (Jurikova i sur., 2017). Ovi spojevi posjeduju antioksidacijska, antibakterijska, antimutagena i protuupalna svojstva, a imaju i sposobnost inhibicije probavnih enzima,  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze, čime kontroliraju razgradnju škroba, smanjuju hiperglikemiju i reguliraju razinu glukoze u krvi (Sun i Miao, 2020). Zahvaljujući svojoj molekularnoj strukturi, polifenoli mogu stvarati interakcije s polisaharidima i proteinima, ali zbog njihove nestabilnosti, niske topljivosti i neugodnog okusa ograničena je njihova široka primjena u razvoju novih, funkcionalnih proizvoda (Feng i sur., 2020). Pri višim temperaturama koje se obično primjenjuju u prehrambenoj industriji dolazi do degradacije polifenola i smanjenja sposobnosti hvatanja slobodnih radikala. Očuvanje polifenola od okolišnih uvjeta može se postići procesom mikroinkapsulacije, odnosno njihovom ugradnjom u mikročestice (Díaz-Bandera i sur., 2013). Na senzorska svojstva plodova aronije utječu i različiti hlapljivi spojevi koji su također nestabilni (Zafeiropoulou i sur., 2012). Voće se često prerađuje u džemove, kaše, žele i sirupe kako bi kroz proizvode bilo dostupno kroz cijelu godinu (Sidor i Gramza-Michałowska 2019). Samom preradom voća smanjuje se njegova nutritivna vrijednost razgradnjom nestabilnih komponenti u prisustvu svjetlosti, kisika i povišene temperature (Atencio i sur., 2020; Mohammadalinejad i Kurek, 2021). Danas se koriste različite inkapsulacijske tehnike (liofilizacija, sušenje raspršivanjem, molekularna inkluzija, koacervacija) kako bi se postiglo očuvanje polifenolnih i hlapljivih komponenata. Razvoj biopolimernih mikročestica pripremljenih pomoću alginata i drugih biopolimera procesom mikroinkapsulacije jedan je od načina kojim se mogu očuvati bioaktivne komponente (Perez i Geonkar, 2015). Mikroinkapsulacija je proces koji svoju primjenu nalazi u različitim granama prehrambene, kozmetičke i farmaceutske industrije (Jantrawut i sur., 2013). Primjenom ovog procesa moguće je poboljšati stabilnost aktivne tvari i omogućiti njezino kontrolirano otpuštanje (Atencio i sur., 2020; Mohammadalinejad i Kurek, 2021). Obzirom da mikročestice mogu sačuvati bioaktivne komponente, ugrađuju se u sastav prehrambenih proizvoda i tako povećavaju njihovu nutritivnu vrijednost. Prema definiciji, inkapsulacija je proces u kojem je aktivna tvar fizički obavijena zaštitnim materijalom koji se naziva omotač i tako štiti osjetljive komponente od neželjenih djelovanja (Frakolaki i sur., 2020). Omotači koji se obično koriste u procesu mikroinkapsulacije uključuju različite biopolimere koji imaju sposobnost formiranja mikročestica ionskim geliranjem. Ionsko geliranje je svojstvo

geliranja polisaharida u vodenim otopinama u prisutnosti dvo- i trovalentnih iona (Usmiati i sur., 2014). Među uobičajeno korištenim biopolimerima, natrijev alginat ističe se svojim biorazgradivim i biokompatibilnim svojstvima (Aldawsari i sur., 2021). Premda ima široku primjenu u pripremi mikročestica, postoje i negativne karakteristike alginata koje mogu uzrokovati nekontrolirano oslobađanje inkapsuliranih komponenata. Poboljšanje ovih negativnih svojstava može se postići kombiniranjem alginata s drugim biopolimerima (Atencio i sur., 2020). Jedan od komercijalno dostupnih mikroinkapsulatora za pripremu mikročestica je BÜCHI Encapsulator B-390 (Labortechnik AG, Flawil, Švicarska). U ovom uređaju se smjesa koja se sastoji od aktivne tvari otopljene u otopini polimera pumpa tlakom i nakon stvaranja laminarnog toka, ovaj uređaj ga razbija pomoću vibracije i mikročestice padaju u otopinu za geliranje (Nemethova i sur., 2014). Karakteristike pripremljenih mikročestica ovise o promjeru mlaznice, protoku laminarnog strujanja, frekvenciji i viskoznosti istisnute tekućine (Whelehan i Marison, 2011).

Prehrambene navike potrošača mijenjaju se u skladu s rastom svijesti o važnosti zdrave prehrane. Kako bi odgovorila na navedene izazove, prehrambena industrija razvija nove, funkcionalne proizvode. Jedan od načina postizanja navedenih ciljeva je i primjena mikroinkapsulacije. Kako bi se postigla što učinkovitija mikroinkapsulacija, potrebno je pravilno formulirati omotač jer njegove interakcije s polifenolima i hlapljivim komponentama utječu na zadržavanje ovih vrijednih spojeva. Nakon pripreme, mikročestice mogu se koristiti kao sastojak funkcionalne hrane jer su komponente koje se koriste za njihovu proizvodnju nutritivno bogate i sigurne za konzumaciju (Corrêa-Filho i sur., 2019).

Ovo istraživanje upotpunjuje dosadašnja saznanja vezana za inkapsulaciju različitih bioaktivnih komponenti (Capablanca i sur., 2017; Savic Gajic i sur., 2021; Olivares i sur., 2017). Ujedno doprinosi proširenju znanja vezana uz utjecaj sastava omotača na inkapsulaciju polifenola i hlapljivih komponenata soka aronije. U dosadašnjim istraživanjima uz alginat kao biopolimer najčešće se koristio hitozan koji se koristio i u ovom istraživanju, ali su se koristili i drugi biopolimeri koji imaju primjenu u prehrambenoj industriji poput pululana, pektina, karboksimetil celuloze i ksantan gume. Različite količine biopolimera koristile su se za pripremu alginatnih mikročestica kako bi se ispitaio utjecaj njihove količine na mikroinkapsulaciju polifenola i hlapljivih spojeva soka aronije. Osim toga, dokazano je kako na zadržavanje bioaktivnih komponenti u alginatnim mikročesticama utječe i vrijeme kompleksiranja u otopini za geliranje (Zam i sur., 2014). Stoga je u ovom istraživanju ispitan i utjecaj različitog vremena kompleksiranja

na zadržavanje polifenola i hlapljivih komponenata. U pripremljenim alginatnim mikročesticama određen je sadržaj polifenola i hlapljivih komponenata, antioksidacijska aktivnost, mogućnost inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze te strukturne promjene primjenom FTIR analize.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. ARONIJA: BOTANIČKA SVOJSTVA I KEMIJSKI SASTAV

Aronija je biljka koja potječe iz istočnih dijelova Sjeverne Amerike i pripada porodici *Rosaceae*. Iz roda *Aronia* razlikujemo sljedeće vrste: *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot koja je poznatija kao crna aronija, *Aronia arbutifolia* (L.) Pers. koja se naziva još i crvena aronija te *Aronia prunifolia* koja je hibrid ovih dvaju vrsta i naziva se još i ljubičasta aronija. Aronija se uzgaja u blažim klimatskim uvjetima, ali i na temperaturama ispod  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  zbog svoje otpornosti na hladnoću. Grm aronije raste do maksimalne visine 2 – 3 m, a njezini bijeli cvjetovi sazrijevaju u crne bobice promjera 6 – 13 mm i težine 0,5 – 2 g (Jurendić i Ščetar, 2021). Plodovi aronije prikazani su na **Slici 1**. Crnoj aroniji potrebno je srednje bogato humusno tlo, a pH bi trebao biti u rasponu 6 – 6,5. Veći prinos može se postići odgovarajućom opskrbom mineralnim gnojivima (Gurčić i sur., 2023). Čimbenici kao što su sorta, gnojidba, sazrijevanje, klimatski uvjeti ili datum berbe uzrokuju razlike u sadržaju minerala, vitamina, ugljikohidrata, aminokiselina, organskih kiselina, masti, hlapljivih tvari i polifenola aronije (Jurendić i Ščetar, 2021). Opor, kiselkast, gorak i neugodan okus i miris gorkog badema svježeg ploda aronije ograničavaju njegovu primjenu (Zhang i sur., 2021). Zbog toga se svježi plodovi aronije rijetko konzumiraju i većinom se prerađuju u sokove, džemove, marmelade, žele, sirupe, vina i likere (Trenka i sur., 2020). Sok aronije često se kombinira s ostalim voćnim sokovima kao što su jabuka, kruška ili crni ribiz (Zhang i sur., 2021). Zbog visokog sadržaja antocijanina, aronija se često koristi kao prirodno bojilo (Kapci i sur., 2013).



**Slika 1** Zreli plod aronije (<https://www.ures.hr/vrtne-biljke/aronia-aronia-melanocarpa>)



Američki domorodci koristili su aroniju za ublažavanje simptoma prehlade, kašlja i groznice (Zhang i sur., 2021). Poznato je da unos bobičastog voća ima niz pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje i zbog toga je aronija u posljednje vrijeme jedno od najviše konzumiranog bobičastog voća. Brojna istraživanja bave se kemijskim sastavom i biološkom aktivnosti ovog voća (Gurčik i sur., 2023). Osim konzumacije svježih plodova bobičastog voća, sve je veći trend dodavanja ekstrakata bobičastog voća kao sastojaka funkcionalne hrane koji se mogu kombinirati s drugim voćem, povrćem ili biljnim ekstraktima (Tolić i sur., 2015).

Najčešće korišteni kultivari su „Viking“ (Finska), „Nero“ (Češka Republika), i „Aron“ (Danska) te se koriste za masovnu proizvodnju aronije. Njezin uzgoj temelji se na razmnožavanju reznicama ili sjemenom i provodi se bez utjecaja štetnika ili problema s pticama, vjerojatno kao posljedica kiselog okusa bobica. Alkalno gnojivo (N, K i Si) pozitivno utječe na veličinu i čvrstoću ploda, dok je dopuna mikroelementima korisna jer povećava sadržaj antocijanina u sjemenkama aronije. Pucanje bobica, kao rezultat unosa prekomjerne količine vode tijekom uzgoja treba izbjegavati jer uzrokuje smanjenje razine antocijanina i tamnjenje plodova. S obzirom na težinu bobica i sadržaj antocijanina, važno je odrediti optimalno vrijeme za berbu. Duljim uzgojem dolazi do oksidacije antocijanina i nepoželjnog posmeđivanja plodova, kao i do sušenja na višim temperaturama (Kokotkiewicz i sur., 2010). Kemijski sastav različitih kultivara aronije prikazan je u **Tablici 1**.

**Tablica 1** Kemijski sastav ploda aronije prema kultivaru (Ochmian i sur., 2012)

Svojstvo	„Nero“	„Viking“
Suha tvar (%)	15,70	15,30
Topljiva suha tvar (°Brix)	14,40	14,20
Kiselost (g limunske kiseline/100 g)	0,85	0,80
Ukupni šećeri (g/100 g)	10,25	9,16
Reducirajući šećeri (g/100 g)	9,88	8,83
Ukupni polifenoli (mg galne kiseline/100 g)	1950	1845

U usporedbi s drugim bobičastim voćem, plod i sok aronije sadrže veće koncentracije sorbitola i polifenola, ali manje koncentracije organskih kiselina (Kulling i Rawel, 2009). Koncentracija proteina u plodu aronije vrlo je niska i iznosi oko 3,7 g/100 g ploda, dok su od aminokiselina prisutni arginin, tirozin, histidin, lizin, cistein, alanin, asparagin, serin, glutaminska kiselina i treonin. Sadržaj lipida u plodu aronije iznosi 0,09 – 0,17 %, a najveće koncentracije lipida određene su u sjemenki i koži ploda. Šećeri i prehrambena vlakna su ugljikohidrati prisutni u plodu aronije.

Više od 60 % prehrambenih vlakana ploda aronije sastoji se od netopljivih vlakana kao što su lignin, celuloza i hemiceluloza. Plod aronije sadrži i makroelemente (K, Ca, P, Mg i Na) kao i esencijalne elemente u tragovima (Zn, Fe, Se, Cu, Mo, Cr) (Sidor i Gramza-Michałowska, 2019). Kemijski sastav soka aronije prikazan je u **Tablici 2**.

**Tablica 2** Kemijski sastav soka aronije

<b>Kemijski sastav</b>	<b>Sok aronije</b>
Topljiva suha tvar (°Brix)	20,10±0,28*
Šećeri/šećerni alkohol (g/L)	
Fruktoza	40,56±0,25*
Glukoza	42,86±0,31*
Saharoza	1,65±0,27*
Sorbitol	77,30±0,02*
Organske kiseline (g/L)	
Limunska kiselina	2,55±0,09*
Jabučna kiselina	13,33±0,79*
Oksalna kiselina	0,79±0,02*
Vinska kiselina	5,20±0,13*
Prehrambena vlakna (g/100 g)	0,3**
Karotenoidi (µg/L)	97,8**
Vitamin C (g/L)	29**
Vitamin B1 (µg/L)	600***
Vitamin B3 (µg/L)	550***
Vitamin B5 (µg/L)	3400***
Vitamin B6 (µg/L)	2200***
Minerali (mg/kg)	
Na	19,6 – 56,3**
K	848 – 3204**
Ca	138 – 1225**
Mg	209 – 589**
P	167 – 1037**
Zn	0,89 – 3,45**
Fe	7,2 – 25,2**
Ukupni polifenoli (g/kg)	6,6±0,1****

\*Sosnowska i sur. (2016); \*\*Sidor i Gramza-Michałowska (2019); \*\*\*Kulling i Rawel (2009);

\*\*\*\* Kapci i sur. (2013)

## 2.2. HLAPLJIVE KOMPONENTE

Molekule odgovorne za aromu prehrambenih proizvoda su ugljikovodici, alkoholi, ketoni, aldehidi, kiseline i/ili esteri. Njihova molekulska masa kreće se između 100 i 250 g/mol (Taheri i sur., 2019). Većina hlapljivih komponenata ima poželjan miris i stoga se često koriste u

prehrambenoj i kemijskoj industriji (npr. industriji pića, pekarstvu, kozmetici i parfemima) (Gao i sur., 2020).

Kvalitetu hrane i njezinu prihvatljivost na tržištu određuju njezina organoleptička svojstva. Nakon što se oslobode iz matriksa hrane, hlapljivi spojevi detektirani su okusnim i olfaktornim receptorima (Zafeiropoulou i sur., 2012). Hlapljive komponente prelaze iz hrane u paru fazu sve do olfaktornog epitela. Komponente su u parnoj fazi prisutne u koncentraciji koja ovisi o koeficijentu raspodjele između dvije faze (para/matriks). Koeficijenti raspodjele izmjereni u različitim matriksima za istu hlapljivu komponentu daju indicaciju njihovog zadržavanja u matriksu hrane (Philippe i sur., 2003).

Prehrambeni proizvodi obično nisu homogeni sustavi i na zadržavanje arome često utječu ugljikohidrati, bjelančevine, masti i druge komponente prisutne u matriksu hrane (Zafeiropoulou i sur., 2012). Interakcije između komponenata matriksa i hlapljivih komponenata utječu na njihovo oslobađanje i tako se mijenja percepcija ukupne aroma prehrambenog proizvoda (Jeleń i sur., 2016). Na brzinu i dužinu oslobađanja arome utječu kompleksnost matriksa, temperatura, jačina ionskih veza i pH. Smanjenje prijenosa mase kroz matriks i povećanje zadržavanja spojeva arome uzrokovano je želiranjem, povećanjem viskoznosti ili drugim promjenama pa je difuzivnost hlapljivih spojeva obrnuto proporcionalna viskoznosti matriksa (Lopes da Silva i sur., 2002).

Hlapljivi spojevi jedni su od pokazatelja dozrijevanja voća. Mnogi od njih prisutni su u tragovima i ne mogu se detektirati analitičkim instrumentima, ali se mogu detektirati ljudskim njuhom. Hlapljive tvari mogu se klasificirati kao primarni ili sekundarni spojevi, ovisno o tome jesu li prisutne u tkivu ploda ili nastaju kao rezultat razgradnje tkiva. Aroma je složeni sustav hlapljivih i nehlapljivih spojeva, čiji je sastav specifičan za vrstu, a često i za sortu voća. Iako različito voće često posjeduje slične aromatske karakteristike, svako voće ima prepoznatljivu aromu koja ovisi o kombinaciji hlapljivih tvari, koncentraciji i pragu osjetljivosti pojedinačnih hlapljivih spojeva (El Hadi i sur., 2013). Za karakterizaciju hlapljivih spojeva vrlo je važan prag osjetljivosti jer koncentracija nije mjerilo aromatične dominantnosti nekog hlapljivog spoja. Neki spojevi prisutni u manjim koncentracijama mogu utjecati više na ukupnu aromu nego spojevi u većim koncentracijama. Prag osjetljivosti hlapljive molekule ovisi o njezinoj kemijskoj strukturi (duljini lanca, stupnju nezasićenosti, položaju dvostrukih veza, funkcionalnim skupinama te o stereokemiji molekula) (Jeleń i sur., 2016). Fizikalno-kemijska svojstva hlapljivih spojeva kao što su topljivost

i viskoznost variraju ovisno o duljini lanca. Spojevi s niskom molekulskom masom često imaju neugodne mirise, koji nestaju kod spojeva veće molekulske mase koji imaju slatke, voćne arome. Također, viskoznost alkohola raste s povećanjem duljine lance (Jeleń i sur., 2016).

### **2.1.1. Inkapsulacija hlapljivih komponenata**

Potrebno je poznavati mehanizam otpuštanja hlapljivih komponenata iz matriksa hrane kada se razvijaju novi proizvodi jer njihove interakcije dovode do promjena u aromatskom profilu (Tromelin i sur., 2010). Ako se dodaju, hidrokoloide utječu na aromu sustava kroz dva glavna mehanizma. Jedan je zbog povećane viskoznosti sustava što uzrokuje smanjenje brzine difuzije u mediju, a drugi je vezanje molekula arome na hidrokoloide prisutne u matriksu (Zafeiropoulou i sur., 2012). Proizvodnja, skladištenje, pakiranje i prisutnost drugih sastojaka u proizvodima uzrokuju promjene u koncentracijama hlapljivih spojeva ili čak njihov gubitak. Budući da su organoleptička svojstva bitan čimbenik koji utječe na prodaju određenog proizvoda i utječe na zadovoljstvo potrošača, hlapljive komponente potrebno je inkapsulirati kako bi se sačuvao njihov izvorni oblik (Astray i sur., 2010).

Zadržavanje hlapljivih komponenata tijekom procesa inkapsulacije ovisi o sljedećim čimbenicima (Saifullah i sur., 2019):

- karakteristikama hlapljivih spojeva: vrsti spojeva (npr. ketoni, esteri, kiseline), polaritetu, veličini, molekulskoj težini, relativnoj hlapljivosti i koncentraciji;
- karakteristikama nosača: vrsti nosača (npr. proteini, masti, polisaharidi), molekulskoj masi, viskoznosti, temperaturi staklastog prijelaza, topljivosti, sposobnosti emulgiranja, sposobnosti stvaranja filma, koncentraciji i biokompatibilnosti;
- metodi pripreme uzorka: metodi emulgiranja, veličini kapljice emulzije, viskoznosti i stabilnosti emulzije;
- primijenjenoj metode inkapsulacije (npr. sušenje raspršivanjem, ekstruzija).

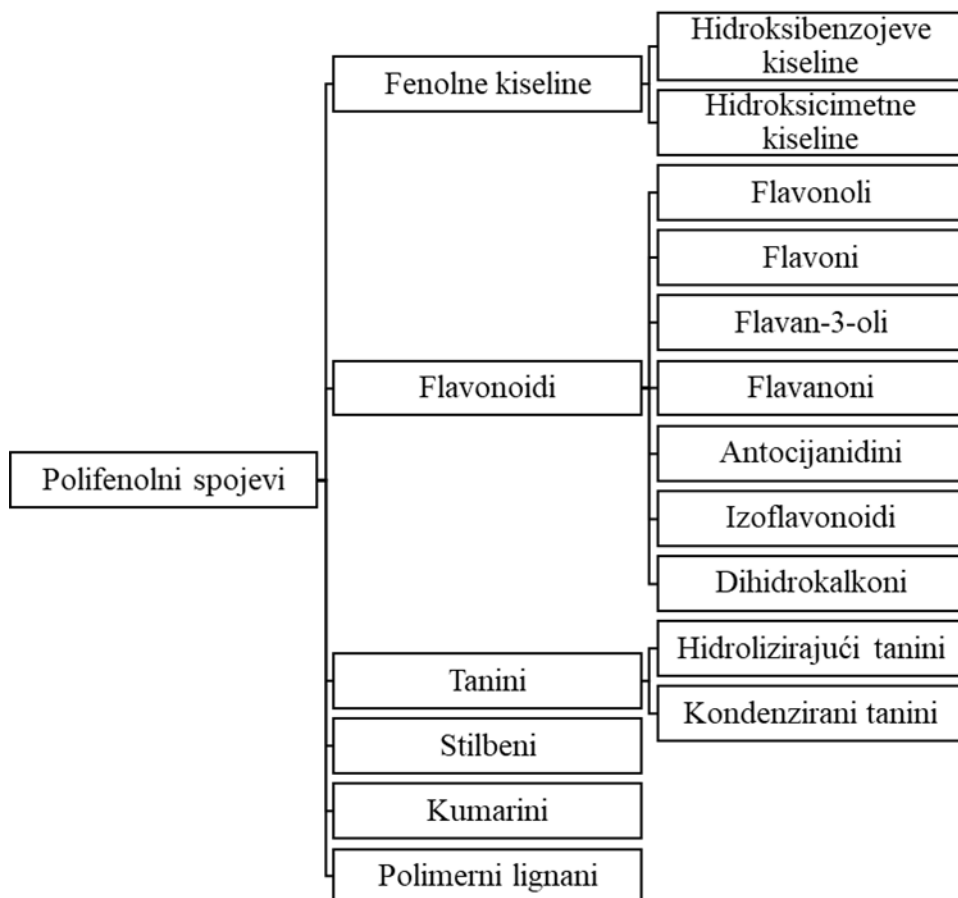
### **2.1.2. Sadržaj hlapljivih komponenata u aroniji**

Amigdalín je cijanogeni glikozid izoliran iz bobičastog voća i odgovoran za nepoželjan miris gorkog badema. Postoje tvrdnje kako amigdalín blagotvorno djeluje na pacijente oboljele od raka, međutim to nije potvrđeno pouzdanim kliničkim podacima (Kulling i Rawel, 2009). Amigdalín dominira uglavnom u sjemenkama aronije, stoga je potrebno eliminirati sjemenke iz komine

tijekom proizvodnje i polifenolnih pripravaka (Jurendić i Ščetar, 2021). Najzastupljeniji hlapljivi spojevi aronije su benzaldehid te niz derivata benzena kao što su benzil alkohol i metil benzoat (Kulling i Rawel, 2009). Prema istraživanju Jurendić i Ščetar (2021) glavni spojevi arome soka pripadaju sljedećim kemijskim skupinama: alkoholi (48,9 %), ketoni (30,3 %), ugljikovodici (0,2 %), kiseline (5,8 %), aldehidi (2,9 %), terpeni (0,6 %), esteri (0,3 %) i drugi (1,3 %). Hirvi i Honkanen (1985) odredili su ukupno 48 spojeva u soku aronije. Najznačajniji bili su benzaldehid, cijanohidrin, cijanovodična kiselina i derivati benzena kao što su benzil alkohol, 2-feniletanol, metilbenzoat, fenilacetaldehid i salicilaldehid. Razlike u sastavu hlapljivih komponenata soka aronije uzrokovane su razlikama u sortama aronije. Klimatski i geografski uvjeti također utječu na razlike u sadržaju hlapljivih komponenata. Rane faze fermentacije koje se odvijaju u voću mogu uzrokovati povećanje koncentracije alkoholnih komponenata (Buturova i sur., 2016).

### **2.3. POLIFENOLI**

Polifenoli su jedna od najzastupljenijih i najprisutnijih skupina spojeva koji se nalaze u prirodnim izvorima hrane, poput voća, povrća, mahunarki, crnom vinu i zelenom čaju. Do sada je poznato više od 8000 polifenolnih spojeva koji su identificirani i karakterizirani u različitim biljnim vrstama (Deng i sur., 2018). Te su molekule sekundarni metaboliti biljaka i sudjeluju u obrani od ultraljubičastog zračenja ili patogena (Bartosz i Irene, 2016). Predmetom su brojnih istraživanja zbog svojstava koja promiču zdravlje (Boath i sur., 2012). Polifenoli su velika skupina spojeva, od jednostavnih i niskomolekularnih molekula, kao što je galna kiselina, do velikih i složenih polimera, kao što su kondenzirani tanini (Rohn i sur., 2002; Di Stefano i sur., 2018). Podijeljeni su u šest glavnih skupina: fenolne kiseline, flavonoidi, tanini, stilbeni, kumarini i lignani. Njihova podjela prikazana je na **Slici 2**.



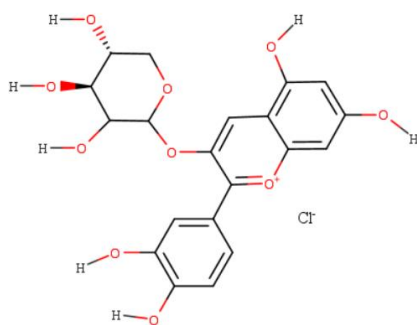
Slika 2 Podjela polifenolnih spojeva (Beconcini i sur., 2020)

## 2.4. POLIFENOLI ARONIJE

Osim vitamina, minerala, šećera, organskih kiselina i prehrambenih vlakana, bobičasto voće također je dobar izvor fitokemikalija kao što su flavonoidi (antocijanini, flavonoli i flavanoli), tanini (proantocijanidini, elagitanini), stilbenoidi (resveratrol), fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline). U istraživanju u kojem je ispitan udio polifenola u 143 različita biljna uzorka, utvrđeno je da je najveći udio ovih spojeva prisutan u aroniji (Ovaskainen i sur., 2008). Za proizvodnju soka, bobičasto voće se cijedi ili grubo melje, zagrijava i na kraju preša. Važan dio fenolnih spojeva tako iz bobičastog voća prelazi u sok, no komina, čvrsti nusproizvod proizvodnje soka, još uvijek je vrlo bogata ovim bioaktivnim spojevima (Mayer-Miebach i sur., 2012). U **Tablici 3** prikazane su kemijske strukture i koncentracije najzastupljenijih polifenola prisutnih u plodu, komini i soku aronije.

**Tablica 3** Koncentracija polifenola u plodu, komini i soku aronije (King i Bolling, 2020)

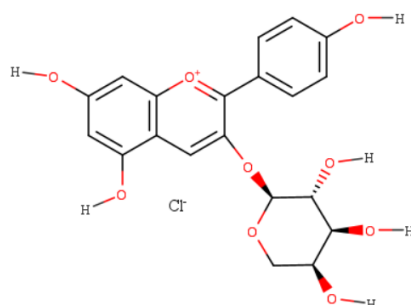
Polifenol	Kemijska struktura	Plod (mg/100 g)	Komina (mg/100 g)	Sok (mg/100 mL)
Antocijanini				
Cijanidin-3-galaktozid		126 – 990	4520 – 9760	87,4 – 94,0
Cijanidin-3-glukozid		0 – 21,5	21 – 225,8	10,2 – 13,5
Cijanidin-3-arabinozid		52 – 392	1840 – 3120	24,5 – 58,6

Cijanidin-3-  
ksilozid

2,7 – 81,2

167 – 275

0,48 – 1,25

Pelargonidin-3-  
arabinozid

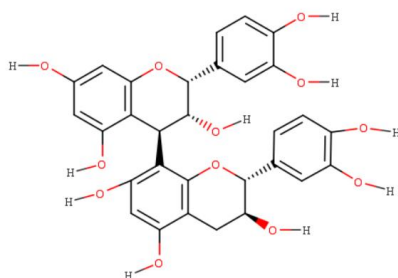
5,04

-

-

## Kondenzirani tanini

Proantocijanidini



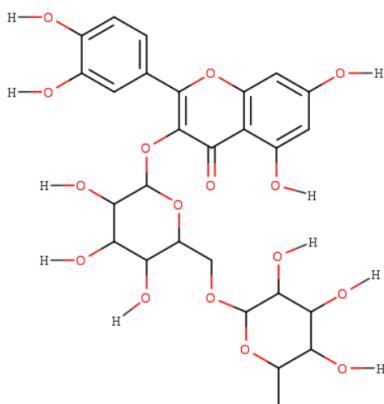
100,69

-

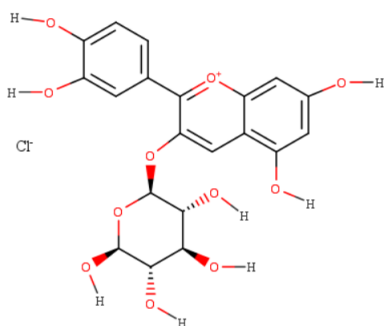
-

## Flavonoli



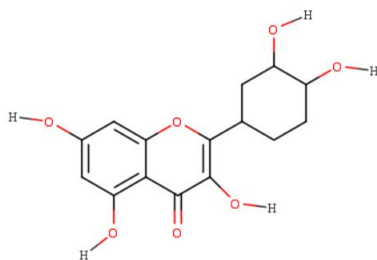
Kvercetin-3-  
rutinozid

3,9 – 61,7    22,7 – 43,7    15,5 – 62,8

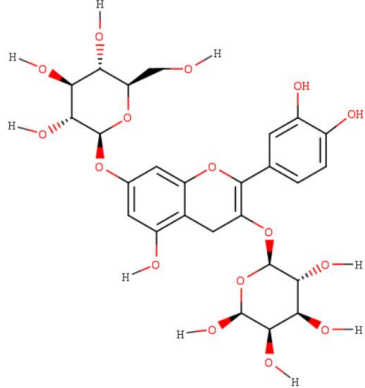
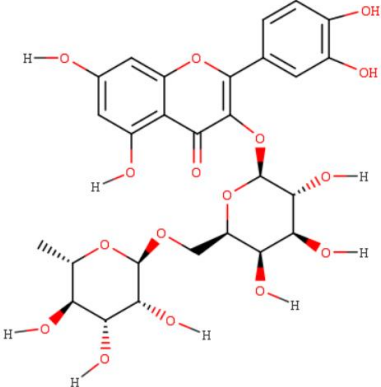
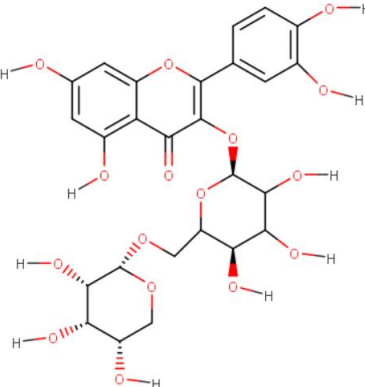
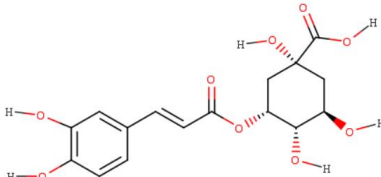
Kvercetin-3-  
glukozyd

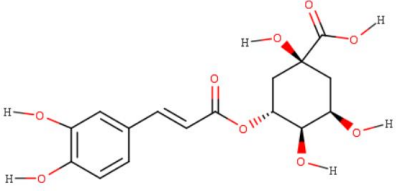
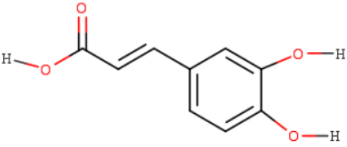
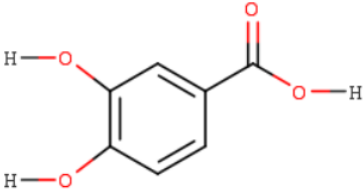
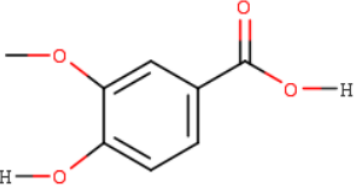
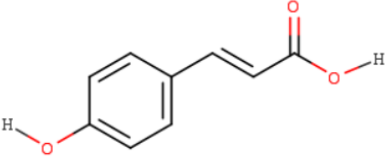
4,4 – 29,2    32,7 – 67,1    11,5 – 36,7

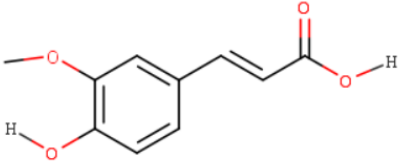
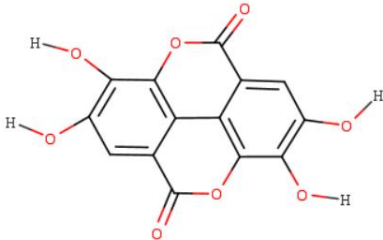
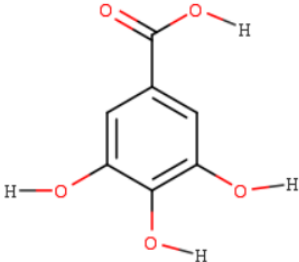
Kvercetin



6,5 – 30,2    -    6,8 – 8,2

Kvercetin-3-galaktozid		6,6 – 30,2	49,0 – 102	-
Kvercetin-3-robinobiozid		1,03 – 11,3	14,9	-
Kvercetin-3-vicianozid		2,6 – 4,3	19,6	-
Fenolne kiseline				
Neoklorogenska kiselina		59 – 186	169	41,6 – 172

Klorogenska kiselina		17 – 188	204	88,6 – 139
Kafeinska kiselina		60 – 75	-	0,12 – 0,18
Protokatehuinska kiselina		0,77	-	2,49 – 5,74
Vanilinska kiselina		0,25 – 0,46	-	-
<i>para</i> -kumarinska kiselina		0,02	-	-

Ferulična kiselina		0,01	-	1,99
Elaginska kiselina		1,57	-	-
Galna kiselina		-	-	0,004 – 0,69

### 2.4.1. Flavonoidi prisutni u aroniji

Prema kemijskoj strukturi, flavonoidi sadrže kromonsku jedinicu čiji kondenzirani sustav se sastoji od dva aromatska prstena. Najčešći flavonoidi su flavonoli poput kvercetina i kemferola te njihovi glikozidi kao što je kvercetin-3-rutinozid (rutin). C-3, C-4 i C-7 pozicije flavonola obično su glikozilirane (Pan i sur., 2016). Povezani šećerni dio je vrlo često glukoza ili ramnoza, ali mogu biti i drugi šećeri (npr. galaktoza, arabinoza i ksiloza) (Bartosz i Irene, 2016). Flavonoli su manje zastupljeni u plodovima aronije u odnosu na proantocijanidine i antocijanine. Flavonolni glikozidi predstavljaju oko 10 % ukupnog sadržaja fenola aronije. U plodu aronije najčešće su prisutna četiri različita flavonola, uglavnom kvercetin-3-galaktozid (hiperozid), kvercetin-3-glukozid (izokvercetin), kvercetin-3-rutinozid (rutin) i kvercetin-3-robinobiozid. U manjim koncentracijama prisutni su kemferol i kvercetin-3-vicianozid (Jurikova i sur., 2017). Flavonoli se nakupljaju u

vanjskim i nadzemnim tkivima (koža i lišće) jer njihovu biosintezu potiče svjetlost (Bartosz i Irene, 2016). Imaju dokazano antioksidacijsko, antimikrobno, antikancerogeno i kardioprotektivno djelovanje (Zhang i sur., 2021). Flavanoli (flavan-3-oli) također su prisutni u bobičastom voću, ali u znatno manjim količinama (Jurikova i sur., 2017).

#### **2.4.2. Proantocijanidni prisutni u aroniji**

Proantocijanidini su oligomerni flavonoidi koji se u prirodi najčešće pojavljuju kao oligomeri katehina i epikatehina (Pan i sur., 2016). Polimerni proantocijanidini, lanci monomera flavan-3-ola, značajna su skupina polifenola u aroniji. Sastoje se uglavnom od (-)-epikatehinskih jedinica koje su uglavnom povezane C4-C6 i C4-C8 vezama (B-tip veze) (Jurikova i sur., 2017). Stupanj polimerizacije proantocijanidina u aroniji kreće se između 2 i 23, dok su za kominu aronije zabilježene vrijednosti polimerizacije preko 30 (Zhang i sur., 2021). Stupanj polimerizacije važan je za njihovu bioraspoloživost budući da se oligomerni proantocijanidini niske molekulske mase apsorbiraju u gastrointestinalnom traktu, ali polimerizacija uvelike smanjuje crijevnu apsorpciju (Jurikova i sur., 2017). Proantocijanidini plodova aronije raspoređeni su 70 % u mesu, 25 % u kožici i 5 % u sjemenkama. Kada se koriste kao sastojci hrane, proantocijanidni povećavaju trpkost (King i Bolling, 2020). U kožici i plodu aronije nalaze se važni dimerni proantocijanidini B2 i B5 i trimerni proantocijanidin C1. Slično sadržaju ukupnih fenola, i sadržaj flavonoida i proantocijanidina u ekstraktima crne aronije veći je u odnosu na ekstrakte drugih bobica poput borovnice, crnog ribiza, kupine, borovnice, crvenog ribiza, maline i jagode (Jurikova i sur., 2017).

#### **2.4.3. Antocijanini prisutni u aroniji**

Antocijanini pripadaju flavonoidnoj skupini polifenola (Tarone i sur., 2020.). Poznati su kao nositelji antioksidacijskog i protuupalnog djelovanja u voću i povrću (Bonerz i sur., 2011). Međutim, njihova ključna funkcija je osiguranje boje biljkama u kojima su prisutni (Kong i sur., 2003). Crveno-ljubičasta boja antocijanina važna je za određivanje kvalitete hrane, ali i za marketinške svrhe jer privlači potrošače (Bonerz i sur., 2011). Antocijanini su glikozidi antocijanidina (aglikonska jedinica). Sastoje se od dva aromatska prstena povezana s tri ugljika u oksigeniranom heterociklu koji se naziva kromanski prsten. Njihova boja ovisi o pH vrijednosti (Tarone i sur., 2020). Pri pH 1 antocijanini su prisutni kao flavilium kationi koji su odgovorni za ljubičastu i crvenu boju biljaka. U pH rasponu od 2 do 4 najčešća je kinoidna forma. Pri pH vrijednostima između 5 i 6 prisutni su kao bezbojna karbinol pseudobaza i kalkon. Porastom pH

iznad 7 antocijanini se razgrađuju (Castaneda-Ovando i sur., 2009). Razlikuju se po broju hidroksilnih skupina kao i po položaju, broju i prirodi vezanih šećera i alifatskih ili aromatskih kiselina. U polarnim otapalima antocijanini su visoko topljivi i snižavanjem pH otopine sprječava se razgradnja neaciliranih antocijanina (Kong i sur., 2003).

Koncentracije antocijanina u aroniji u rasponu su od 0,60 % do 2 %. Cijanidin-3-galaktozid najzastupljenija je komponenta, a pronađeni su još i cijanidin-3-arabinozid, cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-ksilozid (Zhang i sur., 2021). Količine pelargonidin-3-galaktozida i pelargonidin-3-arabinozida detektirane su u tragovima (Jurendić i Ščetar, 2021). Među bobičastim voćem, kao što su crni i crveni ribiz, ogrozd, jagoda, kupina i crvena malina, aronija ima najveću ukupnu koncentraciju antocijana. Sadržaj antocijana ovisi o vrsti aronije; njihov najveći sadržaj potvrđen je u crnoj aroniji, a najmanji u plodovima crvene aronije (Jurikova i sur., 2017).

#### **2.4.4. Fenolne kiseline prisutne u aroniji**

Fenolne kiseline dijele se na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Hidroksibenzojeve kiseline su komponente složenih struktura kao što su hidrolizabilni tanini (galotanini u mangu i elagitanini u crvenom voću kao što su jagode, maline i kupine) (Bartosz i Irene, 2016). Hidroksicimetne kiseline češće su zastupljene nego hidroksibenzojeve kiseline i uglavnom su izgrađene od jedinica kumarinske, kafeinske, ferulične i sinapinske kiseline. Te se kiseline rijetko nalaze u slobodnom obliku, vezani oblici su glikozilirani derivati ili esteri kininske kiseline, šikiminske kiseline i vinske kiseline. Kafeinska i kininska kiselina spajaju se esterskom vezom u klorogensku kiselinu, koja se nalazi u mnogim vrstama voća i visokim koncentracijama u kavi (Bartosz i Irene, 2016). Od fenolnih kiselina u aroniji najzastupljenije su neoklorogenska i klorogenska kiselina, dok su druge kiseline kao što su vanilinska, ferulična, siringinska i galna prisutne u manjim koncentracijama (King i Bolling, 2020).

### **2.5. ZDRAVSTVENI ASPEKTI POLIFENOLA ARONIJE**

Visok udio polifenola odgovoran je za širok raspon potencijalnih medicinskih i terapijskih učinaka aronije (Tolić i sur., 2015). Brojna istraživanja usredotočena su na smanjenje rizika od nezaraznih bolesti kao što su karcinom, dijabetes i kardiovaskularne bolesti. Istraživanja su utvrdila da s obzirom na visoku koncentraciju polifenola u aroniji, njezina konzumacija ima preventivno i terapijsko djelovanje na nezarazne bolesti (Jurikova i sur., 2017; King i Bolling, 2020).

### *Prevenција karcinoma*

Aronija se koristila za liječenje karcinoma dojke, crijeva i leukemije (Zhang i sur., 2021). Dokazano je i kako je katehol dobiven iz soka aronije uzrokovao nestanak karcinoma matičnih stanica i smanjio proizvodnju interleukina-6, proteina koji pospješuje preživljavanje tumorskih stanica (King i Bolling, 2020). Izlaganje tumorskih stanica debelog crijeva polifenolima aronije nakon 24 h uzrokovao je inhibiciju njihovog rasta (Jurendić i sur., 2021). Ekstrakt aronije sprječava migraciju i invaziju SK-Hep1 stanica karcinoma ljudske jetre. Također, ekstrakt aronije uzrokovao je inhibiciju ekspresije proteaza uključenih u metastaziranje (King i Bolling, 2020).

### *Kardiovaskularne bolesti*

Kardiovaskularne bolesti vodeći su uzrok smrti diljem svijeta, a većinom su uzrokovane lošom prehranom, niskom tjelesnom aktivnošću, prekomjernom konzumacijom alkohola i pušenjem. Povišeni krvni tlak, ukupni i LDL kolesterol, pretilost i oksidativni stres povećavaju rizik od nastanka kardiovaskularnih bolesti. Konzumacija 300 mL/dan soka aronije i 3 g/dan praha aronije smanjila je sistolički/dijastolički krvni tlak u odraslih s blago povišenom hipertenzijom. Također, ekstrakt aronije uzrokovao je smanjenje ukupnog i LDL kolesterola kod zdravih bivših pušača. Kod pretilih miševa, konzumacija praha, ekstrakta i soka aronije smanjila je debljanje, poremećaje u metabolizmu lipida i upalne procese (King i Bolling, 2020). Ekstrakt ploda aronije pokazao je i potencijalnu ulogu u prevenciji koronarne bolesti srca, dok je sok aronije pokazao značajno antiagregacijsko djelovanje na ljudske trombocite *in vitro* (Zhang i sur., 2021).

### *Neuroprotekcija*

Dokazano je da je konzumacija aronije smanjila oštećenje pamćenja i motoričkih sposobnosti kod štakora. Osim tog, sok aronije utjecao je i na smanjenje anksioznog ponašanja kod odraslih štakora (King i Bolling, 2020). Ekstrakt aronije mogao bi biti koristan i u liječenju neurodegenerativnih bolesti kao što su demencija, Parkinsonova i Alzheimerova bolest (Jurendić i sur., 2021).

### *Protuupalno djelovanje*

Prethodna istraživanja pokazala su protuupalno djelovanje soka aronije. U modelu miševa, oticanje šapa štakora bilo je izazvano histaminom i smanjeno konzumacijom soka aronije. Zanimljivo je da je sok aronije pokazao veće protuupalno djelovanje od rutina ili kompleksa rutin-magnezij (Zhang i sur., 2021). Dokazano je da ekstrakt aronije može inhibirati upalno stanje endotelnih stanica

ljudske aorte (Jurendić i sur., 2021).

#### *Antibakterijsko i antivirusno djelovanje*

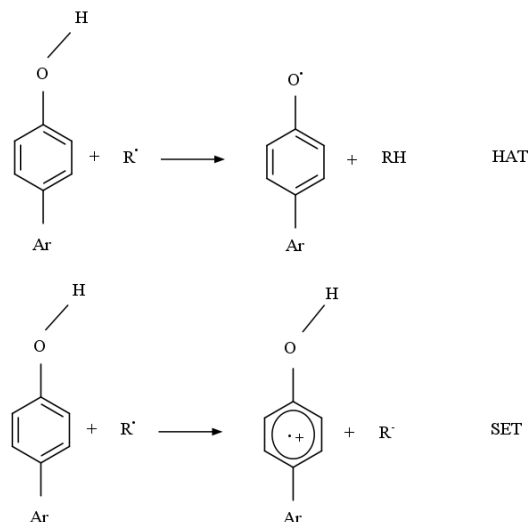
Polifenoli se sintetiziraju u biljkama kao odgovor na mikrobnu infekciju i njihovi ekstrakti imaju učinkovito djelovanje kao antimikrobne tvari. Dokazano je antimikrobno djelovanje ekstrakata aronije *in vitro* protiv mikroorganizama *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* (Jurendić i sur., 2021). Eggers i sur. (2022) dokazali su da sok aronije u *in vitro* uvjetima umanjuje infektivnost virusa SARS-CoV-2 i virusa gripe.

### **2.6. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST POLIFENOLA**

Slobodni radikali vrlo su reaktivne molekule koje nastaju tijekom staničnog disanja i normalnog metabolizma, a reaktivne vrste kisika (ROS) usko su povezane s fiziološkim i patološkim procesima kod životinja. ROS-ovi uglavnom uključuju slobodne radikale superoksidnog aniona ( $O_2^-$ ), hidroksidni anion (-OH), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksilni radikal ( $OH^\cdot$ ), peroksilni radikal ( $ROO^\cdot$ ) i alkoksilni radikal ( $RO^\cdot$ ). Superoksidni anion je kisik s dodatnim elektronom koji može oštetiti mitohondrije i DNK i nastaje tijekom prijenosa elektrona u respiracijskom lancu. Hidroksilni radikal nastaje redukcijom molekule kisika. Taj radikal može oštetiti gotovo bilo koju organsku molekulu u svojoj blizini (ugljikohidrate, lipide, proteine i DNK). Vodikov peroksid je ROS koji nije slobodni radikal, ali može lako prijeći u reaktivni radikal. Manje je reaktivan od superoksidnog aniona, ali je više toksičan budući da ima sposobnost prodiranja kroz biološke membrane. Mehanizam nastajanja ROS-ova prikazan je na **Slici 3**. Pri manjim koncentracijama, ROS može funkcionirati kao signalna molekula koja regulira osnovne stanične aktivnosti kao što je stanični rast. Kada se poremeti ravnoteža između nakupljanja ROS-a i tjelesnog antioksidacijskog procesa, dolazi do stvaranja oksidativnog stresa i oštećenja stanica i tkiva, uzrokujući razne bolesti (Yan i sur., 2020). U normalnim uvjetima, antioksidacijski sustav u ljudskom tijelu može ukloniti te radikale, održavajući tako ravnotežu između oksidacije i antioksidacije (Ji i sur., 2020). Postoje jasni dokazi da su slobodni radikali povezani s razvojem bolesti, poput ateroskleroze, emfizema i karcinoma (Yan i sur., 2020).





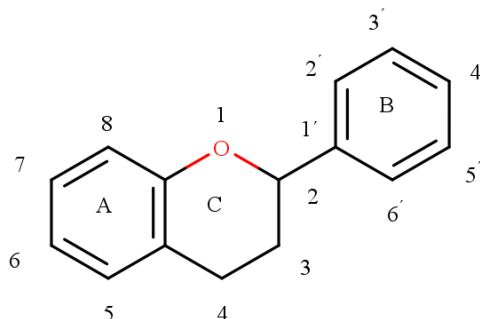


**Slika 4** Dva glavna mehanizma antioksidacije (Belščak-Cvitanović i sur., 2018)

Biološka aktivnost polifenola ovisi o njihovoj strukturi, kombinaciji s drugim spojevima, topljivosti, apsorpciji i metabolizmu (Ji i sur., 2020). Antioksidacijska aktivnost povezana je i s uvjetima u reakcijskom mediju (Yan i sur., 2020). Broj i položaj hidroksilnih skupina u molekularnoj strukturi polifenolnih spojeva uvelike određuju njihovo antioksidacijsko djelovanje (Yan i sur., 2020).

Kemijska struktura flavonoida je C6–C3–C6, što označava dva aromatska prstena (prstenovi A i B) u kombinaciji s tri ugljika kako bi se dobio oksigenirani heterocikl (prsten C; **Slika 5**) (Cutrim i sur., 2018). Konjugacija prstena A s B pomoću heterocikličkog, nezasićenog prstena C poboljšava antioksidacijsku aktivnost polifenolnih spojeva (Olszowy, 2019). Dokazano je da je prisutnost fenolne hidroksilne skupine ključan čimbenik za uklanjanje OH· radikala i da su položaji hidroksilnih skupina u flavonoidima važniji od ukupnog broja fenolnih hidroksilnih skupina. Flavonoidi djeluju kao hvatači slobodnih radikala tvoreći manje reaktivne fenoksilne radikale kada doniraju vodikov atom iz njihove hidroksilne skupine (Papuc i sur., 2017). Dodatna OH skupina u B prstenu flavonoida pojačava njihovo antioksidacijsko djelovanje (npr. miricetin ima bolja antioksidacijska svojstva od kvercetina), dok prisutnost samo jedne OH skupine u B prstenu smanjuje tu aktivnost (kemferol je slabiji antioksidans od kvercetina), a prisutnost više od tri hidroksilne skupine u aromatskom prstenu (u B prstenu flavonoida) ne poboljšava antioksidacijsku aktivnost spoja (Olszowy, 2019). U nedostatku o-dihidroksi strukture u B prstenu, hidroksilne skupine na A prstenu mogu uzrokovati porast antioksidacijske aktivnosti flavonoida (Belščak-

Cvitanović i sur., 2018).



**Slika 5** Osnovna struktura flavonoida (Cutrim i sur., 2018).

Glikozilacija 3-hidroksilnih skupina smanjuje antioksidacijska svojstva spojeva i zbog toga rutin pokazuje slabije antioksidacijsko djelovanje od kvercetina (Olszowy, 2019). *In vitro* antioksidacijska aktivnost polifenola može se povećati polimerizacijom flavonoidnih monomera, što rezultira stvaranjem proantocijanidina ili kondenziranih tanina. Zbog povećanog broja hidroksilnih skupina ti su polimeri vrlo snažni antioksidansi *in vitro* (Belščak-Cvitanović i sur., 2018).

Antioksidacijska aktivnost fenolnih kiselina može se povezati s prisustvom hidroksilnih skupina koje imaju glavnu ulogu u antioksidacijskoj aktivnosti polifenola. Dokazano je da kafeinska kiselina (3,4-dihidroksicimetna kiselina) s dvije hidroksilne skupine pokazuje bolja antioksidacijska svojstva od *para*-kumarinske kiseline (4-hidroksicimetna kiselina) koja ima samo jednu hidroksilnu skupinu vezanu na aromatski prsten. *Para* pozicija pojačava antioksidacijsko djelovanje u usporedbi s *orto* i *meta* pozicijama (Olszowy, 2019). Prisutnost metoksi skupine također utječe na antioksidacijsku aktivnost fenolnih kiselina. Na primjer, ferulična kiselina (3-metoksi-4-hidroksicimetna kiselina) i vanilinska kiselina (4-hidroksi-3-metoksibenzojeva kiselina) imaju manju antioksidacijsku aktivnost od kafeinske kiseline (3,4-dihidroksicimetna kiselina) i protokatehuinske kiseline (3,4-dihidroksibenzojeva kiselina) (Olszowy, 2019). Antioksidacijska aktivnost monofenola se povećava kada se jedna ili dvije metoksi skupine nalaze u *orto* položaju u odnosu na hidroksilne skupine. Na primjer, sinapinska kiselina (3,5-dimetoksi-4-hidroksicimetna kiselina) je bolji antioksidans u usporedbi s feruličnom kiselinom (3-metoksi-4-hidroksicimetna kiselina). S druge strane ferulična kiselina je učinkovitiji antioksidans od *para*-kumarinske kiseline

(4-hidroksicimetne kiseline) (Olszowy, 2019). Alkilna esterifikacija ne utječe na antioksidacijska svojstva, npr. vrlo slično antioksidacijsko djelovanje pokazuju propil galat i galna kiselina (trihidroksibenzojeva kiselina), ali esterifikacija kininskom kiselinom dovodi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti (klorogenska kiselina je slabiji antioksidans u usporedbi s kafeinskom kiselinom). Također, kafeinska kiselina pokazala je bolju antioksidacijsku aktivnost od protokatehuinske (-COOH skupina) kiseline zbog prisutnosti -CH=CH-COOH skupine u svojoj strukturi (Olszowy, 2019).

## 2.7. INHIBICIJA ENZIMA

Dijabetes tipa 2 doseže razmjere epidemije u čitavom svijetu i postoje različiti uzroci ove bolesti poput povećanog unosa kalorija, sjedilačkog načina života i stresa, genetike i dobi. Razni socijalni, ekonomski i kulturološki čimbenici uzrokuju pretilost, koja dovodi do povećanog rizika za razvoj ove bolesti (Tinajero i sur., 2021; Reed i sur., 2021). U 2021. godini 537 milijuna ljudi bolovalo je od ove bolesti, a preko 90 % svih slučajeva dijabetesa bio je tip 2. Predviđa se da će taj broj dosegnuti 783 milijuna do 2045. godine (International Diabetes Federation, 2021). Dijabetes tipa 2 je metabolički poremećaj u kojem je koncentracija glukoze u krvi iznad 200 mg/dL ili je razina glukoze u plazmi veća od 126 mg/dL (Gundala i sur., 2016; Viswanath i sur., 2017). Terapeutske strategije temelje se na smanjenju postprandijalne razine glukoze putem inhibicije razgradnje disaharida i oligosaharida. Polifenoli usporavaju apsorpciju glukoze inhibicijom enzima  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze koji su ključni u razgradnji ugljikohidrata (Sun i sur., 2019). Interakcije između polifenola i enzima proučavaju se različitim *in vitro* metodama. Dobivene vrijednosti ovise o tipu enzima, specifičnim reakcijskim uvjetima i koncentraciji supstrata. Stoga se dobiveni rezultati teško uspoređuju s prethodnim istraživanjima (Sun i sur., 2018; Kaeswurm i sur., 2019).

### 2.7.1. Inhibicija $\alpha$ -amilaze

$\alpha$ -amilaza je enzim koji hidrolizira  $\alpha$ -1,4-glikozidne veze u škrobu, amilozi, amilopektinu, glikogenu i drugim maltooligosaharidima. Glikozidne veze se hidroliziraju u prisutnosti  $\alpha$ -amilaze i nastaju maltodekstrini niske molekulske mase, kao što su maltoza, maltotrioza i maltotetraoza (Yoon i sur., 2002; Moram i sur., 2011). Ovaj enzim naziva se i  $\alpha$ -1,4-glukan-4-glukanohidrolaza, a žlijezde slinovnice i gušterača proizvode  $\alpha$ -amilazu u ljudskom tijelu (Chakraborty i Rajagopalan, 2002; Mahmood, 2016).

Utvrđeno je da promjene u molekularnoj strukturi polifenola utječu na njihovu inhibicijsku aktivnost (Xiao i sur., 2013a; Gong i sur., 2020). U sljedećem dijelu objašnjeno je kako strukturne promjene pojedinih skupina polifenola utječu na inhibiciju  $\alpha$ -amilaze.

Metilacija i metoksilacija flavonoida uzrokuju smanjenje inhibicijske aktivnosti i smanjenje broja akceptora/donora vodikovih veza koji su važan čimbenik koji utječe na vezanje flavonoida na  $\alpha$ -amilazu (Xiao i sur., 2013a). Dokazano je da hidroksilacija poboljšava inhibicijsku aktivnost flavonoida, tako što hidroksilna skupina reagira s aminokiselinskim ostacima na aktivnim mjestima enzima (Sun i Miao, 2020). Zaključeno je da je tri optimalan broj hidroksilnih skupina na A prstenu flavonola za poboljšanu inhibiciju  $\alpha$ -amilaze. Dodatak druge hidroksilne skupine na B prstenu flavonola smanjuje inhibiciju  $\alpha$ -amilaze (Xiao i sur., 2011). Sun i Miao (2020) dokazali su da 3-,7-,4'-monoglikolizacija, diglikozilacija i poliglikolizacija hidroksilnih skupina smanjuju inhibicijsku aktivnost flavonoida. Glikolizacija uzrokuje stvaranje flavonoida neplanarne strukture što smanjuje interakcije s  $\alpha$ -amilazom. Hidrogenacija C2=C3 dvostruke veze flavonoida smanjuje inhibiciju  $\alpha$ -amilaze (Sun i sur., 2020).

