

Pektinske mikrosfere inkapsuliranega eteričnega olja citrusov

Miha SLAPNIČAR¹, Darja RIZMAL² in Brina MANFREDA GOLOB²

¹Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta, Kardeljeva ploščad 16, 1000 Ljubljana

²BIC Ljubljana, gimnazija in veterinarska šola, Cesta v Mestni log 47, 1000 Ljubljana

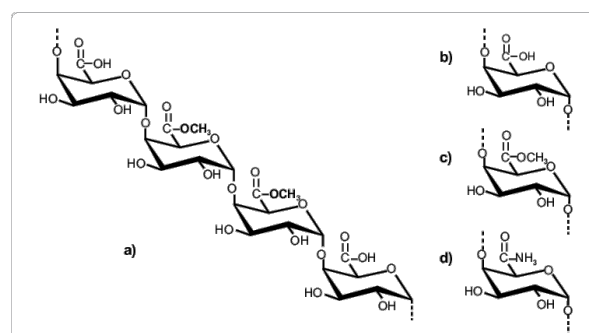
Povzetek: Z vsakodnevno proizvodnjo več ton raznovrstnih odpadkov je pomembno, da stremimo k novim načinom njihove predelave in izobraževanju prihodnjih generacij o pomembnosti ponovne uporabe odpadnih snovi. V raziskavo o razumevanju zelene kemije, ekstrakcije eteričnega olja in njegovih značilnosti, izolacije pektina in mikrokapsuliranja je bilo vključenih 70 srednješolcev iz BIC Ljubljana, gimnazije in veterinarske šola. Njihovo razumevanje izbranih učnih vsebin smo preverjali s preizkusom znanja na predhodno razvit in optimiziran eksperiment izdelave pektinskih mikrosfer, v katere je bilo inkapsulirano izolirano eterično olje lupin citrusov. Pridobljeni rezultati kažejo, da je trdnost pektinskih mikrokapsul boljša, če je zmes, ki predstavlja tekoče jedro, bolj viskozna. S poznim preizkusom znanja je bilo ugotovljeno tudi, da so dijaki na eksperimentalni delavnici usvojili ustrezno znanje o izolaciji komponent iz na videz neuporabnih lupin citrusov.

Ključne besede: zelena kemija, eksperimentalno delo, pektin, eterično olje, mikrokapsuliranje, preizkus znanja

Uvod

Področje t. i. zelene kemije (angl. *Green Chemistry*) med drugim spodbuja ponovno uporabo odpadnih snovi. Pojem zelena kemija skozi dvanajst principov prizadevanja za preoblikovanje kemijskih procesov označuje uporabo kemikalij z namenom povzročanja minimalnega onesnaževanja okolja in ogrožanja zdravja ljudi (Duarte, Ribeiro in Machado, 2015, str. 1027). Velik del odpadnih snovi, ki jih proizvedemo na dnevni ravni, predstavljajo organski odpadki, tudi odpadni olupki citrusov (Mackenzie idr., 2019, str. 3027). Sestavni del citrusnih olupkov je med drugimi snovmi tudi pektin, ki ga kot strukturni heteropolisaharid najdemo v celičnih stenah rastlinskih celic agrumov. Vključen je v biokemijske procese rasti rastlin, regulacijo prehodov ionov med rastlinskimi celicami in v obrambne mehanizme rastline proti patogenom; je ena najbolj učinkovitih, v vodi dobro topnih vlaknin (Voragen, Coenen, Verhoef in Schols, 2009, str. 267). Makromolekulo pektina (Slika 1a) sestavljajo enote α -D-galaktopiranojske kisline, povezane v α -1,4-verigo, v kateri so kislinske skupine v veliki meri esterificirane z metoksiskupinami. Makromolekula lahko vsebuje vezanih do sedemnajst različnih monosaharidov (Slika 1), ki se lahko povezujejo na več kot dvajset različnih načinov, zato makromolekuli

pektina natančne strukture ni mogoče določiti (Wang, Pagan in Shi, 2002, str. 272).



