

Inkapsulacija sirila u formulacije alginatnih mikročestica

Aničić, Ana-Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:695695>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**INKAPSULACIJA SIRILA U FORMULACIJE ALGINATNIH
MIKROČESTICA**

DIPLOMSKI RAD

Ana Marija Aničić

Zagreb, rujan, 2023.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Proizvodnja i prerada mlijeka

**INKAPSULACIJA SIRILA U FORMULACIJE ALGINATNIH
MIKROČESTICA**

DIPLOMSKI RAD

Ana Marija Aničić

Mentor:
Prof.dr.sc. Marko Vinceković

Zagreb, rujan, 2023.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Ana Marija Aničić**, JMBAG 0178114413, rođen/a 15.05.1998. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

INKAPSULACIJA SIRILA U FORMULACIJE ALGINATNIH MIKROČESTICA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Ana Marije Aničić**, JMBAG 0178114413, naslova

INKAPSULACIJA SIRILA U FORMULACIJE ALGINATNIH MIKROČESTICA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | | |
|----|------------------------------------|--------|-------|
| 1. | prof.dr.sc. Marko Vinceković | mentor | _____ |
| 2. | izv.prof.dr.sc. Nataša Mikulec | član | _____ |
| 3. | izv.prof.dr.sc. Luna Maslov Bandić | član | _____ |

Zahvala

Ovime prvenstveno zahvaljujem svom mentoru, prof.dr.sc. Marku Vincekoviću, na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju prilikom izrade ovog diplomskog rada. Hvala Vam na pomoći, strpljenju, razumijevanju te neizmjerne podršci i savjetima koje ste mi dali tijekom pisanja.

Zahvalu dugujem i izv.prof.dr.sc. Nataši Mikulec koja je bila uz mene ne samo tijekom izrade ovog rada već tijekom svih pet godina studiranja. Hvala Vam na pruženoj prilici za izradu diplomskog rada u sklopu projekta „Potencijal mikroinkapsulacije u proizvodnji sireva“, svakom savjetu, pomoći, velikom razumijevanju te uvijek ugodnoj atmosferi. Uz Vas je studiranje bilo lakše.

Zahvaljujem se i mag.ing.agr. Fabijanu Oštariću na pomoći u izradi diplomskog rada te svim djelatnicima Zavoda za kemiju agronomskog fakulteta koji su mi prenijeli svoje znanje tijekom izrade praktičnog dijela rada. Zahvalu također dugujem i svim djelatnicima Referentnog laboratorija za mlijeko i mliječne proizvode koji su mi nesebično prenijeli svoje znanje.

Hvala svim mojim prijateljima koji su mi bili neizmjerne emocionalna podrška tijekom studiranja, a pogotovo u trenucima kada sam mislila da neke stvari nisu moguće.

Najveću zahvalu dugujem svojim roditeljima koji su mi omogućili bezbrižno studiranje. Mojim bližnjima te ostalim članovima obitelji zahvaljujem što su uvijek vjerovali u mene i bili mi najveća moralna podrška. Bez vas bi sve bilo drugačije!

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Cilj rada.....	1
2. Pregled literature	3
2.1. Sirilo.....	3
2.2. Proizvodnja domaćeg sirila	3
2.3. Svojstva i karakteristike janječeg sirila	4
2.4. Mikroinkapsulacija	4
2.4.1. Mikročestice (mikrosfere).....	5
3. Materijali i metode	6
3.1. Proizvodnja domaćeg sirila	6
3.1.1. Određivanje jačine sirila	6
3.2. Otopine i puferi	6
3.2.1. Citratni pufer (0,2 M NaHCO ₃ , 0,06 M Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ x 2 H ₂ O)	6
3.2.2. Etanol (70 % i 96 %)	7
3.2.3. Fiziološka otopina (0,85 %)	7
3.2.4. Kalcijev klorid (CaCl ₂ , 4 %).....	7
3.2.5. Natrijev alginat (1,5 %)	7
3.2.6. Mucosol® (2 %).....	7
3.3. Električni naboj i veličina čestica sirila	7
3.4. Inkapsulacija janječeg sirila metodom ionskog geliranja	8
3.5. Fourierova transformacija infracrvene spektroskopije	10
3.6. Mikroskopska promatranja.....	11
3.7. Metode fizikalno-kemijske karakterizacije mikrosfera	11
3.7.1. Učinkovitost inkapsulacije	11
3.7.2. Kapacitet inkapsulacije	11
3.7.3. Stupanj bubrenja.....	11
3.7.4. In vitro otpuštanje sirila iz mikrosfera.....	12

4. Rezultati i rasprava	13
4.1. Jačina sirila	13
4.2. Međudjelovanje sirila, kalcijevih iona i natrijevog alginata.....	13
4.2.1. Identifikacija međudjelovanja iona kalcija, sirila (enzima) i natrijevog alginata	13
4.3. Fizikalno-kemijska karakterizacija mikrosfera	15
4.3.1. Učinkovitost i kapacitet inkapsulacije te stupanj bubrenja.....	15
4.3.2. Morfologija i veličina mikrosfera	16
4.3.3. In vitro otpuštanje sirila (enzima) iz mikročestica	19
5. Zaključak.....	22
6. Popis literature	23
7. Prilog	27
7.1. Popis kratica	27
Životopis	29

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Ana Marije Aničić**, naslova

INKAPSULACIJA SIRILA U FORMULACIJE ALGINATNIH MIKROČESTICA

Sirilo je pripravak enzima životinjskog, biljnog ili mikrobnog porijekla koji se koristi u proizvodnji sira za koagulaciju mlijeka. Prirodno sirilo životinjskog porijekla se koristi već stoljećima, no povećane potrebe za sirilom u prošlom stoljeću potaknule su razvoj i korištenje sirila mikrobnog i GMO modificiranog porijekla. Prirodno sirilo dobiva se iz sirišta mlade sisajuće teladi, janjadi i jaradi. U posljednje vrijeme stabilizacija sirila, posebno kod ubrzanog zrenja sira, izaziva značajan interes. Kako bi se povećala dugotrajnija aktivnost i stabilnost sirila provodi se postupak inkapsulacije sirila u formulacije alginatnih mikročestica čime se postiže imobilizacija i otpuštanje enzima u određenim vremenskim intervalima. U radu je provedena optimizacija koncentracije natrijevog alginata i kalcijevog klorida na inkapsulaciju sirila. U optimalnim uvjetima alginat je bio 1,5%, a CaCl_2 4%. U optimalnim uvjetima, učinkovitost inkapsulacije (EE%), kapacitet ispune (LC), veličina mikročestice i stupanj bubrenja (Sw) procijenjeni su na 56,8%, 80%, $1386,51 \pm 0,231$ mm odnosno 61,8%. Također, podaci o otpuštanju sirila (enzima) prilagođeni su Korsmeyer-Peppasovom modelu, a eksponent $n > 0,43$ upućuje da je kontrolni mehanizam otpuštanja anomalna transportna kinetika (kombinacija dvaju difuzijskih mehanizama i bubrenja i relaksacije polimernih lanaca). Elektrostatske interakcije između enzima, alginata i CaCl_2 potvrđene su infracrvenom spektroskopijom, a morfologija mikročestica je određena pomoću optičkog mikroskopa (OM) i pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM).

Ključne riječi: inkapsulacija, sirilo, mikrosfere, sirište, alginat

Summary

Of the master's thesis – student Ana Marija Aničić, entitled

ENCAPSULATION OF RENNIN IN SODIUM ALGINATE MICROSPHERES

Rennin is a form of enzyme preparation of animal, plant or microbial origin that is used in cheese production to induce milk coagulation. The natural rennet of animal origin was used for centuries until high demand resulted in development and use of microbial and GMO modified rennets in the last century. Natural rennet is produced from abomasum of young suckling calves, lambs, and goats. To increase the stability and long-term activity of the rennet, the process of encapsulating the rennet in alginate microparticle formulations is carried out, which achieves the immobilization and release of enzymes at certain time intervals. Even recently, the stabilization of rennet, especially in the case of accelerated cheese ripening, has been attracting considerable interest. In this work, the optimization of the concentration of sodium alginate and calcium chloride for the encapsulation of rennet was carried out. Under optimal conditions, alginate was 1.5% and CaCl_2 was 4%. Under optimal conditions, encapsulation efficiency (EE%), filling capacity (LC), microparticle size, and degree of swelling (Sw) were estimated to be 56.8%, 80%, 1386.51 ± 0.231 nm, and 61.8%, respectively. In addition, the data on rennet (enzyme) release were adapted to the Korsmeyer-Peppas model, and the exponent $n > 0.43$ indicates that the controlling mechanism of the release is anomalous transport kinetics (combination of two diffusion mechanisms and swelling and relaxation of polymer chains). Electrostatic interactions between the enzyme, alginate, and CaCl_2 were confirmed by infrared spectroscopy, and the morphology of the microparticle was determined using an optical microscope (OM) and a scanning electron microscope (SEM).

Keywords: encapsulation, rennet, microparticles, abomasum, alginate

1. Uvod

U proizvodnji sireva u svrhu koagulacije mlijeka koriste se sirila koja mogu biti biljnog, životinjskog ili mikrobnog porijekla. Prirodna sirila životinjskog porijekla sastoje se od enzima kimozina i pepsina koji se dobivaju ekstrakcijom iz stijenke sirišta mladih preživača. Kako bi se povećala stabilnost i dugotrajnija aktivnost sirila provodi se postupak inkapsulacije sirila u formulacije alginatnih mikročestica čime se postiže imobilizacija i otpuštanje enzima u određenim vremenskim intervalima. Prije procesa aplikacije alginatnih mikročestica ispunjenih sirilom potrebno je provesti postupak fizikalno-kemijske karakterizacije, efikasnosti inkapsulacije i dinamike otpuštanja sirila.

U ovom radu opisan je postupak inkapsulacije sirila u formulacije alginatnih mikročestica koje je korišten u proizvodnji sira. Inkapsulacija je proces kojim se aktivni sastojci, bilo tekući, čvrsti ili plinoviti, imobiliziraju u čestice koje kontrolirano otpuštaju aktivne sastojke. Cilj tog procesa je postizanje financijske i vremenske uštede u procesu proizvodnje sira kao i proizvodnju gotovog proizvoda s dodatnom vrijednošću. Ove navode potkrepljuje činjenica da se inkapsuliranjem aktivni sastojci unutar mikročestica štite od neželjenih vanjskih utjecaja te se sprječava isparavanje i gubitak aktivnih svojstava.

