

Utjecaj uvjeta ekstrakcije i hidrolize na izdvajanje kvercetina iz ljuske luka i mahune graška

Dajčić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:821318>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2021.

Ivana Dajčić

1226/PI

**UTJECAJ UVJETA EKSTRAKCIJE
I HIDROLIZE NA IZDVAJANJE
KVERCETINA IZ LJUSKE LUKA I
MAHUNE GRAŠKA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda, na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Draženke Komes te uz pomoć više asistentice dr. sc. Aleksandre Vojvodić Cebin.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta *Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina* (IP-2018-01-9717, Hrvatska zaklada za znanost).

ZAHVALA

Najveće HVALA roditeljima koji su mi studij učinili mogućim i HVALA prijateljima na životnoj podršci.

Zahvaljujem se i mentorici prof. dr. sc. Draženki Komes te dr. sc. Aleksandri Vojvodić Cebin na velikoj pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ UVJETA EKSTRAKCIJE I HIDROLIZE NA IZDVAJANJE KVERCETINA IZ LJUSKE LUKA I MAHUNE GRAŠKA

Ivana Dajčić, 1226 PI

Sažetak: Iskorištavanje agro-industrijskog otpada kao izvora vrijednih bioaktivnih sastojaka, u novije vrijeme dobiva sve veću važnost, zbog svog bogatog kemijskog sastava i velike dostupne količine. Ljuska luka i mahuna graška čine značajan udjel otpada koji nastaje prilikom proizvodnje i primarne prerade luka i graška. Nastojeći iskoristi ove sekundarne biljne sirovine za izdvajanje bioaktivnih spojeva, cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj različitih uvjeta ekstrakcije i hidrolize na izdvajanje kvercetina. Primijenjene su tri konvencionalne metode ekstrakcije (maceracija, infuzija i dekokcija) te dvije inovativne (ultrazvuk i mikrovalovi). Dekokcija je rezultirala najvišim prinosima ukupnih polifenola iz oba uzorka. Inovativne metode također su pokazale visoku ekstrakcijsku učinkovitost. HPLC analizom je kvalitativno i kvantitativno određen polifenolni sastav ljuske luka (protokatehinska kiselina, kvercetin-3,4'-diglukozid, kvercetin-3-glukozid, kvercetin-4'-glukozid, kvercetin) i djelomični sastav mahune graška nakon hidrolize (p-kumarinska kiselina, sinapinska kiselina, kvercetin). Kombinacijom ekstrakcije i hidrolize u optimiranim uvjetima, iz ljuske luka izdvojena je protokatehinska kiselina ($4,25 \text{ mg g}^{-1}$) i kvercetin aglikon ($9,86 \text{ mg g}^{-1}$). U mahuni graška kvercetin je prisutan u značajno manjem udjelu nego u ljusci luka, i to isključivo u konjugiranom obliku. Ljuska luka može se smatrati vrlo bogatim izvorom kvercetina i protokatehinske kiselina, dok mahuna graška relativno dobrim izvorom kvercetina te je nužno provesti dodatna istraživanja kako bi se polifenolni sastav mahune graška u potpunosti definirao.

Ključne riječi: ekstrakcija, hidroliza, kvercetin, ljuska luka, mahuna graška

Rad sadrži: 57 stranica, 11 slika, 11 tablica, 74 literaturna navoda, 2 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: dr. sc. Aleksandra Vojvodić Cebin

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Ksenija Marković
2. Prof. dr. sc. Draženka Komes
3. Prof. dr. sc. Ksenija Durgo
4. Prof. dr. sc. Božidar Šantek (zamjena)

Datum obrane: 8. ožujka 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Chemistry and Technology of Carbohydrates and Confectionery Products

