

Sferifikacija u molekularnoj gastronomiji

Ivanović, Domagoj

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:566952>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-07**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Domagoj Ivanović

Student 3. godine Prijediplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

SFERIFIKACIJA U MOLEKULARNOJ GASTRONOMIJI

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Jana Pisk

Zagreb, 2023. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

14. srpnja 2023.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

22. rujna 2023.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Jana Pisk

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Osnove sferifikacije.....	1
<i>1.1.1. Nastanak i suvremena primjena.....</i>	<i>1</i>
<i>1.1.2. Struktura i formacija hidrogelnih čestica</i>	<i>1</i>
1.2. Fickov prvi zakon.....	4
1.3. Cilj rada	4
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	5
2.1. Proizvodne sferifikacijske metode	5
2.2. Metoda vanjske (konvencionalne) sferifikacije i utjecaj izvora kalcija na brzinu sferifikacije	6
2.3. Metoda unutarnje (reverzne) sferifikacije i utjecaj sekundarnog geliranja na svojstva hidrogelnih kuglica	8
2.4. Korištenje alginata za kapsuliranje u sferifikaciji i nastajanje kompozitnih gelova.....	13
<i>2.4.1. Polisaharidni i peptidni kompozitni gelovi</i>	<i>16</i>
2.5. Zaključak.....	18
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XIX

§ Sažetak

Sferifikacija je metoda koja se koristi u molekularnoj gastronomiji i temelji se na stvaranju gel-ovojnica oko tekuće jezgre. Postoje dvije osnovne vrste sferifikacije: konvencionalna (vanjska) i reverzna (unutarnja). Svaka ima svoje prednosti i mane te ovisno o željenim svojstvima konačnog produkta jedna može biti korisnija od druge. Zbog toga su u ovom radu proučene i predstavljene njihove osnovne karakteristike. Različite se tvari mogu koristiti za dobivanje gelova, a naročito zanimljivima pokazale su se soli alginata. One sa ionima dvovalentnih metala (poput Ca^{2+}) u ispravnim uvjetima tvore sferične strukture koje imaju svojstva gelova i mogu zarobiti tekućine u svojoj unutrašnjosti. Ovisno o metodi pripreme, korištenim proizvodnim tehnikama, uvjetima, odabiru dvovalentne soli i tvari koja će sačinjavati tekuću jezgru, nastale sferične strukture imaju različita fizikalno-kemijska svojstva koja mogu biti poželjna, ali i nepoželjna u molekularnoj gastronomiji te drugim granama znanosti i industrije. Široki spektar uvjeta koji utječu na pogodnost korištenja alginata u svrhu geliranja proučeni su i obrađeni u radu kako bi se sažeto predstavila problematika. Sferifikacija danas pronalazi široki interes i primjenu te se konstantno traže novi načini poboljšanja tehnike i korištenih materijala te ju je zato korisno i dalje izučavati.

§ 1. UVOD

1.1. Osnove sferifikacije

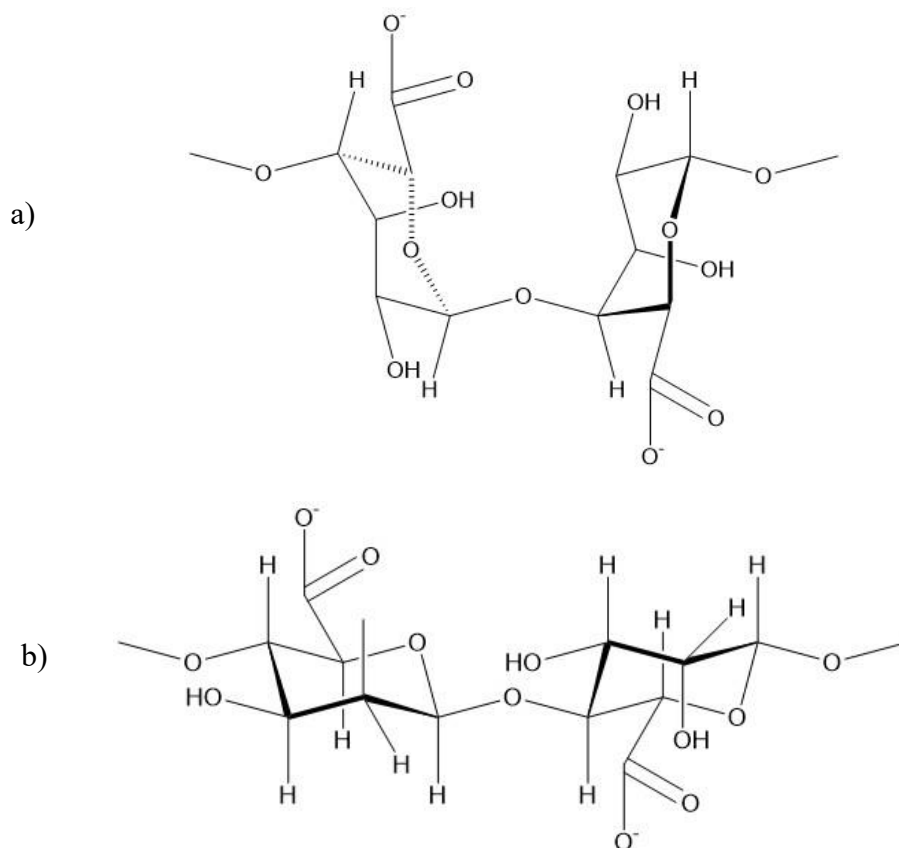
1.1.1. Nastanak i suvremena primjena

Sferifikaciju je kao metodu u molekularnoj gastronomiji 1946. godine primijenio britanski znanstvenik William J. S. Peschardt.¹ Od tada je pa sve do današnjice značajno unaprijeđena, a svoj je vrhunac dostigla 2003. godine kada je usavršena pod vodstvom šefa Ferrana Adriàe, u prestižnom restoranu modernog i avangardnog kulinarstva El Bulli², smještenog u španjolskom gradiću Roses. U osnovi je sferifikacijom cilj proizvesti milimetarske hidrogelne čestice, kapsule ili mikrokapsule od potpuno jestivih biopolimera kao što su proteini i polisaharidi. Tako dobivene gel-ovojnice u stanju su zarobiti tekućine u svojoj unutrašnjosti. Svoju primjenu pronalazi pretežito u prehrambenoj industriji, biotehnologiji, medicini, farmaciji te obradi otpada.¹ U samim počecima najviše se koristila za dobivanje imitacija prehrambenih proizvoda poput kavijara, njoki, ravijola ili jaja.² Danas se ljudi svakodnevno mogu susresti sa proizvodima koji su dobiveni sferifikacijom jer se ona već desetljećima koristi u restrukturiranju crvenih paprika koje ispunjavaju masline radi neutralizacije gorkog okusa.²

1.1.2. Strukutra i formacija hidrogelnih čestica

Mehanizam nastanka hidrogelnih čestica temeljen je na svojstvima gelirajućih tvari poput soli alginata da se vežu na koordinacijske centre kationa nekih metala. Alginati su soli uronskih kiselina koje se dobivaju iz smeđih algi ili bakterija poput *Pseudomonas aeruginosa*.³ Njihova je prehrambena prednost što su sigurni za korištenje, tj. nisu toksični, nemaju antigenska svojstva i biorazgradivi su. Alginati su građeni od lanaca čije podjedinice čine prstenovi β -D-manuronske kiseline i α -L-guluronske kiseline povezani 1–4 glikozidnom vezom. Njihove su strukture prikazane na slici 1. Udio pojedine kiseline u lancu varira i ovisi o vrsti alge iz koje se dobivaju soli alginata. Što ima više guluronskih podjedinica (G) struktura je gela rigidnija, a što ima više manuronskih podjedinica (M) struktura je fleksibilnija.³ Alginatni su gelovi viskoznoelastični što znači da posjeduju elastična i viskozna svojstva kada su izloženi stresu vanjske deformacije.² Jedno od istraženijih svojstava alginata jest njihova sposobnost da se poprečno vežu za koordinacijske centre dvovalentnih i trovalentnih iona. Svaki kation koji može tvoriti takvu vrstu veza ima i određeni afinitet prema alginatima što u konačnici utječe na svojstva. Kation Ca^{2+} najistraženiji je i najčešće korišten zbog njegove iznimne sposobnosti da