Za pripremu optimalnih mikročestica ispunjenih sirilom u ovom radu korišten je natrijev alginat, anionski polisaharid, koji ima sposobnost stvaranja zaštitne ovojnice između aktivnog sastojka i okoline te ekstrakt ovčjeg sirila izoliran iz sirišta janjadi s otoka Paga.

Nakon inkapsulacije određena je učinkovitost inkapsulacije (EE%), kapacitet inkapsulacije (LC%) i stupanj bubrenja (Sw%). Fizikalno-kemijska karakterizacija formulacija alginatnih mikročestica određena je optičko-fluorescencijskim mikroskopom (OM) te elektronskim pretražnim mikroskopom (SEM).

1.1. Cilj rada

Sirilo se u proizvodnji sireva koristi u svrhu koagulacije mlijeka. Danas se zbog velike potražnje najčešće koriste mikroba sirila i rekombinantni kimozin (iz GM organizama). Prirodno sirilo životinjskog porijekla se najčešće zahtjeva u proizvodnji autohtonih i sireva sa zaštitnim oznakama izvornosti ili zemljopisnog porijekla. Jedan od takvih je i Paški sir, zaštićen zaštitnom oznakom izvornosti (ZOI), te je za potrebe istraživanja proizveden uz inkapsulirano sirilo, čiji je postupak opisan u ovom radu.

S obzirom na to da sirilo u inkapsuliranom obliku nema geografsko ograničenje može se koristiti na lokalnoj, regionalnoj, europskoj i svjetskoj razini, a najveća vrijednost se nalazi upravo u proizvodnji „boutique“ sirila specifičnim za određene regije i lokaliteta pa će se samim time koristiti i sirevima sa zaštićenim oznakama izvornosti.

Cilj ovog diplomskog rada je detaljno fizikalno-kemijski okarakterizirati formulacije alginatnih mikročestica ispunjenih sirilom.

Specifični ciljevi ovog diplomskog rada su:

- 1) inkapsulirati sirilo dobiveno iz želudaca mlade janjadi u formulacije alginatnih mikročestica,
- 2) utvrditi otpuštanje sirila (enzima) iz formulacija alginatnih mikročestica,
- 3) odrediti vremensku aktivnost sirila u formulacijama alginatnih mikročestica.

2. Pregled literature

2.1. Sirilo

Jedan od važnijih sastojaka u proizvodnji sireva jest sirilo. Sirilo je pripravak enzima životinjskog, biljnog ili mikrobnog porijekla koji se koristi u proizvodnji sira za zgrušavanje kazeina iz mlijeka. Kimozin je enzim iz sirila životinjskog porijekla dok se u proizvodnji sirila mikrobnog porijekla iz nekih plijesni, kvasaca i bakterija izoliraju proteinaze. Osim ove dvije vrste sirila postoje i sirila koja se dobivaju izoliranjem renina iz biljaka kao što su čičak, artičoka i kopriava. Takvo sirilo najčešće se koristi u proizvodnji vegetarijanskih sireva.

Glavna komponenta prirodnog sirila životinjskog porijekla je kimoziin, ali u prodaji su pronađeni pripravci sirila s nekim drugim enzimima kao što je goveđi pepsin. Danas se u mljekarskoj industriji u tehnološkom procesu proizvodnje sira i mliječnih proizvoda za zgrušavanje mlijeka najčešće koristi kimoziin u smjesi s pepsinom (Salvadori del Prato, 2009; Mikulec, 2010). Proces izolacije i formulacije sirila je komercijaliziran prije više od stoljeća, ali su enzimi iz sirišta još uvijek važni u mliječnoj industriji (Hellmuth i sur., 2013).

Želudac, odnosno sirište mladog preživača hranjenog samo mlijekom sadrži od 80-90 % kimoziina i 10-20 % pepsina. Kimozin služi u probavi majčinog mlijeka i kod starijih životinja i onih hranjenim drugom hranom taj omjer se mijenja, postotak kimoziina se smanjuje i pojavljuju se i neki drugi enzimi koji mogu izazvati pogreške u siru i kvarenje sira.

2.2. Proizvodnja domaćeg sirila

Korištenje prirodnih sirila najčešće se zahtjeva u proizvodnji autohtonih sireva i onih zaštićenih oznakom izvornosti (PDO - Protected Designation of Origin) kod kojih je primjena takvog sirila strogo propisana. Danas se koriste sirila koja su smjesa kimoziina i pepsina u omjeru 80:20 (Oštarić i sur., 2015).

Kimoziin se može pronaći u fetusima starim 6 mjeseci, a njegova količina se povećava između devetog i trećeg ili četvrtog mjeseca nakon poroda, a razlog izlučivanja kimoziina u želucu novorođenih preživača je koagulacija mlijeka kojom se omogućuje sisajućim jedinkama iskorištavanje više hranjivih tvari (Oštarić i sur., 2022). Lučenje enzima proporcionalno je broju sisanja čime se može zaključiti da se kimoziin proizvodi jedino u sirištu isključivo sisajućih jedinki (Dukes, 2004).

Prirodno sirilo dobiva se iz sirišta mlade sisajuće teladi, janjadi, jaradi. Sirište izlučuje sirišni enzim u svom srednjem dijelu, dok gornji dio sirišta nema enzima, a donji ima vrlo malo i sluzav je pa je iz njega teško dobiti sirilo (Šabec, 1953). Priprema sirišta za dobivanje sirila je kompleksan proces koji zahtjeva posebnu pažnju. Sirišta, osim sirišnih enzima, sadrže i razne bakterije koje mogu biti poželjne i nepoželjne. Bakterije mliječne kiseline poput *Lactobacillus fermenti* i *Lactobacillus acidophilus* neke su od bakterija koje su poželjne i sudjeluju u procesu zrenja tvrdih sireva. Suprotno njima bakterije poput *Escherichia coli* su nepoželjne i mogu uzrokovati pogreške sireva. Prilikom odabira sirišta važno je da se odabiru sirišta od sisajuće janjadi, obzirom da sirište mladih životinja koje su se počele hraniti voluminoznom krmom

sadrže manje kimoizina. Osim toga važno je odabrati zdrave jedinke (Šabec, 1953). Nakon odabira jedinke od kojih će se sirišta uzeti slijedi klanje te nakon toga postupak odvajanja sirišta od ostalog dijela želuca. Pri tom postupku važno je ne pritiskati sirište kako bi se sirišni sokovi zadržali unutar njega. Nakon čišćenja, sirište se reže i suši (Šabec, 1953).

2.3. Svojstva i karakteristike janječeg sirila

pH sirila ovisi o vrsti i uvjetima skladištenja pripremljenog sirila te samom postupku pripreme, a prema literaturi pH sirila kod kojeg su sirišni enzimi najstabilniji iznosi 5,5 (Moscopoulou, 2011). Sadržaj NaCl-a varira između 6,5 % i 13,46 % dok se sadržaj proteina kreće od 1,5 % do 1,99 %, a masti između 3,22 % i 3,65 % (Moscopoulou, 2011).

Boja sirila malih preživača uglavnom ovisi o vrsti hranidbe pa je tako sirilo životinja hranjenih samo mlijekom bijele boje, dok je sirilo životinja hranjenih travom zelenkaste boje (Moscopoulou i sur., 2009).

Tekstura i viskoznost tekućeg sirila ovise o vrsti pripreme. Tekstura može biti gruba i osim mliječnih sastojaka sadržavati i komadiće druge hrane. Sirila su uglavnom viskozna, a viskoznost ovisi o omjeru sirišta i ekstrakcijske otopine (Moscopoulou, 2011).

2.4. Mikroinkapsulacija

Inkapsulacija je proces kojim se aktivni sastojci, bilo tekući, čvrsti ili plinoviti, imobiliziraju u čestice koje kontrolirano otpuštaju aktivne sastojke (Gallo i Carbo, 2010), odnosno proces zarobljavanja jedne tvari unutar druge (Zuidam i Nedović, 2010). Sam proces inkapsuliranja omogućuje osjetljivim sastojcima obavljanje zaštitnim materijalom kako bi se aktivni sastojci unutar mikročestica zaštitili od vanjskih utjecaja, gubitaka isparavanjem i zadržali svoja svojstva (Ferrándiz i sur., 2017). Postoji više metoda inkapsulacije, a one se mogu podijeliti na fizikalne (sušenje raspršivanjem, centrifugalna ekstruzija, sferizacija ekstruzijom, procesi koji koriste superkritične fluide), fizikalno-kemijske (ionsko geliranje, hlađenje raspršivanjem, ekstrakcija otapala isparavanjem, jednostavna i kompleksna koacervacija) i kemijske (granična polimerizacija, umrežavanje, in situ polimerizacija itd.) (Gallo i Carbo, 2010; Teixeira da Silva i sur., 2014).

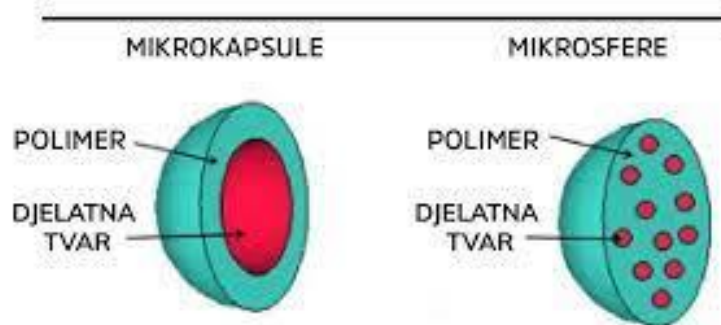
Tvar koja se inkapsulira naziva se jezgra, aktivno sredstvo, punjenje ili unutarnja faza, a tvar u koju se inkapsulira naziva se membrana, ljuska, nosač, vanjska faza ili matriks. Čestice nastale inkapsulacijom se s obzirom na veličinu mogu podijeliti na nanočestice (10-1000 nm), mikročestice (2-2000 μm) i makročestice (> 2000 μm) (Singh i sur. 2010). Nastale čestice mogu biti pravilnog i nepravilnog oblika, a obzirom na morfologiju mogu se klasificirati kao mononuklearne i polinuklearne kapsule i sfere (Gallo i Carbo, 2010). Mononuklearne kapsule imaju jezgru koja je okružena membranom, polinuklearne imaju više jezgri unutar membrane, dok je sfera jezgra bez membrane ili bilo kojeg drugog vanjskog sloja. Uz ove tri osnovne klasifikacije, kapsule mogu biti i dvojezgrene i višeslojne mikrokapsule s jednom jezgrom ili mogu formirati skupinu kapsula (Kumar Das i sur., 2011).