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

THE IMPACT OF EXTRACTION AND HYDROLYSIS CONDITIONS ON THE RECOVERY OF QUERCETIN FROM ONION PEEL AND PEA POD

Ivana Dajčić, 1226 PI

Abstract: The exploitation of agro-industrial wastes as a source of bioactive ingredients, is gaining a significant importance in recent years, because of its rich chemical composition and large available quantity. Onion peel and pea pod make a significant part of waste generated during production and primary processing of onions and peas. In the effort to make the most of these secondary plant waste materials by means of bioactive compounds isolation, the aim of this study was to determine the influence of different extraction and hydrolysis conditions on the extraction of quercetin. Three conventional extraction methods (maceration, infusion and decoction) and two innovative techniques (ultrasound and microwaves) were evaluated. Extraction by decoction resulted with the highest content of total polyphenols from both samples. Innovative techniques as well have shown a high extraction efficiency. HPLC analysis was used to qualitatively and quantitatively determine the polyphenolic composition of onion peel (protocatechuic acid, quercetin-3,4'-diglucoside, quercetin-3-glucoside, quercetin-4'-glucoside, quercetin) and the partial composition of pea pods upon hydrolysis (p-coumaric acid, synapic acid, quercetin). Using the combined extraction and hydrolysis at optimised conditions, protocatechuic acid (4.25 mg g⁻¹) and quercetin aglycone (9.86 mg g⁻¹) were extracted from onion peel. In pea pod, quercetin aglycone is present in significantly smaller amount, exclusively in conjugated form. Onion peel can be considered an excellent source of quercetin, while pea pod a relatively good source of quercetin, although further research is necessary to fully determine the polyphenolic composition of the pea pod.

Keywords: extraction, hydrolysis, quercetin, onion peel, pea pod

Thesis contains: 57 pages, 11 figures, 11 tables, 74 references, 2 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. Draženka Komes, Full Professor

Technical support and assistance: PhD. Aleksandra Vojvodić Cebin

Reviewers:

1. PhD. Ksenija Marković Full professor
2. PhD. Draženka Komes, Full professor
3. PhD. Ksenija Durgo, Full professor
4. PhD. Božidar Šantek, Full professor

Thesis defended: March 8, 2021

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. AGRO-INDUSTRIJSKI OTPAD	2
2.2. BIOAKTIVNI SPOJEVI IZ AGRO-INDUSTRIJSKOG OTPADA	4
2.2.1. Otpad prerade voća i povrća	5
2.2.1.1. Otpad prerade luka	6
2.2.1.2. Otpad prerade graška.....	7
2.3. METODE EKSTRAKCIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ AGRO-INDUSTRIJSKOG OTPADA.....	8
2.3.1. Konvencionalne metode ekstrakcije.....	8
2.3.2. Inovativne metode ekstrakcije	10
2.4. PRIMJENA IZDVOJENIH SPOJEVA IZ AGRO-INDUSTRIJSKOG OTPADA LUKA I GRAŠKA.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJAL	14
3.1.1. Biljni materijal	14
3.1.2. Kemikalije.....	14
3.1.3. Aparatura i pribor	16
3.2. METODE.....	17
3.2.1. Priprema ekstrakata i hidrolizata ljuske crvenog luka i mahune graška	17
3.2.1.1. Konvencionalne metode	18
3.2.1.2. Inovativne metode	20
3.2.2. Karakterizacija ekstrakta	21
3.2.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola	21
3.2.2.2. Određivanje udjela ukupnih neflavonoida.....	22
3.2.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	22
3.2.2.4. Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva HPLC metodom	24
3.2.2.5. Određivanje udjela šećera u ekstraktima	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. UTJECAJ UVJETA EKSTRAKCIJE NA BIOAKTIVNE KARAKTERISTIKE EKSTRAKATA LJUSKE LUKA	29
4.1.1. Udjel ukupnih polifenola i neflavonoida u ljusci luka	30
4.1.2. Antioksidacijski kapacitet.....	33

4.1.3.	Udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva	34
4.2.	UTJECAJ UVJETA HIDROLIZE NA IZDVAJANJE POLIFENOLNIH SPOJEVA I JEDNOSTAVNIH ŠEĆERA U EKSTRAKTIMA LJUSKE LUKA.....	38
4.2.1.	Hidroliza etanolnog ekstrakta	38
4.2.2.	Utjecaj hidrolitičkih uvjeta na izdvajanje frakcija bogatih kvercetinom i protokatehinskom kiselinom	40
4.2.3.	Udjel jednostavnih šećera	42
4.3.	UTJECAJ UVJETA EKSTRAKCIJE NA BIOAKTIVNE KARAKTERISTIKE EKSTRAKATA MAHUNE GRAŠKA	43
4.3.1.	Udjel ukupnih polifenola i neflavonoida	44
4.3.2.	Antioksidacijski kapacitet.....	45
4.3.3.	Udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva nakon hidrolize	46
5.	ZAKLJUČCI.....	49
6.	LITERATURA.....	51
7.	PRILOZI	58