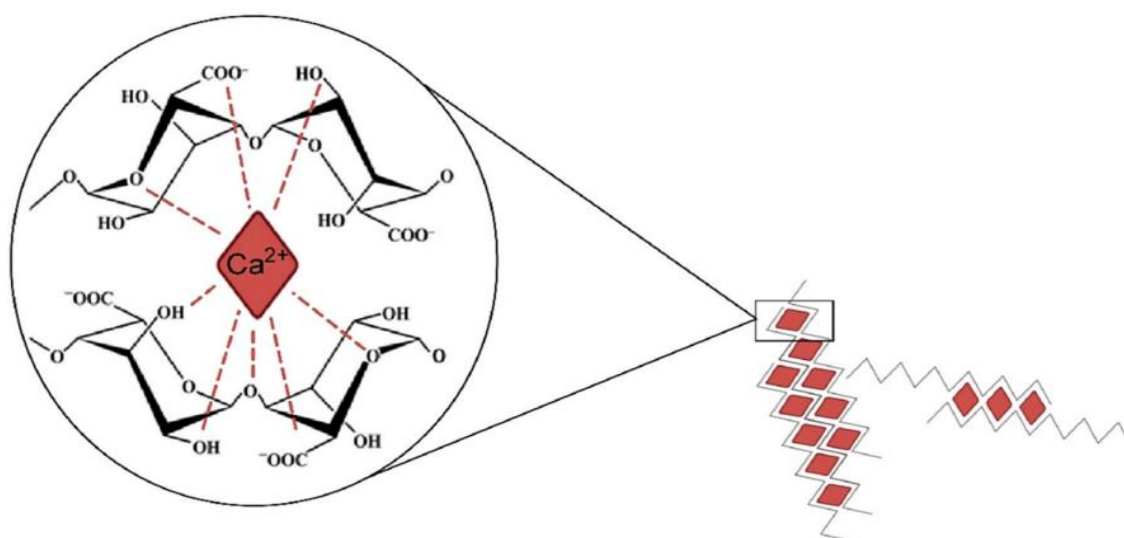
iz otopine natrijeva alginata zamjenjuje natrijeve katione i tvori ionske mostove između antiparalelnih alginatnih lanaca.³ Strukture koje nastaju u takvim situacijama dobile su ime po obliku na koji podsjećaju - kutije jaja (slika 2). Predložena struktura poprima takav oblik zbog poliuronatnih dijelova lanaca koji se preko svojih karboksilnih skupina i kisika u piranoznom prstenu koordiniraju s kalcijevim ionima. Podjedinice guluronske kiseline u takvoj strukturi zauzimaju lateralni položaj.



Slika 1. Strukture guluronske (a) i manuronske (b) kiseline.

Postoje dvije vrste sferifikacijskih modela: vanjska (konvencionalna) i unutarnja (reverzna). Vanjska je sferifikacija konvencionalna metoda gdje se kapljice otopine soli alginata dodaju kupelji koja sadrži otopinu kalcijeve soli. Reverzna, odnosno unutarnja sferifikacija obrnuta je metoda i kod nje se kapljice otopine soli kalcija dodaju u otopinu koja sadrži soli alginata. Gelovi dobiveni vanjskom sferifikacijom imaju većinu kalcijevih iona smještenih na površini gela stoga nisu pretjerano homogeni te imaju nešto lošija mehanička svojstva³, a nastala je membrana tanja. Najčešće se kao izvor kalcija koristi kalcijev klorid (CaCl_2) zbog brzine

geliranja i praktičnosti. Unutarnja se sferifikacija temelji na kontinuiranom uvođenju kalcijevih iona u sustav pod kontroliranim uvjetima i zato je najčešće kalcijev laktat dispergirani u sustav radi poticanja geliranja alginata. Izbjegava se korištenje uobičajenog CaCl_2 kao izvora kalcija jer dobivenim hidrogelnim kuglicama daje gorki okus.² Unutarnjom je metodom lakše kontrolirati kinetičke parametre i dobiveni je gel više homogen, posjeduje pore³ i dobivena je membrana deblja. Reverznom je sferifikacijom lakše uklopiti različite sastojke u sastav hidrogelnih kuglica nego vanjskom metodom.² Osim tih osnovnih sferifikacijskih metoda, razvijena je i metoda u kojoj se proces geliranja inducira fotokiselinskom generacijom u netopljivoj i dispergiranoj kalcijevoj soli. Nakon otprilike 10 minuta i pod utjecajem UV zračenja nastaju protoni koji oslobađaju kalcijeve ione koji tada koordiniraju s alginatima. Kako je svaka od spomenutih metoda na svoj način drugačija, mnogi se parametri trebaju uzeti u obzir pri odabiru kapsulirajuće metode. Sastav matriksa gela i njegova stabilnost, veličina čestica te generalna mogućnost prilagodbe metode na industrijsku razinu proizvodnje najčešći su parametri koji presuđuju odabir jedne metode naspram druge.³



Slika 2. Koordinacija Ca^{2+} iona s alginatinim podjedinicama polimernih lanaca i formacija strukture „kutije jaja”. Preuzeto iz C. Bennacef, S. Desobry-Banon, L. Probst, S. Desobry, *Food Hydrocolloids* **118** (2021).

1.2. Fickov prvi zakon

Sferifikacija se temelji na difuziji iona kalcija u alginatni gel, a sami se proces difuzije generalno može objasniti prvim Fickovim zakonom.⁴ On objašnjava kako se otopljene čestice spontano miču pod utjecajem koncentracijskog gradijenta prema formuli:

$$(1) \quad J = D \frac{dC}{dx}$$

J je protok otopljene tvari izražen u množini tvari koja prođe kroz određenu površinu u jedinici vremena okomito na x -os ($\text{mol} / \text{m}^2 \text{ s}$). D je difuzijski koeficijent ($\text{m}^2 \text{ s}$), dC je diferencijal koncentracije (mol dm^{-3}), tj. razlika koncentracije, a dx karakteristična je mjera dužine sustava (m). U sferifikaciji razlika koncentracija kalcijevih iona između otopina alginata i kalcijeve soli tjera ione kalcija na difuziju u smjeru otopine alginata potičući na taj način geliranje. Fickov se zakon može koristiti i za jednostavno određivanje debljine ovojnice kao $\Delta x = 2 D t$ ako se uzme u obzir da je difuzijska konstanta kalcijevih iona u vodi jednaka $1,5 \times 10^{-13} \text{ cm}^2 / \text{s}$, a t je vrijeme provedeno u kupelji.

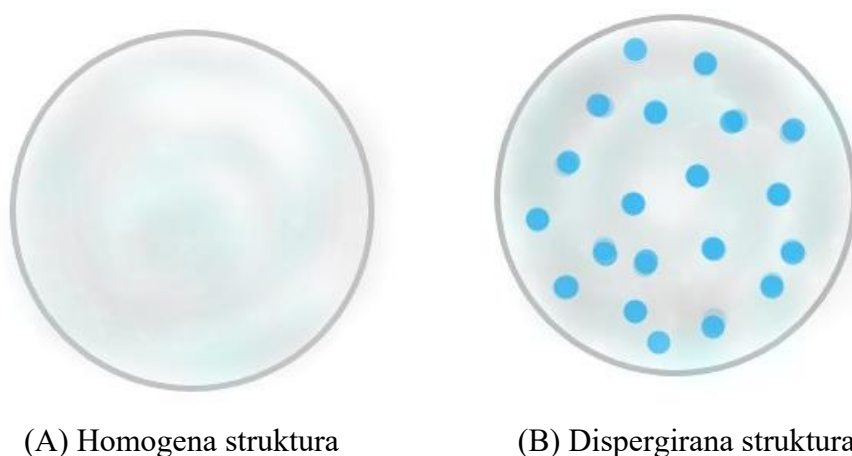
1.3. Cilj rada

U ovom je radu cilj proučiti vanjsku i unutarnju sferifikaciju kao dvije osnovne metode i predstaviti osnovne proizvodne tehnike. U sklopu opisa vanjske sferifikacije proučeno je kako izvori i koncentracija kalcijevih iona utječu na konačna svojstva formiranih hidrogelnih kuglica. Za unutrašnju se sferifikaciju veže i zanimljiva metoda sekundarnog geliranja koja zbog poboljšanja svojstva vanjske ovojnice može značajno promijeniti način kako se hidrogelne kuglice ponašaju u uvjetima termičke obrade ili probavnog sustava što naravno ima bitnu industrijsku i medicinsku važnost. Na kraju je napravljen detaljniji osvrt na utjecaj alginata u samom procesu sferifikacije te dobivanje kompozitnih gelova koji dodatno obogaćuju svojstva hidrogelnih kuglica.