Sirilo (enzim) je unutar mikročestice zaštićeno, zadržava svoju aktivnost te se primjena inkapsulacije sirila u proizvodnji sireva smatra pouzdanom metodom. Interes za ovaj postupak

je u porastu jer sirilo (enzim) koje se nalaze unutar mikročestice pokazuju poboljšanu toleranciju na toplinu, produljenu vitalnost i poboljšano produljenu aktivnost u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima (Kailasapathy, 2002; Santillo i sur., 2012). Inkapsulirani sastojci također osiguravaju produljenje roka trajnosti proizvoda (Riaz i Masud, 2013).

2.4.1. Mikročestice (mikrosfere)

Mikročestice odnosno mikrosfere su sferne čestice veličine 2-2000 μm . Ako su dobro pripremljene, sposobne su za očuvanje stabilnosti i biološke aktivnosti inkapsuliranog sastojka. Ovisno o tome nalazi li se djelatna tvar u jezgri čestice ovijene polimernom ovojnicom ili je dispergirana u polimernom matriksu možemo razlikovati mikrokapsule i mikrosfere (slika 2.4.3.). Najčešće se pripremaju fizikalnim, fizikalno kemijskim te kemijskim metodama. U fizikalne metode spadaju sušenje raspršivanjem i centrifugalna ekstruzija, u fizikalno kemijske metode ubrajamo ionsko geliranje, hlađenje raspršivanjem, jednostavna i kompleksna koacervacija dok su kemijske metode *in situ* polimerizacija i dr. (Blanco i sur., 2005; Bao i sur., 2006; Rizkalla i sur., 2006).



Slika 2.4.3. Prikaz mikrokapsula i mikrosfera (Prilagođeno prema Paulo i Santos, 2017)

Za učinkovitu inkapsulaciju tvari važno je odabrati odgovarajuće nosače. Oni se biraju prema različitim kriterijima, a u njih spadaju fizikalno-kemijska svojstva tvari za inkapsuliranje (poroznost, topljivost) i nosača za inkapsulaciju (viskoznost, mehanička svojstva), kompatibilnosti između te dvije tvari (stijenka materijala treba biti netopljiva i ne smije reagirati sa sastojkom koji se inkapsulira) te zamišljena veličina mikročestice (Boras, 2019).

U prehrambenim proizvodima koriste se nosači poput natrijevog alginata koji ima sposobnost stvaranja zaštitne ovojnice između aktivnog sastojka i okoline. Pokazuje visoku žilavost i ima značajan učinak na mehaničku stabilnost mikročestica (Ferrándiz i sur., 2017). Natrijev alginat je biopolimer, anionski polisaharid sastavljen od dvije ponavljajuće karboksilne jedinice, α -L-guronske i β -D-manuronske kiseline koje su povezane α -glikozidnom vezom i tako vezane jedna na drugu stvaraju različite kompleksne polielektrolitne strukture (Racovitá i sur. 2009).

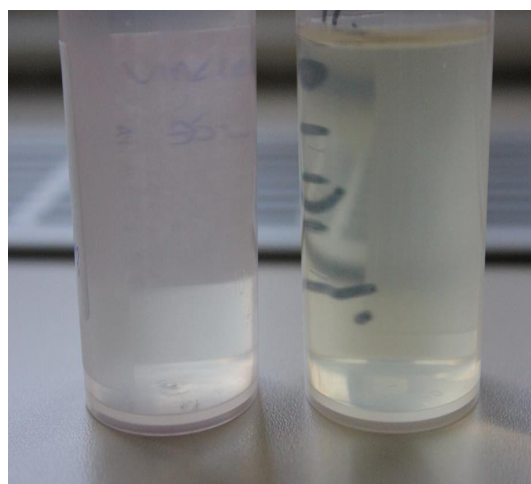
3. Materijali i metode

3.1. Proizvodnja domaćeg sirila

Nakon čišćenja i sušenja sirište je izrezano na rezance debljine 5-10 mm i stavljeno u 6%-tnu otopinu NaCl-a i destilirane vode. Omjer sirišta i otopine NaCl-a bio je 1:8. Nakon 24 sata ekstrakt je filtriran i dodano je 50% otopine od prethodnog dana. Sljedeći dan ponovljen je postupak te je ekstrakt ponovno filtriran i dodano je 50% otopine od prethodnog dana. Nakon 72 sata ekstrakt je ponovno filtriran i svi alikvoti su pomiješani i centrifugirani 45 min na 16 000 – 20 000 g kako bi se uklonile sve nečistoće. Nakon ekstrakcije, zimogen je aktiviran u aktivni oblik enzima snižavanjem pH ekstrakta na 2 tijekom 30 min s HCl, a zatim je naštiman na pH 5,5 s NaOH (Kiš i sur., 2023). Slika 3.1. a) prikazuje unutrašnjost janječeg sirišta, a slika 3.1. b) pripremljeno domaće sirilo.



a)



b)

Slika 3.1. a) Unutrašnjost janječeg sirišta i b) Domaće sirilo (lijevo - sirilo dobiveno iz sirišta janjadi starosti ≈ 20 dana; desno - sirilo dobiveno iz sirišta janjadi starosti ≈ 10 dana),
Izvor: Oštarić i sur., 2015.

3.1.1. Određivanje jačine sirila

Jačina sirila i omjer enzima kimozina i pepsina određeni su prema relevantnim ISO standardima, a za samu analizu korišten je supstrat mlijeka u prahu koji je pripremljen prema istim ISO standardima (ISO 23058:2007, ISO 15163:2012).

3.2. Otopine i puferi

3.2.1. Citratni pufer (0,2 M NaHCO₃, 0,06 M Na₃C₆H₅O₇ x 2 H₂O)

Citratni pufer (0,2 M NaHCO₃, 0,06 M Na₃C₆H₅O₇ x 2 H₂O) je pripremljen otapanjem 16,80 g NaHCO₃ i 17,65 g Na₃C₆H₅O₇ x 2 H₂O u 1000 ml destilirane vode. Za inkapsulaciju sterilnih mikročestica (mikročestice koje su sadržavale sirilo) pufer je steriliziran u autoklavu pri 121 °C kroz 15 min.

3.2.2. Etanol (70 % i 96 %)

Etanol (70 %) je dobiven miješanjem 729,16 ml etanola (96 %) i 270,84 ml destilirane vode, odnosno sterilne destilirane vode za inkapsulaciju sterilnih mikročestica.

3.2.3. Fiziološka otopina (0,85 %)

Fiziološka otopina (0,85 %) pripravljena je otapanjem 8,5 g NaCl (Merck, Njemačka) u 1000 ml destilirane vode, nakon čega je sterilizirana u autoklavu pri 121 °C kroz 15 minuta.

3.2.4. Kalcijev klorid (CaCl₂, 4 %)

Kalcijev klorid (1 M) (Fluka™, Njemačka) pripremljen je otapanjem 4 g CaCl₂ u 100 ml destilirane vode. Kalcijev klorid koji se koristio za inkapsulaciju sterilnih kapsula je steriliziran autoklaviranjem pri 121 °C kroz 15 min.

3.2.5. Natrijev alginat (1,5 %)

Natrijev alginat je pripremljen otapanjem 15 g natrijevog alginata u 1000 ml destilirane vode. Otopina je sterilizirana u autoklavu pri 121 °C kroz 15 min.

3.2.6. Mucosol® (2 %)

Radna otopina Mucosol® (2 %, Sigma-Aldrich, Njemačka) pripravljena je miješanjem 20 ml Mucosol otopine i 980 ml sterilne destilirane vode.

3.3. Električni naboj i veličina čestica sirila

Električni naboj i zeta potencijal (ζ /mV) čestica sirila suspendiranih u vodi i otopini kalcijevog klorida izmjerene su pomoću Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Navedeni uređaj pomoću Henryove jednadžbe ($u = (2\varepsilon\zeta f(Ka))/3\eta$) sa $f(Ka) = 1,5$ (Smoluchowski aproksimacija)) mjeri elektroforetsku pokretljivost (u) i izračuna zeta potencijal (ζ) agregata. Zeta potencijal je uzet kao srednja vrijednost od tri do šest mjerenja.

DLS mjerenja provedena su pod kutem raspršivanja od 173°. Funkcija korelacije intenziteta analizirana je korištenjem softvera CONTIN za kvantificiranje raspodjele agregata (Provencher, 1982). Hidrodinamički promjer (d) procijenjen je Einstein-Stokesovom jednadžbom koja glasi:

$$d = \frac{kBT}{6\pi\eta D}$$

gdje je kB Boltzmannova konstanta, T temperatura, η viskoznost otapala, a D vidljivi difuzijski koeficijent translacije, prilikom čega je uzeta pretpostavka da je agregat sferičan.

Distribucije veličine su prikazane kao raspodjela volumena budući da u polidisperznoj suspenziji distribucija veličine intenziteta koju daje DLS precjenjuju udio većih čestica. U vrlo polidisperznom uzorku i/ili kod jakih međudjelovanja čestica, značenje prosječne veličine

čestica nije izravno (Viseau i sur., 2001). Zbog toga su primijenjeni podaci volumne raspodjele samo kao sredstvo potvrđivanja prisutnosti agregata, kako bi se odredile relativne distribucije veličine čestica u otopinama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje tri do šest mjerenja.

3.4. Inkapsulacija janječeg sirila metodom ionskog geliranja

Prije procesa inkapsulacije sirilo je u liofiliziranom obliku (Slika 3.2. a). 20 g takvog sirila otopljeno je u 100 mL sterilne vode, a u nastaloj otopini otopljeno je 4g CaCl₂ (Slika 3.2. b).



a)

b)

Slika 3.2. a) Liofilizirano ovčje sirilo, b) Otopina ovčjeg sirila

U ovom radu mikročestice su pripravljene metodom ionskog geliranja na inkapsulatoru (Encapsulator Büchi-B390, BÜCHI Labortechnik AG, Švicarska, slika 3.3.).