1. UVOD

U novije vrijeme sve je naglašeniji problem velikog gubitka hrane i nastanka agro-otpada prilikom proizvodnje, pripreme hrane i opskrbe hranom. Otkad je Organizacija za prehranu i poljoprivredu (*engl.* Food and Agriculture Organization, FAO) 2011. godine procijenila da 1/3 ukupno proizvedene hrane završi kao otpad, puno se toga promijenilo u globalnoj percepciji ovog problema (FAO, 2021). Vođeni UN-ovim Ciljevima održivog razvoja, brojne svjetske industrije u suradnji sa znanstvenicima nastoje doskočiti ovom problemu i ponuditi alternativna rješenja. U prehrambenoj industriji se tako razvija ideja iskorištavanja agro-industrijskog otpada s ciljem izdvajanja bioaktivnih spojeva, uglavnom polifenola te njihove primjene za obogaćivanje hrane i kreiranje novih funkcionalnih proizvoda. Polifenolni spojevi predstavljaju jednu od najvećih skupina sekundarnih biljnih metabolita i čine visokovrijedne sastojke hrane. Zbog njihovih antioksidacijskih svojstava i uloge u prevenciji raznih bolesti povezanih s oksidativnim stresom, postali su vrlo zanimljivi znanstvenicima i potrošačima (Belščak-Cvitanović i sur., 2018). Osim već dobro poznatih konvencionalnih metoda u ekstrakciji polifenola iz biljnih materijala, danas se sve više istražuju i inovativne ekstrakcijske metode. Luk (*Allium cepa*, L.) i grašak (*Pisum sativum*, L.) predstavljaju dvije važne prehrambene biljne vrste, a tijekom uzgoja i prerade nastaje značajan udjel agro-industrijskog otpada. Otpad luka čini vanjska suha ljuska, vanjski mesnati listovi, vrškovi i korjenčići te dijelovi glavica sa započetim procesom truljenja. Otpad graška čini mahuna koja preostaje nakon uklanjanja zrna. Takav biljni materijal izvor je dijetalnih vlakana, proteina i mineralnih tvari te polifenolnih spojeva koji se mogu izdvajati i dodatno iskorištavati. Najvažnije polifenolne komponente ljuske luka su kvercetin i njegovi derivati (Bystrická i sur., 2013), a u mahuni graška identificiran je znatan broj glikozida kempferola i kvercetina (Fahim i sur., 2019). Zbog svoje strukture, kvercetin ima veliku sposobnost gašenja slobodnih radikala pa djeluje kao snažni antioksidans, čime postaje jedan od glavnih antioksidacijskih flavonola u ljudskoj prehrani (Metrani i sur., 2020). Iako je polifenolni sastav ljuske luka dobro istražen, za mahunu graška potrebna su daljnja istraživanja o polifenolonom sastavu kako bi se oba materijala mogla smatrati inovativnim izvorom kvercetina za primjenu u prehrambenoj industriji.

Cilj ovog rada je odrediti utjecaj različitih uvjeta ekstrakcije na izdvajanje polifenolnih spojeva iz ljuske crvenog luka i mahune graška. U kombinaciji s postupkom kiselinske hidrolize, ekstrakcija je usmjerena na izdvajanje kvercetina iz obje sirovine. S ciljem potpune karakterizacije ekstrakta ljuske crvenog luka odredit će se i udjel jednostavnih šećera u uzorcima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. AGRO-INDUSTRIJSKI OTPAD

Ciljeve održivog razvoja (eng. *Sustainable Development Goals*) 2015. godine propisali su Ujedinjeni Narodi, nastavno na Milenijske razvojne ciljeve iz 2000. godine, kao dio akcijskog plana s ciljem postizanja bolje i održive budućnosti za sve nas, a na čemu će se raditi do 2030. godine. Ciljevi se bave globalnim izazovima s kojima se suočavamo, uključujući siromaštvo, nejednakost, klimatske promjene, uništenje okoliša, mir i pravdu (UN, 2021; Gudelj, 2019). Jedan od ukupno 17 ciljeva, implementiranih u nacionalne politike svih zemalja pripadnica Ujedinjenih Naroda, je i cilj broj 12 – Odgovorna potrošnja i proizvodnja (UN, 2021). Kao odgovor na tu ideju, u svijetu se razvija *Zero Waste* pokret ili Pokret nultog otpada koji je zahvatio i prehrambenu industriju. Ideja je minimizirati proizvodnju otpada te ponovno koristiti otpad kao izvor vrijednih spojeva.