Slika 1: Skeletne formule: a) makromolekula pektina; b) molekula monomerne enote s karboksilno funkcionalno skupino; c) molekula monomerne enote z estrsko funkcionalno skupino; d) molekula monomerne enote z amidno funkcionalno skupino

Ena izmed za ljudi pomembnih sestavin olupkov citrusov so tudi eterična olja, ki so vsestransko uporabna. Gre za koncentrirane izvlečke različnih delov rastlin, kot so: cvetovi, listi, popki, stebila, veje, semena, skorje semen, debla, lubje, les, smola in korenine. Pridobimo jih lahko iz približno 700 različnih vrst rastlin. Limonen, ki je ena izmed veliko sestavin eteričnega olja, pridobljenega iz odpadnih limoninih olupkov, je derivat izoprena (2-metilbuta-1,3-diena). Nenasičen limonen lahko zato dokazujemo z re-

akcijo polarne elektrofilne adicije oziroma s halogeniranjem (npr. z bromiranjem) (Slapničar in Boh Podgornik, 2020, str. 73–79).

Izolacijo pektina, ki je sorazmerno preprost eksperimentalni postopek, izvedemo v dveh korakih: 1) zmes olupkov (lupine) citrusov, destilirane vode in limoninega soka v bučki nad gorilnikom segrevamo 75 minut; 2) zmes po segrevanju precedimo in dobljenemu filtratu dodamo 96-odstotno raztopino etanola, ki povzroči obarvanje pektina.

Eterično olje citrusov iz njihovih olupkov ekstrahiramo z eksperimentalnim postopkom parne destilacije, pri čemer po principu ločevanja zmesi hlapnih komponent pri 90 °C najprej destiliramo čisto komponento limonena (Kapun Dolinar, 2001). Ker so hlapna eterična olja dolgoročno slabše obstojna, obstaja potreba po shranjevanju v oblike, v katerih nespremenjena ostanejo dlje časa. Eden izmed takšnih načinov shranjevanja je tudi mikrokapsulacija. Gre za specifičen eksperimentalni postopek, pri katerem zelo drobne kapljice, trdne delce ali zračne mehurčke, obdamo s kontinuiranim slojem polimera, lipida ali drugih ustreznih snovi. Nastale mikrokapsule so lahko različnih nepravilnih oblik; delimo jih na enojedrne, večjedrne in na ogrodne. Pri ogrodnih sta (npr. v pektinu inkapsulirano eterično olje citrusov) tekoča inkapsulirana snov in ogrodni material enakomerno razporejena po celotni prostornini delca – takšne mikrokapsule imenujemo tudi mikrosfere (Slapničar in Boh Podgornik, 2020, str. 114–129). Mikrokapsuliranje se danes uporablja predvsem v farmaciji, saj omogoča zaščito vgrajene zdravilne učinkovine pred vplivi okolja ter njeno nadzorovano sproščanje, prekrivanje neprijetnega okusa in vonja zdravilne učinkovine, faznega prehoda (iz tekočega v trdno), ločitev reaktivnih sestavin zmesi, izboljšanje dispergiranja v vodnem mediju netopnih zdravilnih učinkovin in pripravo bioadhezivnih oblik (Zvonar in Gašperlin, 2012, str. 132).

Relevantna teoretična izhodišča nakazujejo na raziskovalni problem, ki je usmerjen v iskanje in optimizacijo eksperimentalnega postopka, z možnostjo ponovne uporabe na videz odpadnih snovi olupkov citrusov. Poleg omenjenega je smiselno, da se vidik zelene kemije po principu ozaveščanja in skrbi za okolje na uporaben način predstavi tudi učečim se.

Iz raziskovalnega problema izhajata dva namena raziskave: 1) optimizacija šolske izvedbe eksperimenta mikrokapsulacije izoliranega eteričnega olja olupkov citrusov s pektinom istih olupkov citrusov in 2) izvedba eksperimentalne delavnice z vsebino zelene kemije v povezavi z eksperimentom mikrokapsulacije izoliranega eteričnega olja v pektinski ovoj s pred- in potestom kemijskega znanja iste kemijske učne vsebine.

V empirični raziskavi sta bili zastavljeni dve raziskovalni vprašanji:

- 1) Ali sta trdnost in obstojnost pektinskih mikrokapsul boljši, če je zmes, ki predstavlja tekoče jedro, bolj viskozna oziroma je vanjo dodanega manj hidrolata izoliranega eteričnega olja?
- 2) Ali pri udeležencih eksperimentalne delavnice na pred- in potestu kemijskega znanja obstajajo pomembne razlike v dosežku skupnega števila točk?