Slika 3.3. Proces inkapsulacije metodom ionskog geliranja na inkapsulatoru

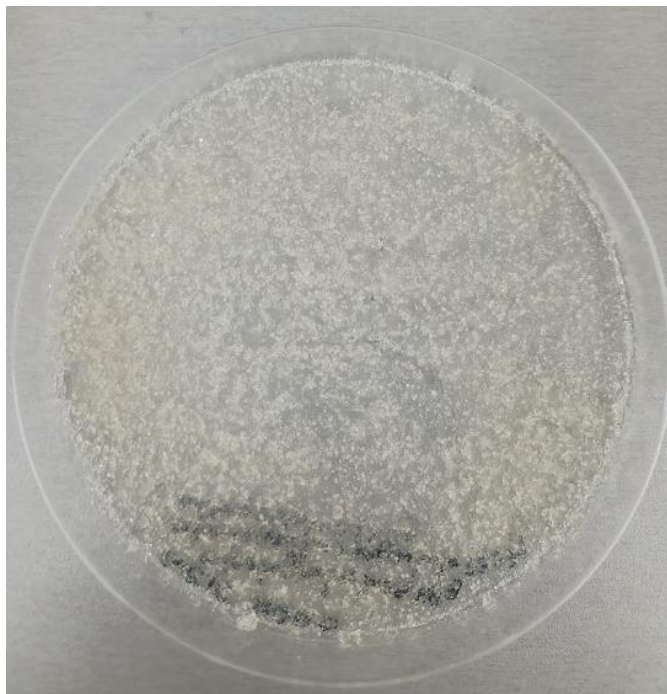
Kao sredstvo za inkapsulaciju korišten je 1,5%-tni natrijev alginat. Natrijev alginat dokapavan je u 50 mL otopine sirila. Nakon završene inkapsulacije, nastale mikročestice miješane su na mješalici 30 min (slika 3.4.). Nakon miješanja mikročestice se profiltrirane kroz muslin (Slika 3.5.), isprane sterilnom vodom te prebačene u Petrijevu zdjelicu (Slika 3.6.).



Slika 3.4. Miješanje mikročestica na mješalici



Slika 3.5. Filtriranje mikročestica kroz muslin



Slika 3.6. Mikročestice u Petrijevoj zdjelici

3.5. Fourierova transformacija infracrvene spektroskopije

Fourierovom transformacijom infracrvene spektroskopije (FTIR) zabilježeni su spektri FTIR instrumentom - Cary 660 FTIR (MIR sustav) (Agilent Technologies, USA). Kako bi se dobile gel pelete, uzorci su miješani kalijevim bromidom. Spektralno skeniranje provedeno je u rasponu od $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$.

3.6. Mikroskopska promatranja

Prosječan promjer i oblici mikrosfera promatrani su stereomikroskopom Leica MZ16a (Leica Microsystems Ltd., Švicarska) pomoću Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, verzija E_LCmicro_09Okt2009. Promjeri su mjereni na oko 100 mikrosfera.

3.7. Metode fizikalno-kemijske karakterizacije mikrosfera

3.7.1. Učinkovitost inkapsulacije

Učinkovitost inkapsuliranja (EE) izračunata je korištenjem jednadžbe prema metodi (Bhunchu i sur., 2015). Izražena je kao postotak ukupno dostupnog kalcija u mikrosferama, a može se izračunati prema sljedećoj jednadžbi:

$$EE = \frac{E(t) - E(s)}{E(s)} \times 100$$

gdje EE označava učinkovitost inkapsulacije, Et ukupna količina enzima (mg), a Es se odnosi na količina enzima u supstratu nakon centrifugiranja.

3.7.2. Kapacitet inkapsulacije

Kapacitet inkapsulacije definiran je kao sadržaj sirila po gramu suhих mikro kapsula. Vlažne mikro kapsule ispunjene sirilom sušene su na zraku na sobnoj temperaturi nekoliko dana dok sva tekućina nije isparila.

Sadržaj sirila unutar mikročestica određen je otapanjem 0,5 g mikročestica u 25 ml smjese 16,80 g (0,2 mol dm⁻³) NaHCO₃ i 17,65 g (0,06 mol dm⁻³) Na₃C₆H₅O₇·2H₂O. Kapacitet ispune mikročestica sirilom LC_S izražen je kao količina sirila po gramu suhих mikročestica i izračunat prema sljedećoj jednadžbi:

$$LC_S = \frac{c_{NS} \times V}{w_c}$$

gdje c_{NS} koncentracija sirila u uzorku, V volumen uzorka, a w_c težina mikročestica. Mjerenja su ponovljena tri puta.

3.7.3. Stupanj bubrenja

Stupanj bubrenja mikročestica ovisi o više čimbenika. Neki od njih su svojstva medija za otapanje svojstava natrijevog alginata koja uključuju molekulska masu, koncentraciju, vrijeme formiranja membrane i tehnologiju pripreme. Kako bi se izbjegao utjecaj elektrolita iz puferskih otopina, stupanj bubrenja određen je na mikročesticama dispergiranim u deioniziranoj vodi. Mikročestice se dispergiraju u čaši s 10 mL deionizirane vode na sobnoj temperaturi tijekom tri sata. Mokra težina nabubrenih mikročestica određuje se upijanjem

tekućine filter papirom da se ukloni vlaga s površine nakon čega se važu. Stupanj bubrenja se računa prema jednadžbi:

$$Sw\% = \frac{w_t - w_0}{w_0}$$

gdje Sw označava stupanj bubrenja, w_t masu nabubrenih mikročestica, a w_0 početnu masu mikročestica. Mjerenja su ponovljena tri puta.

3.7.4. In vitro otpuštanje sirila iz mikrosfera

Istraživanja in vitro otpuštanja sirila (enzima) iz ALG/Ca i ALG/(Ca + sirilo) ispitivana su dispergiranjem mikročestica u deioniziranoj vodi i ostavljanjem da stoje tijekom pokusa, bez miješanja, na sobnoj temperaturi. Uzorci su sadržavali 30 g mikročestica dispergiranih u 100 mL deionizirane vode. Uzorci su miješani 60 sekundi u određenim vremenskim intervalima, uzeti su alikvoti, a koncentracija je određena spektrofotometrijski. Rezultati su prikazani kao frakcija otpuštenih čestica sirila i izračunati pomoću jednadžbe:

$$f = \frac{R_t}{R_{tot}}$$

gdje f predstavlja frakciju otpuštenih čestica sirila, R_t predstavlja količinu čestica sirila otpuštenih u vremenu t , a R_{tot} ukupnu količinu čestica sirila ili kalcija u mikročesticama. Mjerenja su ponovljena tri puta i prikazana su uz standardnu devijaciju.

4. Rezultati i rasprava

Inkapsulacija sirila u formulacije alginatnih mikročestica metodom ionskog geliranja uspješno je provedena. U prvom dijelu rezultati su prikazani analiziranjem međudjelovanja sirila, kalcijevih iona i natrijevog alginata, dok su u drugom dijelu prikazani kroz fizikalno-kemijsku karakterizaciju mikrosfera.

4.1. Jačina sirila

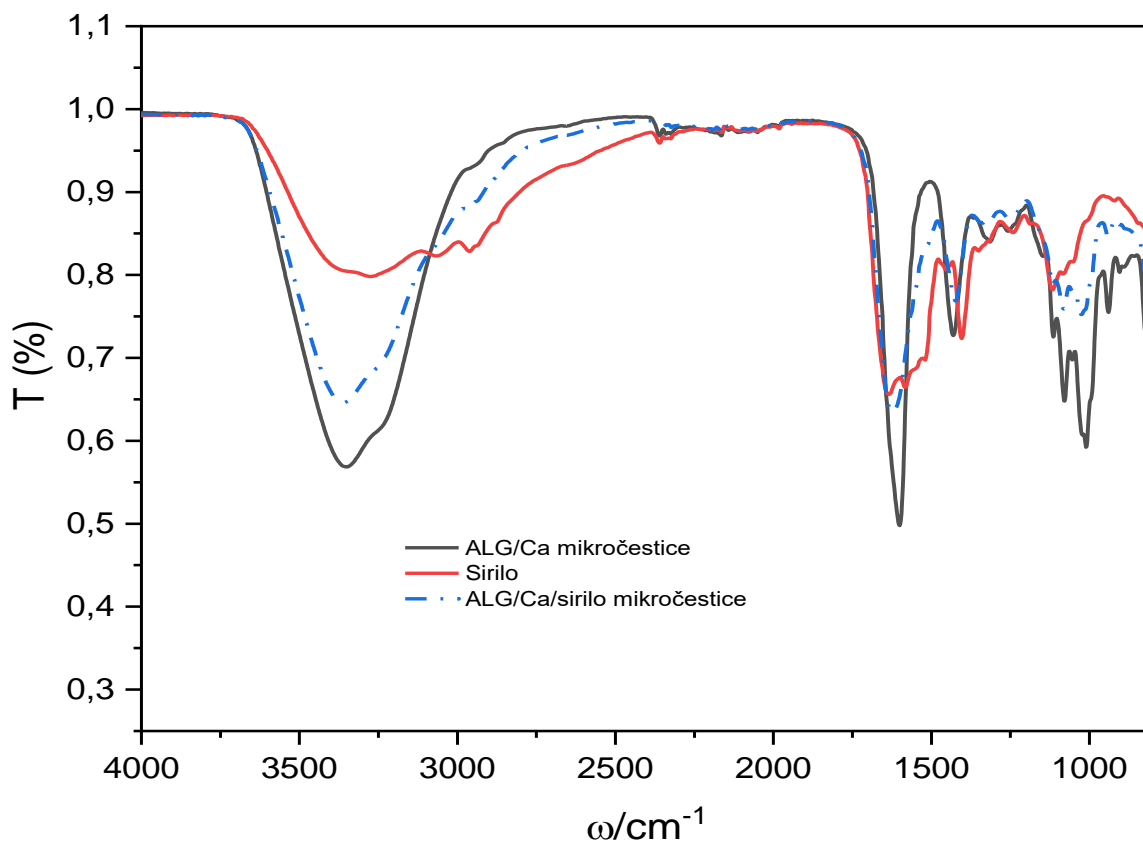
Proizvedeno janjeće sirilo ima potencijal u očuvanju bioraznolikosti i iskorištavanju proizvoda životinjskog porijekla, a janjeće sirilo je najbolje za takvu vrstu zgrušavanja mlijeka (Kiš i sur, 2023). Jačina proizvedenog sirila iznosila je 1800 IMCU/g što je više od jačine većine ostalih prirodnih sirila na tržištu, a omjer kimozina i pepsina koji je iznosio 80:20% optimalan je za proizvodnju tvrdih sireva te sireva sa dužim zrenjem.

