Primjena izolata proteina sirutke i zeina u sustavu alginatnih nosača za inkapsulaciju polifenola đumbira (Zingiber officinale)

Jakupec, Dino

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:563001

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Dino Jakupec

7017/PT

PRIMJENA IZOLATA PROTEINA SIRUTKE I ZEINA U SUSTAVU ALGINATNIH NOSAČA ZA INKAPSULACIJU POLIFENOLA ĐUMBIRA (*Zingiber officinale)*

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i tehnologija ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Mentor: Prof. dr. sc. *Draženka Komes*

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

PRIMJENA IZOLATA PROTEINA SIRUTKE I ZEINA U SUSTAVU ALGINATNIH NOSAČA ZA INKAPSULACIJU POLIFENOLA ĐUMBIRA (*Zingiber officinale)*

Dino Jakupec, 0058205794

Sažetak: Zbog svojih ljekovitih svojstava đumbir (*Zingiber officinale)* ima dugu tradiciju primjene u medicini, a u novije vrijeme ti se pozitivni zdravstveni učinci potkrjepljuju sve većim brojem podataka o njegovom bogatom bioaktivnom sastavu. Budući da nema dostupnih podataka o inkapsulaciji polifenola đumbira, cilj ovog rada bio je istražiti učinkovitost inkapsulacije polifenolnih ekstrakata đumbira metodom ionskog geliranja te odrediti utjecaj sastava nosača na učinkovitost inkapsulacije. Kao nosač za imobilizaciju korišten je čisti alginat te kombinacije alginata s izolatima proteina sirutke i zeinom. Dobivenim česticama određen je udjel vode, fizikalno-kemijske i morfološke karakteristike, učinkovitost inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta, kao i profili otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima. Dobiveni rezultati pokazali su da je dodatak izolata proteina sirutke u alginatni nosač rezultirao tvorbom manjih čestica, a dodatkom zeina dobivene su veće čestice, dok su obje vrste proteina uzrokovale smanjenje tvrdoće čestica, njihove elastičnosti te udjela vode. Dodatkom proteina povećala se inkapsulacijska učinkovitost i zadržavanje antioksidacijskog kapaciteta te usporilo otpuštanje polifenola iz njihovog sastava. Najefikasnijim nosačem pokazao se alginat u kombinaciji sa zeinom s učinkovitošću inkapsulacije polifenola od 93,05%, najvišim zadržavanjem antioksidacijskog kapaciteta (86,79% određeno ABTS metodom i 89,67% određeno DPPH metodom) i kontinuiranim otpuštanjem polifenola iz čestica.

Ključne riječi: alginat, đumbir, inkapsulacija, izolati proteina sirutke, polifenoli, zein
Rad sadrži: 46 stranica, 11 slika, 4 tablice, 74 literaturnih navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: *Prof. dr. sc. Draženka Komes*
Pomoć pri izradi: *Arijana Bušić, mag.ing.*
Datum obrane: 7. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering
Laboratory for technology of carbohydrates and confectionery products

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

APPLICATION OF WHEY PROTEIN ISOLATES AND ZEIN IN SYSTEM OF ALGINATE CARRIERS FOR ENCAPSULATION OF GINGER (*Zingiber officinale)* POLYPHENOLS

Dino Jakupec, 0058205794

Abstract: Due to its medicinal properties ginger (*Zingiber officinale)* has a long tradition of application in medicine and in more recent times those positive effects on health are being substantiated by growing number of facts about its rich bioactive composition. Since there are no available information about encapsulation of ginger polyphenols, the aim of this thesis was to investigate encapsulation efficiency of ginger polyphenolic extracts using the method of ionic gelation and to determine the influence of composition of carriers on encapsulation efficiency. Pure alginate and combinations of alginate with whey protein isolates and zein were used as carriers for immobilization. The acquired hydrogel beads had their water content, physical, chemical and morphological properties, encapsulation and retention of antioxidant capacity efficiency, as well as the release profiles of total polyphenols and antioxidant capacity in simulated gastrointestinal conditions determined. The results showed that the addition of whey protein isolates in the alginate-based carrier resulted in formation of smaller particles, and the addition of zein particles resulted in bigger particles, while both proteins caused decreased hardness, elasticity and water content in the particles. The addition of proteins increased the encapsulation efficiency and retention of antioxidative capacity and slowed the release of polyphenols. The most efficient carrier was alginate in combination with zein with encapsulation efficiency of 93,05%, highest retention of antioxidation capacity (86,79% measured by ABTS method and 89,67% measured by DPPH method), and a continuous release of polyphenols from beads.

Keywords: alginate, ginger, encapsulation, whey protein isolate, polyphenols, zein
Thesis contains: 46 pages, 11 figures, 4 tables, 74 references
Original in: Croatian
Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: *PhD Draženka Komes, Full professor*
Technical support and assistance: *Arijana Bušić, MSc*
Defence date: July 7th 2017

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. Inkapsulacija 2
2.1.1. Ionsko geliranje 3
2.1.2. Prirodni biopolimeri kao nosači za inkapsulaciju 4
2.1.2.1. Alginati kao nosači za inkapsulaciju 5
2.1.2.2. Izolati proteina sirutke kao nosači za inkapsulaciju 6
2.1.2.3. Zein kao nosač za inkapsulaciju 7
2.1.3. Inkapsulacija polifenolnih spojeva 8
2.1.3.1. Funkcije i svojstva proteinskih nosača za inkapsulaciju polifenolnih spojeva 10
2.2. Đumbir 11
2.2.1. Biološki aktivni spojevi đumbira 12

3. EKSPERIMENTALNI DIO 14
3.1. Materijal 14
3.1.1. Uzorci 14
3.1.1.1. Priprema polifenolnog ekstrakta đumbira 14
3.1.2. Kemikalije 14
3.1.3. Aparatura i pribor 16
3.2. Metode 17
3.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola 17
3.2.2. Određivanje udjela ukupnih neflavonoida i flavonoida 19
3.2.3. Određivanje udjela flavan-3-ola metodom s vanilinom 19
3.2.6. Određivanje udjela topljivih polisaharida 24
3.2.7. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta đumbira 25
3.2.8. Karakterizacija čestica 26
3.2.8.1. Određivanje udjela vode 26
3.2.8.2. Određivanje fizikalnih i morfoloških karakteristika formuliranih čestica 26
3.2.8.3. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije i zadržavanja antioks. kapaciteta 27
3.2.8.4. Praćenje otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta 27
3.2.8.5. Praćenje povećanja mase liofiliziranih čestica 28

4. REZULTATI I RASPRAVA 29
4.1. Određivanje fitokemijskog profila đumbira (*Zingiber officinale*) 29
4.2. Karakterizacija hidrogel čestica 30
4.2.1. Fizikalno-kemijske karakteristike formuliranih čestica 30
4.2.2. Morfološke karakteristike formuliranih čestica 31
4.2.3. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta 32
4.2.4. Praćenje otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta 33
4.2.5. Praćenje povećanja mase liofiliziranih čestica Swelling metodom 36

5. ZAKLJUČCI 37

6. LITERATURA 38

1. UVOD

Đumbir (*Zingiber officinale*) zbog svojih ljekovitih svojstava ima dugu tradiciju primjene u narodnoj medicini, a zbog učinkovitosti u ublažavanju mnogobrojnih tegoba tražen je i u suvremenom društvu. Osim što se može konzumirati u svježem ili sušenom obliku, od đumbira se može pripremiti i ekstrakt koji je bogat raznim biološki aktivnim spojevima, primjerice polifenolima (Demin i Yingying, 2010). Polifenoli su snažni antioksidansi koji neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala te tako imaju izrazito pozitivan učinak na zdravlje. No polifenoli imaju vrlo nisku bioraspoloživost, odnosno prolaskom kroz probavni sustav brzo se degradiraju što na kraju dovodi do značajno niže apsorpcije polifenola, u odnosu na unesenu količinu (Zeng i Wang, 2001). Jedan od načina prevladavanja tog problema je inkapsulacija polifenola čime se postiže sporije i dugotrajnije otpuštanje te time veća bioraspoloživost polifenola.

Inkapsulacija je metoda pakiranja materijala u kapsule različitih fizikalnih i kemijskih svojstava s ciljem zaštite materijala jezgre, modifikacije svojstava, kontroliranog otpuštanja ili maskiranja nepoželjnih senzorskih svojstava materijala koji se inkapsulira (Desai i Park, 2005). Neke od korištenih metoda inkapsulacije uključuju sušenje raspršivanjem, hlađenje raspršivanjem, ekstruziju i ionsko geliranje (Augustin i Hemar, 2009). Ovisno o korištenoj metodi i primjenjenim sustavima nosača dobivaju se čestice različitih morfoloških oblika i veličina. Kao nosači za inkapsulaciju mogu se koristiti razni polimeri, a u posljednje vrijeme sve je veći naglasak na biopolimerima. Najčešće korišteni biopolimeri za inkapsulaciju su polisaharidi (alginat, pektin) ili proteni (izolati proteina sirutke, kazein,) koji svojim fizikalno-kemijskim svojstvima direktno utječu na svojstva nastalih kapsula (Vos i sur., 2010; Matalanis i sur., 2011).

Budući da nema dostupnih podataka o inkapsulaciji polifenola đumbira, cilj ovog rada je istražiti učinkovitost inkapsulacije polifenolnog ekstrakta đumbira metodom ionskog geliranja te ispitati utjecaj dodatka izolata proteina sirutke i zeina u alginatni nosač. U tu svrhu provest će se karakterizacija dobivenih čestica određivanjem fizikalno-kemijskih karakteristika (veličina, tvrdoća, elastičnost i udjel vode), određivanjem učinkovitost inkapsulacije i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta te profilia otpuštanja ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima.

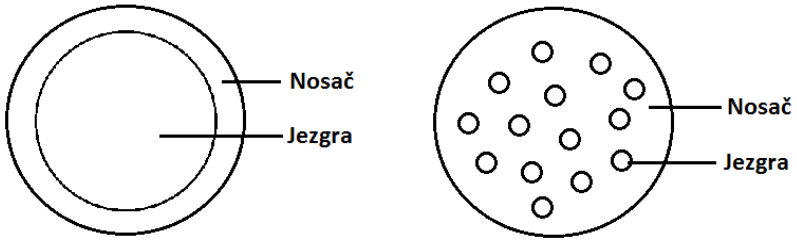
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Inkapsulacija

Inkapsulacija je tehnologija čiji je razvoj započeo prije 60-ak godina, a predstavlja pakiranje krutih, tekućih ili plinovitih materijala u male, zatvorene kapsule koje mogu ispustiti svoj sadržaj ako su ispunjeni određeni uvjeti koji ovise o sastavu kapsula te njihovoj namjeni (Desai i Park, 2005). Materijali koji se inkapsuliraju mogu biti čisti ili pak smjese različitih materijala, a nazivaju se jezgra, punjenje, unutarnja faza ili aktivno sredstvo. S druge strane, materijal koji se koristi za pakiranje naziva se nosač, ljuska, membrana ili kapsula.
Razlozi primjene tehnike inkapsulacije u industriji hrane su brojni, a neki od najvažnijih su:

(1) zaštita jezgre od degradacije smanjenjem doticaja s okolišem
(2) smanjenje isparavanja ili drugog načina gubitka jezgre u okoliš
(3) modifikacija fizikalnih karakteristika jezgre kako bi se omogućilo lakše rukovanje
(4) kontrolirano otpuštanje sastojaka jezgre kroz određeno vrijeme
(5) maskiranje nepoželjnih mirisa ili okusa sastojaka jezgre
(6) razrjeđivanje sastojaka u situacijama kada su potrebni u malim koncentracijama
(7) razdvajanje sastojaka smjese koje bi u suprotnom međusobno reagirali (Desai i Park, 2005).

Kapsule mogu imati razne morfološke oblike, no, dva su najčešća (slika 1). Prvi je mononuklearna kapsula u kojoj je jedna zasebna jezgra obavijena svojim nosačem, dok je drugi oblik polinuklearna kapsula (agregat) pri kojem je nakupina od više jezgri obavijena jednim nosačem i time čini zasebnu česticu (Schrooyen i sur., 2001).



Slika 1. Dva najčešća oblika kapsula: mononuklearna kapsula (lijevo) i polinuklearna kapsula (desno) (Fang i Bhandari, 2010)

Veličina kapsula može varirati od submikronskih do veličine od nekoliko milimetara, a prema tome Singh i suradnici (2010) podijelili su ih na 3 tipa:

- nanokapsule (10-1000 nm)
- mikrokapsule (2-2000 μm)
- makrokapsule (veće od 2 mm).