Metoda raziskovanja

Vzorec

Vzorec raziskave prvega raziskovalnega vprašanja so predstavljali olupki citrusov (limon), destilirana voda in pufer pH 2, hidrolat izoliranega eteričnega olja, izoliran pektin in kalcijev glukonoat (E578).

Vzorec drugega raziskovalnega vprašanja je predstavljalo 70 dijakov (58 dijakinj in 12 dijakov) tretjega letnika Biotehniškega izobraževalnega centra (v nadaljevanju: BIC) Ljubljana, smer veterinarski tehnik, starih od 17 do 18 let. Polnoletni dijaki so sodelovanje v raziskavi potrdili s podpisom izjave, nepolnoletnim pa so izjavo podpisali njihovi starši oziroma skrbniki.

Opis instrumenta

Instrument raziskave je bil preizkus znanja, sestavljen iz 10 štiridelnih nalog izbirnega tipa z enim pravilnim odgovorom, vezanih na vsebine zelene kemije, mikrokapsulacije, izolacije pektina in destilacije eteričnega olja. Naloge so bile glede na specifikacijsko tabelo preizkusa znanja zastavljene na različnih kognitivnih stopnjah po Bloomu. Prvi del štiridelne naloge je predstavljalo vprašanje s štirimi trditvami – A, B, C in Č –, od katerih je bila ena pravilna. V drugem delu so dijaki na 6-stopenjski Likertovi lestvici

ocenili svoje prepričanje o izbiri pravilne trditve vprašanja prvega dela naloge. V tretjem delu naloge so dijaki izmed štirih mogočih trditev izbrali tisto, ki je predstavljala pravilno utemeljitev odgovora, izbranega v prvem delu naloge. V četrtem delu so na 6-stopenjski Likertovi lestvici ocenili svoje prepričanje o pravilnosti rešene naloge (Slika 2). Trditve, ki so v tretjem delu naloge predstavljale utemeljitev izbire odgovora prvega dela naloge, so bile sestavljene iz najpogostejših distraktorjev, ki jih je v pripravi preizkusa znanja podalo 30 študentov različnih izobraževalnih smeri Pedagoške fakultete UL.

10. Kaj je pektin?

A Je nenasičen ogljikovodik.
B Je polisaharid.
C Je nasičen ogljikovodik.
D Je kompleksno zgrajen aldehid.

10.2 Kako prepričan si, da si nalogo rešil pravilno?

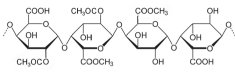
1 Samo ugibam. 2 Neprepričan. 3 Dokaj prepričan. 4 Prepričan. 5 Zelo prepričan. 6 Popolnoma prepričan.

10.3 Zakaj si izbral ta odgovor?

A Ker iz skeletne formule pektina vidimo, da je v molekuli pektina prisotna dvojna vez.
B Ker iz skeletne formule pektina vidimo, da so v molekuli pektina prisotne zgolj enojne vezi.
C Ker monomere pektina med seboj povezuje glikozidna vez.
D Ker iz skeletne formule pektina razberemo aldehidno funkcionalno skupino na prvi monomerni enoti.

10.4 Kako prepričan si, da si nalogo rešil pravilno?

1 Samo ugibam. 2 Neprepričan. 3 Dokaj prepričan. 4 Prepričan. 5 Zelo prepričan. 6 Popolnoma prepričan.



Slika 2: Primer štiridelne naloge v preizkusu znanja

Preizkus znanja je v začetnem delu vseboval še zapisan namen raziskave in navodila za njegovo reševanje. Dijaki so na preizkusu znanja lahko dosegli največ 20 točk, 2 točki pri vsaki nalogi. Preizkus znanja je ekonomičen, vsebinsko veljaven in zanesljiv. Za reševanje preizkusa znanja, ki je bil uporabljen kot pred- in potest, so imeli dijaki na voljo eno šolsko uro. Reševanje je bilo anonimno oziroma spremljano prek izbrane kode.