4.2. Međudjelovanja sirila, kalcijevih iona i natrijevog alginata

Istražen je utjecaj dodatka različitih količina kalcijevog klorida na stvaranje sirnog gruša. Iako su učinci dodatka kalcija česta praksa u proizvodnji sireva, pojedinosti o tome kako kalcij utječe na agregaciju kazeina nisu do kraja razjašnjene. U sirarskoj industriji kalcijev klorid se dodaje mlijeku radi poboljšanja teksture i prinosa sirnog gruša. Na taj način smanjuje se vrijeme koagulacije, a dodatak kalcijeva klorida smanjuje pH mlijeka pri čemu se povećava brzina enzimskih reakcija (Sandra i sur., 2012).

4.2.1. Identifikacija međudjelovanja iona kalcija, sirila (enzima) i natrijevog alginata

Informacije o elektrostatskim međudjelovanjima u formulacijama lofiliziranih mikročestica kalcijevog alginata (Ca/ALG) i kalcijevog alginata ispunjenih sirilom (Ca/ALG/Sirilo) dobivene su usporedbom FTIR spektara formulacija i sirila (Slika 4.2.1.).



Slika 4.2.1.. FTIR spektri suhих formulacija mikročestica kalcijevog alginata (Ca-ALG – crna linija), sirila (crvena linija) i suhих formulacija mikročestica kalcijevog alginata ispunjenih sirilom (Ca-ALG/Sirilo – plava linija)

FTIR spektar sirila se sastoji od karakterističnih vrpca koje odgovaraju pojedinim funkcionalnim skupinama koje se nalaze u enzimima. Sirilo je ekstrakt probavnih enzima životinjskog podrijetla, a sastoji se od kimoizina i pepsina. Ako je pripremljen iz želuca mlade teladi sadržava 80-90 % kimoizina i 10-20 % pepsina. Udio pepsina povećava se sa starošću životinja, a ovisi i o njihovoj prehrani. Karakteristične vrpce se javljaju pri približno 3362 cm^{-1} što odgovara vibracijama istezanja -NH veza, dok vrpca pri 1645 cm^{-1} odgovara području amid I veze koja je prisutna u strukturama enzima. Također pikovi u području između $1416\text{--}1491\text{ cm}^{-1}$ odnose se na vibracije istezanja – CN amid II u u strukturi enzima što je u skladu s prethodnim istraživanjima (Barth, 2007).

FTIR spektar suhих mikročestica kalcijevog alginata (Ca-ALG) pokazuje karakteristične vrpce pri 3345 cm^{-1} što odgovara vibracijama istezanja -OH grupe natrijevog alginata. Također pik pri 2964 cm^{-1} odgovara vibracijama istezanja -CH grupe natrijevog alginata. Pikovi pri 1414 cm^{-1} i 1624 cm^{-1} predstavljaju simetrično i asimetričnu vibraciju istezanja karboksilne grupe natrijevog alginata dok pik pri 1024 cm^{-1} pripada -COC grupi. Iz navedenog FTIR spektra suhих mikročestica Ca-ALG moguće je uočiti da su primarna međudjelovanja pri nastajanju formulacija elektrostatske prirode, te da važnu ulogu u stvaranju mikročestica imaju i vodikove veze.

Inkapsulacijom sirila u mikročestice Ca-ALG dolazi do značajnih promjena u intenzitetu vrpca FTIR spektra u usporedbi s FTIR spektrom mikročestica Ca-ALG. Promijene u intenzitetu pikova dolazi zbog toga što je sirilo (smjesa enzima) negativno nabijeno ($-14,38 \pm 1,402$ mV) te je veličina čestica sirila ($35,26 \pm 7,67$ nm), što utječe na strukturu polimerne mreže, razdvajanje polimernih lanaca natrijevog alginata te promijene u vodikovim vezama. Pik pri 3345 cm^{-1} odgovara vibraciji istezanja -NH grupe enzima što je indicacija da je sirilo uspješno inkapsulirano u Ca-ALG mikročestice. Također pik pri 1625 cm^{-1} predstavlja vibraciju istezanja -CO grupe amine veze I koja je prisutna u sirilu. Iz svega navedenog može se uočiti da najvažniju ulogu u stvaranju formulacija imaju elektrostatska međudjelovanja i vodikove veze (Hosseini i Varidi, 2021).

4.3. Fizikalno-kemijska karakterizacija mikrosfera

4.3.1. Učinkovitost i kapacitet inkapsulacije te stupanj bubrenja

Učinkovitost inkapsulacije sirila i kapacitet punjenja su određeni kako bi se dobili podaci o sadržaju sirila u mikročesticama. Podaci su prikazani u Tablici 1.

Tablica 1. Vrijednosti učinkovitosti (EE%) i kapaciteta inkapsulacije (LC%) sirila u mikročestice kalcijeva alginata (Ca/ALG/sirilo)

Uzorak	LC%	SD%	EE%	SD%
Ca/ALG/sirilo	80	± 2	56,8	$\pm 3,8$

Vrijednosti LC% su izuzetno visoke i potvrđuju mogućnost inkapsulacije sirila u alginatne mikročestice procesom ionskog geliranja natrijevog alginata s kalcijevim kloridom pri stalnim koncentracijama.

Kada su mikročestice dispergirane u vodi počinju pokazivati svojstvo bubrenja. Bubrenje uzrokuje promjenu svojstava mikročestica kao što su mehanička čvrstoća, propusnost, oslobađanje aktivnih tvari, stabilnost i raspad formulacija mikročestica (Jurić i sur., 2021).

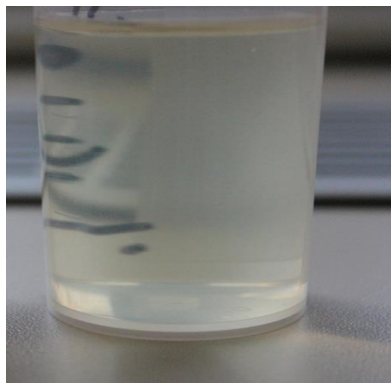
Stupanj bubrenja S_w mikročestica ispunjenih sirilom je iznosio $53,88 \pm 3,71\%$ dok je stupanj bubrenja mikročestica bez sirila iznosio $48,07 \pm 12,21\%$.

Gel bubri kada postoji vanjski pritisak (tj. pritisak bubrenja) uslijed djelovanja otapala. U ravnoteži tlak bubrenja postaje jednak nuli zbog ravnoteže između dviju suprotstavljenih tendencija: običnog povećanja entropije koji je rezultat miješanja polimera i otapala, te smanjenje entropije zbog do izobličenja (tj. širenja) mreže (Davidovich-Pinhas i Bianco-Peled, 2010). Vrijednost stupnja bubrenja mikročestica ispunjenih sirilom (ALG/Ca/sirilo) pokazuje relativno visoke vrijednosti zato što prisutnost kalcija ima utjecaj na povećanu koagulaciju sirila, te dolazi do stvaranja tzv. kalcijevih mostova što uzrokuje sniženje gustoće gel mreže, stupnja umreženja te time i rast stupnja bubrenja S_w kao što je uočeno i tijekom inkapsuliranja spora *Trichoderme viride* i stanica bakterija *Lactobacillus sakei* LS0296 soj (Jurić i sur., 2021). To se može pripisati elektrostatičkom odbijanju između negativno nabijenog enzima sirila i slobodnih dijelova alginatnih lanaca (zeta potencijal matriksa kalcijevog alginata je oko -10 V) (Rokstad i sur., 2014) kao i mehaničkim interakcijama.

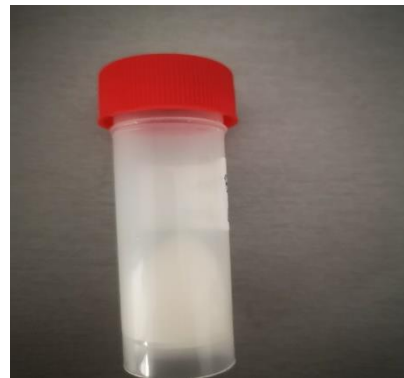
Tijekom geliranja, kalcijevi kationi kooperativno djeluju s α blokom skupine L-guluronske kiseline stvarajući ionska umreženja između različitih polimernih lanaca. Stupanj bubrenja hidrogelova je ograničen umreženjima i S_w se može koristiti kao mjera za opseg umrežavanja.

4.3.2. Morfologija i veličina mikrosfera

Prije provođenja procesa inkapsulacije janječeg sirila u mikrosfere proveden je postupak njegove liofilizacije čime se prevodi iz tekućeg u praškasti (kruti) oblik. Liofilizacijom dolazi i do promijene boje uzorka tekućeg sirila (svjetlo žuta boja), te nastaje praškasti uzorak bijele boje (Slika 4.3.1 a i b).