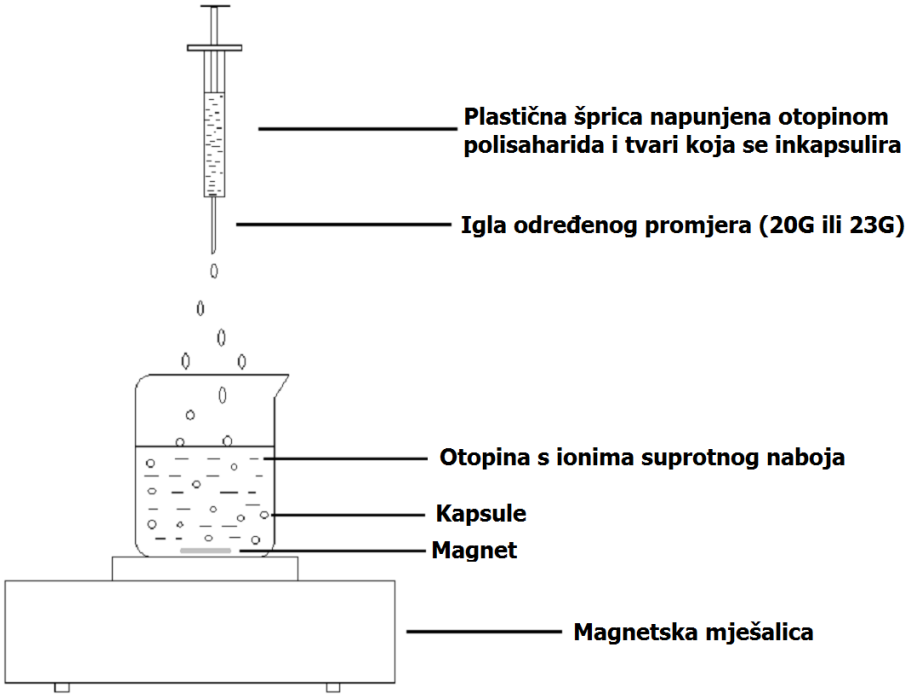
Postoji više metoda inkapsulacije, a izbor same tehnike ovisi o svojstvima materijala kojeg želimo inkapsulirati, fizikalno-kemijskim karakteristikama nosača te financijskim mogućnostima budući da su neke metode jednostavnije te samim time i jeftinije, dok su neke kompleksnije i posljedično tome skuplje. Neke od češće korištenih metoda inkapsulacije su sušenje raspršivanjem, hlađenje raspršivanjem, ekstruzija, koacervacija, zarobljivanje liposomima, kokristalizacija i ionsko geliranje (Augustin i Hemar, 2009; Desai i Park, 2005; Gibbs i sur., 1999).

2.1.1. Ionsko geliranje

Ionsko geliranje je metoda inkapsulacije koja se temelji na privlačenju suprotnih naboja polisaharida i drugih molekula suprotnog naboja zbog čega dolazi do precipitacije polisaharida koji tvore sferične oblike te zatvaraju molekule jezgre pri čemu nastaje ispunjena kapsula. Najčešće korišteni polisaharidi za ovu metodu su alginat, pektin ili kitozan, dok se za tvorbu suprotnih naboja mogu koristiti brojne tvari, a neki od njih su:

- kloridi metala ($CaCl_2$, $MgCl_2$, $ZnCl_2$)
- pirofosfati, tripolifosfati, tetrapolifosfati
- oktil sulfati, lauril sulfati, heksadecil sulfati (Racoviţă i sur., 2009).

Inkapsulacija ionskim geliranjem provodi se na način da se materijal koji se želi inkapsulirati otopi u vodenoj (kod primjerice alginata ili pektina) ili blago kiseloj otopini (kod kitozana) polisaharida te se iglom i špricom ili automatiziranim sustavom ukapava u otopinu s molekulama suprotnih naboja određene koncentracije koja se intenzivno miješa pri čemu dolazi do tvorbe kapsula zbog kompleksacije te precipitacije polisaharida u obliku omotača (slika 2).



Slika 2. Prikaz izvođenja inkapsulacije metodom ionskog geliranja (Patil i sur., 2012)

2.1.2. Prirodni biopolimeri kao nosači za inkapsulaciju

Težnja da se u tehnologiji koristi što je moguće više prirodnih tvari kako bi se smanjila količina kemijskog otpada, a u isto vrijeme iskoristile što veće količine biološkog otpada te nusproizvoda industrije, tehnologijiainkapsulacije dovela je do sve većeg istraživanja prirodnih biopolimera kao potencijalnih nosača za inkapsulaciju. Prirodni polimeri su meki, potencijalno prozirni, jeftini, održivi i biorazgradivi. Imaju dobru citokompatibilnost i mogu se koristiti i u tkivnom inženjerstvu. Slični su biološkim makromolekulama pa se zbog toga mogu lako metabolizirati (Dong, 2013).

Da bi se neki biopolimer mogao koristiti kao nosač mora udovoljavati određenim zahtjevima:

(1) mora biti netoksičan
(2) mora biti inertan prema sastojcima kapsule
(3) mora se postepeno razgrađivati pri zadanim uvjetima
(4) mora imati poželjna fizikalna i senzorska svojstva.

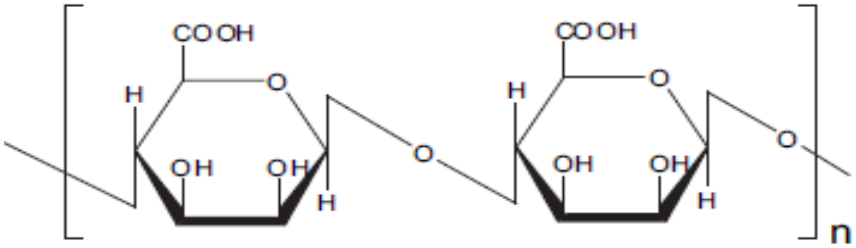
Upravo zato što najbolje udovoljavaju tim zahtjevima, kao najpogodniji prirodni biopolimeri za inkapsulaciju pokazali su se polisaharidi kao što su alginat, kitozan, dekstrin, pektin i škrob te proteini poput kazeina, proteina soje, izolata proteina sirutke i zeina.

Svojstvo polisaharida koje ih čini prikladnima za inkapsulaciju je mogućnost tvorbe kinetički metastabilnih, amorfnih gelova koji pružaju čvrstoću strukturi kapsule. Kod različitih polisaharida ta pojava posljedica je različitih mehanizama. Tako se kod primjerice škroba gel formira hlađenjem prethodno zagrijane suspenzije, dok se kod nekih bakterijskih polisaharida ta pojava može izazvati grijanjem suspenzije polisaharida. Kod polisaharida poput alginata i nisko metiliranog pektina geliranje se postiže umrežavanjem s kalcijevim ionima (Augustin i Hemar, 2009).

Pri korištenju proteina za inkapsulaciju njihovo najvažnije svojstvo je tvorba agregata i gelova do čega dolazi kada se promjenom uvjeta utječe na veze koje su odgovorne za trodimenzionalnu strukturu proteina (vodikove veze, hidrofobne interakcije, interakcije elektrostatske prirode, van der Waalsove veze). Tako primjerice do geliranja proteina može doći pomakom pH bliže izoelektričnoj točki samog proteina čime se neutralizira njegov naboj te smanjuju elektrostatske interakcije. Drugi način je zagrijavanje koje uzrokuje razmatanje proteina te potom tvorbu gela. Kod nekih pak proteina, geliranje se može potaknuti dodavanjem iona poput primjerice kalcijevih kationa (Augustin i Hemar, 2009).

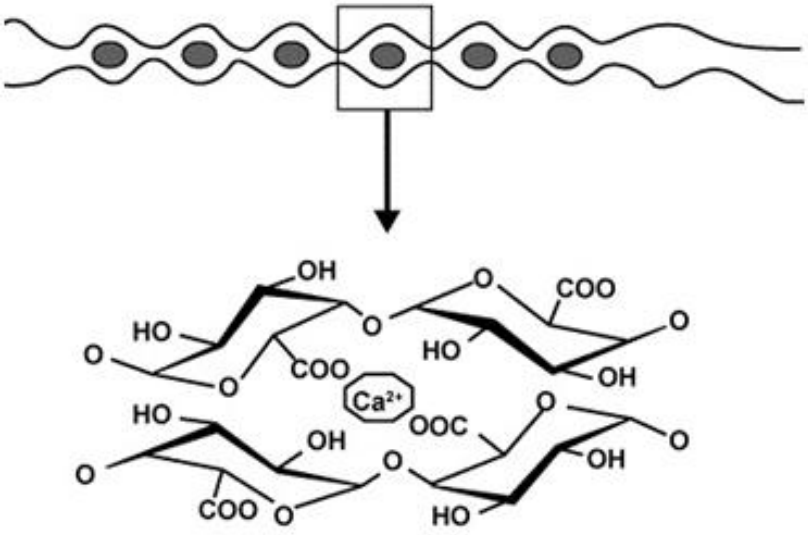
2.1.2.1. Alginati kao nosači za inkapsulaciju

Alginat je jedan od najčešće upotrebljavanih polisaharida. Alginati su linearni polimeri koji se sastoje od β-D-manuronske kiseline povezane 1-4 vezom s α-L-guluronskom kiselinom (slika 3) (Kailasapathy, 2002). Budući da je alginat biorazgradiv i probavljiv koristi se za kapsule kod kojih je potrebno regulirati otpuštanje bioaktivnih komponenti u probavnom sustavu (Iyer i sur., 2005).



Slika 3. Struktura alginata (de Vos i sur., 2010)

Alginati su prikladni za korištenje kao nosači u gotovo svim tehnikama za inkapsulaciju, no, najčešće se koriste kod sušenja raspršivanjem i ekstruzije (Kailasapathy, 2002). Tvorba gela s alginatima može se provesti pri vrlo blagim uvjetima i korištenjem netoksičnih reaktanata što je u prehrambenoj i framaceutskoj industriji izrazito važno. Do geliranja alginata dolazi interakcijom karboksilnih skupina ostataka guluronskih kiselina s dodanim dvovalentnim kationima (često Ca^{2+}), čime dolazi do tvorbe specifične strukture (slika 4), tzv. model „kutije za jaja" ("egg in box") (Park i sur., 1993).



Slika 4. Prikaz modela "kutije za jaja" (Racoviţă i sur., 2009)

2.1.2.2. Izolati proteina sirutke kao nosači za inkapsulaciju

Proteini sirutke visoko su vrijedni proteini izolirani iz mlijeka, a za inkapsulaciju se prvenstveno koriste zbog sljedećih svojstava :

(1) blagi okus

(2) visoka topljivost

(3) niska viskoznost otopine

(4) dobra svojstva formiranja filma, Livney (2010).

Pored toga, omogućuju dodatno kontroliranje otpuštanja sastojaka kapsule u probavnom sustavu (Beaulieu i sur., 2002).

Geliranje i tvorba kapsula primjenom čistog izolata proteina sirutke može se postići korištenjem organskih otapala i kemijskih agenasa, što nije naročito pogodno za prehrambene proizvode. Druga mogućnost inkapsulacije je metoda koju su razvili Rosenberg i Lee (2004), a temelji se na formiranju kapsula obloženim alginatima čija je jezgra tekuća i sadrži proteine sirutke te tvar koja se inkapsulira. Dobivene kapsule se zatim u drugoj fazi postupka izlažu povišenoj temperaturi koja denaturira proteine sirutke čime se dobiva kapsula s konačnim fizikalnim svojstvima.

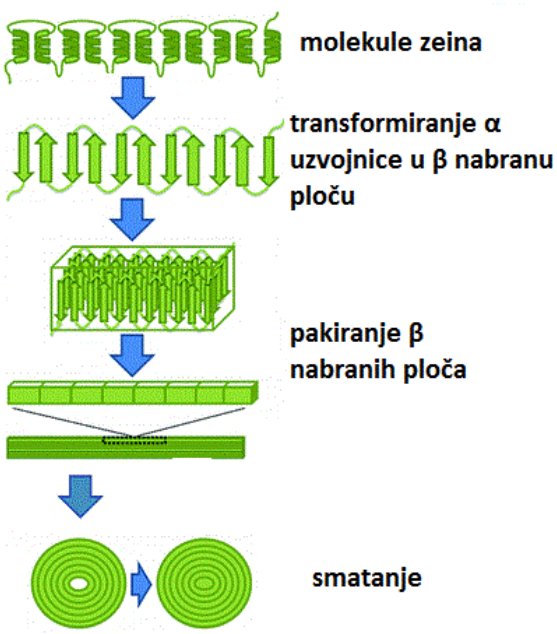
Opisana metoda nije pogodna za inkapsulaciju termolabilnih spojeva koji se u drugoj fazi inkapsulacije mogu značajnije degradirati. Rješenje tog problema je u trećem mehanizmu tvorbe kapsula, odnosno umrežavanju izolata proteina sirutke pomoću dodanih dvovalentnih kationa pri čemu karboksilne skupine proteina ulaze u interakcije s kationima. Time se dobivaju umrežene strukture čime se postiže gelirajući učinak i konačna tvorba kapsula (Chen i Subirade, 2006).