Potek raziskave

Raziskava je potekala od novembra 2019 do februarja 2020. Optimizacija šolske izvedbe eksperimenta mikrokapsulacije izoliranega eteričnega olja limoninih olupkov s pektinom je potekala v kemijskem laboratoriju na Pedagoški fakulteti UL, medtem ko je celotna izvedba petkratne ponovitve eksperimentalne delavnice potekala na BIC Ljubljana. Dijaki so en teden pred izvedbo delavnice rešili predtest. Eksperimentalna delavnica, v kateri so dijaki izvedli izolacijo pektina, ekstrakcijo eteričnega olja s parno destilacijo, mikrokapsuliranje in različne dokazne reakcije na pridobljen hidrolat eteričnega olja (časovno optimizirane izvedbe eksperimentov), je trajala dve šolski uri. Po izvedeni delavnici so dijaki rešili še potest, ki je bil enak predtestu. Pred- in potest sta bila

vrednotena in v dosežkih skupnega števila točk med seboj primerjana.

Rezultati z diskusijo

Slika 3 prikazuje nastale mikrokapsule v etanolu, pri katerih je bilo v tekoče jedro dodano 3 mL hidrolata izoliranega eteričnega olja limone.



Slika 3: Mikrokapsule s 3 mL hidrolata

Slika 4 prikazuje nastale mikrokapsule v etanolu, pri katerih je bilo v tekoče jedro dodano 2 mL hidrolata izoliranega eteričnega olja limone.

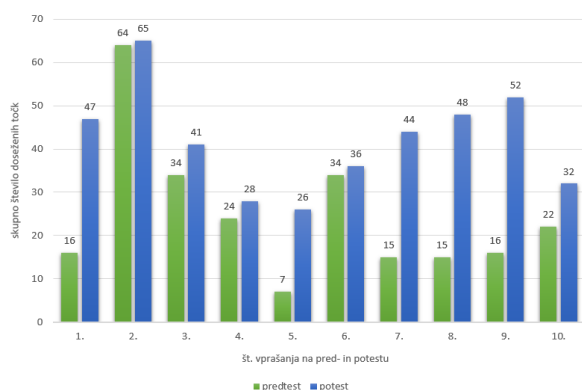


Slika 4: Mikrokapsule z 2 mL hidrolata

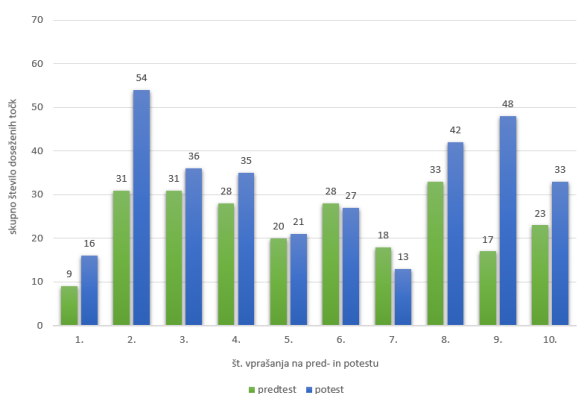
Dobljeni rezultati kažejo, da so se pektinske mikrokapsule, v katerih je tekoče jedro vsebovalo manj hidrolata izoliranega eteričnega olja limone, oblikovale lepše kot tiste, ki so vsebovale 1 mL hidrolata več. Sklepati je mogoče, da na obstojnost nastalih mikrokapsul izoliranega pektina vpliva tudi količina tekočega jedra. Če je zmes, ki predstavlja tekoče jedro, bolj viskozna oziroma je dodano manj hidrolata izoliranega eteričnega olja, je mikrokapsula obstojnejša in trdnjša. Ob večji vsebnosti hidrolata, ki je od pektina manj viskozen, se mikrokapsule tvorijo slabše, saj tekoče jedro v raztopini pufru povzroči razgraditev pektinske mikrosfere. Večja količina hidrolata razredči kalcijev glukonat in pektin, ki povzročata zamreženje in tvorbo stanja gela. Bolj kompaktna struktura pektinske mikrosfere s kal-

cijevim glukonatom vpliva tudi na barvo mikrokapsul (*Slika 4*), saj sta kalcijev glukonat in tudi pektin v trdnem agregatnem stanju pri standardnih pogojih bela. Nastale mikrokapsule bi lahko z dodanimi jedilnimi barvami obarvali v poljubno barvo.