Kafeoilkininske kiseline s više kafeoilnih skupina pokazale su veću inhibicijsku aktivnost prema  $\alpha$ -amilazi. To je rezultat prisutnosti većeg broja hidroksilnih skupina u dikafeolnim skupinama, koje su važne za inhibiciju  $\alpha$ -amilaze zbog stvaranja vodikovih veza (Xu i sur., 2016). Inhibicijska aktivnost hidrokisicimetnih i fenolnih kiselina slijedila je redoslijed: kafeinska kiselina > taninska kiselina > klorogenska kiselina = kininska kiselina (Xiao i sur., 2013a). Hidroksibenzojeve kiseline (salicilna i vanilinska kiselina) pokazale su vrlo nisku inhibicijsku aktivnost, za razliku od inhibicijskog djelovanja hidrokisicimetnih kiselina prema  $\alpha$ -amilazi (Sun i sur., 2019).

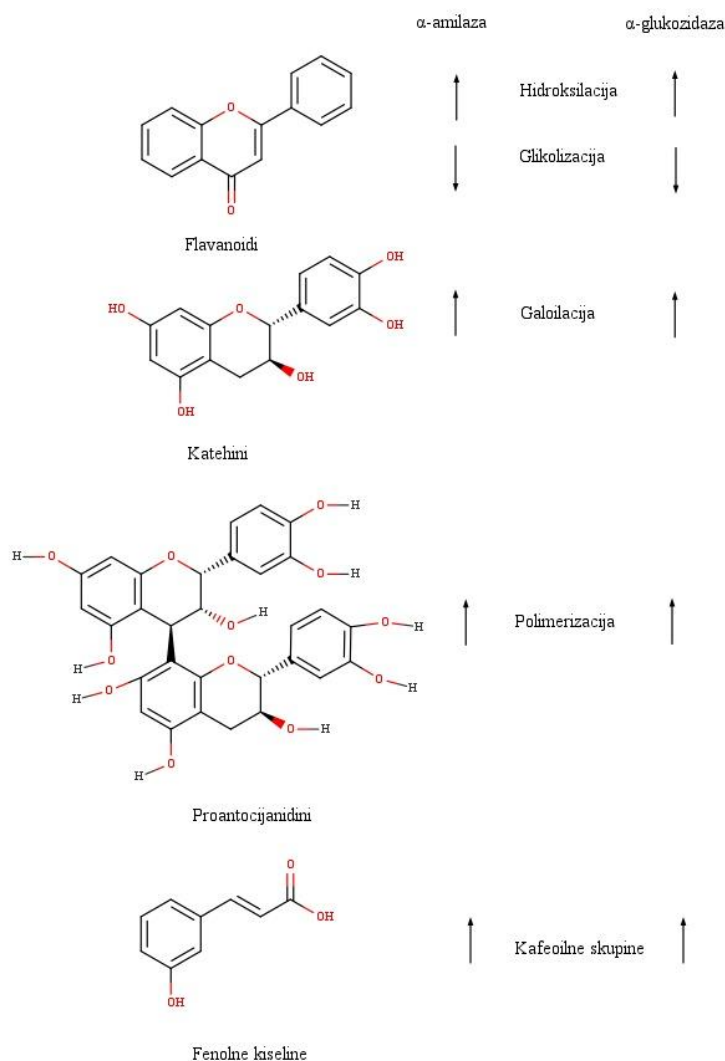
### 2.7.2. Inhibicija $\alpha$ -glukozidaze

Hidrolitičku reakciju i oslobađanje  $\alpha$ -glukoze s nereducirajućih krajeva arila (ili alkil)-glukozida, disaharida ili oligosaharida katalizira  $\alpha$ -glukozidaza (Moremen i sur., 1994).  $\alpha$ -glukozidaza se prema specifičnosti supstrata dijeli u tri skupine. Skupina I su enzimi koji odabiru heterogene supstrate kao što su saharoza i aril  $\alpha$ -glukozidi. Skupine II i III su enzimi koji odabiru homogene supstrate kao što je maltoza, dok enzimi u skupini II imaju visoku selektivnost prema dugolančanim supstratima (Auiewiriyankul i sur., 2018). Kako je inhibicijska aktivnost polifenola povezana s njihovom kemijskom strukturom, u sljedećem dijelu objašnjeno je kako strukturne promjene pojedinih skupina polifenola utječu na inhibiciju  $\alpha$ -glukozidaze.

Flavonoidi bez hidroksilne kupine na pozicijama 5, 6 ili 7 na A prstenu ne inhibiraju  $\alpha$ -glukozidazu, dok hidroksilacija na C prstenu uzrokuje rast inhibicijske aktivnosti. Metilacija na 5-OH i metoksilacija na C-4' ili C-3' pozicijama flavonoida poboljšava inhibicijsku aktivnost. Glikolizacija flavonoida uzrokuje smanjenje inhibicijske aktivnosti flavonoida te je potvrđeno da su monoglikozidi jači inhibitori  $\alpha$ -glukozidaze od poliglikozida. Razlog tome je što povećanje veličine molekule i polariteta te prelazak na neplanarnu strukturu uzrokuje smanjenje inhibicijske aktivnosti. Hidrogenacija C2=C3 veze također uzrokuje smanjenje inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze. Proučavanjem inhibicijskog djelovanja proantocijanidina i antocijanina primijećeno je da oligomeri imaju veću inhibicijsku aktivnost od polimera (Xiao i sur., 2013b).

Uočeno je da klorogenska kiselina snažno inhibira  $\alpha$ -glukozidazu, dok je za galnu i feruličnu kiselinu primijećeno nisko inhibicijsko djelovanje. Povećanje duljine alkilnog lanca uzrokuje povećanje inhibicijske aktivnosti mono- i diketalnih derivata klorogenske kiseline (do derivata 5-nonanona) (Xiao i sur., 2013b).

**Slika 6** sažeti je prikaz kako strukturne promjene pojedinih skupina polifenola utječu na inhibiciju  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze. Utvrđeno je da metilacija i metoksilacija uzrokuju smanjenje inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze, dok glikozilacija antocijanina uzrokuje njezino povećanje.



**Slika 6** Utjecaj strukture polifenola na aktivnost inhibicije  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze

## 2.8. STABILNOST POLIFENOLA

Nestabilnost polifenola označava razgradnju polifenola tijekom procesiranja i skladištenja hrane pod utjecajem temperature, kisika i svjetlosti ili utjecajem *in vivo* čimbenika kao što su pH i enzimi u gastrointestinalnom traktu. Također, njihove interakcije s drugim komponentama u matriksu hrane mijenjaju njihovu stabilnost i topljivost (Mayta-Apaza i sur., 2019). Inkapsuliranje polifenola ima za cilj očuvanje biološke aktivnosti i poboljšanje stabilnosti aktivnih spojeva, kao i osiguravanje njihovog kontroliranog otpuštanja (Bartosz i Irene, 2016).

Stabilnost polifenola može se promijeniti kemijskim modifikacijama, kao što su hidroksilacija, glikozilacija, acilacija i pigmentacija. Polifenoli su vrlo reaktivni spojevi i dobri supstrati za razne

enzime, uključujući polifenol oksidaze, peroksidaze, glikozidaze i esteraze. Stoga sastav polifenola u hrani i pićima biljnog podrijetla ne ovisi samo o upotrijebljenoj sirovini, već i o metodama ekstrakcije i biokemijskim i kemijskim reakcijama biljnih polifenola. Kao rezultat nastaje veliki udio polifenola u hrani i pićima, a neki od novih spojeva nastalih u tim procesima mogu pokazivati posebna svojstva koja se razlikuju od njihovih prekursora (Cao i sur., 2021). Bioaktivni spojevi ekstrahiraju se, pročišćavaju i koncentriraju iz prirodnih biljnih izvora hrane različitim tehnikama i prerađuju u tablete, kapsule ili mikročestice za širu potrošnju. Procesiranje hrane može imati pozitivne ili negativne učinke na sadržaj polifenola u proizvodima. Tradicionalne tehnologije prerade hrane kao što je termička obrada mogu smanjiti stabilnost, sadržaj i antioksidacijsku aktivnost polifenola. Međutim, moderne tehnologije kao što je inkapsulacija omogućile su očuvanje ili povećanje stabilnosti, sadržaja i antioksidacijskog djelovanja polifenola. Prehrambena industrija razvija tehnologije koje ne utječu na strukturu polifenola, a istovremeno osiguravaju odgovarajuću kvalitetu finalnih prehrambenih proizvoda. Na tržištu se razvija sve više dodataka prehrani koji sadrže polifenole i prehrambenih proizvoda obogaćenih polifenolima kako bi se zadovoljile potrebe potrošača koji ne mogu konzumirati odgovarajuće količine povrća i voća u cijelom svijetu (Deng i sur., 2018).

## **2.9. MIKROINKAPSULACIJA**

Mikroinkapsulacija je definirana kao tehnologija pakiranja aktivne tvari (čvrstih tvari, tekućina ili plinovitog materijala) u zaštitni materijal koji se naziva omotač. Omotač štiti aktivnu tvar od neželjenih učinaka svjetlosti, vlage i kisika, čime doprinosi stabilnosti i promicanju kontroliranog oslobađanja aktivne tvari (Bartosz i Irene, 2016). Postoji nekoliko metoda mikroinkapsuliranja koje se mogu primijeniti na polifenole, ali odabir metode mora se temeljiti na karakteristikama polifenola kao što su kemijska struktura, topljivost, kompatibilnost s omotačem i termofizička stabilnost (Cao i sur., 2021).

U prehrambenoj industriji, proces mikroinkapsulacije može se primijeniti iz sljedećih razloga (Bartosz i Irene, 2016):

- zaštita aktivne tvari od degradacije smanjenjem njegove reaktivnosti s vanjskim okruženjem;
- smanjenje brzine isparavanja ili prijenosa aktivne tvari u okolinu;
- prilagođavanje otpuštanja aktivne tvari tijekom vremena ili u određeno vrijeme;



- za prikrivanje neželjene arome ili okusa aktivne tvari;
- razrjeđivanje aktivne tvari;
- za postizanje razdvajanja komponenti smjese.

Postoji više metoda inkapsulacije, a one se mogu podijeliti na fizikalne (sušenje raspršivanjem, centrifugalna ekstruzija, sferizacija ekstruzijom, procesi koji koriste superkritične fluide), kemijske (granična polimerizacija, umrežavanje, *in situ* polimerizacija itd.) i fizikalno-kemijske (ionsko geliranje, hlađenje raspršivanjem, ekstrakcija otapala isparavanjem, jednostavna i kompleksna koacervacija) (Teixeira da Silva i sur., 2014).

### 2.9.1. Ionsko geliranje

Ionsko geliranje je metoda inkapsulacije gdje se tekuća otopina koja sadrži aktivnu tvar i omotač (polimerni materijal) istiskuje kroz mlaznicu pri čemu se stvara kapljica koja u dodiru s otopinom za geliranje (otopina kationa suprotnih naboja) uz konstantno miješanje prelazi u mikročesticu. Ovaj proces prikazan je na **Slici 7**. Stvaranje mikročestica temelji se na formaciji gel struktura između suprotno nabijenih vrsta. Kao materijali za inkapsulaciju uglavnom se koriste natrijev alginat, hitin, hitozan i pektin, a kao tvar za umrežavanje najčešće se koristi kalcijev klorid (Patil i sur., 2012). Ioni suprotnog naboja, koji se koriste za ionsko geliranje, mogu se podijeliti u dvije glavne skupine (Racovič i sur., 2009):

- ioni niske molekulske mase (nastali disocijacijom soli:  $MgCl_2$ ,  $BaCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $CuCl_2$  te pirofosfat, tripolifosfat, tetrapolifosfat, oktapolifosfat, heksametafosfat i  $[Fe(CN)_6]^{-4}/[Fe(CN)_6]^{-3}$ ),
- ioni visoke molekulske mase (npr. lauril sulfat, oktil sulfat, cetilstearil sulfat, heksadecil sulfat).



Slika 7 Priprema mikročestica pomoću ionskog geliranja (Patil i sur., 2012)

### 2.9.2. Proizvodnja alginatnih mikročestica primjenom uređaja za mikroinkapsulaciju

Kako bi se postiglo očuvanje polifenolnih i hlapljivih komponenata koriste se različite inkapsulacijske tehnike. Razvoj biopolimernih mikročestica pripremljenih pomoću alginata i drugih biopolimera procesom mikroinkapsulacije jedan je od načina kojim se mogu očuvati bioaktivne komponente (Perez i Geonkar, 2015). S obzirom na to da mikročestice mogu sačuvati bioaktivne komponente, ugrađuju se u sastav prehrambenih proizvoda i tako povećavaju njihovu biološku aktivnost (Frakolaki i sur., 2020). Omotači koji se obično koriste u procesu mikroinkapsulacije uključuju različite biopolimere koji imaju sposobnost formiranja mikročestica ionskim geliranjem. Ionsko geliranje je svojstvo geliranja polisaharida u vodenim otopinama u prisutnosti dvo- i trovalentnih iona (Usmiati i sur., 2014). Među uobičajeno korištenim biopolimerima, natrijev alginat ističe se svojim biorazgradivim i biokompatibilnim svojstvima (Aldawsari i sur., 2021). Premda ima široku primjenu u pripremi mikročestica, postoje i negativne karakteristike alginata koje mogu uzrokovati nekontrolirano oslobađanje inkapsuliranih komponenata. Poboljšanje ovih negativnih svojstava može se postići kombiniranjem alginata s drugim biopolimerima (Atencio i sur., 2020). Jedan od komercijalno dostupnih mikroinkapsulatora za pripremu mikročestica ionskim geliranjem je BÜCHI Encapsulator B-390 (Labortechnik AG, Flawil, Švicarska). U ovom uređaju se smjesa koja se sastoji od aktivne tvari otopljena u otopini polimera pumpa tlakom i nakon stvaranja laminarnog toka, ovaj uređaj ga razbija pomoću vibracije

i mikročestice padaju u otopinu za geliranje (Nemethova i sur., 2014). Karakteristike pripremljenih mikročestica ovise o promjeru mlaznice, protoku laminarnog strujanja, frekvenciji i viskoznosti istisnute tekućine (Whelehan i Marison, 2011).

Büchi, Nisco Engineering AG, Inotech Biotechnologies AG i Brace Technologies proizvode komercijalno dostupne uređaje za mikroinkapsulaciju koji primjenjuju vibraciju u kombinaciji s ionskim geliranjem za pripremu alginatnih mikročestica. Ovi uređaji nisu prikladni za industriju, ali ispunjavaju zahtjeve znanstvenog istraživanja.

Svi ovi uređaji sastoje se od sljedećih dijelova (Fangmeier i sur., 2019):

- spremnik koji sadrži aktivnu tvar otoplenu u otopini nosača;
- mlaznica određenog promjera za proizvodnju laminarnog toka;
- kontrolni sustav za određivanje frekvencije;
- stroboskopsko svjetlo za kontrolu nastajanja mikročestica;
- otopina za geliranje koja se stalno miješa i omogućuje polimerizaciju i stvaranje čestica.

Parametri koje je potrebno dobro postaviti i kontrolirati kako bi nastale čestice željenih karakteristika su veličina mlaznica, frekvencija i napon elektrode (Dorati i sur., 2013). Strujanje polimera ostvaruje se pomoću ventila za regulaciju tlaka koji dovodi komprimirani zrak u spremnik s otopinom za inkapsulaciju pod tlakom u rasponu 0,1 – 2 bar. U usporedbi sa špricom, ovaj sustav omogućuje proizvodnju većih količina jednolikih kapljica od kojih se naknadno formiraju čestice (Whelehan i Marison, 2011). Vibracija uzrokuje lomljenje laminarnog mlaza te nastaju čestice homogene veličine i oblika (Fangmeier i sur., 2019). Frekvencija regulira količinu proizvedenih čestica, pri čemu frekvencija od 7000 Hz proizvodi 7000 kapljica/s. Napon elektrode stabilizira mlaz kapljica i raspršuje ga kako bi se spriječilo stvaranje nakupina mikročestica (Dorati i sur., 2013). Preporuka je da se ne dodaje potencijal veći od 2,15 kV jer to može uzrokovati pucanje mikročestica (Whelehan i Marison, 2011). Mlaznice su izrađene od nehrđajućeg čelika s otvorima promjera 50 – 1000  $\mu\text{m}$  i učinkovit su sustav za proizvodnju čestica u rasponu 100 – 2000  $\mu\text{m}$ . Važno je prilagoditi viskoznost otopine za inkapsulaciju kako bi se dobile čestice zadovoljavajuće veličine. Ako je viskoznost smjese previsoka, učinak vibracije neće biti dovoljan za stvaranje čestica i veća je mogućnost začepjenja mlaznica. S druge strane, ako viskoznost nije dovoljno visoka, proizvedene čestice neće imati željeni sferni oblik (Fangmeier i sur., 2019). Na **Slici 8** prikazan je uređaj za proizvodnju mikročestica. Glavni nedostaci ove tehnike su ograničen izbor

biopolimera koji se mogu koristiti kao nosači jer se obično temelje na primjeni samog alginata ili kombinaciji alginata s drugim biopolimerima i mala količina proizvedenih mikročestica (Whelehan i Marison, 2011).



**Slika 8** Uređaj za proizvodnju mikročestica - Encapsulator B-390 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) (<https://www.buchi.com/en/products/instruments/encapsulator-b-390-b-395>)

### 2.9.3. Polimeri kao nosači za inkapsulaciju

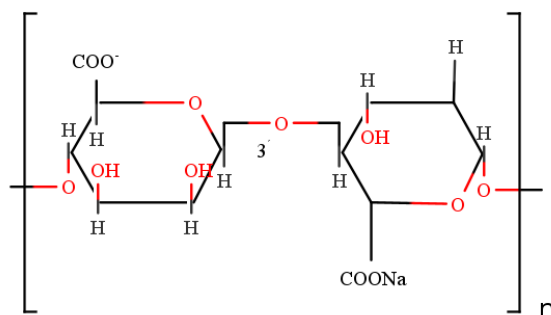
Inkapsulacija koristi fizičku barijeru za zaštitu biološki aktivnih sastojaka od štetnih utjecaja okoline. Materijali koji se obično koriste u procesima inkapsulacije su polisaharidi, proteini, lipidi ili biorazgradivi sintetski materijali. Ovi materijali moraju ispunjavati uvjete koje zahtjeva Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) te moraju biti Općenito priznati kao sigurni materijali (GRAS) (Nedović i sur., 2013). Odabir odgovarajućeg nosača ovisi o svojstvima aktivnog sastojka i o željenim svojstvima konačnog proizvoda. Osim fizikalno-kemijskih svojstva, cijene i dostupnosti, pri odabiru nosača potrebno je uzeti u obzir i druge ekonomske čimbenike (Timilsena i sur., 2020).

Na temelju podrijetla polimere koji se koriste kao nosači u procesu inkapsulacije dijelimo na prirodne i sintetičke. Prirodni polimeri dobivaju se od životinjskih i biljnih makromolekula te je za njih karakteristična niska toksičnost, biokompatibilnost i biorazgradivost. Glavni nedostatak

prirodnih polimera su varijacije u njihovom sastavu koje utječu na stupanj polimerizacije i njihova mehanička svojstva (Chirani i sur., 2015). Najčešći jestivi polimeri su proteini (životinjskog podrijetla: želatina, kolagen, albumin; biljnog podrijetla: soja, pšenični gluten), lipidi (fosfolipidi, trigliceridi, masne kiseline), polisaharidi (celuloza, škrob). Također, često se upotrebljavaju različiti hidrokoloide poput pektina te polisaharidi biljnog, životinjskog ili mikrobnog podrijetla poput alginata i hitozana (Ali i sur., 2018).

### *Alginat*

Alginat je polisaharid topljiv u vodi dobiven ekstrakcijom iz morskih algi. Sastoji  $\alpha$ -L-guluronskih (G) i  $\beta$ -D-manuronskih kiselina (M) spojenih 1  $\rightarrow$  4 glikozidnom vezom (**Slika 9**). Omjer i raspodjela monomera M i G kiselina utječu na fizikalna i kemijska svojstva alginata. Dužina i broj guluronskih kiselina određuje afinitet alginata prema kationima kao što je  $\text{Ca}^{2+}$  koji uzrokuje formaciju umreženih gelova, dok omjer monomera M i G kiseline utječe na elastičnost lanaca polisaharida i smanjuje viskoznost alginatnih otopina (Brownlee i sur., 2005). Osim toga, alginatna struktura ovisi o njegovom podrijetlu. Utvrđeno je da se stabljika smeđih algi *Laminaria hyperborea* sastoji od većeg broja guluronskih kiselina, dok se njezini listovi sastoje od manuronskih kiselina (Puscaselu i sur., 2020). Molekulska masa alginata iznosi između 33 000 i 400 000 g/mol i utječe na njegova mehanička svojstva (Sun i Tan, 2013).



**Slika 9** Kemijska struktura alginata

Dimerizacija G segmenata odgovorna je za geliranje alginata. Nakon dodavanja  $\text{Ca}^{2+}$  iona, dva G lanca vezana su sa suprotnih strana. Geliranje se može opisati „egg box“ modelom gdje se dva antiparalelna lanca poliuronata vežu  $\text{Ca}^{2+}$  ionima. Da bi se postigla ova 3-D mreža, za svaki kation

potrebna su 4 G segmenta. Međutim, za formiranje stabilnih struktura potrebno je 8 do 20 okolnih G ostataka (Ching i sur., 2017). Proces formiranja ovog modela odvija se prema mehanizmu „zatvarača“ koji opisuje prvo vezanje iona za umrežavanje (Skjåk-Bræk i sur., 2015). U prehrambenoj industriji primjena drugih kationa kao što su  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  i  $Sr^{2+}$  ograničena je zbog njihovih toksičnih svojstava (Ching i sur., 2017).

Oko 40 % suhe tvari smeđih algi čini alginat, a najčešće se ekstrahira iz vrsta *Laminaria hyperborean*, *Laminaria japonica*, *Laminaria digitata*, *Macrocystis pyrifera* i *Ascophyllum nodosum* (Lee i Mooney, 2012). Osim alginata iz algi, alginat proizvode i bakterije, ali se komercijalno najčešće ekstrahira iz biomase algi (Pereira i Cotas, 2020). Bakterije koje ga proizvode pripadaju rodovima *Pseudomonas* i *Azotobacter*. Ipak, alginati izolirani iz morskih algi imaju širu primjenu od onih bakterijskog podrijetla te se stoga opsežnije proučavaju (Skjåk-Bræk i sur., 2015). Ekstrakciju alginata iz algi patentirao je Stanford 1881. godine koji je predložio namakanje algi vodom ili razrijeđenom kiselinom nakon čega slijedi ekstrakcija natrijevim karbonatom i taloženje alginata kao rezultat dodavanja kiseline (Pereira i Cotas, 2020). Alginska kiselina obično se na kraju ovog tretmana pretvara u sol, a natrijev alginat je oblik u kojem se najčešće nalazi (Tønnesen i Karlsen, 2002).

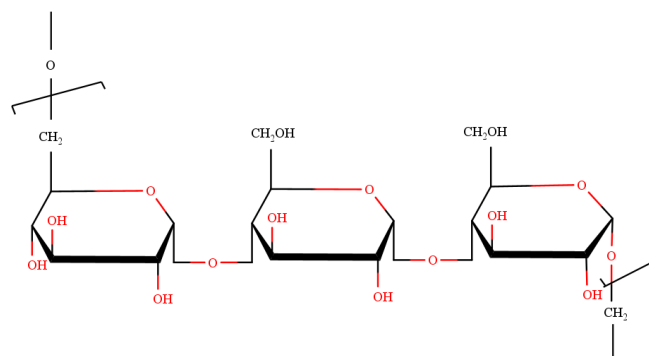
U prehrambenoj industriji alginat se primjenjuje u sirupima, preljevima za sladolede, umacima, instant mliječnim desertima, voćnim kašama i punilima. Odvajanje faza u majonezi, preljevima za salatu i drugim emulzijama vode u ulju može se spriječiti dodatkom alginata. Osim što ispunjava uobičajene zahtjeve u prehrambenoj industriji primjenom novih tehnika inkapsulacije, alginat može postići kontrolirano otpuštanje, toplinsku zaštitu i poželjna senzorska svojstva „uhvaćenog“ materijala (Qin i sur., 2018). Prije upotrebe alginata u hrani, potrebno ga je pravilno pročistiti jer se rizik od kontaminacije proteinima ili endotoksinima prisutnim u sirovom alginatu mora minimalizirati (Tam i sur., 2011).

Prema Puscaselu i sur. (2020), utvrđena su brojna pozitivna svojstva alginata kao što su geliranje, netoksičnost, biorazgradivost, mogućnost regeneracije, prirodni resursi, niska cijena, biokompatibilnost i inertnost. Zadržavanje vlage moguće je zahvaljujući hidrofilnoj prirodi alginata (Qin i sur., 2018). S druge strane, neugodan miris, depolimerizacija na temperaturama višim od 60 °C i slaba stabilnost, neki su od nedostataka koje treba uzeti u obzir pri odabiru alginata. Ti se nedostaci obično prevladavaju kombiniranjem različitih biopolimera s alginatom

(Puscaselu i sur., 2020).

### *Pululan*

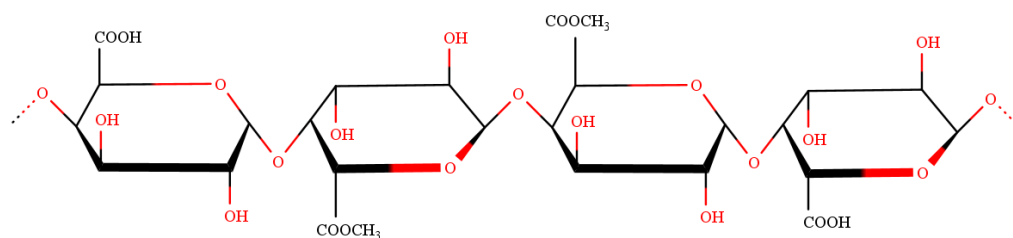
Zbog svojih specifičnih karakteristika, pululan je jedan od biopolimera koji je privukao veliku pozornost znanstvene zajednice. Ovaj polisaharid dobiva se iz fermentacijskog medija gljivičnog kvasca *Aureobasidium pullulans* gdje sastav podloge i uvjeti uvelike utječu na konačni prinos. Prema kemijskoj strukturi pululan je trimer maltotrioze. Zbog koegzistencije  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  4) i  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  6) veza u jednom spoju, ovaj polisaharid smatra se posrednikom između strukture amiloze i dekstrana. Njegova kemijska struktura prikazana je na **Slici 10**. Proizvodnja pululana u industrijskom mjerilu započela je 1976. godine u Hayashibara Company Limited, japanskoj tvrtki koja je još uvijek vodeći proizvođač pululana širom svijeta. Pululan je netoksičan, bez okusa i mirisa i topljiv u vodi, dok je u alkoholu netopljiv. Posjeduje visoku mehaničku čvrstoću i sposobnost oblikovanja filma i vlakana i nisku viskoznost u usporedbi s drugim polisaharidima. Zbog ovih karakteristika brojne su primjene pululana u prehrambenoj, farmaceutskoj i biomedicinskoj industriji. U prehrambenoj industriji pululan se koristi kao sredstvo za zgušnjavanje, želiranje i stabilizaciju. Visoka fleksibilnost daje pululanu sposobnost stvaranja tankih slojeva, mikročestica, filmova i prevlaka (Trinetta i sur., 2016). Unatoč dobrim karakteristikama pululana, visoka cijena njegove proizvodnje u odnosu na druge polisaharide ograničava njegovu široku primjenu na tržištu. Također, visoki afinitet pululana prema vodi onemogućuje njegovu primjenu zbog visoke osjetljivosti na vlažna okruženja (Farris i sur., 2014).



**Slika 10** Kemijska struktura pululana

### *Pektin*

Pektin se koristi za razvoj različitih proizvoda u prehrambenoj industriji kao što su zgušnjivači, sredstva za želiranje, koloidni stabilizatori i emulgatori. Međutim, pektin ima svoju primjenu i u pakiranju hrane (Mellinas i sur., 2020). Po kemijskom sastavu pektin je poligalakturonska kiselina s različitim stupnjem metilacije ostataka karboksilne kiseline i/ili amidacije poligalakturonske kiseline. Prema stupnju esterifikacije s metanolom, što je omjer esterificiranih skupina galakturonske kiseline prema ukupnom broju galakturonskih kiselina, pektin može biti viskoesterificirani ili niskoesterificirani. Pektin je jedan od najraširenijih polisaharida prisutnih u stanicama viših biljaka iz kojih se može ekstrahirati i primijeniti kao anionski biopolimer topljiv u vodi. Brojne su koristi uporabe pektina u odnosu na konvencionalne polimere (Espitia i sur., 2014). Pektin je građen od polisaharidnih domena: poligalakturonan (građen od molekula D-galakturonske kiseline koje su metilirane na C6 atomu, a ponekad i acetilirane na kisikovom atomu), ramnogalakturonan I (građen od L-ramnoze i D-galakturonske kiseline kao podmonomernih jedinica vezanih (1,2)- $\alpha$ -L-Rha-(1,4)- $\alpha$ -D-GalA i sadrži veliku količinu šećera na neutralnoj strani lanca) i ramnogalakturonan II koji je mnogo kompleksnije strukture i vrlo je važan u staničnoj stijenci (Shu Liu i sur., 2012). Njegova kemijska struktura prikazana na **Slici 11**.



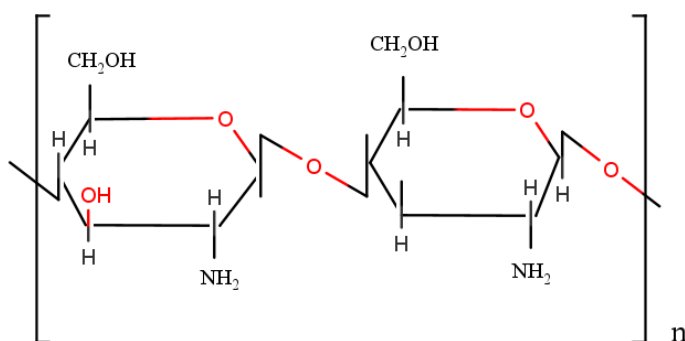
**Slika 11** Kemijska struktura pektina

### *Hitozan*

Hitin je strukturni materijal rakova, insekata i gljiva te je drugi najzastupljeniji biopolimer na zemlji nakon celuloze. Hitozan se dobiva deacetilacijom hitina koji zbog prisutnosti amino skupina ima pogodna svojstva za industrijsku primjenu kao biorazgradivi materijal s antimikrobnim svojstvima. Golema količina otpada od ljuski rakova nastaje svake godine kao glavni nusproizvod industrije morske hrane. Taj otpad može se koristiti za proizvodnju hitina koji se jednostavnim procesom



deacetilacije može pretvoriti u hitozan. Na svojstva hitozana utječe stupanj deacetilacije. Niže vrijednosti propusnosti vodene pare uočene su za filmove pripremljene od hitozana s nižim stupnjem deacetilacije. Također, izmjene u pH vrijednosti mogu utjecati na protonaciju amino skupine što dovodi do varijacija u topljivosti hitozana, dok na mehanička svojstva hitozana utječe konformacija lanca. Produžetkom vremena skladištenja, povećanjem molekulske mase hitozana te smanjenjem temperature skladištenja povećavaju se mehanička svojstva i propusnost vodene pare (Priyadarshi i sur., 2020). Zbog niske toksičnosti i biokompatibilnosti predmetom je brojnih istraživanja. Modificira se u različite oblike (hidrogelove, mikročestice, filmove, prahove) te se koristi u prehrambenoj, farmaceutskoj industriji i medicini (Gonçalves i sur., 2019). Njegova kemijska struktura prikazana je na **Slici 12**.

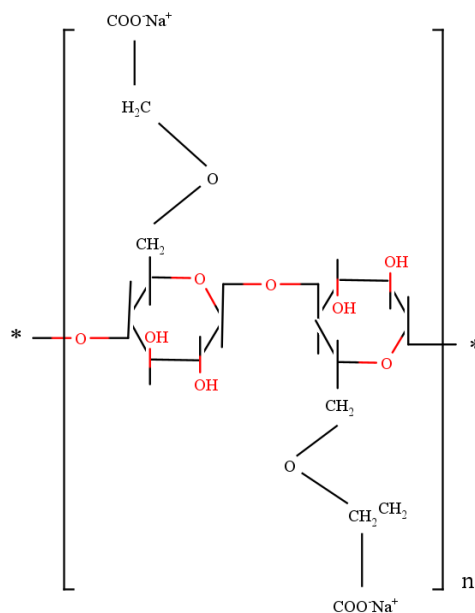


**Slika 12** Kemijska struktura hitozana

### *Karboksimetil celuloza*

Celuloza je polimer koji sadrži najmanje 3000 molekula glukoze povezanih β-1,4-glikozidnim vezama. Ima biokompatibilna svojstva i njezini derivati poput karboksimetil celuloze (CMC), metil celuloze, hidroksipropil celuloze i hidroksipropilmetil celuloze koriste se kao jestivi polimeri (Ali i Ahmed, 2018). Karboksimetil celuloza derivat je celuloze koji je topljiv u vodi i zbog svojih biorazgradivih svojstava koristi se u papirnoj, tekstilnoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Gregorova i sur., 2015). Po kemijskom sastavu karboksimetil celuloza je ionski polisaharid sastavljen od β-D-(1 → 4) monomera glukana u kojem su hidroksilne skupine djelomično supstituirane CH<sub>2</sub>COOH skupinama. Dužina polimernog lanca i stupanj supstitucije utječu na funkcionalna svojstva karboksimetilceluloze (Shahbazi i sur., 2016). U prehrambenoj industriji se

CMC koristi kao zgušnjivač, stabilizator emulzija te za razvoj ambalažnog materijala zbog nekaloričnih i fiziološki inertnih svojstava. Za komercijalnu proizvodnju CMC-a koriste se biljni prekursori kao kukuruzna ljuska i stabljika, kora naranče i ananasa, šećerna trska kao i neki otpadni materijali kao što je stari papir i otpad iz tekstilne industrije (Rahman i sur., 2021). Kemijska struktura CMC-a prikazana je na **Slici 13**.

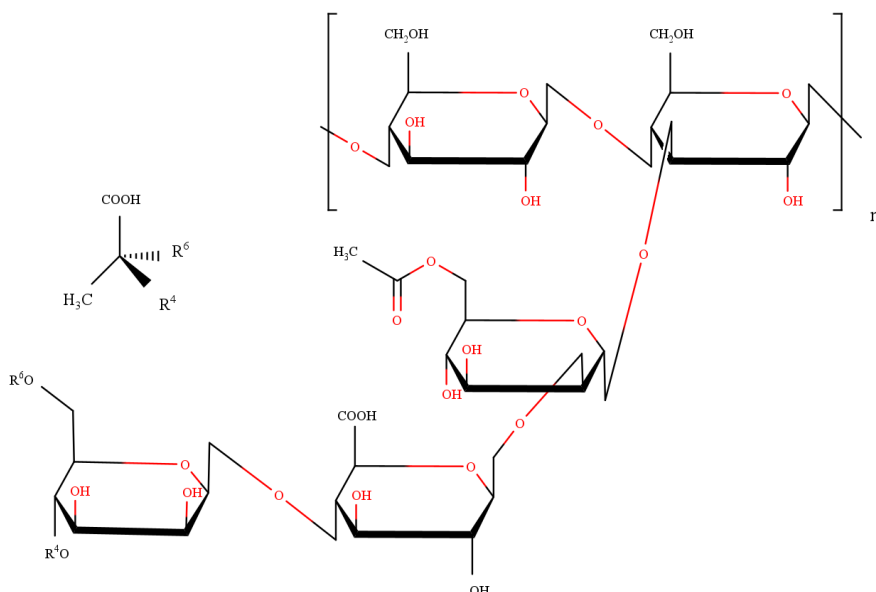


**Slika 13** Kemijska struktura karboksimetil celuloze

### *Ksantan guma*

Ksantan guma prirodna je guma dobivena pomoću Gram-negativne bakterije *Xanthomonas campestris*. Ove bakterije su strogo aerobne i kisik je temeljna hranjiva tvar za njihov rast i proizvodnju ksantan gume. Iako ima povoljna fizikalno-kemijska svojstva, ksantan gumu ponekad je potrebno modificirati kako bi se izbjegla njezina nepovoljna svojstva kao što su niska površinska napetost, niska brzina otapanja i loša toplinska stabilnost. Posjeduje brojne reaktivne funkcionalne skupine kao što su hidroksilne i karboksilne skupine, koje se mogu modificirati te se tako poboljšavaju njihova fizikalno-kemijska svojstva i povećava mogućnost njihove primjene (Ella i sur., 2020). Ksantan guma ima izrazitu sposobnost emulgiranja, suspendiranja i stabilizacije te je vrlo kompatibilan hidrokolid s drugim zgušnjivačima poput škroba, pektina, dekstrina, želatine i alginata. Ksantan guma ima nisku kalorijsku vrijednost, a kao i druge gume nije probavljiva za

ljude (Katzbauer, 1998). Prema kemijskoj strukturi, ksantan guma sastavljena je od ponavljajuće jedinice pentasaharida koji sadrži D-glukoze, D-manoze i D-glukuronsku kiselinu u molarnom omjeru 2:2:1. Okosnicu uglavnom čini  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glukoza koja nalikuje lancu celuloze dok su bočni lanci formirani od  $\beta$ -D-manoze s D-glukuronskom kiselinom preko  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) povezanih s D-manozom preko  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) (Habibi i sur., 2017). Kemijska struktura ksantan gume prikazana je na Slici 14.



Slika 14 Kemijska struktura ksantan gume

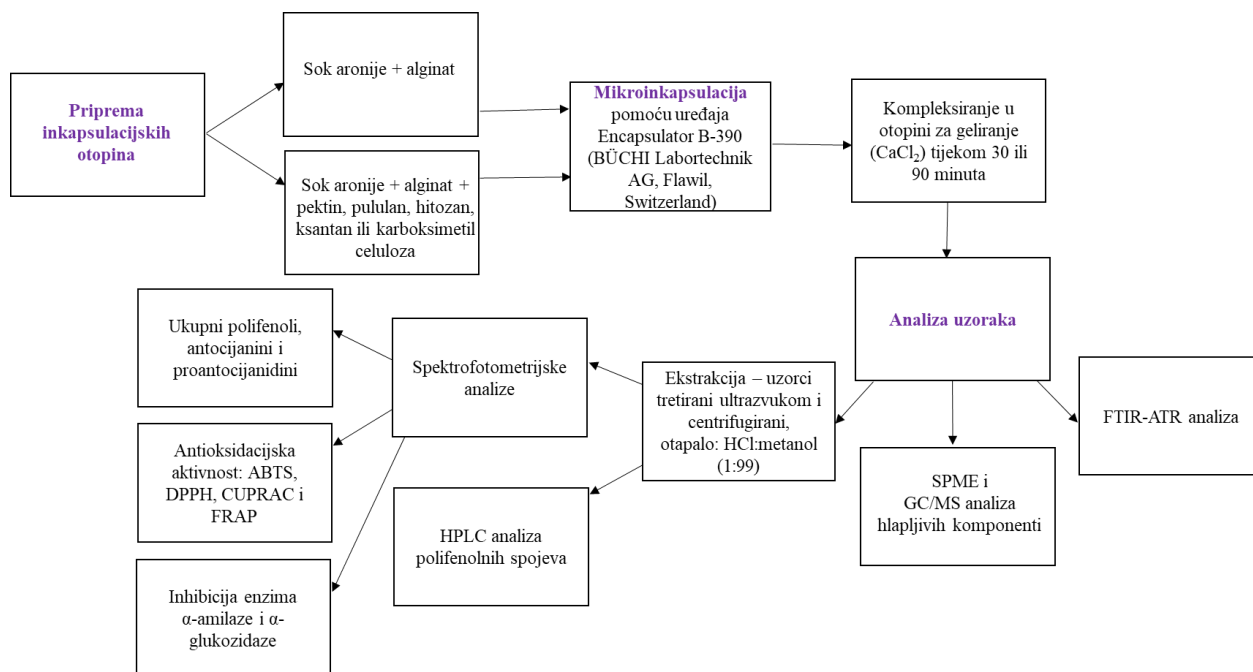
### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK RADA

Zadatak ovog istraživanja bio je:

- Ispitati mogućnost primjene biopolimernih mikročestica kao nositelja polifenolnih i hlapljivih komponenata soka aronije;
- Ispitati koji je sastav nosača za pripremu mikročestica najpovoljniji za mikroinkapsulaciju polifenolnih i hlapljivih komponenata;
- Ispitati utjecaj dodatnog kompleksiranja biopolimernih mikročestica u otopini za geliranje na mikroinkapsulaciju polifenolnih i hlapljivih komponenata u biopolimernim mikročesticama;
- Ispitati antioksidacijsku aktivnost biopolimernih mikročestica;
- Ispitati inhibiciju enzima pomoću biopolimernih mikročestica.

Eksperimentalni dio ovog rada bio je podijeljen u dva dijela. U prvom dijelu pripremljene su alginatne mikročestice bez i s dodatkom 0,5 %, 1 %, 1,5 % i 2 % pululana ili pektina. U drugom dijelu pripremljene su alginatne mikročestice bez i s dodatkom 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 % i 0,5 % hitozana, karboksimetil celuloze ili ksantan gume. Osim dodatka nosača, ispitan je i utjecaj vremena kompleksiranja (30 ili 90 minuta) u otopini za geliranje na zadržavanje polifenola i hlapljivih komponenata. Nakon pripreme setova uzoraka provedena je njihova karakterizacija kako je naznačeno na **Slici 15**.



**Slika 15** Grafički prikaz istraživanja

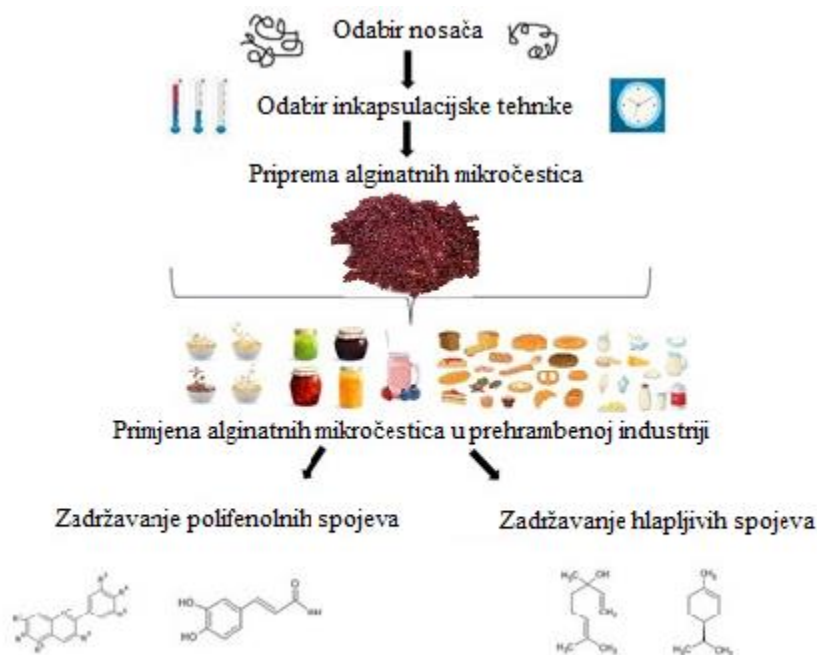
Hipoteze istraživanja:

- Ionsko geliranje pogodna je metoda za mikroinkapsulaciju fenolnih i hlapljivih komponenata soka aronije;
- Sastav nosača alginatnih mikročestica utječe na mikroinkapsulaciju polifenolnih i hlapljivih komponenata;
- Svojstva polifenola utječu na njihovu mikroinkapsulaciju;
- Fizikalno-kemijske karakteristike hlapljivih komponenti utječu na njihovu mikroinkapsulaciju;
- Dodatno kompleksiranje biopolimernih čestica u otopini za geliranje utječe na mikroinkapsulaciju polifenolnih i hlapljivih komponenata;
- Bioaktivne komponente soka aronije zadržane u alginatnim mikročesticama nositelji su antioksidacijske aktivnosti;
- Bioaktivne komponente soka aronije zadržane u alginatnim mikročesticama inhibiraju  $\alpha$ -amilazu i  $\alpha$ -glukozidazu.

Ovo istraživanje doprinosi nadogradnji dosadašnjih saznanja vezanih za inkapsulaciju različitih bioaktivnih komponenti (Capablanca i sur., 2017; Savic Gajic i sur., 2021; Olivares i sur., 2017).

Ujedno doprinosi proširenju znanja vezanih uz utjecaj sastava omotača na inkapsulaciju polifenola i hlapljivih komponenata soka aronije. Alginatne mikročestice pokazuju nehomogena svojstva i zbog toga se njihova svojstva poboljšavaju dodatkom drugih nosača (Belščak-Cvitanović i sur., 2016a). U dosadašnjim istraživanjima uz alginat kao biopolimer najčešće se koristio hitozan (Cho i sur., 2014) koji je korišten i u ovom istraživanju, ali su se koristili i drugi biopolimeri koji imaju primjenu u prehrambenoj industriji poput pululana, pektina, karboksimetil celuloze i ksantan gume. Osim odabira nosača, dokazan je i utjecaj vremena kompleksiranja u otopini za geliranje na zadržavanje bioaktivnih komponenti (Zam i sur., 2014). Ova mikroinkapsulacijska tehnika, osim za polifenole, može se primijeniti i za inkapsulaciju probiotika (Olivares i sur., 2017), eteričnih ulja (Lucía i sur., 2017) i DNK (Quong i sur., 1998).

Posljednjih godina mikroinkapsulacija se uspješno koristi za proizvodnju poboljšanih tzv. „delivery systems“ bioaktivnih komponenata u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Molino i sur., 2022). Pripremljene alginatne mikročestice mogu se primjenjivati u prehrambenoj industriji zbog sposobnosti ugrađivanja u prehrambene proizvode bez smanjenja kvalitete te zbog sposobnosti zaštite bioaktivnih sastojka od kemijske, fizičke ili biološke degradacije, njihove isporuke na željeno mjesto ili produžetka roka trajanja proizvoda (Nazmus Saqib i sur., 2022). Moguća primjena alginatnih mikročestica prikazana je na **Slici 16**. Proučavanjem inkapsulacije bioaktivnih tvari u alginatne mikročestice, dokazano je povećanje stabilnosti i kontrolirano otpuštanje bioaktivnih spojeva te druga svojstva važna za razvoj sastojaka funkcionalne hrane (Aguirre-Calvo i sur., 2021). Mikročestice se mogu koristiti kao sastojak funkcionalne hrane jer su komponente koje se koriste za njihovu proizvodnju nutritivno bogate i sigurne za konzumaciju (Corrêa-Filho i sur., 2019).



Slika 16 Primjena alginatnih mikročestica u prehrambenoj industriji

### 3.2. MATERIJALI

Sok aronije upotrijebljen za pripremu alginatnih mikročestica nabavljen je od lokalnog proizvođača iz okolice Varaždina (Remetinec, 46°10'37.5"N 16°20'02.3"E). Korištena je natrijeva sol alginske kiseline (vrlo niske viskoznosti), Alfa Aesar GmbH & Co KG (Karlsruhe, Njemačka), hitozan, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD), pululan, Hayashibara Co., Ltd. (Okayama, Japan), kalcijev klorid, Gram-mol (Zagreb, Hrvatska), dok su nisko esterificirani pektin, karboksimetil celuloza i ksantan guma proizvodi tvrtke CP Kelco (San Diego, CA, SAD).

Za spektrofotometrijske analize korišteni su:

- Galna kiselina, čistoće 97,5 – 102,5 %, 2,2'-azinobis(3-etilbenziazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol, čistoće > 98 %, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, 4-(dimetilamino)-cinamaldehyd,  $\alpha$ -amilaza iz svinjske gušterače,  $\alpha$ -glukozidaza iz *Saccharomyces cerevisiae*, željezov(III) klorid, čistoće 97 %, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD);
- Procijanidin B2, čistoće  $\geq$  90 %, Cijanidin-3-O-glukozid klorid, čistoće  $\geq$  96 % Extrasynthese (Genay, Francuska);



- Trolox, čistoće 97 %, neokuproin hemihidrat, čistoće > 99 %, 2,4,6-tris (2-piridil)-s-triazin, čistoće 99 %, bakrov(II) klorid dihidrat, čistoće 99 %, Acros Organics (Geel, Belgija);
- Folin-ciocalteuov reagens, Carlo Erba Reagents, (Sabadell, Španjolska);
- 4-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranozid, čistoće > 98 %, 3-5-dintriosalicilna kiselina, čistoće > 97 %, akarboza, čistoće 95 %, Alfa Aesar GmbH & Co KG (Karlsruhe, Njemačka);
- Škrob, kalij-peroksodisulfat, kalij-dihidrogenfosfat Kemika (Zagreb, Hrvatska);
- Kalijev natrijev tartarat tetrahidrat, natrijev hidroksid, natrijev karbonat T.T.T. (Sveta Nedjelja, Hrvatska);
- Natrijev acetat, kalijev klorid, amonijev acetat, Gram-mol (Zagreb, Hrvatska);

Za HPLC analizu korišteni su sljedeći standardi:

- Cijanidin-3-*O*-galaktozid klorid, čistoće  $\geq$  97 %, cijanidin-3-*O*-arabinozid klorid, čistoće  $\geq$  95 %, kvercetin-3-galaktozid, čistoće  $\geq$  98 %, neoklorogenska kiselina, čistoće  $\geq$  99 %, Extrasynthese (Genay, Francuska);
- Kvercetin-3-rutinozid (hidrat), čistoće 94 % Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD);
- Klorogenska kiselina, čistoće 98 %, Acros Organics (Geel, Belgija).

Od ostalih kemikalija korišten je mirtenol, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD), natrijev klorid, Kemika (Zagreb, Hrvatske), metanol, HPLC čistoće, J.T. Baker (Deventer, Nizozemska), etanol 96 %, Gram-mol (Zagreb, Hrvatska), klorovodična kiselina 37 %, Panreac (Barcelona, Španjolska), orto-fosforna kiselina 85 %, HPLC čistoće, Fisher Scientific (Loughborough, UK) i octena kiselina 99,5 %, T.T.T. (Sveta Nedjelja, Hrvatska).

## 3.3. METODE

### 3.3.1. Priprema alginatnih mikročestica

Inkapsulacijska otopina pripremljena je od soka aronije u kojem je otopljen natrijev alginat (3,75 %) pomoću homogenizatora (GLH 850 Homogenizer, Omni International, Kennesaw, GA, SAD). Tako pripremljena otopina kompleksirana je na magnetskoj miješalici 15 min pri 60 °C. Zatim su u otopinu alginata dodane različite količine drugih nosača: pululan (0,5 %, 1 %, 1,5 % i 2 %), pektin (0,5 %, 1 %, 1,5 % i 2 %), ksantan guma (0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 % i 0,5 %) i karboksimetil celuloza (0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 % i 0,5 %), dok je hitozan (0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 % i 0,5 %)

otopljen u otopini za geliranje. Ove otopine kompleksirane su dodatnih 30 min na magnetskoj miješalici. Otopina za geliranje pripravljena je otapanjem 5 %  $\text{CaCl}_2$  u soku aronije. Priprema mikročestica provedena je uporabom uređaja Encapsulator B-390 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Švicarska, **Slika X**) pri uvjetima: 1000  $\mu\text{m}$  veličina mlaznice, tlak 200 mbar, frekvencija 200 Hz i napon 1000 V. Kompleksiranje dobivenih mikročestica u otopini za geliranje provedeno je kroz različiti vremenski period odnosno 30 ili 90 minuta. Tako pripravljene mikročestice filtrirane su i zatim ekstrahirane.

### 3.3.2. Ekstrakcija uzoraka za spektrofotometrijske analize i HPLC analizu

Za ekstrakciju polifenolnih komponenti, izvagano je oko 3 g uzorka te je dodano 10 mL zakiseljenog metanola (metanol:HCl u omjeru 99:1). Uzorci su tretirani ultrazvukom u ultrazvučnoj kupelji tijekom 15 min, a zatim centrifugirani pri 8700 rpm tijekom 10 min. Nakon centrifugiranja, supernatanti su odvojeni, a talog ekstrahiran istim postupkom. Supernatanti su spojeni i zatim analizirani. Sve spektrofotometrijske analize provedene su uporabom UV-Vis spektrofotometra (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) koji je prikazan na **Slici 17**.



**Slika 17** UV-Vis spektrofotometar

### 3.3.3. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Za određivanje sadržaja ukupnih polifenola korištena je Folin-Ciocalteu metoda (Singleton i sur., 1965). U staklenu epruvetu otpipetirano je 0,1 mL ekstrakta, 0,9 mL destilirane vode, 5 mL Folin-Ciocalteu (1:10) reagensa i 4 mL otopine natrijevog karbonata (7,5 %). Provedena je inkubacija pri sobnoj temperaturi u trajanju od 120 min na tamnom mjestu. Apsorbancija na 765 nm izmjerena je pomoću spektrofotometra. Mjerenja su provedena u tri paralele, rezultati su izračunati pomoću

kalibracijskog pravca standarda galne kiseline konstruiranog u rasponu 200 – 1200 mg/L ( $r^2 = 0,9919$ ), a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata galne kiseline po g uzorka (mg EGK/g).

### 3.3.4. Određivanje sadržaja monomernih antocijanina

Za određivanje sadržaja monomernih antocijanina korištena je pH diferencijalna metoda (Giusti i Wrodsad, 2001). U dvije epruvete otpipetirano je 0,2 mL ekstrakta. U jednu epruvetu dodano je 2,8 mL kalij klorid pufera (0,025 M, pH 1), a u drugu 2,8 mL natrij acetat pufera (0,4 M, pH 4,5). Reakcijske smjese inkubirane su 15 min na tamnom mjestu i zatim je apsorbancija izmjerena na valnim duljinama od 517 nm i 700 nm. Mjerenja su provedena u tri paralele, a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata cijanidin-3-glukozida po g uzorka (mg EC3G/g). Apsorbancija uzorka je izračunata prema sljedećoj formuli (1):

$$A = (A_{515} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{515} - A_{700})_{\text{pH } 4,5} \quad (1)$$

Sadržaj monomernih antocijanina izračunat je prema sljedećoj formuli (2):

$$\gamma = (A \times M \times FR \times 1000) / \varepsilon \times l \quad (2)$$

gdje je:  $\gamma$  - koncentracija antocijanina izražena kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida,

M - molekulska masa cijanidin-3-glukozida (449,2 g/mol),

FR - faktor razrjeđenja,

$\varepsilon$  - molarni koeficijent apsorpcije (26 900 L/mol cm),

l - duljina kivete (1 cm).

### 3.3.5. Određivanje sadržaja proantocijanidina

Za određivanje proantocijanidina korištena je metoda prema Prior i sur. (2010). U staklenu epruvetu otpipetirano je 0,5 mL ekstrakta i 1 mL DMAC (4-(dimetilamino)-cinamaldehyd) reagensa ( $\gamma = 1$  mg/mL) pripremljenog u zakiseljenom etanolu (75 % etanola, 12,5 % vode, 12,5 % HCl (37 %)). Reakcijska smjena inkubirana je 30 min te je izmjerena apsorbancija pri 640 nm. Mjerenja su provedena u tri paralele, rezultati su izračunati pomoću kalibracijskog pravca standarda procijanidina B2 konstruiranog u rasponu 10 – 80  $\mu\text{g/g}$  ( $r^2 = 0,9971$ ), a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata procijanidina B2 po g uzorka (mg EPB2/g).