2.1.2.3. Zein kao nosač za inkapsulaciju

Zein je protein koji služi kao glavno spremište metalnih iona i aminokiselina u kukuruzu, a sastoji se od četiri glavne komponente α-, β-, γ- i δ-zeina, pri čemu α komponenta čini oko 85 % cijelog proteina (Shukla i Cheryan, 2001). Zein ima potencijal za primjenu u prehrambenoj industriji, agronomiji, farmaciji i biotehnologiji u kojima se može koristiti kao prevlaka te za tabletiranje (Hurtado-Lopez i Murdan, 2008). U inkapsulaciji se koristio za imobilizaciju, stabilizaciju i kontrolirano otpuštanje polifenola, esencijalnih ulja, bioaktivnih lipida, funkcionalnih mikronutrijenata te bojila (Wan i sur., 2015). Parris i suradnici (2005) ustanovili su da se čestice s nosačem od zeina slabo razgrađuju u želucu, pokazuju sporo otpuštanje u tankom crijevu, dok je otpuštanje u debelom crijevu izrazito brzo. Takva svojstva su izrazito pogodna budući da se većina biološki aktivnih spojeva lako degradira prije apsorpcije u debelom crijevu što se inkapsulacijom sa zeinom, kao nosačem, može spriječiti. Također, poboljšana fizikalno-kemijska svojstava zeina kao nosača mogu se postići njegovim kombiniranjem s otopinama polisaharida.

Najznačajnije svojstvo zbog kojeg je zein zanimljiv za inkapsulaciju je sposobnost samosmatanja (slika 5) u mikrokapsule u prisutnosti polarnog otapala kao što je voda. Samosmatanje je pojava spontanog formiranja organiziranih struktura potpomognutih slabim

interakcijama poput van der Waalsovih sila ili hidrofobnih interakcija (Wang i Padua, 2012). Pojava samosmatanja molekula zeina posljedica je njegovih amfifilnih svojstava (Hurtado-Lopez i Murdan, 2006).



Slika 5. Grafički prikaz samosmatanja molekula zeina (Wang i Padua, 2012)

2.1.3. Inkapsulacija polifenolnih spojeva

Polifenoli su sekundarni metaboliti mnogih biljnih vrsta, a kao biološki aktivni spojevi posebno su važni zbog svog antioksidacijskog djelovanja. Budući da slobodni radikali i reaktivni oblici kisika koji nastaju tijekom metabolizma i negativnih vanjskih utjecaja mogu dovesti do oksidacijskog stresa, ukoliko antioksidacijski kapacitet organizma nije dovoljno jak u borbi sa slobodnim radikalima, poželjno je putem raznovrsne hrane unositi polifenolne antioksidanse (Zeng i Wang, 2001). Na taj način može se značajno smanjiti rizik od bolesti srca, neurodegenerativnih bolesti i raka, što su direktne posljedice oksidacijskog stresa (Astley, 2003).

Glavne prepreke široj primjeni polifenolnih ekstrakata njihova je niska bioraspoloživost i brzo metaboliziranje zbog čega do ciljanih organa polifenoli dolaze u niskim koncentracijama (Tabarez i sur., 2010). Jedno od mogućih rješenja tog problema je inkapsulacija polifenola u zaštitne omotače čime se omogućuje njihovo sporije otpuštanje u organizmu te povećava iskoristivost.

Dva su pristupa inkapsulaciji polifenola: "top-down" i "bottom-up". "Top-down" pristup koristi se u metodama inkapsulacije poput ekstruzije i emulgiranja, a temelji se na razbijanju većih struktura u manje čestice poput kapsula (Joye i McClements, 2014). "Bottom-up" pristup podrazumijeva metode u kojima se inkapsulacija postiže agregiranjem manjih molekula ili čestica u veće procesima samosklapanja i samoograniziranja, a najčešće se provodi mješanjem polifenolnih spojeva koji se inkapsuliraju s otopinom nosača (Tavares i sur., 2014). Koacervacija i sušenje raspršivanjem primjeri su "bottom-up" pristupa. U odnosu na "top-down", "bottom-up" pristup zahtjeva manju potrošnju energije te omogućuje bolju kontrolu veličine čestica i time bolje morfološke karakteristike dobivenih čestica (Joye i McClements, 2014).

Izolati proteina sirutke (IPS) često su korišteni kao nosači za inkapsulaciju polifenola, kao čisti nosači ili u kombinaciji s polisaharidima, čime se postiže zaštita polifenola od negativnih vanjskih utjecaja te sprječava prerana razgradnja u probavnom traktu. Primjeri inkapsulacije polifenolnih spojeva primjenom proteina sirutke i različitih tehnika inkapsulacije prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Primjena izolata proteina sirutke za imobilizaciju polifenola

Sastav nosača	Inkapsulirani spoj	Metoda inkapsulacije	Referenca
IPS	antocijani borovnice	emulgiranje	Betz i sur., 2012
	antocijani	sušenje raspršivanjem	Flores i sur., 2015
IPS+kitozan	flavan-3-oli	ekstruzija	Belščak-Cvitanović i sur., 2015
	procijanidini	emulgiranje	Berendsen i sur., 2015
	katehini čaja	koacervacija	Zhang i sur., 2009
IPS+pektin	β-karoten	ionsko geliranje	Belščak-Cvitanović i sur., 2016
	antocijani	koacervacija	McClements, 2015
	polifenoli hibiskusa	koacervacija	Rubi Serrano-Cruz i sur., 2013

Iako je zbog svojih svojstava zein izrazito pogodan za inkapsulaciju određenih vrsta biološki aktivnih spojeva, njegova primjena u te svrhe još uvijek nije dovoljno istražena. Polifenoli poput kurkumina (Patel i sur., 2010), kvercetina (Patel i sur., 2012), tangeritina (Chen i sur., 2014) i procijanidini brusnice (Zou i sur., 2012) inkapsulirani su u kapsule sa zeinom

koristeći metodu disperzije tekuće-tekuće. Neo i suradnici (2013) metodom elektrospininga inkapsulirali su galnu kiselinu u vlakna sa zeinom, a istom metodom inkapsuliran je i (-)-epigalokatehingalat (Li i sur., 2009). Koristeći metodu ionskog geliranja i alginat sa zeinom kao nosač, Bušić i suradnici (2016) imobilizirali su polifenole gljive *Ghanoderma lucidum.*

2.1.3.1. Funkcije i svojstva proteinskih nosača za inkapsulaciju polifenolnih spojeva

Zbog činjenice da u svojoj strukturi posjeduju karboksilne i amino skupine, svojstva proteina se mjenjaju ovisno u pH kojem su izloženi. To svojstvo može se iskoristiti za manipuliranje oslobađanja aktivne tvari iz čestica s proteinskim nosačima, budući da različiti proteini pri različitim pH vrijednostima imaju različita svojstva, te time na specifičan način otpuštaju sadržaj kapsule. Primjerice, Li-u i suradnici (2015) ustanovili su da je oslobađanje polifenolnih spojeva iz nosača pripremljenih s proteinima soje pri pH 7,4 u 90 minuta tretiranja bilo 72,12%, dok je pri pH 1,2 otpuštanje bilo svega 43,63%. Ovakva razlika objašnjena je činjenicom da se pri pH 7,4 negativno nabijene karboksilne grupe proteina odbijaju čime se stvaraju pukotine koje uzrokuju brže otpuštanje polifenola iznosača, dok je pri pH 1,2 zbog djelovanja vodikovih veza struktura proteina kompaktna što rezultira sporijom difuzijom aktivne tvari iz kapsula.

Proteini mogu na sebe vezati polifenolne spojeve poput katehina djelovanjem hidrofobnih interakcija ili formiranjem vodikovih veza (Zou i sur., 2012). U takvim smjesama proteina i vezanih polefenola mogu se dobiti kapsule različitih veličina u kojima kao jezgra zaostaju vezani polifenoli i to metodama koje uključuju:

- korištenje sredstva za umrežavanje
- termički tretman
- mijenjanje pH otopine
- mijenjanje ionske jakosti otopine (Tavares i sur., 2014).

Molekule proteina imaju i sposobnost umrežavanja jedne s drugima čime se stvaraju koloidne čestice pogodne za inkapsulaciju polifenola (Xue i sur., 2014).

U kombinaciji s proteinima, kao nosači za inkapsulaciju aktivnih tvari poput polifenola često se koriste i polisaharidi. U tom slučaju može doći do interakcija između suprotno nabijenih molekula proteina i polisaharida što za posljedicu može imati sprječavanje enzimske razgradnje ili pak poboljšana mehanička svojstva čestica (Leick i sur., 2011). S druge strane, budući da se interakcijama mijenja struktura kapsule, može doći i do promjene u profilu otpuštanja inkapsulirane aktivne tvari što je poželjno budući da daje dodatnu mogućnost manipuliranja otpuštanjem tvari iz kapsula (Diaz-Bandera i sur., 2013).

2.2. Đumbir

Đumbir (*Zingiber officinale*) je zeljasta biljka trajnica iz porodice *Zingiberaceae* s vodoravnim, račvasto razgranjenim podankom iz kojeg izbijaju lisnate stabljike nalik stabljikama bambusa visoke do 1,5 metara. Glavni dio biljke koji se koristi u prehrani i preradi je podzemni gomolj, odnosno rizom koji se može konzumirati svjež, osušen, u prahu ili kao ulje, ekstrakt ili sok. U mnogim državama svijeta koristi se kao začin, a najzastupljeniji je u azijskim zemljama (Demin i Yingying, 2010).

Kao lijek đumbir se koristio u Indiji i Kini još od drevnih vremena, a zbog svojih ljekovitih svojstava prepoznat je i u Europi u 9. stoljeću (Sasidharan i sur., 2010). Đumbir djeluje direktno na probavni sustav smanjujući mučninu te se zbog toga koristi kod prevencije mučnine koja se može pojaviti i kao posljedica kemoterapije, operacija ili morske bolesti (Holtmann i sur, 1989). Isto tako, koristi se za liječenje različitih drugih probavnih problema poput jutarnje mučnine, grčeva u trbuhu, nadutosti, proljeva, gubitka apetita i dispepsije. Konzumacija đumbira preporuča se i kako bi se potaknula probava hrane (Ali i sur., 2008).

Osim što pomaže kod probavnih problema, đumbir pomaže u ublažavanju:

- bolova kod artritisa
- upale mišića
- boli u prsima i donjem dijelu leđa
- menstrualnih bolova (Shukla i Singh, 2007).

Đumbir se može koristiti i za liječenje infekcija gornjih dišnih puteva, kašlja i bronhitisa, a kao protuupalno sredstvo djeluje kod problema sa zglobovima. Đumbir se također često koristi i kao začin u hrani i pićima te kao miris u sapunima i kozmetičkim proizvodima (Alam, 2013).

2.2.1. Biološki aktivni spojevi đumbira

Kemijskom analizom đumbira utvrđeno je da sadrži preko 400 različitih spojeva. Glavni sastojci u rizomima đumbira su ugljikohidrati (50-70%), lipidi (3-8%), terpeni i fenolni spojevi (Grzanna i Lindmark, 2005). U manjim koncentracijama u đumbiru su prisutne i slobodne aminokiseline, vlakna, proteini, fitosteroli, vitamini (nikotinska kiselina i vitamin A) te mineralne tvari (Shukla i Singh, 2007).