Velika količina agro-industrijskog otpada proizvodi se svakodnevno i njegovo neposredno odlaganje u okoliš uzrokuje ozbiljne ekološke probleme. Agro-industrijski otpad bogat je organskim i anorganskim spojevima (Singh i sur., 2019) pa se takav otpad zadnjih godina intenzivno istražuje i promatra kao izvor različitih vrijednih komponenata, bilo u nutritivnom ili nenutritivnom smislu.

Agro-industrijskim otpadom, u kontekstu prehrambene industrije, smatraju se ostaci iz proizvodnje i prerade primarnih prehrambenih sirovina biljnoga podrijetla, a koji nastaju u jednoj od pet faza prerade i potrošnje (Song i sur., 2015): (i) poljoprivredna proizvodnja, (ii) rukovanje i skladištenje nakon berbe, žetve, (iii) prerada, (iv) distribucija, (v) potrošnja. Agro-industrijski otpad uglavnom se sastoji od kore, ljuske, mahuna, kožice, stabljika i drugih neiskorištenih dijelova biljke, poput iscrpljene pulpe ili komine (Vojvodić i sur., 2014). Oko 38 % takvog otpada nastaje upravo prilikom procesiranja hrane. S obzirom na vrstu primarne sirovine, agro-industrijski otpad može biti: (i) otpad životinjskog podrijetla koji nastaje prilikom uzgoja stoke i morskih životinja, (ii) otpad iz mliječne industrije ili (iii) otpad biljnog podrijetla, koji uključuje voće, povrće i razne žitarice te (iv) otpad iz proizvodnje vina i piva (Helkar i sur., 2016). Zbrinjavanje ovakvog otpada u okolišu šteti ekosustavu zbog nestabilnosti deponiranih tvari, velikog udjela organskih tvari te značajne mikrobiološke aktivnosti što negativno utječe na okoliš te stvara dodatni trošak industriji koja mora osigurati adekvatno zbrinjavanje takvog otpada (Helkar i sur., 2016).

U globalnom kontekstu sve oskudnijih prirodnih izvora hrane, važno je znati da više od jedne trećine danas proizvedene hrane završi kao otpad, a to je oko 1,3 milijarde tona prehrambenog otpada godišnje (Song i sur., 2015).



Slika 1. Nastajanje i ponovna upotreba agro-industrijskog otpada (Tassoni i sur., 2020)

Prehrambena industrija i agroindustrija godišnje proizvedu puno otpada i nusproizvoda koji se mogu koristiti za neke druge potrebe (slika 1). Zadnjih godina te industrije ulažu puno napora kako bi pronašle nove, alternativne načine iskorištavanja agro-industrijskog otpada, pri čemu se ističu dva razloga. Prvo, porastom svijesti potrošača o utjecaju prehrane na zdravlje, povećala se potražnja za funkcionalnom hranom u cilju prevencije razvoja različitih bolesti. Agro-industrijski otpad bogat je izvor funkcionalnih sastojaka koji se mogu dodavati prehrambenim proizvodima i povećavati njihovu nutritivnu vrijednost. Globalna potražnja za funkcionalnom hranom je 2013. godine procijenjena na oko 100 milijuna \$ (Helkar i sur., 2016) stoga je lako zaključiti o tendenciji prehrambene industrije u smjeru ulaganja u nova istraživanja i načine ekstrakcije i izolacije bioaktivnih spojeva iz novih izvora, kao i u razvoj novih, funkcionalnih proizvoda i nutraceutika (Kumar i sur., 2017).