### 3.3.6. Analiza polifenolnih spojeva HPLC metodom

Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) analizirani su pojedinačni polifenoli u uzorcima. HPLC sustav 1260 Infinity II (Agilent Technology, Santa Clara, CA, SAD) (Slika 18) opremljen je kvaternom pumpom, kolonom za razdvajanje Poroshell 120 (EC C-18 column,  $4.6 \times 100$  mm,  $2.7 \mu\text{m}$ ) i detektorom s nizom dioda (DAD). Prije injektiranja, 1 mL ekstrakta filtriran je uporabom PTFE filtera. Injektirani volumen bio je  $5 \mu\text{L}$ , a protok  $1 \text{ mL/min}$ . Kao mobilne faze korištene su  $0,1 \%$  ortofosforna kiselina (mobilna faza A) i  $100\%$  metanol (mobilna faza B). Primijenjena je gradijentna elucija: 0 min  $5 \%$  B, 3 min  $30 \%$  B, 15 min  $35 \%$  B, 22 min  $37 \%$  B, 30 min  $41 \%$  B, 32 min  $45 \%$  B, 40 min  $49 \%$  B, 45 min  $80 \%$  B, 48 min  $80 \%$  B, 50 min  $5 \%$  B, 53 min  $5 \%$  B koja je prethodno opisana kod Ivić i sur. (2021). Spektar je sniman u području valnih duljina od 190 do 600 nm. Fenolne kiseline detektirane su na valnoj duljini 320 nm, flavonoli na 360 nm, a antocijanini na 520 nm. Usporedbom retencijskog vremena i UV-Vis spektra čistih standarda provedena je kvalitativna analiza polifenolnih spojeva u uzorcima, a dodavanjem poznatih količina standarda u uzorke potvrđena je njihova identifikacija. Kvantitativna analiza polifenolnih spojeva u uzorcima provedena je integriranjem površine ispod pikova na temelju prethodno konstruiranog kalibracijskog pravca za pojedine polifenolne spojeve. Otopine standarda pripremljene su u različitim koncentracijama kako slijedi: cijanidin-3-galaktozid ( $4 - 512 \text{ mg/L}$ ), cijanidin-3-arabinozid ( $3,3 - 415 \text{ mg/L}$ ), neoklorogenska kiselina ( $1 - 150 \text{ mg/L}$ ), klorogenska kiselina ( $5 - 250 \text{ mg/L}$ ), kvercetin-3-galaktozid ( $2,3 - 75 \text{ mg/L}$ ) i kvercetin-3-rutinozid ( $1 - 150 \text{ mg/L}$ ). Linearnom regresijom dobivena je jednadžba pravca za svaki spoj te su izračunati koeficijenti korelacije koji potvrđuju linearnost metode u cijelom području ispitivanih koncentracija te oni iznose: cijanidin-3-galaktozid ( $r^2=0.9998$ ), cijanidin-3-arabinozid ( $r^2=0.9996$ ), neoklorogenska kiselina ( $r^2=0,9992$ ), klorogenska kiselina ( $r^2=0,9997$ ), kvercetin-3-galaktozid ( $r^2=1$ ) i kvercetin-3-rutinozid ( $r^2=0,998$ ).



**Slika 18** HPLC sustav za analizu pojedinih polifenolnih spojeva

### 3.3.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Antioksidacijska aktivnost uzoraka određena je pomoću četiri različite metode kako bi se odredio cjelokupni antioksidacijski kapacitet pripremljenih uzoraka. Za određivanje antioksidacijske aktivnosti mjerenja su provedena u tri paralele, a rezultati su izraženi kao mmol ekvivalenata Trolox-a po 100 g uzorka (mmol TE/100 g).

#### *FRAP metoda*

Ova metoda prethodno je opisana kod Benzie i Strain (1996). U staklenu epruvetu dodano je 0,2 mL ekstrakta i 3 mL FRAP reagensa koji se priprema miješanjem 25 mL acetatnog pufera (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL TPTZ otopine (2,4,6-tripiridil-s-triazin otopljen u 40 mmol/L otopini HCl-a) i 2,5 mL otopine  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (20 mM). Nakon što su uzorci inkubirani na tamnom mjestu tijekom 30 min, apsorbancija je izmjerena na 593 nm.

#### *CUPRAC metoda*

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti pomoću CUPRAC metode u staklenu epruvetu dodano je 1 mL 10 mM otopine  $\text{CuCl}_2$ , 1 mL 7,5 mM otopine neokuproina i 1 mL 1 M amonijevog acetatnog pufera (pH 7,0) te ekstrakt i voda u ukupnom volumenu od 1,1 mL. Nakon inkubacije

tijekom 30 min na tamnom mjestu, apsorbancija je izmjerena na 450 nm. Ova metoda detaljno je opisana kod Apak i sur. (2004).

#### *DPPH metoda*

Kako bi se provela DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metoda, bilo je potrebno otpipetirati 0,2 mL ekstrakta u staklenu epruvetu te dodati 3 mL DPPH otopine (0,5 mM otopina u 96 % etanolu). Nakon što su uzorci inkubirani tijekom 15 min na tamnom mjestu, apsorbancija je izmjerena na 517 nm. Ova metoda prethodno je opisana kod Brand-Williams i sur. (1995).

#### *ABTS metoda*

Ova metoda provedena je prema protokolu opisanom kod Arnao i sur. (2001). ABTS reagens pripremljen je miješanjem 10 mL otopine 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol ( $\gamma = 4$  mg/mL) i 10 mL otopine  $K_2S_2O_8$  ( $\gamma = 7$  mg/mL). U staklenu epruvetu dodano je 0,2 mL ekstrakta i 3,2 mL pripremljenog ABTS reagensa. Inkubacija je provedena tijekom 95 min u mraku te je uzrocima izmjerena apsorbancija na 734 nm.

### **3.3.8. Inhibicija enzima $\alpha$ -amilaze**

Metoda za određivanje inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze prethodno je opisana kod Kellogg i sur. (2014) i Nyambe-Silavwe i sur. (2015). Otopine kalijevog natrijevog tartarata tetrahidrata ( $c = 5,3$  mol/L, pripremljena u 2 M NaOH) i 3,5-dinitrosalicilne kiseline ( $c = 96$  mmol/L) zagrijane su na 90 °C na magnetskoj miješalici. Miješanjem vode, otopine kalijevog natrijevog tartarata tetrahidrata i otopine 3,5-dinitrosalicilne kiseline u omjeru 3:2:5 dobiven je DNS reagens potreban za provedbu ove analize. Otopine škroba ( $\gamma = 2,5$  mg/mL) i  $\alpha$ -amilaze (3 U/mL) pripremljene su u fosfatnom puferu ( $c = 0,02$  mol/L, pH 6,9). Inkubacija uzoraka provedena je uporabom Combitherm-2 CH 3-150 (BioSan, Riga, Latvija) uređaja koji je prikazan na **Slici 19**. Otpipetirano je 50  $\mu$ L razrijeđenog uzorka i pomiješano s 200  $\mu$ L škroba te je provedena inkubacija na 37 °C tijekom 10 min. Zatim je dodano 200  $\mu$ L pripremljene otopine  $\alpha$ -amilaze te je ponovno provedena inkubacija na 37 °C, ali tijekom 15 min. Nakon dodatka 1 mL DNS reagensa provedena je inkubacija na 95 °C tijekom 15 min te je apsorbancija izmjerena na 540 nm. Detaljan protokol za određivanje inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze prikazan je u **Tablici 4**.



Slika 19 Uređaj za inkubaciju uzoraka

Tablica 4 Protokol za određivanje inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze

	Neinhibirana reakcija		Inhibirana reakcija	
	Slijepa proba	Glavna proba	Slijepa proba	Glavna proba
Pufer	300 $\mu$ L	100 $\mu$ L	250 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Uzorak	0 $\mu$ L	0 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Škrob	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L
$\alpha$ -amilaza	0 $\mu$ L	200 $\mu$ L	0 $\mu$ L	200 $\mu$ L
DNS reagens	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L

Inhibicija enzima  $\alpha$ -amilaze izračunata prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{(\Delta A_{\text{neinhibirana reakcija}} - \Delta A_{\text{inhibirana reakcija}})}{\Delta A_{\text{neinhibirana reakcija}}} \times 100 \quad (3)$$

gdje  $\Delta A_{\text{neinhibirana reakcija}}$  označava razliku apsorbancije neinhibirane reakcije i pripadajuće slijepe probe, a  $\Delta A_{\text{inhibirana reakcija}}$  označava razliku apsorbancije inhibirane reakcije i pripadajuće slijepe probe.

### 3.3.9. Inhibicija enzima $\alpha$ -glukozidaze

Metoda za određivanje inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze prethodno je opisana kod Granados-Guzmán i sur. (2018). Otpipetirano je 165  $\mu$ L razrijeđenog ekstrakta te pomiješano s 85  $\mu$ L otopine p-nitrofenil- $\alpha$ -glukopiranozida (pNPG,  $\gamma = 0,4$  mg/mL) pripremljene u fosfatnom puferu ( $c = 0,1$  mol/L, pH 6,8) i provedena je inkubacija na 37 °C tijekom 10 min. Zatim je dodano 85  $\mu$ L otopine  $\alpha$ -glukozidaze (0,55 U/mL, pripremljeno u fosfatnom puferu) te je ponovno provedena inkubacija na 37 °C, ali tijekom 17,5 min. Dodatkom 665  $\mu$ L otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,1 M) zaustavljena je reakcija te je apsorbancija izmjerena na 405 nm. Inkubacija uzoraka provedena je uporabom Combitherm-2 CH 3-150 (BioSan, Riga, Latvija) uređaja prikazanog na Slici 19. Detaljan protokol za određivanje inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze prikazan je u Tablici 5 te je inhibicija enzima  $\alpha$ -

glukozidaze izračunata prema formuli (3).

**Tablica 5** Protokol za određivanje inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze

	Neinhibirana reakcija		Inhibirana reakcija	
	Slijepa proba	Glavna proba	Slijepa proba	Glavna proba
Pufer	250 $\mu$ L	165 $\mu$ L	85 $\mu$ L	0 $\mu$ L
Uzorak	0 $\mu$ L	0 $\mu$ L	165 $\mu$ L	165 $\mu$ L
pNPG	85 $\mu$ L	85 $\mu$ L	85 $\mu$ L	85 $\mu$ L
$\alpha$ -glukozidaza	0 $\mu$ L	85 $\mu$ L	0 $\mu$ L	85 $\mu$ L
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	665 $\mu$ L	665 $\mu$ L	665 $\mu$ L	665 $\mu$ L

### 3.3.10. Analiza hlapljivih komponenata GC-MS metodom

Plinski kromatograf s masenim detektorom (GC-MS) korišten je za određivanje hlapljivih komponenata u pripremljenim uzorcima. Korišteni uređaj prikazan je na **Slici 20** (Agilent 7890B s masenim detektorom Agilent 5977A (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)). Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME) primijenjena je u svrhu uzorkovanja te ja kao polimerna stacionarna faza korišten divinilbenzen-karboksen-polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) debljine 80  $\mu$ m (Supelco, Bellefonte, SAD) koji se nalazio unutar igle. U vijalu je dodano 5 g uzorka, 1 g NaCl i 10  $\mu$ L internog standarda mirtenola ( $\gamma = 0,5$  g/L). Vijala s teflonskim čepom dodana je u vodenu kupelj te je njezin sadržaj zagrijavan na 40 °C i miješan tijekom 5 min radi zasićenja nadprostora uzorka hlapljivim komponentama, nakon čega je u nadprostor postavljena SPME igla s navedenim punilom. Zatim je provedena adsorpcija na temperaturi od 40 °C u trajanju od 45 min. Nakon što je adsorpcija završena, igla je stavljena u injektor plinskog kromatografa gdje se događa njihova toplinska desorpcija u kolonu plinskog kromatografa. U maseni detektor zatim najprije dopijevaju lakše hlapljivi spojevi. Uvjeti rada plinskog kromatografa prikazani su u **Tablici 6**.





**Slika 20** Plinski kromatograf s masenim detektorom (GC-MS)

**Tablica 6** Uvjeti rada plinskog kromatografa

Parametri ekstrakcije	temperatura ekstrakcije: 40 °C vrijeme ekstrakcije: 45 min SPME punilo: 80 µm DVB/CAR/PDMS (Supelco)
GC-MS analitički uvjeti	kolona: HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) početna temperatura: 40 °C (10 min) temperaturni gradijent 1: 3 °C/min do 120 °C temperaturni gradijent 2: 10 °C/min do 250 °C konačna temperatura: 250 °C temperatura injektora: 250 °C vrijeme desorpcije: 7 min temperatura detektora: 250 °C plin nosač: helij 5,0 (čistoće 99,9%) (Messer Austria, Gumpoldskirchen, Austria) energija ionizacije: 70 eV maseni interval (m/z): 40 – 400

Dobiveni pikovi i maseni spektri uspoređivani su s bazom spojeva *Nist08* (National Institute of Standards and Technology, SAD) i *Wiley 9* (Wiley, SAD). Izračunat je i linearni retencijski indeks za svaki spoj koristeći standard koji sadrži smjesu alkana C7 – C30 i koji je analiziran pri istim GC-MS uvjetima. Za izračun je korištena sljedeća formula (4):

$$RI = 100 \times \left[ (n + (N - n) \frac{\log t_x - \log t_n}{\log t_N - \log t_n}) \right] \quad (4)$$

gdje je: RI – retencijski indeks, n – broj C atoma u alkanu koji izlazi prije nepoznatog spoja, N – broj C atoma u alkanu koji izlazi nakon nepoznatog spoja, x – nepoznati spoj, t – retencijsko

vrijeme (min). U **Tablici 7** prikazana su fizikalno-kemijska svojstva i aromatske note hlapljivih komponenata identificiranih i kvantificiranih u ovom istraživanju.

**Tablica 7** Fizikalno-kemijska svojstva i aromatske note detekriranih hlapljivih komponenti

Spoj	RT (min)	RI	MW (g/mol)	log P (o/w)	VP (mmHg)	Aromatska nota
2-etilheksanska kiselina	26,53	1128	144,214	2,640	0,03	-
Oktanska kiselina	29,16	1188	144,21	3,050	0,022	Masna nota
Nonanska kiselina	33,20	1277	158,24	3,420	0,009	Masna nota
Dekanska kiselina	37,48	1376	172,27	4,090	$3,66 \times 10^{-4}$	Masna nota
Laurinska kiselina	41,75	1558	200,32	4,600	$1,598 \times 10^{-5}$	Masna nota
Palmitinska kiselina	47,56	2004	256,43	7,170	$3,8 \times 10^{-7}$	Masna nota
3-heksen-1-ol	7,54	849	100,16	1,697	1,039	Zelena nota
Heks-1-ol	8,38	868	102,18	2,030	0,947	Zelena nota
2-etilheksan-1-ol	19,68	1030	130,23	2,820	0,207	Citrusna nota
Oktan-1-ol	23,12	1072	130,23	3,000	0,079	Zelena nota
1-okten-3-ol	17,18	980	128,2	2,520	0,531	Zemljana nota
Nonan-1-ol	28,45	1174	144,26	3,770	0,041	Masna nota
Perilil alkohol	33,75	1286	152,24	2,100	0,006	Zelena nota
Fenetil alkohol	24,36	1103	122,17	1,360	0,087	Cvjetna nota
Izoamil alkohol	3,71	734	88,148	1,280	2,37	Voćna nota
Benzil alkohol	20,24	1037	192,3	3,200	0,008	Cvjetna nota
Benzaldehid	14,76	955	106,12	1,480	1,270	Voćna nota
6-metil-5-hepten-2-on	17,04	987	126,20	2,070	0,841	Citrusna nota
Oktanal	17,9018	997	128,31	2,951	2,068	Zelena nota
Nonanal	23,99	1095	142,24	3,461	0,532	Citrusna nota
Dekanal	29,40	1200	156,27	3,970	0,207	Cvjetna nota
Etil-benzaldehid	30,17	1208	134,18	2,408	0,106	Voćna nota
Dodekanal	39,03	1406	184,32	4,106	0,01	Citrusna nota
Geranil-aceton	39,51	1448	194,32	3,834	0,016	Cvjetna nota
Lilial	40,05	1517	204,31	4,216	0,005	Cvjetna nota
Heksil-cinamal	44,62	1738	216,32	4,866	0,001	Cvjetna nota
Guaiakol	23,70	1081	124,14	1,320	0,179	Zelena nota
<i>trans</i> -pinokarveol	26,14	1125	152,24	1,630	0,028	Drvenasta nota
D-limonen	19,19	1018	136,24	4,570	0,198	Citrusna nota
Linalol oksid	21,99	1068	170,25	1,375	0,002	Cvjetna nota
Linalol	23,74	1096	154,25	2,970	0,016	Citrusna nota
Mentol	27,62	1167	156,27	3,216	0,032	Menta
$\beta$ -citronelol	31,17	1228	156,27	3,480	0,02	Cvjetna nota
Vitispiran	33,33	1269	192,30	3,620	0,022	Cvjetna nota
Eugenol	36,99	1354	164,2	2,660	0,0221	Začinska nota
$\beta$ -damascenon	37,60	1377	190,29	4,042	0,020	Cvjetna nota
$\alpha$ -ionon	38,83	1417	192,30	3,995	0,014	Cvjetna nota
$\beta$ -ionon	40,23	1477	192,30	3,995	0,017	Cvjetna nota
$\gamma$ -ionon	40,08	1470	192,30	3,505	0,008	Cvjetna nota
Cedrol	42,34	1592	222,37	4,330	0,001	Drvenasta nota
Etil-heksanoat	18,06	998	144,21	2,823	1,665	Voćna nota
Etil-dekanoat	38,00	1391	200,32	4,861	0,034	Voćna nota

Metil-dihidroxjasmonat	43,11	1644	226,32	2,653	0,001	Cvjetna nota
Heksil-salicilat	43,70	1685	222,28	5,070	0,00049	Zelena nota
Heksil-acetat	18,75	1009	144,21	2,870	1,391	Voćna nota
Etil-miristat	44,85	1778	256,42	7,090	0,003	Masna nota
Izopropil-miristat	45,21	1810	270,46	7,710	$9,35 \times 10^{-5}$	Masna nota
Etil-pentadekanoat	46,24	1880	270,45	7,62	0,00047	Med
Metil-palmitat	46,50	1907	270,45	7,38	$6 \times 10^{-5}$	Masna nota
Etil-palmitat	47,01	1978	284,48	6,760	$7 \times 10^{-5}$	Masna nota

RT – retencijsko vrijeme; RI – retencijski indeks, MW – molekulska masa; log P – logaritam koeficijenta oktanol voda koji pokazuje relativnu hidrofobnost komponente; VP – tlak pare.

### 3.3.11. FTIR-ATR analiza

FTIR-ATR analizom (infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom uz prigušenu totalnu refleksiju) utvrđene su strukturne promjene u pripremljenim alginatnim mikročesticama. Za potrebe FTIR-ATR analize pripremljene su alginatne mikročestice bez dodatka soka aronije istim postupkom kao i mikročestice sa sokom aronije te je snimljen njihov IR spektar kako bi se utvrdile strukturne promjene nakon inkapsulacije polifenola. Snimanje IR spektra provedeno je u rasponu  $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$  pomoću Cary 630 FTIR spektrometra opremljenim sa softverom MicroLab Expert (Agilent Technology, Santa Clara, CA, SAD) prikazanog na **Slici 21**.



**Slika 21** FTIR spektrometar

### 3.3.12. Statistička obrada podataka

Svi dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Rezultati su obrađeni u računalnom programu Statistica 13.1 (StatSoft Inc., Tulsa, SAD) pomoću metode analize varijanci (ANOVA) i Fisher-ovog LSD testa (test najmanje značajne razlike,  $P < 0,05$ )

## **4. REZULTATI**

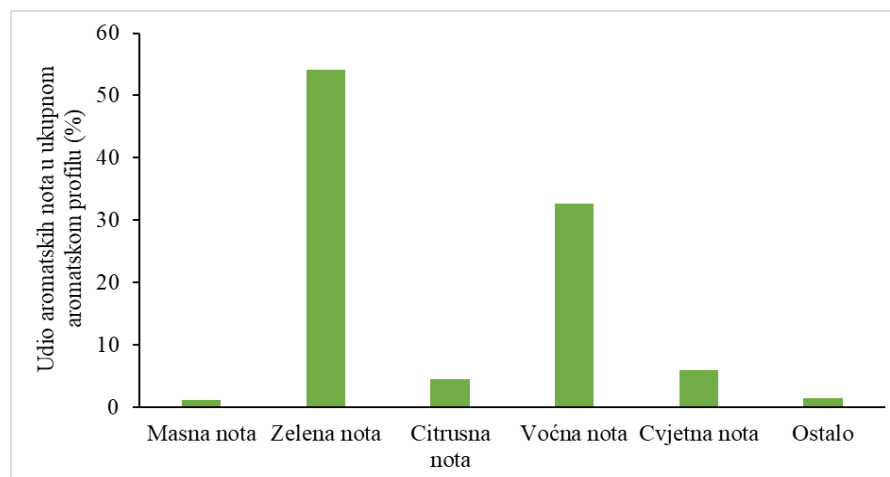
## 4.1. SOK ARONIJE

**Tablica 8** Sadržaj pojedinačnih polifenola, antioksidacijska aktivnost i sposobnost inhibicije enzima soka aronije korištenog za pripremu alginatnih mikročestica

<b>Sadržaj pojedinačnih polifenola u soku aronije određen HPLC analizom (mg/L)</b>					
	Cijanidin-3-galaktozid			4,81±0,30	
	Cijanidin-3-arabinozid			1,19±0,00	
	Neoklorogenska kiselina			188,45±13,17	
	Klorogenska kiselina			48,64±0,25	
	Kvercetin-3-galaktozid			9,12±0,25	
	Kvercetin-3-rutinozid			17,28±0,19	
<b>Antioksidacijska aktivnost soka aronije (μmol/100 mL)</b>					
	DPPH			30,40±0,91	
	ABTS			103,81±2,02	
	FRAP			3,97±0,67	
	CUPRAC			242,88±4,92	
<b>Inhibicija enzima</b>					
	Koncentracija polifenola (mg/L)	% inhibicije	Koncentracija akarboze (mg/L)	% inhibicije	
	Inhibicija α-amilaze	6,26±0,02	26,06±0,37	6,67	52,11
	Inhibicija α-glukozidaze	0,02±0,00	85,94±1,14	200	66,04

**Tablica 9** Sadržaj hlapljivih komponenti soka aronije korištenog za pripremu alginatnih mikročestica ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Hlapljive komponente									
Kiseline	104,49 $\pm$ 2,40	Alkoholi	6602,10 $\pm$ 156,58	Karbonilni spojevi	1186,25 $\pm$ 16,52	Terpeni	550,70 $\pm$ 10,13	Esteri	158,44 $\pm$ 2,50
2-etilheksanska kiselina	7,78 $\pm$ 0,54	Izoamil alkohol	1656,33 $\pm$ 18,75	Benzaldehid	1013,26 $\pm$ 12,16	D-limonen	5,94 $\pm$ 0,23	Etil-heksanoat	79,10 $\pm$ 0,68
Nonanska kiselina	66,39 $\pm$ 0,56	3-heksen-1-ol	1135,08 $\pm$ 35,98	6-metil-5-hepten-2-on	22,89 $\pm$ 0,13	Linalol oksid	26,00 $\pm$ 2,60	Heksil-acetat	34,31 $\pm$ 0,64
Dekanska kiselina	16,83 $\pm$ 1,19	Heks-1-ol	3423,14 $\pm$ 78,32	Nonanal	54,96 $\pm$ 2,17	Linalol	40,16 $\pm$ 0,90	Etil-dekanoat	12,84 $\pm$ 0,39
Laurinska kiselina	12,23 $\pm$ 0,07	1-okten-3-ol	16,47 $\pm$ 0,15	Dekanal	46,36 $\pm$ 0,73	Mentol	85,36 $\pm$ 2,42	Metil-dihidrojasmonat	14,11 $\pm$ 0,11
Palmitinska kiselina	1,28 $\pm$ 0,04	2-etilheksan-1-ol	268,52 $\pm$ 18,40	Etil-benzaldehid	15,90 $\pm$ 0,35	$\beta$ -citronelol	11,47 $\pm$ 0,18	Heksil-salicilat	6,77 $\pm$ 0,11
		Oktan-1-ol	65,60 $\pm$ 1,47	Geranil aceton	17,09 $\pm$ 0,54	Vitispiran	258,62 $\pm$ 2,19	Etil-miristat	4,21 $\pm$ 0,02
		Fenetil alkohol	14,47 $\pm$ 1,25	Lilial	9,83 $\pm$ 0,31	Eugenol	13,80 $\pm$ 0,29	Etil-pentadekanoat	3,04 $\pm$ 0,17
		Perilil alkohol	22,48 $\pm$ 0,90	Heksil-cinamal	5,97 $\pm$ 0,13	$\beta$ -damascenon	78,31 $\pm$ 0,09	Metil-palmitat	1,36 $\pm$ 0,08
						$\alpha$ -ionon	8,93 $\pm$ 0,27	Etil-palmitat	2,70 $\pm$ 0,32
						$\beta$ -ionon	17,17 $\pm$ 0,64		
						$\gamma$ -ionon	4,94 $\pm$ 0,33		

**Slika 22** Aromatski profil soka aronije korištenog za pripremu alginatnih mikročestica

## 4.2. SADRŽAJ UKUPNIH POLIFENOLA, ANTOCIJANINA I PROANTOCIJANIDINA U ALGINATNIM MIKROČESTICAMA

**Tablica 10** Sadržaj ukupnih polifenola, proantocijanidina i antocijanina u alginatnim mikročesticama bez i s dodatkom pululana ili pektina (mg/100 g)

Uzorak	Ukupni polifenoli	Proantocijanidini	Antocijanini
A-30	635,03±0,12 <sup>g</sup>	193,29±1,11 <sup>h</sup>	8,30±0,04 <sup>h,i</sup>
A-90	637,86±8,44 <sup>g</sup>	198,49±0,55 <sup>g</sup>	8,77±0,22 <sup>g,h</sup>
A-0.5 PUL-30	968,91±17,47 <sup>b</sup>	271,76±0,69 <sup>c</sup>	11,89±0,06 <sup>c</sup>
A-0.5 PUL-90	869,26±12,61 <sup>e</sup>	258,99±0,24 <sup>f</sup>	11,12±0,22 <sup>d</sup>
A-1 PUL-30	948,76±0,02 <sup>b,c</sup>	260,92±0,39 <sup>e</sup>	11,14±0,26 <sup>d</sup>
A-1 PUL-90	1060,10±15,74 <sup>a</sup>	295,34±1,16 <sup>a</sup>	13,96±0,67 <sup>a</sup>
A-1.5 PUL-30	886,01±20,81 <sup>d,e</sup>	272,06±1,24 <sup>c</sup>	11,52±0,25 <sup>c,d</sup>
A-1.5 PUL-90	949,26±7,06 <sup>b,c</sup>	288,95±0,67 <sup>b</sup>	13,03±0,25 <sup>b</sup>
A-2 PUL-30	897,18±5,44 <sup>d</sup>	262,90±1,49 <sup>d</sup>	11,48±0,30 <sup>c,d</sup>
A-2 PUL-90	923,83±19,68 <sup>c</sup>	271,76±1,83 <sup>c</sup>	11,53±0,47 <sup>c,d</sup>
A-0.5 P-30	571,96±2,78 <sup>h</sup>	152,86±1,28 <sup>m</sup>	7,50±0,03 <sup>j</sup>
A-0.5 P-90	594,51±19,10 <sup>h</sup>	151,57±0,25 <sup>m</sup>	8,00±0,36 <sup>i,j</sup>
A-1 P-30	637,90±12,73 <sup>g</sup>	157,11±0,25 <sup>l</sup>	9,21±0,25 <sup>f,g</sup>
A-1 P-90	641,77±13,19 <sup>g</sup>	163,42±0,12 <sup>j,k</sup>	8,33±0,06 <sup>h,i</sup>
A-1.5 P-30	640,69±4,75 <sup>g</sup>	165,06±0,10 <sup>j</sup>	9,61±0,26 <sup>f</sup>
A-1.5 P-90	632,63±9,38 <sup>g</sup>	161,66±0,29 <sup>k</sup>	8,87±0,29 <sup>g,h</sup>
A-2 P-30	592,99±9,02 <sup>h</sup>	155,75±0,45 <sup>l</sup>	9,75±0,10 <sup>e,f</sup>
A-2 P-90	707,53±5,09 <sup>f</sup>	179,69±0,45 <sup>i</sup>	10,24±0,32 <sup>e</sup>

A – alginat; PUL – pululan; P – pektin; 0.5, 1, 1.5, 2 – postotak korištenog nosača; 30, 90 – vrijeme kompleksiranja (min). Vrijednosti u istom stupcu s različitim eksponentima su statistički značajno različite ( $P < 0,05$ , ANOVA, Fisher-ov LSD test).

**Tablica 11** Sadržaj ukupnih polifenola, proantocijanidina i antocijanina u alginatnim mikročesticama bez i s dodatkom hitozana, karboksimetil celuloze ili ksantan gume (mg/100 g)

Uzorak	Ukupni polifenoli	Proantocijanidini	Antocijanini
A-30	635,03±0,12 <sup>j,k,l,m,n</sup>	193,29±1,11 <sup>n</sup>	8,30±0,04 <sup>q</sup>
A-90	637,86±8,44 <sup>j,k,l,m</sup>	198,49±0,55 <sup>k,l</sup>	8,77±0,22 <sup>n,o,p</sup>
A-0.1 C-30	670,88±21,05 <sup>g,h,i</sup>	162,90±1,86 <sup>s</sup>	8,63±0,27 <sup>n,o,p,q</sup>
A-0.1 C-90	587,07±9,49 <sup>o,p,q</sup>	149,51±1,29 <sup>w</sup>	8,72±0,01 <sup>n,o,p,q</sup>
A-0.2 C-30	641,75±8,33 <sup>j,k,l</sup>	173,18±0,30 <sup>q</sup>	10,04±0,06 <sup>l,m</sup>
A-0.2 C-90	580,20±21,76 <sup>p,q</sup>	150,92±0,24 <sup>v</sup>	8,41±0,10 <sup>p,q</sup>
A-0.3 C-30	681,98±32,16 <sup>g,h</sup>	159,40±0,70 <sup>t</sup>	9,93±0,20 <sup>l,m</sup>
A-0.3 C-90	569,83±0,23 <sup>q,r</sup>	149,21±0,35 <sup>w</sup>	8,81±0,20 <sup>n,o,p</sup>
A-0.4 C-30	631,08±2,55 <sup>k,l,m,n</sup>	165,79±0,32 <sup>r</sup>	8,87±0,09 <sup>n,o</sup>
A-0.4 C-90	547,14±4,74 <sup>r,s</sup>	143,62±0,18 <sup>y</sup>	8,62±0,20 <sup>n,o,p,q</sup>
A-0.5 C-30	532,45±17,24 <sup>s</sup>	145,82±0,32 <sup>x</sup>	8,44±0,36 <sup>o,p,q</sup>
A-0.5 C-90	579,03±0,00 <sup>p,q</sup>	154,16±0,79 <sup>u</sup>	9,05±0,14 <sup>n</sup>
A-0.1 CMC-30	811,36±14,59 <sup>c,d</sup>	239,21±0,22 <sup>f</sup>	13,95±0,12 <sup>j</sup>

A-0.1 CMC-90	820,20±16,90 <sup>c,d</sup>	241,72±0,34 <sup>e</sup>	14,89±0,35 <sup>i</sup>
A-0.2 CMC-30	858,10±9,84 <sup>b</sup>	252,04±0,02 <sup>d</sup>	17,86±0,06 <sup>g</sup>
A-0.2 CMC-90	958,78±21,99 <sup>a</sup>	281,86±0,47 <sup>a</sup>	26,04±0,13 <sup>c</sup>
A-0.3 CMC-30	839,44±18,17 <sup>b,c</sup>	257,12±0,42 <sup>b</sup>	27,15±0,45 <sup>a</sup>
A-0.3 CMC-90	671,16±7,29 <sup>g,h,i</sup>	201,95±0,54 <sup>j</sup>	19,57±0,06 <sup>f</sup>
A-0.4 CMC-30	744,47±4,98 <sup>f</sup>	230,78±0,24 <sup>g</sup>	25,57±0,09 <sup>d</sup>
A-0.4 CMC-90	779,94±26,51 <sup>e</sup>	238,10±0,66 <sup>f</sup>	26,89±0,12 <sup>a,b</sup>
A-0.5 CMC-30	657,23±26,73 <sup>h,i,j,k</sup>	217,48±1,02 <sup>h</sup>	14,60±0,26 <sup>i</sup>
A-0.5 CMC-90	773,49±0,58 <sup>e</sup>	231,62±0,50 <sup>g</sup>	13,76±0,30 <sup>j</sup>
A-0.1 K-30	606,80±1,16 <sup>n,o,p</sup>	185,54±0,22 <sup>p</sup>	10,25±0,10 <sup>l</sup>
A-0.1 K-90	610,73±6,13 <sup>m,n,o</sup>	186,25±0,69 <sup>p</sup>	10,31±0,10 <sup>l</sup>
A-0.2 K-30	649,61±14,35 <sup>i,j,k</sup>	199,75±0,66 <sup>k</sup>	20,71±0,43 <sup>e</sup>
A-0.2 K-90	638,83±10,53 <sup>k,l,m</sup>	196,80±1,04 <sup>m</sup>	19,67±0,16 <sup>f</sup>
A-0.3 K-30	793,31±1,16 <sup>d,e</sup>	254,70±0,79 <sup>c</sup>	26,52±0,54 <sup>b</sup>
A-0.3 K-90	689,69±17,59 <sup>g</sup>	203,67±0,84 <sup>i</sup>	20,43±0,23 <sup>e</sup>
A-0.4 K-30	639,17±1,27 <sup>j,k,l,m</sup>	197,66±0,08 <sup>l,m</sup>	17,29±0,04 <sup>h</sup>
A-0.4 K-90	620,02±6,25 <sup>l,m,n</sup>	191,22±0,74 <sup>o</sup>	20,30±0,04 <sup>e</sup>
A-0.5 K-30	593,39±6,36 <sup>o,p,q</sup>	196,74±0,54 <sup>m</sup>	10,86±0,10 <sup>k</sup>
A-0.5 K-90	663,53±17,81 <sup>g,h,i,j</sup>	196,78±0,02 <sup>m</sup>	9,76±0,06 <sup>m</sup>

A – alginat; C – hitozan; CMC – karboksimetil celuloza; K – ksantan guma; 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 – postotak korištenog nosača; 30, 90 – vrijeme kompleksiranja (min). Vrijednosti u istom stupcu s različitim eksponentima su statistički značajno različite ( $P < 0,05$ , ANOVA, Fisher-ov LSD test).



### 4.3. SADRŽAJ INDIVIDUALNIH POLIFENOLA U ALGINATNIM MIKROČESTICAMA

**Tablica 12** Sadržaj individualnih polifenola u alginatnim mikročesticama bez i s dodatkom pululana ili pektina (mg/kg) određen HPLC analizom

Uzorak	C-3-gal	C-3-ara	R	K-3-gal	NK	KK	Ukupno
A-30	29,23±0,25 <sup>f</sup>	6,77±0,08 <sup>e,f</sup>	61,97±0,02 <sup>f</sup>	36,85±0,28 <sup>e</sup>	299,78±0,39 <sup>c</sup>	193,98±0,02 <sup>e</sup>	628,58±1,04 <sup>e</sup>
A-90	28,87±0,07 <sup>g</sup>	7,51±0,09 <sup>b,c</sup>	60,64±0,36 <sup>g</sup>	36,24±0,11 <sup>f</sup>	283,07±0,43 <sup>d</sup>	188,38±0,32 <sup>f</sup>	604,71±1,38 <sup>f</sup>
A-0.5 PUL-30	30,65±0,00 <sup>d</sup>	7,36±0,04 <sup>c,d</sup>	63,95±0,28 <sup>d,e</sup>	38,24±0,06 <sup>c,d</sup>	301,25±2,73 <sup>b,c</sup>	204,36±2,62 <sup>d</sup>	645,81±5,73 <sup>d,e</sup>
A-0.5 PUL-90	30,26±0,16 <sup>e</sup>	7,61±0,04 <sup>b</sup>	63,83±0,76 <sup>e</sup>	37,94±0,34 <sup>d</sup>	297,70±7,82 <sup>c</sup>	203,93±5,65 <sup>d</sup>	641,27±14,77 <sup>d,e</sup>
A-1 PUL-30	30,80±0,09 <sup>c,d</sup>	7,30±0,01 <sup>c,d</sup>	64,92±0,46 <sup>c</sup>	38,66±0,13 <sup>b,c</sup>	303,86±4,18 <sup>b,c</sup>	209,23±3,01 <sup>c,d</sup>	654,77±7,88 <sup>b,c,d</sup>
A-1 PUL-90	31,77±0,31 <sup>a</sup>	7,84±0,08 <sup>a</sup>	66,99±0,68 <sup>a</sup>	39,98±0,19 <sup>a</sup>	308,30±6,55 <sup>a,b</sup>	215,33±4,67 <sup>a,b</sup>	670,18±12,48 <sup>a,b,c</sup>
A-1.5 PUL-30	31,02±0,09 <sup>c</sup>	7,27±0,03 <sup>d</sup>	65,60±0,00 <sup>b,c</sup>	38,66±0,07 <sup>b,c</sup>	313,74±2,45 <sup>a</sup>	218,46±2,31 <sup>a</sup>	674,75±4,95 <sup>a,b</sup>
A-1.5 PUL-90	31,41±0,16 <sup>b</sup>	7,84±0,08 <sup>a</sup>	66,31±0,06 <sup>a,b</sup>	38,79±0,09 <sup>b</sup>	313,83±1,46 <sup>a</sup>	220,61±1,24 <sup>a</sup>	678,79±3,09 <sup>a</sup>
A-2 PUL-30	30,73±0,09 <sup>c,d</sup>	7,65±0,07 <sup>a,b</sup>	64,75±0,40 <sup>c,d</sup>	37,92±0,13 <sup>d</sup>	299,09±0,92 <sup>c</sup>	210,94±0,06 <sup>b,c</sup>	651,08±1,67 <sup>c,d</sup>
A-2 PUL-90	30,91±0,09 <sup>c,d</sup>	7,58±0,00 <sup>b</sup>	64,83±0,46 <sup>c</sup>	38,19±0,02 <sup>d</sup>	300,01±0,68 <sup>c</sup>	211,09±0,56 <sup>b,c</sup>	652,61±1,81 <sup>c,d</sup>
A-0.5 P-30	28,58±0,24 <sup>h,i</sup>	6,44±0,04 <sup>g,h</sup>	54,72±0,20 <sup>h</sup>	34,29±0,30 <sup>g,h</sup>	199,13±4,25 <sup>d</sup>	119,67±3,45 <sup>h</sup>	442,83±8,48 <sup>g,h</sup>
A-0.5 P-90	28,08±0,02 <sup>j</sup>	6,30±0,11 <sup>h</sup>	53,13±0,26 <sup>j</sup>	33,77±0,04 <sup>i</sup>	182,19±6,73 <sup>g</sup>	111,38±4,39 <sup>i</sup>	414,85±11,55 <sup>i</sup>
A-1 P-30	28,39±0,05 <sup>i</sup>	6,75±0,08 <sup>e,f</sup>	54,04±0,00 <sup>h,i</sup>	34,21±0,11 <sup>g,h</sup>	182,94±1,05 <sup>f,g</sup>	112,53±0,61 <sup>i</sup>	418,86±1,90 <sup>i</sup>
A-1 P-90	28,36±0,11 <sup>i,j</sup>	6,46±0,04 <sup>g,h</sup>	54,04±0,22 <sup>h,i</sup>	34,28±0,11 <sup>g,h</sup>	185,06±0,11 <sup>f,g</sup>	116,72±0,56 <sup>h,i</sup>	424,92±1,15 <sup>h,i</sup>
A-1.5 P-30	28,86±0,19 <sup>g,h</sup>	6,25±0,01 <sup>h</sup>	53,54±0,32 <sup>i,j</sup>	33,32±0,52 <sup>j</sup>	188,88±3,24 <sup>e,f,g</sup>	120,06±0,26 <sup>g,h</sup>	430,91±4,54 <sup>g,h,i</sup>
A-1.5 P-90	28,49±0,01 <sup>i</sup>	6,59±0,36 <sup>h</sup>	53,51±0,12 <sup>i,j</sup>	33,94±0,09 <sup>h,i</sup>	189,81±0,15 <sup>e,f</sup>	121,12±0,26 <sup>g,h</sup>	433,46±0,99 <sup>g,h,i</sup>
A-2 P-30	28,49±0,04 <sup>i</sup>	6,59±0,36 <sup>f,g</sup>	54,47±0,62 <sup>h</sup>	34,07±0,21 <sup>g,h,i</sup>	185,83±2,61 <sup>f,g</sup>	120,14±3,70 <sup>g,h</sup>	431,59±7,54 <sup>g,h,i</sup>
A-2 P-90	29,18±0,02 <sup>f</sup>	6,81±0,05 <sup>c</sup>	54,70±0,80 <sup>h</sup>	34,47±0,17 <sup>g</sup>	195,52±1,74 <sup>d,e</sup>	125,37±2,15 <sup>g</sup>	446,05±4,93 <sup>g</sup>

A – alginat; PUL – pululan; P – pektin; 0.5, 1, 1.5, 2 – postotak korištenog nosača; 30, 90 – vrijeme kompleksiranja (min); C-3-gal – cijanidin-3-galaktozid; C-3-ara – cijanidin-3-arabinozid; R – rutin; K-3-gal – kvercetin-3-galaktozid; NK – neoklorogenska kiselina; KK – klorogenska kiselina. Vrijednosti u istom stupcu s različitim eksponentima su statistički značajno različite ( $P < 0,05$ , ANOVA, Fisher-ov LSD test).

**Tablica 13** Sadržaj individualnih polifenola u alginatnim mikročesticama bez i s dodatkom hitozana, karboksimetil celuloze ili ksantan gume (mg/kg) određen HPLC analizom

Uzorak	C-3-gal	C-3-ara	R	K-3-gal	NK	KK	Ukupno
A-30	29,23±0,25 <sup>l,m</sup>	6,77±0,08 <sup>n,o,p</sup>	61,97±0,02 <sup>a,b</sup>	36,85±0,28 <sup>b,c,d</sup>	299,78±0,39 <sup>a</sup>	193,98±0,02 <sup>a</sup>	628,58±1,04 <sup>a</sup>

A-90	28,87±0,07 <sup>l,m,n</sup>	7,51±0,09 <sup>m</sup>	60,64±0,36 <sup>b,c,d,e,f</sup>	36,24±0,11 <sup>d,e</sup>	283,07±0,43 <sup>b</sup>	188,38±0,32 <sup>b</sup>	604,71±1,38 <sup>b</sup>
A-0.1 C-30	28,40±0,46 <sup>l,m,n</sup>	6,73±0,08 <sup>n,o,p</sup>	55,62±1,64 <sup>m,n,o</sup>	34,39±0,09 <sup>h,i</sup>	194,76±6,03 <sup>j,k,l</sup>	126,00±2,14 <sup>i,j,k,l</sup>	445,90±10,44 <sup>h</sup>
A-0.1 C-90	28,92±0,30 <sup>l,m,n</sup>	6,81±0,03 <sup>n,o,p</sup>	53,89±0,18 <sup>p,q,r</sup>	33,44±0,35 <sup>j,k,l</sup>	188,30±3,03 <sup>m,n</sup>	121,72±1,98 <sup>k,l,m,n</sup>	433,08±5,87 <sup>h,j</sup>
A-0.2 C-30	27,84±0,07 <sup>l,m,n</sup>	6,80±0,01 <sup>n,o,p</sup>	53,10±0,66 <sup>r,s</sup>	33,50±0,22 <sup>j,k</sup>	191,14±1,07 <sup>k,lm</sup>	126,25±1,69 <sup>i,j,k</sup>	438,63±3,72 <sup>h,i</sup>
A-0.2 C-90	28,86±0,41 <sup>l,m,n</sup>	7,00±0,03 <sup>n,o</sup>	53,13±0,74 <sup>r,s</sup>	33,52±0,06 <sup>j,k</sup>	189,41±5,92 <sup>m,n</sup>	125,72±4,14 <sup>i,j,k,l,m</sup>	437,64±11,3 <sup>h,i</sup>
A-0.3 C-30	27,74±0,72 <sup>m,n</sup>	6,82±0,00 <sup>n,o,p</sup>	54,43±0,56 <sup>o,p,q,r</sup>	33,65±0,32 <sup>j</sup>	191,61±0,43 <sup>k,l,m</sup>	129,56±0,29 <sup>h,i</sup>	443,81±2,32 <sup>h</sup>
A-0.3 C-90	28,27±0,57 <sup>l,m,n</sup>	6,51±0,05 <sup>p</sup>	52,46±1,60 <sup>s</sup>	32,80±0,06 <sup>l</sup>	184,25±0,25 <sup>n,o</sup>	118,17±4,00 <sup>n</sup>	422,46±6,53 <sup>ij</sup>
A-0.4 C-30	28,75±0,31 <sup>l,m,n</sup>	7,07±0,03 <sup>n</sup>	53,76±1,68 <sup>q,r,s</sup>	33,60±0,02 <sup>j</sup>	187,36±0,59 <sup>m,n</sup>	122,28±0,64 <sup>j,k,l,m,n</sup>	432,82±3,27 <sup>h,i,j</sup>
A-0.4 C-90	29,49±0,07 <sup>l</sup>	6,90±0,00 <sup>n,o</sup>	54,31±1,64 <sup>o,p,q,r</sup>	33,45±0,17 <sup>j,k,l</sup>	187,13±0,80 <sup>m,n</sup>	126,71±4,99 <sup>ij</sup>	437,99±7,68 <sup>h,i</sup>
A-0.5 C-30	27,43±0,15 <sup>n</sup>	6,70±0,12 <sup>o,p</sup>	55,07±0,86 <sup>o,p,q</sup>	33,83±1,19 <sup>ij</sup>	175,55±0,01 <sup>p</sup>	121,33±3,42 <sup>l,m,n</sup>	419,91±5,75 <sup>j</sup>
A-0.5 C-90	28,00±0,46 <sup>l,m,n</sup>	6,96±0,00 <sup>n,o</sup>	55,23±0,76 <sup>n,o,p</sup>	32,90±0,04 <sup>k,l</sup>	187,79±0,23 <sup>m,n</sup>	128,09±0,80 <sup>h,i</sup>	438,97±2,29 <sup>h,i</sup>
A-0.1 CMC-30	37,17±0,10 <sup>i</sup>	9,73±0,03 <sup>i</sup>	53,03±0,56 <sup>h,i</sup>	35,80±0,22 <sup>e,f</sup>	113,70±6,95 <sup>t</sup>	42,14±5,11 <sup>t</sup>	291,57±12,95 <sup>l</sup>
A-0.1 CMC-90	37,38±0,20 <sup>i</sup>	9,33±0,07 <sup>j</sup>	59,88±0,12 <sup>d,e,f,g,h</sup>	36,35±0,00 <sup>c,d,e</sup>	124,63±4,10 <sup>s</sup>	52,47±3,83 <sup>s</sup>	220,04±8,32 <sup>m</sup>
A-0.2 CMC-30	51,45±1,26 <sup>h</sup>	15,06±0,11 <sup>h</sup>	60,52±0,42 <sup>c,d,e,f,g</sup>	36,96±0,11 <sup>b,c</sup>	134,88±3,08 <sup>r</sup>	65,37±3,59 <sup>r</sup>	364,24±8,57 <sup>k</sup>
A-0.2 CMC-90	67,23±0,64 <sup>f</sup>	20,89±0,21 <sup>g</sup>	61,90±0,02 <sup>a,b,c</sup>	39,03±1,03 <sup>a</sup>	160,48±4,29 <sup>q</sup>	83,47±3,46 <sup>q</sup>	433,00±9,65 <sup>h,i,j</sup>
A-0.3 CMC-30	98,36±0,32 <sup>a</sup>	30,08±0,59 <sup>a</sup>	62,57±0,16 <sup>a</sup>	38,36±0,04 <sup>a</sup>	163,92±3,31 <sup>q</sup>	94,70±2,95 <sup>p</sup>	487,99±7,37 <sup>f</sup>
A-0.3 CMC-90	79,84±0,10 <sup>d</sup>	23,20±0,15 <sup>d</sup>	59,88±0,28 <sup>d,e,f,g,h</sup>	36,47±0,07 <sup>c,d,e</sup>	179,21±2,28 <sup>o,p</sup>	107,69±1,94 <sup>o</sup>	486,29±4,82 <sup>f</sup>
A-0.4 CMC-30	89,19±3,22 <sup>c</sup>	27,94±0,21 <sup>c</sup>	60,63±0,38 <sup>b,c,d,e,f</sup>	37,31±0,11 <sup>b</sup>	190,13±1,94 <sup>l,m</sup>	120,97±0,45 <sup>m,n</sup>	526,17±6,31 <sup>e</sup>
A-0.4 CMC-90	94,10±2,61 <sup>b</sup>	29,70±0,41 <sup>b</sup>	61,19±0,22 <sup>a,b,c,d</sup>	37,49±0,11 <sup>b</sup>	196,05±2,38 <sup>ij,k</sup>	129,41±2,19 <sup>h,i</sup>	547,94±7,92 <sup>d</sup>
A-0.5 CMC-30	37,80±0,35 <sup>i</sup>	9,92±0,08 <sup>i</sup>	59,15±0,16 <sup>g,h,i</sup>	35,90±0,09 <sup>e</sup>	197,99±2,00 <sup>ij</sup>	125,47±1,82 <sup>ij,k,l,m</sup>	466,23±4,5 <sup>g</sup>
A-0.5 CMC-90	37,20±0,26 <sup>i</sup>	9,86±0,08 <sup>i</sup>	59,74±0,14 <sup>e,f,g,h</sup>	36,18±0,32 <sup>d,e</sup>	207,15±0,29 <sup>h</sup>	135,05±0,67 <sup>g</sup>	485,18±1,76 <sup>f</sup>
A-0.1 K-30	35,00±0,16 <sup>j,k</sup>	8,63±0,28 <sup>k</sup>	56,83±0,26 <sup>k,l,m</sup>	34,67±0,28 <sup>g,h</sup>	201,12±0,50 <sup>i</sup>	127,47±0,81 <sup>i</sup>	463,72±2,29 <sup>g</sup>
A-0.1 K-90	33,36±0,05 <sup>k</sup>	7,93±0,17 <sup>l</sup>	57,56±0,02 <sup>j,k,l</sup>	34,87±0,22 <sup>g,h</sup>	208,20±0,23 <sup>g,h</sup>	132,42±0,34 <sup>g,h</sup>	474,34±1,03 <sup>f,d</sup>
A-0.2 K-30	73,77±0,04 <sup>d,e</sup>	22,31±0,15 <sup>f</sup>	59,36±0,22 <sup>f,g,h,i</sup>	35,91±0,30 <sup>e</sup>	219,57±0,68 <sup>d,e</sup>	148,29±0,75 <sup>e</sup>	559,21±2,14 <sup>c,d</sup>
A-0.2 K-90	73,32±0,12 <sup>d,e</sup>	22,05±0,11 <sup>f</sup>	58,84±0,20 <sup>h,i,j</sup>	35,83±0,28 <sup>e,f</sup>	215,66±0,43 <sup>e,f</sup>	146,28±0,37 <sup>e,f</sup>	551,98±1,51 <sup>d</sup>
A-0.3 K-30	87,72±0,22 <sup>c</sup>	28,14±0,01 <sup>c</sup>	61,10±0,16 <sup>b,c,d,e</sup>	37,19±0,13 <sup>b</sup>	229,50±0,05 <sup>c</sup>	161,30±1,27 <sup>c</sup>	604,98±1,84 <sup>b</sup>
A-0.3 K-90	74,67±0,02 <sup>d</sup>	22,73±0,09 <sup>e</sup>	58,80±0,20 <sup>h,i,j</sup>	36,01±0,21 <sup>e</sup>	223,60±0,03 <sup>d</sup>	154,33±0,27 <sup>d</sup>	570,14±0,82 <sup>c</sup>
A-0.4 K-30	53,34±0,04 <sup>g</sup>	15,38±0,29 <sup>h</sup>	57,27±0,20 <sup>k,l</sup>	35,19±0,21 <sup>f,g</sup>	230,57±0,51 <sup>c</sup>	157,89±0,97 <sup>c,d</sup>	549,64±2,22 <sup>d</sup>
A-0.4 K-90	72,74±0,48 <sup>e</sup>	22,17±0,17 <sup>f</sup>	58,07±0,40 <sup>ij,k</sup>	35,90±0,06 <sup>e</sup>	218,33±0,86 <sup>e</sup>	153,56±1,32 <sup>d</sup>	560,77±3,29 <sup>c,d</sup>
A-0.5 K-30	35,39±0,14 <sup>j</sup>	8,68±0,23 <sup>k</sup>	56,79±0,20 <sup>k,l,m</sup>	34,62±0,22 <sup>g,h</sup>	212,73±0,60 <sup>f,g</sup>	142,12±0,07 <sup>f</sup>	490,33±1,46 <sup>f</sup>
A-0.5 K-90	33,60±0,17 <sup>k</sup>	8,39±0,01 <sup>k</sup>	56,63±0,44 <sup>l,m,n</sup>	34,46±0,09 <sup>h,i</sup>	212,29±0,62 <sup>f,g,h</sup>	143,31±0,17 <sup>f</sup>	488,68±1,50 <sup>f</sup>

A – alginat; C – hitozan; CMC – karboksimetil celuloza; K – ksantan guma; 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 – postotak korištenog nosača; 30, 90 – vrijeme kompleksiranja (min); C-3-gal – cijanidin-3-galaktozid; C-3-ara – cijanidin-3-arabinozid; R – rutin; K-3-gal – kvercetin-3-galaktozid; NK – neoklorogenska kiselina; KK – klorogenska kiselina. Vrijednosti u istom stupcu s različitim eksponentima su statistički značajno različite (P < 0,05, ANOVA, Fisher-ov LSD test).