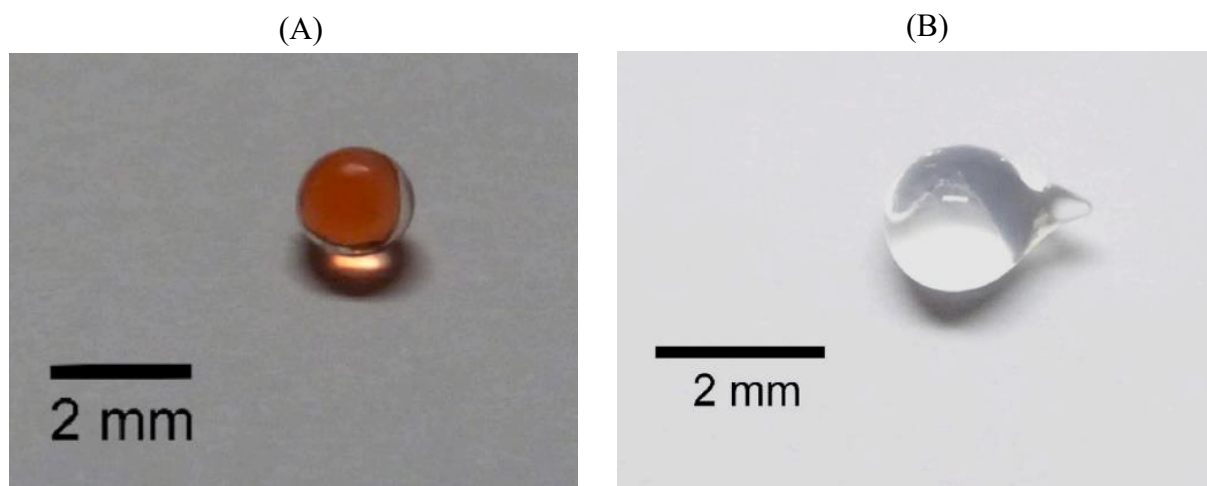
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Proizvodne sferifikacijske metode

Razvijene su mnogobrojne metode za miješanje sastojaka kako bi se dobili hidrogelovi različitih svojstava. Uobičajena kapljična metoda istiskuje alginatnu otopinu u obliku kapljica u kalcijevu kupelj uz miješanje. Alginatna otopina sadrži komponente koje se pokušava kapsulirati. Kapljičnom metodom uobičajeno nastaju homogene strukture, ali ako se lipidna emulzija rasprši u vodenu otopinu alginata, može se dobiti i dispergirana struktura (slika 3). Na oblik dobivenih hidrokolooidnih čestica utječu pH, temperatura, koncentracija kalcijevih iona, ali i viskoznost te visina sa koje se kapljice alginatne otopine ubacuju u kupelj.³ Eksperimentalno je potvrđeno kako je visina od 7 do 10 cm optimalna jer padom s većih visina kuglice dobivaju oblik kapi (slika 4).³ Različiti spojevi poput ulja, esencijalnih masnih kiselina, lijekova, probiotika, enzima i proteina mogu biti kapsulirani, a najčešće su podvrgnuti takvom postupku kako bi se povećala njihova stabilnosti. Za dobivanje granula različitih veličina razvijene su naprednije metode: disperzija mlaznicom, rotirajućim diskom i atomizacijom. Metoda prstenastog mlaza naprednija je metoda koja se temelji na korištenju dviju koaksijalnih mlaznica od kojih jedna raspršuje alginat, a druga spoj koji se pokušava kapsulirati. Rotacijom i paralelnom injekcijom iz obje mlaznice nastaje koncentrični mlaz koji u doticaju sa otopinom kalcijevih iona stvara hidrogelne kuglice koje izvana imaju izrazito tanku ovojnicu, a unutrašnjost (preko 90 % volumena) ispunjava kapsulirana komponenta (slika 4).³



Slika 3. Primjer uobičajene homogene strukute (A) i dispergirane (B) nastale pod utjecajem lipidne emulzije.



Slika 4. Hidrogelna kuglica dobivena metodom prstenastog mlaza (A) i kuglica oblika kapi (B) dobivena padom s neoptimalne visine. Preuzeto iz C. Bennacef, S. Desobry-Banon, L. Probst, S. Desobry, *Food Hydrocolloids* **118** (2021).

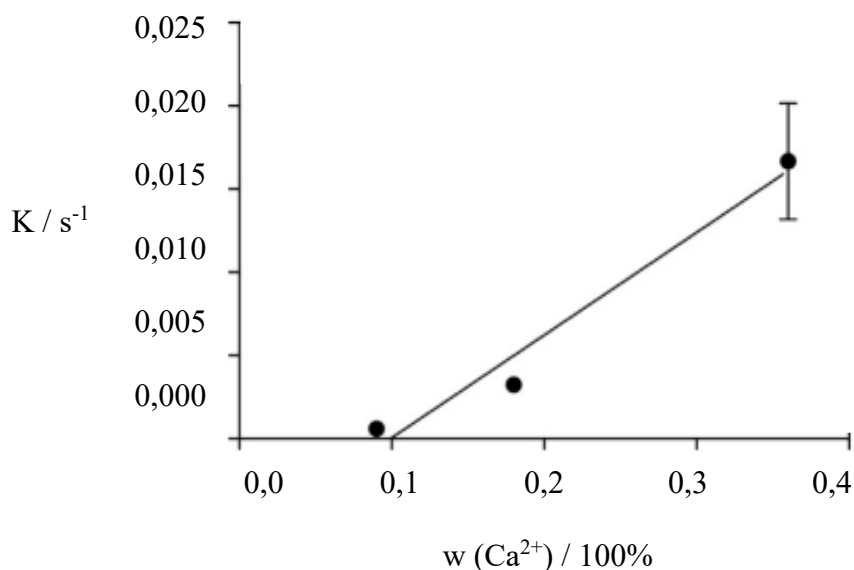
2.2. Metoda vanjske (konvencionalne) sferifikacije i utjecaj izvora kalcija na brzinu sferifikacije

Vanjska je sferifikacija metoda koja se zasniva na uvođenju otopine gelirajućeg sredstva u otopinu koja sadrži katione neke dvovalente soli. Najčešće korištene tvari za geliranje su soli alginata, primjerice natrijev alginat. Kationi koji su se pokazali odličnim metalnim centrima za ostvarivanje koordinacijskih veza sa karboksilnim skupinama podjedinica alginatnih polimernih lanaca su mahom elementi 2. skupine periodnog sustava elemenata. Alginati međutim nemaju jednaki afinitet prema svakom kationu i generalno je pravilo da se taj afinitet povećava niz skupinu ($Mg^{2+} < Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+}$). Ispitivanja su pokazala kako soli kalcija poput $CaCl_2$ osobito dobro stvaraju gel-ovojnice oko tekuće jezgre. Intuitivno je za očekivati kako odabir izvora kalcija može utjecati na svojstva gel-ovojnica dobivenih unutrašnjom sferifikacijom pa je napravljen niz eksperimenata kako bi se ova hipoteza istražila.² Kao izvor dvovalentnih iona kalcija korišteni su $CaCl_2$, kalcijev laktat i kalcijev glukonat, a kao izvor alginata korištena je 1 %-tna otopina. Izdvojene su kuglice koje su imale promjer od 8 mm i na njima su provedena reološka istraživanja. Oscilatornom reologijom malih deformacija određeni su parametri elastičnog modula G' i modula gubitka G'' u rasponu linearne viskoznoelastične regije od 0,1 do 100 Pa. Specifično za alginatne gelove je da ih se opisuje kao tvari koje imaju viskozna i elastična svojstva kada ih se izloži utjecaju vanjskog pritiska. Upravo parametar G'