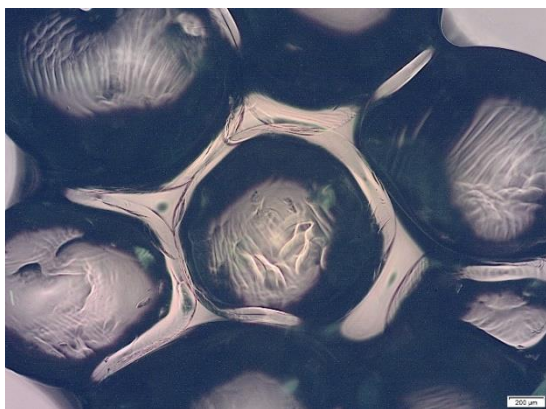
a)



b)

Slika 4.3.1. a) tekuće janjeće sirilo i b) liofilizirano janjeće sirilo

Procesom inkapsulacije sirila u biopolimerni matriks natrijevog alginata uz pomoć djelovanja kalcijevog iona kao gelirajućeg kationa nastaju sferične mikročestice. Na slici 4.3.2. a) i b) su prikazane mikročestice Ca/ALG i Ca/ALG/sirilo nastale inkapsulacijom procesom ionskog geliranja.



a)



b)

Slika 2.3.2. Mikrofotografije a) Ca/ALG i b) Ca/ALG/sirilo

Iz prikazanih mikrofotografija lako je moguće uočiti promjenu u obliku, morfologiji i boji mikročestica koje su ispunjene sirilom. Mikročestice koje nisu ispunjene sirilom su sferične, prozirne boje s površinom koja je naborana koja je posljedica procesa ionskog

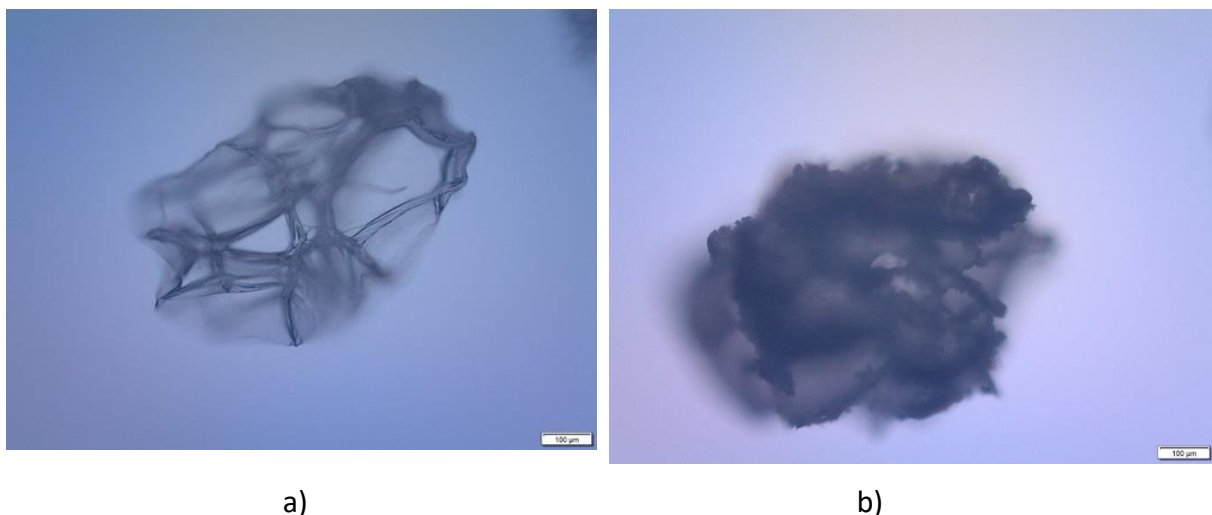
geliranja natrijevog alginata i gelirajućeg kalcijevog kationa. Naborana struktura površine mikročestica bez sirila može se objasniti zbog različite koncentracije natrijevog alginata na površini i u unutrašnjosti mikročestice što je u skladu s prethodnim istraživanjima (Jurić i sur., 2021).

Mikročestice ispunjene sirilom poprimaju nepravilnu sferičnu strukturu, s glatkom površinom te su bijele boje. Opažene promijene su posljedica međudjelovanja sirila koje je inkorporirano u biopolimerni matriks natrijevog alginata.

Općenito, veličina i ujednačenost veličina mikrosfera uglavnom je određena eksperimentalnim uvjetima pripreme (viskoznošću otopine alginata, promjerom vrha igle (mlaznice) kroz koju se otopina dodaje, koncentracijom kalcijevog klorida, brzine protoka otopine alginata i udaljenost od šprice (mlaznice) do kupelji s gelirajućim kationom (Blandino i sur., 2000).

Pripremljene mikročestice su prosječno približno milimetarske veličine. Prosječna veličina mikročestica ispunjenih sirilom iznosi $1386,51 \pm 0,231$ mm a bez sirila iznosi $1181,21 \pm 0,153$ mm. Nešto veće vrijednosti veličina mikročestica koje su ispunjene sirilom se može objasniti elektrostatskim međudjelovanjem između sirila koje negativno nabijeno ($-14,38 \pm 1,402$ mV) i pozitivno nabijenog kalcijevog iona. Dodatkom kalcijevog iona u otopinu sirila postiže se bolja agregacija i koagulacije sirila jer kalcijevi ioni drži proteinsku strukturu na okupu što uzrokuje promjenu veličine mikročestica, ali i njihove boje te morfologije (Sandra i sur., 2012) (Pawlos i sur., 2021).

Liofiliziranjem mikročestica ALG/Ca i ALG/Ca/sirilo gube na svojoj sferičnosti, te mikročestice poprimaju nepravilnu strukturu koja ima poroznu strukturu. Do promjene u obliku, veličini i morfologiji dolazi kao posljedica potpunog gubitka vode i vlage. Na slici 4.3.3. prikazane su mikrofotografije liofiliziranih mikročestica ALG/Ca i ALG/Ca/sirilo.



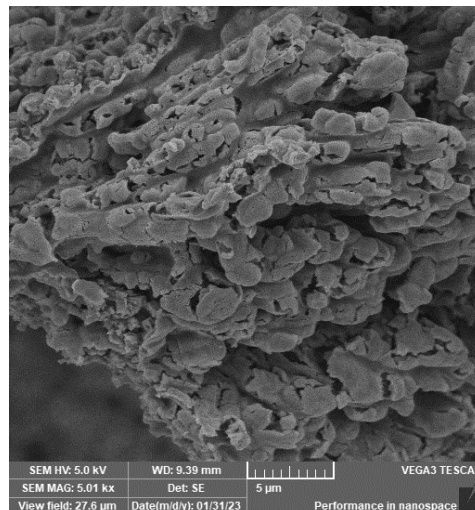
Slika 4.3.3. Mikrofotografije liofiliziranih mikročestica; a) ALG/Ca i b) ALG/Ca/sirilo

Gubitkom vode i vlage dolazi i do drastičnog smanjenja veličine mikročestica te poprimaju mikrometarske veličine. Prosječna veličina liofiliziranih mikročestica ALG/Ca iznosi $542,31 \pm 0,69$ µm, te ALG/Ca/sirilo iznosi $861,61 \pm 43,21$ µm. Potpunim gubitkom vode i vlage

prosječna veličina se smanjuje za više od 60%. Morfologija i površina se intenzivno mijenjaju te površina postaje gruba, porozna i slojevita. Također boja liofiliziranih mikročestica ALG/Ca je prozirna, dok boja liofiliziranih mikročestica ALG/Ca/sirilo bijela i posljedica je inkapsulacije sirila.

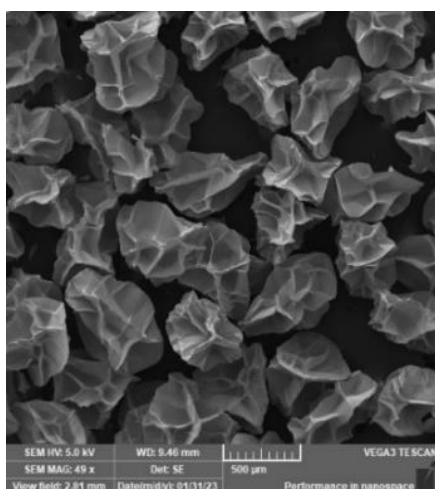
Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) je dala daljnji uvid u oblik, veličinu i morfologiju pripremljenih formulacija liofiliziranih mikročestica ALG/Ca, ALG/Ca/sirilo te sirila.

Lako se može učiti da je mikrostruktura liofiliziranog ovčjeg sirila porozna, slojevita i rahla, te se mogu učiti otvori na krajevima strukture (Slika 4.3.4.) (Bensalah i Acem, 2022).

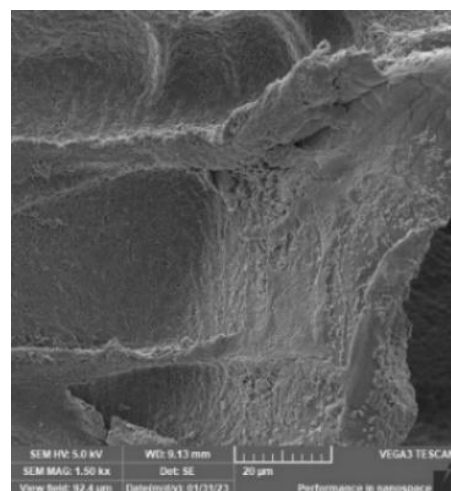


Slika 4.3.4. SEM mikrofotografije liofiliziranog ovčjeg sirila

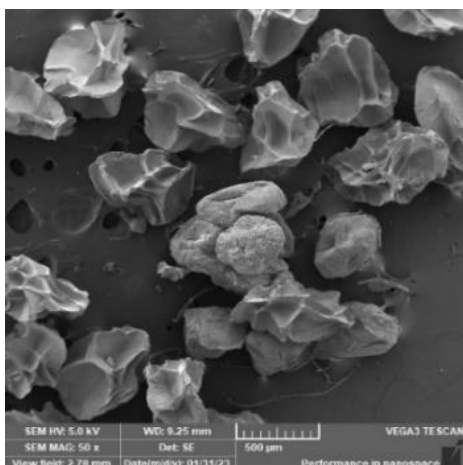
Na slici 4.3.5. a), b), c) i d) Prikazane su SEM mikrofotografije formulacija mikročestica ALG/Ca ,ALG/Ca/sirilo te njihovih površina



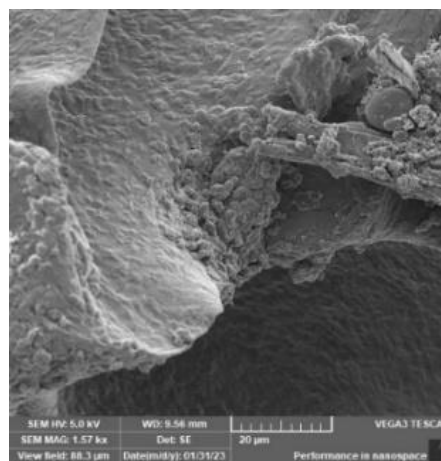
a)



b)



c)