#### 4.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST I INHIBICIJA ENZIMA $\alpha$ -AMILAZE I $\alpha$ -GLUKOZIDAZE ALGINATNIH MIKROČESTICA

**Tablica 14** Antioksidacijska aktivnost alginatnih mikročestica bez i s dodatkom pululana ili pektina ( $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ )

Uzorak	FRAP	CUPRAC	DPPH	ABTS
A-30	4,32±0,14 <sup>f,g</sup>	308,69±1,70 <sup>h</sup>	29,21±1,19 <sup>f</sup>	32,66±0,28 <sup>i</sup>
A-90	4,51±0,06 <sup>f</sup>	317,62±1,16 <sup>g</sup>	28,71±0,45 <sup>f</sup>	31,03±0,18 <sup>j</sup>
A-0.5 PUL-30	6,92±0,15 <sup>c</sup>	490,86±4,26 <sup>c</sup>	36,70±0,15 <sup>d</sup>	60,53±0,89 <sup>d</sup>
A-0.5 PUL-90	6,50±0,18 <sup>c</sup>	448,78±2,84 <sup>f</sup>	32,19±0,20 <sup>e</sup>	54,91±0,58 <sup>f</sup>
A-1 PUL-30	6,80±0,25 <sup>c,d</sup>	469,27±0,84 <sup>d</sup>	43,57±0,22 <sup>b</sup>	56,22±0,66 <sup>e,f</sup>
A-1 PUL-90	8,36±0,28 <sup>b</sup>	545,81±0,61 <sup>b</sup>	43,68±1,53 <sup>b</sup>	75,16±0,42 <sup>b</sup>
A-1.5 PUL-30	12,34±0,32 <sup>a</sup>	822,96±16,26 <sup>a</sup>	61,81±1,11 <sup>a</sup>	114,29±0,27 <sup>a</sup>
A-1.5 PUL-90	8,06±0,13 <sup>b</sup>	551,40±3,81 <sup>b</sup>	39,71±0,29 <sup>c</sup>	67,32±0,44 <sup>c</sup>
A-2 PUL-30	6,52±0,17 <sup>d,e</sup>	459,17±4,97 <sup>e</sup>	36,49±0,84 <sup>d</sup>	56,66±0,97 <sup>e</sup>
A-2 PUL-90	6,90±0,20 <sup>c</sup>	474,45±2,52 <sup>d</sup>	35,37±0,39 <sup>d</sup>	60,28±0,51 <sup>d</sup>
A-0.5 P-30	3,06±0,03 <sup>l</sup>	229,24±1,74 <sup>l</sup>	21,29±0,22 <sup>j</sup>	27,81±0,47 <sup>k</sup>
A-0.5 P-90	3,36±0,01 <sup>k,l</sup>	228,84±0,32 <sup>l</sup>	23,42±1,27 <sup>i</sup>	28,79±0,72 <sup>k</sup>
A-1 P-30	3,59±0,02 <sup>j,k</sup>	265,27±3,20 <sup>j,k</sup>	21,36±0,59 <sup>j</sup>	33,20±0,20 <sup>i</sup>
A-1 P-90	3,81±0,02 <sup>h,i,j</sup>	262,39±3,26 <sup>j,k</sup>	22,60±0,23 <sup>i,j</sup>	33,71±0,12 <sup>i</sup>
A-1.5 P-30	4,01±0,04 <sup>h,i</sup>	269,60±0,48 <sup>j</sup>	25,00±0,68 <sup>h</sup>	37,10±0,53 <sup>h</sup>
A-1.5 P-90	3,70±0,01 <sup>i,j,k</sup>	259,15±1,29 <sup>k</sup>	22,94±0,16 <sup>i</sup>	39,54±0,72 <sup>g</sup>
A-2 P-30	3,36±0,02 <sup>k,l</sup>	256,04±4,58 <sup>k</sup>	23,61±0,09 <sup>h,i</sup>	34,19±1,55 <sup>i</sup>
A-2 P-90	4,11±0,13 <sup>g,h</sup>	279,60±5,04 <sup>i</sup>	26,53±0,31 <sup>g</sup>	36,65±1,83 <sup>h</sup>

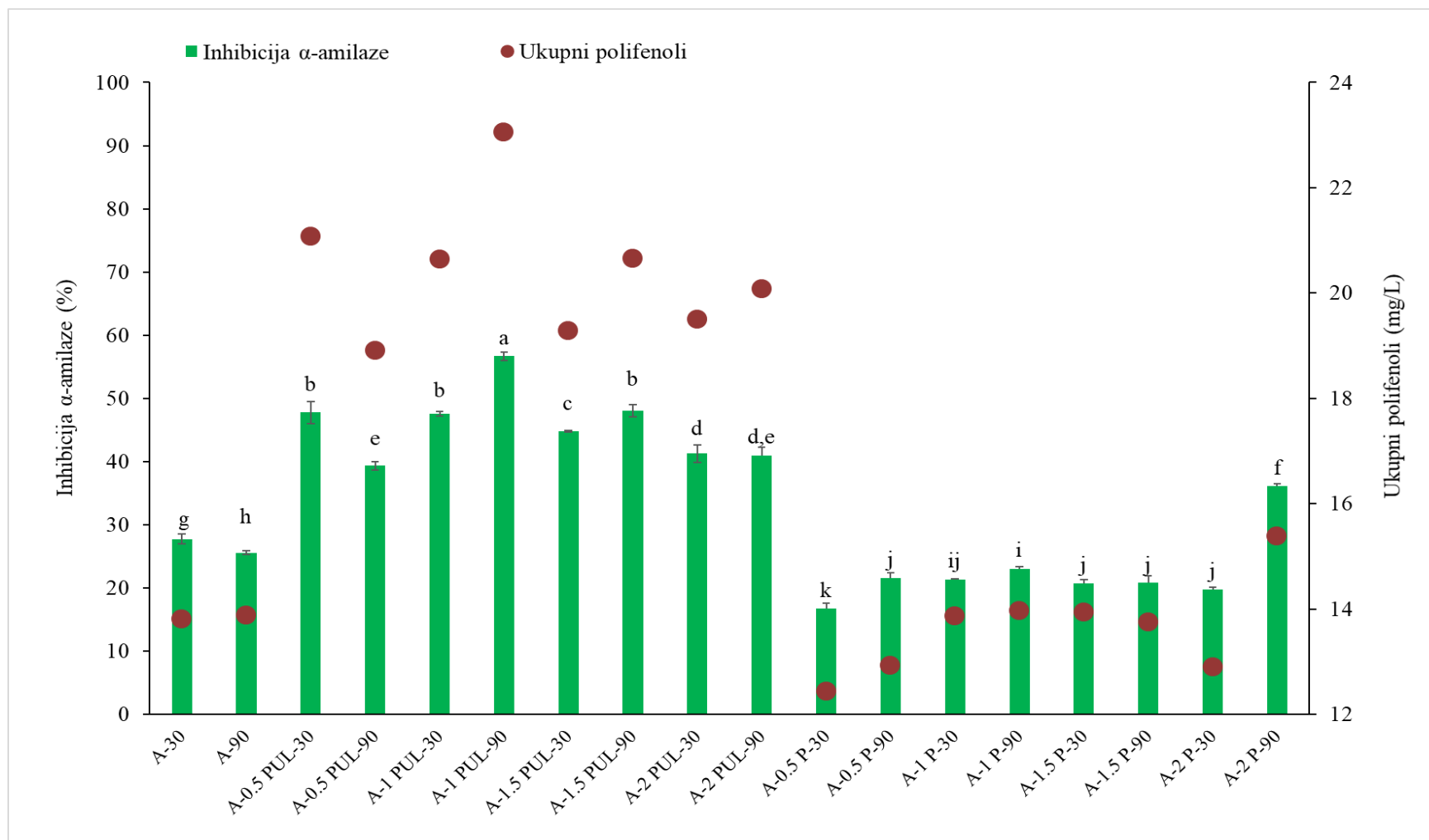
A – alginat; PUL – pululan; P – pektin; 0.5, 1, 1.5, 2 – postotak korištenog nosača; 30, 90 – vrijeme kompleksiranja (min). Vrijednosti u istom stupcu s različitim eksponentima su statistički značajno različite ( $P < 0,05$ , ANOVA, Fisher-ov LSD test).

**Tablica 15** Antioksidacijska aktivnost alginatnih mikročestica bez i s dodatkom hitozana, karboksimetil celuloze ili ksantan gume ( $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ )

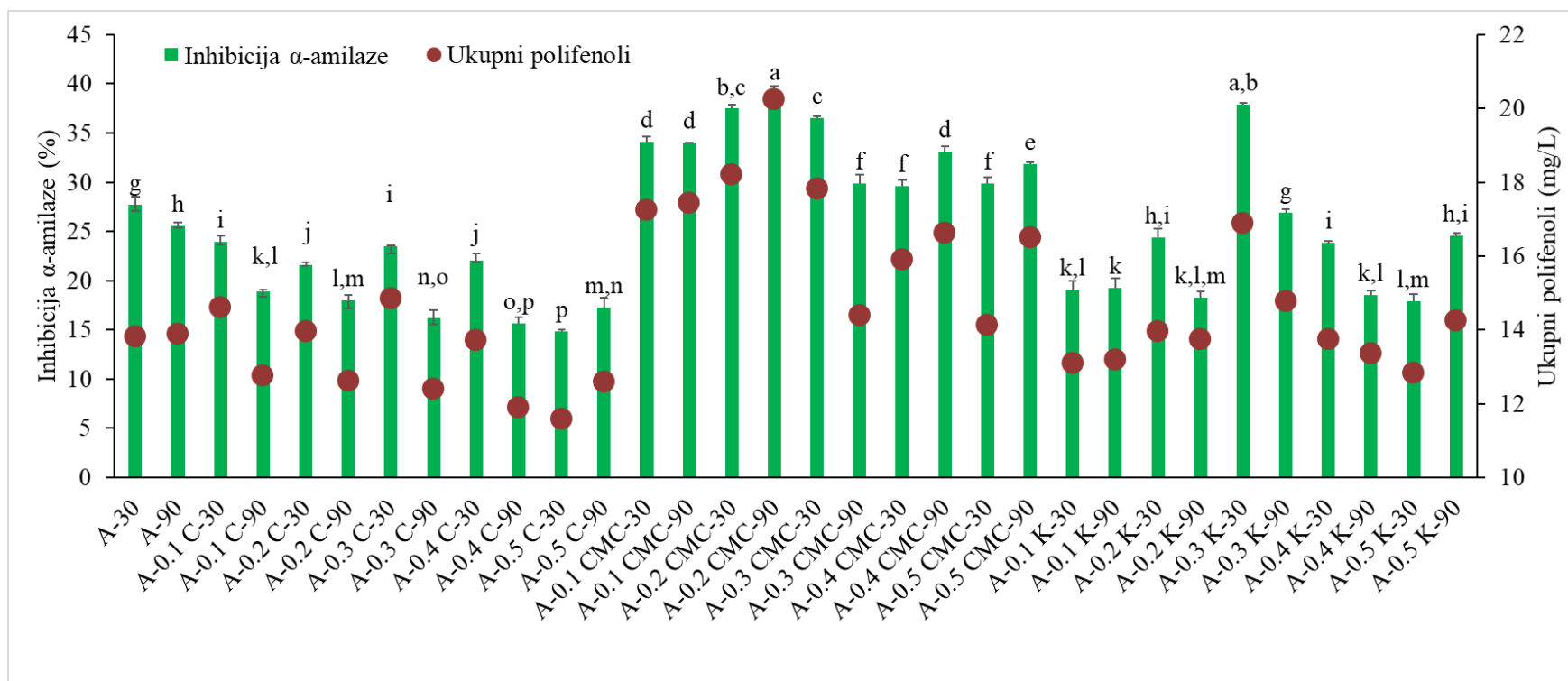
Uzorak	FRAP	CUPRAC	DPPH	ABTS
A-30	4,32±0,14 <sup>i</sup>	308,69±1,70 <sup>i</sup>	29,21±1,19 <sup>a</sup>	32,66±0,28 <sup>l,m</sup>
A-90	4,51±0,06 <sup>h</sup>	317,62±1,16 <sup>h</sup>	28,71±0,45 <sup>a</sup>	31,03±0,18 <sup>m,n</sup>
A-0.1 C-30	3,66±0,05 <sup>o,p</sup>	285,13±1,90 <sup>k</sup>	23,50±0,19 <sup>g,h,i</sup>	40,55±1,15 <sup>h</sup>
A-0.1 C-90	3,38±0,02 <sup>q</sup>	238,09±4,04 <sup>q</sup>	20,01±0,22 <sup>n,o</sup>	28,14±1,02 <sup>o,p</sup>
A-0.2 C-30	3,75±0,04 <sup>o</sup>	252,00±1,23 <sup>m,n</sup>	22,06±1,23 <sup>j,k</sup>	37,57±1,28 <sup>i</sup>
A-0.2 C-90	3,11±0,01 <sup>r</sup>	218,92±1,78 <sup>t</sup>	20,69±0,16 <sup>m,n</sup>	26,95±0,38 <sup>p</sup>
A-0.3 C-30	4,07±0,01 <sup>k,l,m</sup>	264,47±1,82 <sup>l</sup>	23,12±0,14 <sup>g,h,i</sup>	37,59±0,25 <sup>i</sup>
A-0.3 C-90	3,55±0,06 <sup>p</sup>	255,56±3,00 <sup>m</sup>	21,08±0,16 <sup>l,m</sup>	34,90±0,73 <sup>i,k</sup>
A-0.4 C-30	4,07±0,14 <sup>k,l,m</sup>	264,13±2,20 <sup>l</sup>	20,92±0,61 <sup>l,m,n</sup>	40,54±1,44 <sup>h</sup>
A-0.4 C-90	3,34±0,06 <sup>q</sup>	231,94±1,74 <sup>r</sup>	20,16±0,08 <sup>m,n</sup>	28,76±0,69 <sup>o</sup>
A-0.5 C-30	3,42±0,03 <sup>q</sup>	243,68±1,65 <sup>o,p</sup>	23,71±0,13 <sup>f,g</sup>	30,81±0,32 <sup>n</sup>
A-0.5 C-90	3,75±0,10 <sup>o</sup>	263,25±1,16 <sup>l</sup>	25,08±0,32 <sup>c,d,e</sup>	36,64±0,85 <sup>i,j</sup>
A-0.1 CMC-30	5,30±0,04 <sup>c</sup>	338,47±2,91 <sup>f</sup>	24,01±0,39 <sup>f,g</sup>	52,55±1,23 <sup>b</sup>

A-0.1 CMC-90	5,45±0,01 <sup>c,d</sup>	347,79±4,58 <sup>e</sup>	25,31±0,35 <sup>c,d</sup>	51,52±1,84 <sup>b</sup>
A-0.2 CMC-30	5,34±0,07 <sup>d,e</sup>	380,21±2,39 <sup>b</sup>	25,86±0,16 <sup>c</sup>	46,95±0,31 <sup>c,d</sup>
A-0.2 CMC-90	6,41±0,01 <sup>a</sup>	447,52±2,58 <sup>a</sup>	29,09±0,28 <sup>a</sup>	58,98±0,51 <sup>a</sup>
A-0.3 CMC-30	5,78±0,08 <sup>b</sup>	373,86±3,23 <sup>c</sup>	26,79±0,24 <sup>b</sup>	48,44±0,49 <sup>c</sup>
A-0.3 CMC-90	4,51±0,14 <sup>h</sup>	291,68±4,32 <sup>j</sup>	19,16±0,23 <sup>o</sup>	33,84±0,66 <sup>k,l</sup>
A-0.4 CMC-30	5,16±0,07 <sup>f</sup>	350,64±1,36 <sup>d,e</sup>	24,38±0,29 <sup>e,f</sup>	42,78±0,57 <sup>f</sup>
A-0.4 CMC-90	5,04±0,06 <sup>f</sup>	355,61±2,65 <sup>d</sup>	20,40±0,05 <sup>m,n</sup>	44,92±0,06 <sup>e</sup>
A-0.5 CMC-30	4,54±0,02 <sup>h</sup>	327,17±1,48 <sup>g</sup>	23,55±0,09 <sup>f,g,h,i</sup>	40,86±1,22 <sup>g,h</sup>
A-0.5 CMC-90	4,86±0,02 <sup>g</sup>	354,44±1,87 <sup>d</sup>	23,70±0,10 <sup>f,g</sup>	40,33±0,63 <sup>h</sup>
A-0.1 K-30	3,58±0,04 <sup>p</sup>	219,55±2,78 <sup>t</sup>	22,06±0,29 <sup>j,k</sup>	45,15±1,56 <sup>e</sup>
A-0.1 K-90	3,58±0,09 <sup>p</sup>	225,19±3,87 <sup>s</sup>	21,71±0,73 <sup>k,l</sup>	45,28±0,78 <sup>d,e</sup>
A-0.2 K-30	4,11±0,00 <sup>j,k</sup>	245,69±2,13 <sup>o,p</sup>	22,68±0,87 <sup>h,i,j</sup>	40,39±1,00 <sup>h</sup>
A-0.2 K-90	3,96±0,06 <sup>l,m,n</sup>	245,65±4,13 <sup>o,p</sup>	21,72±0,01 <sup>k,l</sup>	41,01±0,87 <sup>f,g,h</sup>
A-0.3 K-30	5,53±0,03 <sup>c</sup>	347,86±0,13 <sup>e</sup>	29,52±0,10 <sup>a</sup>	51,46±0,72 <sup>b</sup>
A-0.3 K-90	4,10±0,10 <sup>k,l</sup>	256,15±1,36 <sup>m</sup>	23,60±0,48 <sup>f,g,h</sup>	42,46±0,75 <sup>f,g</sup>
A-0.4 K-30	4,24±0,06 <sup>i,j</sup>	251,94±1,36 <sup>m,n</sup>	25,01±0,05 <sup>d,e</sup>	37,46±0,39 <sup>i</sup>
A-0.4 K-90	3,93±0,00 <sup>n</sup>	240,70±4,52 <sup>p,q</sup>	22,65±0,40 <sup>i,j</sup>	36,43±1,16 <sup>i,j</sup>
A-0.5 K-30	4,10±0,060 <sup>k,l</sup>	247,71±0,77 <sup>n,o</sup>	24,01±0,00 <sup>f,g</sup>	41,34±0,49 <sup>f,g,h</sup>
A-0.5 K-90	3,95±0,03 <sup>m,n</sup>	248,55±2,90 <sup>n,o</sup>	23,61±0,69 <sup>f,g</sup>	40,86±0,08 <sup>g,h</sup>

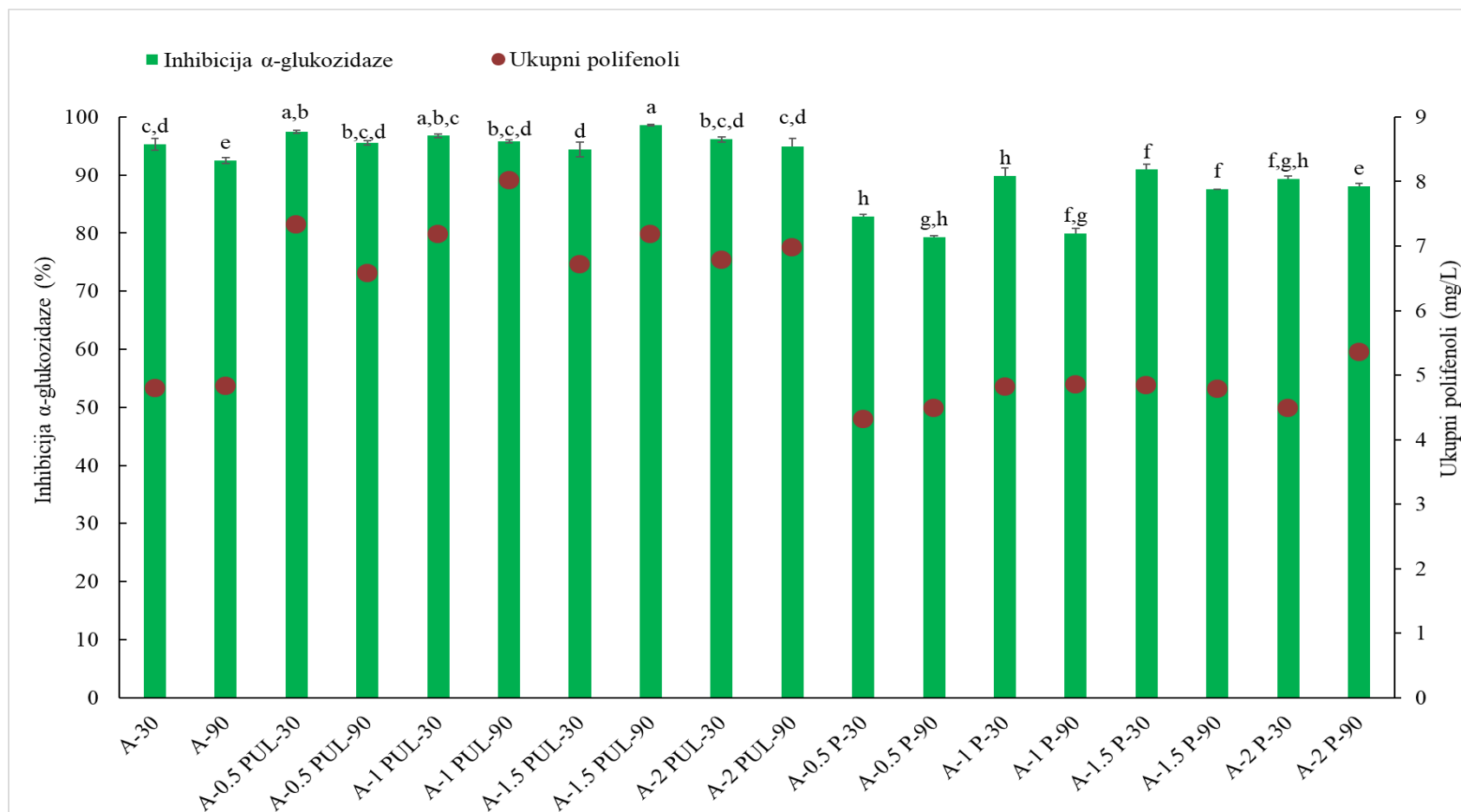
A – alginat; C – hitozan; CMC – karboksimetil celuloza; K – ksantan guma; 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 – postotak korištenog nosača; 30, 90 – vrijeme kompleksiranja (min). Vrijednosti u istom stupcu s različitim eksponentima su statistički značajno različite ( $P < 0,05$ , ANOVA, Fisher-ov LSD test).



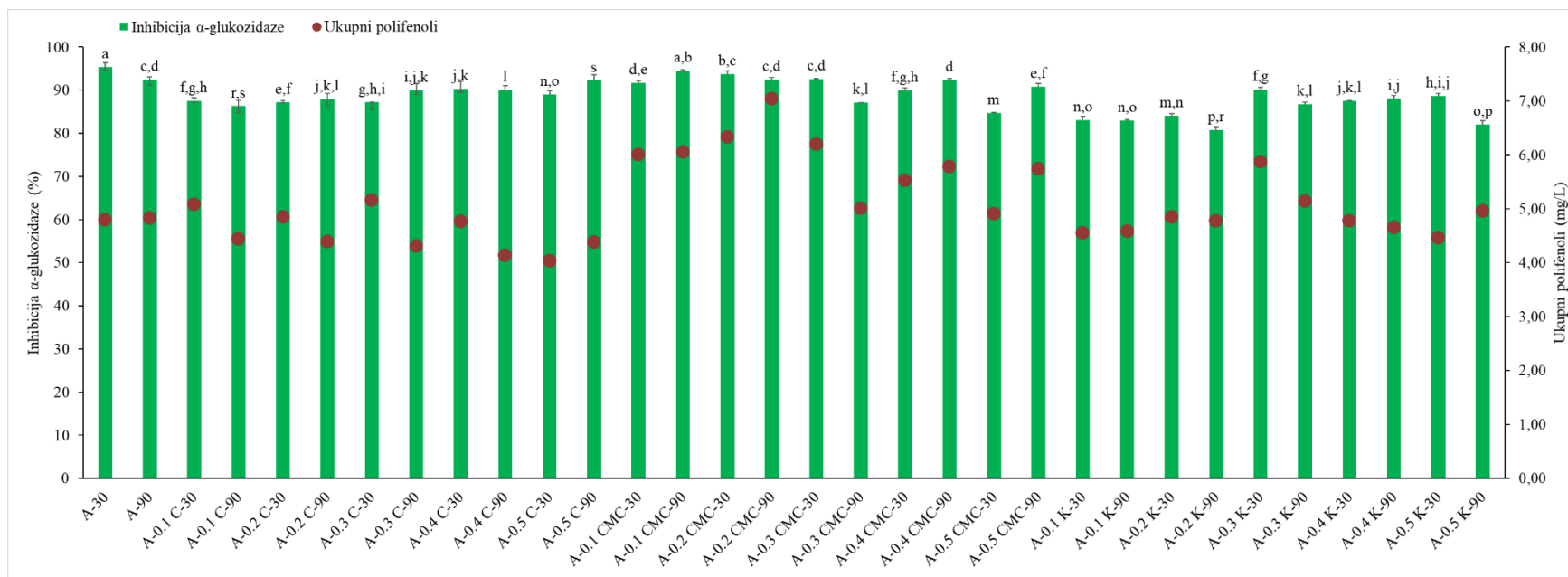
**Slika 23** Inhibicija enzima  $\alpha$ -amilaze alginatnih mikročestica bez i s dodatkom pululana ili pektina (A – alginat; PUL – pululan; P – pektin; 0.5, 1, 1.5, 2 – postotak korištenog nosača; 30, 90 – vrijeme kompleksiranja (min); srednje vrijednosti iznad kojih slijede različita slova su statistički značajno različite ( $P < 0,05$ , ANOVA, Fisher-ov LSD test))



**Slika 24** Inhibicija enzima  $\alpha$ -amilaze alginatnih mikročestica bez i s dodatkom hitozana, karboksimetil celuloze ili ksantan gume (A – alginat; C – hitozan; CMC – karboksimetil celuloza; K – ksantan guma; 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 – postotak korištenog nosača; 30, 90 – vrijeme kompleksiranja (min); srednje vrijednosti iznad kojih slijede različita slova su statistički značajno različite ( $P < 0,05$ , ANOVA, Fisher-ov LSD test))



**Slika 25** Inhibicija enzima  $\alpha$ -glukozidaze alginatnih mikročestica bez i s dodatkom pululana ili pektina (A – alginat; PUL – pululan; P – pektin; 0.5, 1, 1.5, 2 – postotak korištenog nosača; 30, 90 – vrijeme kompleksiranja (min); srednje vrijednosti iznad kojih slijede različita slova su statistički značajno različite ( $P < 0,05$ , ANOVA, Fisher-ov LSD test))



**Slika 26** Inhibicija enzima  $\alpha$ -glukozidaze alginatnih mikročestica bez i s dodatkom hitozana, karboksimetil celuloze ili ksantan gume (A – alginat; C – hitozan; CMC – karboksimetil celuloza; K – ksantan guma; 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 – postotak korištenog nosača; 30, 90 – vrijeme kompleksiranja (min); srednje vrijednosti iznad kojih slijede različita slova su statistički značajno različite ( $P < 0,05$ , ANOVA, Fisher-ov LSD test))



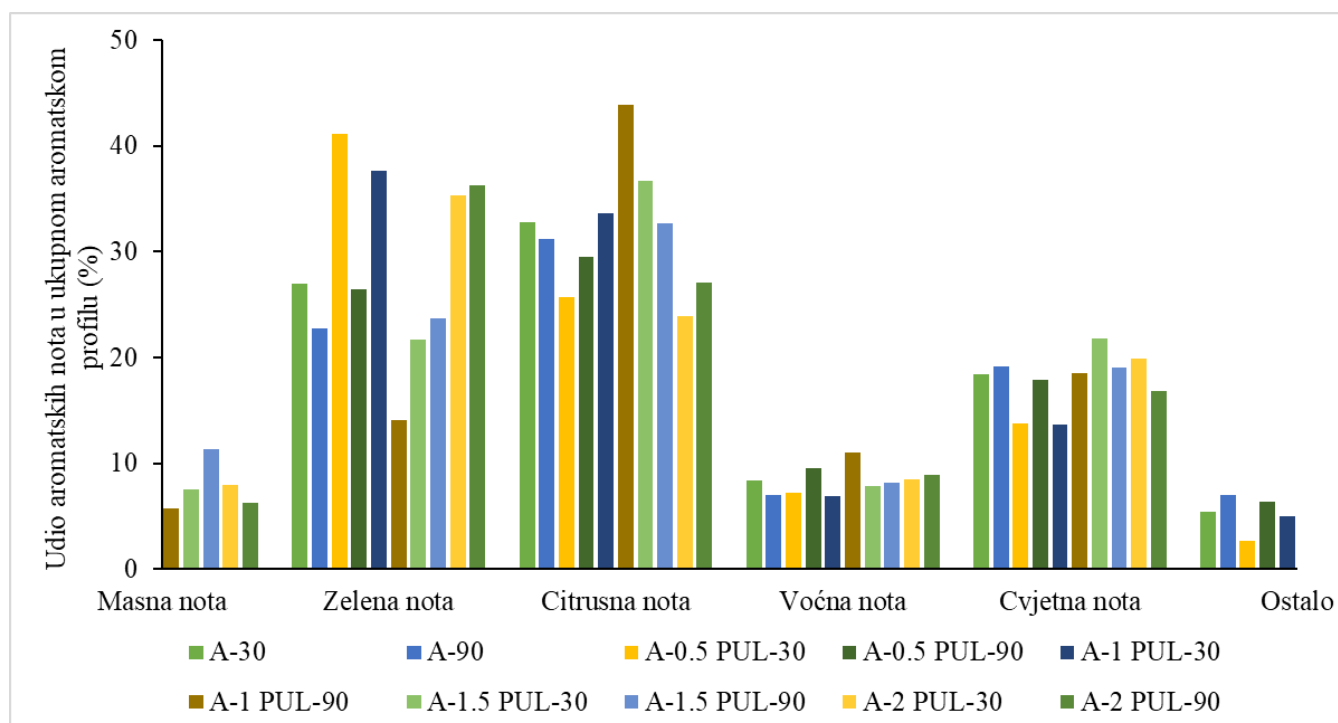
## 4.7. SADRŽAJ HLAPLJIVIH KOMPONENATA I AROMATSKI PROFIL ALGINATNIH MIKROČESTICA

Tablica 16 Sadržaj hlapljivih komponenata alginatnih mikročestica bez i s dodatkom pululana ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Spoj	A-30	A-90	A-0.5 PUL-30	A-0.5 PUL-90	A-1 PUL-30	A-1 PUL-90	A-1.5 PUL-30	A-1.5 PUL-90	A-2 PUL-30	A-2 PUL-90
<b>Kiseline</b>	28,57±1,14 <sup>d,e</sup>	43,58±0,85 <sup>a</sup>	31,42±1,06 <sup>c,d</sup>	33,98±1,09 <sup>c</sup>	10,06±0,53 <sup>e</sup>	14,43±0,61 <sup>f</sup>	37,84±0,94 <sup>b</sup>	42,30±0,70 <sup>a</sup>	34,01±1,49 <sup>c</sup>	28,21±0,44 <sup>c</sup>
2-etilheksanska kiselina	1,26±0,05 <sup>e,f</sup>	1,45±0,02 <sup>c,d,e,f</sup>	1,49±0,13 <sup>d,e</sup>	1,74±0,13 <sup>b,c</sup>	1,44±0,04 <sup>d,e,f</sup>	1,62±0,11 <sup>b,c,d</sup>	1,80±0,05 <sup>b</sup>	1,16±0,02 <sup>f</sup>	2,47±0,12 <sup>a</sup>	1,83±0,15 <sup>b</sup>
Nonanska kiselina	11,75±0,60 <sup>d</sup>	20,39±0,22 <sup>a</sup>	13,47±0,36 <sup>c</sup>	15,64±0,10 <sup>b</sup>	-	-	11,04±0,28 <sup>d</sup>	14,15±0,30 <sup>c</sup>	16,83±0,68 <sup>b</sup>	8,49±0,03 <sup>c</sup>
Dekanska kiselina	10,34±0,34 <sup>d</sup>	12,85±0,04 <sup>c</sup>	11,21±0,46 <sup>d</sup>	11,06±0,67 <sup>d</sup>	5,78±0,37 <sup>f</sup>	8,58±0,28 <sup>c</sup>	18,84±0,16 <sup>b</sup>	20,37±0,11 <sup>a</sup>	8,53±0,51 <sup>c</sup>	12,43±0,13 <sup>c</sup>
Laurinska kiselina	4,04±0,12 <sup>c,d</sup>	4,29±0,12 <sup>c,d</sup>	3,76±0,03 <sup>d,e</sup>	3,38±0,04 <sup>c</sup>	1,51±0,09 <sup>e</sup>	2,68±0,14 <sup>f</sup>	4,60±0,46 <sup>b,c</sup>	5,34±0,22 <sup>a</sup>	4,99±0,13 <sup>a,b</sup>	4,46±0,04 <sup>b,c</sup>
Palmitinska kiselina	1,18±0,03 <sup>c,d</sup>	4,60±0,45 <sup>a</sup>	1,48±0,08 <sup>c,d</sup>	2,17±0,14 <sup>b</sup>	1,33±0,03 <sup>c,d</sup>	1,54±0,08 <sup>c</sup>	1,56±0,01 <sup>c</sup>	1,27±0,05 <sup>c,d</sup>	1,19±0,06 <sup>c,d</sup>	0,99±0,09 <sup>d</sup>
<b>Alkoholi</b>	221,90±4,57 <sup>c</sup>	192,58±3,29 <sup>d</sup>	221,57±4,82 <sup>c</sup>	212,41±5,74 <sup>c</sup>	282,97±10,54 <sup>b</sup>	158,34±2,61 <sup>e</sup>	279,39±6,05 <sup>b</sup>	229,24±5,10 <sup>c</sup>	286,35±4,29 <sup>b</sup>	318,31±6,29 <sup>a</sup>
3-heksen-1-ol	27,64±0,13 <sup>f</sup>	30,03±0,59 <sup>c</sup>	26,40±0,72 <sup>f</sup>	30,45±1,19 <sup>c</sup>	38,54±1,35 <sup>c</sup>	12,88±0,37 <sup>e</sup>	33,73±0,41 <sup>d</sup>	31,59±0,01 <sup>c</sup>	50,83±0,05 <sup>b</sup>	78,27±0,10 <sup>a</sup>
Heks-1-ol	66,72±0,01 <sup>d,e</sup>	42,70±1,63 <sup>g</sup>	63,39±1,41 <sup>d,e,f</sup>	60,08±1,64 <sup>c,f</sup>	122,00±4,05 <sup>a</sup>	19,17±0,29 <sup>h</sup>	68,19±1,79 <sup>d</sup>	59,15±1,74 <sup>f</sup>	113,34±0,59 <sup>b</sup>	99,54±4,27 <sup>c</sup>
2-etilheksan-1-ol	109,72±3,87 <sup>c,d,e</sup>	103,32±0,62 <sup>c</sup>	116,37±2,40 <sup>b,c</sup>	107,50±2,90 <sup>c,d,e</sup>	108,64±5,02 <sup>c,d,e</sup>	112,94±1,49 <sup>c,d</sup>	161,64±2,45 <sup>a</sup>	123,51±3,00 <sup>b</sup>	107,28±3,12 <sup>d,e</sup>	124,89±0,86 <sup>b</sup>
Oktan-1-ol	1,63±0,01 <sup>a</sup>	2,17±0,20 <sup>a</sup>	1,81±0,13 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-
Perilil alkohol	16,20±0,54 <sup>a</sup>	14,34±0,25 <sup>a,b,c</sup>	13,60±0,16 <sup>c</sup>	14,38±0,02 <sup>a,b,c</sup>	13,79±0,13 <sup>b,c</sup>	13,35±0,45 <sup>c</sup>	15,83±1,39 <sup>a</sup>	14,99±0,35 <sup>a,b,c</sup>	14,91±0,54 <sup>a,b,c</sup>	15,61±1,05 <sup>a,b</sup>
<b>Karbonilni spojevi</b>	83,02±3,13 <sup>b</sup>	67,54±3,84 <sup>c,d</sup>	63,14±1,69 <sup>d</sup>	67,68±1,90 <sup>c,d</sup>	87,31±2,44 <sup>b</sup>	86,60±2,12 <sup>b</sup>	102,20±4,18 <sup>a</sup>	71,15±1,95 <sup>c,d</sup>	73,73±2,41 <sup>c</sup>	74,32±1,61 <sup>c</sup>
Benzaldehid	13,73±0,14 <sup>c</sup>	5,05±0,04 <sup>c</sup>	10,94±0,05 <sup>d</sup>	17,83±0,42 <sup>b</sup>	12,85±0,36 <sup>c</sup>	18,50±0,99 <sup>b</sup>	19,23±0,32 <sup>b</sup>	18,53±0,94 <sup>b</sup>	22,15±0,70 <sup>a</sup>	23,15±0,75 <sup>a</sup>
6-metil-5-hepten-2-on	8,98±0,71 <sup>c</sup>	4,25±0,30 <sup>d</sup>	2,95±0,24 <sup>c</sup>	3,88±0,28 <sup>d,e</sup>	16,15±0,21 <sup>a</sup>	15,64±0,07 <sup>a</sup>	16,05±0,27 <sup>a</sup>	14,27±0,04 <sup>b</sup>	8,29±0,37 <sup>c</sup>	9,10±0,01 <sup>c</sup>
Nonanal	14,74±0,71 <sup>b</sup>	13,00±0,57 <sup>c</sup>	15,86±0,52 <sup>b</sup>	6,32±0,20 <sup>d</sup>	20,68±0,49 <sup>a</sup>	15,16±0,22 <sup>b</sup>	20,69±0,84 <sup>a</sup>	3,80±0,02 <sup>c</sup>	2,99±0,05 <sup>c</sup>	4,34±0,07 <sup>c</sup>
Dekanal	21,77±1,18 <sup>a,b</sup>	22,56±1,86 <sup>a</sup>	14,06±0,50 <sup>c</sup>	19,99±0,00 <sup>a,b,c</sup>	18,09±1,12 <sup>c,d</sup>	19,65±0,19 <sup>b,c</sup>	19,74±1,01 <sup>a,b,c</sup>	15,68±0,58 <sup>d,e</sup>	19,95±0,63 <sup>a,b,c</sup>	18,76±0,21 <sup>c</sup>
Etil-benzaldehid	8,65±0,02 <sup>a</sup>	7,90±0,14 <sup>d</sup>	8,15±0,02 <sup>b,c,d</sup>	8,42±0,09 <sup>a,b,c</sup>	8,43±0,01 <sup>a,b</sup>	7,87±0,17 <sup>d</sup>	7,96±0,15 <sup>c,d</sup>	8,13±0,05 <sup>b,c,d</sup>	7,88±0,32 <sup>d</sup>	8,26±0,19 <sup>a,b,c,d</sup>
Geranil-aceton	5,95±0,34 <sup>a</sup>	5,04±0,50 <sup>b</sup>	4,03±0,07 <sup>c,d</sup>	4,12±0,44 <sup>c,d</sup>	4,69±0,15 <sup>b,c</sup>	3,79±0,19 <sup>d</sup>	6,06±0,26 <sup>a</sup>	4,82±0,05 <sup>b,c</sup>	4,11±0,08 <sup>c,d</sup>	3,67±0,05 <sup>d</sup>
Lilial	4,65±0,02 <sup>b,c</sup>	4,67±0,29 <sup>b</sup>	3,13±0,21 <sup>d,e</sup>	3,37±0,33 <sup>d,e</sup>	3,18±0,05 <sup>d,e</sup>	2,74±0,10 <sup>d,c</sup>	6,98±0,83 <sup>a</sup>	2,67±0,08 <sup>c</sup>	3,69±0,06 <sup>c,d</sup>	3,42±0,10 <sup>d,c</sup>
Heksil-cinamal	4,54±0,01 <sup>b,c</sup>	5,07±0,13 <sup>a,b</sup>	4,02±0,08 <sup>c,d</sup>	3,74±0,14 <sup>d,e</sup>	3,24±0,06 <sup>c</sup>	3,24±0,18 <sup>c</sup>	5,50±0,50 <sup>a</sup>	3,26±0,19 <sup>c</sup>	4,66±0,19 <sup>b,c</sup>	3,63±0,24 <sup>d,e</sup>
<b>Terpeni</b>	59,00±2,04 <sup>f,g</sup>	65,96±2,42 <sup>c</sup>	88,66±1,64 <sup>b</sup>	53,18±1,99 <sup>g</sup>	59,83±1,31 <sup>f</sup>	86,60±0,83 <sup>b,c</sup>	94,78±2,88 <sup>a</sup>	80,97±1,55 <sup>c,d</sup>	68,54± 2,27 <sup>c</sup>	78,99± 1,50 <sup>d</sup>
D-limonen	5,32±0,10 <sup>c</sup>	4,85±0,21 <sup>c</sup>	-	-	9,68±0,23 <sup>a</sup>	3,35±0,01 <sup>d</sup>	5,31±0,48 <sup>c</sup>	6,95±0,09 <sup>b</sup>	2,98±0,05 <sup>d</sup>	5,12±0,11 <sup>c</sup>
Linalol oksid	3,72±0,07 <sup>b</sup>	3,41±0,07 <sup>b</sup>	42,23±0,87 <sup>a</sup>	1,76±0,04 <sup>c</sup>	1,56±0,06 <sup>c</sup>	2,99±0,01 <sup>b</sup>	3,30±0,15 <sup>b</sup>	3,40±0,02 <sup>b</sup>	3,19±0,05 <sup>b</sup>	3,60±0,08 <sup>b</sup>
Linalol	1,64±0,16 <sup>g</sup>	2,66±0,04 <sup>d,e</sup>	2,27±0,18 <sup>f</sup>	2,79±0,19 <sup>d</sup>	2,95±0,11 <sup>d</sup>	2,31±0,02 <sup>c,f</sup>	5,84±0,18 <sup>a</sup>	3,46±0,07 <sup>b</sup>	3,33±0,03 <sup>b,c</sup>	3,02±0,01 <sup>d</sup>
Mentol	17,96±0,31 <sup>c</sup>	21,31±1,03 <sup>a</sup>	18,47±0,07 <sup>b,c</sup>	19,82±0,29 <sup>a,b</sup>	18,84±0,29 <sup>b,c</sup>	18,82±0,37 <sup>b,c</sup>	19,10±0,52 <sup>b,c</sup>	17,42±0,18 <sup>c</sup>	18,19±1,12 <sup>b,c</sup>	19,17±0,40 <sup>b,c</sup>
$\beta$ -citronelol	2,63±0,03 <sup>c,f</sup>	2,27±0,02 <sup>g</sup>	1,85±0,10 <sup>h</sup>	2,73±0,12 <sup>c</sup>	2,28±0,07 <sup>f,g</sup>	2,06±0,18 <sup>a,h</sup>	21,95±0,13 <sup>a,h</sup>	9,12±0,21 <sup>c</sup>	6,10±0,08 <sup>d</sup>	10,40±0,06 <sup>b</sup>
Vitispiran	14,64±0,73 <sup>d,e</sup>	16,86±0,20 <sup>b,c</sup>	13,67±0,04 <sup>c</sup>	15,57±0,92 <sup>c,d</sup>	16,72±0,19 <sup>b,c</sup>	16,67±0,04 <sup>c</sup>	16,33±0,07 <sup>c</sup>	19,26±0,38 <sup>a</sup>	16,97±0,60 <sup>b,c</sup>	18,11±0,19 <sup>a,b</sup>
Eugenol	2,02±0,19 <sup>a</sup>	2,04±0,10 <sup>a</sup>	1,56±0,06 <sup>b</sup>	1,55±0,06 <sup>b</sup>	1,57±0,08 <sup>b</sup>	1,47±0,03 <sup>b</sup>	2,29±0,15 <sup>b</sup>	2,10±0,01 <sup>a</sup>	1,58±0,06 <sup>b</sup>	1,63±0,02 <sup>b</sup>
$\beta$ -damascenon	5,20±0,15 <sup>a,b</sup>	5,31±0,48 <sup>a,b</sup>	4,80±0,03 <sup>b</sup>	5,37±0,13 <sup>a</sup>	0,91±0,00 <sup>d</sup>	1,05±0,03 <sup>c,d</sup>	1,51±0,17 <sup>c,d</sup>	5,45±0,10 <sup>a</sup>	0,77±0,03 <sup>d</sup>	0,97±0,00 <sup>d</sup>
$\alpha$ -ionon	0,88±0,10 <sup>d</sup>	1,05±0,01 <sup>c,d</sup>	-	-	0,97±0,05 <sup>d</sup>	0,78±0,01 <sup>d</sup>	8,59±0,78 <sup>d</sup>	1,66±0,15 <sup>c,d</sup>	1,94±0,07 <sup>c</sup>	3,85±0,26 <sup>b</sup>
$\beta$ -ionon	1,41±0,12 <sup>d</sup>	2,29±0,08 <sup>c</sup>	1,39±0,07 <sup>d</sup>	1,45±0,12 <sup>d</sup>	1,51±0,14 <sup>d</sup>	1,35±0,06 <sup>d</sup>	9,14±0,16 <sup>d</sup>	2,43±0,13 <sup>c</sup>	3,15±0,02 <sup>b</sup>	3,06±0,29 <sup>b</sup>
$\gamma$ -ionon	3,59±0,09 <sup>c</sup>	3,92±0,17 <sup>c</sup>	2,42±0,24 <sup>d,e</sup>	2,14±0,12 <sup>c</sup>	2,84±0,10 <sup>d</sup>	2,49±0,07 <sup>d,e</sup>	1,42±0,11 <sup>d,e</sup>	9,70±0,21 <sup>b</sup>	10,34±0,15 <sup>a</sup>	10,06±0,08 <sup>a,b</sup>
<b>Esteri</b>	35,96±1,59 <sup>b,c</sup>	40,12±1,88 <sup>b</sup>	35,12±1,32 <sup>b,c</sup>	40,93±2,15 <sup>b</sup>	29,67±1,37 <sup>c,d</sup>	27,66±0,87 <sup>d</sup>	56,93±2,28 <sup>a</sup>	40,70±1,14 <sup>b</sup>	60,58±4,63 <sup>a</sup>	40,77±2,01 <sup>b</sup>
Etil-heksanoat	7,13±0,53 <sup>b</sup>	7,59±0,47 <sup>b</sup>	2,75±0,08 <sup>d</sup>	5,01±0,14 <sup>c</sup>	4,31±0,28 <sup>c</sup>	4,86±0,07 <sup>c</sup>	9,46±0,15 <sup>a</sup>	3,07±0,01 <sup>d</sup>	6,62±0,67 <sup>b</sup>	5,41±0,52 <sup>c</sup>

Etil-dekanoat	6,49±0,21 <sup>c,d</sup>	8,13±0,34 <sup>b</sup>	8,01±0,61 <sup>b</sup>	7,49±0,29 <sup>b,c</sup>	6,95±0,38 <sup>b,c,d</sup>	6,24±0,19 <sup>d</sup>	7,93±0,10 <sup>b</sup>	8,01±0,32 <sup>b</sup>	7,43±0,42 <sup>b,c,d</sup>	11,03±0,66 <sup>a</sup>
Metil-dihidrojasmonat	9,70±0,37 <sup>d,e</sup>	5,90±0,06 <sup>f</sup>	9,91±0,06 <sup>d,e</sup>	12,88±0,71 <sup>c</sup>	8,12±0,30 <sup>e,f</sup>	6,16±0,07 <sup>f</sup>	23,79±1,10 <sup>b</sup>	11,20±0,53 <sup>c,d</sup>	29,31±2,34 <sup>a</sup>	11,48±0,40 <sup>c,d</sup>
Heksil-salicilat	3,64±0,10 <sup>b,c</sup>	3,88±0,20 <sup>b,c</sup>	2,60±0,23 <sup>d</sup>	3,00±0,14 <sup>c,d</sup>	2,63±0,02 <sup>d</sup>	2,55±0,03 <sup>d</sup>	6,06±0,65 <sup>a</sup>	4,27±0,04 <sup>b</sup>	5,64±0,59 <sup>a</sup>	2,95±0,14 <sup>c,d</sup>
Etil-miristat	3,64±0,10 <sup>c,f,g</sup>	4,41±0,46 <sup>c,d,e</sup>	4,07±0,03 <sup>d,e,f</sup>	5,01±0,41 <sup>b,c</sup>	2,86±0,16 <sup>g</sup>	3,50±0,37 <sup>f,g</sup>	2,92±0,07 <sup>g</sup>	8,32±0,07 <sup>a</sup>	5,26±0,30 <sup>b</sup>	4,65±0,02 <sup>b,c,d</sup>
Etil-pentadekanoat	1,79±0,11 <sup>c</sup>	4,01±0,10 <sup>a</sup>	2,90±0,15 <sup>b</sup>	2,83±0,17 <sup>b</sup>	1,58±0,16 <sup>c,d</sup>	1,28±0,03 <sup>d</sup>	2,96±0,12 <sup>b</sup>	2,75±0,08 <sup>b</sup>	1,52±0,14 <sup>c,d</sup>	2,73±0,25 <sup>b</sup>
Metil-palmitat	1,68±0,03 <sup>c</sup>	2,26±0,01 <sup>b</sup>	1,86±0,08 <sup>d</sup>	1,46±0,03 <sup>f</sup>	1,20±0,08 <sup>g</sup>	1,08±0,01 <sup>g,h</sup>	2,06±0,04 <sup>c</sup>	0,89±0,06 <sup>i</sup>	2,49±0,01 <sup>a</sup>	0,99±0,02 <sup>h,i</sup>
Etil-palmitat	1,90±0,11 <sup>c,d,e</sup>	3,94±0,24 <sup>a</sup>	3,00±0,07 <sup>b</sup>	3,24±0,25 <sup>b</sup>	2,03±0,00 <sup>c,d</sup>	2,00±0,10 <sup>c,d</sup>	1,74±0,06 <sup>d,e</sup>	2,18±0,03 <sup>c</sup>	2,30±0,17 <sup>c</sup>	1,53±0,01 <sup>e</sup>

A – alginat; PUL – pululan; 0.5, 1, 1.5, 2 – postotak korištenog nosača; 30, 90 – vrijeme kompleksiranja (min). Vrijednosti u istom retku s različitim eksponentima su statistički značajno različite ( $P < 0,05$ , ANOVA, Fisher-ov LSD test).



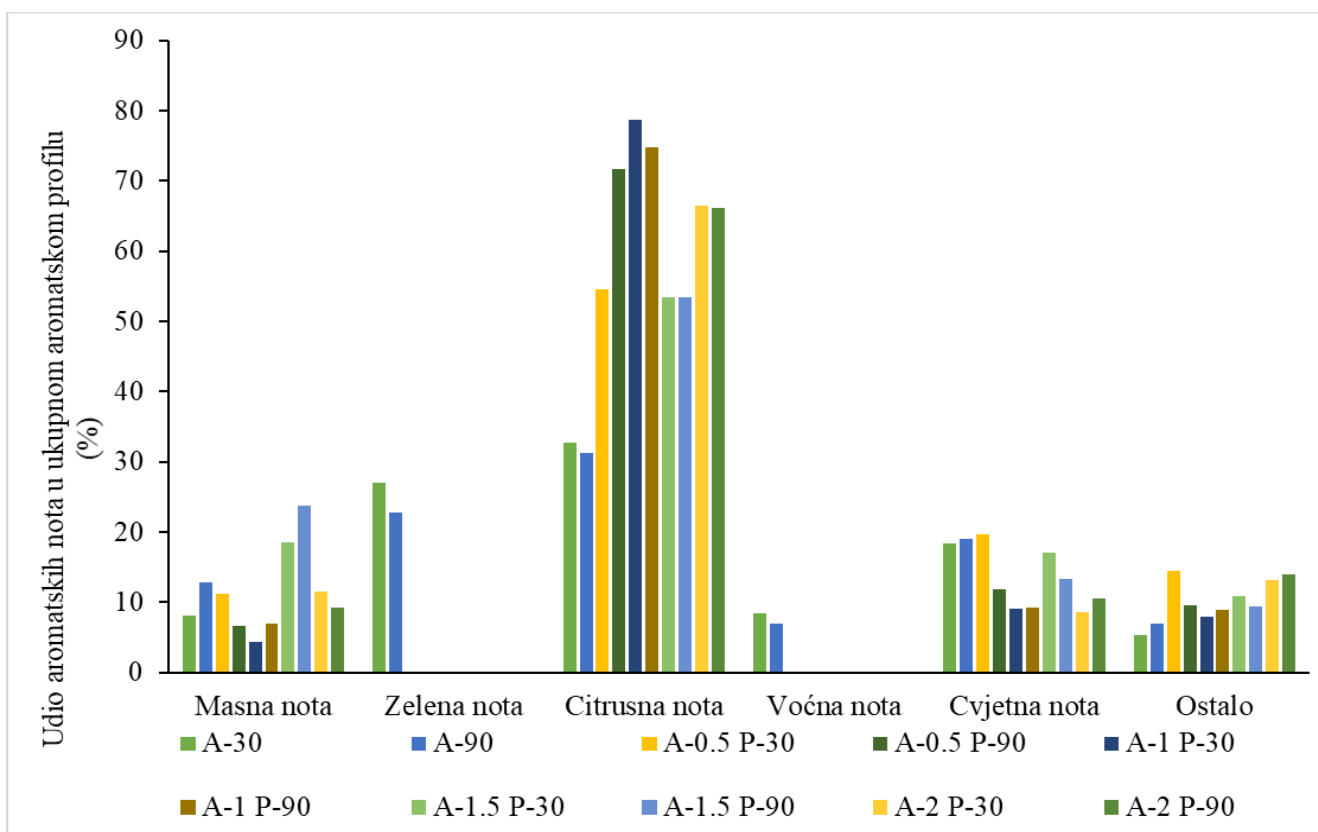
**Slika 27** Aromatski profil alginatnih mikročestica bez i s dodatkom pululana; A – alginat; PUL – pululan; 0.5, 1, 1.5, 2 – postotak korištenog nosača; 30, 90 – vrijeme kompleksiranja (min)

Tablica 17 Sadržaj hlapljivih komponenata alginatnih mikročestica bez i s dodatkom pektina ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Spoj	A-30	A-90	A-0.5 P-30	A-0.5 P-90	A-1 P-30	A-1 P-90	A-1.5 P-30	A-1.5 P-90	A-2 P-30	A-2 P-90
<b>Kiseline</b>	28,57±1,14 <sup>d</sup>	43,58±0,85 <sup>b</sup>	32,37±0,35 <sup>c</sup>	16,12±0,04 <sup>c</sup>	9,32±0,02 <sup>e</sup>	13,48±0,04 <sup>a</sup>	31,83±0,54 <sup>c</sup>	47,81±0,44 <sup>a</sup>	16,86±0,44 <sup>c</sup>	12,65±0,81 <sup>f</sup>
2-etilheksanska kiselina	1,26±0,05 <sup>b</sup>	1,45±0,02 <sup>b</sup>	4,16±0,08 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-
Oktanska kiselina	-	-	-	-	-	-	4,96±0,14 <sup>a</sup>	3,46±0,02 <sup>b</sup>	-	-
Nonanska kiselina	11,75±0,60 <sup>e</sup>	20,39±0,22 <sup>d</sup>	28,20±0,27 <sup>b</sup>	16,12±0,04 <sup>c</sup>	9,32±0,02 <sup>b</sup>	13,48±0,04 <sup>f</sup>	26,87±0,40 <sup>c</sup>	44,35±0,42 <sup>a</sup>	16,86±0,44 <sup>c</sup>	12,65±0,81 <sup>f,g</sup>
Dekanska kiselina	10,34±0,34 <sup>b</sup>	12,85±0,04 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Laurinska kiselina	4,04±0,12 <sup>a</sup>	4,29±0,12 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Palmitinska kiselina	1,18±0,03 <sup>b</sup>	4,60±0,45 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Alkoholi</b>	221,90±4,57 <sup>a</sup>	192,58±3,29 <sup>b</sup>	135,73±2,05 <sup>d</sup>	158,60±0,93 <sup>c</sup>	165,43±0,89 <sup>c</sup>	136,00±1,18 <sup>d</sup>	93,32±4,17 <sup>f</sup>	108,04±1,47 <sup>e</sup>	89,59±0,77 <sup>f,g</sup>	83,33±1,52 <sup>g</sup>
3-heksen-1-ol	27,64±0,13 <sup>a</sup>	30,03±0,59 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Heks-1-ol	66,72±0,01 <sup>a</sup>	42,70±1,63 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
2-etilheksan-1-ol	109,72±3,87 <sup>c</sup>	103,32±0,62 <sup>c,d</sup>	106,31±1,73 <sup>c</sup>	157,06±0,91 <sup>a</sup>	160,17±0,82 <sup>a</sup>	135,01±1,16 <sup>b</sup>	83,04±4,04 <sup>e</sup>	98,60±1,37 <sup>d</sup>	89,02±0,75 <sup>e</sup>	82,63±1,51 <sup>e</sup>
Benzil alkohol	-	-	29,42±0,31 <sup>a</sup>	1,54±0,02 <sup>c</sup>	5,25±0,07 <sup>d</sup>	0,99±0,02 <sup>f</sup>	10,28±0,13 <sup>b</sup>	9,45±0,10 <sup>c</sup>	0,57±0,03 <sup>f</sup>	0,70±0,00 <sup>f</sup>
Oktan-1-ol	1,63±0,01 <sup>a</sup>	2,17±0,20 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Perilil alkohol	16,20±0,54 <sup>a</sup>	14,34±0,25 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Karbonilni spojevi</b>	83,02±3,13 <sup>a</sup>	67,54±3,84 <sup>b</sup>	62,68±1,36 <sup>b</sup>	41,92±0,77 <sup>c</sup>	24,68±0,94 <sup>d,e</sup>	26,20±0,29 <sup>d</sup>	27,27±0,61 <sup>d</sup>	26,12±1,08 <sup>d</sup>	20,00±0,47 <sup>c</sup>	21,89±0,49 <sup>d,e</sup>
Benzaldehid	13,73±0,14 <sup>a</sup>	5,05±0,04 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
6-metil-5-hepten-2-on	8,98±0,71 <sup>a</sup>	4,25±0,30 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Oktanal	-	-	10,57±0,33 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-
Nonanal	14,74±0,71 <sup>b</sup>	13,00±0,57 <sup>c</sup>	31,62±0,56 <sup>a</sup>	14,96±0,38 <sup>b</sup>	10,07±0,13 <sup>d</sup>	9,34±0,00 <sup>d,e</sup>	8,42±0,09 <sup>e,f</sup>	8,87±0,20 <sup>e,f</sup>	7,92±0,17 <sup>f</sup>	8,01±0,07 <sup>f</sup>
Dekanal	21,77±1,18 <sup>a</sup>	22,56±1,86 <sup>a</sup>	18,79±0,35 <sup>b</sup>	21,94±0,03 <sup>a</sup>	11,90±0,49 <sup>d,e,f</sup>	13,98±0,09 <sup>c,d</sup>	15,70±0,36 <sup>c</sup>	13,48±0,67 <sup>c,d,e</sup>	10,14±0,24 <sup>f</sup>	11,33±0,18 <sup>e,f</sup>
Etil-benzaldehid	8,65±0,02 <sup>a</sup>	7,90±0,14 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Geranil-aceton	5,95±0,34 <sup>a</sup>	5,04±0,50 <sup>b</sup>	1,70±0,11 <sup>f</sup>	5,02±0,36 <sup>b</sup>	2,71±0,32 <sup>d,e</sup>	2,89±0,20 <sup>d</sup>	3,15±0,16 <sup>c,d</sup>	3,77±0,21 <sup>c</sup>	1,93±0,05 <sup>e,f</sup>	2,55±0,25 <sup>d,e,f</sup>
Lilial	4,65±0,02 <sup>a</sup>	4,67±0,29 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Heksil-cinamal	4,54±0,01 <sup>a</sup>	5,07±0,13 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Terpeni</b>	59,00±2,04 <sup>b</sup>	65,96±2,42 <sup>a</sup>	58,79±1,62 <sup>b</sup>	26,84±3,48 <sup>c</sup>	24,92±1,58 <sup>c</sup>	17,29±0,63 <sup>d</sup>	26,20±0,49 <sup>c</sup>	25,63±1,47 <sup>c</sup>	19,22±0,26 <sup>d</sup>	19,15±0,04 <sup>d</sup>
Guaiakol	-	-	26,33±0,32 <sup>a</sup>	3,68±3,02 <sup>b</sup>	7,84±0,49 <sup>b</sup>	-	7,69±0,03 <sup>b</sup>	6,82±0,34 <sup>b</sup>	-	-
<i>trans</i> -pinokarveol	-	-	32,46±1,30 <sup>a</sup>	23,16±0,46 <sup>b</sup>	17,08±1,09 <sup>c</sup>	17,29±0,63 <sup>c</sup>	18,51±0,46 <sup>c</sup>	18,81±1,13 <sup>c</sup>	19,22±0,26 <sup>c</sup>	19,15±0,04 <sup>c</sup>
D-limonen	5,32±0,10 <sup>a</sup>	4,85±0,21 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalol oksid	3,72±0,07 <sup>a</sup>	3,41±0,07 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalol	1,64±0,16 <sup>b</sup>	2,66±0,04 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Mentol	17,96±0,31 <sup>a</sup>	21,31±1,03 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -citronelol	2,63±0,03 <sup>a</sup>	2,27±0,02 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Vitispiran	14,64±0,73 <sup>a</sup>	16,86±0,20 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Eugenol	2,02±0,19 <sup>a</sup>	2,04±0,10 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -damascenon	5,20±0,15 <sup>a</sup>	5,31±0,48 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -ionon	0,88±0,10 <sup>a</sup>	1,05±0,01 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -ionon	1,41±0,12 <sup>b</sup>	2,29±0,08 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
$\gamma$ -ionon	3,59±0,09 <sup>a</sup>	3,92±0,17 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Esteri</b>	35,96±1,59 <sup>a</sup>	40,12±1,88 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Etil-heksanoat	7,13±0,53 <sup>a</sup>	7,59±0,47 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Etil-dekanoat	6,49±0,21 <sup>a</sup>	8,13±0,34 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil-dihidrojasmonat	9,70±0,37 <sup>a</sup>	5,90±0,06 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Heksil-salicilat	3,64±0,10 <sup>a</sup>	3,88±0,20 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-

Etil-miristat	3,64±0,10 <sup>a</sup>	4,41±0,46 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-
Etil-pentadekanoat	1,79±0,11 <sup>b</sup>	4,01±0,10 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-
Metil-palmitat	1,68±0,03 <sup>b</sup>	2,26±0,01 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-
Etil-palmitat	1,90±0,11 <sup>b</sup>	3,94±0,24 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-

A – alginat; P – pektin; 0,5, 1, 1,5, 2 – postotak korištenog nosača; 30, 90 – vrijeme kompleksiranja (min). Vrijednosti u istom retku s različitim eksponentima su statistički značajno različite ( $P < 0,05$ , ANOVA, Fisher-ov LSD test).