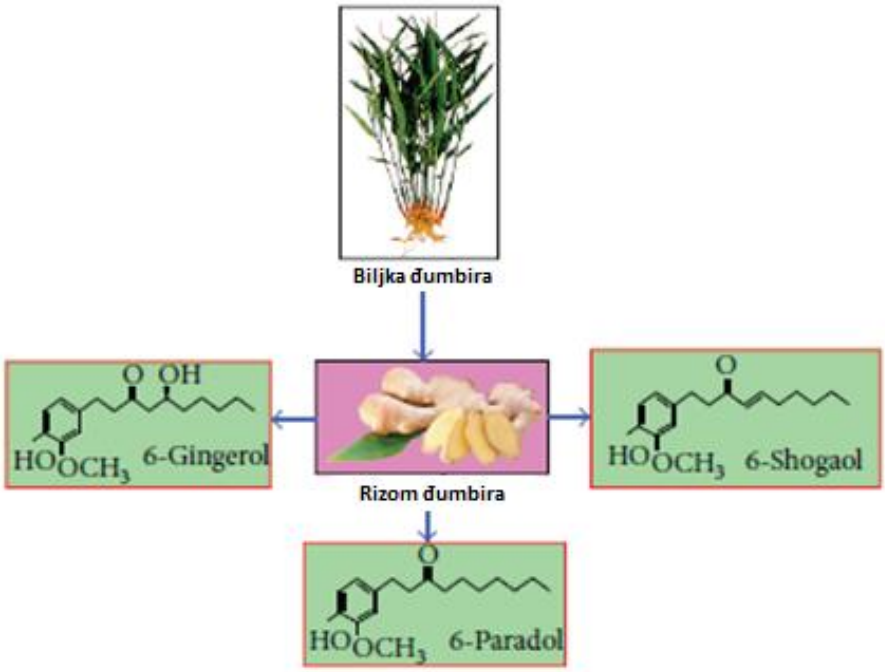
Korijen đumbira koji se koristi u prehrani, preradi i izolaciji pojedinih spojeva, pored vode najvećim se dijelom sastoji od polisaharida koji su pokazali značajnu biološku aktivnost u *in vitro* uvjetima (Zhang i sur., 2011). Polisaharidi prisutni u rizomu đumbira su heteropolisaharidi, čine približno 15 % mase rizoma te oko 97 % njegove suhe tvari, a izgrađeni su od sljedećih monosaharida:

- glukoza (50-58 %)
- arabinoza (21-24 %)
- ksiloza (6-8 %)
- galaktoza (3-5 %)
- manoza (2-3 %) i
- ramnoza (1-2 %) (Yeh i sur., 2014).

Heteropolisaharidi đumbira ujedno posjeduju i antioksidacijska svojstva (Dharmesh i sur. 2012), a budući da su u rizomu đumbira prisutni u visokom udjelu i relativno se lako ekstrahiraju, to ih čini dobrom sirovinom za proizvodnju funkcionalne hrane (Zhang i sur., 2011).

Najzastupljeniji polifenoli u đumbiru su 6-gingerol, 6-shogaol, 6-paradol, 8-gingerol i 10-gingerol (Schwertner i Rios, 2007). Prisutnost navedenih spojeva (slika 6) odgovorna je za opori okus đumbira, no, ujedno je odgovorna i za većinu njegovih jakih antioksidacijskih svojstava (Kikuzaki i sur., 1994). 6-gingerol je jedini spoj koji je pronađen u svježem korijenu đumbira, dok su ostali spojevi derivati 6-gingerola koji nastaju tijekom prerade, termičke obrade i duljeg skladištenja (Zhang i sur.,1994). 6-shogaol prisutan je u većoj koncentraciji u sušenim rizomima đumbira u odnosu na svježi (Jolad i sur., 2005), što opravdava tradicionalno korištenje sušenog đumbira kao lijeka budući da je istraživanje koje su proveli Dugasani i suradnici (2009) pokazalo da 6-shogaol ima najveći antioksidacijski potencijal u odnosu na ostale derivate 6-gingerola.

Glavni problem koji se javlja kod polifenola đumbira, kao i polifenola općenito, je njihova niska bioraspoloživost.



Slika 6. Đumbir, rizom đumbira i njegove glavne bioaktivne komponente (Prasad i Tyagi, 2015)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

3.1.1. Uzorci

U ovom radu za ekstrakciju polifenolnih spojeva, kao aktivnih sastojaka za inkapsulaciju, korišten je suhi korijen đumbira podrijetlom iz Kine (2016. godina), koji je za potrebe ekstrakcije usitnjen do odgovarajuće veličine čestica. Natrijeva sol alginske kiseline iz smeđih algi niske viskoznosti (Sigma-Aldrich, Steinheim, SAD), izolati proteina sirutke (Davisco Foods International Inc, La Sueur, Minnesota, SAD) i pročišćeni zein (Acros Organics, New Yersey, SAD) korišteni su kao materijali u sustavu nosača za inkapsulaciju polifenola đumbira.

3.1.1.1. Priprema polifenolnog ekstrakta đumbira

Ekstrakt đumbira pripremljen je prelijevanjem 20 g suhog, usitnjenog đumbira s 200 mL 70%-tnog etanola (v/v). Ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji na temperaturi od 70 °C kroz 30 minuta, uz povremeno miješanje. Dobivena smjesa je filtrirana i centrifugirana kako bi se uklonili netopljivi sastojci, dok je tekući ekstrakt uparen do određenog volumena kako bi se otpario dodani etanol. Dobiveni ekstrakt je još jednom centrifugiran te nadopunjen destiliranom vodom do početnog volumena od 200 mL čime je dobiven vodeni ekstrakt đumbira koji je korišten za daljne analize i u svrhu inkapsulacije. Pripremljenom ekstraktu đumbira određen je udjel ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida, hidroksicimetnih kiselina, flavan-3-ola te antioksidacijski kapacitet.

3.1.2. Kemikalije

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

Određivanje udjela ukupnih polifenola:

- Folin-Ciocalteau reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 20%-tna otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3), Kemika (Zagreb, Hrvatska)

- Galna kiselina, Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

Određivanje udjela flavonoida i neflavonoida:

- Klorovodična kiselina, 37%-tna, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Formaldehid, 35%-tni, Alkaloid AD (Skopje, Makedonija)
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 20%-tna otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3), Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina:

- Klorovodična kiselina (HCl), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Arnow reagens– smjesa natrijevog nitrata (Gram-mol d.o.o.; Zagreb, Hravatska) i natrijevog molbidata (Sigma-Aldrich; Steinham, Njemačka)
- Natrijev hidroksid (NaOH), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kafeinska kiselina, Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)

Određivanje udjela flavan-3-ola:

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

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS i DPPH metodom:

- Etanol, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev persulfat, Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS), Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- Metanol, Malinckrodt Baker B.V. (Amsterdam, Nizozemska)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH), Fluka (St. Gallen, Švicarska)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)

Inkapsulacija i karakterizacija hidrogel čestica:

- Natrijeva sol alginske kiseline niske viskoznosti Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- Izolati proteina sirutke, Davisco Foods international (La Suer, SAD)
- Zein (Acros Organics, New Yersey, SAD)
- Kalcijev klorid, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Natrij citrat, T.T.T. d.o.o. (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev klorid, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Dinatrij hidrogen *o*-fosfat bezvodni, Fisher Chemical (Loughborough, Velika Britanija)
- Natrij dihidrogenfosfat-dihidrat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela suhe tvari:

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

3.1.3. Aparatura i pribor

Priprema ekstrakta:

- Plamenik s azbestnom mrežicom
- Termometar
- Stakleni štapić
- Čaše volumena od 250 do 500 mL
- Menzura volumena 250 mL
- Štoperica
- Metalno cijedilo
- Gaze

Spektrofotomerijske analize:

- Staklene epruvete
- Staklene čaše volumena 250 mL
- Staklene menzure volumena 50 mL i 100 mL
- Automatske mikropipete volumena 100-1000 μL (Gilson, SAD)
- Staklene pipete volumena 5 mL i 10 mL

- Propipete
- Odmjerne tikvice volumena 10-100 mL
- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Kiveta (10 mm) za spektrofotometrijsko mjerenje
- Spektrofotometar Helios γ, ThermoSpectronic (Cambridge, Velika Britanija)

Inkapsulacija i karakterizacija hidrogel čestica:

- Plastične šprice volumena 5 mL
- Igle 23G (0,6x30 mm) i 20G (0,9x40 mm)
- Čaše volumena od 50 do 250 mL
- Termometar
- Metalno cjedilo
- Plastične Eppendorf epruvete volumena 2 mL
- Plastične epruvete volumena 15 mL
- Magneti
- Aluminijska posudice s poklopcima
- Eksikator
- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Laboratorijski sušionik, Tehtnica (Železnik, Slovenija)
- Tehnička vaga, A&D Instruments (Abingdon, Velika Britanija)
- Magnetna miješalica, IKA C-Mag HS 7 (Staufen, Njemačka)
- Dino-Lite kalibracijska pločica (minimalni razmak=0,2 mm) (Naarden, Nizozemska)
- TA.HDPlus analizator teksture, Stable Micro Systems (Godalming, Velika Britanija)
- Cilindrična čelična sonda P/2, Stablo Micro Systems (Godalming, Velika Britanija)
- Mikroskop Leica DM1000 LED (Cambridge, Velika Britanija)

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Princip metode:

Metoda za određivanje udjela ukupnih polifenola temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteau reagensa s nekim reducirajućim reagensom (fenoli). Folin-Ciocalteau reagens je

smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteau reagens reducira do plavo obojenih volframovog i molibdenovog oksida (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Nakon dva sata reakcije, u kojoj svi fenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteau reagensom, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na 765 nm (Ough i Amerine, 1988), pri čemu je intenzitet obojenja direktno proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

Postupak rada:

U staklene epruvete otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100 µL uzorka, 500 µL Folin-Ciocalteau reagensa (razrijeđen s vodom u omjeru 1:2) te 1,5 mL 20%-tne otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3) te se reakcijska smjesa u epruvetama dobro izmiješa. Tako pripremljeni uzorci ostave se stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorci koji se ispituju, samo umjesto 100 µL uzorka sadrži isti volumen destilirane vode. Apsorbanciju slijepe probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Udjel ukupnih polifenola izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

$$y = 0{,}0010x - 0{,}0001 \qquad [1]$$

gdje su:

x – udjel ukupnih polifenola (mg/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje, konstruirane za standard galne kiseline, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg/L), određuje se udjel ukupnih polifenola u ispitivanom uzorku. Određivanje udjela ukupnih polifenola provedeno je u dvije paralelene probe (n = 2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama, u mg ekvivalentima galne kiseline (EGK)/g čestica.

3.2.2. Određivanje udjela ukupnih neflavonoida i flavonoida

Princip metode:

Za taloženje flavonoidnih spojeva primjenjuje se formaldehid koji reagira s C-6 ili C-8 na 5,7-dihidroksi flavonoidu stvarajući metilol derivate koji dalje reagiraju s drugim flavonoidnim spojem također na C-6 ili C-8 položaju itd. Kondenzirane molekule nastale ovom reakcijom uklone se filtriranjem, a ostatak neflavonoidnih fenola određuje se prema metodi za ukupne fenole (Ough i Amerine, 1988).

Postupak rada:

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

Udjel ukupnih neflavonoida izračunat je prema jednadžbi baždarnog pravca [1] korištenoj za izračun udjela ukupnih polifenola. Rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline (EGK)/g uzorka.

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

ukupni flavonoidi = ukupni polifenoli – ukupni neflavonoidi [mg EGK/g uzorka] [2]

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

Princip metode:

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

Postupak rada:

Pripremi se 4 %-tna otopina vanilina u metanolu. U tamnu epruvetu doda se 0,5 mL mikrofiltriranog uzorka i 3 mL prethodno pripremljene otopine vanilina. Epruvete se stave u hladnu vodenu kupelj i nakon 5 minuta doda se 1,5 mL koncentrirane klorovodične kiseline te se reakcijska smjesa u epruveti izmiješa. Nakon 15 minuta očita se apsorbancija na 500 nm (Di Stefano i sur., 1989). Slijepa proba priprema se na isti način, posebno za svaki uzorak, ali se umjesto 4%-tne otopine vanilina dodaje čisti metanol.

Udjel (+)-katehina i proantocijanidina računa se prema jednadžbi:

$$\text{mg (+)-katehina/L} = 290{,}8 \times \Delta A \times \text{razrijeđenje} \qquad [3]$$

gdje je: ΔA = razlika apsorbancije između uzorka i slijepe probe.

Određivanje udjela flavan-3-ola provedeno je u dvije paralelene probe (n = 2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mg (+)-katehina/g uzorka. Kao što je vidljivo iz formule, ako je u postupku korišten razrijeđen uzorak, dobivene koncentracije moraju se pomnožiti s faktorom razrjeđenja.

3.2.4. Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina

Princip metode:

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

Postupak rada:

Za određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina, 500 µL uzorka pomiješa se u epruveti sa 1 mL 0,5 M klorovodične kiseline, 1 mL Arnow-og reagensa, 1 mL 8,5 %-tne vodene otopine NaOH te se doda 1,5 mL destilirane vode. Sadržaj epruvete se zatim izmiješa te se apsorbancija odmah zatim očita na 490 nm (Matkowski i sur., 2008). Slijepa proba umjesto uzorka sadrži destiliranu vodu.

Udjel hidroksicimetnih kiselina izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

$$y = 0{,}0025x + 0{,}0054 \quad [4]$$

gdje su:

x – udjel kafeinske kiseline (mg/L),

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 490 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard kafeinske kiseline, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg/L), određuje se udjel hidroksicimetnih kiselina u ispitivanom uzorku. Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina provedeno je u dvije paralelene probe (n = 2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mg ekvivalenata kafeinske kiseline/g čestica.