S druge strane, svakoj tehnologiji prehrambene industrije važno je kvalitetno zbrinuti otpad koji proizvede. Prehrambena industrija sama po sebi je relativno nisko profitabilna u odnosu na druge velike industrijske grane pa dodatni troškovi obrade otpada mogu predstavljati značajno ekonomsko opterećenje (Helkar i sur., 2016). Konvencionalno se dio takvog otpada odlaže na odlagališta, što ima značajan utjecaj na okoliš, posebno na divlje životinje, ekosustav i ljudsko zdravlje (Choi i sur., 2015), a dio se izvozi u zemlje trećeg svijeta. Navedena dva najistaknutija razloga iskorištavanja agro-industrijskog otpada su zapravo komplementarna. Proizvodnja proizvoda dodane vrijednosti iz agro-industrijskog otpada te njihova ponovna primjena u prehrambenoj industriji nameće se kao potencijalno najbolje rješenje. Time se usporedno

smanjuje količina raspoloživog otpada koji može završiti u okolišu. Dodatno, razvojem novih industrijskih postrojenja poput biorafinerija za proizvodnju goriva i/ili energije te postrojenja za pročišćavanje i izolaciju drugih vrijednih komponenata iz agro-industrijskog otpada, povećava se ukupna učinkovitost prerade u prehrambenoj industriji u kojoj otpad i nastaje (Tassoni i sur., 2020).

Agro-industrijski otpad se može iskoristiti ne samo u prehrambenoj, već i u farmaceutskoj industriji, agroindustriji, kemijskoj ili kozmetičkoj industriji, ali i u proizvodnji gnojiva i stočne hrane. Karakterizacija i ponovna upotreba bioaktivnih spojeva iz otpadnih materijala važna je kako bi se osigurala održivost prehrambene industrije te smanjio njezin utjecaj na okoliš. Time se izravno pridonosi rješavanju ekoloških problema koji su uglavnom usmjereni na klimatske promjene (Dueñas i García-Estévez, 2020). Iskorištavanje agro-industrijskog otpada na taj način može doprinijeti poboljšanju ljudskog zdravlja kroz razvoj novih proizvoda te rješavanju okolišnih problema koji su važan korak pream ostvarivanju Ciljeva održivog razvoja (Hanan i sur., 2020).

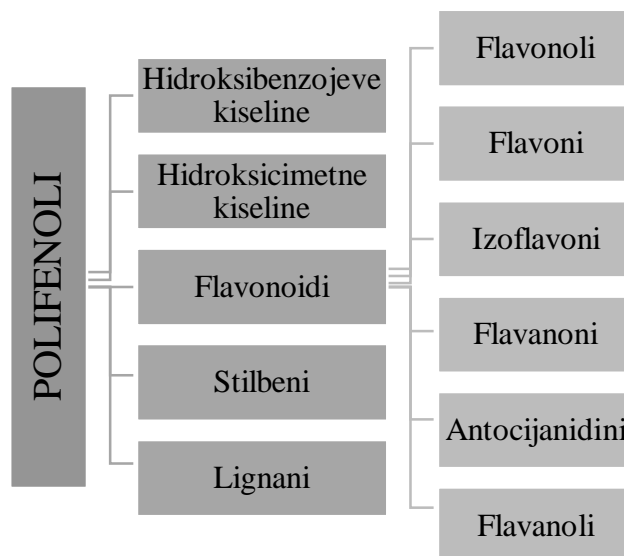
2.2. BIOAKTIVNI SPOJEVI IZ AGRO-INDUSTRIJSKOG OTPADA

Mnogobrojna istraživanja pokazala su kako se različite vrste agro-industrijskog otpada, poput voća, povrća i žitarica mogu koristiti kao potencijalni izvor bioaktivnih spojeva i nutraceutika koji imaju značajnu primjenu u prevenciji raznih bolesti (Kumar i sur., 2017).

Bioaktivni spojevi biljaka su sekundarni biljni metaboliti koji izazivaju farmakološke ili toksikološke učinke na ljude i životinje (Azmir, 2013). Ti spojevi se jako razlikuju prema kemijskim svojstvima, strukturi i funkciji te se prema tome različito grupiraju i dijele (Kris-Etherton i sur., 2002). Prema Azmir i suradnicima (2013), bioaktivni spojevi biljaka mogu se podijeliti u tri kategorije: a) terpeni i terpenoidi kojih ima približno 25000 vrsta, b) alkaloidi, približno 12000 vrsta i c) polifenolni spojevi kojih ima oko 8000 vrsta.