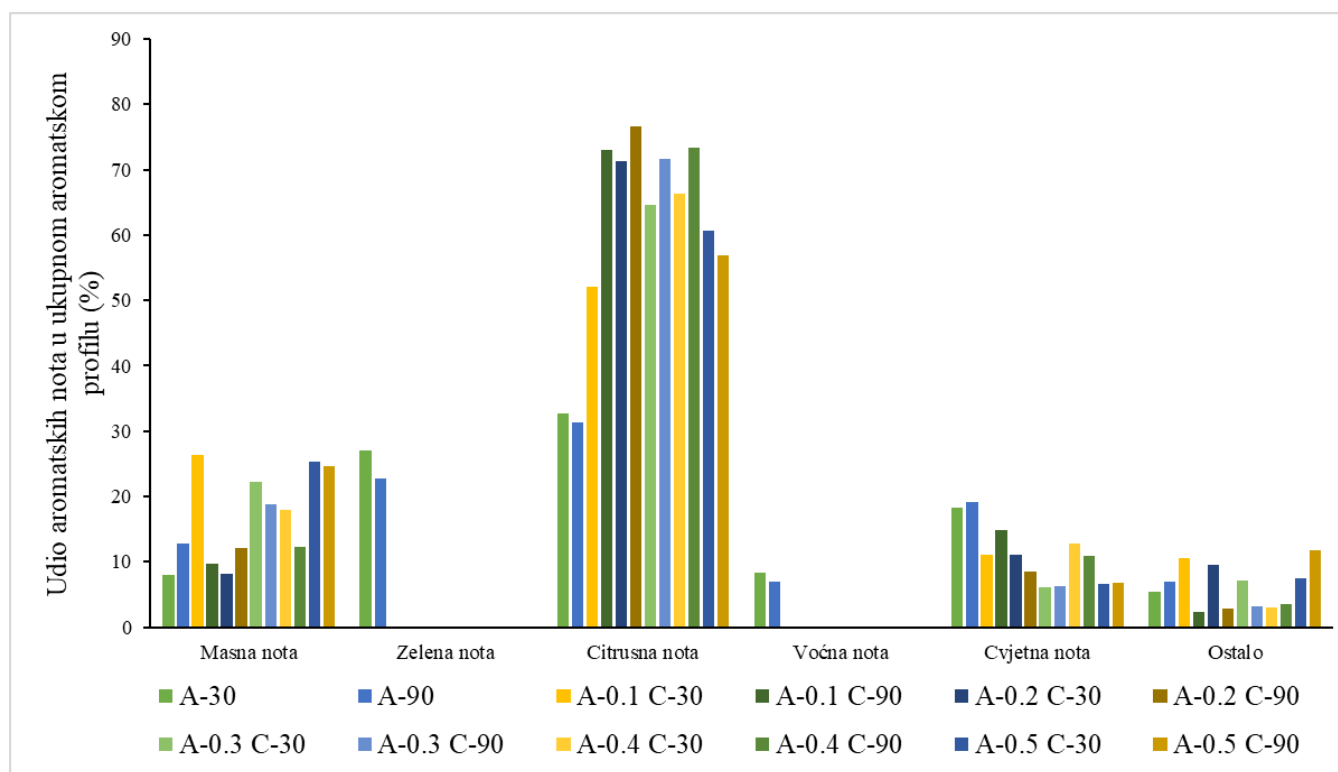
**Slika 28** Aromatski profil alginatnih mikročestica bez i s dodatkom pektina; A – alginat; P – pektin; 0,5, 1, 1,5, 2 – postotak korištenog nosača; 30, 90 – vrijeme kompleksiranja (min)

Tablica 18 Sadržaj hlapljivih komponenata alginatnih mikročestica bez i s dodatkom hitozana ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Spoj	A-30	A-90	A-0.1 C-30	A-0.1 C-90	A-0.2 C-30	A-0.2 C-90	A-0.3 C-30	A-0.3 C-90	A-0.4 C-30	A-0.4 C-90	A-0.5 C-30	A-0.5 C-90
<b>Kiseline</b>	28,57±1,14 <sup>c</sup>	43,58±0,85 <sup>a</sup>	42,44±0,82 <sup>a</sup>	23,60±0,72 <sup>d</sup>	11,94±0,35 <sup>f</sup>	21,91±0,16 <sup>d,c</sup>	42,97±0,91 <sup>a</sup>	37,25±1,41 <sup>b</sup>	34,89±0,80 <sup>b</sup>	20,16±0,57 <sup>c</sup>	36,56±0,06 <sup>b</sup>	27,00±0,28 <sup>c</sup>
2-etilheksanska kiselina	1,26±0,05 <sup>a</sup>	1,45±0,02 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oktanska kiselina	-	-	-	-	-	-	4,09±0,21 <sup>a</sup>	-	2,56±0,03 <sup>b</sup>	-	-	-
Nonanska kiselina	11,75±0,34 <sup>h</sup>	20,39±0,22 <sup>g</sup>	42,44±0,82 <sup>a</sup>	23,60±0,72 <sup>f</sup>	11,94±0,35 <sup>h</sup>	21,91±0,16 <sup>f,g</sup>	38,88±0,71 <sup>a,b</sup>	37,25±1,41 <sup>b,c</sup>	32,33±0,76 <sup>d</sup>	20,16±0,57 <sup>g</sup>	36,56±0,06 <sup>c</sup>	27,00±0,28 <sup>e</sup>
Dekanska kiselina	10,34±0,34 <sup>b</sup>	12,85±0,04 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Laurinska kiselina	4,04±0,12 <sup>a</sup>	4,29±0,12 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palmitinska kiselina	1,18±0,03 <sup>b</sup>	4,60±0,45 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Alkoholi</b>	221,90±4,57 <sup>a</sup>	192,58±3,29 <sup>b</sup>	77,32±0,42 <sup>h</sup>	156,69±1,91 <sup>c</sup>	99,02±0,21 <sup>g</sup>	129,85±1,63 <sup>d</sup>	118,76±0,20 <sup>c</sup>	132,22±3,54 <sup>d</sup>	125,95±0,69 <sup>d</sup>	111,55±2,32 <sup>f</sup>	83,46±1,16 <sup>h</sup>	58,22±2,33 <sup>i</sup>
3-heksen-1-ol	27,64±0,13 <sup>a</sup>	30,03±0,59 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heks-1-ol	66,72±0,01 <sup>a</sup>	42,70±1,63 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-etilheksan-1-ol	109,72±3,87 <sup>d</sup>	103,32±0,62 <sup>c</sup>	77,32±0,42 <sup>g</sup>	156,69±1,91 <sup>a</sup>	99,02±0,21 <sup>c</sup>	129,85±1,63 <sup>b</sup>	118,76±0,20 <sup>c</sup>	132,22±3,54 <sup>b</sup>	120,62±0,66 <sup>c</sup>	111,55±2,32 <sup>d</sup>	83,46±1,16 <sup>f</sup>	58,22±2,33 <sup>h</sup>
Benzil alkohol	-	-	-	-	-	-	-	-	5,33±0,02 <sup>a</sup>	-	-	-
Oktan-1-ol	1,63±0,01 <sup>a</sup>	2,17±0,20 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perilil alkohol	16,20±0,54 <sup>a</sup>	14,34±0,25 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Karbonilni spojevi</b>	83,02±3,13 <sup>a</sup>	67,54±3,84 <sup>b</sup>	24,42±0,17 <sup>d,e,f</sup>	58,45±1,45 <sup>c</sup>	21,74±0,40 <sup>f,g</sup>	25,31±0,64 <sup>d,e,f</sup>	17,82±0,29 <sup>g,h</sup>	22,11±0,75 <sup>c,f,g</sup>	29,10±0,66 <sup>d</sup>	26,85±0,80 <sup>d,e</sup>	14,05±0,35 <sup>h,i</sup>	11,78±0,21 <sup>i</sup>
Benzaldehid	13,73±0,14 <sup>a</sup>	5,05±0,04 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6-metil-5-hepten-2-on	8,98±0,71 <sup>a</sup>	4,25±0,30 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nonanal	14,74±0,71 <sup>b</sup>	13,00±0,57 <sup>c</sup>	6,65±0,06 <sup>c</sup>	21,92±1,36 <sup>a</sup>	5,53±0,16 <sup>c,f</sup>	9,75±0,12 <sup>d</sup>	6,10±0,09 <sup>c</sup>	9,66±0,40 <sup>d</sup>	9,24±0,31 <sup>d</sup>	8,96±0,48 <sup>d</sup>	4,39±0,15 <sup>f</sup>	4,27±0,06 <sup>f</sup>
Dekanal	21,77±1,18 <sup>b</sup>	22,56±1,86 <sup>b</sup>	15,24±0,08 <sup>c</sup>	32,54±0,08 <sup>a</sup>	14,37±0,10 <sup>c,d</sup>	12,97±0,50 <sup>d</sup>	9,37±0,12 <sup>c,f</sup>	10,20±0,28 <sup>c</sup>	16,42±0,22 <sup>c</sup>	15,62±0,02 <sup>c</sup>	9,65±0,20 <sup>c</sup>	7,51±0,15 <sup>f</sup>
Etil-benzaldehid	8,65±0,02 <sup>a</sup>	7,90±0,14 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geramil-aceton	5,95±0,34 <sup>a</sup>	5,04±0,50 <sup>b</sup>	2,52±0,02 <sup>d,e</sup>	3,99±0,00 <sup>c</sup>	1,84±0,14 <sup>c</sup>	2,60±0,03 <sup>d</sup>	2,35±0,08 <sup>d,e</sup>	2,25±0,08 <sup>d,e</sup>	3,44±0,14 <sup>c</sup>	2,26±0,30 <sup>d,e</sup>	-	-
Lilial	4,65±0,02 <sup>a</sup>	4,67±0,29 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heksil-cinamal	4,54±0,01 <sup>a</sup>	5,07±0,13 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Terpeni</b>	59,00±2,04 <sup>b</sup>	65,96±2,42 <sup>a</sup>	16,98±0,48 <sup>c</sup>	5,81±0,04 <sup>c</sup>	13,90±0,42 <sup>c,d</sup>	5,12±0,04 <sup>c</sup>	13,93±1,57 <sup>c,d</sup>	6,37±0,52 <sup>c</sup>	5,80±0,24 <sup>c</sup>	5,69±0,07 <sup>c</sup>	10,80±0,36 <sup>d</sup>	12,95±0,01 <sup>d</sup>
<i>trans</i> -pinokarveol	-	-	16,98±0,48 <sup>a</sup>	5,81±0,04 <sup>d</sup>	13,90±0,42 <sup>b</sup>	5,12±0,04 <sup>d</sup>	13,93±1,57 <sup>b</sup>	6,37±0,52 <sup>d</sup>	5,80±0,24 <sup>d</sup>	5,69±0,07 <sup>d</sup>	10,80±0,36 <sup>c</sup>	12,95±0,01 <sup>b</sup>
D-limonen	5,32±0,10 <sup>a</sup>	4,85±0,21 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalol oksid	3,72±0,07 <sup>a</sup>	3,41±0,07 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalol	1,64±0,16 <sup>b</sup>	2,66±0,04 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mentol	17,96±0,31 <sup>a</sup>	21,31±1,03 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -citronelol	2,63±0,03 <sup>a</sup>	2,27±0,02 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vitispiran	14,64±0,73 <sup>a</sup>	16,86±0,20 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eugenol	2,02±0,19 <sup>a</sup>	2,04±0,10 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -damascenon	5,20±0,15 <sup>a</sup>	5,31±0,48 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -ionon	0,88±0,10 <sup>a</sup>	1,05±0,01 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -ionon	1,41±0,12 <sup>b</sup>	2,29±0,08 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\gamma$ -ionon	3,59±0,09 <sup>a</sup>	3,92±0,17 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Esteri</b>	35,96±1,59 <sup>a</sup>	40,12±1,88 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etil-heksanoat	7,13±0,53 <sup>a</sup>	7,59±0,47 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etil-dekanoat	6,49±0,21 <sup>a</sup>	8,13±0,34 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil-dihidrojasmonat	9,70±0,37 <sup>a</sup>	5,90±0,06 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heksil-salicilat	3,64±0,10 <sup>a</sup>	3,88±0,20 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etil-miristat	3,64±0,10 <sup>a</sup>	4,41±0,46 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etil-pentadekanoat	1,79±0,11 <sup>b</sup>	4,01±0,10 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Metil-palmitat	1,68±0,03 <sup>b</sup>	2,26±0,01 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etil-palmitat	1,90±0,11 <sup>b</sup>	3,94±0,24 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A – alginat; C – hitozan; 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 – postotak korištenog nosača; 30, 90 – vrijeme kompleksiranja (min). Vrijednosti u istom retku s različitim eksponentima su statistički značajno različite ( $P < 0,05$ , ANOVA, Fisher-ov LSD test).



**Slika 29** Aromatski profil alginatnih mikročestica bez i s dodatkom hitozana; A – alginat; C – hitozan; 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 – postotak korištenog nosača; 30, 90 – vrijeme kompleksiranja (min)

**Tablica 19** Sadržaj hlapljivih komponenata alginatnih mikročestica bez i s dodatkom karboksimetil celuloze ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

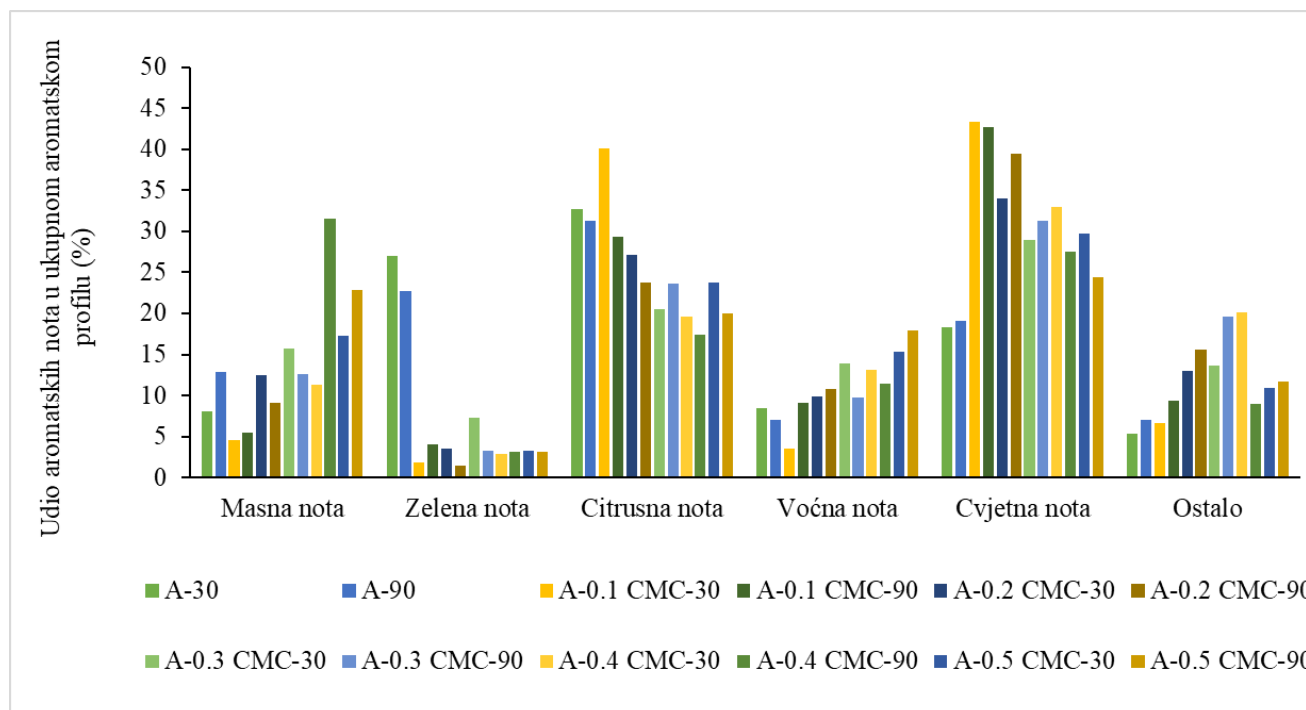
Spoj	A-30	A-90	A-0.1 CMC-30	A-0.1 CMC-90	A-0.2 CMC-30	A-0.2 CMC-90	A-0.3 CMC-30	A-0.3 CMC-90	A-0.4 CMC-30	A-0.4 CMC-90	A-0.5 CMC-30	A-0.5 CMC-90
Kiseline	28,57±1,14 <sup>f</sup> g	43,58±0,85 <sup>c</sup>	7,67±0,18 <sup>i</sup>	13,05±0,17 <sup>b</sup>	29,15±0,35 <sup>f</sup> g	27,09±0,55 <sup>e</sup>	33,32±0,26 <sup>c</sup>	46,87±1,42 <sup>b</sup>	36,67±0,37 <sup>d</sup>	59,89±1,43 <sup>a</sup>	30,39±0,60 <sup>f</sup>	42,88±0,69 <sup>c</sup>

## 4. REZULTATI

2-etilheksanska kiselina	1,26±0,05 <sup>i</sup>	1,45±0,02 <sup>i</sup>	3,52±0,08 <sup>h</sup>	7,03±0,12 <sup>g</sup>	12,97±0,08 <sup>d</sup>	16,25±0,26 <sup>c</sup>	13,84±0,07 <sup>d</sup>	26,57±1,15 <sup>a</sup>	22,73±0,13 <sup>b</sup>	8,28±0,13 <sup>f</sup>	7,95±0,08 <sup>fg</sup>	9,88±0,11 <sup>e</sup>
Oktanska kiselina	-	-	-	-	-	-	2,41±0,01 <sup>d</sup>	2,91±0,00 <sup>c</sup>	-	7,68±0,17 <sup>a</sup>	3,32±0,04 <sup>c</sup>	6,59±0,24 <sup>a</sup>
Nonanska kiselina	11,75±0,60 <sup>f</sup>	20,39±0,22 <sup>b</sup>	0,54±0,00 <sup>j</sup>	5,10±0,02 <sup>i</sup>	12,00±0,21 <sup>e,f</sup>	8,93±0,29 <sup>h</sup>	13,11±0,08 <sup>c</sup>	12,80±0,06 <sup>e,f</sup>	10,14±0,18 <sup>g</sup>	29,65±0,98 <sup>a</sup>	15,64±0,38 <sup>d</sup>	19,07±0,12 <sup>c</sup>
Dekanska kiselina	10,34±0,34 <sup>c</sup>	12,85±0,04 <sup>a</sup>	3,61±0,09 <sup>c</sup>	0,92±0,04 <sup>i</sup>	2,10±0,02 <sup>f</sup>	1,90±0,00 <sup>fg</sup>	1,54±0,02 <sup>gh</sup>	2,01±0,04 <sup>f</sup>	1,73±0,04 <sup>fg,h</sup>	11,31±0,11 <sup>b</sup>	1,47±0,06 <sup>h</sup>	4,91±0,18 <sup>d</sup>
Laurinska kiselina	4,04±0,12 <sup>a</sup>	4,29±0,12 <sup>a</sup>	-	-	2,07±0,04 <sup>d</sup>	-	2,44±0,08 <sup>c</sup>	2,58±0,16 <sup>c</sup>	2,07±0,02 <sup>d</sup>	2,97±0,05 <sup>b</sup>	2,01±0,03 <sup>d</sup>	2,42±0,04 <sup>c</sup>
Palmitinska kiselina	1,18±0,03 <sup>b</sup>	4,60±0,45 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Alkoholi</b>	<b>221,90±4,57<sup>a</sup></b>	<b>192,58±3,29<sup>b</sup></b>	<b>26,38±0,83<sup>d,e</sup></b>	<b>29,23±0,33<sup>c,d,e</sup></b>	<b>31,95±1,39<sup>c</sup></b>	<b>27,02±0,67<sup>c,d,e</sup></b>	<b>27,29±0,52<sup>c,d,e</sup></b>	<b>31,42±0,62<sup>c,d</sup></b>	<b>25,94±0,39<sup>e</sup></b>	<b>27,01±0,68<sup>c,d,e</sup></b>	<b>30,70±0,46<sup>c,d,e</sup></b>	<b>27,64±0,22<sup>c,d,e</sup></b>
3-heksen-1-ol	27,64±0,13 <sup>a</sup>	30,03±0,59 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heks-1-ol	66,72±0,01 <sup>a</sup>	42,70±1,63 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-etilheksan-1-ol	109,72±3,87 <sup>a</sup>	103,32±0,62 <sup>b</sup>	23,51±0,81 <sup>c,d</sup>	24,55±0,30 <sup>c,d</sup>	25,56±1,14 <sup>c</sup>	22,87±0,65 <sup>c,d</sup>	22,69±0,45 <sup>c,d</sup>	25,89±0,40 <sup>c</sup>	20,74±0,22 <sup>d</sup>	22,25±0,61 <sup>c,d</sup>	25,35±0,38 <sup>c</sup>	22,50±0,05 <sup>c,d</sup>
Oktan-1-ol	1,63±0,01 <sup>a</sup>	2,17±0,20 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nonanol	-	-	2,87±0,03 <sup>f</sup>	4,68±0,02 <sup>d</sup>	6,39±0,25 <sup>a</sup>	4,15±0,02 <sup>c</sup>	4,60±0,08 <sup>d</sup>	5,52±0,22 <sup>b</sup>	5,21±0,17 <sup>b</sup>	4,75±0,07 <sup>c,d</sup>	5,34±0,08 <sup>b</sup>	5,14±0,16 <sup>b,c</sup>
Perilil alkohol	16,20±0,54 <sup>a</sup>	14,34±0,25 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Karbonilni spojevi</b>	<b>83,02±3,13<sup>a,b</sup></b>	<b>67,54±3,84<sup>e,f</sup></b>	<b>89,14±2,74<sup>a</sup></b>	<b>83,52±3,17<sup>a,b</sup></b>	<b>74,03±1,68<sup>c,d,e</sup></b>	<b>79,92±3,45<sup>b,c</sup></b>	<b>73,71±0,92<sup>c,d,e</sup></b>	<b>87,34±0,79<sup>a</sup></b>	<b>77,90±1,3<sup>b,c,d</sup></b>	<b>71,87±0,85<sup>d,e,f</sup></b>	<b>65,88±0,78<sup>f</sup></b>	<b>69,04±2,16<sup>e,f</sup></b>
Benzaldehid	13,73±0,14 <sup>a</sup>	5,05±0,04 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6-metil-5-hepten-2-on	8,98±0,71 <sup>a</sup>	4,25±0,30 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oktanal	-	-	2,45±0,07 <sup>a</sup>	-	-	-	-	0,78±0,07 <sup>b</sup>	-	-	-	-
Nonanal	14,74±0,71 <sup>b</sup>	13,00±0,57 <sup>c,d</sup>	23,90±1,14 <sup>a</sup>	11,93±0,93 <sup>d</sup>	10,06±0,38 <sup>c</sup>	9,21±0,13 <sup>e,f</sup>	7,84±0,01 <sup>fg</sup>	14,44±0,09 <sup>b,c</sup>	8,09±0,01 <sup>f</sup>	6,16±0,13 <sup>h</sup>	5,60±0,15 <sup>h</sup>	6,45±0,38 <sup>gh</sup>
Dekanal	21,77±1,18 <sup>g</sup>	22,56±1,86 <sup>g</sup>	42,94±1,23 <sup>a</sup>	44,32±0,57 <sup>a</sup>	36,58±0,65 <sup>c,d</sup>	39,64±2,03 <sup>d,e</sup>	33,89±0,13 <sup>d,e</sup>	44,06±0,02 <sup>a</sup>	41,90±0,61 <sup>a,b</sup>	37,75±0,44 <sup>c</sup>	32,13±0,27 <sup>e,f</sup>	29,77±0,41 <sup>f</sup>
Etil-benzaldehid	8,65±0,02 <sup>h</sup>	7,90±0,14 <sup>h</sup>	4,50±0,22 <sup>j</sup>	12,21±1,10 <sup>g</sup>	14,09±0,06 <sup>c</sup>	15,12±1,17 <sup>b</sup>	20,67±0,54 <sup>b</sup>	16,56±0,21 <sup>d</sup>	19,32±0,33 <sup>b,c</sup>	18,66±0,12 <sup>c</sup>	19,93±0,05 <sup>b,c</sup>	25,92±1,05 <sup>a</sup>
Dodekanal	-	-	5,53±0,06 <sup>a</sup>	4,33±0,06 <sup>b</sup>	3,23±0,28 <sup>d</sup>	4,32±0,04 <sup>c,d</sup>	3,53±0,05 <sup>c,d</sup>	3,83±0,20 <sup>c</sup>	3,15±0,18 <sup>d</sup>	3,53±0,01 <sup>c,d</sup>	2,36±0,05 <sup>e</sup>	2,66±0,11 <sup>e</sup>
Geranil-aceton	5,95±0,34 <sup>a</sup>	5,04±0,50 <sup>b</sup>	4,28±0,01 <sup>c</sup>	3,38±0,15 <sup>d</sup>	2,45±0,04 <sup>e</sup>	3,09±0,06 <sup>fg</sup>	1,44±0,06 <sup>fg</sup>	1,86±0,06 <sup>e,fg</sup>	1,29±0,11 <sup>g</sup>	1,67±0,03 <sup>fg</sup>	1,95±0,17 <sup>e,f</sup>	1,43±0,17 <sup>e,f</sup>
Lilial	4,65±0,02 <sup>a</sup>	4,67±0,29 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heksil-cinamal	4,54±0,01 <sup>f</sup>	5,07±0,13 <sup>c</sup>	5,55±0,01 <sup>d,e</sup>	7,35±0,37 <sup>b</sup>	7,62±0,27 <sup>b</sup>	8,55±0,02 <sup>a</sup>	6,34±0,13 <sup>c</sup>	5,81±0,14 <sup>d</sup>	4,15±0,09 <sup>fg</sup>	4,11±0,11 <sup>fg</sup>	3,90±0,10 <sup>g</sup>	2,80±0,04 <sup>h</sup>
<b>Terpeni</b>	<b>59,00±2,04<sup>b</sup></b>	<b>65,96±2,42<sup>a</sup></b>	<b>17,92±0,57<sup>c</sup></b>	<b>13,07±0,34<sup>d,e,f</sup></b>	<b>14,17±0,30<sup>d,e</sup></b>	<b>15,76±0,14<sup>c,d</sup></b>	<b>11,12±0,22<sup>f</sup></b>	<b>11,76±0,14<sup>e,f</sup></b>	<b>10,88±0,23<sup>f</sup></b>	<b>10,87±0,31<sup>f</sup></b>	<b>10,31±0,25<sup>f</sup></b>	<b>10,90±0,24<sup>f</sup></b>
D-limonen	5,32±0,10 <sup>a</sup>	4,85±0,21 <sup>b</sup>	3,81±0,06 <sup>c</sup>	2,61±0,06 <sup>c</sup>	3,08±0,06 <sup>d</sup>	1,10±0,01 <sup>f</sup>	-	-	-	-	-	-
Linalol oksid	3,72±0,07 <sup>a</sup>	3,41±0,07 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalol	1,64±0,16 <sup>b</sup>	2,66±0,04 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mentol	17,96±0,31 <sup>a</sup>	21,31±1,03 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-citronelol	2,63±0,03 <sup>a</sup>	2,27±0,02 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vitispiran	14,64±0,73 <sup>a</sup>	16,86±0,20 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eugenol	2,02±0,19 <sup>a</sup>	2,04±0,10 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-damascenon	5,20±0,15 <sup>a</sup>	5,31±0,48 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-ionon	0,88±0,10 <sup>a</sup>	1,05±0,01 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-ionon	1,41±0,12 <sup>fg,h</sup>	2,29±0,08 <sup>c</sup>	2,70±0,20 <sup>b</sup>	2,02±0,17 <sup>c,d</sup>	1,83±0,02 <sup>d,e</sup>	3,90±0,07 <sup>a</sup>	1,49±0,03 <sup>fg</sup>	1,70±0,01 <sup>e,f</sup>	1,19±0,01 <sup>h</sup>	1,51±0,09 <sup>fg</sup>	0,68±0,06 <sup>i</sup>	1,29±0,01 <sup>gh</sup>
γ-ionon	3,59±0,09 <sup>a</sup>	3,92±0,17 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trans-pinokarveol	-	-	4,93±0,28 <sup>c</sup>	5,39±0,02 <sup>d</sup>	5,58±0,11 <sup>d</sup>	5,55±0,04 <sup>d</sup>	6,50±0,07 <sup>b,c</sup>	6,90±0,06 <sup>a,b</sup>	6,83±0,16 <sup>a,b</sup>	6,50±0,05 <sup>b,c</sup>	6,20±0,17 <sup>c</sup>	6,98±0,19 <sup>a</sup>
Cedrol	-	-	6,48±0,04 <sup>a</sup>	3,05±0,09 <sup>e,fg</sup>	3,68±0,12 <sup>c</sup>	5,22±0,02 <sup>b</sup>	3,13±0,12 <sup>e,f</sup>	3,17±0,07 <sup>d,e</sup>	2,86±0,06 <sup>gh</sup>	2,86±0,17 <sup>fg,h</sup>	3,43±0,02 <sup>c,d</sup>	2,63±0,04 <sup>h</sup>
<b>Esteri</b>	<b>35,96±1,59<sup>b</sup></b>	<b>40,12±1,88<sup>a</sup></b>	<b>18,61±0,90<sup>d,e</sup></b>	<b>16,51±0,91<sup>c</sup></b>	<b>20,31±0,28<sup>d</sup></b>	<b>17,72±0,07<sup>d,e</sup></b>	<b>24,53±0,20<sup>c</sup></b>	<b>16,52±0,46<sup>c</sup></b>	<b>17,81±0,62<sup>d,e</sup></b>	<b>11,79±0,23<sup>f</sup></b>	<b>10,89±0,25<sup>f</sup></b>	<b>11,71±0,19<sup>f</sup></b>

Etil-heksanoat	7,13±0,53 <sup>a</sup>	7,59±0,47 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etil-dekanoat	6,49±0,21 <sup>a</sup>	8,13±0,34 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil-dihidrojasmonat	9,70±0,37 <sup>a</sup>	5,90±0,06 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heksil-salicilat	3,64±0,10 <sup>f</sup>	3,88±0,20 <sup>e,f</sup>	2,35±0,00 <sup>g</sup>	5,39±0,15 <sup>b</sup>	4,95±0,01 <sup>c</sup>	1,99±0,00 <sup>g</sup>	10,88±0,13 <sup>a</sup>	5,47±0,33 <sup>b</sup>	4,15±0,06 <sup>d,e</sup>	5,21±0,16 <sup>b,c</sup>	4,17±0,08 <sup>d,e</sup>	4,43±0,07 <sup>d</sup>
Etil-miristat	3,64±0,10 <sup>g</sup>	4,41±0,46 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etil-pentadekanoat	1,79±0,11 <sup>b</sup>	4,01±0,10 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Izopropil-miristat	-	-	14,60±0,90 <sup>a</sup>	9,90±0,73 <sup>b</sup>	13,78±0,19 <sup>a</sup>	13,87±0,05 <sup>a</sup>	9,84±0,07 <sup>b</sup>	9,95±0,03 <sup>b</sup>	10,93±0,48 <sup>b</sup>	6,58±0,07 <sup>c</sup>	6,72±0,17 <sup>c</sup>	7,28±0,12 <sup>c</sup>
Metil-palmitat	1,68±0,03 <sup>c</sup>	3,94±0,01 <sup>c</sup>	1,66±0,00 <sup>c</sup>	1,22±0,04 <sup>f</sup>	1,59±0,08 <sup>c</sup>	1,86±0,02 <sup>d</sup>	3,82±0,00 <sup>a</sup>	1,10±0,10 <sup>f</sup>	2,72±0,08 <sup>b</sup>	-	-	-
Etil-palmitat	1,90±0,11 <sup>b</sup>	3,94±0,24 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A – alginat; CMC – karboksimetil celuloza; 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 – postotak korištenog nosača; 30, 90 – vrijeme kompleksiranja (min). Vrijednosti u istom retku s različitim eksponentima su statistički značajno različite ( $P < 0,05$ , ANOVA, Fisher-ov LSD test).



**Slika 30** Aromatski profil alginatnih mikročestica bez i s dodatkom karboksimetil celuloze; A – alginat; CMC – karboksimetil celuloza; 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 – postotak korištenog nosača; 30, 90 – vrijeme kompleksiranja (min)

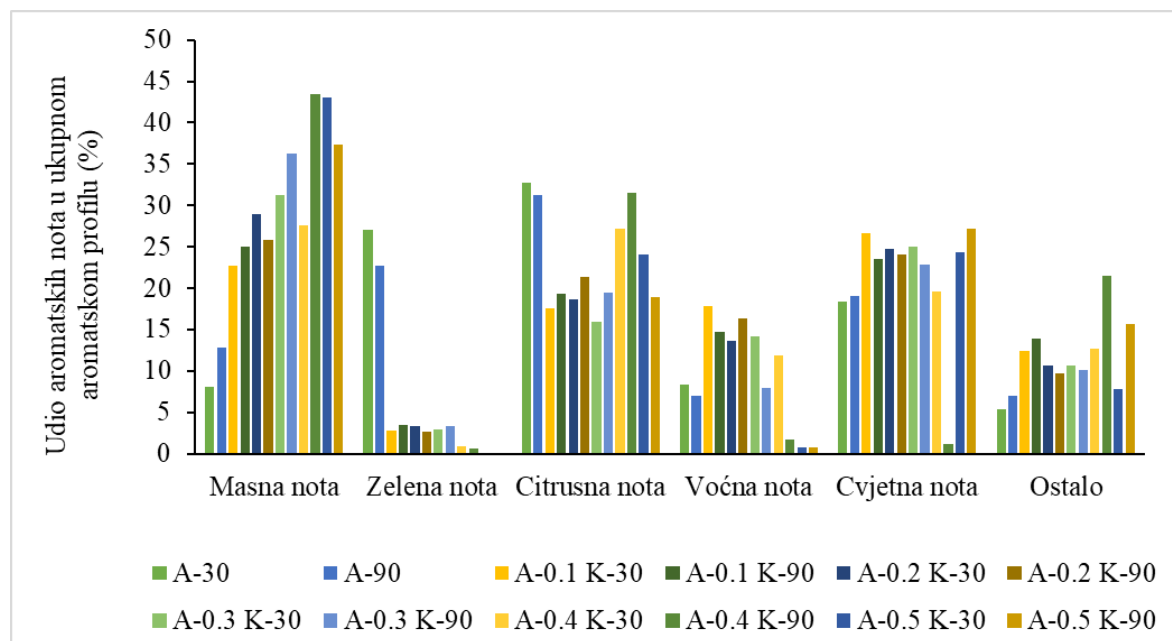


Tablica 20 Sadržaj hlapljivih komponenata alginatnih mikročestica bez i s dodatkom ksantan gume ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Spoj	A-30	A-90	A-0.1 K-30	A-0.1 K-90	A-0.2 K-30	A-0.2 K-90	A-0.3 K-30	A-0.3 K-90	A-0.4 K-30	A-0.4 K-90	A-0.5 K-30	A-0.5 K-90
<b>Kiseline</b>	28,57±1,14 <sup>f</sup>	43,58±0,85 <sup>e</sup>	42,38±0,69 <sup>e</sup>	54,45±1,50 <sup>b</sup>	45,09±0,75 <sup>d,e</sup>	46,57±0,73 <sup>c,d</sup>	53,18±0,96 <sup>b</sup>	47,21±0,93 <sup>c,d</sup>	47,88±0,39 <sup>c,d</sup>	55,05±1,16 <sup>a,b</sup>	57,76±0,77 <sup>a</sup>	49,33±0,50 <sup>e</sup>
2-etilheksanska kiselina	1,26±0,05 <sup>i</sup>	1,45±0,02 <sup>i</sup>	11,34±0,24 <sup>e</sup>	14,80±0,06 <sup>a</sup>	6,45±0,15 <sup>f</sup>	7,94±0,16 <sup>e</sup>	7,96±0,01 <sup>e</sup>	4,69±0,15 <sup>e</sup>	11,04±0,11 <sup>c</sup>	13,87±0,26 <sup>b</sup>	1,86±0,03 <sup>h</sup>	10,25±0,04 <sup>d</sup>
Oktanska kiselina	-	-	6,91±0,04 <sup>e</sup>	8,16±0,26 <sup>c</sup>	8,18±0,11 <sup>c</sup>	8,78±0,23 <sup>b</sup>	9,96±0,02 <sup>a</sup>	5,81±0,01 <sup>f</sup>	5,60±0,12 <sup>f</sup>	7,96±0,10 <sup>c</sup>	7,50±0,07 <sup>d</sup>	3,36±0,13 <sup>g</sup>
Nonanska kiselina	11,75±0,60 <sup>g</sup>	20,39±0,22 <sup>f</sup>	20,29±0,53 <sup>f</sup>	25,39±0,94 <sup>e</sup>	24,34±0,34 <sup>e</sup>	25,04±0,13 <sup>e</sup>	28,19±0,86 <sup>d</sup>	29,09±0,71 <sup>d</sup>	29,05±0,02 <sup>d</sup>	33,23±0,79 <sup>c</sup>	45,80±0,51 <sup>a</sup>	35,72±0,33 <sup>b</sup>
Dekanska kiselina	10,34±0,34 <sup>b</sup>	12,85±0,04 <sup>a</sup>	2,35±0,02 <sup>f,g</sup>	4,08±0,12 <sup>d</sup>	4,39±0,07 <sup>d</sup>	2,97±0,13 <sup>e,f</sup>	5,49±0,06 <sup>c</sup>	3,05±0,00 <sup>e</sup>	2,18±0,15 <sup>g</sup>	-	2,60±0,17 <sup>e,f,g</sup>	-
Laurinska kiselina	4,04±0,12 <sup>b</sup>	4,29±0,12 <sup>a,b</sup>	1,48±0,03 <sup>e</sup>	2,01±0,12 <sup>c</sup>	1,72±0,07 <sup>c,d,e</sup>	1,84±0,08 <sup>c,d</sup>	1,58±0,01 <sup>d,e</sup>	4,56±0,06 <sup>a</sup>	-	-	-	-
Palmitinska kiselina	1,18±0,03 <sup>b</sup>	4,60±0,45 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Alkoholi</b>	221,90±4,57 <sup>a</sup>	192,58±3,29 <sup>b</sup>	24,99±0,52 <sup>c,d</sup>	27,92±0,11 <sup>c</sup>	24,09±0,49 <sup>c,d,e</sup>	27,97±0,15 <sup>c</sup>	21,14±1,02 <sup>d,e,f</sup>	21,59±0,23 <sup>d,e,f</sup>	20,84±0,39 <sup>d,e,f</sup>	19,51±0,93 <sup>e,f</sup>	17,74±0,23 <sup>f</sup>	18,73±0,54 <sup>f</sup>
3-heksen-1-ol	27,64±0,13 <sup>a</sup>	30,03±0,59 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heks-1-ol	66,72±0,01 <sup>a</sup>	42,70±1,63 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-etilheksan-1-ol	109,72±3,87 <sup>a</sup>	103,32±0,62 <sup>b</sup>	19,65±0,34 <sup>c,d,e,f</sup>	22,24±0,08 <sup>c,d</sup>	19,84±0,28 <sup>d,e</sup>	23,76±0,09 <sup>c</sup>	17,00±0,79 <sup>e,f,g</sup>	17,25±0,05 <sup>e,f,g</sup>	16,75±0,31 <sup>e,f,g</sup>	15,80±0,74 <sup>f,g</sup>	14,15±0,00 <sup>g</sup>	14,53±0,44 <sup>g</sup>
Oktan-1-ol	1,63±0,01 <sup>a</sup>	2,17±0,20 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nonanol	-	-	5,34±0,17 <sup>a</sup>	5,68±0,03 <sup>a</sup>	4,25±0,21 <sup>b</sup>	4,21±0,06 <sup>b,c</sup>	4,15±0,23 <sup>b,c</sup>	4,34±0,18 <sup>b</sup>	4,08±0,08 <sup>b,c,d</sup>	3,72±0,19 <sup>c,d</sup>	3,58±0,23 <sup>d</sup>	4,20±0,10 <sup>b,c</sup>
Perilil alkohol	16,20±0,54 <sup>a</sup>	14,34±0,25 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Karbonilni spojevi</b>	83,02±3,13 <sup>a</sup>	67,54±3,84 <sup>b,c</sup>	66,65±1,19 <sup>b,c,d</sup>	72,26±1,69 <sup>b</sup>	58,87±2,66 <sup>c</sup>	70,50±1,79 <sup>b</sup>	62,78±1,05 <sup>c,d,e</sup>	42,19±1,59 <sup>g</sup>	61,54±0,44 <sup>d,e</sup>	40,19±0,33 <sup>g,h</sup>	49,77±0,27 <sup>f</sup>	34,51±0,34 <sup>h</sup>
Benzaldehid	13,73±0,14 <sup>a</sup>	5,05±0,04 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6-metil-5-hepten-2-on	8,98±0,71 <sup>a</sup>	4,25±0,30 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nonanal	14,74±0,71 <sup>c</sup>	13,00±0,57 <sup>d</sup>	4,39±0,17 <sup>h</sup>	8,38±0,16 <sup>e</sup>	4,96±0,49 <sup>g,h</sup>	8,10±0,00 <sup>e</sup>	6,02±0,00 <sup>f</sup>	5,60±0,13 <sup>f,g</sup>	19,53±0,12 <sup>a</sup>	14,13±0,07 <sup>c</sup>	17,09±0,02 <sup>b</sup>	5,29±0,10 <sup>f,g,h</sup>
Dekanal	21,77±1,18 <sup>f</sup>	22,56±1,86 <sup>c,f</sup>	30,78±0,04 <sup>a,b</sup>	31,74±0,14 <sup>a</sup>	28,62±1,01 <sup>b,c</sup>	31,05±0,61 <sup>a,b</sup>	31,17±0,68 <sup>a,b</sup>	24,59±0,81 <sup>d,e</sup>	24,50±0,18 <sup>d,e</sup>	23,38±0,22 <sup>c,f</sup>	30,73±0,23 <sup>a,b</sup>	26,95±0,14 <sup>c,d</sup>
Etil-benzaldehid	8,65±0,02 <sup>e</sup>	7,90±0,14 <sup>c</sup>	24,31±0,61 <sup>a</sup>	23,34±1,06 <sup>a</sup>	18,22±1,00 <sup>c</sup>	24,36±1,07 <sup>a</sup>	20,57±0,25 <sup>b</sup>	9,34±0,57 <sup>e</sup>	15,92±0,09 <sup>d</sup>	1,60±0,01 <sup>f</sup>	1,02±0,01 <sup>f</sup>	0,81±0,01 <sup>f</sup>
Dodekanal	-	-	2,91±0,09 <sup>c</sup>	4,31±0,01 <sup>a</sup>	3,55±0,06 <sup>b</sup>	3,36±0,05 <sup>b</sup>	1,96±0,12 <sup>d</sup>	0,50±0,00 <sup>e</sup>	-	-	-	-
Geranil-aceton	5,95±0,34 <sup>a</sup>	5,04±0,50 <sup>a</sup>	1,44±0,06 <sup>b</sup>	1,22±0,13 <sup>b</sup>	1,02±0,04 <sup>b</sup>	1,11±0,05 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-
Lilial	4,65±0,02 <sup>a</sup>	4,67±0,29 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heksil-cinamal	4,54±0,01 <sup>b</sup>	5,07±0,13 <sup>a</sup>	2,83±0,22 <sup>c</sup>	3,27±0,19 <sup>c</sup>	2,48±0,06 <sup>d</sup>	2,53±0,01 <sup>d</sup>	3,07±0,00 <sup>c</sup>	2,15±0,07 <sup>e</sup>	1,59±0,05 <sup>f</sup>	1,09±0,04 <sup>g</sup>	0,92±0,01 <sup>g</sup>	1,46±0,08 <sup>f</sup>
<b>Terpeni</b>	59,00±2,04 <sup>b</sup>	65,96±2,42 <sup>a</sup>	9,60±0,46 <sup>c,d,e</sup>	10,91±0,25 <sup>c,d</sup>	11,44±0,39 <sup>c</sup>	10,61±0,19 <sup>c,d</sup>	11,66±0,43 <sup>c</sup>	9,87±0,18 <sup>c,d,e</sup>	7,02±0,29 <sup>e,f</sup>	6,57±0,21 <sup>f</sup>	8,25±0,07 <sup>d,e,f</sup>	6,11±0,02 <sup>f</sup>
D-limonen	5,32±0,10 <sup>a</sup>	4,85±0,21 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalol oksid	3,72±0,07 <sup>a</sup>	3,41±0,07 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalol	1,64±0,16 <sup>b</sup>	2,66±0,04 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mentol	17,96±0,31 <sup>a</sup>	21,31±1,03 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -citronelol	2,63±0,03 <sup>a</sup>	2,27±0,02 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vitispiran	14,64±0,73 <sup>a</sup>	16,86±0,20 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eugenol	2,02±0,19 <sup>a</sup>	2,04±0,10 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -damascenon	5,20±0,15 <sup>a</sup>	5,31±0,48 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -ionon	0,88±0,10 <sup>a</sup>	1,05±0,01 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -ionon	1,41±0,12 <sup>c</sup>	2,29±0,08 <sup>a</sup>	1,35±0,04 <sup>c,d</sup>	1,08±0,01 <sup>d,e</sup>	0,94±0,04 <sup>e</sup>	1,21±0,00 <sup>c,d</sup>	1,98±0,04 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-
$\gamma$ -ionon	3,59±0,09 <sup>a</sup>	3,92±0,17 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -pinokarveol	-	-	5,60±0,32 <sup>f</sup>	7,23±0,01 <sup>c</sup>	7,80±0,17 <sup>b</sup>	6,56±0,06 <sup>d</sup>	7,40±0,19 <sup>b,c</sup>	7,24±0,13 <sup>c</sup>	5,93±0,15 <sup>e</sup>	6,57±0,21 <sup>d</sup>	8,25±0,07 <sup>a</sup>	6,11±0,02 <sup>e</sup>
Cedrol	-	-	2,64±0,10 <sup>a</sup>	2,60±0,24 <sup>a</sup>	2,71±0,18 <sup>a</sup>	2,84±0,13 <sup>a</sup>	2,28±0,20 <sup>a</sup>	2,63±0,03 <sup>a</sup>	1,09±0,13 <sup>b</sup>	-	-	-
<b>Esteri</b>	35,96±1,59 <sup>b</sup>	40,12±1,88 <sup>a</sup>	9,22±0,17 <sup>d,e</sup>	12,35±0,19 <sup>c</sup>	10,56±0,49 <sup>c,d</sup>	9,27±0,25 <sup>d,e</sup>	9,19±0,34 <sup>d,e</sup>	8,11±0,12 <sup>e</sup>	3,53±0,20 <sup>f</sup>	2,02±0,08 <sup>f</sup>	1,94±0,01 <sup>f</sup>	1,47±0,01 <sup>f</sup>

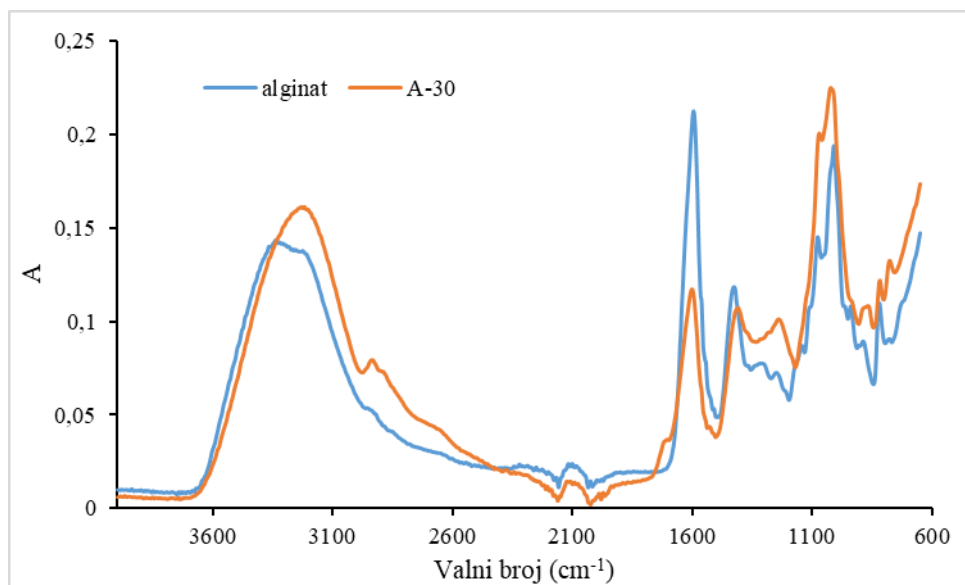
Etil-heksanoat	7,13±0,53 <sup>a</sup>	7,59±0,47 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etil-dekanoat	6,49±0,21 <sup>a</sup>	8,13±0,34 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil-dihidrojasmonat	9,70±0,37 <sup>a</sup>	5,90±0,06 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heksil-salicilat	3,64±0,10 <sup>c</sup>	3,88±0,20 <sup>b,c</sup>	3,79±0,03 <sup>b,c</sup>	5,60±0,09 <sup>a</sup>	4,43±0,36 <sup>b</sup>	3,91±0,17 <sup>b,c</sup>	4,34±0,27 <sup>b</sup>	3,88±0,09 <sup>b,c</sup>	1,24±0,06 <sup>d</sup>	0,56±0,00 <sup>e</sup>	-	-	-
Etil-miristat	3,64±0,10 <sup>a</sup>	4,41±0,46 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etil-pentadekanoat	1,79±0,11 <sup>b</sup>	4,01±0,10 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Izopropil-miristat	-	-	5,44±0,15 <sup>c</sup>	6,75±0,09 <sup>a</sup>	6,12±0,13 <sup>b</sup>	5,36±0,08 <sup>c</sup>	4,85±0,07 <sup>d</sup>	4,22±0,03 <sup>e</sup>	2,29±0,15 <sup>f</sup>	1,46±0,08 <sup>h</sup>	1,94±0,01 <sup>g</sup>	1,47±0,01 <sup>h</sup>	-
Metil-palmitat	1,68±0,03 <sup>b</sup>	3,94±0,01 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etil-palmitat	1,90±0,11 <sup>b</sup>	3,94±0,24 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A – alginat; K – ksantan guma; 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 – postotak korištenog nosača; 30, 90 – vrijeme kompleksiranja (min). Vrijednosti u istom retku s različitim eksponentima su statistički značajno različite ( $P < 0,05$ , ANOVA, Fisher-ov LSD test).