je elastična komponenta, a G'' je viskozna komponenta koja pokazuje tendenciju viskozne disipacije. Nakon 4000 sekundi, neovisno o uzorku, moduli su postigli sličnu i stalnu razinu. Smanjenjem vremena tijekom kojeg su alginati bili izloženi otopini kalcija uočena je smanjena tvrdoća i raspon linearne viskozne regije. Dobiveni su podaci o vremenu potrebnom da moduli G' i G'' postignu stalnu vrijednost. Za 1 %-tnu otopinu CaCl_2 pokazano je da nakon 250 sekundi nema više porasta vrijednosti modula G' jer je ostvarena konstantna maksimalna vrijednost od otprilike 800 Pa, a nakon 50 sekundi i otprilike 200 Pa ne mijenja se niti vrijednost G'' . Otopina kalcijeva laktata (1 %-tna) ostvaruje maksimalne i konstantne vrijednosti modula kasnije od otopine CaCl_2 . Potrebno je 1000 sekundi za G' da postigne vrijednost od 700 Pa i 1500 sekundi za G'' da postigne 150 Pa. Otopina kalcijeva glukonata najsporije potiče geliranje. Niti nakon 4000 sekundi G' modul nije u potpunosti postigao asimptotski maksimum, a G'' je nakon 1000 sekundi postigao maksimum pri 200 Pa. Podaci pokazuju jasnu povezanost između odabira izvora kalcija i vremena potrebnog za nastajanje gel-ovojnica. Stoga je napravljena analiza prikupljenih podataka pomoću jednadžbe binomne difuzije. Ako se proučava kako G' modul, koji u svojoj suštini predstavlja mjeru tvrdoće, ovisi o vremenu ekspozicije otopine alginata u otopini kalcija različitih izvora, dobije se jednadžba:

$$(2) \quad G' = G'_{max}[1 - e^{-kt}]^n$$

G'_{max} je vrijednost koja se postiže pri beskonačnom vremenu ekspozicije, k je konstanta brzine reakcije, tj. brzine geliranja, a n je konstanta heterogene strukturalne otpornosti koja zapravo pokazuje tendenciju otpornosti prema difuziji. Uzorci triju testiranih otopina alginata nisu pokazali značajniju međusobu razliku vrijednosti G' i n , međutim velike su razlike uočene kod konstante brzine reakcije. Vrijednost k za geliranje u otopini CaCl_2 skoro je 5 puta veća od konstante brzine reakcije za otopinu laktata, a čak 17 puta veća od otopine glukonata. Pročavajući dobivene rezultate za konstantu brzine reakcije treba uzeti u obzir početnu koncentraciju kalcija u ishodnim otopinama. Kako se u svakoj otopini nalazila 1 %-tna količina izvora kalcijevih iona, zbog različitih molarnih masa samih soli, najveću je koncentraciju kalcijevih iona u konačnici imala otopina CaCl_2 , a najmanju otopina kalcijeva glukonata. Iz tih podataka može se uočiti da postoji linearna ovisnost između koncentracije kalcijevih iona i brzine geliranja prikazana na slici 4.



Slika 4. Brzina sferifikacijske reakcije u ovisnosti o koncentraciji kalcijevih iona u otopini.

Prilagođeno prema P. Lee, M. A. Rogers, *Int. J. Gastron. Food Sci.* 1 96–100 (2012).

2.3. Metoda unutarnje (reverzne) sferifikacije i utjecaj sekundarnog geliranja na svojstva hidrogelnih kuglica

Metoda unutarnje (reverzne) sferifikacije razlikuje se od konvencionalne sferifikacije po tome što se otopina kalcijeve soli dodaje u otopinu gelirajućeg sredstva. Ovakav pristup geliranju ima svoje prednosti jer je moguće različite sastojke uvesti u nastale hidrokoloidne gel-kuglice. Normalnom sferifikacijom geliranje se može dogoditi prije samog proces sferifikacije, stoga miješanjem željenih sastojaka sa otopinom kalcijeve soli i dodavanjem takve otopine u kupelj koja sadrži otopinu tvari za geliranje osiguravaju se optimalniji uvjeti za uspješnu sferifikaciju. Druga prednost reverzne sferifikacije jest lakoća provođenja sekundarnog geliranja sa poluobrađenim kuglicama iz postupka prvog geliranja.¹ Već formirane se kuglice urone u otopinu kalcijevih iona koji zbog razlika u osmotskom gradijentu ulaze u kuglice i ojačavaju vanjsku gel-ovojnicu. Metoda sekundarnog geliranja daje dobre rezultate sa reverznom sferifikacijom upravo zbog mehanizma nastanka hidrokoloidnih gel-kuglica gdje se kapi otopine koja sadrži kalcijeve ione dodaju u otopinu gelirajućeg sredstva (najčešće alginata) što potiče difuziju kalcija iz kapljice prema van gdje u kontaktu sa alginatima počinje stvarati

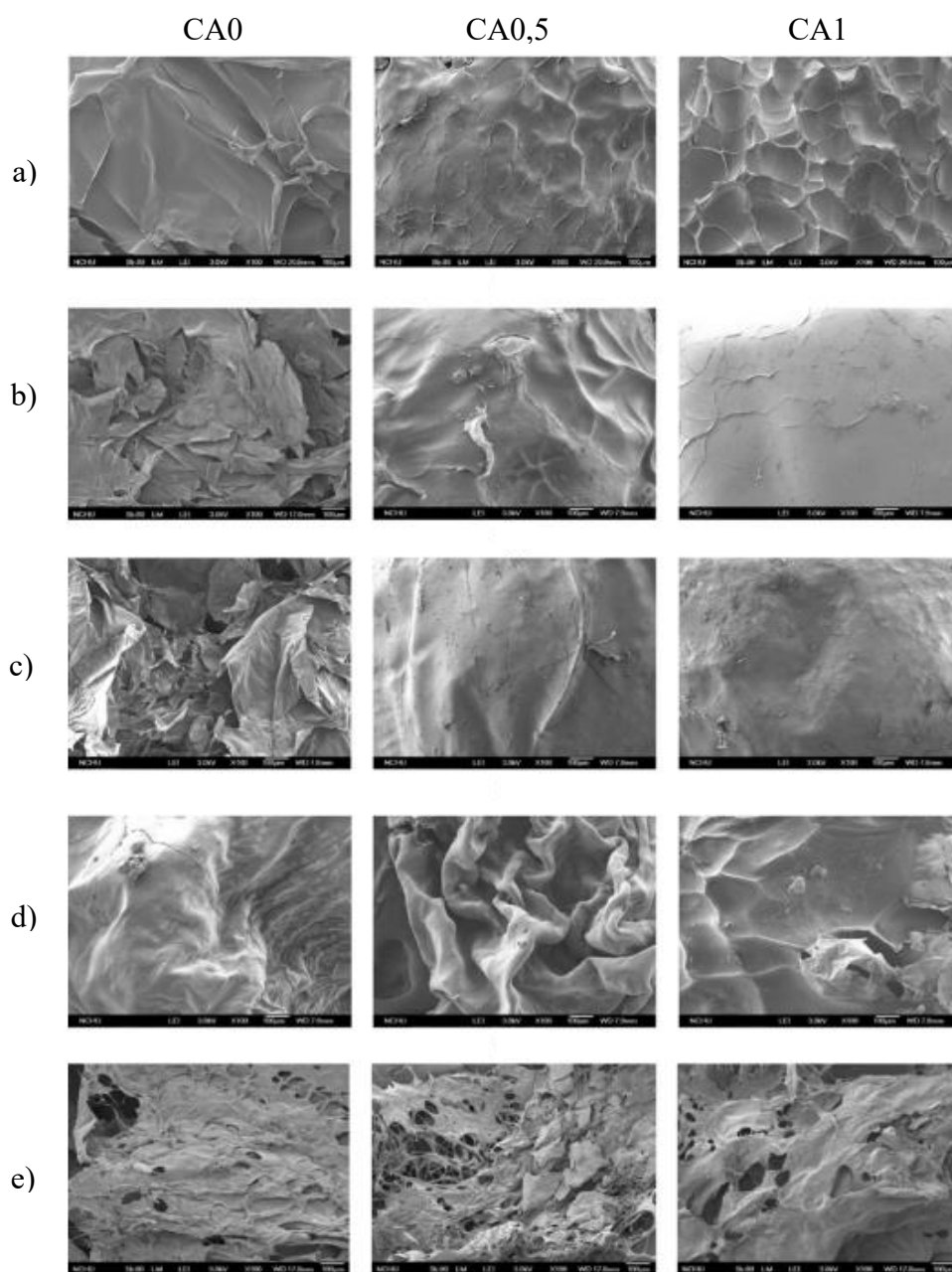
vanjsku ovojnici.¹ Kako bi se bolje istražio utjecaj sekundarnog geliranja na svojstva hidrogelnih kuglica napravljena je studija koja je koristila ekstrakte iz lišća i stabljike čička kao osnovicu tekuće jezgre hidrokolooidnih kuglica dobivenih reverznom sferifikacijom. Ekstrakt čička je pomiješan u omjeru 1 : 3 sa otapalom koje je sadržavalo $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ citratne kiseline u 95 %-tnom etanolu. Dodana je i 1 %-tna otopina kitozana u octenoj kiselini. Kitozan im ulogu zgušnjivača tekuće jezgre kako bi se spriječila deformacija kuglica tijekom samog procesa sferifikacije. Njegova je prednost što je on jedini prirodni polisaharid pozitivnog naboja zbog svoje amino skupine.³ CaCl_2 koncentracije $1 \text{ g}/100 \text{ g}$ otapala dodavan je u otopinu natrijeva alginata koncentracije $1 \text{ g}/100 \text{ mL}$ otopine tijekom 30 minuta uz lagano miješanje. Nastale kuglice su zatim uronjene u otopine CaCl_2 različitih koncentracija ($0, 0,5$ i $1 \text{ g}/100 \text{ mL}$ otopine) kako bi se dobile tri skupine kuglica različitih svojstava vanjske ovojnice. Radi lakšeg raspoznavanja, korištena je nomenklatura CA0, CA0,5 i CA1 za svaki tip kuglica, ovisno o koncentraciji kalcijevih iona korištenih u sekundarnom geliranju. Nakon pripreve uslijedila je termalna obrada kuglica pri $90 \text{ }^\circ\text{C}$ i $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Te temperature predstavljaju tipične uvjete pri kojima se u prehrambenoj proizvodnji hrana izlaže prilikom termalne obrade. Zatim su kuglice bile izložene otopinama koje su simulirale uvjete želučane kiseline (2 g NaCl i 6 mL HCl u 500 mL destilirane vode do pH 1,2) i tekućine tankog crijeva (fosfatni pufer koncentracije $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ podešen na pH 6,8). Poanta postavljanja ovakvih uvjeta je proučiti kako se kuglice raspadaju, a kapsulirane tvari otpuštaju pri probavnim uvjetima. Najprije je proučen kapacitet bubrenja (SC) tako što su u određenim vremenskim intervalima tijekom termalne obrade i simulacije probavnih uvjeta kuglice izvađene iz destilirane vode, višak je vode upijen papirom, a masa prije i poslije upijanja iskorištena je za izračun SC-a prema formuli:

$$(3) \quad SC (\%) = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100$$

gdje W_t predstavlja masu kuglice u trenutku t , a W_0 u trenutku 0 s . Termalnom obradom, kuglice pojačano bubre jer brže upijaju vodu sa porastom temperature, naročito CA0 jer one nemaju ovojnici koja je ojačana sekundarnim geliranjem pa su se nakon 10 minuta na $100 \text{ }^\circ\text{C}$ takve kuglice čak i raspale. U kiselim uvjetima simuliranog želučanog soka kuglicama se smanjuje kapacitet bubrenja i one se smežuraju. SC CA0 uzoraka smanjio se za čak 50-60 % čime se pokazuje značajna razlika u ponašanju od CA0,5 i CA1 kojima se SC smanjio svega 10-15 %. U uvjetima tankog crijeva SC CA0,5 i CA1 značajno se povećava (gotovo 300 %), dok CA0 se smanjio za 40 % kroz 45 minuta nakon čega su se kuglice raspale. Pri niskim pH vrijednostima pH karboksilne je skupine 4,75 pa povećanjem pH do 6,8 ona se deprotonira što dovodi do

nastanka više negativnih naboja i repulzija u polimernom lancu alginata.¹ U konačnici se uočava kako kuglice ojačane sekundarnim geliranjem pokazuju bolju otpornost na raspad prilikom bubrenja u procesu termalne obrade i simulacije probavnih uvjeta. Ovakvi rezultati ne čude ako se prouči i tvrdoća kuglica. Analizatorom tekstura izvršena je kompresijska analiza sva tri tipa kuglica i dobiveni rezultati pokazuju recipročnu korelaciju između kapaciteta bubrenja i tvrdoće. Tvrdoća se svih tipova kuglica smanjuje neovisno o uvjetima, ali najveću promjenu ponovno pokazuje tip CA0. Jasno je da taj tip nema ojačanu vanjsku ovojnici zbog čega se lakše kompresira i brže mu se narušava strukturalni integritet što dovodi do pucanja ovojnice u testu tvrdoće i kapaciteta bubrenja. Kako bi se proučila pozadina ovih opažanja elektronskom mikroskopijom (SEM) proučene su površine ovojnice svakog tipa kuglica u dosad spomenutim uvjetima (slika 5). SEM je pokazao da je površinska struktura CA0 jako vijugava i pahuljasta, dok druga dva tipa imaju više grebenastu i mrežastu površinu. Tijekom termičke obrade CA0 dobiva niz pukotina dok površine CA0,5 i CA1 postaju oblike i glađe (korelacija sa povećanjem SC-a). Nabori i udubine na površini stvaraju se tijekom obrade u želučanim uvjetima, a naročito kod CA0 gdje su prisutne velike udubine. CA0,5 ima više manjih nabora, dok CA1 ima površinsku strukturu sličnu početnoj samo što je manje grebena koji su nepravilniji. Veliki raspad površinske strukture u uvjetima tankog crijeva odražava činjenicu da se kalcijev alginat raspada pri višem pH.¹ CA0,5 naizgled ima najviše pukotina, no moguće je da CA0 ima još više samo što ih je toliko nastalo da je dio zbog težine kolapsirao na površinu i prividno stvorio dojam da je nastalo manje pukotina.¹

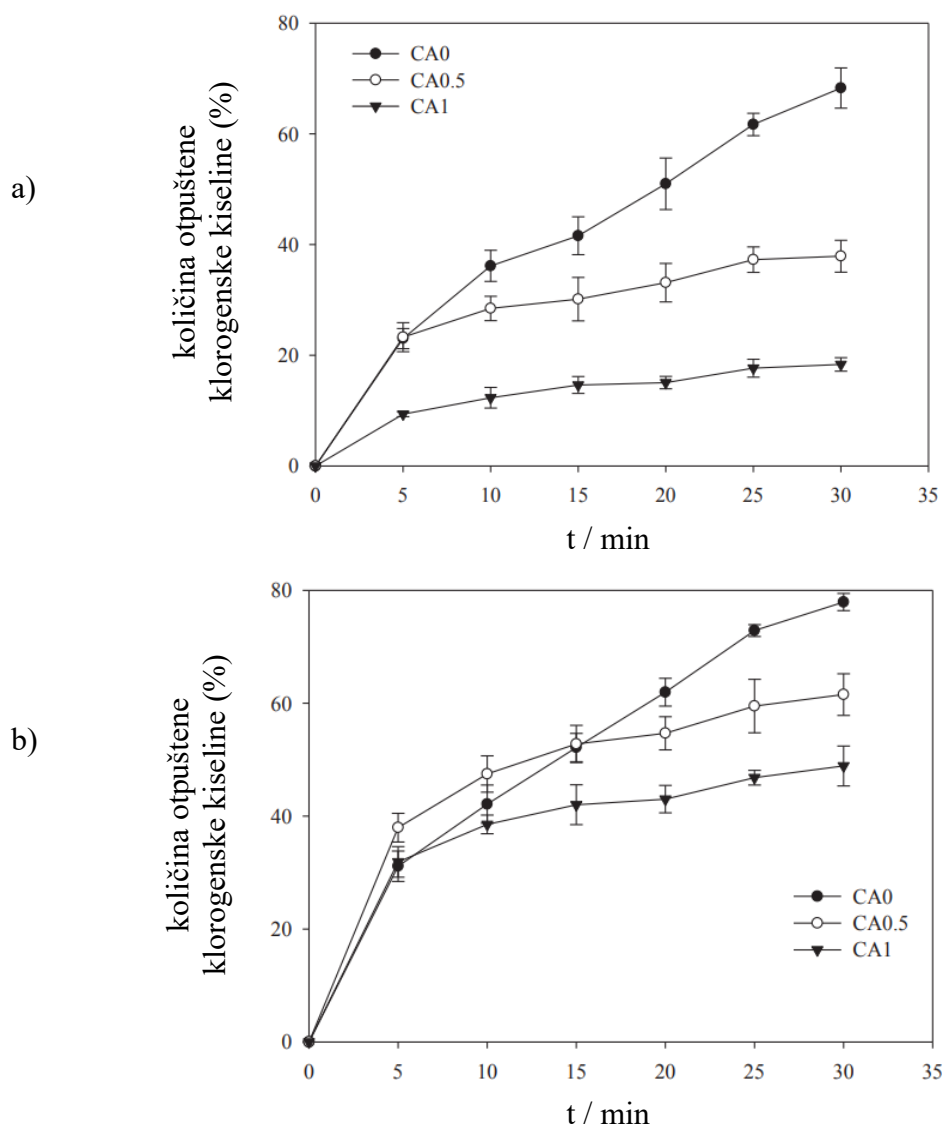
Rezultati SEM-a daju dobar uvod u iduće proučavano svojstvo, a to je sposobnost hidrogelnih kuglica da u određenim uvjetima otpuste svoj tekući sadržaj. Idealni bi sustav dostavio ispravnu količinu tvari sadržane u tekućoj jezgri do ciljanog mjesta u probavnom sustavu i otpustio je u ciljanom vremenskom roku. Zato je prikladno da željeni sustav ima nisku stopu otpuštanja tijekom termičke obrade koja je uobičajena prilikom proizvodnje, a u *in vitro* uvjetima trebao bi imati visoku stopu otpuštanja. Stoga je praćena količina ispuštene klorogenske kiseline iz tri tipa pripremljenih hidrokoloidnih kuglica tako što su alikvoti supernatanta skupljani u vremenu t i obrađeni tekućom kromatografijom visokih performansi (HPLC). Tijekom termalne obrade i u *in vitro* uvjetima količina otpuštene klorogenske kiseline raste što je vidljivo na slikama 6 i 7. Nakon određenog vremena CA0 najviše otpušta u svim uvjetima, a CA1 najmanje.¹