3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

3.2.5.1. ABTS metoda

Princip metode:

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

Postupak rada:

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka pripremi se otopina $ABTS^{+}$ radikala, oksidacijom vodene otopine ABTS reagensa (7 mM) s kalijevim persulfatom (140 mM) do

konačne koncentracije otopine kalijevog persulfata od 2,45 mM. Za pripremu ove otopine potrebno je pomiješati 88 µL otopine kalijevog persulfata (140 mM) te nadopuniti sa otopinom ABTS (7 mM) reagensa do volumena 5 mL. Budući da ABTS i kalijev persulfat reagiraju u stehiometrijskom odnosu 1:0,5, neće doći do potpune oksidacije te je stoga potrebno pripremljenu otopinu omotati folijom i ostaviti stajati preko noći (12-16 h) na sobnoj temperaturi. Na dan analize otopina se razrijedi etanolom (96%-tnim) do konačne koncentracije $ABTS^+$ radikala od 1 %, tako da apsorbancija te otopine iznosi 0,70 ± 0,02.

Volumen od 40 µL uzorka pomiješa se s 4 mL otopine $ABTS^+$ radikala u tamnoj epruveti te se izmjeri apsorbancija na 734 nm nakon točno 6 minuta. Prije mjerenja uzoraka potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se, umjesto uzorka, 40 µL vode pomiješa s istom količinom reagensa.

Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA, koja se koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Jednadžba baždarne krivulje:

$$y = 0{,}303x + 0{,}0006 \qquad [5]$$

gdje su:

x –koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol /L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol/L), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom provedeno je u dvije paralelene probe (n = 2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mmol Troloxa/g čestica.

3.2.5.2. DPPH metoda

Princip metode:

Ova metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, koja je praćena kolorimetrijskom

reakcijom. DPPH radikal radi nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). U prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji gasi slobodne radikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje otopine u žutu, što se prati mjerenjem apsorbancije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995).

$$DPPH^{\bullet} + AH \rightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$

$$DPPH^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow DPPH\text{-}R$$

Postupak rada:

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U tamnu epruvetu se otpipetira 100 µL uzorka i doda 3,9 mL otopine DPPH te se nakon 30 minuta po dodatku otopine DPPH mjeri apsorbancija pri 515 nm. U drugu epruvetu, koja predstavlja slijepu probu, umjesto uzorka doda se 100 µL metanola.

Oduzimanjem izmjerene apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA, koja se prema jednadžbi baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a preračunava u koncentraciju (mmol Trolox-a).

Jednadžba baždarne krivulje:

$$y = 0{,}603x - 0{,}006 \qquad [6]$$

gdje su:

x – koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol /L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol/L), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom provedeno je u dvije paralelene probe (n = 2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mmol Troloxa/g čestica.

3.2.6. Određivanje udjela topljivih polisaharida

Princip metode:

Ova metoda primjenjuje se za određivanje udjela topljivih polisaharida, a temelji se na ekstrakciji polisaharida iz uzorka vodom te precipitaciji etanolom, nakon čega se otapalo uklanja te određuje ostatak (masa) polisaharida zaostao nakon uparavanja. Metoda ekstrakcije može se modificirati ovisno o strukturi i topljivosti polisaharida, ali osnovno pravilo je razbiti staničnu stijenku od vanjskog do unutarnjeg dijela različitim uvjetima ekstrakcije (pH i temperatura) (Wei i sur., 2008).

Postupak rada:

U tikvicu s okruglim dnom izvaže se 2,5 g uzorka te se doda 50 mL destilirane vode. Tako dobivena smjesa zagrijava se u vodenoj kupelji na temperaturi vrenja 2h, uz povremeno miješanje. Nakon centrifugiranja, supernatant se koncentrira uparavanjem na rotacijskom vakuum uparivaču do nekoliko mL. Nakon toga polisaharidi se precipitiraju iz uparenog ekstrakta dodatkom dvostrukog volumena 96 %-tnog etanola te se odvoje od taloga nakon centrifugiranja. Precipitat se zatim otopi u destiliranoj vodi i upari pod vakuumom do suhog te se do konstantne mase suši u sušioniku na 60°C i izvaže.

Udjeli topljivih polisaharida (%) određeni su prema sljedećoj jednadžbi:

$$\%\ \text{polisaharida} = ((m_2 - m_1)/m) * 100 \qquad [7]$$

gdje su:

m – masa uzorka (g)

m_1 – masa prazne tikvice (g)

m_2 – masa tikvice i uzorka nakon sušenja (g)

Određivanje udjela topljivih polisaharida u uzorcima rogača i maka provedeno je u dvije paralelne probe (n = 2), a rezultati su izračunati kao srednje vrijednosti u % s pripadajućim standarnim devijacijama.

3.2.7. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta đumbira

Za dobivanje sustava nosača na bazi alginata korištena je 4%-tna (w/v) otopina alginata niske viskoznosti. Pripremljena su tri različita sustava, pri čemu se alginat kombinirao s izolatima proteina sirutke i zeinom.
Time su formirani sljedeći sustavi:

- Čisti alginat: A (4%)
- Alginat + izolati proteina sirutke: A-IPS (80:20, w/w)
- Alginat + zein: A-Z (80:20, w/w)

Otopine nosača pripremljene su otapanjem natrijevog alginata te izolata proteina sirutke, odnosno zeina, u prethodno pripremljenom ekstraktu đumbira (w/v), te su pomiješane u odgovarajućem masenom omjeru. Otopine sustava nosača otapane su na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi tijekom 24 h, nakon čega su korištene u daljnim analizama.

Za ionsko geliranje alginata u ovom radu koristila se 3%-tna (w/v) otopina kalcijevog klorida ($CaCl_2$) pripremljena u ekstraktu đumbira. Za formiranje alginatnih hidrogel čestica korišten je postupak ukapavanja na način da je 5 mL pripremljene otopine nosača u ekstraktu đumbira prebačeno u plastičnu špricu i istiskivano kroz iglu (23 G (0,6x30 mm) za sustave A i A-IPS i 20 G (0,9x40 mm) za A-Z) u prethodno pripremljenu 3%-tnu otopinu kalcijevog klorida. Tijekom postupka inkapsulacije, otopine gelirajućeg medija miješane su na magnetskoj miješalici, pri čemu su se formirale čestice sferičnog oblika. Nakon formiranja, čestice su miješane u otopini za geliranje 30 min, nakon čega su izdvojene iz otopine kalcijevog klorida, isprane ekstraktom đumbira te spremljene u ekstrakt na +4 °C do daljnjih analiza. Kao kontrolne čestice napravljeni su prethodno opisani sustavi nosača na bazi alginata, koji su umjesto polifenolnog ekstrakta đumbira sadržavali destiliranu vodu.

3.2.8. Karakterizacija čestica

3.2.8.1. Određivanje udjela vode

Princip metode:

Ovim postupkom mjeri se masa suhe tvari nakon sušenja do konstantne mase budući da na temperaturi sušenja od 105°C dolazi do izdvajanja slobodne vlage iz uzorka. Udio suhe tvari izračunava se u odnosu na početnu masu uzorka koji se suši.

Postupak rada:

U prethodno osušene, ohlađene i izvagane aluminijske posudice s kvarcnim pijeskom i poklopcem, odvaže se 1 g hidrogel čestica (± 0,0001 g). Uzorak se u otklopljenim posudicama suši oko 3 sata pri 105 °C u sušioniku s automatskim temperaturnim regulatorom. Kada je sušenje završeno, posudice se poklope u sušioniku i prenesu u eksikator, gdje se hlade na sobnoj temperaturi te ohlađene važu na analitičkoj vagi. Postupak se ponavlja dok se ne postigne konstantna masa uzorka u posudici (± 0,0003 g). Udjel vode u uzorcima izračuna se iz gubitka mase prema formuli:

$$\text{udjel vode (\%)} = (a-b) \bullet 100 / m$$

$$\text{udjel suhe tvari (\%)} = 100 - \text{udjel vode (\%)}$$

Gdje su: a – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)
b – masa posudice s uzorkom poslije sušenja (g)
m – masa uzorka (g)

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

3.2.8.2. Određivanje fizikalnih i morfoloških karakteristika formuliranih čestica

Veličina alginatnih čestica određena je snimanjem čestica (n=10) digitalnim fotoaparatom na Dino-Lite kalibracijskoj pločici (min. razmak = 0,2 mm), iz čega je određena veličina čestica. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost 10 mjerenja.

Analiza teksture provedena je na TA.HDPlus analizatoru teksture (Stable Micro Systems, Velika Britanija) opremljenom s 5 kg utegom. Analize su provedene na sobnoj temperaturi, na 3 različite čestice svakog sustava. Kako bi se postigao maksimalni omjer kompresije i smicanja, za probijanje uzoraka korištena je cilindrična čelična sonda P/2 (Stable Micro Systems, Velika Britanija) s ravnim dnom, uz brzinu prodiranja od 0,5 mm/s. Dobiveni dijagrami obrađeni su u Texture Exponent programu (Stable Mirco Systems, Velika Britanija), nakon čega su izračunate vrijednosti za ispitivani parametar teksture (tvrdoća). Tvrdoća uzorka izražena je kroz maksimalnu silu (N) potrebnu za kompresiju uzorka.

Morfološke karakteristike, s ciljem određivanja oblika i strukture dobivenih hidrogel čestica, ispitane su snimanjem čestica mikroskopom uz odgovarajuće povećanje.

3.2.8.3. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta

Udjel ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina, kao i antioksidacijski kapacitet, u česticama na bazi alginata, određen je otapanjem poznate količine profiltriranih čestica u 2%-tnoj otopini natrijevog citrata (w/v), uz snažno miješanje na Vortex mikseru.

Udjel ukupnih polifenola u otopini razbijenih čestica određen je primjenom Folin-Ciocalteau reagensa (opisano u poglavlju 3.2.1.), udjel hidroksicimetnih kiselina određen je u reakciji s Arnow-im reagensom (opisano u poglavlju 3.2.3.), dok je određivanje antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS i DPPH metode opisano u poglavljima 3.2.5.1. i 3.2.5.2. Postotak inkapsulacije polifenolnih spojeva i zadržanog antioksidacijskog kapaciteta izračunat je kao omjer udjela ukupnih polifenola ili hidroksicimetnih kiselina i antioksidacijskog kapaciteta u otopini citrata razbijenih čestica i udjela istih u početnim otopinama sustava nosača u ekstraktu maslačka korištenim za inkapsulaciju.

3.2.8.4. Praćenje otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima

Otpuštanje polifenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta iz dobivenih čestica u simuliranim gastričnim (SGF) i intestinalnim (SIF) uvjetima praćeno je određivanjem udjela ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina te određivanjem antioksidacijskog kapaciteta ABTS i DPPH metodom. Simulirane gastrična i intestinalna otopina pripremljene su prema protokolu

europske farmakopeje (European Pharmacopeia 7.0, 2010), no, bez odgovarajućih enzima (pepsina i pankreatina). SGF se sastojao od natrijevog klorida i klorovodične kiseline (pH=1,2), dok je SIF odgovarao fosfatnom puferu (pH= 7,4). Formulirane čestice izdvoje se iz otopine za geliranje te se približno 0,6 g profiltriranih čestica suspendira u 30 mL SGF-a. Čestice u SGF-u konstatno su miješane na magnetskoj mješalici (podešenoj na 100 rpm), na temperaturi od 37°C. U određenim vremenskim razmacima iz otopine se izuzima 2 mL tekućeg medija do posljednjeg uzorkovanja nakon 2 h te se nakon svakog izuzimanja u otopinu s česticama doda alikvot od 2 mL SGF-a. Čestice se zatim uklone iz otopine SGF-a filtriranjem i prenesu u 30 mL SIF-a (37°C) te konstantno miješaju na magnetskoj mješalici. Postupak uzorkovanja alikvota tekućeg medija u određenim vremenskim razmacima se ponavlja prema prethodno opisanom načinu. U ovako dobivenim alikvotima od 2 mL određuje se udjel ukupnih polifenola, hidroksicimetnih kiselina i antioksidacijski kapacitet, a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne ili kafeinske kiseline/g čestica ili mmol Trolox-a/g čestica. Pomoću dobivenih rezultata određuje se kinetika otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz ispitivanih sustava nosača.