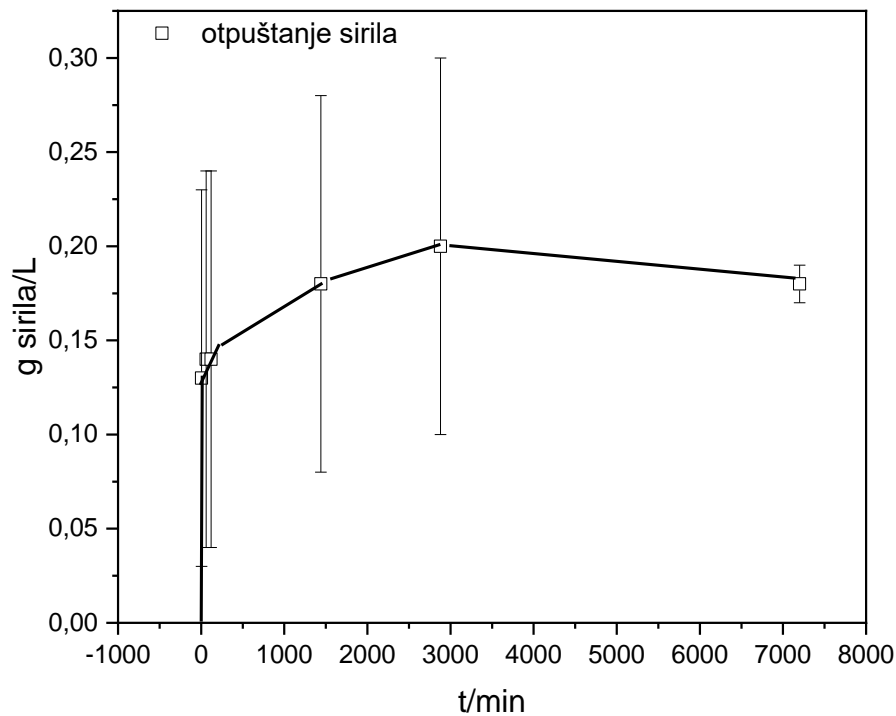
d)

Slika 4.3.5. SEM mikrofotografije: a) formulacija mikročestica ALG/Ca, b) površina formulacije mikročestice ALG/Ca, c) formulacija mikročestica ALG/Ca/sirilo i d) površina formulacije mikročestica ALG/Ca/sirilo

Kao što je uočeno i na mikrofotografijama snimljenih pomoću optičkog mikroskopa liofilizacijom formulacija mikročestica dolazi do značajnog smanjenja veličine. Površina formulacija postaje udubljena, te se lako mogu učiti i pore kroz koje sirilo difundira. Također lako se može uočiti da je dio sirila lociran i na površini liofiliziranih formulacija mikročestica ALG/Ca/sirilo.

4.3.3. In vitro otpuštanje sirila (enzima) iz mikročestica

Mehanizmi kojim se aktivna tvar otpušta iz mikročestica su kompleksni te mogu uključivati različite procese: prodiranje okolne otopine u mikročesticu, bubrenje, difuziju aktivnog sastojka kroz mrežu gela, otapanje aktivnog sastojka u okolnom mediju i eroziju nabubrene mikročestice (Maderuelo i sur., 2011), (Sankalia i sur., 2007). Pokazano je da su difuzija, bubrenje i erozija najvažniji mehanizmi koji kontroliraju brzinu otpuštanja aktivnih sastojaka iz hidrofilnih mikrosfera (Sankalia i sur., 2007). Krivulja otpuštanja sirila iz liofiliziranih mikročestica ALG/Ca/sirilo je prikazana na slici 4.3.6. Vremenski interval praćenja otpuštanja sirila je bio u intervalu od 120 sata koliko je potrebno da se sirilo potpuno otpusti iz pripremljene mikročestice.



Slika 4.3.3. Otpuštena količina sirila u vremenu t , iz pripremljenih mikročestica ALG/Ca/sirilo pri optimalnoj koncentraciji kalcijeva klorida, $c(\text{CaCl}_2)$ i natrijeva alginata. Na slici su prikazane i standardne devijacije.

Iz krivulja otpuštanja sirila iz pripremljenih mikročestica ALG/Ca/sirilo moguće je uočiti da dispergiranjem u vodi dolazi do vrlo brzo otpuštanja sirila te da u vrlo kratkom vremenu postiže konstantnu vrijednost otpuštanja što ukazuje na dobro odobrene parametre pripreve mikročestica ALG/Ca/sirilo.

Otpuštena količina sirila može se opisati jednadžbom $f = a + kt^n$. Vrijednosti konstante otpuštanja k , eksponenti n i odsječci a prikazani su u Tablici 2. Prema modelu Korsmeyer-Peppasa (Korsmeyer i sur., 1983) konstanta otpuštanja, k , uključuje ukupan difuzijski koeficijent otapanja i geometrijske karakteristike mikrosfera, a eksponent n je karakterističan za mehanizam koji kontrolira brzinu otpuštanja. Iz Tablice 4 je vidljivo da se vrijednosti za konstantu k smanjuju povećanjem početne koncentracije iona kalcija. Vrijednost za $n > 0,43$ upućuje da je kontrolni mehanizam otpuštanja anomalna transportna kinetika (kombinacija dvaju difuzijskih mehanizama i bubrenja i relaksacije polimernih lanaca).

Tablica 2. Varijacija konstante oslobađanja (k), eksponent (n), presjek y -osi (a) i koeficijent korelacije (R^2) sirila oslobođenog iz (ALG/Ca/sirilo) mikročestica.

Mikročestica	a	k/min	n	R^2
ALG/Ca/sirilo	0,126	0,00147	0,49	0,9971

Iz dobivenih vrijednosti lako je uočiti da je vrijednost eksponenta n iznosi 0,49. Iz dobivene vrijednosti može se zaključiti da je otpuštanje sirila iz pripremljenih mikročestica ALG/Ca/sirilo vođen procesima kontroliranim kombinacijom dvaju difuzijskih mehanizama i transportom tipa II.

Poznavanje kinetike i mehanizama koji kontroliraju u otpuštanje aktivnih sastojaka je važno za pripravu optimalnih agroformulacija baziranih na biopolimernim materijalima. Dizajn kontroliranog sustava za isporuku uključuje optimizaciju mnogih parametara među kojima su najvažniji tip i koncentracija oba, biopolimera i gelirajućeg kationa (Sankalia i sur., 2007). U tom smjeru, kinetika i mehanizmi oslobađanja sirila istraženi su na mikrosferama pripremljenima pri konstantnoj koncentraciji kalcijevog klorida i uz konstantnu koncentraciju natrijevog alginata. Važno je naglasiti da otpuštanje sirila karakterizira brzo početno oslobađanje nakon čega slijedi sporije otpuštanje. Kontrolni mehanizam otpuštanja sirila je kombinacija dvaju difuzijskih mehanizama te bubrenja i relaksacije polimernih lanaca (anomalna transportna kinetika). Važno je naglasiti da je brzina geliranja alginata važan je čimbenik u kontroli homogenosti i čvrstoće mikročestice. Usporeno geliranje daje homogene strukture s boljim mehaničkim svojstvima. Homogene mikročestice dopuštaju veću brzinu difuzije zbog jednolike veličine pora, dok nehomogene usporavaju difuziju u mrežnoj strukturi.

5. Zaključak

Proces inkapsulacije sirila u formulacije alginatnih mikročestice pokazao se učinkovitim. Nakon inkapsulacije dobivene su kapsule sa zadovoljavajućom količinom sirila te se mogu koristiti za kontrolirano otpuštanje u proizvodnji sira.

Jačina sirila iznosila je 1800 IMCU/g, a omjer kimozin:pepsin iznosio je 80:20 % što je optimalno za proizvodnju tvrdih sireva i sireva s dužim zrenjem.

Fizikalno kemijskom karakterizacijom utvrđene su zadovoljavajuće vrijednosti i potvrđuju mogućnost inkapsulacije. Kapacitet inkapsulacije iznosio je 80%, stupanj bubrenja S_w mikročestica ispunjenih sirilom je iznosio $53,88 \pm 3,71\%$ dok je stupanj bubrenja mikročestica bez sirila iznosio $48,07 \pm 12,21\%$. Vrijednost stupnja bubrenja mikročestica ispunjenih sirilom (ALG/Ca/sirilo) pokazuje visoke vrijednosti čime je potvrđena pretpostavka da će stupanj bubrenja mikročestica ispunjenih sirilom biti veći u odnosu na mikročestice bez sirila.

Morfološkim pregledom mikročestica uočena je promjena u obliku, morfologiji i boji kod čestica ispunjenih sirilom. Prosječna veličina mikročestica ispunjenih sirilom iznosila je $1386,51 \pm 0,231$ mm, a bez sirila $1181,21 \pm 0,153$ mm čime je potvrđena pretpostavka da će mikročestice ispunjene sirilom biti veće zbog elektrostatskog međudjelovanja sirila i kalcijevih iona. Pretpostavljeno je da će liofiliziranjem doći do gubitka vode i vlage iz mikročestica što će rezultirati smanjenjem veličine mikročestica. Nakon mjerenja utvrđeno je da je prosječna veličina liofiliziranih mikročestica ALG/Ca iznosila $542,31 \pm 0,69$ μm , te ALG/Ca/sirilo iznosila $861,61 \pm 43,21$ μm čime je navedena pretpostavka potvrđena.

Dinamika otpuštanja sirila iz mikročestica uspješno je izmjerena. Mjerenjem je utvrđeno da je sirilu potrebno 120 sati da se potpuno otpusti iz mikročestice te da dispergiranjem u vodi vrlo brzo dostiže konstantnu vrijednost otpuštanja čime se potvrđuje da su mikročestice dobro pripravljene.

Nakon svih provedenih mjerenja dokazano je da će mikročestice ispunjene sirilom biti pogodne za daljnju proizvodnju sira.