Polifenolni spojevi su posebno zanimljivi i intenzivno istraživani bioaktivni spojevi, prisutni u svim biljkama pa tako i u žitaricama, mahunarkama, voću, jezgričastom voću, povrću, čaju, vinu i ulju (Kris-Etherton i sur., 2002). Pripisuju im se razna pozitivna djelovanja na ljudsko zdravlje, a u prvom redu pokazuju antioksidacijska, antimikrobna, protuupalna, antialergijska svojstva i druge pozitivne učinke na zdravlje (Coman i sur., 2019). *In vitro* je dokazano njihovo svojstvo inhibicije proliferacije stanica raka, pružaju zaštitu neuronima, potiču vazodilataciju i

poboljšavaju lučenje inzulina (Kavalcová i sur., 2014). Različite podskupine polifenolnih spojeva prikazane su shematski na slici 2.



Slika 2. Podjela polifenolnih spojeva (Hardman, 2014)

2.2.1. Otpad prerade voća i povrća

Proizvodnja voća i povrća iznimno je važan segment u poljoprivrednoj proizvodnji, ali i u proizvodnji hrane. Voće i povrće konzumira se sirovo, minimalno procesirano ili procesirano, a obiluje nizom spojeva koji utječu pozitivno na ljudsko zdravlje. Organizacija za hranu i poljoprivredu (FAO) pri Ujedinjenim narodima, procijenila je da je otpad od proizvodnje voća i povrća najveći među svim vrstama hrane, a može doseći i do 60 % (Sagar i sur., 2018). Taj se otpad uglavnom sastoji od sjemenki, kora, komine, ljuski i stabljika koji sadrže vrijedne bioaktivne spojeve (Sagar i sur., 2018) poput makronutrijenata (proteini i ugljikohidrati) i fitokemikalija (polifenoli i karotenoidi) (Coman i sur., 2019).

Kod voća, vrijedni bioaktivni spojevi nalaze se u mesnatom dijelu voća tj. pulpi koju uglavnom konzumiramo sirovu. Međutim, veliki udjel istih spojeva nalazimo i u različitim nusproizvodima voća. Na primjer, kora limuna i naranče, pokožica grožđa te sjemenke avokada i manga sadrže oko 15 % veći udio polifenolnih spojeva od one u voćnoj pulpi (Sagar i sur., 2018).

Citrusno voće se u prehrambenoj industriji uglavnom prerađuje u sokove, što rezultira velikom količinom otpada koja može predstavljati čak i 50 % početne mase, a sastoji se uglavnom od kora i sjemenki. Takav otpad predstavlja bogat izvor prirodnih flavonoida, posebice flavonola

i flavona (Coman i sur., 2019). Bogat izvor polifenola predstavlja i otpad iz proizvodnje vina, a čine ih uglavnom fenolne kiseline, flavanoli, flavonoli i antocijani, čiji udjel ovisi o raznim faktorima (sorta, geografsko podrijetlo, sastav tla, klima i način prerade) (Coman i sur., 2019). Najveći dio (približno 95 %) otpada jabuka čini kora i ostaci mesnate unutrašnjosti, koji se sastoje od polisaharida stanične stijenke (npr. pektin, celuloza, hemiceluloza, lignin) i polifenolnih spojeva (npr. flavonoli, flavanoli i fenolne kiseline) (Helkar i sur., 2016).

Bioaktivni spojevi, među kojima su steroli, tokoferoli, karoteni, terpeni i polifenoli ekstrahirani iz komine rajčice pokazuju značajnu antioksidacijsku aktivnost (Kumar i sur., 2017). U kemijskom sastavu pokožice rajčice dominiraju karotenoidi poput likopena i beta-karotena te fenolni spojevi (Coman i sur., 2019). Dobrim izvorom polifenolnih spojeva može se smatrati i kora krumpira (Sagar i sur., 2018). Ljuska češnjaka predstavlja potencijalni izvor fenolnih spojeva poput kafeinske, kumarinske i ferulinske kiseline (Coman i sur., 2019).

2.2.1.1. Otpad prerade luka

Luk (*Allium cepa*, L.) je druga najvažnija poljoprivredna prehrambena kultura u svijetu. Kina i Indija najveći su proizvođači luka, a ukupna proizvodnja u svijetu iznosi 74,25 milijuna tona s proizvodne površine od 4,364 milijuna hektara (Pal i Jadeja, 2018). Tijekom prerade, gotovo 37 % svježeg luka prelazi u otpad koji se sastoji od vanjske suhe ljuske, dva unutarnja mesnata sloja, korijena i gornjih listova te oštećenih lukovica (Pal i Jadeja, 2018).