3.2.8.5. Praćenje povećanja mase liofiliziranih čestica

Omjer povećanja mase nastale usred vezanja vode (bubrenja) u liofiliziranim česticama praćen je provođenjem *Swelling* metode. 0,05 g liofiliziranih čestica preliveno je s 20 mL destilirane vode te miješano na magnetskoj mješalici pri sobnoj temperaturi. U određenim vremenskim intervalima (na početku, nakon 30 minuta, 1, 2, 4 i 6 sata) izmjerena je masa čestica. Čestice su vagane na analitičkoj vagi nakon što su uklonjene iz tekućeg medija, profiltrirane pomoću lijevka i filter papira te posušene staničevinom.
Rezultati su prikazani kao omjer početne mase čestica i mase čestica nakon vezanja vode u određenom vremenskom periodu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitan je utjecaj dodatka izolata proteina sirutke i zeina u alginatni sustav nosača na učinkovitost inkapsulacije polifenola đumbira te otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima. U tu svrhu određen je udjel ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida, hidroksicimetnih kiselina, flavan-3-ola i topljivih vlakana u ekstraktu đumbira te njegov antioksidacijski kapacitet. Nakon provedene inkapsulacije provedena je karakterizacija čestica koja je uključivala ispitivanje njihovih fizikalno-kemijskih karakteristika (veličina, tvrdoća, elastičnost, udjel vode), njihove morfološke karakteristike te na kraju učinkovitost inkapsulacije polifenola i otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta.

4.1. Određivanje fitokemijskog profila đumbira (*Zingiber officinale*)

Tablica 2. Polifenolni sastav, antioksidacijski kapacitet i udjel topljivih polisaharida đumbira (*Zingiber officinale*)

ĐUMBIR (*Zingiber officinale*)	
Polifenolni sastav	
Ukupni polifenoli (mg EGK/g)	7,46±0,30
Ukupni flavonoidi (mg EGK/g)	3,45±0,05
Hidroksicimetne kiseline (mg kafeinske k./g)	2,94±0,12
Flavan-3-oli (mg (+)-katehina/g)	0,57±0,01
Antioksidacijski kapacitet	
ABTS (mmol Trolox-a/g)	0,05±0,00
DPPH (mmol Trolox-a/g)	0,03±0,00
Vlakna	
Topljivi polisaharidi (%)	10,57±0,15

U tablici 2. prikazan je bioaktivni profil određen u vodenom ekstraktu đumbira i udjel topljivih polisaharida đumbira. Udjel ukupnih polifenola iznosio je 7,46±0,30 mg EGK/g, što je u skladu s rezultatima koje su za etanolni ekstrakt đumbira odredili Adel i Parkash (2010). Udjel flavonoida u ovom radu iznosio je 3,45±0,05 mg EGK/g, što čini 46 % udjela ukupnih polifenola

određenih u dobivenom ekstraktu đumbira. To je približno jednako vrijednosti od 3,66± 0,45 mg EGK/g, koju su u metanolnom ekstraktu đumbira izmjerili Ghasemzadeg i suradnici (2010). Udjel hidroksicimetnih kiselina u ekstraktu iznosio je 2,94±0,12 mg kafeinske kiseline/g, dok je udjel flavan-3-ola određen vanillin metodom iznosio 0,57±0,01 mg (+)-katehina(g.

Antioksidacijski kapacitet đumbira, određen ABTS metodom, iznosio je 0,05±0,00 mmol Trolox-a/g, dok su Adel i Prakash (2010) izmjerili veći kapacitet koji je iznosio 0,09±0,00 mmol Trolox-a/g. Rezultati dobiveni DPPH metodom pokazali su nešto niži antioksidacijski kapacitet od 0,03±0,00 mmol Trolox-a/g.

Udjel topljivih polisaharida đumbira iznosio je 10,57±0,15 % mase đumbira što je u skladu s 12,82 % koliko su topljivih polisaharida u đumbiru odredili Qin i suradnici (2010).

4.2. Karakterizacija hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom đumbira pripremljenih s različitim sustavima nosača na bazi alginata

4.2.1. Fizikalno-kemijske karakteristike formuliranih čestica

Tablica 3. Veličina, parametri teksture i udjel vode hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom đumbira

Sustav nosača	Veličina (mm)	Tvrdoća (N)	Elastičnost (mm)	Udjel vode (%)
A	2,38±0,13	0,21±0,00	0,31±0,01	92,08±0,02
A-IPS	1,98±0,13	0,16±0,01	0,28±0,00	91,76±0,03
A-Z	2,70±0,09	0,17±0,00	0,29±0,00	90,61±0,05

U tablici 3. prikazane su fizikalno-kemijske karakteristike čestica pripremljenih s različitim sustavima nosača na bazi alginata. Čestice s nosačem od čistog alginata imale su prosječnu veličinu od 2,38±0,13 mm. Iz tablice je vidljivo da je dodatak izolata proteina sirutke u sustav alginatnog nosača rezultirao česticama manje veličine (1,98±0,13 mm), dok je dodatak zeina uzrokova povećanje čestica (2,70±0,09 mm). Slična korelacija može se zamijetiti i u radu Bušić i suradnika (2016) gdje su autori metodom ionskog geliranja inkapsulirali polifenolne spojeve iz gljive *Ganoderma lucidum* koristeći iste sustave nosača na bazi alginata, pri čemu su čestice s

dodatkom zeina također bile najveće, dok su najmanje bile čestice s dodanim izolatima proteina sirutke.

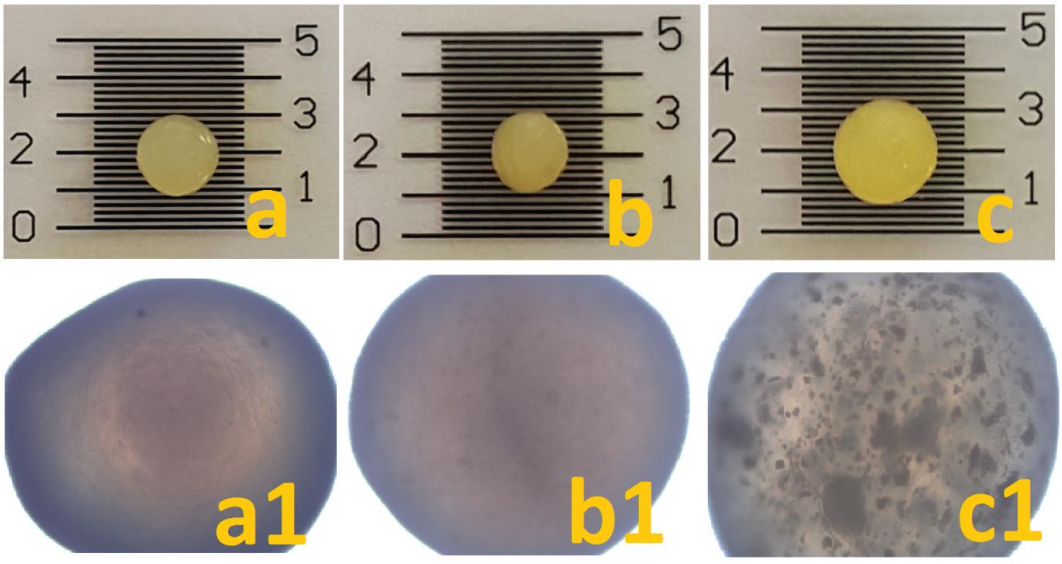
Što se tvrdoće tiče, čestice na bazi čistog alginata (A) imale su najveću tvrdoću od 0,21 N (Tablica 3). Dodatak proteina u alginatni gel rezultirao je smanjenjem tvrdoće hidrogel čestica, a vrsta proteina neznatno je utjecala na same vrijednosti tvrdoće (0,16 N za A-IPS i 0,17 N za A-Z). U istraživanju Bušić i suradnika (2016) čestice s čistim alginatom također su imale najveću vrijednost tvrdoće, dok su i ovdje čestice pripremljene s proteinima bile mekše.

Nadalje, kod ispitivanja parametra elastičnosti čestica, najelastičnije su se pokazale čestice pripremljene samo s alginatom (0,31 mm), dok je dodatak proteina uzrokovao smanjenje elastičnosti, no, neznatno budući da je elastičnost svih čestica bila približno jednaka (tablica 3).

Iz rezultata je također vidljivo da su najmanje čestice bile najmekše, ali su bile i najmanje elastične (A-IPS).

Kod određivanja udjela vode, dodatkom proteina u sustav alginatnog nosača udjel vode se smanjio sa 92,08±0,02% za sustav od čistog alginata na 91,76±0,03 % za sustav s dodanim izolatom proteina sirutke, dok je dodatkom zeina udjel vode bio još niži i iznosio je 90,61±0,05%.

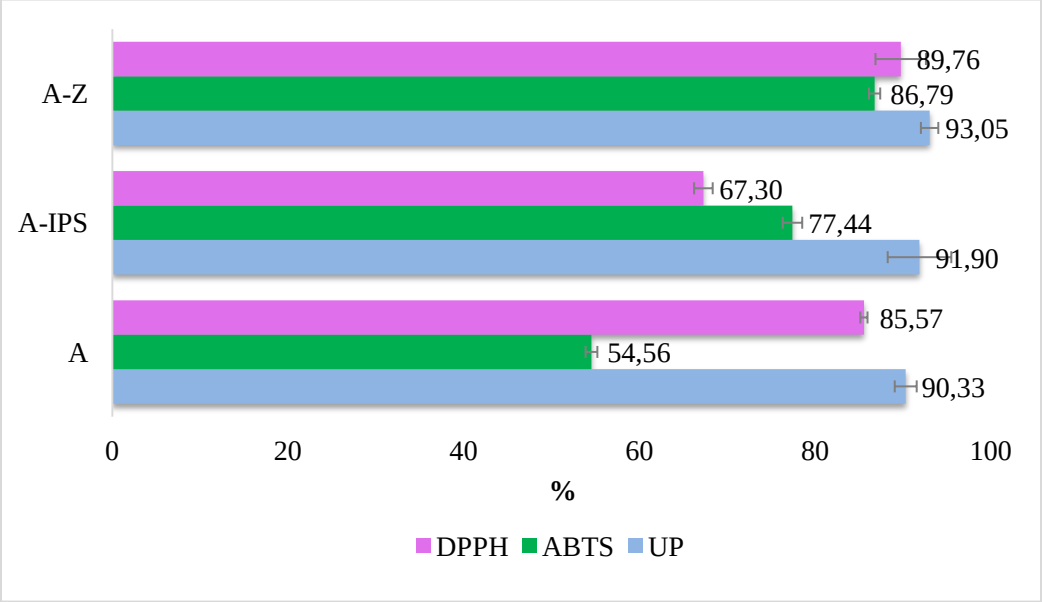
4.2.2. Morfološke karakteristike formuliranih čestica



Slika 7. Fotografije čestica s inkapsuliranim ekstraktom đumbira na kalibracijskoj pločici (a-c) s pripadajućim mikroskopskim slikama (a1-c1) za sustave nosača a) A b) A-IPS i c) A-Z

Na slici 7. prikazane su odabrane čestice na kalibracijskim pločicama za određivanje veličine čestica i njihove pripadajuće mikroskopske slike. Dodatak proteina u sustav nosača na bazi alginata nije značajno uzrokovao promjenu oblika budući da su čestice sa svim sustavima nosača zadržale pretežito sferičan oblik. Najsferičnije su se pokazale čestice A i A-IPS, gdje je sustav A-IPS pokazao veću sferičnost i pravilniji izgled, dok je dodatak zeina rezultirao izduženijim oblikom čestica. Mikroskopske slike pokazuju da je tekstura čestica s nosačima A i A-IPS pretežito homogena, dok se kod čestica s nosačem A-Z može vidjeti teksturalna heterogenost najvjerojatnije uzrokovana fizikalno-kemijskim svojstvima korištenog zeina.