6. Popis literature

1. Bao, W., Zhou, J., Luo, J., Wu, D. (2006). PLGA microspheres with high drug loading and high encapsulation efficiency prepared by a novel solvent evaporation technique. *Journal of microencapsulation*. 23(5), 471-479. DOI: 10.1080/02652040600687613
2. Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1767(9), 1073–1101.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>
3. Bensalah, B., Acem, K. (2022). Spectroscopy characterization of acid and rennet camel milk caseins using XRD, XPS, and SEM and evaluation of their emulsifying properties. *Mljekarstvo*. 72 (3), 161-171.
<https://hrcak.srce.hr/en/file/405087>
4. Blanco, M.D., Sastre, R.L., Teijon, C., Olmo, R. and Teijon, J.M. (2005). 5- Fluorouracil-loaded microspheres prepared by spray-drying poly (D, L-lactide) and poly (lactide-co-glycolide) polymers: characterization and drug release. *Journal of microencapsulation*. 22(6), 671-682. DOI: 10.1080/02652040500161990
5. Blandino, A., Macias M., Cantero D. (2000). Glucose oxidase release from calcium alginate gel capsules. *Enzyme and Microbial Technology*. 27, 319–324. DOI: 10.1016/s0141-0229(00)00204-0
6. Boras, A. (2019). Mikroinkapsulacija soja *Lactobacillus sakei* MRS_296 s potencijalom primjene kao starter kultura. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb.
7. Davidovich, P.M., Bianco, H.P. (2010). A quantitative analysis of alginate swelling. *Carbohydrate Polimers*. 79(4), 1020–1027.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.036>
8. Ferrándiz, M., Capablanca L., García D., Bonet M. Á. (2017). Application of Antimicrobial Microcapsules on Agrotiles. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*. 6, 62- 82. DOI: 10.4236/jacen.2017.61004
9. Gallo, M., Corbo M.R. (2010). Microencapsulation as a new approach to protect active compounds in food. U: *Application of alternative food-preservation technologies to enhance food safety and stability*. Bentham Science Publisher. 188-195. DOI:10.2174/978160805096311001010188
10. Harboe, M., Budtz, P. (1999). The production, action and application of rennet and coagulants. U: *Technology of cheesemaking (Edited by Lae, B.A.)*. Sheffield Academic Press, CRS Press. 33-65. DOI:10.1002/9781444323740

11. Hellmuth, K., van den Brink, J. M. (2013). Microbial production of enzymes used in food applications. *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals*. 262–287.
<https://doi.org/10.1533/9780857093547.2.262>
12. Hosseini, S., Varidi, M. (2021). Optimization of Microbial Rennet Encapsulation in Alginate – Chitosan Nanoparticles. *Food Chemistry*. 352, 129325.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129325>
13. ISO (2007): Milk and Milk Products—Ovine and Caprine Rennets—Determination of Total Milk-Clotting Activity. ISO:Geneva, Switzerland.
14. ISO (2012): Milk and Milk Products—Calf Rennet and Adult Bovine Rennet—Determination by Chromatography of Chymosin and Bovine Pepsin Contents. ISO: Geneva, Switzerland.
15. Jurić, S., Tanuwidjaja, I., Fuka, M.M., Kahlina, V.K., Marijan, M., Boras, A., Kolić, U.N., Vinceković, M. (2021). Encapsulation of two fermentation agents, *Lactobacillus sakei* and calcium ions in microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 197-111387.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111387>
16. Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 3, 39–48.
17. Kiš, M., Zdolec, N., Kazazić, S., Vinceković, M, Jurić, S., Dobranić, V, Oštarić, F., Marić, I., Mikulec, N. (2023). Implementation of Novel Autochthonous Microencapsulated Strains of *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, and Lamb's Rennet in the Production of Traditional "Paški Sir" Cheese. *Fermentation*. 9(5), 441.
<https://doi.org/10.3390/fermentation9050441>
18. Korsmeyer, R. W., Gurny R., Doelker, E., Buri, P., Peppas, N. A. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 15, 25-35. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9)
19. Maderuelo, C., Zarzuelo A., Lanao J.M. (2011). Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. *Journal of Controlled Release*. 154, 2-19. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.04.002
20. Mikulec, N. (2010). Promjene sadržaja topljivih peptida i aminokiselina tijekom zrenja Krčkog sira. Disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb.
21. Moschopoulou, E. (2011). Small Ruminant. *Research*. 101, 188–195.
22. Moschopoulou, E., Onoufriou, E., Kandarakis, I. (2009). Effects of diet and abomasums part on enzymic properties of liquid lamb rennet. *Ital. J. Food Sci.* 21, 73–80.

23. Oštarić, F., Antunac, N. Čubrić-Ćurik, V., Ćurik, I., Jurić, S., Kazazić, S., Kiš, M., Vinceković, M., Zdolec, N., Špoljarić, J., Mikulec, N. (2022). Challenging Sustainable and Innovative Technologies in Cheese Production: A Review. *Processes*. 10(3), 529
<https://doi.org/10.3390/pr10030529>
24. Oštarić, F., Antunac, N., Prpić, Z. i Mikulec, N. (2015). Influence of the rennet type on the quality of Pag Island cheese (Croatian: Paški sir). *Mljekarstvo*. 65 (2), 101-110.
<https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2015.0204>
25. Ouwerx C., Velings N., Mestdagh M.,M., Axelos M. A. V. (1998). Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polymer Gels and Networks*. 6, 393-408. [https://doi.org/10.1016/S0966-7822\(98\)00035-5](https://doi.org/10.1016/S0966-7822(98)00035-5)
26. Paulo, F., Santos L. (2017). Design of experiments for microencapsulation applications: a review. *Mater Sci Eng C*. 77, 1327-1340. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.219>
27. Pawlos, M., Znamirowska, A., Szajnar, K. (2001). Effect of Calcium Compound Type and Dosage on the Properties of Acid Rennet Goat's Milk Gels. *Molecules*. 26(18), 5563. DOI: 10.3390/molecules26185563
28. Racovită, Ș., 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.
29. Riaz, QU, Masud T. (2013). Recent trends and applications of encapsulating materials for probiotic stability. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 53(3), 231-44. DOI: 10.1080/10408398.2010.524953
30. Rizkalla, N., Range, C., Lacasse, F.X. and Hildgen, P. (2006). Effect of various formulation parameters on the properties of polymeric nanoparticles prepared by multiple emulsion method. *Journal of microencapsulation*. 23(1), 39-57.
<https://doi.org/10.1080/02652040500286185>
31. Rokstad, A.M.A., Lacik, I., de Vos, P., Strand, B.L.. (2014). Advances in biocompatibility and physico-chemical characterization of microspheres for cell encapsulation, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 67(68), 111–130.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.010>
32. Salvadori del Prato, O. (2009). Small dairies. Gruppo 24 ore, Italija. (na talijanskom: I mini caseifici aziendali).
33. Sandra S., Ho, M., Alexander M., Corredig, M. (2012). Effect of soluble calcium on the renneting properties of casein micelles as measured by rheology and diffusing wave spectroscopy. *Journal of Dairy Science*. 95(1), 0–82. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4713>

34. Sankalia, M. G., Mashru, R. C., Sankalia, J. M., Sutariya, V.B. (2007). Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: optimization and physicochemical characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 65, 215-232.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.07.014>
35. Santillo, A., Albenzio M, Bevilacqua A, Corbo MR, Sevi A. (2012). Encapsulation of probiotic bacteria in lamb rennet paste: effects on the quality of Pecorino cheese. *J Dairy Sci*. 95(7), 3489-500. DOI: 10.3168/jds.2011-4814
36. Singh, M.N., Hemant K.S.Y., Ram M., Shivakumar H.G. (2010). Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. 5(2), 65–77.
37. Šabec, S. (1953). O sirilu i sirenju. *Mljekarstvo*. 3 (2), 32-34.
38. Teixeira da Silva P., Martins Fries L.L., Ragagnin de Menezes C., Tasch Holkem A., Schwan C.L., Wigmann É.F., De Oliveira Bastos J., De Bona da Silva C. (2014). Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*. 44(7), 1304-1311. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971>
39. Vinceković, M., Jalšenjak, N., Pintarić, T.S., Đermić, E., Bujan, M., Jurić, S. (2016). Encapsulation of biological and chemical agents for plant nutrition and protection: Chitosan/Alginate microcapsules loaded with copper cations and *Trichoderma viride*. *J. Agric. Food Chem*. 64, 8073–8083. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b02879
40. Zuidam, N.J., Nedović V. (2010). Encapsulation Technologies for Active FoodIngredients and Food Processing. *Springer*. 3-29. DOI:10.1007/978-1-4419-1008-0

7. Prilog

7.1. Popis kratica

Kratica	Značenje
°C	stupanj celzijev
ALG/Ca	mikročestica kalcijevog alginata
ALG/Ca/sirilo	mikročestica kalcijevog alginata sa sirilom
c	koncentracija
CaCl ₂	kalcijev klorid
cm	centimetar
cNS	koncentracija sirila u uzorku
D	vidljivi difuzijski koeficijent translacije
d	Hidrodinamički promjer
DLS	Dinamičko raspršivanje svjetlosti
EE%	učinkovitost inkapsulacije
Et	ukupna količina enzima
Es	količina enzima u supstratu nakon centrifugiranja
FTIR	engl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Fourierova transformacija infracrvene spektroskopije)
g	gram
kB	Boltzmannova konstanta
L	Litra
LC%	kapacitet inkapsulacije
LCs	kapacitet ispunjevanja mikročesticama sirilom
M	mol
mL	mililitar
mm	milimetar
MRS	MRS De Man, Rogosa, Sharpe
mV	milivolt

NaCl	Natrijev klorid
NaHCO ₃	Natrijev hidrogen karbonat
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ x 2H ₂ O	Natrijev citrat dihidrat
NaOH	Natrijev hidroksid
nm	Nanometar
OM	Optički mikroskop
PDO	engl. Protected Designation of Origin (oznaka izvornosti)
R ²	Koeficijent determinacije
R _t	Količina otpuštenih čestica sirila u vremenu t
R _{tot}	Ukupna količina čestica sirila
SEM	Pretražni elektronski mikroskop
Sw%	stupanj bubrenja
T	temperatura
t	vrijeme
u	elektroforetska pokretljivost
UV/VIS	ultraviolet-visible spectroscopy
V	volt
V	volumen
w _c	težina mikročestica
w _t	masa nabubrenih mikročestica
w ₀	početna masa mikročestica
ζ	zeta potencijal
η	viskoznost otapala
μm	mikrometar
<i>f</i>	Frakcija otpuštenih čestica sirila

Životopis

Ana-Marija Aničić rođena je 15. svibnja 1998. godine u Zagrebu, gdje je završila osnovnu školu (2012.). Srednjoškolsko obrazovanje stječe u Zagrebačkoj Prirodoslovnoj školi Vladimira Preloga, gdje je završila četiri razreda i stekla zvanje Kemijski tehničar. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja, 2017. godine upisuje Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, preddiplomski (Bs) studij Animalne znanosti i nastavlja obrazovanje upisom diplomskog (Ms) studija Proizvodnje i prerade mlijeka na istom fakultetu. Tijekom preddiplomskog i diplomskog studija obavljala je stručnu praksu u Referentnom laboratoriju za mlijeko i mliječne proizvode na Agronomskom fakultetu. Osim materinjeg hrvatskog jezika služi se i engleskim te španjolskim. U slobodno vrijeme bavi se volontiranjem i čitanjem knjiga, ali najviše od svega voli ga provesti u prirodi ili s prijateljima.