Slika 5. SEM površine alginatnih gelova prije obrade (a), 90 °C (b), 100 °C (c), simulirani želučani uvjeti (d) i simulirani uvjeti u tankom crijevu (e). Preuzeto iz F. H. Tsai, P. Y. Chiang, Y. Kitamura, M. Kokawa, M. Z. Islam, *Food Hydrocolloids* **62** (2017) 140–148.

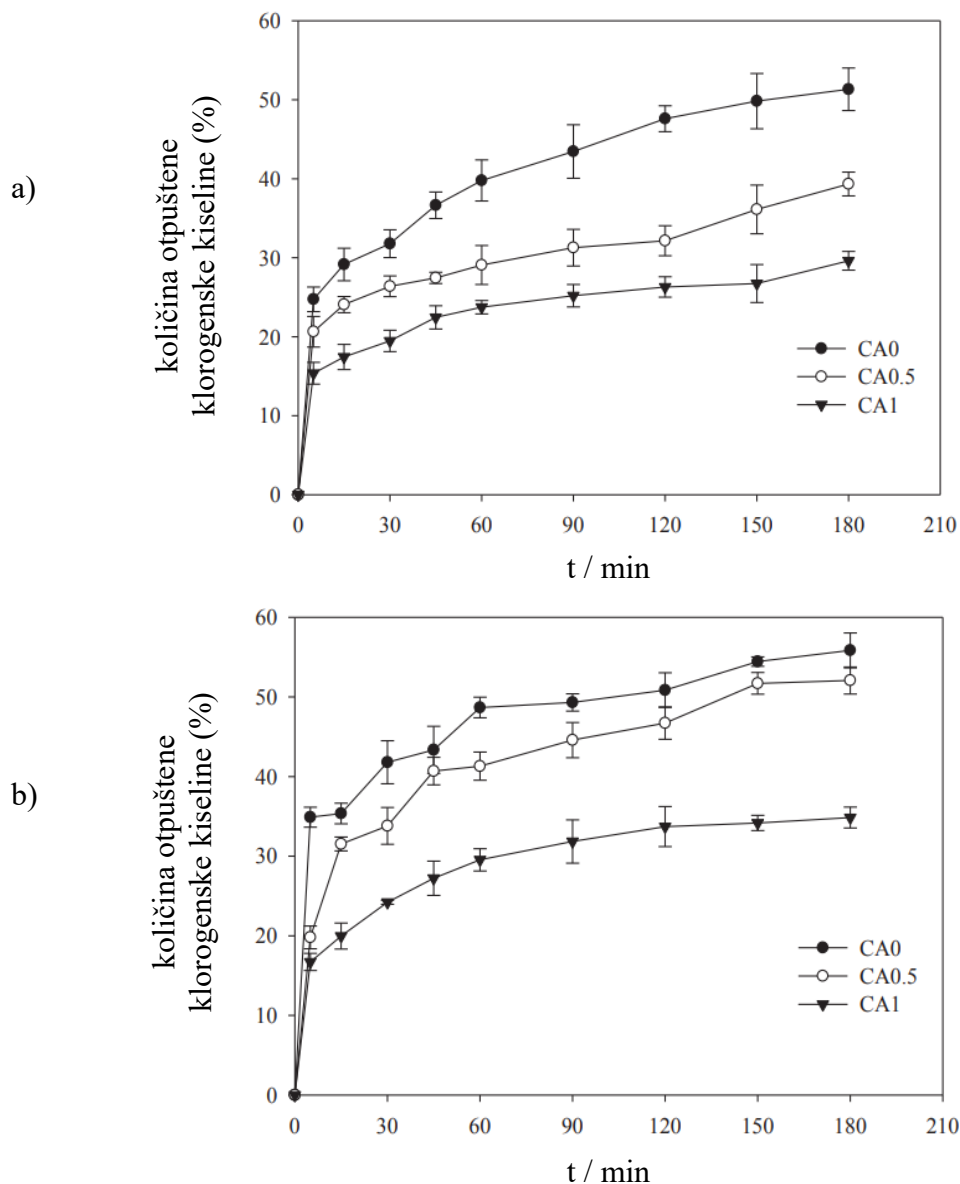
Različiti kinetički modeli opisuju mehanizam otpuštanja svakog uzorka. Parametri R^2 , n i K opisuju te kinetičke modele. R^2 parametar za otpuštanje klorogenske kiseline ukazuje na model koji najbolje opisuje sustav i prema njegovim vrijednostima, CA0 slijedi kinetiku nultog

reda i Korsmeyer-Peppasov model tijekom termalne obrade. Pri istim uvjetima uzorci CA0,5 i CA1 slijede kinetičke modele Higuchi i Korsmeyer-Peppas. Parametar n je eksponent otpuštanja i ukazuje na mehanizam (Fickov, anomalni ili transportni slučaj-II). Ako je vrijednost ovog parametra približno 0,43 uzorak slijedi Fickov difuzijski mehanizam. Vrijednosti oko 0,85 upućuju na mehanizam transportnog slučaja-II. Vrijednosti između 0,43 i 0,85 ukazuju na anomalni mehanizam i uzorak CA0 u rasponu vrijednosti parametra n od 0,525 do 0,597 slijedi ovaj mehanizam. Uzorci CA0,5 i CA1 imaju Fickov mehanizam otpuštanja.¹



Slika 6. Količina otpuštene klorogenske kiseline iz pripremljenih hidrogelnih kuglica pri a) 90°C i b) 100 °C. Preuzeto iz F. H. Tsai, P. Y. Chiang, Y. Kitamura, M. Kokawa, M. Z.

Islam, *Food Hydrocolloids* **62** (2017) 140–148.