Luk predstavlja bogat izvor proteina, šećera, celuloze, mineralnih tvari, eteričnih ulja i flavonoida, među kojima se posebno ističu eterična ulja i flavonoidi. Udjel i profil ovih spojeva ovisi o sorti, stupnju zrelosti, okolišnim i agro-tehničkim uvjetima te vremenu skladištenja (Sharma i sur., 2016).

Prema istraživanju Vojvodić i suradnika (2016) osnovni makrokomponentni sastav ljuske luka čini 82,8 % ugljikohidrata, 6,9 % proteina, 9,4 % mineralnih tvari te 0,9 % masti. Ljuska luka bogata je polifenolnim spojevima od kojih je najvažniji flavonol kvercetin (Pal i Jadeja, 2018). Ljuska luka sadrži veći udjel ukupnih flavonoida od jestivih dijelova luka, među kojima je najzastupljeniji kvercetin (Ju i Song, 2019). Prema istraživanju Prakash i suradnika (2007), u kojem su uspoređivani udjeli polifenolnih spojeva u različitim slojevima i vrstama luka, zaključeno je da je ljuska crvenog luka najbolji izvor protokatehinske kiseline ($138 \mu\text{g g}^{-1}$), kvercetina ($5110 \mu\text{g g}^{-1}$) i kempferola ($481 \mu\text{g g}^{-1}$), a slijedi je ljuska ljubičastog luka. Protokatehinska kiselina je jedan od najjačih antioksidansa prisutnih u voću i povrću te pokazuje preventivni učinak na razvoj karcinoma debelog crijeva i usne šupljine te inhibitorni

učinak na razvoj tumora kože, ispitivano na miševima (Ly i sur., 2005). Također, prema istraživanju Cheng i suradnika (2013), u kojem su uspoređivani udjeli polifenolnih spojeva iz različitih slojeva crvenog i ljubičastog luka, ljuska obje vrste pokazala se odličnim izvorom kvercetina i njegovih derivata (kvercetin-3,4'-diglukozida i kvercetin-4'-glukozida) te galne i ferulinske kiseline. Prema literaturi, flavonoid kojeg ima najviše u ljusci luka je kvercetin, a prema istraživanju Lee i suradnika (2014) on iznosi 62 %. Kvercetin ima veliku sposobnost gašenja slobodnih radikala pa djeluje kao snažni antioksidans i jedan je od glavnih prehrambenih antioksidansa (Metrani i sur., 2020). Osim kao antioksidans, kvercetin ima brojne druge pozitivne učinke na ljudsko zdravlje pa tako potiskuje oslobađanje histamina iz stanice inhibirajući alergijske reakcije. Također posjeduje značajna antikancerogena svojstva te smanjuje pojavu raka želuca, crijeva i pluća (Bystrická i sur., 2013). Kvercetin je učinkovit inhibitor lipidne peroksidacije, što indicira potencijalan pozitivan učinak na aterosklerozu. Također, unos kvercetina povezan je sa smanjenjem rizika od nastanka krvožilnih i drugih degenerativnih bolesti (Bystrická i sur., 2013).

2.2.1.2. Otpad prerade graška

Zeleni grašak (*Pisum sativum*, L.) se najviše uzgaja u Indiji, s godišnjom proizvodnjom od oko 3,56 milijuna tona, što svake godine generira više od milijun tona otpada mahuna graška (Nimbalkar i sur., 2018). One su dobar izvor dijetalnih vlakana, proteina i mineralnih tvari (Hanan i sur., 2020).