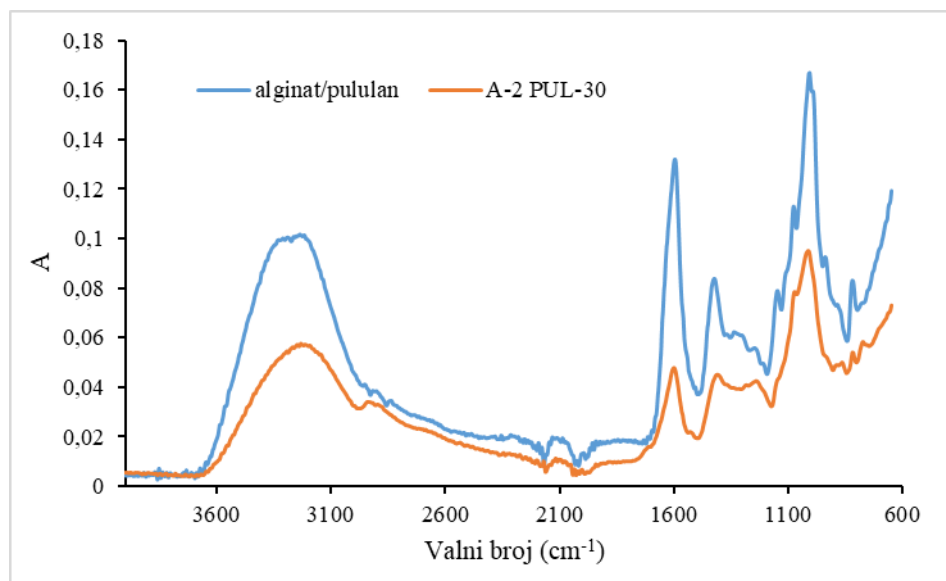


**Slika 31** Aromatski profil alginatnih mikročestica bez i s dodatkom ksantan gume; A – alginat; K – ksantan guma; 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 – postotak korištenog nosača; 30, 90 – vrijeme kompleksiranja (min)

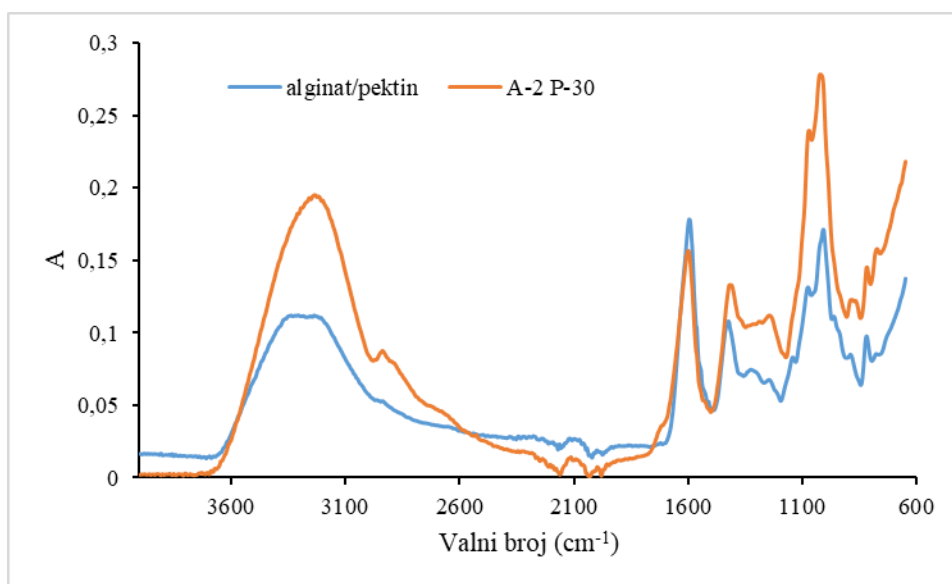
#### 4.8. IR SPEKTRI ALGINATNIH MIKROČESTICA



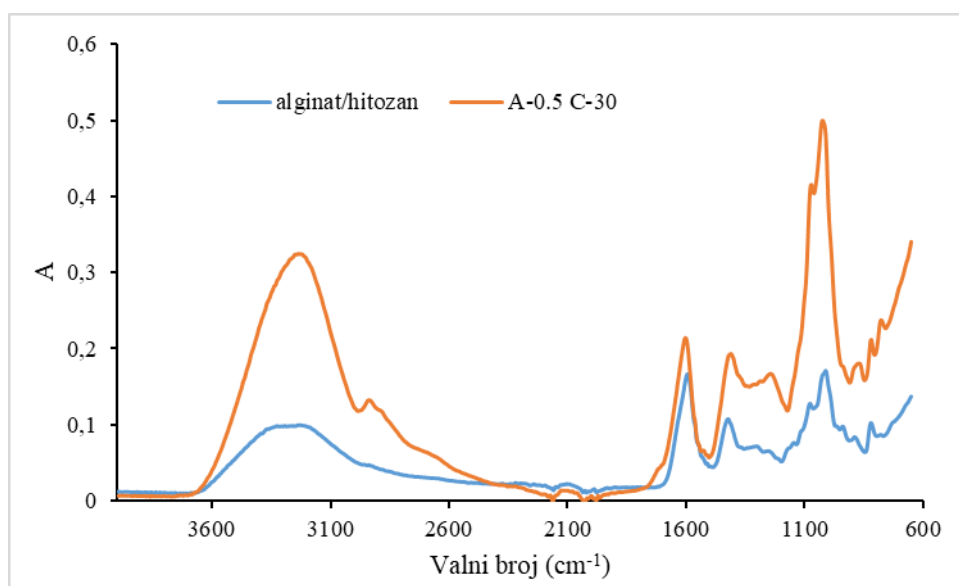
**Slika 32** IR spektri uzorka alginatnih mikročestica bez soka aronije (alginat) i uzorka alginatnih mikročestica sa sokom aronije kompleksiranog 30 min (A-30)



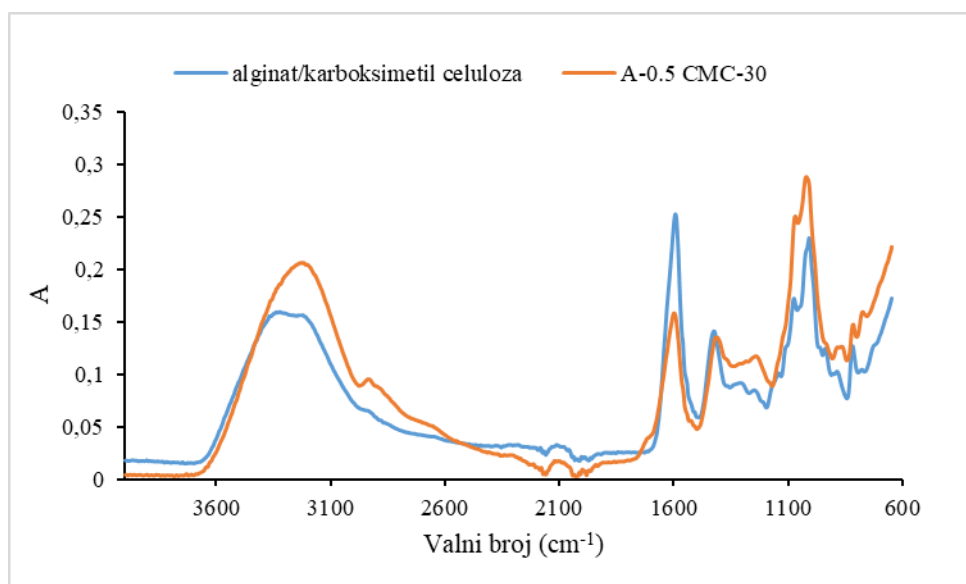
**Slika 33** IR spektri uzorka alginatnih mikročestica bez soka aronije s dodatkom pululana (alginat/pululan) i uzorka alginatnih mikročestica sa sokom aronije i dodatkom 2 % pululana kompleksiranog 30 min (A-2 PUL-30)



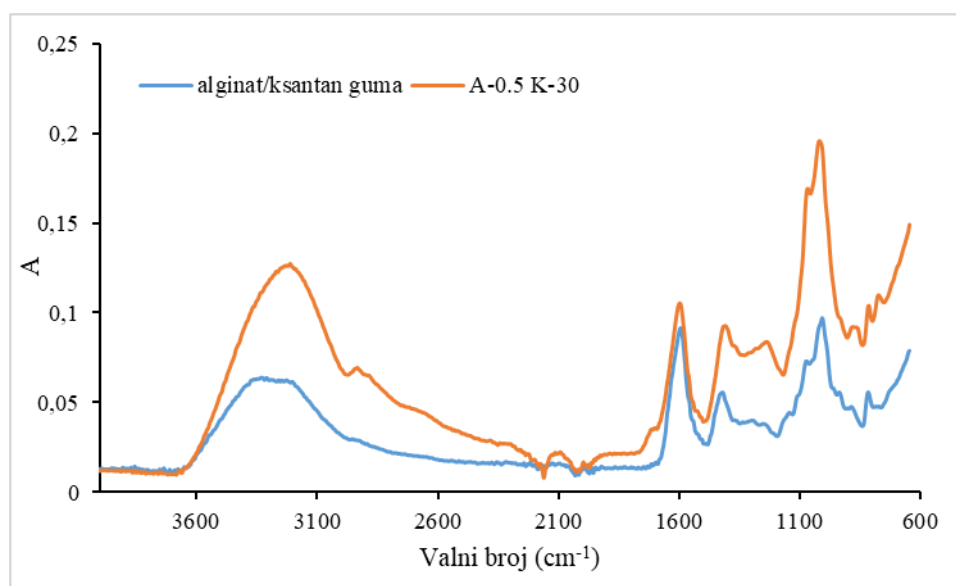
**Slika 34** IR spektri uzorka alginatnih mikročestica bez soka aronije s dodatkom pektina (alginat/pektin) i uzorka alginatnih mikročestica sa sokom aronije i dodatkom 2 % pektina kompleksiranog 30 min (A-2 P-30)



**Slika 35** IR spektri uzorka alginatnih mikročestica bez soka aronije s dodatkom hitozana (alginat/hitozan) i uzorka alginatnih mikročestica sa sokom aronije i dodatkom 0,5 % hitozana kompleksiranog 30 min (A-0.5 C-30)



**Slika 36** IR spektri uzorka alginatnih mikročestica bez soka aronije s dodatkom karboksimetil celuloze (alginat/karboksimetil celuloza) i uzorka alginatnih mikročestica sa sokom aronije i dodatkom 0,5 % karboksimetil celuloze kompleksiranog 30 min (A-0.5 CMC-30)



**Slika 37** IR spektri uzorka alginatnih mikročestica bez soka aronije s dodatkom ksantan gume (alginat/ksantan guma) i uzorka alginatnih mikročestica sa sokom aronije i dodatkom 0,5 % ksantan gume kompleksiranog 30 min (A-0.5 K-30)

## **5. RASPRAVA**

## 5.1. SOK ARONIJE

### *Sadržaj polifenola u soku aronije*

U ovom istraživanju sok aronije odabran je kao izvor polifenola zbog svojeg visokog sadržaja ovih biološki aktivnih komponenata. Zbog zdravstvenih tvrdnji povezanih s njegovom potrošnjom, sok aronije predmetom je brojnih istraživanja (Mayer-Miebach i sur., 2012; Tolić i sur., 2015; Sidor i sur., 2020). U **Tablici 8** prikazani su rezultati dobiveni za sok aronije koji je korišten za pripremu alginatnih mikročestica. Od individualnih polifenola čije su koncentracije određene HPLC analizom, najzastupljeniji polifenol bila je neoklorogenska kiselina. Njezina koncentracija iznosila je 188,45 mg/L. Osim neoklorogenske kiseline, detektirana je i klorogenska kiselina čija je koncentracija bila 48,64 mg/L. Visoke koncentracije neoklorogenske i klorogenske kiseline u soku aronije određene su i u istraživanju od Nowak i sur. (2015), gdje je koncentracija neoklorogenske kiseline iznosila 542,60 mg/L, dok je koncentracija klorogenske kiseline u istom istraživanju bila 425,10 mg/L. Druga istraživanja također potvrđuju kako je sok aronije bogat izvor fenolnih kiselina, posebice klorogenske i neoklorogenske kiseline (Bursać Kovačević i sur., 2016). Koncentracija antocijanina važan je čimbenik koji utječe na kvalitetu bobičastog voća jer su antocijanini kao prirodni pigmenti zaslužni za boju voća privlačnu kupcima. Zbog njihovih pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje, preradom voća nastoje se formulirati obogaćeni sokovi koji sadrže visoke koncentracije antocijanina iz bobica voća (Hellström i sur., 2013). Antocijanini detektirani u soku aronije bili su cijanidin-3-galaktozid (4,81 mg/L) i cijanidin-3-arabinozid (1,19 mg/L). Cijanidin-3-galaktozid bio je najzastupljeniji antocijanin u soku aronije i u drugim istraživanjima (Jakobek i sur., 2007). U ovom istraživanju u soku aronije od flavonola detektirani su kvercetin-3-galaktozid (9,12 mg/L) i kvercetin-3-rutinozid (17,28 mg/L). Osim kvercetin-3-galaktozida i kvercetin-3-rutinozida, u nekim sokovima aronije detektirani su i drugi flavonoli (kvercetin-3-glukozid i kvercetin-3-vicianozid) (Bursać Kovačević i sur., 2016). Sadržaj polifenola u soku aronije može se razlikovati ovisno o kultivaru aronije, fazi dozrijevanja kao i o primijenjenoj tehnologiji proizvodnje soka (Sosnowska i sur., 2015). Dokazano je kako vremenski uvjeti, kao što su temperatura i insolacija utječu na sadržaj polifenola u soku aronije. Topli i suhi klimatski uvjeti imaju pozitivan utjecaj na sadržaj polifenola u soku aronije (Jurendić i Ščetar, 2021).

### *Antioksidacijska aktivnost soka aronije*

U **Tablici 8** prikazane su vrijednosti antioksidacijske aktivnosti soka aronije određene pomoću

DPPH (30,40  $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ ), ABTS (103,81  $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ ), FRAP (3,97  $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ ) i CUPRAC (242,88  $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ ) metoda. Visoke koncentracije polifenola utječu na visoku antioksidacijsku aktivnost soka aronije (Jurendić i Ščetar, 2021). Tolić i sur. (2015) utvrdili su da je antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom za 11 različitih sokova aronije bila u rasponu od 38,71 mmol/L do 79,86 mmol/L, dok je antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom bila u rasponu od 12,09 mmol/L do 40,19 mmol/L. Poznato je da zbog visokog sadržaja polifenola, sok aronije ima veću antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom u odnosu na druge komercijalno dostupne sokove (sokovi naranče, jabuke, trešnje, crnog ribiza) (Nowak i sur., 2015). Antioksidacijska aktivnost za tri različita soka aronije određena pomoću DPPH, ABTS i CUPRAC metode objavljena je u istraživanju od Kapci i sur. (2013). DPPH metodom određena je antioksidacijska aktivnost u rasponu od 5,7 g/kg do 6,2 g/kg, ABTS metodom određena je antioksidacijska aktivnost u rasponu od 9,8 g/kg do 10,8 g/kg, dok je CUPRAC metodom određena antioksidacijska aktivnost u rasponu od 30,7 g/kg do 35,1 g/kg.

#### *Sposobnost inibicije enzima $\alpha$ -amilaze i $\alpha$ -glukozidaze polifenolima soka aronije*

Određena je inhibicija enzima  $\alpha$ -amilaze pomoću soka aronije korištenog za pripremu alginatnih mikročestica te su dobiveni rezultati prikazani u **Tablici 8**. Rezultati su pokazali da je 26,06 %-tnu inhibiciju enzima  $\alpha$ -amilaze uzrokovala koncentracija polifenola soka aronije od 6,26 mg/L, dok je 52,11 %-tnu inhibiciju istog enzima uzrokovala koncentracija akarboze od 6,67 mg/L. Prethodno objavljena istraživanja pokazala su da polifenoli aronije inhibiraju  $\alpha$ -amilazu te tako imaju blagotvorni učinak na prevenciju pretilosti (Worsztynowicz i sur., 2014). Liječenje poremećaja metabolizma ugljikohidrata moguće je i inhibicijom enzima  $\alpha$ -glukozidaze (de Oliveira Raphaelli i sur., 2019). Rezultati dobiveni u ovom istraživanju pokazali su da je 0,02 mg/L polifenola soka aronije uzrokovalo 85,94 % inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze, dok je za inhibiciju od 66,04 % bila potrebna koncentracija akarboze od 200 mg/L. Isto je uočeno u istraživanju od de Oliveira Raphaelli i sur. (2019), gdje su polifenoli jabuke imali jači inhibicijski potencijal na  $\alpha$ -glukozidazu od akarboze. Dokazano je da antocijanini imaju dobar potencijal za prevenciju i liječenje dijabetesa tipa 2 (Bahadoran i sur., 2013) te se može zaključiti kako je inhibicija  $\alpha$ -glukozidaze polifenola aronije povezana sa sadržajem antocijanina od kojih je cijanidin-3-galaktozid bio prisutan u najvećoj koncentraciji.

#### *Sadržaj hlapljivih komponenata soka aronije*



U soku aronije detektirane su hlapljive komponente i njihove koncentracije prikazane su u **Tablici 9**. Detektirana je 41 komponenta od kojih je ukupno 5 kiselina, 8 alkohola, 8 karbonilnih spojeva, 11 terpena i 9 estera. Najveću koncentraciju imala je skupina alkohola (6602,10  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ), a najviše detektiranih hlapljivih komponenata pripadalo je skupini terpena (11) s ukupnom koncentracijom 550,70  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . Heks-1-ol bio je prisutan u najvećoj koncentraciji u soku aronije (3423,12  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ). Od prisutnih kiselina, najzastupljenija je bila nonanska kiselina s koncentracijom 66,30  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , dok je kod estera etil-heksanoat bio je prisutan u najvećoj koncentraciji (79,10  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ). Od prisutnih karbonilnih spojeva najveću koncentraciju imao je benzaldehid (1013,26  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ). Koncentracije terpena detektiranih u soku aronije bile su u rasponu od 4,94  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  ( $\gamma$ -ionon) do 258,62  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  (vitispiran).

Butorova i sur. (2016) detektirali su ukupno 39 hlapljivih spojeva u aroniji od kojih je najviše spojeva pripadalo skupini alkohola. Hlapljive komponente soka aronije analizirali su Romani i sur. (2016) te su u najvećim koncentracijama bili zastupljeni heks-1-ol, 3-penten-2-on i 2-heksen-1-ol. Hirvi i Honkanen (1985) detektirali su 48 hlapljivih komponenata u soku aronije te utvrdili kako su koncentracije pojedinačnih komponenti u soku aronije bile vrlo niske. Benzaldehid važna je hlapljiva komponenta prisutna u voću i jedan je od sastojaka arome badema. Dobiva se iz različitog voća kao što su breskve, marelice i višnje te se dodaje u bombone, gazirana pića i slastice (Chandra i sur., 1993). Razlike u sadržaju hlapljivih komponenata rezultat su klimatskih i geografskih uvjeta. Također, povećana koncentracija alkoholnih komponenata može biti povezana s vrlo ranim fazama fermentacije koje se odvijaju u voću. Sinteza hlapljivih spojeva u voću uglavnom je povezana sa stvaranjem pigmenata tijekom procesa zrenja, oksidacijom i razgradnjom glavnih sastojaka voća kojima nastaju različiti hlapljivi spojevi. Tako se npr. D-limonen sintetizira u biljkama iz dva početna terpena preko dva sintetska puta u prisutnosti terpen sintaza (Buturova i sur., 2016).

Svaki hlapljivi spoj ima karakterističnu notu i na temelju ovog svojstva na **Slici 22** prikazan je aromatski profil soka aronije. Najzastupljenija nota bila je zelena i njezina zastupljenost iznosila je više od 50 %, zatim je slijedila voćna nota sa zastupljenošću većom od 30 %, dok su masna, citrusna i cvjetna nota bile zastupljene ispod 10 %.

## 5.2. SADRŽAJ UKUPNIH POLIFENOLA, ANTOCIJANINA I PROANTOCIJANIDINA U ALGINATNIM MIKROČESTICAMA

U **Tablici 10** prikazani su rezultati ukupnih polifenola u alginatnim mikročesticama pripremljenim

bez i s dodatkom 0,5 %, 1 %, 1,5 % i 2 % pululana ili pektina i kompleksiranih u otopini za geliranje 30 ili 90 min. Kontrolni uzorci imali su vrijednosti ukupnih polifenola 635,03 mg/100 g za A-30 i 637,86 mg/100 g za A-90 bez statistički značajne razlike između uzoraka. Rezultati ukupnih polifenola u pripremljenim mikročesticama bili su u rasponu od 571,96 mg/100 g do 1060,10 mg/100 g. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je dodatak pululana utjecao pozitivno na mikroinkapsulaciju ukupnih polifenola soka aronije u alginatnim mikročesticama jer su mikročestice s dodatkom pululana imale veće koncentracije ukupnih polifenola u odnosu na kontrolne uzorke (A-30 i A-90). Kod mikročestica s dodatkom pululana, vrijeme kompleksiranja uzrokovalo je razlike u koncentracijama polifenola kod uzoraka s dodatkom iste količine nosača te je samo kod dodatka 0,5 % pululana duže vrijeme kompleksiranja uzrokovalo smanjenje koncentracije ukupnih polifenola. U drugim su uzorcima dužim vremenom kompleksiranja inkapsulirane veće koncentracije ukupnih polifenola. Kod mikročestica s dodatkom pektina, samo je uzorak A-2 P-90 (707,53 mg/100 g) imao veću koncentraciju ukupnih polifenola u odnosu na kontrolne uzorke (A-30 i A-90). Kod ostalih uzoraka s dodatkom pektina nije uočena statistički značajna razlika između koncentracije ukupnih polifenola u odnosu na kontrolne uzorke (uzorci A-1 P-30, A-1 P-90, A-1.5 P-30 i A-1.5 P-90) ili je dodatkom pektina došlo do smanjenja koncentracije ukupnih polifenola (uzorci A-0.5 P-30, A-0.5 P-90 i A-2 P-30). Vrijeme kompleksiranja samo je u slučaju dodatka 2 % pektina imalo utjecaj na sadržaj ukupnih polifenola jer je uzorak kompleksiran 30 min (592,99 mg/100 g) imao manju koncentraciju ukupnih polifenola u odnosu na uzorak kompleksiran 90 min (707,53 mg/100 g). Kod ostalih uzoraka s dodatkom pektina nisu uočene statistički značajne razlike s produžetkom vremena kompleksiranja s 30 min na 90 min.

U **Tablici 10** prikazane su koncentracije proantocijanidina u alginatnim mikročesticama pripremljenim bez i s dodatkom 0,5 %, 1 %, 1,5 % i 2 % pululana ili pektina i kompleksiranih u otopini za geliranje 30 ili 90 min. Produžetak vremena kompleksiranja pozitivno je utjecao na mikroinkapsulaciju proantocijanidina u mikročesticama pripremljenim samo s alginatom kao nosačem (kontrolni uzorci) jer je uzorak A-90 (198,49 mg/100 g) imao veću koncentraciju proantocijanidina od uzorka A-30 (193,29 mg/100 g). Koncentracije proantocijanidina bile su u rasponu od 151,57 mg/100 g do 295,34 mg/100 g. Najveću koncentraciju proantocijanidina imao je uzorak A-1 PUL-90. Isti je uzorak imao i najveću koncentraciju ukupnih polifenola. Svi uzorci s dodatkom pululana imali su veće koncentracije proantocijanidina u odnosu na kontrolne uzorke

(A-30 i A-90). Iz tih rezultata moguće je zaključiti kako je dodatak pululana pozitivno utjecao na mikroinkapsulaciju proantocijanidina soka aronije u alginatnim mikročesticama. U alginatnim mikročesticama s dodatkom pululana produžetak vremena kompleksiranja s 30 na 90 min imao je pozitivan utjecaj na mikroinkapsulaciju proantocijanidina, osim u slučaju dodatka 0,5 % pululana gdje je s produžetkom vremena kompleksiranja došlo do smanjenja koncentracije proantocijanidina s 271,76 mg/100 g (A-0.5 PUL-30) na 258,99 mg/100 g (A-0.5 PUL-90). Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako je dodatak pektina u alginatne mikročestice negativno utjecao na mikroinkapsulaciju proantocijanidina iz soka aronije jer su svi uzorci s dodatkom pektina imali manje koncentracije proantocijanidina u odnosu na kontrolne uzorke (A-30 i A-90). Od svih alginatnih mikročestica s dodatkom pektina kao nosača, najveću koncentraciju proantocijanidina imao je uzorak s dodatkom 2% pektina kompleksiran 90 min u otopini za geliranje (179,69 mg/100 g).

U **Tablici 10** prikazane su koncentracije antocijanina u alginatnim mikročesticama pripremljenim bez i s dodatkom 0,5 %, 1 %, 1,5 % i 2 % pululana ili pektina i kompleksiranih u otopini za geliranje 30 ili 90 min. Kontrolni uzorci imali su vrijednosti antocijanina 8,30 mg/100 g za A-30 i 8,77 mg/100 g za A-90 bez statistički značajne razlike između uzoraka. Koncentracije antocijanina u alginatnim mikročesticama s dodatkom pululana i pektina kao nosača bile su u rasponu od 7,50 mg/100 g do 13,96 mg/100 g. Iz dobivenih rezultata uočeno je kako je dodatak pululana kao nosača u alginatne mikročestice pozitivno utjecao na mikroinkapsulaciju antocijanina jer su svi uzorci s dodatkom pululana imali veće koncentracije antocijanina u odnosu na kontrolne uzorke koji su sadržavali samo alginat kao nosač (A-30 i A-90). Iz rezultata je vidljivo da je za očuvanje antocijanina najpovoljniji sastav omotača bio dodatak 1 % pululana u alginatni omotač uz vrijeme kompleksiranja 90 min. Osim antocijanina, ova formulacija omotača alginatnih mikročestica očuvala je najveće koncentracije ukupnih polifenola i proantocijanidina određenim spektrofotometrijskim metodama. Dodatak pektina također je u nekim slučajevima utjecao pozitivno na očuvanje antocijanina jer su uzorci s dodatkom 1,5 % pektina i vremenom kompleksiranja 30 min te uzorci s dodatkom od 2 % pektina i vremenom kompleksiranja 30 i 90 min imali veće koncentracije antocijanina u odnosu na uzorke koji su sadržavali samo alginat kao nosač. Produžetak vremena kompleksiranja u otopini za geliranje s 30 na 90 min je samo u slučaju dodatka 1 % i 1,5 % pululana uzrokovao povećanje koncentracije antocijanina u alginatnim mikročesticama, kod ostalih uzoraka je produženje vremena kompleksiranja negativno utjecalo na

koncentraciju antocijanina ili nije imalo statistički značajan utjecaj.

U **Tablici 11** prikazani su rezultati ukupnih polifenola u alginatnim mikročesticama pripremljenim bez i s dodatkom 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 % i 0,5 % hitozana, karboksimetil celuloze ili ksantan gume i kompleksiranih u otopini za geliranje 30 ili 90 min. Kontrolni uzorci imali su vrijednosti ukupnih polifenola 635,03 mg/100 g za A-30 i 637,86 mg/100 g za A-90 bez statistički značajne razlike između uzoraka. Rezultati ukupnih polifenola određeni spektrofotometrijskom analizom bili su u rasponu od 532,45 mg/100 g do 958,78 mg/100 g. Dodatak hitozana samo je za uzorke A-0.1 C-30 (670,88 mg/100 g) i A-0.3 C-30 (681,98 mg/100 g) utjecao na povećanje koncentracije ukupnih polifenola jer su oba uzorka imali veće koncentracije u odnosu na kontrolne uzorke bez dodatka polimera (A-30 i A-90). Kod ostalih uzoraka je s dodatkom hitozana došlo do smanjenja koncentracije ukupnih polifenola (A-0.1 C-90, A-0.2 C-90, A-0.3 C-90 i A-0.5 C-90) ili nije došlo do statistički značajnih promjena (A-0.2 C-30 i A-0.4 C-30). Dodatak karboksimetil celuloze utjecao je pozitivno na očuvanje ukupnih polifenola u alginatnim mikročesticama u nekim slučajevima. Svi uzorci s dodatkom karboksimetil celuloze imali su veće koncentracije ukupnih polifenola u odnosu na uzorke samo s alginatom kao nosačem, osim u slučaju dodatka 0,5 % CMC kompleksiranog tijekom 30 min jer nije uočena statistički značajna razlika između ukupnih polifenola ovog uzorka i kontrolnih uzoraka (A-30 i A-90). Dodatak ksantan gume utjecao je na povećanje sadržaja ukupnih polifenola samo u slučaju dodatka 0,3 % ksantan gume tijekom 30 i 90 minuta kompleksiranja u otopini za geliranje. Ti uzorci sadržavali su 793,31 mg/100 g ukupnih polifenola za A-0.3 K-30 i 689,69 mg/100 g za A-0.3 K-90. Dodatkom ostalih ispitivanih količina ksantan gume u omotač alginatnih mikročestica nije došlo do statistički značajnih promjena ili je došlo do smanjenja sadržaja ukupnih polifenola u odnosu na kontrolne uzorke koji su sadržavali samo alginat kao nosač (A-30 i A-90).

U **Tablici 11** prikazane su koncentracije proantocijanidina u alginatnim mikročesticama pripremljenim bez i s dodatkom 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 % i 0,5 % hitozana, karboksimetil celuloze ili ksantan gume i kompleksiranih u otopini za geliranje 30 ili 90 min. Kontrolni uzorci imali su vrijednosti proantocijanidina 193,29 mg/100 g za A-30 i 198,49 mg/100 g za A-90. Koncentracije proantocijanidina određene spektrofotometrijskim metodama bile su u rasponu od 143,62 mg/100 g do 281,86 mg/100 g. Svi uzorci pripremljeni s dodatkom hitozana imali su manje koncentracije ukupnih proantocijanidina u odnosu na kontrolne uzorke koji su sadržavali samo alginat kao nosač te je stoga moguće zaključiti da je dodatak hitozana utjecao negativno na mikroinkapsulaciju

proantocijanidina, neovisno o dodanoj količini hitozana i vremenu kompleksiranja u otopini za geliranje. Najveća koncentracija ukupnih proantocijanidina u uzorcima s dodatkom hitozana određena je za uzorak A-0.4 C-30 koji je sadržavao 165,75 mg/100 g proantocijanidina. Iz rezultata se može zaključiti da je dodatak karboksimetil celuloze utjecao pozitivno na zadržavanje proantocijanidina jer su svi uzorci s dodatkom karboksimetil celuloze sadržavali veće koncentracije proantocijanidina (u rasponu od 201,95 mg/100 g do 281,86 mg/100 g) u odnosu na kontrolne uzorke. Produženje vremena kompleksiranja s 30 min na 90 min samo je u slučaju dodatka 0,3 % karboksimetil celuloze uzrokovalo smanjenje koncentracije proantocijanidina, kod ostalih uzorka s dodatkom karboksimetil celuloze je s povećanjem vremena kompleksiranja došlo do povećanja koncentracije proantocijanidina. Dodatkom ksantan gume samo je u slučaju dodatka 0,3 % ksantan gume došlo do povećanja koncentracije proantocijanidina (254,70 mg/100 g za uzorak kompleksiran 30 min i 203,67 mg/100 g za uzorak kompleksiran 90 min) u odnosu na oba kontrolna uzorka.

U **Tablici 11** prikazane su koncentracije antocijanina u alginatnim mikročesticama pripremljenim bez i s dodatkom 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 % i 0,5 % hitozana, karboksimetil celuloze ili ksantan gume i kompleksiranih u otopini za geliranje 30 ili 90 min. Kontrolni uzorci imali su vrijednosti antocijanina 8,30 mg/100 g za A-30 i 8,77 mg/100 g za A-90. Koncentracije antocijanina određene spektrofotometrijski bile su u rasponu od 8,30 mg/100 g do 27,15 mg/100 g. Dodatak hitozana utjecao je pozitivno na mikroinkapsulaciju antocijanina u slučaju dodatka 0,2 % i 0,3 % hitozana i vremenu kompleksiranja 30 min i dodatka 0,5 % hitozana s vremenom kompleksiranja 90 min jer su ti uzorci imali veće koncentracije antocijanina od oba kontrolna uzorka. Iz rezultata je vidljivo da je dodatak karboksimetil celuloze utjecao na povećanje koncentracije antocijanina u alginatnim mikročesticama jer su svi uzorci s dodatkom karboksimetil celuloze imali veće koncentracije antocijanina od onih samo s alginatom kao nosačem bez obzira na vrijeme kompleksiranja u otopini za geliranje. Produženje vremena kompleksiranja s 30 min na 90 min u slučaju dodatka 0,3 % i 0,5 % karboksimetil celuloze uzrokovalo je smanjenje koncentracije antocijanina u alginatnim mikročesticama. Dodatak ksantan gume kao nosača utjecao je pozitivno na mikroinkapsulaciju antocijanina u alginatnim mikročesticama. Svi uzorci s dodatkom ksantan gume imali su veće koncentracije antocijanina u odnosu na kontrolne uzorke (A-30 i A-90). Produženje vremena kompleksiranja s 30 min na 90 min uzrokovalo je povećanje koncentracije antocijanina samo u slučaju dodatka 0,4 % ksantan gume, dok je u ostalim slučajevima uzrokovalo njezino smanjenje

ili nije uzrokovalo statistički značajne promjene u koncentraciji antocijanina.

Više je istraživača proučavalo mogućnosti mikroinkapsulacije bioaktivnih komponenata u alginatne mikročestice s ciljem povećanja njihove stabilnosti (Fang i Bhandari, 2010; Nedović i sur., 2011; Rijo i sur., 2014). Kako bi se omogućilo formiranje alginatnih mikročestica, potrebna je odgovarajuća koncentracija natrijevog alginata. Pri manjim koncentracijama alginata, sile viskoznog trenja i površinska napetost manje su od potrebnih i ne dolazi do formiranja alginatnih mikročestica zbog nedovoljnog broja karboksilnih skupina potrebnih za geliranje što uzrokuje veću difuziju aktivne tvari u okolinu (Aguirre-Calvo i sur., 2021). Zbog toga je u ovom istraživanju odabrana odgovarajuća količina alginata od 3,75 %.

U istraživanju od Bušić i sur. (2017) zabilježeno je da je dodatak drugih polisaharida (pektina, derivata celuloze i hitozana) ili punila (praha rogača ili kaka) uzrokovao poboljšanje inkapsulacije aktivnih tvari u alginatne mikročestice poboljšanjem porozne strukture alginata, što je omogućilo inkapsulaciju spojeva s manjom molekulskom masom. Kombinacija alginata i pektina s proteinima ili derivatima celuloze omogućila je mikroinkapsulaciju polifenola smanjenjem difuzije kroz mikrostrukturu alginata jer su dodatne komponente služile kao čvrsta barijera koja je blokirala prijenos iz mikročestica u okolinu. Moguće su i interakcije između komponenti koje mogu osigurati kemijsko „zarobljivanje“ bioaktivnih komponenata u mikročesticama. Aguirre Calvo i sur. (2019) proučavali su mikroinkapsulaciju polifenola u mikročestice pripremljene samo s alginatom ili u kombinaciji s različitim gumama i pektinom. Koncentracije ukupnih polifenola mikročestica pripremljenih od ekstrakata cikle slijedile su sljedeći redoslijed: guar guma < niskoesterificirani pektin, viskoesterificirani pektin, alginat < guma arabika. Nekim istraživanjima utvrđeno je kako korištenjem alginata kao jedinog omotača, njegova veća koncentracija uzrokovala bolje očuvanje i inkapsulaciju polifenola (Najafi-Soulari i sur., 2016; Keskin i sur., 2019). Polifenoli iz Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) inkapsulirani su u alginatne mikročestice s dodatkom škroba. Dobiveni rezultati pokazali su povećanje učinkovitosti mikroinkapsulacije dodatkom škroba. Proučavanjem struktura takvih mikročestica, dokazano je da škrob ispunjava praznine unutar matriksa kalcijevog alginata te tako sprječava difuziju polifenola u otopini za geliranje tijekom ionskog geliranja. Dokazano je i kako kontrolni uzorci (pripremljeni samo s alginatom) imaju veći ukupni volumen pora od alginatnih mikročestica s dodatkom škroba (Córdoba i sur., 2013). U ovom su istraživanju neke mikročestice s dodatkom biopolimera pokazale bolja svojstva od mikročestica pripremljenih samo s alginatom kao nosačem. Zbog toga se može zaključiti kako je porozna struktura alginatnih

mikročestica i u ovom istraživanju poboljšana dodatkom određenih vrsta i količina biopolimera.

Stach i sur. (2023) istražili su utjecaj dodatka pektina, karagenana i hitozana na mikroinkapsulaciju polifenola soka aronije u alginatne mikročestice. Dodatkom karagenana, pektina i hitozana u alginatne mikročestice došlo je do porasta sadržaja ukupnih polifenola. Najveća koncentracija ukupnih polifenola određena je u alginatnim mikročesticama s dodatkom karagenana (345,1 mg/100 g). Koncentracija ukupnih polifenola s dodatkom hitozana imala je najmanju koncentraciju ukupnih polifenola koja je iznosila 205,84 mg/100 g, dok su mikročestice s dodatkom pektina pokazale koncentraciju ukupnih polifenola od 295,45 mg/100 g. Koncentracija ukupnih polifenola u alginatnim mikročesticama bez dodatka drugih polimera bila je 259,06 mg/100 g. Sličan negativan utjecaj hitozana u nekim slučajevima na sadržaj ukupnih polifenola alginatnih mikročestica dokazan je i u ovom istraživanju, što je suprotno od rezultata dobivenih u istraživanju od Belščak-Cvitanović i sur. (2011) gdje je uočeno kako su alginatne mikročestice s dodatkom hitozana bile učinkovite u očuvanju polifenola iz lista maline, gloga, bršljana, stolisnika, koprive i lista masline. Stabilnost alginatnih mikročestica s dodatkom hitozana postignuta je kompleksiranjem alginata i hitozana, kao i alginatnim umrežavanjem. Veće koncentracije polifenola u alginatnim mikročesticama s dodatkom hitozana pripisane su i mogućim interakcijama između hitozana i polifenola (Belščak-Cvitanović i sur., 2011). To je suprotno od rezultata dobivenih u ovom istraživanju, gdje je dodatak hitozana pokazao većinom negativan utjecaj. Razlog tomu mogu biti razlike u polifenolnom sastavu biljnog materijala, odnosno činjenica da različiti polifenoli pokazuju različite afinitete prema istom nosaču. Rezultatima dobivenim u istraživanju od Deladino i sur. (2008) utvrđeno je kako su alginatne čestice s dodatkom hitozana imale manje koncentracije yerba mate (*Ilex paraguariensis*) polifenola nego mikročestice bez hitozana. Prema autorima, značajni gubici aktivnih spojeva dogodili su se tijekom kontakta alginatnih mikročestica s otopinom hitozana. Slično tome, Bajpai i Tankhiwale (2006) pokazali su bolju mikroinkapsulaciju vitamina B2 u alginatnim mikročesticama nego u onima s hitozanom i alginatom. Ipak, vanjski sloj hitozana može biti koristan za usporavanje oslobađanja aktivnih spojeva iz alginatnih mikročestica zbog stvaranja fizičke barijere i formiranja polifenol-hitozan kompleksa (Anbinder i sur., 2011). Iako ima dobra biokompatibilna i netoksična svojstva, glavna prepreka za uporabu hitozana kao nosača je razgradnja pri niskom pH. Stoga kako bi se spriječila razgradnja ovog polimera, hitozan se uspješno kombinira s alginatom (Nalini i sur., 2019). Proučavanjem alginatnih mikročestica s polifenolima aronije i s dodatkom guar gume i hitozana,

zaključeno je da je sadržaj ukupnih polifenola bio najveći za mikročestice s alginatom, hitozanom i guar gumom. U navedenom istraživanju vrijednosti ukupnih polifenola bile su u rasponu od 31,98 mg/100 g za mikročestice koje su sadržavale samo alginat u svom omotaču do 158,08 mg/100 g za mikročestice sa alginatom, hitozanom i guar gumom (Haładyn i sur., 2021). Flamminii i sur. (2021) ispitivali su mikroinkapsulaciju polifenola iz masline u alginatne mikročestice bez i s dodatkom pektina, kazeinata i proteina sirutke. U tom istraživanju alginatne mikročestice s dodatkom pektina pokazale su dobra svojstva za mikroinkapsulaciju polifenola, dok su mikročestice s dodatkom kazeinata i proteina sirutke imale poroznu strukturu. Utjecaj vremena kompleksiranja mikročestica u otopini za geliranje bio je predmet i drugih istraživanja. Zam i sur. (2014) utvrdili su da nakon kontakta kalcijevih kationa i alginata dolazi do stvaranja gela, ali homogenost matriksa ovisi o difuziji  $\text{Ca}^{2+}$ . Poznato je da duža izloženost alginata kalcijevim ionima uzrokuje veću difuziju kalcija u mrežu gela. Međutim, duže vrijeme kompleksiranja može uzrokovati otpuštanje polifenola u okolinu. Također, veće koncentracije alginata mogle bi smanjiti gubitak inkapsuliranog materijala u okolinu (Najafi-Soulari i sur., 2016). Rezultati dobiveni u ovom istraživanju pokazali su da duže vrijeme kompleksiranja u otopini za geliranje samo u nekim slučajevima uzrokuje veće zadržavanje polifenolnih spojeva.

Natrijev alginat i pektin najčešći su polimeri koji se koriste za pripremu mikročestica ionskim geliranjem (McClements, 2017). Međutim, mikročestice s ovim omotačima imaju porozna svojstva koja smanjuju stabilnost antocijanina koji su hidrofilne prirode. Ovo negativno svojstvo pektina i alginata, može se poboljšati njihovom kombinacijom s drugim polimerima (Norcino i sur., 2022). Gubitak antocijanina nastaje zbog visoke poroznosti alginatnih mikročestica i lakoj difuziji ovih bioaktivnih spojeva u hidrofilnim uvjetima zbog njihove hidrofilnosti. Kombinacijom polimera u omotaču stvara se dodatna barijera koja utječe na polaritet antocijanina, ometajući difuzijski prijenos iz unutrašnjosti na površinu mikročestica (da Silva Carvalho i sur., 2019). Smanjenje koncentracije antocijanina u mikročesticama opisano je kao posljedica mogućeg stvrdnjavanja tekuće kapljice prije geliranja u otopini za geliranje. Predloženo je da veće koncentracije nosača mogu uzrokovati bolje očuvanje antocijanina. Općenito, difuzija antocijanina unutar čestica hidrogela smatra se difuzijom u poroznom mediju i povezana je s poroznošću mikročestica (Guo i sur., 2017). Prema istraživanjima provedenim pomoću elektronske mikroskopije otkriveno je kako  $\text{Ca}^{2+}$  – alginat matriks pokazuje pore s promjerima između 5 nm i 200 nm. Struktura (veličina pora) i mehanička otpornost alginatnih mikročestica ovisi o nekoliko čimbenika, uključujući broj



guluronskih jedinica u alginatnim lancima, vrsti sredstva za geliranje, koncentraciji dvovalentnih iona, vremenu izlaganja alginatnih lanaca dvovalentnim ionima i prisutnosti organskih otapala u otopini za geliranja (Martins i sur., 2017). Stojanović i sur. (2012) ustanovili su da molekulska masa polimera koji su u sastavu omotača može utjecati na difuziju aktivnih tvari iz mikročestica jer niskomolekulske tvari ne utječu na poroznost alginatnih mikročestica.

Da Silva Carvalho i sur. (2019) proučavali su mikroinkapsulaciju antocijanina dobivenih iz bobica brazilske palme (*Euterpe edulis*). Dobiveni rezultati pokazali su da je dodatak hitozana, proteina sirutke i želatine uzrokovao smanjenje koncentracije antocijanina. Zadržavanje polifenola bilo je u poretku: želatina < protein sirutke < hitozan. Ovi rezultati potvrđuju da je odabir sastava omotača kritičan korak tijekom mikroinkapsulacije antocijanina. Pinheiro i sur. (2021) su inkapsulirali antocijanine iz kožice grožđa *Pinot noir* u alginatne mikročestice i mikročestice s hitozanom. Interakcije između alginata i antocijana objašnjene su vezama između flavilium kationa antocijanina i karboksilnih skupina alginata. Haładyn i sur. (2021) odredili su koncentraciju antocijanina u alginatnim mikročesticama s ili bez dodatka hitozana i guar gume s inkapsuliranim polifenolima aronije. Koncentracije antocijanina bile su u rasponu od 5,00 mg/100 g (alginat + hitozan + guar guma) do 38,90 mg/100 g (alginat + guar guma). De Moura i sur. (2019) ispitali su utjecaj obogaćivanja mliječnog jogurta alginatnim mikročesticama pripremljenim od ekstrakta polifenola *Hibiscus sabdariffa* L. na zadržavanje antocijanina. Rezultati su pokazali da su se tijekom 29 dana skladištenja jogurta s dodatkom alginatnih mikročestica antocijanini zadržali u rasponu 21 – 48 %, dok je zadržavanje antocijanina u jogurtu sa čistim ekstraktom iznosilo tek 14 %. Ovime je dokazana moguća primjena alginatnih mikročestica za obogaćivanje mliječnih proizvoda.

### **5.3. SADRŽAJ INDIVIDUALNIH POLIFENOLA U ALGINATNIM MIKROČESTICAMA**

Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola provedena je pomoću HPLC metode te su koncentracije polifenola za alginatne mikročestice bez i s dodatkom pululana ili pektina prikazane u **Tablici 12**. U kontrolnim uzorcima koncentracija cijanidin-3-galaktozida bila je 29,23 mg/kg za A-30 i 28,87 mg/kg za A-90. Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako je dodatak pululana utjecao na povećanje koncentracije cijanidin-3-galaktozida u alginatnim mikročesticama. Koncentracije tog antocijanina bile su veće u svim uzorcima s dodatkom pululana u odnosu na kontrolne uzorke.

Najveće koncentracije cijanidin-3-galaktozida detektirane su za uzorak A-1 PUL-90 (31,77 mg/kg). Dodatkom pektina došlo je do smanjenja koncentracije cijanidin-3-galaktozida kod svih uzoraka, osim kod uzoraka A-1.5 P-30 i A-2 P-30 kod kojih nije došlo do statistički značajnih promjena u odnosu na kontrolne uzorke. U kontrolnim uzorcima koncentracija cijanidin-3-arabinozida bila je 6,77 mg/kg za A-30 i 7,51 mg/kg za A-90. Najveće koncentracije cijanidin-3-arabinozida detektirane su za A-1 PUL-90, A-1.5 PUL-90 i A-2 PUL-30. Koncentracije ovog antocijanina bile su u rasponu od 6,25 mg/kg do 7,84 mg/kg. Detektirani flavonoli bili su rutin i kvercetin-3-galaktozid, od kojih je rutin bio prisutan u većim koncentracijama u svim uzorcima. U kontrolnim uzorcima koncentracija rutina bila je 61,97 mg/kg za A-30 i 60,64 mg/kg za A-90, dok je koncentracija kvercetin-3-galaktozida bila 36,85 mg/kg za A-30 i 36,24 mg/kg za A-90. Dodatak pululana utjecao je na povećanje koncentracije rutina i kvercetin-3-galaktozida u pripremljenim uzorcima, dok je dodatak pektina uzrokovao smanjenje koncentracije ovih flavonola. Najveće koncentracije rutina određene su za A-1 PUL-90 (66,99 mg/kg) i A-1.5 PUL-90 (66,31 mg/kg), dok su najveće koncentracije kvercetin-3-galaktozida bile kod A-1 PUL-90 (39,98 mg/kg). Od svih detektiranih polifenola, u mikročesticama su neoklorogenska i klorogenska kiselina bile prisutne u najvećim koncentracijama. U kontrolnim uzorcima koncentracija neoklorogenske kiseline bila je 299,78 mg/kg za A-30 i 283,07 mg/kg za A-90, dok je koncentracija klorogenske kiseline bila 193,98 mg/kg za A-30 i 188,38 mg/kg za A-90. Koncentracije neoklorogenske kiseline su u uzorcima s dodatkom pululana i pektina bile u rasponu od 182,19 mg/kg do 313,84 mg/kg, dok su koncentracije klorogenske kiseline bile u rasponu od 111,38 mg/kg do 220,61 mg/kg. Dodatak pululana uzrokovao je povećanje koncentracije neoklorogenske kiseline za uzorak s dodatkom 1 % pululana kompleksiran 90 min i uzorke s dodatkom 1,5 % pululana kompleksirane 30 min i 90 min u odnosu na kontrolne uzorke. Dodatkom pektina u alginatni omotač došlo je do smanjenja koncentracije neoklorogenske kiseline ili nije došlo do statistički značajnih promjena u njezinoj koncentraciji. Za mikroinkapsulaciju klorogenske kiseline dodatak pululana imao je pozitivan utjecaj jer su sve količine pululana uzrokovale povećanje koncentracije klorogenske kiseline u odnosu na kontrolne uzorke (A-30 i A-90). U svim uzorcima s dodatkom pektina detektirane su manje koncentracije klorogenske kiseline nego u kontrolnim uzorcima te se stoga može zaključiti kako dodatak pektina u alginatni omotač uzrokuje smanjenje koncentracije inkapsulirane klorogenske kiseline u mikročesticama. U **Tablici 12** prikazana je ukupna količina individualnih polifenola detektiranih HPLC metodom. Vrijednosti ukupnih količina individualnih polifenola bile

su rasponu od 414,85 mg/kg do 678,79 mg/kg. Za uzorke s dodatkom 1,5 % pululana određena je najveća ukupna količina individualnih polifenola i za te uzorke nije uočena statistički značajna razlika između vremena kompleksiranja. Svi uzorci s dodatkom pektina imali su manju ukupnu količinu individualnih polifenola određenih HPLC metodom u odnosu na kontrolne uzorke te se može zaključiti da je dodatak pektina negativno utjecao na ukupnu količinu individualnih polifenola određenih HPLC metodom u alginatnim mikročesticama.

U **Tablici 13** prikazane su koncentracije individualnih polifenola određene HPLC metodom za alginatne mikročestice bez i s dodatkom hitozana, karboksimetil celuloze ili ksantan gume. Detektirani antocijanini u svim uzorcima bili su cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-arabinozid. U kontrolnim uzorcima koncentracija cijanidin-3-galaktozida bila je 29,23 mg/kg za A-30 i 28,87 mg/kg za A-90 bez statistički značajne razlike između uzoraka, dok je koncentracija cijanidin-3-arabinozida bila 6,77 mg/kg za A-30 i 7,51 mg/kg za A-90. Iz rezultata je vidljivo da dodatak hitozana u alginatni omotač nije uzrokovao statistički značajne promjene u koncentraciji cijanidin-3-galaktozida i cijanidin-3-arabinozida u odnosu na kontrolne uzorke. Dodatak karboksimetil celuloze statistički je značajno utjecao na koncentraciju oba detektirana antocijanina u alginatnim mikročesticama. Svi uzorci s karboksimetil celulozom sadržavali su veće koncentracije oba antocijanina u odnosu na kontrolne uzorke (A-30 i A-90). Uzorak A-0.3 CMC-30 sadržavao je najveće koncentracije za oba detektirana antocijanina, cijanidin-3-galaktozid (98,36 mg/kg) i cijanidin-3-arabinozid (30,08 mg/kg). Ista količina dodatka ksantan gume i isto vrijeme kompleksiranja (0,3 % ksantan gume i 30 min kompleksiranja u otopini za geliranje) uzrokovali su vezanje najveće koncentracije oba antocijanina jer je uzorak (0.3 K-30) imao najveće vrijednosti za cijanidin-3-galaktozid (87,72 mg/kg) i cijanidin-3-arabinozid (28,24 mg/kg) u odnosu na ostale uzorke s ksantan gumom. Produžetak vremena kompleksiranja s 30 min na 90 min utjecao je na povećanje koncentracije oba antocijanina samo u slučaju dodatka 0,2 % i 0,4 % karboksimetil celuloze, dok je za uzorke s ksantan gumom produžetak vremena kompleksiranja samo u slučaju dodatka 0,4 % ksantan gume uzrokovao povećanje koncentracije cijanidin-3-galaktozida i cijanidin-3-arabinozida. Rutin i kvercetin-3-galaktozid bili su detektirani flavonoli u svim alginatnim mikročesticama s dodatkom hitozana, karboksimetil celuloze i ksantan gume. U kontrolnim uzorcima koncentracija rutina bila je 61,97 mg/kg za A-30 i 60,64 mg/kg za A-90 bez statistički značajne razlike između uzoraka, dok je koncentracija kvercetin-3-galaktozida bila 36,85 mg/kg za A-30 i 36,24 mg/kg za A-90 bez statistički značajne razlike između uzoraka. Koncentracije

rutina u pripremljenim mikročesticama bile su u rasponu od 8,39 mg/kg do 61,97 mg/kg. U svim uzorcima detektirane su manje koncentracije rutina od uzoraka pripremljenih samo s alginatom kao nosačem ili nije bilo statistički značajnih razlika između tih uzoraka. Koncentracije kvercetin-3-galaktozida bile su u rasponu od 32,80 mg/kg do 39,03 mg/kg. Dodatak karboksimetil celuloze samo je kod uzoraka A-0.2 CMC-90 i A-0.3 CMC-30 uzrokovao statistički značajno povećanje koncentracije kvercetin-3-galaktozida. Dodatkom ksantan gume došlo je do smanjenja koncentracije kvercetin-3-galaktozida ili nije došlo do statistički značajnih razlika u odnosu na kontrolne uzorke. Detektirane fenolne kiseline u alginatnim mikročesticama s ili bez dodatka hitozana, karboksimetil celuloze i ksantan gume bile su neoklorogenska i klorogenska kiselina. U kontrolnim uzorcima koncentracija neoklorogenske kiseline bila je 299,78 mg/kg za A-30 i 283,07 mg/kg za A-90, dok je koncentracija klorogenske kiseline bila 193,98 mg/kg za A-30 i 188,38 mg/kg za A-90. Dodatkom hitozana došlo je do smanjenja koncentracija neoklorogenske i klorogenske kiseline u alginatnim mikročesticama. Isti je trend zabilježen i u alginatnim mikročesticama s dodatkom karboksimetil celuloze i ksantan gume. Stoga se može zaključiti da je dodatak hitozana, karboksimetil celuloze i ksantan gume u alginatni nosač imao negativni utjecaj na mikroinkapsulaciju fenolnih kiselina. U **Tablici 13** prikazana je ukupna količina individualnih polifenola za svaki uzorak s ili bez dodatka hitozana, karboksimetil celuloze i ksantan gume. Ukupna količina individualnih polifenola bila je u rasponu od 220,04 mg/kg do 628,58 mg/kg. Uočeno je kako je dodatkom hitozana, karboksimetil celuloze i ksantan gume u alginatni nosač došlo do smanjenja ukupne količine individualnih polifenola ili nije došlo do statistički značajnih promjena u njihovoj ukupnoj količini.

U istraživanju od Belščak-Cvitanović i sur. (2011) dokazano je kako zadržavanje polifenolnih komponenata ovisi o svojstvima polifenola. Neki polifenolni spojevi, kao npr. klorogenska kiselina pokazuju manju sposobnost inkapsulacije u alginatnim mikročesticama. Alginatne mikročestice s dodatkom škroba pokazale su veće koncentracije klorogenske kiseline od mikročestica s alginatnim omotačem te je zaključeno kako dodatak drugih biopolimera može smanjiti difuzijski prijenos polifenolnih spojeva u otopini za geliranje (Lozano-Vazquez i sur., 2015). Alginati stvaraju interakcije s polifenolnim spojevima stvaranjem vodikovih veza koje uključuju hidroksilne skupine polifenola i hidroksilne i karboksilne skupine alginata. Hidrofobne interakcije su važne samo u slučaju alginske kiseline (Plazinski i Plazinska, 2011). Molino i sur. (2022) dokazali su da je moguće stvaranje interakcija između pektina i polifenola koje rezultiraju stvaranjem mikročestica

s poboljšanim karakteristikama, ali i većim zadržavanjem polifenola u odnosu na alginat. Interakcije između tanina i pektina pomoću vodikovih veza jače se u usporedbi s onima s alginatom i taninima, vjerojatno zbog prisutnosti amidnih skupina. Vodikove veze i hidrofobne interakcije predložene su vrste interakcija i u ovom istraživanju. Difuzija u alginatnim mikročesticama ovisi o poroznosti kuglica i veličini pora. Sušenje je predloženo kao jedan od pristupa kojim se može smanjiti poroznost i time ograničiti gubitak bioaktivnih spojeva iz mikročestica. Sušenjem mikročestica je moguće postići smanjenu difuziju, iako ugrađivanjem mikročestica u hranu bi se difuzija prema vodenoj fazi nastavila, s obzirom na to da većina namirnica ima visok udio vode (Molino i sur., 2022). Osim sastava omotača, na mikroinkapsulaciju utječe i sastav aktivne tvari. Poznato je da u prisutnosti divalentnih kationa dolazi do geliranja alginata. Čak i vrlo niske koncentracije tih elemenata mogu utjecati na stvaranje gela i dobivanja stabilnih struktura čak i prije kontakta alginata s otopinom za geliranje (Belščak-Cvitanović i sur., 2011). Haładyn i sur. (2021) odredili su koncentraciju fenolnih kiselina i flavonola alginatnih mikročestica s ili bez dodatka hitozana i guar gume s polifenolima aronije. Koncentracije fenolnih kiselina bile su u rasponu od 6,22 mg/100 g (alginat + hitozan) do 22,84 mg/100 g (alginat), dok su koncentracije flavonola bile u rasponu od 1,22 mg/100 g (alginat + hitozan + guar guma) do 7,58 mg/100 g (alginat). Najveći udio polifenolnih komponenti u alginatnim mikročesticama s polifenolima aronije s ili bez dodatka pektina, karagenana i hitozana u istraživanju od Stach i sur. (2023) određen je za antocijanine i bio je u rasponu od 44,3 % za alginatne mikročestice do 49,8 % za alginatne mikročestice s dodatkom hitozana. Druga najzastupljenija skupina polifenola bile su fenolne kiseline i njihov udio bio je u rasponu od 36,9 % za alginatne mikročestice s dodatkom karagenana do 42,3 % za alginatne mikročestice. Najmanji udio činili su flavanoni i bili su u rasponu od 1,1 % za alginatne mikročestice i alginatne mikročestice s dodatkom hitozana do 1,2 % za alginatne mikročestice s dodatkom karagenana (Stach i sur., 2023). Poznato je da dodatkom hitozana dolazi do formiranja vodikovih veza i van der Waalsovih sila između funkcionalnih skupina hitozana i polifenola (Spanga i sur., 1996).

U istraživanju od Padayachee i sur. (2012a) dokazno je kako klorogenska kiselina iz soka ljubičaste mrkve stvara interakcije s pektinom i celulozom. Međutim, slični uvjeti uzrokovali su sasvim suprotan učinak na koncentraciju neoklorogenske kiseline. Može se zaključiti da molekulska masa nije jedini čimbenik koji utječe na vezanje fenolnih kiselina i polisaharida, kao što je ranije ustanovljeno jer ova dva spoja imaju identične molekulske mase (Padayachee i sur., 2012a). Broj i

položaj hidroksilnih skupina fenolnih kiselina bili su drugi čimbenici koji utječu na interakcije zbog stvaranja kovalentnih i vodikovih veza s polisaharidima (Belščak-Cvitanović i sur., 2016a). Budući da je hrana složen matriks, fenolne kiseline mogu reagirati međusobno ili s drugim komponentama hrane i time se njihova svojstva mogu promijeniti.