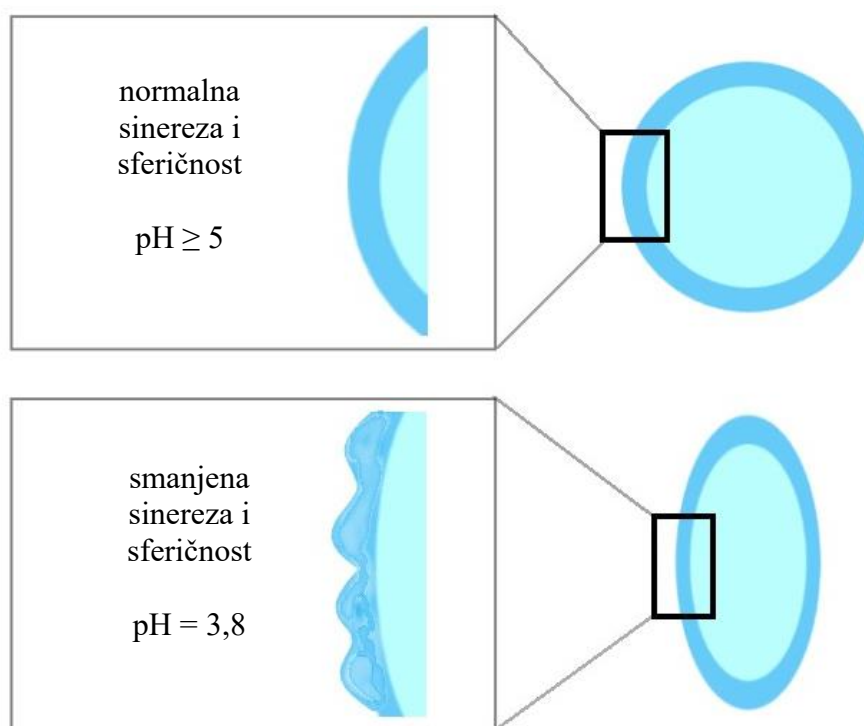
Slika 7. Količina otpuštene klorogenske kiseline iz pripremljenih hidrogelnih kuglica u simuliranim uvjetima a) želučane kiseline i b) tankoga crijeva. Preuzeto iz F. H. Tsai, P. Y. Chiang, Y. Kitamura, M. Kokawa, M. Z. Islam, *Food Hydrocolloids* **62** (2017) 140–148.

2.4. Korištenje alginata za kapsuliranje u sferifikaciji i nastajanje kompozitnih gelova

Alginatni polimerni lanci pokazali su se iznimno korisnima u procesu sferifikacije kao izvor gelova zbog mogućnosti da se svojim karboksilnim skupinama guluronskih podjedinica

poprečno vežu na koordinacijske centre dvovalentnih iona poput Ca^{2+} . Stoga je zbog široke primjene alginata korisno istražiti kako određeni fizikalno-kemijski uvjeti utječu na njih. Molekularna masa pokazala se kao jedan od osnovnih faktora koji utječe na viskoznost gelova.³ Što je veća molekularna masa alginata (dulji lanci) to je veća i viskoznost. Kinetika geliranja također ovisi o masi, tj. brže se formira gel što je veća masa alginata. Ovakvo se ponašanje objašnjava činjenicom da veći gelovi imaju dulje lance i više potencijalnih karboksilnih skupina za ostvarivanje poprečnih veznih interakcija sa dvovalentnim ionima. Osim mase, udio gradivnih podjedinica alginata igra važnu ulogu na elastičnost i lateralnu asocijaciju lanaca. Alginati su građeni od podjedinica manuronske (M) i guluronske kiseline (G). Unakrsno je povezivanje uglavnom rezultat povezivanja preko G podjedinica, dok M podjedinice utječu na elastičnost i lateralnu asocijaciju lanaca. Ako ima puno M podjedinica onda je gel mekan i elastičan, a ako ima puno G podjedinica gel je tvrd i kompaktan. Koncentracija alginata pokazala se također bitnim faktorom koji određuje konačna fizikalna svojstva gela. Povećana koncentracija alginata povećava viskoznost, elastičnu otpornost na pucanje i općenito tvrdoću. Veća koncentracija ima više alginata dostupnog za poprečno povezivanje preko Ca^{2+} . Međutim niti prevelika koncentracija nije dobra za svojstva gela jer Ca^{2+} može teže difundirati kroz gel. Koncentracija konačno utječe i na oblik kuglica jer pri većim koncentracijama nastaju hidrogelne kuglice koje su pravilnijeg oblika (više su sferične), ali treba imati na umu da pri prevelikim koncentracijama nastaju hidrogelni oblici koji izgledom podsjećaju na kapi. Već je obrađeno kako koncentracija kalcijevih iona utječe na brzinu sferifikacije, ali kalcijevi ioni utječu i na ostala svojstva gelova. Više koncentracije kalcijevih iona osiguravaju više poprečnog vezivanja i bržu difuziju što povećava viskoznost, elastičnost i stabilnost.³ Empirijski je utvrđena povezanost između koncentracija kalcijevih iona i karboksilnih skupina sa načinom povezivanja podjedinica u gelove. R vrijednost je omjer ravnotežne koncentracije kalcijevih iona te karboksilnih skupina. Ovisno o vrijednosti tog omjera razlikuju se 3 načina povezivanja: monokompleksiranje za $R < 0,25$, formiranje strukture kutije jaja za $0,25 < R < 0,55$ te nastajanje internih klustera za $R > 0,55$. Pri jako visokim koncentracijama kalcijevih iona stvara se velika količina pozitivnog naboja što odvaja lance i dovodi do dezintegracije gela. Veće je i odstupanje nastalih hidrogelnih kuglica od idealne sferičnosti. Vrijeme koje alginat provede u kontaktu sa kalcijevim ionima (odstajano vrijeme) nema utjecaja na sferičnost niti svojstva. Nakon određenog vremena svi uzorci izloženi istim koncentracijama kalcijevih iona pokazuju slična fizikalna svojstva. Minimalno potrebno odstajano vrijeme može se izračunati primjenom

drugog Fickova zakona. Vrijednost pH otopine također utječe na topljivost i vezivanje alginata jer se mijenja naboj G i M podjedinica koje imaju pK_a 3,38 i 3,65. Polimeri alginata uglavnom imaju pK_a oko 3,4. Veći udio G podjedinica povećava pH pri kojem taloži alginat. Pri visokom pH, ali nižem od 10,5, slabi glikozidna veza u lancima što narušava strukturalnu stabilnost.³ Pri pH 3,8 stvara se alginat koji je gušće građe i isprepletene mikrostrukture što stvara jače interakcije među lancima te je izraženiji efekt sakupljanja gela i sinereze (kontrakcije gela prilikom izolacije iz tekućine). Suprotan se efekt događa pri pH višim od 5. Niži pH općenito uvjetuje manje međufazne napetosti pa su hidrogelne kuglice spljoštenije, a viši pH daje pravilnije sferne oblike kao što je prikazano na slici 8.



Slika 8. Utjecaj pH otopine u kojoj se vrši sferifikacija na površinu vanjskog sloja i općenitu makrostrukturu hidrogelnih čestica.

Temperatura igra važnu ulogu u procesu sferifikacije sa alginatima jer pri višim temperaturama poboljšana je difuzija kalcija i ubrzava se proces geliranja što stvara gušću mrežu lanaca.³ Niža temperatura stvara pak uređenije i pravilnije mreže. Viša temperatura smanjuje viskoznost i veličinu kuglica, ali one su pravilnijeg sferičnog oblika. Ako je gel stabilan u rasponu od 0-100 °C, termalna stabilnost raste s povećanjem udjela G podjedinica. Pri višim temperaturama započinje depolimerizacija lanaca alginata, a pri 180 °C događa se i

potpuna dezintegracija. Niža ionska jakost osigurava formiranje gela, a pri višoj ionskoj jakosti dolazi do kompeticije monovalentne soli sa kalcijevim ionima za karboksilnu skupinu alginata što stvara manje stabilan sustav.

2.4.1. Polisaharidni i peptidni kompozitni gelovi

Jedan od načina promjene svojstava alginata je stvaranje kompozitnih gelova. Metoda se zasniva na kopolimerizaciji sa polisaharidima ili proteinima radi promjene svojstava dobivenih alginatnih gelova, a svoju primjenu pronalazi u kapsuliranju i dobivanju tankih jestivih filmova. Ovisno o korištenim kopolimerima svojstva se gelova razlikuju. U nastavku će biti rečeno više o najčešće korištenim polisaharidima i proteinima.