Rezultati drugega raziskovalnega vprašanja, primerjava skupnega števila doseženih točk za posamezno vprašanje na pred- in potestu, so predstavljeni na grafu 1 (1. del naloge štirdelnega tipa) in grafu 2 (3. del naloge štirdelnega tipa).



Graf 1: Skupno število doseženih točk za odgovor (1. del naloge) pri posameznem vprašanju na pred- in potestu



Graf 2: Skupno število doseženih točk za utemeljitev odgovora (3. del naloge) pri posameznem vprašanju na pred- in potestu

Rezultati kažejo (*grafa 1 in 2*), da so dijaki skoraj pri vseh vprašanjih (*izjema so 4. vprašanje v pred- in potestu ter 5., 7., 8., 9. in 10. vprašanje na predtestu*) na pred- in tudi potestu boljše reševali 1. del naloge (odgovor na vprašanje) kot 3. del naloge, ki je od njih zahteval utemeljitev odgovora. Pri reševanju predtesta lahko razberemo, da je bilo najslabše reševano peto vprašanje (le 10 % pravih odgovorov), ki je od dijakov zahtevalo izbiro definicije za eterično

olje. Omenjeno ne velja za pravilno izbiro utemeljitve odgovora, iz česar sklepamo, da dijaki k izbranemu odgovoru 1. dela naloge niso izbirali njemu pripadajoče utemeljitve odgovora, ampak drugo. Nasprotno situacijo v pravilnosti odgovorov lahko opazimo pri prvem vprašanju, ki je preverjalo razumevanje pojma obarvanje.

Dijaki, vključeni v raziskavo, so na pred- in tudi na potestu najboljše reševali drugo vprašanje (91,4 % pravih odgovorov), ki je na drugi kognitivni stopnji po Bloomu preverjalo razumevanje eksperimentalnega postopka destilacije, ter fizikalnih lastnosti čistih snovi, na podlagi katerih potekata ločevanje in čiščenje homogene zmesi. Sklepamo, da so dijaki vsebino drugega vprašanja dobro poznali tudi pred izvedbo eksperimentalne delavnice, saj je vsebina ločevanja in čiščenja snovi oziroma spoznavanje postopka destilacije učna snov, ki se v njihovem izobraževalnem programu natančno obravnava. Iz grafov 1 in 2 je razvidno, da so dijaki, vključeni v raziskavo, pri vseh vprašanjih razen pri utemeljitvi odgovora pri 6. in 7. vprašanju, ki sta od njih zahtevala utemeljitev izbire pojma mikrokapsuliranje (6. vprašanje) in mikrosfera (7. vprašanje), dosegli boljše rezultate. Natančnejša analiza frekvenc izbire napačnih odgovorov kaže, da so bile izbire napačnih odgovorov znotraj naloge razporejene precej enakomerno, iz česar lahko sklenemo, da so bili distraktorji v posameznih trditvah nalog dobri.

Dijaki so po eksperimentalni delavnici na potestu v skupnem seštevku točk dosegli 59,9 % (na predtestu 35,3 %), iz česar sklepamo, da je izvedba eksperimentalne delavnice zvišala raven usvojenega znanja iz prej omenjenih specifičnih vsebinskih sklopov za 24,6 %.

Največja razlika v pravih odgovorih pred eksperimentalno delavnico in po njej znaša 51,4 %, in sicer pri 9. vprašanju, ki se nanaša na izbiro laboratorijskega postopka, ki bi ga dijaki lahko uporabili, da bi iz lupine citrusov pridobili največ najbolj zastopane spojine, predstavljene v tortnem diagramu. Sklepamo lahko, da so dijaki na eksperimentalni delavnici usvojili znanje, vezana na izolacijo komponent iz na videz neuporabnih lupin citrusov, kar je tudi eden izmed principov zelene kemije. Vprašanje z najmanjšim porastom pravih odgovorov med pred- in potestom je drugo vprašanje, saj je bilo že na predtestu več kot 90 % pravih odgovorov.