Na mikrokapsulaciju antocijanina utjecale su fizikalno-kemijske interakcije i stvaranje kovalentnih veza između alginatnih mikročestica s dodatkom pektina i antocijanina (Guo i sur., 2017). Osim toga, stvaranjem fizičke barijere, interakcije između biopolimera i antocijanina mogu uzrokovati povećanu stabilnost antocijanina. I alginat i pektin su poliuronske kiseline te su elektrostatske interakcije između flavilium kationa antocijanina i disociranih karboksilnih skupina polisaharida uzrokovale stabilizacijski učinak sličan vezanju iona kalcija u pektinske i alginatne gelove (Hubbermann i sur., 2006). Isto bi se moglo pretpostaviti i u ovom istraživanju. Za bolje razumijevanje interakcije antocijanin – polisaharid, važno je napomenuti da njihova međusobna interakcija i naknadno vezivanje uključuje stvaranje učinka slaganja, tj. interakcije dodatnih antocijanina s onima koji su već vezani (Padayachee i sur., 2012b).

Prethodno objavljena istraživanja pokazala su da flavonoidi stvaraju hidrofobne reakcije koje doprinose afinitetu flavonoida prema celulozi. Isto tako, interakcije su izraženije ovisno o broju OH skupina flavonoida. Zbog prisustva karboksilnih skupina, interakcije između pektina i celuloze jače su s fenolnim kiselinama nego s flavonoidima (Mercado-Mercado i sur., 2020). Tsirigotis-Maniecka i sur. (2017) svojim su istraživanjem pokazali da alginatne mikročestice s dodatkom karboksimetil celuloze mogu biti korisne kao sustav za očuvanje hesperidina, ali i drugih polifenola biljnog podrijetla.

Visoke koncentracije rutina u mikročesticama s pektinom određene su u istraživanju Jantrawut i sur (2013). Prisutnost šećera i hidroksilnih skupina na različitim položajima u B prstenu flavonola uzrokuju promjene u njihovim interakcijama s polisaharidima (Liu i sur., 2020). Još jedan čimbenik koji određuje mikroinkapsulaciju spojeva unutar alginatnih mikročestica je njihov polaritet. Za hidrofobnije polifenole dolazi do slabe mikroinkapsulacije zbog lošije apsorpcije u inkapsulacijskoj otopini, koja se obično sastoji od hidrofilnih materijala, kao što su alginat ili pektin pa je stoga njihova inkapsulacija često zahtjevna (Caballero i sur., 2021). Mikroinkapsulacijom polifenola iz ekstrakta papaje (*Carica papaya L.*) u alginatne mikročestice s dodatkom pektina proučavana je u istraživanju Vallejo-Castillo i sur. (2020). Visoke koncentracije inkapsuliranog

rutina određene su vjerojatno zbog prisutnosti disaharida u strukturi ovog flavonoida. Rutinoza ima visok afinitet prema pektinu, budući da se stvaranje pektinskog gela može pospješiti u prisutnosti disaharida u otopini za geliranje. U istom istraživanju ispitivana je i mikroinkapsulacija galne kiseline te je dokazano kako je dodatkom pektina došlo do većeg zadržavanja galne kiseline zbog prisutnosti karboksilnih skupina pektina koje stvaraju interakcije s  $\text{Ca}^{2+}$  kationima u otopini za geliranje (Vallejo-Castillo i sur., 2020). Postolović i sur. (2022) pripremali su alginatne mikročestice s dodatkom karagenana i poloksamera s ciljem mikroinkapsulacije kurkumina te su rezultati pokazali najveći postotak inkapsulacije kurkumina (95,74 %) upotrebom karagenana i alginata u omjeru 2:8 i dodatkom 2,5 % poloksamera. Ovim istraživanjem dokazana je važnost formulacije omotača i vremena kompleksiranja za mikroinkapsulaciju polifenola. Produženje vremena kompleksiranja s 30 na 90 min utjecalo je na koncentraciju inkapsuliranog glukozil-hesperidina. Kod alginatnih mikročestica dužim vremenom kompleksiranja došlo je do povećanja koncentracije glukozil-hesperidina, dok je za čestice s dodatkom hitozana došlo do smanjenja njegove koncentracije (Ćorković i sur., 2021a).

#### **5.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST ALGINATNIH MIKROČESTICA**

U **Tablici 14** prikazani su rezultati antioksidacijske aktivnosti određeni pomoću 4 različite metode (FRAP, CUPRAC, DPPH i ABTS) za alginatne mikročestice bez i s dodatkom pululana ili pektina. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene pomoću FRAP metode bile su u rasponu od 3,06  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  do 12,34  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ . U kontrolnim uzorcima antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom bila je 4,32  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  za A-30 i 4,51  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  za A-90 bez statistički značajne razlike između uzoraka. Iz rezultata je vidljivo da su vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom veće za uzorke s dodatkom pululana u odnosu na uzorke koji su sadržavali alginatni omotač (A-30 i A-90). Uzorak A-1.5 PUL-30 imao je najveću vrijednost antioksidacijske aktivnosti određenu FRAP metodom. Produžetak vremena kompleksiranja u otopini za geliranje imao je pozitivan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom za uzorke s dodatkom 1 % i 2 % pululana. Dodatkom pektina došlo je do smanjenja antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom u svim uzorcima, osim za uzorak s dodatkom 2 % pektina kompleksiran 90 min u otopini za geliranje u kojem nije došlo do statistički značajnih promjena u antioksidacijskoj aktivnosti. Kod svih uzoraka s dodatkom pektina produžetak vremena kompleksiranja s 30 min na 90 min nije uzrokovao statistički značajne razlike u antioksidacijskoj aktivnosti određenoj FRAP metodom, osim za uzorak s dodatkom 2 % pektina gdje je uzorak

kompleksiran 90 min imao veće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti od uzorka kompleksiranog 30 min. Sličan trend pokazale su i vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene CUPRAC metodom jer je uzorak A-1.5 PUL-30 imao najveću vrijednost antioksidacijske aktivnosti (822,96  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ ). U kontrolnim uzorcima antioksidacijska aktivnost određena CUPRAC metodom bila je 308,69  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  za A-30 i 317,62  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  za A-90. Dodatak pululana utjecao je na povećanje antioksidacijske aktivnosti određene CUPRAC metodom jer su svi uzorci s dodatkom pululana pokazali veće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u odnosu na kontrolne uzorke (A-30 i A-90). U slučaju dodatka 0,5 % i 1,5 % pululana duže vrijeme kompleksiranja uzrokovalo je smanjenje antioksidacijske aktivnosti određene CUPRAC metodom, dok je u slučaju dodatka 1 % i 2 % pululana duže kompleksiranje uzrokovalo povećanje antioksidacijske aktivnosti. Dodatakom pektina došlo je do statistički značajnog smanjenja antioksidacijske aktivnosti određene CUPRAC metodom i vrijednosti antioksidacijske aktivnosti za mikročestice s dodatkom pektina bile su u rasponu od 228,84  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  do 279,60  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ . U kontrolnim uzorcima antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom bila je 29,21  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  za A-30 i 28,71  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  za A-90 bez statistički značajne razlike između uzoraka. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom za mikročestice bez i s dodatkom pululana ili pektina bile su u rasponu od 21,29  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  do 61,81  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ . Sve mikročestice s dodatkom pululana u alginatni omotač imale su veće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom od uzoraka A-30 i A-90 koji su sadržavali alginatni omotač. Duže vrijeme kompleksiranja utjecalo je na smanjenje antioksidacijske aktivnosti (dodatak 0,5 % i 1,5 % pululana) određene DPPH metodom ili nije uzrokovalo statistički značajne promjene u vrijednostima antioksidacijske aktivnosti (dodatak 1 % i 2 % pululana) mikročestica s dodatkom pululana. Svi uzorci s dodatkom pektina imali su manje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti od kontrolnih uzoraka (A-30 i A-90) pa se može zaključiti da je dodatak pektina negativno utjecao na antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom. U kontrolnim uzorcima antioksidacijska aktivnost određena ABTS metodom bila je 32,66  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  za A-30 i 31,03  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  za A-90. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene pomoću ABTS metode bile su veće za uzorke s dodatkom pululana u odnosu na kontrolne uzorke (A-30 i A-90). Najveću vrijednost antioksidacijske aktivnosti određenu ABTS metodom pokazao je uzorak A-1.5 PUL-30 (114,29  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ ). Za mikročestice s dodatkom pululana duže vrijeme kompleksiranja uzrokovalo je smanjenje (dodatak 0,5 % i 1,5 % pululana) ili povećanje (dodatak 1 % i 2 % pululana) antioksidacijske aktivnosti određene ABTS metodom. Dodatak pektina je kod



uzoraka A-1.5 P-30, A-1.5 P-90 i A-2 P-90 imao pozitivan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost određenu ABTS metodom, dok je kod ostalih uzoraka došlo do smanjenja antioksidacijske aktivnosti ili nije došlo do statistički značajnih razlika u antioksidacijskoj aktivnosti.

U **Tablici 15** prikazani su rezultati antioksidacijske aktivnosti određene FRAP, CUPRAC, DPPH i ABTS metodama za alginatne mikročestice bez i s dodatkom hitozana, karboksimetil celuloze ili ksantan gume. U kontrolnim uzorcima antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom bila je 4,32  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  za A-30 i 4,51  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  za A-90. Rezultati antioksidacijske aktivnosti dobiveni FRAP metodom bili su u rasponu od 3,11  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  do 6,41  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ . Može se zaključiti kako je dodatak hitozana utjecao na smanjenje antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom jer su sve alginatne mikročestice s dodatkom hitozana pokazale manju antioksidacijsku aktivnost od kontrolnih uzoraka (A-30 i A-90). Kod svih mikročestica s dodatkom karboksimetil celuloze došlo je do povećanja antioksidacijske aktivnosti u odnosu na kontrolne uzorke, osim za uzorke A-0.3 CMC-90 i A-0.5 CMC-30 gdje nije došlo do statistički značajnih promjena u antioksidacijskoj aktivnosti. Rezultatima je utvrđeno da je dodatak ksantan gume uzrokovao smanjenje antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom, osim kod uzorka A-0.3 K-30 (5,53  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ ) koji je imao veću antioksidacijsku aktivnost od kontrolnih uzoraka i uzorka A-0.4 K-30 (4,24  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ ) kod kojeg nije došlo do statistički značajnih promjena u odnosu na kontrolne uzorke. U kontrolnim uzorcima antioksidacijska aktivnost određena CUPRAC metodom bila je 308,69  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  za A-30 i 317,62  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  za A-90. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene CUPRAC metodom bile su u rasponu od 231,94  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  do 447,52  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ . Iz rezultata je vidljivo kako je dodatak hitozana negativno utjecao na antioksidacijsku aktivnost alginatnih mikročestica. Svi uzorci s dodatkom hitozana imali su manje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene CUPRAC metodom u odnosu na kontrolne uzorke (A-30 i A-90). Duže vrijeme kompleksiranja (90 min) uzrokovalo je smanjenje antioksidacijske aktivnosti mikročestica s dodatkom hitozana, osim kod uzorka A-0.5 C-90 gdje je došlo do njenog povećanja. Uzorci s dodatkom karboksimetil celuloze imali su veće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene CUPRAC metodom, osim uzorka A-0.3 CMC-90 (291,68  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ ) koji je pokazao manju antioksidacijsku aktivnost u odnosu na kontrolne uzorke (A-30 i A-90). Dodatak ksantan gume negativno je utjecao na antioksidacijsku aktivnost alginatnih mikročestica određenu CUPRAC metodom gdje su za sve uzorke s dodatkom ksantan gume određene manje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti, osim za uzorak A-0.3 K-30 (347,86  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ ) gdje je došlo do

njezinog povećanja u odnosu na kontrolne uzorke. Rezultati antioksidacijske aktivnosti određeni DPPH metodom pokazali su drugačiji trend. Dodatak hitozana, karboksimetil celuloze i ksantan gume uzrokovao je smanjenje antioksidacijske aktivnosti u odnosu na kontrolne uzorke (A-30 i A-90) kod svih uzoraka, osim kod A-0.2 CMC-90 i A-0.3 K-90 gdje nije došlo do statistički značajnih promjena. U kontrolnim uzorcima antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom bila je 29,21  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  za A-30 i 28,71  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  za A-90 bez statistički značajne razlike između uzoraka. Antioksidacijska aktivnost određena ABTS metodom bila je u rasponu od 26,95  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  do 58,98  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ . U kontrolnim uzorcima antioksidacijska aktivnost određena ABTS metodom bila je 32,66  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  za A-30 i 31,03  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  za A-90 bez statistički značajne razlike između uzoraka. Dodatkom hitozana u alginatne mikročestice došlo je do povećanja antioksidacijske aktivnosti određene ABTS metodom, osim kod uzoraka A-0.1 C-90, A-0.2 C-90 i A-0.4 C-90 gdje je došlo do njezinog smanjenja, dok kod uzorka A-0.5 C-30 nije došlo do statistički značajnih promjena u odnosu na kontrolni uzorak A-90. U alginatnim mikročesticama dodatkom karboksimetil celuloze u omotač došlo je do povećanja antioksidacijske aktivnosti određene ABTS metodom, osim za uzorak A-0.3 CMC-90 gdje nije došlo do statistički značajnih promjena u antioksidacijskoj aktivnosti u odnosu na kontrolni uzorak A-30. Dodatak ksantan gume imao je pozitivan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost alginatnih mikročestica, sve dodane količine uzrokovale su povećanje antioksidacijske aktivnosti u odnosu na kontrolne uzorke.

Postoje razne metode za mjerenje antioksidacijske aktivnosti koje često daju različite rezultate zbog primjene različitih slobodnih radikala i različitog vremena reakcije. Osim toga, kod metoda koje se temelje na obezbojenosti, prisutnost obojenih spojeva može rezultirati netočnim vrijednostima antioksidacijske aktivnosti. Ovaj problem češći je kod metoda u kojima se mjerenja provode pri nižim valnim duljinama jer se interferencije događaju u vidljivom području. Čak i metode temeljene na istom principu kao što su ABTS i DPPH daju različite rezultate te zbog toga primjena jedne metode nije dovoljna za određivanje antioksidacijske aktivnosti pa se preporučuje korištenje nekoliko metoda za dobivanje pouzdanih rezultata (Kapci i sur., 2013). Antioksidacijska aktivnost aronije može se odrediti različitim *in vitro* testovima, kao što su FRAP, CUPRAC, DPPH i ABTS metoda (Jurikova i sur., 2017). FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) testom mjeri se antioksidacijski potencijal uzorka na principu redukcije kompleksa željeza (III) s 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazinom ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) u kompleks  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ pomoću antioksidansa prisutnih u ispitivanim uzorcima. CUPRAC (eng. *cupric ion reducing antioxidant capacity*) metoda temelji se

na redoks reakciji CUPRAC reagensa (bakar (II) neokuproin) i antioksidansa (Gupta, 2015). Kod DPPH metode, DPPH radikal reducira se u DPPH spoj (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) djelovanjem antioksidansa. ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) je spoj koji enzim peroksidaza katalizira do radikal-kationa. ABTS radikal-kation reaktivan je prema velikom broju antioksidansa.

U istraživanju od Stach i sur. (2023) određena je antioksidacijska aktivnost alginatnih mikročestica s polifenolima aronije s ili bez dodatka pektina, karagenana i hitozana. Za antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH, ABTS i FRAP metodama nije došlo do statistički značajnih razlika između uzoraka. Svi su uzorci imali antioksidacijsku aktivnost oko 0,90 mmol/100 g za DPPH, 0,66 mmol/100 g za ABTS i oko 0,65 mmol/100 g za FRAP metodu (Stach i sur., 2023). Ovim istraživanjem dokazano je kako su alginatne mikročestice dobar izvor polifenola s dobrim antioksidacijskim svojstvima. Haładyn i sur. (2021) odredili su antioksidacijsku aktivnosti alginatnih mikročestica s ili bez dodatka hitozana i guar gume s polifenolima aronije. Antioksidacijske aktivnosti određene ABTS metodom bile su u rasponu od 0,202 mmol/100 g (alginat + hitozan) do 0,840 mmol/100 g (alginat + hitozan + guar guma), dok su rezultati određeni FRAP metodom bile u rasponu od 0,151 mmol/100 g (alginat + hitozan + guar guma) do 0,771 mmol/100 g (alginat + guar guma) (Haładyn i sur., 2021). Busch i sur. (2017) dokazali su da se dodatkom guma (maltodekstrin, maltodekstrin + guma arabika) postiže veća antioksidacijska aktivnost inkapsuliranih polifenola u odnosu na druge inkapsulacijske nosače. Tzatsi i Goula (2021) određivali su antioksidacijsku aktivnost inkapsulata od bioaktivnih komponenata aronije pripremljenih različitim inkapsulacijskim tehnikama (sušenje raspršivanjem, ko-kristalizacija i ionsko geliranje) DPPH metodom. Najveću antioksidacijsku aktivnost (93,14 %) imale su mikročestice pripremljene ionskim geliranjem, dok je najmanja vrijednost antioksidacijske aktivnosti određena za inkapsulate dobivene sušenjem s raspršivanjem (74,20 %).

Ekstrakt biljke Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) uspješno je inkapsuliran u pektinske mikročestice. Antioksidacijska aktivnost mikročestica određena pomoću DPPH metode iznosila je 15,83  $\mu\text{mol/g}$ , dok je ABTS metoda pokazala antioksidacijsku aktivnost od 4,39  $\mu\text{mol/g}$  (Budini i sur., 2023). Interakcije između pektina i pojedinačnih polifenola mogu dovesti do povećanja antioksidacijske aktivnosti. Na interakcije s pektinom utječu tip i koncentracija pojedinačnih polifenola. Pektin može zaštititi polifenole od oksidacije i tako pogodovati antioksidacijskoj aktivnosti. Poznato je da pektin utječe na sinergistički učinak polifenola, modificirajući prijenos elektrona u

antioksidacijskoj aktivnosti određenoj DPPH i FRAP metodom (Mercado-Mercado i sur., 2020). Proučavanjem antioksidacijske aktivnosti alginatnih mikročestica s hitozanom, želatinom i proteinima sirutke, da Silva Carvalho i sur. (2019) zaključili su da su alginatne mikročestice s dodatkom hitozana bile učinkovitije u mikroinkapsulaciji antocijanina što je rezultiralo većim vrijednostima antioksidacijske aktivnosti u odnosu na uzroke s proteinima sirutke i želatinom.

Iz rezultata ovog istraživanja može se zaključiti kako je priprema alginatnih mikročestica s dodatkom pululana ionskim geliranjem dobra mikroinkapsulacijska tehnika kojom se mogu očuvati antioksidacijska svojstva polifenola iz soka aronije. Najveću antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP, CUPRAC, DPPH i ABTS metodom imao je uzorak pripremljen s dodatkom 1,5 % pululana i vremenom kompleksiranja 30 min.

### **5.5. INHIBICIJA ENZIMA $\alpha$ -AMILAZE I $\alpha$ -GLUKOZIDAZE ALGINATNIH MIKROČESTICA**

Na **Slici 23** prikazana je sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze alginatnih mikročestica bez i s dodatkom pektina ili pululana. Sposobnost inhibicije bila je u rasponu od 16,68 % do 56,65 % za sadržaj polifenola u rasponu od 12,44 mg/L do 23,06 mg/L. Vrijednosti inhibicijske aktivnosti za kontrolne uzorke bile su 27,72 % za A-30 i 25,57 % za A-90. Najveću vrijednost inhibicijske aktivnosti imao je uzorak A-1 PUL-90, a najmanju uzorak A-0.5 P-30. Iz dobivenih rezultata je utvrđeno kako su sve alginatne mikročestice s dodatkom pululana imale veću vrijednost inhibicijske aktivnosti u odnosu na kontrolne uzorke (A-30 i A-90) te se stoga može zaključiti kako je dodatak pululana utjecao pozitivno na sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze. Od uzoraka s dodatkom pektina, samo je uzorak A-2 P-90 imao veću vrijednost inhibicijske aktivnosti (36,06 %) u odnosu na kontrolne uzorke, kod ostalih uzoraka je dodatak pektina utjecao negativno na sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze.

Na **Slici 24** prikazana je sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze alginatnih mikročestica bez i s dodatkom hitozana, karboksimetil celuloze ili ksantan gume. Sposobnost inhibicije bila je u rasponu od 14,84 % do 39,00 % za sadržaj polifenola u rasponu od 11,58 mg/L do 20,25 mg/L. Vrijednosti inhibicijske aktivnosti za kontrolne uzorke bile su 27,72 % za A-30 i 25,57 % za A-90. Najmanje sposobnosti inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze imali su uzorci A-0.4 C-90 i A-0.5 C-30, a najveće sposobnosti inhibicije pokazali su uzorci A-0.2 CMC-90 i A-0.3 K-30. Svi uzorci s dodatkom hitozana imali su manju vrijednost inhibicijske aktivnosti u odnosu na uzorke A-30 i A-

90. Iz tog razloga može se zaključiti kako je dodatak hitozana utjecao negativno na sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze polifenolima iz alginatnih mikročestica. Suprotan utjecaj imao je dodatak karboksimetil celuloze. Svi uzorci s dodatkom karboksimetil celuloze imali su veću sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze u odnosu na kontrolne uzorke. Iz ovih rezultata može se zaključiti kako je dodatak ovog polimera pozitivno utjecao na inhibiciju enzima  $\alpha$ -amilaze polifenolima iz alginatnih mikročestica. Dodatak ksantan gume utjecao je negativno na sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze, osim u slučaju uzoraka A-0.2 K-30, A-0.3 K-90 i A-0.5 K-90 kod kojih nije došlo do statistički značajnih promjena u sposobnosti inhibicije te u slučaju uzorka A-0.3 K-30 (37,87 %) kod kojeg je došlo do povećanja sposobnosti inhibicije ovog enzima.

Na **Slici 25** prikazana je sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze pomoću polifenola alginatnih mikročestica bez i s dodatkom pululana ili pektina. Rezultati inhibicijske aktivnosti bili su u rasponu od 79,35 % do 98,62 % za sadržaj polifenola u rasponu od 4,32 mg/L do 8,02 mg/L. Vrijednosti inhibicijske aktivnosti za kontrolne uzorke bile su 95,32 % za A-30 i 92,50 % za A-90. Iz rezultata je utvrđeno kako je kod uzoraka A-0.5 PUL-30 i A-1.5 PUL-90 došlo do povećanja inhibicijske aktivnosti u odnosu na kontrolne uzorke (A-30 i A-90), dok kod ostalih uzoraka nije došlo do statistički značajnih promjena. Kod alginatnih mikročestica s dodatkom pektina došlo je do statistički značajnog smanjenja inhibicijske aktivnosti u odnosu na kontrolne uzorke, osim za uzorak A-2 P-90 kod kojeg nije došlo do statistički značajnih promjena u odnosu na uzorak A-90.

Na **Slici 26** prikazane su vrijednosti inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze alginatnih mikročestica bez i s dodatkom hitozana, karboksimetil celuloze ili ksantan gume. Dobiveni rezultati bili su u rasponu od 80,79 % do 95,32 % za vrijednosti polifenola u rasponu od 4,03 mg/L do 7,04 mg/L. Vrijednosti inhibicijske aktivnosti za kontrolne uzorke bile su 95,32 % za A-30 i 92,50 % za A-90. Svi uzorci s dodatkom hitozana pokazali su manje vrijednosti inhibicijske aktivnosti u odnosu na kontrolne uzorke (A-30 i A-90) te se može zaključiti kako je dodatak hitozana negativno utjecao na sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze polifenolima zadržanim u alginatnim mikročesticama. Dodatak karboksimetil celuloze utjecao je na smanjenje inhibicijske aktivnosti za uzorke A-0.3 CMC-90, A-0.4 CMC-30, A-0.5 CMC-30 i A-0.5 CMC-90, kod ostalih uzoraka nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolne uzorke. Svi uzorci s dodatkom ksantan gume imali su manje vrijednosti inhibicijske aktivnosti u odnosu na kontrolne uzorke. Iz ovih rezultata može se zaključiti da je dodatkom ksantan gume smanjena inhibicijska aktivnost polifenola aronije zadržanim u alginatnim mikročesticama.

Sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze polifenolima iz aronije predmet je prethodno objavljenih istraživanja. Međutim, zbog toga što i vrlo male modifikacije u eksperimentalnim uvjetima dovode do velikih razlika u vrijednostima inhibicije enzima, usporedba s rezultatima različitih istraživanjima često je otežana (Kaeswurm i sur., 2019). Pasukamonset i sur. (2016) dokazali su da alginatne mikročestice mogu očuvati sposobnost polifenola da inhibiraju  $\alpha$ -amilazu. Mikročestice s polifenolima plavog graška (*Clitoria ternatea*) pokazale su veću sposobnost inhibicije  $\alpha$ -amilaze (22,01 %) u odnosu na čisti ekstrakt (12,12 %). Hidrogelovi na bazi karboksimetil celuloze i polifenola soka višnje pokazali su sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze u rasponu od 21,97 % (za hidrogel s dodatkom 3 % polimera) do oko 26 % (za hidrogelove s dodatkom 3 % i 4 % polimera) (Ćorković i sur., 2021b). Worsztynowicz i sur. (2014) istraživali su sposobnost inhibicije  $\alpha$ -amilaze polifenolima iz aronije. Metanolni ekstrakt imao je  $IC_{50}$  vrijednost 10,31 mg/mL. Separacijom klorogenske kiseline iz ekstrakta aronije utvrđena je najmanja  $IC_{50}$  vrijednost za klorogensku kiselinu koja je iznosila 0,57 mg/mL. Poznato je da sastav i koncentracija individualnih polifenola imaju utjecaj na sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze. Ranija istraživanja pokazala su kako su fenolne kiseline dobri inhibitori  $\alpha$ -amilaze (Sun i sur., 2019). To je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju jer su u svim uzorcima detektirane visoke koncentracije neoklorogenske i klorogenske kiseline. Hidroksilne skupine imaju dikafeoilne skupine s više hidroksilnih skupina koje su važne za inhibiciju enzima  $\alpha$ -amilaze fenolnim kiselinama zbog stvaranja vodikovih veza (Xu i sur., 2016). U istraživanjima koja su proučavala inhibicijsku aktivnost antocijanina uočeno je da je cijanidin-3-glukozid imao veću inhibicijsku aktivnost od cijanidina i cijanidin-3-galaktozida, dok cijanidin-3,5-diglukozid nije pokazao inhibicijsku aktivnost (Xiao i sur., 2013a). Cijanidin-3-glukozid je imao veću sposobnost inhibicije  $\alpha$ -amilaze od cijanidin-3-rutinozida, cijanidin-3,5-glukozida i peonidin-3-glukozida u istraživanju koje su proveli Sui i sur (2016). Od svih detektiranih antocijanina (cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-arabinozid, cijanidin-3-ksilozid) najveću sposobnost inhibicije  $\alpha$ -amilaze pokazao je cijanidin-3-glukozid s  $IC_{50}$  vrijednosti 1,74 mg/mL (Worsztynowicz i sur., 2014). Osim antocijanina, i proantocijanidini imaju sposobnost inhibicije  $\alpha$ -amilaze. Proantocijanidini imaju polimerne strukture, sastoje se od flavonoidnih monomera i procjenom inhibicijske aktivnosti na  $\alpha$ -amilazu uočeno je da polimeri imaju jaču inhibicijsku aktivnost od oligomera (Xiao i sur., 2013a; Gong i sur., 2020). Zbog svog blagotvornog djelovanja, polifenoli iz aronije mogu se primjenjivati kao prirodni inhibitori enzima  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze. Haładyn

i sur. (2021) odredili su inhibiciju enzima  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze alginatnih mikročestica bez i s dodatkom hitozana i guar gume s polifenolima aronije. Rezultati su pokazali veću sposobnost inhibicije  $\alpha$ -amilaze polifenolima aronije u usporedbi s inhibicijom  $\alpha$ -glukozidaze što je suprotno od rezultata dobivenih u ovom istraživanju gdje su sve alginatne mikročestice pokazale veću sposobnost inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze pri manjim koncentracijama polifenola u odnosu na inhibiciju  $\alpha$ -amilaze. Također, inhibicija  $\alpha$ -glukozidaze pospješena je dodatkom hitozana i guar gume (Haładyn i sur., 2021). Prethodno je objavljeno da je učinkovitost inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze ovisna o sadržaju antocijanina u bobičastom voću (Lavelli i sur., 2016). U istraživanju od McDougall i sur. (2005) proučavane su inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze polifenolima borovnice, crnog ribiza, malina i crvenog kupusa. Uočen je suprotan trend za  $\alpha$ -amilazu i  $\alpha$ -glukozidazu, tj. jagode i maline bile su učinkovitije u inhibiciji  $\alpha$ -amilaze od borovnica, crnog ribiza i crvenog ribiza koju su bili bogati antocijaninima i učinkovitiji u inhibiciji  $\alpha$ -glukozidaze. Hidrogelovi na bazi karboksimetil celuloze i polifenola soka višnje pokazali su sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze u rasponu od 38,39 % (za hidrogel s dodatkom 5 % polimera) do 56,64 % (za hidrogelove s dodatkom 3 % polimera) (Ćorković i sur., 2021b). Poznato je da na inhibicijsku aktivnost utječe glikolizacija antocijanina koja uzrokuje njezino povećanje te metilacija koja uzrokuje smanjenje inhibicijske aktivnosti. Ovi rezultati potvrđuju prethodna znanja o odnosu između strukture polifenola i aktivnosti enzima (Zorzenon i sur., 2020).

## 5.6. SADRŽAJ HLAPLJIVIH KOMPONENATA I AROMATSKI PROFIL ALGINATNIH MIKROČESTICA

U **Tablici 16** prikazane su koncentracije hlapljivih komponenata u alginatnim mikročesticama bez i s dodatkom pululana. Detektirano je ukupno 37 hlapljivih komponenata koje su podijeljene u 5 skupina: kiseline (5 komponenata), alkoholi (5 komponenata), karbonilni spojevi (8 komponenata), terpeni (11 komponenata), esteri (8 komponenata). Koncentracije kiselina bile su u rasponu od 10,06  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  do 43,58  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . Nonanska kiselina detektirana je u svim alginatnim mikročesticama, osim u mikročesticama s dodatkom 1 % pululana. Koncentracije detektiranih alkohola u mikročesticama bile su u rasponu od 158,43  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  do 318,31  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . Od svih alkohola, 2-etilheksan-1-ol bio je prisutan u najvećim koncentracijama, u rasponu od 103,32  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  do 161,64  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . Oktan-1-ol detektiran je u kontrolnim uzorcima (A-30 i A-90) i samo u uzorku s dodatkom 0,5 % pululana kompleksiranog 30 min u otopini za geliranje. Koncentracije

karbonilnih spojeva bile su u rasponu od 63,14  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  do 102,20  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , dok su koncentracije terpena bile u rasponu od 53,18  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  do 94,78  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . U uzorcima s dodatkom 0,5 % pululana nije došlo do inkapsulacije D-limonena i  $\alpha$ -ionona, dok su u svim ostalim uzorcima detektirani ovi terpeni. Koncentracije detektiranih estera bile su u rasponu od 27,66  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  do 60,58  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ .

Na **Slici 27** prikazan je aromatski profil alginatnih mikročestica bez i s dodatkom pululana. Na temelju aromatskih nota su hlapljive komponente podijeljene u 6 skupina: masna nota, zelena nota, citrusna nota, voćna nota, cvjetna nota te skupina ostalo u koju su bile uključene aromatske note koje su bile prisutne u manjim koncentracijama (zemljana nota, drvenasta nota, menta, začinska nota, med). Iz rezultata je vidljivo kako je citrusna nota (D-limonen, linalol) bila prisutna u najvećem udjelu u alginatnim mikročesticama. Udio citrusne note bio je u rasponu od 21,31 % do 43,89 %, a za zelenu notu od 14,09 % do 41,16 %. Cvjetne note bile su prisutne u rasponu od 13,72 % do 29,66 %, a voćne note u rasponu od 7,00 % do 11,01 %.

U **Tablici 17** prikazane su koncentracije hlapljivih komponenata u alginatnim mikročesticama bez i s dodatkom pektina. Detektirane su ukupno 42 hlapljive komponente koje su podijeljene u 5 skupina: kiseline (6 komponenata), alkoholi (6 komponenata), karbonilni spojevi (9 komponenata), terpeni (13 komponenata), esteri (8 komponenata). Kiseline su detektirane u rasponu od 9,32  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  do 47,81  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . Od svih detektiranih kiselina, jedino je nonanska kiselina bila prisutna u svim alginatnim mikročesticama bez i s dodatkom pektina. U kontrolnim uzorcima detektirana je 2-etilheksanska kiselina, kao i u uzorku A-0.5 P-30. Oktanska kiselina detektirana je samo u uzorcima s dodatkom 1,5 % pektina. Od prisutnih alkoholnih komponenata, samo je 2-etilheksan-1-ol detektiran u svim uzorcima i njegova koncentracija bila je u rasponu od 82,63  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  do 160,17  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . Benzil-alkohol nije inkapsuliran alginatnim mikročesticama bez dodatka pektina. Od detektiranih karbonilnih spojeva koji su bili u rasponu od 20,00  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  do 83,02  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , samo su nonanal, dekanal i geranil aceton bili prisutni u svim alginatnim mikročesticama. Većina terpenskih spojeva bila je prisutna u kontrolnim uzorcima (D-limonen, linalol oksid, linalol, mentol,  $\beta$ -citronelol, vitispiran, eugenol,  $\beta$ -damascenon,  $\alpha$ -ionon,  $\beta$ -ionon i  $\gamma$ -ionon), ali nisu detektirani u uzorcima s dodatkom pektina pa se može zaključiti da je prilikom procesa mikroinkapsulacije nije došlo do njihove inkapsulacije. Svih 8 estera prisutnih u kontrolnim uzorcima nije bilo prisutno u mikročesticama s dodatkom pektina.



Na **Slici 28** prikazan je aromatski profil alginatnih mikročestica bez i s dodatkom pektina. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako su citrusne note bile prisutne u najvećem udjelu i to u rasponu od 31,26 % do 78,63 %. Zelena nota bila je prisutna samo u kontrolnim uzorcima (A-30 i A-90) te se može zaključiti kako u alginatnim mikročesticama s dodatkom pektina nije došlo do inkapsulacije hlapljivih komponenata sa zelenom notom. Dodatak pektina isto je utjecao i na voćnu notu, niti jedan spoj s karakterističnom voćnom notom nije detektiran u alginatnim mikročesticama s dodatkom pektina. Cvjetna nota bila je u rasponu od 8,68 % do 19,75 %.

U **Tablici 18** prikazane su koncentracije hlapljivih komponenata u alginatnim mikročesticama bez i s dodatkom hitozana. Detektirano je ukupno 40 hlapljivih komponenata koje su podijeljene u 5 skupina: kiseline (6 komponenata), alkoholi (6 komponenata), karbonilni spojevi (8 komponenata), terpeni (12 komponenata), esteri (8 komponenata). Kiseline su detektirane u rasponu od 11,94  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  do 43,58  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . Od svih detektiranih kiselina, jedino je nonanska kiselina bila prisutna u svim alginatnim mikročesticama bez i s dodatkom hitozana. Kod ostalih kiselina dodatkom hitozana u alginatne mikročestice nije došlo do mikroinkapsulacije kiselina, osim za dodatak 0,3 % i 0,4 % hitozana i vrijeme kompleksiranja 30 min kod kojih je detektirana oktanska kiselina koja nije bila prisutna u kontrolnim uzorcima. U mikročesticama bez i s dodatkom hitozana su koncentracije alkohola bile u rasponu od 58,22  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  do 221,90  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . Od svih detektiranih alkohola, jedino je 2-etilheksan-1-ol detektiran u svim alginatnim mikročesticama. Detektirani karbonilni spojevi bili su rasponu od 11,78  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  do 83,02  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . Koncentracije terpena bile su u rasponu od 5,12  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  do 65,96  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . Od svih detektiranih terpena jedino je na mikroinkapsulaciju *trans*-pinokarveola dodatak hitozana utjecao pozitivno, ostali terpeni (D-limonen, linalol oksid, linalol, mentol,  $\beta$ -citronelol, vitispiran, eugenol,  $\beta$ -damascenon,  $\alpha$ -ionon,  $\beta$ -ionon i  $\gamma$ -ionon) nisu detektirani u uzorcima s dodatkom hitozana. Svih 8 estera detektiranih u kontrolnim uzorcima nisu bili prisutni u alginatnim mikročesticama s dodatkom hitozana.

Na **Slici 29** prikazan je aromatski profil alginatnih mikročestica bez i s dodatkom hitozana. Iz rezultata je vidljivo kako su citrusne note bile prisutne u najvećem udjelu. Njihov raspon bio je od 31,26 % do 76,62 %. Zelena i voćna nota bile su prisutne samo u kontrolnim uzorcima te se može zaključiti kako dodatkom hitozana nije došlo do inkapsulacije hlapljivih komponenata sa zelenom i voćnom notom. Cvjetna nota bila je u rasponu od 6,06 % do 19,12 %, a masna u rasponu od 8,06 % do 26,34 %.

U **Tablici 19** prikazane su koncentracije hlapljivih komponenata u alginatnim mikročesticama bez i s dodatkom karboksimetil celuloze. Detektirano je ukupno 44 hlapljivih komponenata koje su podijeljene u 5 skupina: kiseline (6 komponenata), alkoholi (6 komponenata), karbonilni spojevi (10 komponenata), terpeni (13 komponenata), esteri (9 komponenata). Koncentracije detektiranih kiselina bile su u rasponu od 27,09  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  do 59,89  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . Rezultati su pokazali da je oktanska kiselina inkapsulirana u uzorcima s dodatkom 0,3 % i 0,5 % karboksimetil celuloze te u slučaju dodatka 0,4 % karboksimetil celuloze i vremenu kompleksiranja 30 min. Kod ostalih uzoraka oktanska kiselina nije detektirana. Dodatkom karboksimetil celuloze u alginatne mikročestice nije došlo do inkapsulacije palmitinske kiseline, koja je bila detektirana samo u kontrolnim uzorcima (A-30 i A-90). Dodatkom 0,1 % karboksimetil celuloze nije došlo do inkapsulacije laurinske kiseline, kao i dodatkom 0,2 % karboksimetil celuloze pri vremenu kompleksiranja 90 min. Od alkohola su u alginatnim mikročesticama s dodatkom karboksimetil celuloze detektirani samo 2-etilheksan-1-ol i nonanol. Koncentracije karbonilnih spojeva bile su u rasponu od 65,88  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  do 89,14  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . Dodatkom karboksimetil celuloze nije došlo do inkapsulacije benzaldehida, 6-metil-5-hepten-2-ona i lialala, dok je oktanal detektiran samo za uzorke A-0.1 CMC-30 i A-0.3 CMC-90. Od ukupno 13 identificiranih terpena, dodatkom karboksimetil celuloze inkapsulirali su se  $\beta$ -ionon, *trans*-pinokarveol i cedrol te D-limonen koji je inkapsuliran samo u slučaju dodatka 0,1 % i 0,2 % karboksimetil celuloze. Koncentracije estera bile su u rasponu od 10,89  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  do 40,12  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . Od 9 detektiranih estera, u alginatnim mikročesticama s dodatkom karboksimetil celuloze inkapsulirali su se heksil-salicilat, izopropil-miristat i metil-palmitat (osim u slučaju uzoraka A-0.4 CMC-90, A-0.5 CMC-30 i A-0.5 CMC-90).

Na **Slici 30** prikazan je aromatski profil alginatnih mikročestica bez i s dodatkom karboksimetil celuloze. Iz rezultata je vidljivo kako su cvjetne i citrusne note bile prisutne u najvećem udjelu. Cvjetna nota imala je udio u rasponu od 18,36 % do 43,40 %, dok je citrusna nota imala udio od 17,35 % do 40,08 %. Udio masne note bio je u rasponu od 8,06 % do 31,53 %, dok je udio zelene note bio puno veći za kontrolne uzorke, 27,03 % za A-30 i 22,73 % za A-90 u odnosu na alginatne mikročestice s dodatkom karboksimetil celuloze koje su bile u rasponu od 1,84 % do 7,31 %.

U **Tablici 20** prikazane su koncentracije hlapljivih komponenata u alginatnim mikročesticama bez i s dodatkom ksantan gume. Detektirano je ukupno 43 hlapljivih komponenata koje su podijeljene u 5 skupina: kiseline (6 komponenata), alkoholi (6 komponenata), karbonilni spojevi (9 komponenata), terpeni (13 komponenata), esteri (9 komponenata). Koncentracije kiselina bile su u

rasponu od 28,57  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  do 57,76  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . Od detektiranih kiselina, 2-etilheksanska i nonanska kiselina bile su prisutne u svim uzorcima. Oktanska kiselina nije bila prisutna u kontrolnim uzorcima. Dekanska kiselina detektirana je u svim uzorcima, osim u uzorcima A-0.4 K-90 i A-0.5 K-90. Dodatkom 0,4 % i 0,5 % ksantan gume nije došlo do inkapsulacije laurinske kiseline. U svim uzorcima s dodatkom ksantan gume nije detektirana palmitinska kiselina. Od prisutnih alkohola, samo su 2-etilheksan-1-ol i nonanol bili prisutni u svim mikročesticama s dodatkom ksantan gume, dok su 3-heksen-1-ol, heks-1-ol, oktan-1-ol i perilil alkohol bili prisutni samo u kontrolnim uzorcima (A-30 i A-90). Koncentracije karbonilnih spojeva bile su u rasponu od 34,51  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  do 83,02  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . Dodatkom ksantan gume došlo je do razgradnje benzaldehida, 6-metil-5-hepten-2-ona, lialala i geranil-acetona pri dodatku 0,3 %, 0,4 % i 0,5 % ksantan gume. Dodekanal nije detektiran u uzorcima s dodatkom 0,4 % i 0,5 % ksantan gume, kao ni u kontrolnim uzorcima. Od 13 detektiranih terpena u alginatnim mikročesticama s dodatkom ksantan gume detektirani su  $\beta$ -ionon (za uzorke s dodatkom 0,1 % i 0,2 % ksantan gume te uzorak A-0.3 K-90), *trans*-pinokarveol i cedrol (osim za uzorak 0.4 K-90 te uzorke s dodatkom 0,5 % ksantan gume). Od 9 detektiranih uzoraka, u uzorcima s dodatkom ksantan gume bili su prisutni heksil-salicilat (osim za uzorke s dodatkom 0,5 % ksantan gume) i izopropil-miristat. Ostali esteri bili su prisutni samo u kontrolnim uzorcima (A-30 i A-90).

Na **Slici 31** prikazan je aromatski profil alginatnih mikročestica bez i s dodatkom ksantan gume. Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako su u najvećem udjelu bile prisutne masne note i to u rasponu od 8,06 % do 43,44%. Udio zelene note bio je u rasponu od 0,59 % do 27,03 %. Zelene note nisu prisutne u uzorcima s dodatkom 0,5 % ksantan gume. Citrusne note bile su u rasponu od 15,91 % do 32,77 %, voćne note u rasponu od 0,78 % do 16,33 %, a cvjetne note u rasponu od 1,15 % do 27,19 %.

Inkapsulacija hlapljivih komponenata često se provodi radi poboljšanja organoleptičkih svojstava hrane kao što su žvakače gume, pekarski proizvodi i slastice. Ovim postupkom omogućena je zaštita hlapljivih komponenata od djelovanja vlage, kisika i kemijskih reakcija između aktivnih spojeva, povećanje stabilnosti i kontrolirano otpuštanje aktivnih tvari (Martins i sur., 2017). Dokazano je kako interakcije između komponenti imaju važnu ulogu u mikroinkapsulaciji hlapljivih tvari. Potrebno je uzeti u obzir kompeticiju za vezna mjesta između komponenti jer je ta kompeticija značajan čimbenik u zadržavanju hlapljivih tvari (Van Ruth i sur., 2003). Lević i sur. (2014) inkapsulirali su D-limonen u alginatne mikročestice s ciljem proučavanja

mikroinkapsulacije hlapljivih komponenata. Hlapljive komponente kao što je D-limonen mogu se inkapsulirati kako bi se poboljšala njihova funkcionalnost i stabilnost u proizvodima jer su zbog svog lipofilnog karaktera vrlo nestabilne, dok su alginatne mikročestice nestabilne zbog visoke hidrofilnosti. Dodavanjem površinski aktivnih tvari ili hitozana koji modificira hidrofilnost alginatnih čestica može se smanjiti njihova nestabilnost. Međutim, dodatak biopolimera ili površinski aktivnih tvari utječe na povećanje troškova proizvodnje alginatnih mikročestica. Uporaba površinski aktivnih tvari u prehrambenoj industriji vrlo je ograničena zbog njihove niske biokompatibilnosti. Lopez i sur. (2012) inkapsulirali su linalol u alginatne mikročestice. Smanjenje pora alginatnih mikročestica postignuto je dodatkom glicerola i škroba te je time postignuto bolje zadržavanje ovog hlapljivog spoja. Shabkhiz i sur. (2021) proveli su mikroinkapsulaciju eteričnog ulja biljke *Thymus daenensis* bogatog aromatskog profila (karvakrol, benzen,  $\gamma$ -terpinen, timol, linalol) u alginatne mikročestice s dodatkom ciklodekstrina. Rezultati su pokazali da su mikročestice uspješno inkapsulirale hlapive komponente ovog eteričnog ulja. U istraživanju od Misharina i sur. (2016) proučavano je vezanje hlapljivih spojeva na alginat i druge biopolimere (škrob, karagenan, ksatan gumu, karboksimetil celulozu, guar gumu, citrus vlakna, gumu arabiku, gumu od rogača). Uočeno je da alginat veže terpene, alkohole i ketone srednjom brzinom, sličnoj vezanju ksantan gume, citrus vlakana i maltodekstrina. Utvrđeno je kako dodatak biopolimera smanjuje intenzitet arome i dovodi do njezine modifikacije ili nestanka. Ova pojava posljedica je smanjenja difuzije hlapljivih spojeva zbog povećanja viskoznosti sustava. Također, određene interakcije kao što su formiranje većih struktura s lipidima i polimerima mogu uzrokovati slabljenje arome. Prisutnost ketonske skupine u D-limonenu uzrokovala je smanjenje vezanja, dok su se acetati uspješno vezali vjerojatno zbog toga što su hidrofobniji od alkohola i ketona. Polarni spojevi poput linalola topljiviji su u vodi i jače se vežu za polimere od nepolarnih spojeva kao što je D-limonen. U usporedbi s citrus vlaknima, karboksimetil celuloza pokazala je lošija svojstva vezivanja alkohola. Guar guma i guma arabika pokazale su najbolja svojstva vezivanja polarnih i nepolarnih hlapljivih spojeva. Drugim istraživanjem dokazano je da nakon stvaranja alginatnih mikročestica s dodatkom želatine s eteričnim uljem crnog papra, sadržaj D-limonena iznosio je 12,10 %, a smanjenje udjela svih terpena objašnjeno je njihovom hlapljivošću i osjetljivošću na vanjske čimbenike (Heckert Bastos i sur., 2019). Bolje očuvanje hlapljivih spojeva u alginatnim mikročesticama može se postići uporabom koncentričnih mlaznica. Ova metoda temelji se na strujanju otopine polimera i hlapljivih spojeva istovremeno kroz unutarnje i vanjske mlaznice

(Martins i sur., 2017). Dodatak pektina imao je utjecaj na inkapsulaciju hlapljivih tvari. Pektin reagira s hlapljivim molekulama ili formira hidrofobne micle u kojima su zadržane nepolarne hlapljive komponente. U istraživanju od Zhang i Barringer (2017), linalol i heks-1-ol, kao i druge hlapljive komponente jagode sačuvane su dodatkom pektina. Isti spojevi iz soka aronije zadržani su u alginatnim mikročesticama u ovom istraživanju. Povećanjem koncentracije pektina mogle bi se zadržati veće koncentracije hlapljivih komponenti zbog prisutnosti više veznih mjesta (Hansson i sur., 2001). Kopjar i sur. (2020) pripremili su hidrogelove pomoću ksantan gume i guar gume s dodatkom disaharida (saharoze ili trehaloze) te proučavali njihov utjecaj na zadržavanje linalola i eugenola. U hidrogelovima pripremljenim od ksantan gume i saharoze, zadržavanje linalola raslo je s povećanjem koncentracije ksantan gume, dok je u hidrogelovima s trehalozom i ksantan gumom primijećen suprotan trend. Dodatak guar gume poboljšao je zadržavanje linalola. Dodatak ksantan ili guar gume imao je različit utjecaj na zadržavanje hlapljivih spojeva zbog toga što je ksantan guma anionske prirode, dok je guar guma neutralna. Bylaite i sur. (2005) istražili su utjecaj ksantan gume na zadržavanje hlapljivih komponenata. D-limonen je zadržan u visokim koncentracijama i to je objašnjeno njegovim hidrofobnim svojstvima. Visoke koncentracije estera i aldehida također su određene te je zaključeno kako kemijska struktura i fizikalno-kemijska svojstva hlapljivih spojeva imaju značajan utjecaj na njihovo otpuštanje. Hidrofobni spojevi (npr. heptanal i oktanal, ketoni s većim brojem ugljika) također su zadržani, dok se alkoholi nisu zadržavali dodatkom ksantan gume. Ksantan guma zbog svojeg hidrofobnog karaktera može stvarati hidrofobni omotač s hlapljivim spojevima. Zaključeno je kako biopolimeri utječu različito na hlapljive komponente, ne samo zbog svoje viskoznosti nego i zbog svoje polarnosti. Prisutne kemijske skupine nisu najvažniji čimbenici koji određuju zadržavanje hlapljivih spojeva nego ono ovisi o više kemijskih svojstava (Tromelin i sur., 2010).

## 5.7. IR SPEKTRI ALGINATNIH MIKROČESTICA

FTIR-ATR analiza provedena je kako bi se utvrdile moguće interakcije između aktivnih spojeva soka aronije i polisaharida prisutnih u sastavu nosača mikročestica. Ova spektroskopska metoda daje nove mogućnosti za strukturnu analizu polisaharida i njihovih derivata kao i za utvrđivanje tipa veze između molekula jer i slabe međumolekulske interakcije imaju značajan utjecaj na neka vrlo važna biološka svojstva (Mitić i sur., 2010). Na **Slikama 32-37** prikazani su IR spektri pripremljenih alginatnih mikročestica bez i s dodatkom pululana, pektina, hitozana, karboksimetil celuloze ili ksantan gume uspoređeni s IR spektrom mikročestica pripremljenih bez soka aronije

kako bi se utvrdile promjene uzrokovane dodatkom aktivnih spojeva iz soka. Na svakoj slici prikazan je IR spektar samo jednog uzorka pripremljenog od jedne vrste nosača jer su utvrđene iste promjene neovisno o količini dodanog nosača i vremenu kompleksiranja u otopini za geliranje.

Za polisaharide karakteristične su vrpce u regiji  $3627\text{ cm}^{-1} - 2910\text{ cm}^{-1}$  (O-H i C-H istezanje). Osim toga kod polisaharida su karakteristične dvije vrpce na  $1603\text{ cm}^{-1}$  i  $1405\text{ cm}^{-1}$  (C-O-O slabije asimetrično i jače simetrično vibracijsko istezanje), zatim vrpce u području  $1200\text{ cm}^{-1} - 1000\text{ cm}^{-1}$  (C-O i C-C istezanje glikozidnih veza i piranoznih prstenova) i vrlo složeno područje ispod  $1000\text{ cm}^{-1}$  koje se naziva i „otisak prsta“ polisaharida. Vrpce na približno  $2927\text{ cm}^{-1}$  (istezanje C-H veza ugljika u piranoznom prstenu),  $1085\text{ cm}^{-1}$  (C-O istezanje),  $1025\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C istezanje) i  $947\text{ cm}^{-1}$  (C-O istezanje) pripisane su polisaharidnoj strukturi (Norcino i sur., 2022; Wongverawattanakul i sur., 2022). Vibracijska istezanja C-C-H i C-OH skupina u strukturi prstena bila su detektirana prisustvom vrpce na oko  $1010\text{ cm}^{-1}$  (**Slike 32-37**) (Özbilenler i sur., 2020).

Vrpce karakteristične za alginatne mikročestice koje se pripisuju blokovima manuronskih i guluronskih kiselina nalaze se u regiji  $1100\text{ cm}^{-1} - 780\text{ cm}^{-1}$  (Chan i sur., 2010). Kod mikročestica s pululanom (**Slika 33**), uočene su promjene u širini karbonilne vrpce na  $1607\text{ cm}^{-1}$  i vrpce COO<sup>-</sup> skupine na  $1413\text{ cm}^{-1}$  u usporedbi s mikročesticama s pululanom i aktivnim spojevima aronije. Ove promjene mogu nastati kao posljedica novog okruženja karbonilne skupine te mogu biti dokaz interakcija između polisaharida i aktivnih spojeva u alginatnim mikročesticama (Córdoba i sur., 2013). Proučavanjem inkapsulacije polifenola lista masline u mikročestice s hitozanom, pojava vrpce oko  $1540\text{ cm}^{-1}$  objašnjena je interakcijama između hidroksilnih/karbonilnih/aldehidnih skupina polifenola i amino skupina hitozana (Kosaraju i sur., 2006). U slučaju alginatnih mikročestica s polifenolima aronije i dodatkom hitozana, ta je vrpca bila prisutna na  $1530\text{ cm}^{-1}$  (**Slika 35**). Za alginatne mikročestice s dodatkom hitozana prisutna je karakteristična vrpca na oko  $3300\text{ cm}^{-1}$  koja predstavlja spomenute OH skupine u međumolekulskim vodikovim vezama i istezanje N-H skupina (Najafi-Soulari i sur., 2016). Vrpce u području oko  $1117\text{ cm}^{-1} - 1240\text{ cm}^{-1}$  upućuju na elektrostatske interakcije između protoniranih amino skupina hitozana i disociranih karboksilatnih skupina natrijevog alginata (Deladino i sur., 2008). Zbog stvaranja međumolekulskih vodikovih veza između ksantan gume i alginata (**Slika 37**) važna je vrpca u području oko  $1600\text{ cm}^{-1}$  koja opisuje jačanje vrpce OH skupina te tako upućuje na stvaranje veza između komponenata (Belščak-Cvitanović i sur., 2016b).

Na svim IR spektrima može se uočiti nekoliko vrpca s višim intenzitetom apsorpcije, kao što je vrpca na oko  $1600\text{ cm}^{-1}$  koja vjerojatno potječe od  $\text{COO}^-$  vibracija u molekulama polisaharida, dok se vrpca u rasponu  $1030\text{ cm}^{-1} - 1070\text{ cm}^{-1}$  može pripisati C-OH vibracijama. Razlike u intenzitetu nastaju zbog promjena u ugljikohidratnim spojevima, a izraženije su bile u uzorcima s pululanom. Ovi rezultati u skladu su s Čujić i sur. (2016) koji su proučavali slične inkapsulacijske sustave. Dodatak aktivnih komponenti uzrokovao je promjene u intenzitetu u području karakterističnom za OH veze, regiji oko  $3300\text{ cm}^{-1}$  kao i u području oko  $1000\text{ cm}^{-1}$  koje je karakteristično za ugljikohidrate (Čujić i sur., 2016; Flamminii i sur., 2020). Vrpca na oko  $1260\text{ cm}^{-1}$  može se povezati s polifenolnim komponentama jer se pripisuje C-C-O vibracijama, dok bi se vrpca na oko  $815\text{ cm}^{-1}$  mogla pripisati monoterpenima (C-H vibracije) (Jovanović i sur., 2017). Kod alginatnih mikročestica s dodatkom aktivnih komponenti iz soka aronije, uočena je vrpca na oko  $1402\text{ cm}^{-1}$  koja upućuje na C-O vibracijsko istežanje fenola i pojava vrpce u regiji  $1742\text{ cm}^{-1} - 1707\text{ cm}^{-1}$  koje se pripisuju C=O skupinama aromatskog prstena. U uzorcima s aktivnim spojevima aronije uočena je pojava vrpce na  $1520\text{ cm}^{-1}$  koja označava C=C vibracije karakteristične za polifenolne komponente (Córdoba i sur., 2013). Promjene na IR spektru u mikročesticama pripremljenim sa sokom aronije nastale su zbog prisutnih bioaktivnih komponenata. Uočene promjene u regiji C-O i O-H vibracijskog istežanja mogu se pripisati njihovoj uključenosti u međumolekulske interakcije (Córdoba i sur., 2013). Poznato je da antocijanini imaju apsorpcijski spektar u području  $3400\text{ cm}^{-1} - 3100\text{ cm}^{-1}$  (O-H simetrično vibracijsko istežanje) kao i područja  $2900\text{ cm}^{-1} - 2840\text{ cm}^{-1}$  (C-H alifatsko istežanje),  $870\text{ cm}^{-1} - 675\text{ cm}^{-1}$  (C-H aromatsko istežanje) i  $1660\text{ cm}^{-1}$  (C=C aromatsko istežanje) koje potvrđuju prisutnost polifenola u alginatnim mikročesticama. Vrpce povezane s istežanjem aromatskog prstena i C-O-C skupina flavonoida uočene su na  $1260\text{ cm}^{-1}$ ,  $1076\text{ cm}^{-1}$  i  $1516\text{ cm}^{-1}$ . Vrpca na  $1363\text{ cm}^{-1}$  upućuje na deformacije O-H veza polifenola, a vibracije C-C veza fenolnih skupina apsorbiraju se u rasponu  $1500\text{ cm}^{-1} - 1400\text{ cm}^{-1}$  (Seke i sur., 2022).