4.2.3. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta



Slika 8. Učinkovitost inkapsulacije (%) ukupnih polifenola (UP) i učinkovitost zadržavanja (%) antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS i DPPH metode u formuliranim česticama s inkapsuliranim ekstraktom đumbira

Na slici 8. prikazana je učinkovitost inkapsulacije polifenola i učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta u hidrogel česticama s inkapsuliranim polifenolima đumbira. Sva tri sustava pokazala su izvrsnu učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola budući da je stupanj inkapsulacije polifenola bio preko 90 %. Dodatak proteina u alginatni nosač povećao je

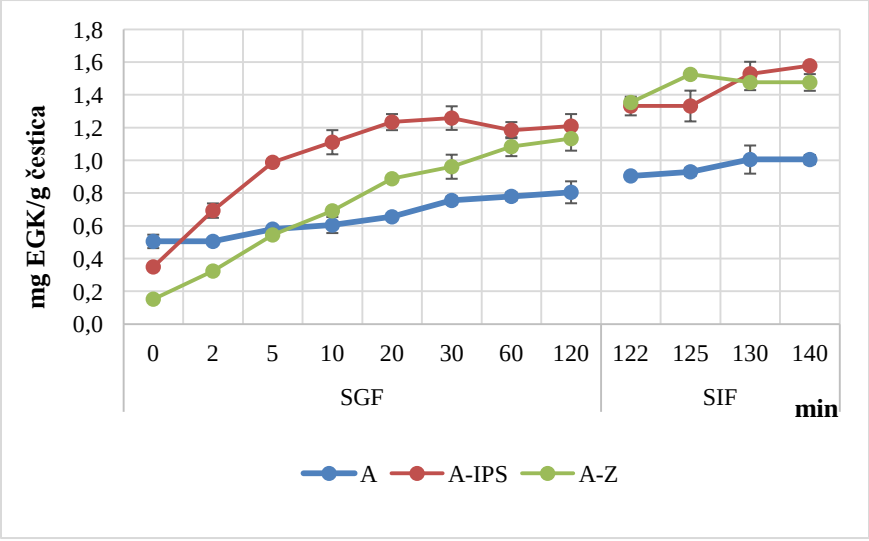
učinkovitost inkapsulacije polifenola, gdje se dodatak zeina pokazao najučinkovitijim (93,05 %), praćen sustavima A-IPS (91,90 %) > A (90,33 %).

U radu Bušić i suradnika (2016) učinkovitost inkapsulacije polifenola iz gljive *Ganoderma lucidum* bila je nešto niža (oko 80 %), što se može pripisati prirodi biljne vrste koja se koristila za inkapsulaciju i njenom slabijem afinitetu prema sustavima nosača što je rezultiralo nižim stupnjem inkapsulacije polifenola.

Učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta u hidrogel česticama s polifenolima đumbira ispitana je ABTS i DPPH metodama. ABTS metoda pokazala je niže zadržavanje antioksidacijskog kapaciteta od 54,56 % kod nosača pripremljenog s čistim alginatom, dok su binarni sustavi s proteinima pokazali učinkovitije zadržavanje antioksidacijskog kapaciteta, s 77,44 % za A-IPS i 86,79 % za A-Z. U radu Bušić i suradnika (2016) stupanj zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS metode iznosio je oko 60-65 % prilikom inkapsulacije polifenola gljive u sustave nosača na bazi alginata.

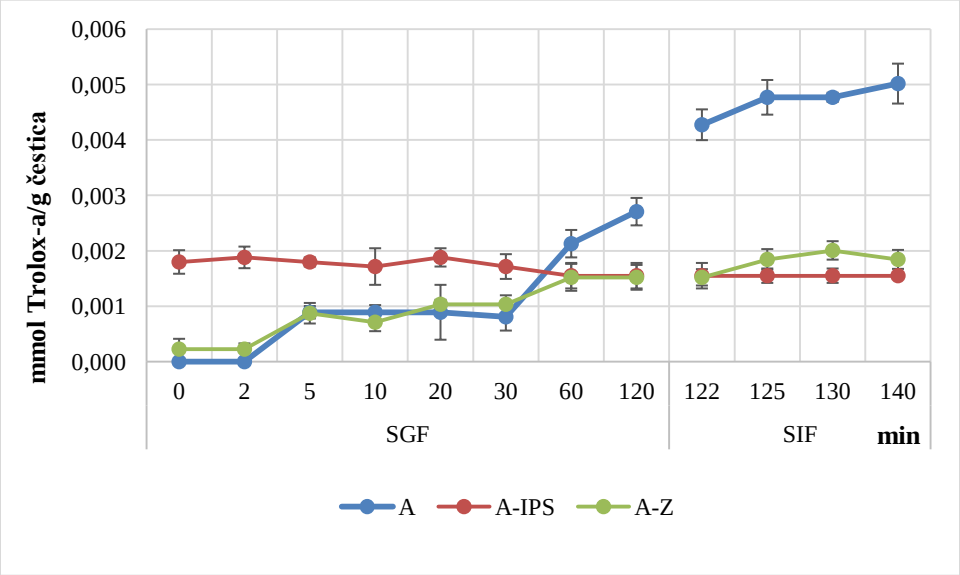
DPPH metodom utvrđeno je da su sustavi nosača od čistog alginata te alginata s dodanim ,zeinom imali slično zadržavanje antioksidacijskog kapaciteta (oko 85 %) dok je dodatak proteina sirutke uzrokovao znatno niže zadržavanje od 67,30 %.

4.2.4. Praćenje otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz formuliranih hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom đumbira u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima



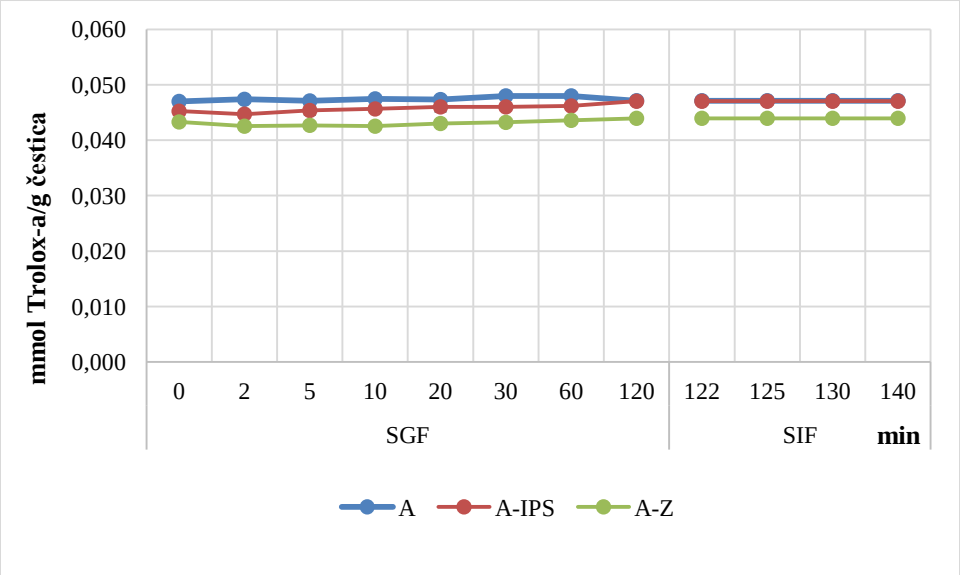
Slika 9. Profil otpuštanja ukupnih polifenola (mg EGK/g čestica) iz formuliranih čestica s inkapsuliranim ekstraktom đumbira u SGF i SIF fluidima

Budući da se polifenoli izrazito brzo razgrađuju u probavnom sustavu te se time smanjuje njihova bioraspoloživost, inkapsulacijom se pokušalo omogućiti njihovo sporije i dugotrajnije otpuštanje iz čestica. Na slici 9. prikazan je profil otpuštanja ukupnih polifenola iz alginatnih hidrogel čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima, pri 37 °C. Iz čestica s nosačem od čistog alginata u SGF-u polifenoli su se kontinuirano otpuštali do 30-te minute nakon čega je nastupio period stacionarnog stanja, a nakon prebacivanja u SIF kontinuirano otpuštanje polifenola nastavilo se do 130-te minute, pri čemu se ukupno otpustilo 1 mg EGK/g čestica. Dodatak izolata proteina sirutke u nosač uzrokovao je kontinuirano otpuštanje polifenola do 30-te minute u gastričnom fluidu, a u SIF-u, stacionarno stanje se nastavilo još 5 minuta nakon čega je opet počelo otuštanje do 140-te minute s ukupno otpuštenih 1,6 mg EGK/g čestica. Najpogodniji se pokazao sustav nosača alginata sa zeinom budući da je pokazao kontinuirano otpuštanje polifenola iz čestica kroz svih 125 minuta, s ukupnom količinom ispuštenih polifenola od 1,5 mg EGK/g čestica. Rad Bušić i suradnika (2016) također je pokazao da dodatak proteina u alginatni nosač povoljno utječe na kontinuirano i produženo otpuštanje imobiliziranih polifenola iz čestica.



Slika 10. Profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox-a/g čestica) primjenom ABTS metode iz formuliranih čestica s inkapsuliranim ekstraktom đumbira u SGF i SIF fluidima

Na slici 10. prikazan je profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS metode. Antioksidacijski kapacitet se kod sustava A otpuštao u SGF-u do 5-te minute, nakon čega se prestao otpuštati sve do 30-te minute, da bi se opet od 60-te minute u SGF-u pa sve do 140-te minute u SIF-u nastavio kontinuirano otpuštati (0,005 mmol Trolox/g čestica). Sličan trend bio je vidljiv i nakon dodatka zeina, gdje je otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta zabilježeno do 130-te minute. Kod nosača s izolatima proteina sirutke većina se antioksidacijkog kapaciteta otpustila u prve 2. minute. U radu Bušić i suradnika (2016) upravo taj sustav pokazao se kao najpogodniji, budući da je otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta bilo kontinuirano kroz 140 minuta.



Slika 11. Profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox-a/g čestica) primjenom DPPH metode iz formuliranih hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom đumbira u SGF i SIF fluidima

Profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta primjenom DPPH metode prikazan je na slici 11. Na slici je vidljivo da je kod svih ispitivanih nosača većina antioksidacijskog kapaciteta otpuštena u prvih nekoliko minuta u SGF-u, nakon čega je do otpuštanje do kraja analize ostalo konstantno, što je bio slučaj i u radu Bušić i suradnika (2016).

4.2.5. Praćenje povećanja mase liofiliziranih čestica Swelling metodom

Tablica 4. Omjer povećanja mase nastale uslijed bubrenja (vezanja vode) u liofiliziranim česticama s inkapsuliranim ekstraktom đumbira

Sustav nosača	SR_{30min}	SR_{1h}	SR_{2h}	SR_{4h}	SR_{6h}	SR_{24h}
A	3,818±0,184	3,840±0,186	4,023±0,271	4,113±0,295	4,101±0,176	5,051±0,389
A-IPS	4,145±0,155	4,168±0,095	4,230±0,093	4,261±0,022	4,353±0,101	5,083±0,000
A-Z	4,030±0,038	4,182±0,056	4,459±0,106	4,613±0,220	4,538±0,448	5,503±0,096

*SR – Swelling ratio, omjer bubrenja mase

U tablici 4. prikazan je omjer povećanja mase nastale usred bubrenja liofiliziranih čestica u vodi. Dodatak proteina u alginatni nosač uzrokovao je brže bubrenje čestica i vezanje veće količine vode, budući da su najviše vode vezale čestice pripremljene s alginatom i zeinom, čiji je omjer povećanja mase nakon 24 sata iznosio 5,503, te čestice A-IPS (SR_{24h} = 5,083). Kod svih sustava, uz neznatne fluktuacije, vidljivo je kontinuirano povećanje omjera bubrenja mase tijekom vremena.

5. ZAKLJUČCI

1. Udjel polifenola u đumbiru iznosio je 7,46±0,30 mg EGK/g, od čega 46% čine ukupni flavonoidi. U đumbiru je određen i značajan udjel topljivih polisaharida s udjelom od 10,57±0,15%.

2. Dodatak izolata proteina sirutke u alginatni sustav nosača za inkapsulaciju polifenola đumbira rezultirao je formiranjem manjih čestica, dok su dodatkom zeina nastale veće čestice. Dodatak obje vrste proteina u alginatni sustav nosača rezultirao je formiranjem čestica manje tvrdoće i niže elastičnosti.

3. Dodatak proteina u alginatni sustav rezultirao je većim stupnjem inkapsulacije ukupnih polifenola đumbira i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta, pri čemu se zein pokazao učinkovitijim dodatkom.

4. Dodatak proteina u alginatni sustav nosača usporio je otpuštanje polifenola iz čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima, čime se potencijalno povećava njihova bioraspoloživost.

5. Kao najefikasniji sustav nosača pokazao se alginat u kombinaciji sa zeinom, budući da je omogućio najbolju imobilizaciju polifenola te učinkovitije zadržavanje antioksidacijskog kapaciteta, kao i kontinuirano otpuštanje polifenola u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima kroz svih 140 minuta analize.

6. Zein je pokazao velik potencijal kao nosač za inkapsulaciju polifenolnih spojeva, no, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se omogućila njegova veća primjena u te svrhe.

6. LITERATURA

Alam P. (2013) Densitometric HPTLC analysis of 8-gingerol in *Zingiber officinale* extract and ginger-containing dietary supplements, teas and commercial creams. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **3**: 634 - 638.

Ali B. H., Blunden G., Tanira M. O., Nemmar A. (2008) Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger *(Zingiber officinale Roscoe*): a review of recent research. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 409 - 420.