Zaključek

Iz eksperimentalnega dela raziskave je mogoče skleniti, da je trdnost in s tem povezana obstojnost pripravljenih pektinskih mikrokapsul boljša, če je zmes, ki predstavlja tekoče jedro, bolj viskozna oziroma je vanjo dodanega manj hidrolata izoliranega eteričnega olja. Z optimiziranimi eksperimenti smo dokazali, da je tudi v šolskem kemijskem laboratoriju mogoče eksperimentalne tehnike izvesti na način spodbujanja principov zelene kemije. Pomembno je, da s tovrstnimi učnimi vsebinami seznanjamo učeče se skozi celotno vertikalno izobraževanja, saj so vsebine zelene kemije pomembne za ustrezen trajnostni razvoj okolja, v katerem živimo. Z eksperimentom, uporabljenim v raziskavi, dajemo poudarek temu, da lahko na videz neuporabne olupke citrusov (limon) ponovno uporabimo za izdelavo pektinskih mikrosfer, v katere inkapsuliramo izolirano eterično olje citrusov istih olupkov. Tako iz odpadkov pripravimo kroglice z dišečim in s tekočim jedrom, ki jih lahko ob različnih priložnostih, npr. kot osvežilce zraka, uporabimo v izparilnikih. Smiselno je, da se principe zelene kemije teoretično in tudi praktično na ustrezen način predstavi že v osnovni šoli, saj se le tako pri mladostnikih lahko ponotranji skrb za okolje in jih spodbuja, da usvojeno kemijsko znanje vidijo kot uporabno v namene bolj čistega sveta za prihodnje generacije. Optimiziran eksperiment izdelave pektinskih mikrosfer inkapsuliranega eteričnega olja citrusov, sestavljen iz več delov, je bil v eksperimentalni delavnici uporabljen še v šolski praksi. Pri dijakih, sodelujočih v raziskavi ($N = 70$), smo s predtestom želeli pridobiti podatke o njihovem predznanju zelene kemije in teoretičnih vsebin, povezanih z optimiziranim eksperimentom. Po izvedbi eksperimentalne delavnice nas je zanimalo, v kolikšni meri se je usvojeno znanje dijakov izboljšalo. Ugotovitve kažejo, da so dijaki usvojili več znanja; še posebno so se te razlike kazale v vprašanjih višjih kognitivnih stopenj po Bloomu (vprašanja 1, 5, 7, 8, 9 in 10). Ugotovljeno je bilo, da so imeli dijaki težave pri izbiri utemeljitve odgovorov, iz česar sklepamo, da imajo o poudarjenih učnih vsebinah razvita tudi napačno razumevanje.

Za nadaljnje delo in raziskovanje se predlaga razvoj in optimizacijo več podobnih eksperimentov, ki bi na čim bolj preprost način prikazali principe zelene kemije za raven osnovne pa tudi

srednje šole. V ta namen bi bilo smiselno pripraviti prilagojena učna gradiva, ki bi podpirala samostojno eksperimentalno-raziskovalno delo učencev in dijakov. Osnova eksperimentalno-raziskovalnega dela bi temeljila na ugotovljenem predznanju principov zelene kemije ter s tem na povezanih eksperimentalnih postopkih med slovenskimi osnovnošolci in srednješolci.

Viri in literatura

1. Duarte, R., Ribeiro, M., in Machado, A. (2015). Using Green Star metrics to optimize the greenness of literature protocols for syntheses. *Journal of Chemical Education*, 92(6) str. 1024–1034.
2. Kapun Dolinar, A. (2001). *Biotehnologija*. Učbenik. Ljubljana, Zavod RS za šolstvo.
3. Mackenzie, L. S., Tyrrell, H., Thomas, R., Matharu, A. S., Clark, J. H., in Hurst, G. A. (2019). Valorization of waste orange peel to produce shear-thinning gels, *Journal of Chemical Education* 96(12), str. 3025–3029.
4. Slapničar, M., in Podgornik Boh, B. (2020). *Naravne spojine v živih sistemih*. Univerzitetni učbenik. Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta.
5. Voragen, A., Coenen, G.-J., Verhoef, P. R., in Schols, H. A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2), str. 263–275.
6. Zvonar, A. in Gašperlin, M. (2011). Pregled metod izdelave mikrokapsul za farmacevtsko uporabo. *Farmacevtski vestnik* 62(2), str. 131–138.
7. Wang, Q., Pagan, J., in Shi, J. (2002). Pectin from fruits. V J. Shi, G. Mazza, in M. Le Maguer (ur.), *Functional foods: Biochemical and processing aspects*, (str. 263–309). New York, CRC Press.