Uočene promjene na spektrima dokazuju inkapsulaciju aktivnih komponenata u alginatne mikročestice. Na svim IR spektrima dominiraju vrpce karakteristične za polisaharidne nosače što upućuje na dobro formiranje zaštitnog omotača oko aktivnih komponenata. Medina-Torres i sur. (2016) zaključili su da pojava vrpce na IR spektru koje gotovo isključivo potječu od nosača upućuje na učinkovito obavijanje aktivnih komponenti i samim tim njihovu bolju zaštitu.

## **6. ZAKLJUČCI**



Cilj ovog rada bio je pripremiti alginatne mikročestice bez i s dodatkom pululana, pektina, hitozana, karboksimetil celuloze ili ksantan gume. Definirane su hipoteze doktorskog rada iz kojih su izvedeni sljedeći zaključci na temelju dobivenih rezultata:

*Hipoteza 1: Ionsko geliranje pogodna je metoda za mikroinkapsulaciju fenolnih i hlapljivih komponenata soka aronije.*

Rezultati dobiveni spektrofotometrijskim metodama i HPLC analizom pokazali su da su u svim alginatnim mikročesticama bez i s dodatkom pululana, pektina, hitozana, karboksimetil celuloze ili ksantan gume bile prisutne fenolne komponente, dok su GC-MS metodom određene hlapljive komponente u mikročesticama. Fenolne komponente prisutne u alginatnim mikročesticama pripadale su skupinama antocijanina, flavonola i fenolnih kiselina. Hlapljive komponente pripadale su skupinama kiselina, alkohola, karbonilnih spojeva, terpena i estera. Dobiveni rezultati upućuju na mogućnost mikroinkapsulacije fenolnih i hlapljivih komponenata iz soka aronije metodom ionskog geliranja.

*Hipoteza 2: Sastav nosača alginatnih mikročestica utječe na mikroinkapsulaciju polifenolnih i hlapljivih komponenata.*

Dodatakom pululana, pektina, hitozana, karboksimetil celuloze i ksantan gume u alginatnim mikročesticama došlo je do promjena u koncentracijama polifenolnih komponenata. Dodatkom pululana došlo je do povećanja koncentracija ukupnih polifenola, dok je u slučaju dodatka pektina, hitozana, karboksimetil celuloze i ksantan gume utjecaj na polifenole ovisio o količini dodanog biopolimera. Međutim, u svim alginatnim mikročesticama detektirane su iste polifenolne komponente kao i u alginatnim mikročesticama s dodatkom biopolimera. Analizom hlapljivih komponenata utvrđeno je da, osim što je došlo do promjena u njihovim koncentracijama, u nekim slučajevima nije došlo do njihove inkapsulacije.

*Hipoteza 3: Svojstva polifenola utječu na njihovu mikroinkapsulaciju.*

HPLC analizom su u svim pripremljenim mikročesticama detektirani sljedeći spojevi: cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3-arabinozid, rutin, kvercetin-3-galaktozid, neoklorogenska kiselina i klorogenska kiselina. U svim uzorcima detektirane su najveće koncentracije fenolnih kiselina. Dodatkom pululana u alginatni omotač

mikročestica došlo je do porasta ukupne količine individualnih polifenola u većini slučajeva, dok je dodatak pektina, hitozana, karboksimetil celuloze i ksantan gume utjecao negativno u većini slučajeva na ukupnu količinu individualnih polifenola. Interakcije između polifenola i omotača utjecale su na mikroinkapsulaciju polifenolnih komponenti te se može zaključiti kako svojstva polifenola utječu na njihovu mikroinkapsulaciju.

*Hipoteza 4: Fizikalno-kemijske karakteristike hlapljivih komponenti utječu na njihovu mikroinkapsulaciju.*

Analizom hlapljivih komponenti pomoću GC-MS metode u uzorcima je detektirano ukupno 50 različitih komponenata. Njihove fizikalno-kemijske karakteristike utjecale su na interakcije s omotačem te su tako utjecale na mikroinkapsulaciju hlapljivih komponenata. U alginatnim mikročesticama s dodatkom pululana detektirano je najviše hlapljivih komponenata (ukupno 37), dok je dodatkom pektina inkapsulirano 10, hitozana 8, karboksimetil celuloze 21 i ksantan gume 18 hlapljivih komponenata.

*Hipoteza 5: Dodatno kompleksiranje biopolimernih čestica u otopini za geliranje utječe na mikroinkapsulaciju polifenolnih i hlapljivih komponenata.*

Dodatno kompleksiranje utjecalo je na mikroinkapsulaciju bioaktivnih spojeva u alginatne mikročestice bez i s dodatkom pululana, pektina, hitozana, karboksimetil celuloze ili ksantan gume ovisno o količini dodanog biopolimera. U nekim slučajevima je dodatno kompleksiranje osiguralo bolju mikroinkapsulaciju, kao npr. dodatkom 1 %, 1,5 % i 2% pululana gdje je dodatnim kompleksiranjem (90 min) došlo do povećanja koncentracije ukupnih polifenola.

*Hipoteza 6: Bioaktivne komponente soka aronije zadržane u alginatnim mikročesticama nositelji su antioksidacijske aktivnosti.*

Sve alginatne mikročestice bez i s dodatkom biopolimera pokazale su antioksidacijska svojstva te su vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene pomoću FRAP, CUPRAC, DPPH i ABTS metode. Rezultati su pokazali kako je dodatak pululana u alginatne mikročestice utjecao pozitivno na antioksidacijsku aktivnost određenu pomoću četiri različite metode. U slučaju ostalih nosača utjecaj na antioksidacijsku aktivnost ovisio je o vrsti i količini dodanog polimera te u nekim slučajevima o

vremenu kompleksiranja u otopini za geliranje. Najveću vrijednost antioksidacijske aktivnosti pokazao je uzorak A-1.5 PUL-30 za sve spektrofotometrijske metode.

*Hipoteza 7: Bioaktivne komponente soka aronije zadržane u alginatnim mikročesticama inhibiraju  $\alpha$ -amilazu i  $\alpha$ -glukozidazu.*

Dobiveni rezultati pokazali su kako su sve pripravljene alginatne mikročestice pri manjim koncentracijama polifenola inhibirale  $\alpha$ -glukozidazu, dok je za inhibiciju  $\alpha$ -amilaze bila potrebna veća koncentracija polifenola. Može se zaključiti kako su sve pripravljene alginatne mikročestice bolji inhibitori  $\alpha$ -glukozidaze, nego  $\alpha$ -amilaze. Dodatak pululana pozitivno je utjecao na sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze, dok je kod ostalih mikročestica utjecaj na inhibiciju enzima ovisio o vrsti i količini dodanog nosača.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je odabir sastava omotača važan čimbenik koji određuje mikroinkapsulaciju polifenola i hlapljivih komponenata iz soka aronije. Ovim postupkom mogu se očuvati pozitivna svojstva ovih spojeva, kao što su antioksidacijska aktivnost i sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze. Nakon pripreme, alginatne mikročestice mogu se koristiti kao sastojak funkcionalne hrane jer sve komponente koje se koriste za njihovu pripremu blagotvorno djeluju na ljudski organizam i sigurne su za konzumaciju.

## **7. LITERATURA**

- Aguirre-Calvo TR, Aguirre-Calvo Daniel, Perullini M, Santagapita PR: A detailed microstructural and multiple responses analysis through blocking design to produce Ca(II)-alginate beads loaded with bioactive compounds extracted from by-products. *Food Hydrocolloids for Health* 1:100030, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2021.100030>
- Aguirre-Calvo TR, Santagapita PR, Perullini M: Functional and structural effects of hydrocolloids on Ca(II)-alginate beads containing bioactive compounds extracted from beetroot. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 520-526, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.047>
- Aldawsari MF, Ahmed MM, Fatima F, Anwer MK, Katakam P, Khan A: Development and characterization of calcium-alginate beads of apigenin: in vitro antitumor, antibacterial, and antioxidant activities. *Marine Drugs* 19:467, 2021.
- Ali A, Ahmed S: Recent Advances in Edible Polymer Based Hydrogels as a Sustainable Alternative to Conventional Polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66:6940-6967, 2018. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01052>
- Anbinder P, Deladino L, Navarro AS, Amalvy JI, Martino MN: Yerba mate extracted encapsulation with alginate and chitosan systems: interactions between active compound encapsulation polymers. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences* 1:80-87, 2011.
- Apak R, Güçlü K, Ozyürek M, Karademir SE: Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:7970-7981, 2004. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>
- Arnao MB, Cano A, Acosta M: The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73:239-244, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00324-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1)
- Aronia Melanocarpa*. <https://www.ures.hr/vrtne-biljke/aronia-aronia-melanocarpa> [25. 1. 2024.]
- Astray G, Mejuto JC, Morales J, Rial-Otero R, Simal-Gándara J: Factors controlling flavors binding constants to cyclodextrins and their applications in foods. *Food Research International* 43:1212-1218, 2010.
- Atencio S, Maestro A, Santamaría E, Gutiérrez JM, González C: Encapsulation of ginger oil in alginate-based shell materials. *Food Bioscience* 37:100714, 2020.
- Augst A, Kong HJ, Mooney DJ: Alginate Hydrogels as Biomaterials. *Macromolecular Bioscience* 6:623-633, 2006. <https://doi.org/10.1002/mabi.200600069>
- Auiewiriyankul W, Saburi W, Kato K, Yao M, Mori H: Function and structure of GH13\_31  $\alpha$ -glucosidase with high  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glucosidic linkage specificity and transglucosylation activity. *FEBS Letters* 592:2268-2281, 2018. <http://doi.org/10.1002/1873-3468.13126>
- Bahadoran Z, Mirmiran P, Azizi F: Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: A review. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders* 12:43, 2013.
- Bajpai SK, Tankhiwale R: Investigation of dynamics of vitamin B2 from calcium alginate/chitosan multilayered beads: Part II. *Reactive and Functional Polymers* 66:1565-1574, 2006.
- Bartosz T, Irene T: Polyphenols encapsulation – application of innovation technologies to improve

- stability of natural products. *Physical Sciences Reviews* 1:201500005, 2016. <http://doi.org/10.1515/psr-2015-0005>
- Beconcini D, Felice F, Fabiano A, Sarmiento B, Zambito Y, Di Stefano R: Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Cherry Extract: Nanosystems-Based Strategies to Improve Endothelial Function and Intestinal Absorption. *Foods* 9:207, 2020. <http://doi.org/10.3390/foods9020207>
- Belščak-Cvitanović A, Bušić A, Barišić L, Vrsaljko D, Karlović S, Špoljarić I, Vojvodić A, Mršić G, Komes D: Emulsion templated microencapsulation of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols and  $\beta$ -carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin. *Food Hydrocolloids* 57:139-152, 2016a. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.01.020>
- Belščak-Cvitanović A, Durgo K, Huđek A, Bačun-Družina V, Komes D: Overview of polyphenols and their properties. U *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Woodhead Publishing, Sawston, UK, 3-44, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00001-4>
- Belščak-Cvitanović A, Jurić S, Đorđević V, Barišić L, Komes D, Ježek D, Bugarski B, Nedović V: Chemometric evaluation of binary mixtures of alginate and polysaccharide biopolymers as carriers for microencapsulation of green tea polyphenols. *International Journal of Food Properties*, 2016b. <http://doi.org/10.1080/10942912.2016.1225762>
- Belščak-Cvitanović A, Stojanović R, Manojlović V, Komes D, Juranović-Cindrić I, Nedović V, Bugarski B: Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Research International* 44:1094-1101, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.030>
- Benzie IF, Strain JJ: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239:70-79, 1996. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Boath AS, Grussu D, Stewart D, McDougall GJ: Berry: Polyphenols Inhibit Digestive Enzymes: a Source of Potential Health Benefits?. *Food Digestion* 3:1-7, 2012. <http://doi.org/10.1007/s13228-012-0022-0>
- Bonerz D, Würth K, Will F, Patz CD, Quast P, Hillebrand S, Winterhalter H, Dietrich H: Anthocyanins in tart-cherry juices and nectars – influence of processing steps and presence of ageing pigments. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 107:24-32, 2011.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 28:25-30, 1995. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brownlee IA, Allen A, Pearson JP, Dettmar PW, Havler ME, Atherton MR, Onsøyen E: Alginate as a source of dietary fiber. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45:497-510, 2005.
- Büchi Encapsulator B-390. <https://www.buchi.com/en/products/instruments/encapsulator-b-390-b-395> [25. 1. 2024.]
- Budin AC, Takano LV, D. Alvim I, de Moura SCSR: Stability of yerba mate extract, evaluation of its microencapsulation by ionic gelation and fluidized bed drying. *Helyon* 2023.

- <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16611>
- Bursać Kovačević D, Gajdoš Kljusurić J, Putnik P, Vukušić T, Herceg Z, Dragović-Uzelac V: Stability of polyphenols in chokeberry juice treated with gas phase plasma. *Food Chemistry* 212, 323-331, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.192>
- Busch VM, Pereyra-Gonzalez A, Šegatin N, Santagapita PR, Poklar-Ulrih N, Buera MP: Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 75:227-235, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.055>
- Bušić A, Belščak-Cvitanović A, Vojvodić Cebin A, Karlović S, Kovač V, Špoljarić I, Mršić G, Komes D: Structuring new alginate network aimed for delivery of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols using ionic gelation and new filler materials. *Food Research International* 111:244-255, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.034>
- Butorova L, Vitova E, Polovka M: Comparison of volatiles identified in *Aronia melanocarpa* and *Amelanchier alnifolia* using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Food & Nutrition Research* 55, 2016.
- Bylaite E, Adler-Nissen J, Meyer AS: Effect of Xanthan of Flavor Release from Thickened Viscous Food Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:3577-3583, 2005.
- Caballero S, Li YO, McClements DJ, Davidov-Pardo G: Encapsulation and delivery of bioactive citrus pomace polyphenols: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1-17, 2021. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1922873>
- Cao H, Saroglu O, Karadag A, Diaconeasa Z, Zoccatelli G, Conte-Junior CA, Xiao J: Available technologies on improving the stability of polyphenols in food processing. *Food Frontiers* 2:109-139, 2021. <http://doi.org/10.1002/fft2.65>
- Capablanca L, Ferrándiz M, López A: Encapsulation of almond essential oil by co-extrusion/gelling using chitosan as wall material. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences* 7:67-74, 2017.
- Castaneda-Ovando A, de Lourdes Pacheco-Hernandez M, Paez-Hernandez ME, Rodriguez JA, Galan-Vidal CA: Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 113:859-871, 2009. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>
- Chakraborty R, Rajagopalan R: Diabetes and insulin resistance associated disorders: Disease and the therapy. *Current Science* 83:1533-1538, 2002.
- Chan ES, Yim ZH, Phan SH, Mansa RF, Ravindra P: Encapsulation of herbal aqueous extract through absorption with ca-alginate hydrogel beads. *Food and Bioproducts Processing*, 88:195-201, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.09.005>
- Chandra A, Nair MG: Quantification of benzaldehyde and its precursors in montmorency cherry (*Prunus cerasus* L.) kernels. *Phytochemical Analysis* 4:120-123, 1993. <https://doi.org/10.1002/pca.2800040308>
- Ching SH, Bansal N, Bhandari B: Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57:1133-1152, 2017. <http://doi.org/10.1080/10408398.2014.965773>
- Chirani N, Yahia L, Gritsch L, Motta F, Chirani S, Fare S: History and Applications of Hydrogel. *Journal of Biomedical Science* 4:13, 2015. <http://doi.org/10.4172/2254-609X.100013>

- Cho AR, Chun YG, Kim BK, Park DJ: Preparation of chitosan–TPP microspheres as resveratrol carriers. *Journal of food science* 79:E568-E576, 2014.
- Córdoba AL, Deladino L, Martino M: Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. *Carbohydrate Polymers* 95:315-323, 2013.
- Corrêa-Filho LC, Moldão-Martins M, Alves VD: Advances in the Application of Microcapsules as Carriers of Functional Compounds for Food Products. *Applied Sciences* 9:571, 2019.
- Cutrim CS, Cortez MAS: A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology* 71:564-578, 2018. <http://doi.org/10.1111/1471-0307.12515>
- Ćorković I, Pichler A, Šimunović J, Kopjar M: Microencapsulation of glucosyl-hesperidin in alginate/chitosan hydrogel beads. *Hrana u zdravlju i bolesti* 10:39-44, 2021a.
- Ćorković I, Pichler, A, Buljeta I, Šimunović J, Kopjar, M. Carboxymethylcellulose hydrogels: Effect of its different amount on preservation of tart cherry anthocyanins and polyphenols. *Current Plant Biology* 28:100222, 2021b. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100222>.
- Ćujić N, Trifković K, Bugarski B, Ibrić S, Pljevljakušić D, Šavikin K: Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) extract loaded in alginate and alginate/inulin system. *Industrial Crops and Products*, 86:120-131, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.045>.
- da Silva Carvalho AG, da Costa Machado MT, de Freitas Queiroz Barros HD, Cazarin CBB, Mar'ostica Junior MR, Hubinger MD: Anthocyanins from jussara (*Euterpe edulis* Martius) extract carried by calcium alginate beads prepared using ionic gelation. *Powder Technology* 345:283-291, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.01.016>
- de Moura SCSR, Schettini GN, Garcia AO: Et al. Stability of Hibiscus Extract Encapsulated by Ionic Gelation Incorporated in Yogurt. *Food Bioprocess Technol* 12:1500-1515, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02308-9>
- de Oliveira Raphaelli C, Dos Santos Pereira E, Camargo TM, Vinholes J, Rombaldi CV, Vizzotto M, Nora L: Apple phenolic extracts strongly inhibit  $\alpha$ -glucosidase activity. *Plant Foods for Human Nutrition* 74, 430-435, 2019.
- Deladino L, Anbinder PS, Navarro AS, Martino MN: Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers* 71:126-134, 2008.
- Deng J, Yang H, Capanoglu E, Cao H, Xiao J: Technological aspects and stability of polyphenols. *U Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Woodhead Publishing, Sawston, UK, 295-323, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00009-9>.
- Di Stefano E, Oliviero T, Udenigwe CC: Functional significance and structure-activity relationship of food-derived  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Current Opinion in Food Science* 20:7-12, 2018. <https://doi.org/doi:10.1016/j.cofs.2018.02.008>
- Díaz-Bandera D, Villanueva-Carvajal A, Dublán-García O, Quintero-Salazar B, Dominguez-Lopez A: Release kinetics of antioxidant compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. encapsulated in gelatin beads and coated with sodium alginate. *International Journal of Food Science*, 48:2150–2158, 2013.
- Dorati R, Genta I, Modena T, Conti B: Microencapsulation of hydrophilic model molecule through vibration nozzle and emulsion phase inversion technologies. *Journal of Microencapsulation*



- 30:559-570, 2013. <http://doi.org/10.3109/02652048.2013.764938>
- Eggers M, Jungke P, Wolkinger V, Bauer R, Kessler U, Frank B: Antiviral activity of plant juices and green tea against SARS-CoV-2 and influenza virus. *Phytotherapy Research* 36:2109-2115, 2022.
- El Hadi MAM, Zhang FJ, Wu FF, Zhou CH, Tao J: Advances in Fruit Aroma Volatile Research. *Molecules* 18:8200-8229, 2013. <https://doi.org/10.3390/molecules18078200>
- Ellella MHA, Goda ES, Gab-Allah MA, Hong SE, Pandit B, Lee S, Gamal H, Rehman Au, Yoon KR: Xanthan gum-derived materials for applications in environment and eco-friendly materials: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 9:104702, 2020.
- Espitia PJP, Du WX, Avena-Bustillos RJ, Soares NFF, McHugh TH: Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. *Food Hydrocolloids* 35:287-296, 2014.
- Fang Z, Bhandari B: Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science and Technology* 21:510-523, 2010.
- Fangmeier M, Lehn DN, Maciel MJ, de Souza CFV: Encapsulation of Bioactive Ingredients by Extrusion with Vibrating Technology: Advantages and Challenges. *Food and Bioprocess Technology* 12:1472-1486, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02326-7>
- Farris S, Unalan IU, Introzzi L, Fuentes-Alventosa JM, Cozzolino CA: Pullulan-based films and coatings for food packaging: Present applications, emerging opportunities, and future challenges. *Journal of Applied Polymer Science* 131, 2014. <http://doi.org/10.1002/app.40539>
- Feng R, Wang L, Zhou P, Luo Z, Li X, Gao L: Development of the pH responsive chitosan-alginate based microgel for encapsulation of *Jughans regia* L. polyphenols under simulated gastrointestinal digestion in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 250:116917, 2020.
- Flamminii F, Paciulli M, Di Michele A, Littardi P, Carini E, Chiavaro E, Pittia P, Di Mattia CD: Alginate-based microparticles structured with different biopolymers and enriched with a phenolic-rich olive leaves extract: A physico-chemical characterization. *Current Research in Food Science* 4:698-706, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.10.001>
- Frakolaki G, Giannou V, Kekos D, Tzia C: A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 61:1515-1536, 2020.
- Gao Q, Zhang B, Qiu L, Fu X, Huang Q: Ordered structure of starch inclusion complex with C10 aroma molecules. *Food Hydrocolloids* 108:105969, 2020.
- Giusti MM, Wrolstad RE: Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. U *Current Protocols in Food Analytical Chemistry Current Protocols*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, SAD, 2001.
- Gonçalves JO, Esquerdo VM, Sant'Anna Cadaval TR, de Almeida Pinto LA: Chitosan-Based Hydrogels. U *Sustainable Agriculture Reviews*. Springer, New York, NY, SAD, 2019. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16581-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16581-9_5)
- Gong L, Feng D, Wang T, Ren Y, Liu Y, Wang J: Inhibitors of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase:

- Potential linkage for whole cereal foods on prevention of hyperglycemia. *Food Science and Nutrition* 8:6320-6337, 2020. <http://doi.org/10.1002/fsn3.1987>
- Granados-Guzmán G, Castro-Rios R, de Torres NW, Salazar-Aranda R: Optimization and validation of a microscale in vitro method to assess  $\alpha$ -glucosidase inhibition activity. *Current Analytical Chemistry* 14:458-464, 2018. <http://doi.org/10.2174/1573411013666170911154755>
- Gregorova A, Saha N, Kitano T, Saha P: Hydrothermal effect and mechanical stress properties of carboxymethylcellulose based hydrogel food packaging. *Carbohydrate Polymers* 117:559-568, 2015.
- Gundala NKV, Naidu VGM, Das UN: Arachidonic acid and lipoxin A4 attenuate alloxan-induced cytotoxicity to RIN5F cells in vitro and type 1 diabetes mellitus in vivo. *BioFactors* 43:251-271, 2016. <http://doi.org/10.1002/biof.1336>
- Guo J, Giusti MM, Kaletunç G: Encapsulation of purple corn and blueberry extracts in alginate-pectin hydrogel particles: Impact of processing and storage parameters on encapsulation efficiency. *Food Research International* 107:414-422, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.035>
- Gupta D: Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 6:546, 2015.
- Gurčík E, Bajusová Z, Ladvenicová J, Palkovič J, Novotná K: Cultivation and Processing of Modern Superfood—Aronia melanocarpa (Black Chokeberry) in Slovak Republic. *Agriculture* 13:604, 2023. <https://doi.org/10.3390/agriculture13030604>
- Habibi H, Khosravi-Darani K: Effective variables on production and structure of xanthan gum and its food applications: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 10:130-140, 2017. <http://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.02.013>
- Haładyn K, Tkacz K, Wojdyło A, Nowicka P: The Types of Polysaccharide Coatings and Their Mixtures as a Factor Affecting the Stability of Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties Expressed as the Ability to Inhibit the  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase of Chokeberry Extracts in the Microencapsulation Process. *Foods* 10: 1994, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10091994>
- Hansson A, Andersson J, Leufvén A: The effect of sugars and pectin on flavor release from a soft drink-related model system. *Food Chemistry*, 72:363-368, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00243-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00243-0)
- Heckert Bastos LP, Vicente J, Corrêa dos Santos CH, Geraldo de Carvalho M, Garcia-Rojas EE, Encapsulation of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil with gelatin and sodium alginate by complex coacervation. *Food Hydrocolloids*, 102: 105605, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105605>
- Hellström J, Mattila P, Karjalainen R: Stability of anthocyanins in berry juices stored at different temperatures. *Journal of Food Composition and Analysis* 31:12-19, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.02.010>
- Hirvi T, Honkanen E: Analysis of the volatile constituents of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* Ell.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36:808-810,

1985. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740360908>
- Hubbermann EM, Heins A, Stöckmann H, Schwarz K: Influence of acids, salt, sugars and hydrocolloids on the colour stability of anthocyanin rich black currant and elderberry concentrates. *European Food Research and Technology* 223, 83-90, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0139-2>
- International Diabetes Federation, IDF Diabetes Atlas, 10th ed.; International Diabetes Federation: Brussels, Belgium, 2021. <https://www.diabetesatlas.org> [17. 10. 2022.]
- Ivić I, Kopjar M, Jakobek L, Jukić V, Korbar S, Marić B, Mesić J, Pichler A: Influence of processing parameters on phenolic compounds and color of Cabernet Sauvignon red wine concentrates obtained by reverse osmosis and nanofiltration. *Process* 9:89, 2021. <https://doi.org/10.3390/pr9010089>
- Jakobek L, Seruga M, Medvidovic-Kosanovic M, Novak I: Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 103:58, 2007.
- Jantrawut P, Assifaoui A, Chambin O: Influence of low methoxyl pectin gel textures and in vitro release of rutin from calcium pectinate beads. *Carbohydrate Polymers* 97:335-342, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.091>
- Jeleń H, Gracka A: Characterization of aroma compounds: structure, physico-chemical and sensory properties. U *Flavour: From food to perception*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, SAD, 126-153, 2016. <http://doi.org/10.1002/9781118929384.ch6>
- Ji M, Gong X, Li X, Wang C, Li M: Advanced research on the antioxidant activity and mechanism of polyphenols from Hippophae species—A review. *Molecules* 25:917, 2020.
- Jovanović AA, Đorđević VB, Lević SM, Marković SM, Pavlović VB, Nedović VA, Bugarski BM: Želatin kao nosač za isporuku polifenolnih komponenata. *Tehnika—novi materijali*, 26:633, 2017.
- Jurendić T, Ščetar M: Aronia melanocarpa Products and By-Products for Health and Nutrition: A Review. *Antioxidants* 10:1052, 2021. <https://doi.org/10.3390/antiox10071052>
- Jurikova T, Mlcek J, Skrovankova S, Sumczynski D, Sochor J, Hlavacova I, Snopek L, Orsavova J: Fruits of Black Chokeberry Aronia melanocarpa in the Prevention of Chronic Diseases. *Molecules* 22:944, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22060944>
- Kaeswurm JAH, Claasen B, Fischer M, Buchweitz M: Interaction of Structurally Diverse Phenolic Compounds with Porcine Pancreatic  $\alpha$ -amylase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67:11108-11118, 2019. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04798>
- Kapci B, Neradová E, Čížková H, Voldřich M, Rajchl A, Capanoglu E: Investigating the antioxidant potential of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) products. *Food & Nutrition Research* 52:219-229, 2013.
- Katzbauer B: Properties and applications of xanthan gum. *Polymer Degradation and Stability* 59:81-84, 1998. [http://doi.org/10.1016/s0141-3910\(97\)00180-8](http://doi.org/10.1016/s0141-3910(97)00180-8)
- Kellogg J, Grace MH, Lila MA: Phlorotannins from alaskan seaweed inhibit carbolytic enzyme activity. *Marine drugs* 12:5277-5294, 2014. <http://doi.org/10.3390/md12105277>
- Keskin M, Keskin Ş, Kolayli S: Preparation of alcohol free propolis-alginate microcapsules,

- characterization and release property. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 108:89-96, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.036>
- King ES, Bolling BW: Composition, polyphenol bioavailability, and health benefits of aronia berry: a review. *Journal of Food Bioactives* 11:13-30, 2020. <https://doi.org/10.31665/JFB.2020.11235>
- Kokotkiewicz A, Jaremicz Z, Luczkiewicz M: Aronia Plants: A Review of Traditional Use, Biological Activities, and Perspectives for Modern Medicine. *Journal of Medicinal Food* 13:255-269, 2010. <http://doi.org/10.1089/jmf.2009.0062>
- Kong J, Chia L, Goh N, Chia T, Brouillard R: Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64:923-933, 2003. [http://doi.org/10.1016/s0031-9422\(03\)00438-2](http://doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00438-2)
- Kopjar M, Ivić I, Vukoja J, Šimunović J, Pichler A: Retention of linalool and eugenol in hydrogels. *Journal of Food Science and Technology*, 55:1416-1425, 2020.
- Kosaraju SL, D'ath L, Lawrence A: Preparation and Characterisation of Chitosan Microspheres for Antioxidant Delivery. *Carbohydrate Polymers*, 64:163-167, 2006. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.11.027>
- Kulling SE, Rawel HM: Chokeberry (*Aronia melanocarpa*)—A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta medica* 74:1625-1634, 2008.
- Kutschera U, Niklas KJ: Metabolic scaling theory in plant biology and the three oxygen paradoxa of aerobic life. *Theory in Biosciences* 132:277-288, 2013. <http://doi.org/10.1007/s12064-013-0194-3>
- Lavelli, V.; Pedapati, S.C.; Harsha, S.; Laureati, M.; Pagliarini, E. Degradation kinetics of encapsulated grape skin phenolics and micronized grape skins in various water activity environments to improve wide-ranging and tailor-made food applications. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 39:156-164, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.12.006>
- Lee KY, Mooney DJ: Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 37:106-126, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
- Lević S, Pajić Lijaković I, Đorđević V, Rac V, Rakić V, Šolević Knudsen T, Pavlović V, Bugarski B, Nedović V: Characterization of sodium alginate/D-limonene emulsions and respective calcium alginate/D-limonene beads produced by electrostatic extrusion. *Food Hydrocolloids* 45:111-123, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.001>
- Liu LS, Kost J, Yan F, Spiro RC: Hydrogels from Biopolymer Hybrid for Biomedical, Food, and Functional Food Applications. *Polymers* 4:997-1011, 2012. <https://doi.org/10.3390/polym4020997>
- Liu X, Le Bourvellec C, Renard CM: Interactions between cell wall polysaccharides and polyphenols: Effect of molecular internal structure. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19:3574-3617, 2020. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12632>
- Lopes da Silva JA, Castro SM, Delgadillo I: Effect of Gelatinization and Starch-Emulsifier Interactions on Aroma Release from Starch-Rich Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:1976-1984, 2002.
- Lopez MD, Maudhuit A, Pascual-Villalobos MJ, Poncelet D: Development of formulations to

- improve the controlled release of linalool to be applied as an insecticide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:1187-92, 2012.
- Lozano-Vazquez G, Lobato-Calleros C, Escalona-Buendia H, Chavez G, Alvarez-Ramirez J, Vernon-Carter EJ: Effect of the weight ratio of alginate-modified tapioca starch on the physicochemical properties and release kinetics of chlorogenic acid containing beads. *Food Hydrocolloids* 48:301-311, 2015.
- Lucía C, Marcela F, Ainhoa L: Encapsulation of Almond Essential Oil by Co-Extrusion/ Gelling Using Chitosan as Wall Material. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences* 7:67-74, 2017. <https://doi.org/10.4236/jeas.2017.71004>
- Mahmood NA: Review of  $\alpha$ -amylase inhibitors on weight loss and glycemic control in pathological state such as obesity and diabetes. *Comparative Clinical Pathology* 25:1253-1264, 2016. <http://doi.org/10.1007/s00580-014-1967-x>
- Martins E, Poncelet D, Rodrigues RC, Renard D: Oil encapsulation techniques using alginate as encapsulating agent: applications and drawbacks. *Journal of Microencapsulation* 34:8, 754-771, 2017. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1403495>
- Martins E, Poncelet D, Rodrigues RC, Renard D: Oil encapsulation techniques using alginate as encapsulating agent: Applications and drawbacks. *Journal of Microencapsulation*, 34: 754-771, 2017. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1403495>
- Martins E, Poncelet D, Rodrigues RC, Renard D: Oil encapsulation techniques using alginate as encapsulating agent: applications and drawbacks. *Journal of Microencapsulation*, 34:754-771, 2017. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1403495>
- Mayer Miebach E, Adamiuk M, Behsnilian D: Stability of Chokeberry Bioactive Polyphenols during Juice Processing and Stabilization of a Polyphenol-Rich Material from the By-Product. *Agriculture* 2:244-258, 2012. <https://doi.org/10.3390/agriculture2030244>
- Mayta-Apaza AC, Marasini D, Carbonero F: Tart Cherries and health: Current knowledge and need for a better understanding of the fate of phytochemicals in the human gastrointestinal tract. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59:626-638, 2019. <http://doi.org/10.1080/10408398.2017.1384918>
- McClements DJ: Recent progress in hydrogel delivery systems for improving nutraceutical bioavailability. *Food Hydrocolloids* 68:238-245, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.037>
- McDougall GJ, Shpiro F, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D: Different Polyphenolic Components of Soft Fruits Inhibit  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:2760-2766, 2005.
- Medina-Torres L, Santiago-Adame R, Calderas F, Gallegos-Infante JA, González-Laredo RF, Rocha Guzmán NE, Núñez-Ramírez DM, Bernad-Bernad MJ, Manero O. Microencapsulation by spray drying of laurel infusions (*Litsea glaucescens*) with maltodextrin. *Industrial Crops and Products*, 90:1-8, 2016.
- Mellinas C, Ramos M, Jiménez A, Garrigós MC: Recent Trends in the Use of Pectin from Agro-Waste Residues as a Natural-Based Biopolymer for Food Packaging Applications. *Materials* 13:673, 2020.



- Mercado-Mercado G, de la Rosa LA, Alvarez-Parrilla E: Effect of pectin on the interactions among phenolic compounds determined by antioxidant capacity. *Journal of Molecular Structure* 1199:126967, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.126967>
- Misharina TA, Terenina MB, Krikunova NI, Medvedeva IB: Binding of Volatile Organic Compounds to Food Biopolymers. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 52:226-232, 2016. <https://doi.org/10.1134/S0003683816020113>
- Mitić Ž, Cakić M, Nikolić GS, Ilić L, Stanković M: Spectroscopic characterization of bioactive Cu (II) complexes with polysaccharides by modern FTIR microspectroscopy. *Hemijaska industrija*, 64:9-20, 2010.
- Mohammadalinejad S, Kurek MA: Microencapsulation of Anthocyanins—Critical Review of Techniques and Wall Materials. *Applied Sciences* 11:3936, 2021.
- Molino S, Henares JAR, Gómez-Mascaraque LG: Tannin-rich extracts improve the performance of amidated pectin as an alternative microencapsulation matrix to alginate. *Current Research in Food Science* 5:243-250, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.crf.2022.01.014>
- Moran JI, Cyras VP, Vazquez A, Foresti ML: Characterization of chemically modified potato starch films through enzymatic degradation. *Journal of Polymers and the Environment* 19:217-224, 2011.
- Moremen KW, Trimble RB, Herscovics A: Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway. *Glycobiology* 4:113-125, 1994. <http://doi.org/10.1093/glycob/4.2.113>
- Najafi-Soulari S, Shekarchizadeh H, Kadivar M: Encapsulation optimization of lemon balm antioxidants in calcium alginate hydrogels. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 27:1631-1644, 2016. <https://doi.org/10.1080/09205063.2016.1226042>
- Nalini T, Basha SK, Sadiq AMM, Kumari VS, Kaviyarasu K: Development and characterization of alginate / chitosan nanoparticulate system for hydrophobic drug encapsulation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 52:65-72, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.04.002>
- Nazmus Saqib MD, Khaled BM, Liu Fei, Zhong Fang: Hydrogel beads for designing future foods: structure, mechanisms, application, and challenges. *Food Hydrocolloids for Health* 2:100073, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2022.100073>
- Nedovic V, Kalusevic A, Manojlovic V, Levic S, Bugarski B: An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* 1:1806-1815, 2011.
- Nedović V, Kalušević A, Manojlović V, Petrović T, Bugarski B: Encapsulation systems in the food industry. U *Advances in food process engineering research and applications*. Springer, New York, NY, SAD, 229-253, 2013.
- Nemethova V, Lacik I, Razga F: Vibration Technology for Microencapsulation: The Restrictive Role of Viscosity. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques* 5:199, 2014.
- Norcino LB, Farinassi Mendes J, de Abreu Figueiredo J, Oliveira NL, Alvarenga Botrel D, Capparelli Mattoso LH: Development of alginate/pectin microcapsules by a dual process combining emulsification and ultrasonic gelation for encapsulation and controlled release of anthocyanins from grapes (*Vitis labrusca* L.). *Food Chemistry* 391:133256, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133256>

- Nowak D, Gośliński M, Wojtowicz E: Comparative analysis of the antioxidant capacity of selected fruit juices and nectars: Chokeberry juice as a rich source of polyphenols. *International Journal of Food Properties* 19:1317-1324, 2016.
- Nyambe-Silavwe H, Villa-Rodriguez JA, Ifie I, Holmes M, Aydin E, Jensen JM, Williamson G: Inhibition of human  $\alpha$ -amylase by dietary polyphenols. *Journal of Functional Foods* 19, 723-732, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.003>
- Ochimian ID, Grajkowski J, Smolik M: Comparison of some morphological features, quality and chemical content of four cultivars of chokeberry fruits (*Aronia melanocarpa*). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 40:253-260, 2012.
- Olivares A, Silva P, Altamirano C: Microencapsulation of probiotics by efficient vibration technology. *Journal of Microencapsulation* 34:667-674, 2017. <http://doi.org/10.1080/02652048.2017.1390005>
- Olszowy M: What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants?. *Plant Physiology and Biochemistry* 144:135-143, 2019. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.09.039>
- Ovaskainen ML, Törrönen R, Koponen JM, Sinkko H, Hellström J, Reinivuo H, Mattila P: Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *Journal of Nutrition* 138:562-6, 2008. <http://doi.org/10.1093/jn/138.3.562>
- Özbilenler C, Altundağ EM, Gazi M: Synthesis of quercetin-encapsulated alginate beads with their antioxidant and release kinetic studies. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 2020. <http://doi.org/10.1080/10601325.2020.1817756>
- Padayachee A, Netzel G, Netzel M, Day L, Zabarar D; Mikkelsen, D.; Gidley, M.J. Binding of polyphenols to plant cell wall analogues—Part 2: Phenolic acids. *Food Chemistry* 135:2287-2292, 2012a. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.004>.
- Padayachee A, Netzel G, Netzel M, Day, L, Zabarar D, Mikkelsen D, Gidley MJ: Binding of polyphenols to plant cell wall analogues—Part 1: Anthocyanins. *Food Chemistry* 134:15561, 2012b. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.082>.
- Pan MH, Tung YC, Yang G, Li S, Ho CT: Molecular mechanisms of the anti-obesity effect of bioactive compounds in tea and coffee. *Food & Function* 7:4471-4722, 2016. <http://doi.org/10.1039/c6fo01168c>
- Papuc C, Goran GV, Predescu CN, Nicorescu V, Stefan G: Plant polyphenols as antioxidant and antibacterial agents for shelf-life extension of meat and meat products: Classification, structures, sources, and action mechanisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16:1243-1268, 2017.
- Pasukamonset P, Kwon O, Adisakwattana S: Alginate-based encapsulation of polyphenols from *Clitoria ternatea* petal flower extract enhances stability and biological activity under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids* 61:772-779, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.039>.
- Patil P, Chavanke D, Wagh M: A review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelspheres. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4:27-32, 2012.

- Pereira L, Cotas J: Alginates – A General Overview. U *Alginates – Recent Uses of This Natural Polymer*. IntechOpen: London, 2020. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88381>
- Perez R, Gaonkar AG: Commercial Applications of Microencapsulation and Controlled Delivery in Food and Beverage Products. U *Microencapsulation in the Food Industry*. Academic Press, Cambridge, MA, SAD, 2014.
- Philippe E, Seuvre AM, Colas B, Langendorff V, Schippa Cand Voilley A: Behavior of flavor compounds in model food systems: a thermodynamic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:1393-1398, 2003.
- Pinheiro CP, Moreira LMK, Alves SS, Tito RS, Cadaval Jr, Pinto LAA: Anthocyanins concentration by adsorption onto chitosan and alginate beads: Isotherms, kinetics and thermodynamics parameters. *International Journal of Biological Macromolecules* 166: 934-939, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.250>
- Plazinski W, Plazinska, A: Molecular dynamics study of the interactions between phenolic compounds and alginate/alginate acid chains. *New Journal of Chemistry* 35:1607-1614, 2011.
- Postolović KS, Antonijević MD, Ljujić B, Miletić Kovačević M, Gazdić Janković M, Stanić ZD: pH-Responsive Hydrogel Beads Based on Alginate,  $\kappa$ -Carrageenan and Poloxamer for Enhanced Curcumin, Natural Bioactive Compound, Encapsulation and Controlled Release Efficiency. *Molecules* 27:4045, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27134045>
- Prior RL, Fan E, Ji H, Howell A, Nio C, Payne MJ, Reed J: Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90:1473-1478, 2010. <http://doi.org/10.1002/jsfa.3966>
- Priyadarshi R, Rhim JW: Chitosan-based biodegradable functional films for food packaging applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 62:102346, 2020.
- Puscaselu R, Gutt G, Amariei S: The Use of Edible Films Based on Sodium Alginate in Meat Product Packaging: An Eco-Friendly Alternative to Conventional Plastic Materials. *Coatings* 10:166, 2020.
- Qin Y, Jiang J, Zhao L, Zhang J, Wang F: Applications of Alginate as a Functional Food Ingredient. U *Handbook of Food Bioengineering, Biopolymers for Food Design*. Academic Press, Cambridge, MA, SAD, 2018.
- Quong D, Neufeld RJ, Skjak B, Poncelet D: External versus internal source of calcium during the gelation of alginate beads for DNA encapsulation. *Biotechnology Bioengineering* 57:438-446, 2018.
- Racoviță S, Vasiliu S, Popa M, Luca C: Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. *Revue Roumaine de Chimie* 54:709-718, 2009.
- Rahman MS, Hasan MS, Nitai AS, Nam S, Karmakar AK, Ahsan MS, Shiddiky MJA, Ahmed MB: Recent Developments of Carboxymethyl Cellulose. *Polymers* 13:1345, 2021. <https://doi.org/10.3390/polym13081345>
- Reed J, Bain S, Kanamarlapudi VA: Review of Current Trends with Type 2 Diabetes Epidemiology, Aetiology, Pathogenesis, Treatments and Future Perspectives. *Diabetes, Metabolic*



- Syndrome and Obesity* 14:3567-3602, 2021. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S319895C>
- Rijo P, Falé PL, Serralheiro ML, Simões MF, Gomes A, Reis C: Optimization of medicinal plant extraction methods and their encapsulation through extrusion technology. *Measurement* 58:249-255, 2014 .
- Rohn S, Rawel HM, Kroll J: Inhibitory Effects of Plant Phenols on the Activity of Selected Enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:3566-3571, 2002. <http://doi.org/10.1021/jf011714b>
- Romani A, Vignolini P, Ieri F, Heimler D: Polyphenols and volatile compounds in commercial chokeberry (*Aronia melanocarpa*) products. *Natural product communications* 11:99-102, 2016.
- Saifullah M, Islam Shishir MR, Ferdowsi R, Tanver Rahman MR, Van Vuong Q: Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review. *Trends in Food Science and Technology* 86:230-251, 2019.
- Savic Gajic IM, Savic IM, Gajic DG, Dasic, A: Ultrasound-Assisted Extraction of Carotenoids from Orange Peel Using Olive Oil and Its Encapsulation in Ca-Alginate Beads. *Biomolecules* 11:225, 2021.
- Seke F, Manhivi VE, Slabbert RM, Sultanbawa Y, Sivakumar D. *In Vitro* Release of Anthocyanins from Microencapsulated Natal Plum (*Carissa macrocarpa*) Phenolic Extract in Alginate/Psyllium Mucilage Beads. *Foods* 11:2550, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11172550>
- Shabkhiz MA, Pirouzifard MK, Pirsá S, Mahdavinia GR: Alginate hydrogel beads containing *Thymus daenensis* essential oils/Glycyrrhizic acid loaded in  $\beta$ -cyclodextrin. Investigation of structural, antioxidant/antimicrobial properties and release assessment. *Journal of Molecular Liquids* 344: 117738, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117738>
- Shahbazi M, Ahmadi SJ, Seif A, Rajabzadeh G: Carboxymethyl cellulose film modification through surface photo-crosslinking and chemical crosslinking for food packaging applications. *Food Hydrocolloids* 61:378-389, 2016.
- Shahin L, Phaal Sheriff S, Vaidya Brajesh N, Brown James E, Joshee Nirmal: Aronia (Chokeberry): an underutilized, highly nutraceutical plant. *Journal of Medicinally Active Plants* 8:46-63, 2019. <https://doi.org/10.7275/q651-2w57>
- Sidor A, Drożdżyńska A, Brzozowska A, Szwengiel A, Gramza-Michałowska A: The Effect of Plant Additives on the Stability of Polyphenols in Cloudy and Clarified Juices from Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*). *Antioxidants* 9:801, 2020. <https://doi.org/10.3390/antiox9090801>
- Sidor A, Gramza-Michałowska A: Black Chokeberry *Aronia Melanocarpa* L.—A Qualitative Composition, Phenolic Profile and Antioxidant Potential. *Molecules* 24:3710, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24203710>
- Singleton VL, Rossi JA: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16:144–158, 1965.
- Skjåk-Bræk G, Donati I, Paoletti S: Alginate hydrogels: properties and applications. U *Polysaccharide Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications*. Pan Stanford

- Publishing, Singapore, 2015. <https://doi.org/10.1201/b19751-14>
- Sosnowska D, Podśędek A, Kucharska AZ, Redzyna M, Opęchowska M, Koziółkiewicz M: Comparison of in vitro anti-lipase and antioxidant activities, and composition of commercial chokeberry juices. *European Food Research and Technology* 242:505-515, 2015. <http://doi.org/10.1007/s00217-015-2561-4>
- Spagna G, Pifferi PG, Rangoni C, Mattivi F, Nicolini G, Palmonari R: The stabilization of white wines by adsorption of phenolic compounds on chitin and chitosan. *Food Research International* 29:241-248, 1996. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(96\)00025-7](https://doi.org/10.1016/0963-9969(96)00025-7)
- Stach M, Kolniak-Ostek J: The Influence of the Use of Different Polysaccharide Coatings on the Stability of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Chokeberry Hydrogel Microcapsules Obtained by Indirect Extrusion. *Foods* 12:515, 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12030515>
- Stojanovic R, Belščak-Cvitanović A, Manojlovic V, Komes D, Nedovic V, Bugarski V: Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92:685-696, 2012.
- Sui X, Zhang Y, Zhou W: In vitro and in silico studies of the inhibition activity of anthocyanins against porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase. *Journal of Functional Foods* 21:50-57, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.042>
- Sun C, Zhao C, Capanoglu Guven E, Paoli P, Simal-Gandara J, Ramkumar KM, Wang S, Buleu F, Pah A, Turi V, Damian G, Dragan S, Tomas M, Khan W, Wang M, Delmas D, Portillo MP, Dar P, Chen L, Xiao J: Dietary polyphenols as antidiabetic agents. *Frontiers in Nutrition* 1:18-44, 2020. <https://doi.org/10.1002/fft2.15>
- Sun J, Tan H: Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials* 6:1285-1309, 2013.
- Sun L, Miao M: Dietary polyphenols modulate starch digestion and glycaemic level: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60:541-555, 2020. <http://doi.org/10.1080/10408398.2018.1544883>
- Sun L, Warren FJ, Gidley MJ: Natural products for glycaemic control: Polyphenols as inhibitors of alpha-amylase. *Trends in Food Science and Technology* 91:262-273, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.009>
- Sun LJ, Gidley MJ, Warren FJ: Tea polyphenols enhance binding of porcine pancreatic alpha-amylase with starch granules but reduce catalytic activity. *Food Chemistry* 258:164-173, 2018.
- Taheri A, Jafari SM: Gum-based nanocarriers for the protection and delivery of food bioactive compounds. *Advances in Colloid and Interface Science* 269:277-295, 2019. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2019.04.009>
- Tam SK, Dusseault J, Bilodeau S, Langlois G, Halle JP, Yahia L: Factors influencing alginate gel biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research* 98:40-52, 2011. <http://doi.org/10.1002/jbm.a.33047>
- Tarone AG, Cazarin CBB, Marostica Jr MR: Anthocyanins: New techniques and challenges in microencapsulation. *Food Research International* 133:109092, 2009.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109092>
- Teixeira da Silva P, Martins Fries LL, Ragagnin de Menezes C, Tasch Holkem A, Schwan CL, Wigmann ÉF, De Oliveira Bastos J, De Bona da Silva C: Microencapsulation: Concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural* 44:1304-1311, 2014. <https://doi.org/10.1590/01038478cr20130971>
- Timilsena YP, Haque MA, Adhikari B: Encapsulation in the Food Industry: A Brief Historical Overview to Recent Developments. *Food and Nutrition Sciences* 11:481-508, 2020.
- Tinajero MG, Malik VS: An Update on the Epidemiology of Type 2 Diabetes: A Global Perspective. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 50:337-355, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2021.05.013>
- Tolić MT, Landeka Jurčević I, Panjkota Krbavčić I, Marković K, Vahčić N: Phenolic Content, Antioxidant Capacity and Quality of Chokeberry (*Aronia Melanocarpa*) Products. *Food Technology and Biotechnology* 53:171-179, 2015. <http://doi.org/10.17113/ftb.53.02.15.3833>
- Tønnesen HH, Karlsen J: Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 28:621-630, 2002. <http://doi.org/10.1081/ddc-120003853>
- Trenka M, Nawirska-Olszańska A, Oziembłowski M: Analysis of Selected Properties of Fruits of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) from Organic and Conventional Cultivation. *Applied Sciences* 10:9096, 2020. <https://doi.org/10.3390/app10249096>
- Trinetta V, Cutter CN: Pullulan: A Suitable Biopolymer for Antimicrobial Food Packaging Applications. U *Antimicrobial Food Packaging*. Academic Press, Cambridge, MA, SAD, 385-397, 2016.
- Tromelin A, Merabtine Y, Andriot I: Retention-release equilibrium of aroma compounds in polysaccharide gels: Study by quantitative structure-activity/property relationships approach. *Flavour Fragrance Journal* 25: 431-442, 2010.
- Tsirigotis-Maniecka M, Gancarz R, Wilk KA: Polysaccharide hydrogel particles for enhanced delivery of hesperidin: Fabrication, characterization and in vitro evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 532:48-56, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.07.001>
- Tzatsi P, Goula AM: Encapsulation of Extract from Unused Chokeberries by Spray Drying, Co-crystallization, and Ionic Gelation. *Waste and Biomass Valorization* 12:4567-4585, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01316-7>
- Usmiati S, Richana N, Mangunwidjaja D, Noor E, Prangdimurti E: The using of ionic gelation method based on polysaccharides for encapsulating the macromolecules– a review. *International conference on food security and nutrition* 67:79-84, 2014.
- Vallejo-Castillo V, Rodríguez-Stouvenel A, Martínez R, Bernal C: Development of alginate-pectin microcapsules by the extrusion for encapsulation and controlled release of polyphenols from papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of Food Biochemistry* 2020. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13331>
- Van Ruth SM, King C: Effect of starch and amylopectin concentrations on volatile flavour release from aqueous model food systems. *Flavour and Fragrance Journal*, 18:407-416, 2003.

- <https://doi.org/10.1002/ffj.1240>.
- Viswanath B, Choi CS, Lee K, Kim S: Recent trends in the development of diagnostic tools for diabetes mellitus using patient saliva. *Trends in Analytical Chemistry* 89:60-67, 2017.
- Whelehan M, Marison IW: Microencapsulation using vibrating technology. *Journal of Microencapsulation* 28:669-688, 2011.
- Wongverawattanakul C, Suklaew PO, Chusak C, Adisakwattana S, Thilavech T: Encapsulation of *Mesona chinensis* Benth Extract in Alginate Beads Enhances the Stability and Antioxidant Activity of Polyphenols under Simulated Gastrointestinal Digestion. *Foods* 11:2378, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11152378>
- Worsztynowicz P, Napierała M, Białas W, Grajek W, Olkowicz M: Pancreatic  $\alpha$ -amylase and lipase inhibitory activity of polyphenolic compounds present in the extract of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.). *Process Biochemistry* 49: 1457-1463, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.002>
- Xiao J, Kai G, Ni X, Yang F, Chen X: Interaction of natural polyphenols with  $\alpha$ -amylase in vitro: Molecular property-affinity relationship aspect. *Molecular Omics* 7:1883-1890, 2011.
- Xiao J, Kai G, Yamamoto K, Chen X: Advance in Dietary Polyphenols as  $\alpha$ -Glucosidases Inhibitors: A Review on Structure-Activity Relationship Aspect. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53:818-836, 2013b. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.561379>
- Xiao J, Ni X, Kai G, Chen XA: Review on Structure-Activity Relationship of Dietary Polyphenols Inhibiting  $\alpha$ -amylase. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53:497-506, 2013a. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2010.548108>
- Xu W, Shao R, Xiao J: Is There Consistency between the Binding Affinity and Inhibitory Potential of Natural Polyphenols as  $\alpha$ -amylase Inhibitors?. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56:1630-1639, 2016. <http://doi.org/10.1080/10408398.2013.793652>
- Yan Z, Zhong Y, Duan Y, Chen Q, Li F: Antioxidant mechanism of tea polyphenols and its impact on health benefits. *Animal Nutrition* 6:115-123, 2020.
- Yoon SH, Robyt JF: Addition of maltodextrins to the nonreducing end of acarbose by reaction of acarbose with cyclomaltohexaose and cyclomaltodextrin glucoyltransferase. *Carbohydrate Research* 337:509-516, 2002.
- Zafeiropoulou T, Evageliou V, Gardeli C, Yanniotis S, Komaitis M: Retention of selected aroma compounds by gelatine matrices. *Food Hydrocolloids* 28:105-109, 2012. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.12.004>
- Zam W, Bashour G, Abdelwahed W, Khayata W: Alginate-pomegranate peels' polyphenols beads: Effects of formulation parameters on loading efficiency. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 50:741-748, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502014000400009>
- Zhang Y, Barringer S: Effect of hydrocolloids, sugar, and citric acid on strawberry volatiles in a gummy candy. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42: 13327, 2017. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13327>
- Zhang Y, Zhao Y, Liu X, Chen X, Ding C, Dong L, Zhang J, Sun S, Ding Q, Khatoom S, Cheng Z,

- Liu W, Shen L, Xiao F: Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) as a new functional food relationship with health: an overview. *Journal of Future Foods* 1:168-178, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.01.006>
- Zorzenon MRT, Formigoni M, da Silva SB, Hodas F, Piovan S, Ciotta SR, Jansen CA, Dacome AS, Pilau EJ, Mareze Costa CE, Milani PG, Costa SC: Spray drying encapsulation of stevia extract with maltodextrin and evaluation of the physicochemical and functional properties of produced powders. *Journal of Food Science* 85:3590-3600, 2020. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15437>

## **8. ŽIVOTOPIS**

Ina Ćorković rođena je 22. kolovoza 1995. u Našicama, Republika Hrvatska gdje je završila svoje osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje. 2015. godine upisuje Fakultet kemijske i prehrambene tehnologije na Slovačkom tehničkom sveučilištu u Bratislavi, Slovačka Republika gdje 2018. godine završava prijediplomski studij Biotehnologija i prehrambena tehnologija. Na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek 2018. godine upisuje diplomski studij Prehrambeno inženjerstvo te u srpnju 2020. godine stječe akademski naziv magistre inženjerke prehrambenog inženjerstva. Od listopada 2020. zaposlena je na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek kao asistentica na projektu „Formuliranje, priprema i testiranje biopolimernih gelova kao nositelja bioaktivnih i hlapljivih komponenata u inovativnim funkcionalnim proizvodima“ u sklopu kojeg upisuje poslijediplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija i nutricionizam, smjer Prehrambena tehnologija. Do sada je sudjelovala na 16 međunarodnih znanstvenih skupova s 19 radova te bila autor i koautor na 14 znanstvenih radova iz skupine A1, 1 znanstvenog rada iz skupine A2 te 2 poglavlja u knjigama. Dobitnica je dviju nagrada EIT FOOD Challenge Labs Hrvatska. Stručno se usavršavala na Sveučilištu u Pragu, Češka Republika, Sveučilištu u Czestochowi, Poljska i Sveučilištu Santiago de Compostela, Španjolska.