Adel P. S., Prakash J. (2010) Chemical composition and antioxidant properties of ginger root (*Zingiber officinale*). *Journal of Medicinal Plants Research* **4(24):** 2674 - 2679.

Arroyo-Maya I. J., McClements D. J. (2015). Biopolymer nanoparticles as potential delivery systems for anthocyanins: Fabrication and properties. *Food Research International* **69*:*** 1 - 8.

Astley S. B. (2003) Dietary antioxidants past, present and future. *Trends Food Science & Technology* **14**: 93 - 98.

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

Beaulieu L., Savoie L., Paquin P., Subirade M. (2002) Elaboration and characterization of whey protein beads by an emulsification/cold gelation process: application for the protection of retinol *Biomacromolecules* **3:** 239 - 248.

Belščak-Cvitanović A., Bušić A., Barišić L., Vrsaljko D., Karlović S., Špoljarić I., Vojvodić A., Mršić G., Komes D. (2016) Emulsion template microencapsulation of dandelion (*Taraxacum officinale L.)* polyphenols and β-carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin. *Food hydrocolloids* **57:** 139 - 152.

Belščak-Cvitanović A., Đorđević V., Karlović S., Pavlović V., Komes D., Ježek D., Bugarski B., Nedović V. (2015) Protein-reinforced and chitosan-pectin coated alginate microparticles for delivery of flavan-3-ol antioxidants and caffeine from green tea extract. *Food hydrocolloids* **51:** 361 - 374.

Berendsen R., Guell C., Ferrando M. (2015b). Spray dried double emulsions containing procyanidin-rich extracts produced by premix membrane emulsification: Effect of interfacial composition. *Food Chemistry* **178:** 251 - 258.

Betz M., Steiner B., Schantz M., Oidtmann J., Mader K., Richling E., Kulozik U. (2012). Antioxidant capacity of bilberry extract microencapsulated in whey protein hydrogels. *Food Research International* **47(1):** 51 - 57.

Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **28**: 25 - 30.

Bušić A., Belščak-Cvitanović A., Wang Y., Vojvodić A., Karlović S., Špoljarić I., Mršić G., Veršec P., Vučilovski J., Komes D. (2016) Application of whey protein isolates and zein for the formulation of alginate-based delivery system encapsulating *Ganoderma lucidum* polyphenols. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **8(2):** 99 - 106.

Chen L., Subirade M. (2006) Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials* **27:** 4646 - 4654.

Demin G., Yingying Z. (2010) Comparative antibacterial activities of crude polysaccharides and flavonoids from *Zingiber officinale* and their extraction. *American Journal of Tropical Medicine* **5**: 235 - 238.

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

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

Diaz-Bandera D., Villanueva-Carvajal A., Dublan-Garcia O., Quintero-Salazar B., Dominguez-Lopez A. (2013). Release kinetics of antioxidant compounds from Hibiscus sabdariffa L. encapsulated in gelatin beads and coated with sodium alginate. *International Journal of Food Science and Technology* **48(10):** 2150 - 2158.

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

Dugasani S., Pichika M. R., Nadarajah V. D., Balijepalli M. K., Tandra S., Korlakuntab J. N. (2009). Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol,[8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *Journal of Ethnopharmacology* **127**: 515 - 520.

Dziezak J. D. (1998). Microencapsulation and encapsulated food ingredients. *Food Technology* **42:** 136 - 151.

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

Flores F. P., Singh R. K., Kerr W. L., Phillips D. R., Kong F. B. (2015). In vitro release properties of encapsulated blueberry (*Vaccinium ashei*) extracts. *Food Chemistry* **168**: 225 - 232.

Ghasemzadeh A., Jaafar H. Z. E., Rahmat A., (2010) Antioxidant Activities, Total Phenolics and Flavonoids in Two Varieties of Malaysia Young Ginger. *Molecules* **15**: 4324 - 4333.

Gibbs B. F., Kermasha S., Alli I., Mulligan C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **50:** 213 - 224.

Grzanna R., Lindmark L., Frondoza C. G. (2005) Ginger - an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. *Journal of Medicinal Food* **8**: 125 - 132.

Heidebach T., Forst P., Kulozik U. (2012). Microencapsulation of probiotic cells for food application. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **52**: 291 - 311.

Holtmann S., Clarke A. H., Scherer H., Hohn M. (1989) The antimotion sickness mechanism of ginger. A comparative study with placebo and dimenhydrinate. *Acta Oto-Laryngologica* **108**: 168 - 174.

Hurtado-Lopez P., Murdan S. (2006). Zein microspheres as drug/antigen carriers: a study of their degradation and erosion, in the presence and absence of enzymes. *Journal of Microencapsulation* **23(3):** 303 - 314.

Iyer C., Phillips M., Kailasapathy K. (2005). Release studies of Lactobacillus casei strain Shirota from chitosan-coated alginate–starch microcapsules in ex vivo porcine gastrointestinal contents. *Letters in Applied Microbiology* **41**: 493 - 497.

Kailasapathy K. (2002) Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology* **3:** 39 - 48.
Kikuzaki H., Kawasaki Y., Nakatani N. (1994). Structure of antioxidative compounds in ginger. *Food phytochemicals for cancer prevention* **47:** 237 - 243.

Kosaraju S. L. (2005). Colon targeted delivery systems: review of polysaccharides for encapsulation and delivery. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **5:** 251 - 258.

Leick S., Kemper A., Rehage H. (2011). Alginate/poly-L-lysine capsules: mechanical properties and drug release characteristics. *Soft Matter* **7(14):** 6684 - 6694.

Li Y., Lim L. T., Kakuda Y. (2009). Electrospun Zein Fibers as Carriers to Stabilize (-)-Epigallocatechin Gallate. *Journal of Food Science* **74(3**): 233 - 240.

Liu Y., Wei S. L., Liao M. C., Liu L., Huang Y. W. (2015). Self-assembly of glycinin nanoparticles for delivery of phenolic compounds from Phyllanthus urinaria. *Research Advances* **5(8):** 5533 - 5541.

Livney Y.D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **15**: 73 - 83.

Matalanis A., Jones O. G., McClements D. J. (2011) Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids* **25:** 1865 - 1880.

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

Mozafari M. R. (2006). Bioactive entrapment and targeting using nanocarrier technologies: an introduction. *Nanocarrier technologies: Frontiers of nanotherapy* **7:** 1-16.

Neo Y. P., Ray S., Jin J., Gizdavic-Nikolaidis M., Nieuwoudt M. K., Liu D. Y., Quek S. Y. (2013). Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein-gallic acid system. *Food Chemistry* **136(2):** 1013 - 1021.

Park K., Sharaby W. S. W., Park H. (1993) Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery. *Technomic Publishing, P. A. Lancaster* **6:** 99-140.

Parris N., Cooke P. H., Hicks K. B. (2005). Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**: 4788 - 4792.

Patel A. R., Bouwens E. C. B., Velikov K. P. (2010). Sodium caseinate stabilized zein colloidal particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 12497 - 12503.

Patil P., Chavanke D., Wagh M. (2012) A review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelispheres. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **4**: 27 - 32.

Prasad S., Tyagi A. K. (2015) Ginger and its constituents: role in prevention and treatment of gastrointestinal cancer. *Gastroenterology Research and Practice* **11**: 1 - 11.

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

Qin J., Miao J., Tang S. (2010) Study on the extraction of soluble dietary fiber in ginger and antioxidation. *China Food Additives* **6:** 51 – 58.

Racoviţă S., Vasiliu S., Popa M., Luca C. (2009) Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. *Revue Roumaine de Chimie* **54(9**): 709 - 718.

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

Rosenberg M., Lee S. J. (2004) Calcium-alginate coated, whey protein-based microspheres: preparation, some properties and opportunities*. Microencapsulation* **21**: 263 - 281.

Rubi Serrano-Cruz M., Villanueva-Carvajal A., Morales Rosales E. J., Ramirez Davila J. F., Dominguez-Lopez A. (2013). Controlled release and antioxidant activity of Roselle *(Hibiscus sabdariffa L.*) extract encapsulated in mixtures of carboxymethyl cellulose, whey protein, and pectin. *Food Science and Technology* **50(2**): 554 - 561.

Sasidharan I., Nirmala Menon I. (2010) Comparative chemical composition and antimicrobial activity fresh & dry ginger oils (Zigiber officinale roscoe). *International Journal of Current Pharmaceutical Research* **2**: 40 - 43.

Schrooyen P. M. M., van der Meer R., De Kruif C. G. (2001). Microencapsulation: its application in nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society* **60**: 475 - 479.

Schwertner H. A., Rios D. C. (2007) High-performance liquid chromatographic analysis of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, and 6-shogaol in ginger –containing dietary supplements, spices, teas, and beverages. *Journal of Chromatography* **56**: 41 - 47.

Shukla R., Cheryan M. (2001). Zein the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products* **13**: 171 - 192.

Shukla Y., Singh M. (2007) Cancer preventive properties of ginger: a brief review. *Food and Chemical Toxicology* **45**: 683 - 690

Singh M. N., Hemant K. S. Y., Ram M., Shivakumar H. G. (2010) Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Science* **5(2)**: 65 - 77.

Singleton V. L., Orthofer R., Lamela-Raventós R. M. (1999a) Flavanoids and other polyphenols. *Methods in Enzymology* **299**: 152.

Singleton V. L., Orthofer R., Lamela-Raventós R. M. (1999b) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means od Folin-Ciocalteau reagent. *Methods in Enzymology* **299:** 1179.

Singleton V. L., Rossi J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**: 144 - 158.

Tavares G. M., Croguennec T., Carvalho A. F., Bouhallab, S. (2014). Milk proteins as encapsulation devices and delivery vehicles: Applications and trends. *Trends in Food Science & Technology* **37(1):** 5 - 20.

Tabrez S., Priyadarshini M., Urooj M., Shakil S., Ashraf G. M., Khan M. S., Kamal M. A., Alam Q., Jabir N. R., Abuzenadah A. M. (2013) Cancer Chemoprevention by Polyphenols and Their Potential Application as Nanomedicine. *Science & Health* **31:** 67 - 98.

Vos de P., Fass M. M., Spasojevic M., Sikkema J., (2010) Encapsulation for preservation of unctionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal* **20:** 292 - 302.

Wang Y., Padua G.W. (2012) Nanoscale Characterization of Zein Self- Assembly. *Langmuir* **28(5):** 2429 - 2435.

Xue J., Tan C., Zhang X. M., Feng B., Xia S. Q. (2014). Fabrication of Epigallocatechin-3-gallate Nanocarrier Based on Glycosylated Casein: Stability and Interaction Mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62(20):** 4677 - 4684

Wei S., Helsper J. P. F. G., Van Griensven L. J. L. D. (2008) Phenolic compounds present in medicinal mushroom extracts generate reactive oxygen species in human cells *in vitro*. *International Journal of Medicinal Mushrooms* **10:** 1 - 13.

Yeh H., Chaung C., Chen H., Wan C., Chen T., Lin L. (2014) Bioactive components analysis of two various gingers *(Zingiber officinale Roscoe*) and antioxidant effect of ginger extracts. *Food Science and Technology* **55**: 329 - 334.

Zhang X., Iwaoka W. T., Huang A. S., Nakamoto S. T., Wong R. (1994). Gingerol decreases after processing and storage of ginger. *Journal of Food Science* **9**: 1338 - 1340.

Zhang Z., Wang X., Zhang J., Zhaoa M. (2011) Potential antioxidant activities in vitro of polysaccharides extracted from ginger (*Zingiber officinale*). *Carbohydrate Polymers* **86**: 448-452.

Zhang L. Y., Dudhani A., Lundin L., Kosaraju S. L. (2009). Macromolecular conjugate based particulates: Preparation, characterisation and evaluation of controlled release properties. *European Polymer Journal* **45(7):** 1960 - 1969.

Zheng W.; Wang S.Y. (2001) Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 5165 - 5170.

Zhong Q. X., Tian H. L., Zivanovic S. (2009). Encapsulation of fish oil in solid zein particles by liquid–liquid dispersion. *Journal of Food Processing and Preservation* **33**: 255 - 270.

Zou T., Li Z., Percival S. S., Bonard S., Gu L. (2012). Fabrication, characterization, and cytotoxicity evaluation of cranberry procyanidins-zein nanoparticles. *Food Hydrocolloids* **27(2):** 293 – 300.

Zou L. Q., Zheng B. J., Zhang R. J., Zhang Z. P., Liu W., Liu C. M., Xiao H., McClements D. J. (2016a). Enhancing the bioaccessibility of hydrophobic bioactive agents using mixed colloidal dispersions: Curcumin-loaded zein nanoparticles plus digestible lipid nanoparticles. *Food Research International* **81**: 74 - 82.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



ime i prezime studenta