Pektin je biopolimer koji se ekstrahira iz staničnih stijenki citrusnih biljaka i pronalazi svoju primjenu u sferifikaciji. Zaslužan je za povećanje stabilnosti kapsulirane supstance, bolju apsorpciju vode i termalnu stabilnost. U prehrambenoj industriji koristi se prilikom procesa hladnoga geliranja zbog manje potrošnje energije u proizvodnji slatkiša. Pokazao se i korisnim u kapsuliranju probiotika jer povećava stabilnost kapsuliranih bakterija.

Guar guma je polisaharid ekstrahiran iz sjemenki guara i ima linearne lance 1–4 povezanih β -D-manopiranoznih i β -galaktopiranoznih jedinica. Topiva u vodi, koristi se kao obložno sredstvo, a u sferifikaciji se koristi kao zgušnjivač gela. Pri nižim koncentracijama kalcija kompozitni gel koji sadrži guar gumu jači je od nekompozitnog i ima veću elastičnost, rigidnost i nižu razinu poroznosti. Uočena je i smanjena razina sinereze i smanjivanja prilikom skladištenja. Bolja je i otpornost umreženih lanaca u kiselim uvjetima te tijekom termičke obrade. Korisna je za kapsuliranje masnih kiselina zbog mogućnosti očuvanja njihovih antioksidanskih svojstava.

Arapska guma prirodni je polimer iz akačia drveta koji se sastoji od β -D-galaktopiranozilnih podjedinica s ograncima koji sadržavaju L-ramozu, D-galaktozu, arabinozu i glukuronsku kiselinu. Koristi se u različitim granama industrije kao zgušnjivač i stabilizator. Interagira s alginatom pri pH 7, a pri pH 4 uočena je jača sinereza zbog ionskih interakcija između negativnih i pozitivnih naboja alginata i gume. Ionsko sparivanje gume i alginata povećava viskoznost i elastičnost gela. Pokazala se kao odličan kopolimer za kapsuliranje lijekova sa čak 86 %-tnom efikasnosti.

Kitozan je linearni polisaharid ekstrahiran iz oklopa rakova. Netoksični je polimer D-glukozamina i N-acetil glukozamina. Koristi se zbog svojih mnogobrojnih korisnih svojstava: antioksidanska svojstva, protuupalna i antimikrobska svojstva, pospješuje vezanje lipida.

Prilikom kopolimerizacije povećava viskoznost gela sa porastom pH, a najjači gelovi koji kombiniraju alginat i kitozan postignuti su pri pH 7. Dobiveni su gelovi imali poboljšana mehanička, kemijska i termička svojstva. Kitozan se koristi kao oblog alginatnih kapsula jer je pozitivnog naboja pa se veže sa negativnim alginatima i na taj im način povećava debljinu i zaštitna svojstva. Odličan je za očuvanje globulina tijekom termičke obrade te kapsuliranje probiotika i ulja jer sprječava oksidaciju.

Karagenan je sulfuirani poligalaktan iz crvenih morskih algi. Polisaharid je D-galaktoze i 3,6-anhidro galaktoze. U kombinaciji s alginatom karagenan povećava rigidnost i mehaničku stabilnost gela, termička svojstva, modul elastičnosti, bubrenje i promjer hidrokolooidnih gel-kuglica. Obećavajući je kapsulirajući reagens za inzulin jer su mu svojstva pH ovisna, tj. pokazuje dobru zaštitu i očuvanje pri niskom pH želučanih uvjeta zbog gušće mikrostrukture i dobru kinetiku otpuštanja pri neutralnom pH tankog crijeva.

Škrob je još jedan polisaharid koji se pokazao korisnim u kopolimerizaciji. Građen je od amiloze i amilopektina. Koristi se u proizvodnji hidrogelova zbog slobodnih hidroksilnih skupina. U suradnji s alginatom poboljšava apsorpciju vode i kapsuliranje. Svojstva mu ovise o uvjetima poput pH, ionske jakosti, koncentracije soli i vrsti korištenog dvovalentnog kationa. Dodatak škroba alginatnim gelovima utječe na poroznost i sporije otpuštanje kapsuliranog sadržaja. Vrsta škroba utječe na zadržavanje vode, stabilnost i probavljivost. Dobar je kopolimer za pohranu ulja i njihovu zaštitu.

Osim polisaharida, neke proteinske vrste mogu davati vrijedna svojstva kopolimerizacijom s alginatima. Proteini sirutke u ispravnim uvjetima mogu biti izvor kationa za stvaranje poprečnih veza između polimernih lanaca alginata. Dobiveni gelovi imaju dobru termičku stabilnost i otpornost na kisele uvjete tijekom kapsuliranja probiotika. Poboljšavaju reološka svojstva, smanjuju viskoznost i pojačavaju hidrofobnost što se odražava smanjenom tendencijom apsorpcije vode.

Gelatin je još jedan protein koji daje korisna svojstva kopolimerizacijom s alginatima. U procesu sferifikacije najviše je istražen zbog primjene u procesu koacervacije (spontana fazna separacija između netopljivog kompleksa i neke druge vodene faze prilikom promjene pH). Poboljšava efikasnost kapsuliranja esencijalnih ulja, probiotika i antioksidansa.

2.5. Zaključak

Metoda vanjske sferifikacije konvencionalna je i iskušana metoda u kojoj je najveći napredak postignut ispitivanjem povezanosti koncentracija i izvora kalcijevih iona na brzinu reakcije. Različite soli kalcija nisu utjecale na fizikalno-kemijska svojstva dobivenih hidrogelnih čestica. Uočeno je da postoji linearna ovisnost između konstante brzine reakcije i koncentracije kalcijevih iona u otopini. Kalcijev klorid je sol koja se pokazala kao najbolji izbor kalcija za brzu sferifikaciju, ali je njen nedostatak što ostavlja gorki okus kojeg treba nekako prikriti. Kalcijev laktat i glukonat sporije potiču geliraje, ali upravo zato su pogodniji za dobivanje membrana različitih debljina i tvrdoće. Dulje vrijeme inkubacije čini ih podložnijim vanjskim manipulacijama pa su zato jako zahvalni za korištenje. Metoda sekundarnog geliranja pokazala se pogodnom za očvršćivanje vanjske ovojnice hidrogelnih čestica. Deblja ovojnica značajno mijenja ponašanje hidrogelnih kuglica u uvjetima termičke obrade i probavnog sustava. Kuglice sa ovojnicom očvršćenom sekundarnim geliranjem manje upijaju vodu, otpornije su na vanjske tenzije jer imaju rigidniju i uređeniju površinsku strukturu te sporije otpuštaju kapsuliranu supstancu prilikom termalne obrade. Sporije otpuštanje kapsulirane supstance može se i pozitivno odraziti na poboljšanu apsorpciju same supstance u probavnom sustavu jer sporije i kontrolirano otpuštanje osigurava postepenu apsorpciju kroz ciljane dijelove probavnog sustava. Mnoga svojstva utječu na alginatne kao pogodna sredstva za dobivanje gelova u sferifikaciji. Molarna masa te udio G i M podjedinica značajno utječu na fizikalna svojstva gelova. Različiti uvjeti sferifikacije poput temperature, pH, ionske jakosti, koncentracije polimera i dvovalentnih iona mogu proizvesti gelove svakojakih fizikalno-kemijskih svojstava što pokazuje koliko polivalentna može biti primjena alginata u sferifikaciji. Da priči ovdje ne bude kraj, alginatni se gelovi dobro slažu sa čitavim nizom polisaharida i proteina sa kojima tvore kopolimerne gelove, dodatno oplemenjujući primjenu i svrhu alginata u sferifikaciji.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. F. H. Tsai, P. Y. Chiang, Y. Kitamura, M. Kokawa, M. Z. Islam, *Food Hydrocolloids* **62** (2017) 140–148.
2. P. Lee, M. A. Rogers, *Int. J. Gastron. Food Sci.* **1** (2012) 96–100.
3. C. Bennacef, S. Desobry-Banon, L. Probst, S. Desobry, *Food Hydrocolloids* **118** (2021).
4. L. Zhou, K. Nyberg, A. C. Rowat, *Adv. Physiol. Educ.* **39** (2015) 192–197.
5. <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/mannuronic-acid> (datum pristupa 10.9.2023.)
6. <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/guluronic-acid> (datum pristupa 10.9.2023)
7. <https://en.wikipedia.org/wiki/Chitosan> (datum pristupa 11.9.2023.)
8. <https://en.wikipedia.org/wiki/Gelatin> (datum pristupa 11.9.2023.)
9. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, New York, 2012.