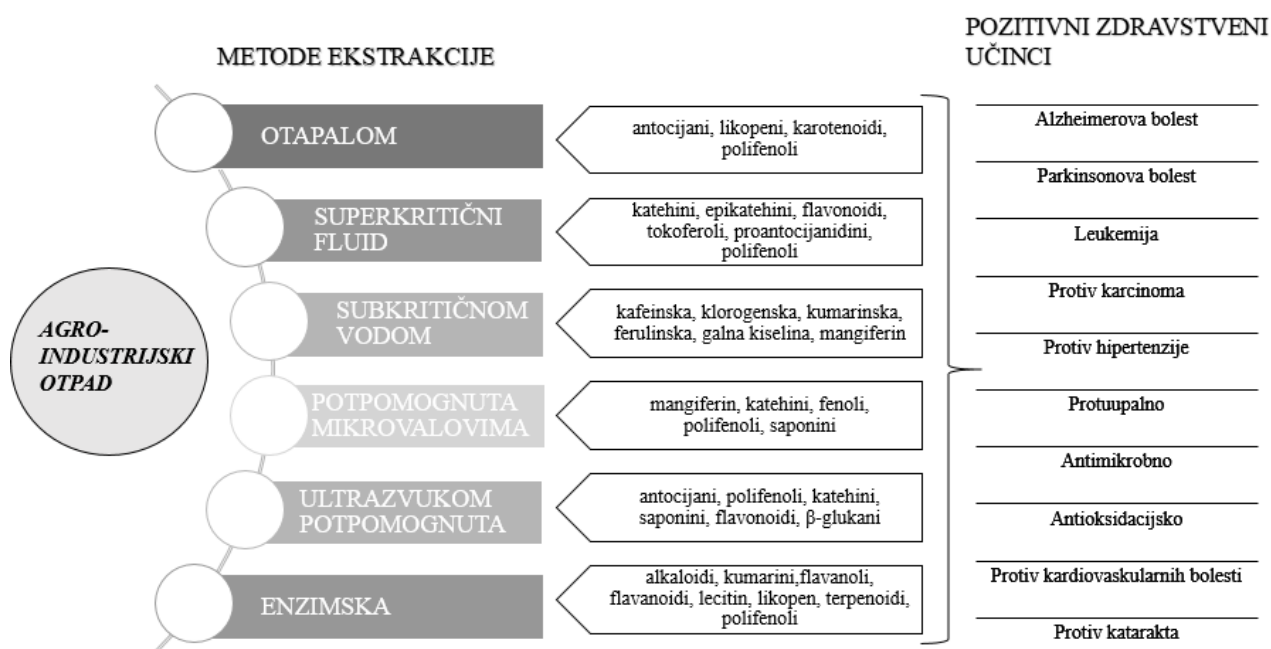
Prema istraživanju Vojvodić i suradnika (2016), osnovni makrokomponentni sastav mahune graška čini 78,4 % ugljikohidrata, 4,7 % proteina, 6,3 % mineralnih tvari te 0,7 % masti. Najvažnija frakcija mahune graška su upravo prehrambena vlakna (58,6 g/100 g uzorka) (Mateos-Aparicio i sur., 2010).

S obzirom na dostupnu literaturu, tek manji broj istraživanja je usmjeren na ispitivanje polifenolnog sastava mahune graška. Ipak, neka su istraživanja pokazala da je ukupni udjel polifenola u mahuni graška značajno veći od onog u zrnu graška. Na primjer, udjel ukupnih polifenola u mahuni žutog graška bio je dvostruko veći od istoga u zrnu (Guo i sur., 2019). Većinu identificiranih polifenolnih spojeva iz cijele biljke graška čine glikozilirani flavonoli, a u mahuni graška je identificiran i znatan broj glikozida kempferola i kvercetina (Fahim i sur., 2019).

2.3. METODE EKSTRAKCIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ AGRO-INDUSTRIJSKOG OTPADA

Važno je naglasiti da je otpad prehrambene industrije sklon mikrobiološkoj degradaciji i kvarenju, što uzrokuje neugodne mirise i probleme u okolišu. Općenito, takav otpad treba dalje prerađivati korištenjem toplinskih (zagrijavanje, mikrovalno zagrijavanje, infracrveno zagrijavanje te sterilizacija) ili netoplinskih metoda (visoki hidrostatski tlak, ultrazvuk, pulsirajuće električno polje, zračenje i pulsirajuće svjetlo) (Sagar i sur., 2018) kako bi se spriječilo mikrobiološko kvarenje i omogućila danja upotreba tog otpada.

Metode koje se koriste za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz agro-industrijskog otpada uglavnom se temelje na ekstrakciji otapalom, a u novije vrijeme i ekstrakciji superkritičnim fluidima, subkritičnom vodom, primjenom mikrovalova i ultrazvuka te korištenjem enzima (Kumar i sur., 2017). Prikaz metoda ekstrakcije za izdavanje tih spojeva dan je na slici 3. Također, slika 3. prikazuje neke pozitivne zdravstvene učinke izdvojenih bioaktivnih spojeva.



Slika 3. Pregled metoda ekstrakcije agro-industrijskog otpada i pozitivnih zdravstvenih učinaka izdvojenih bioaktivnih spojeva (Kumar i sur., 2017)

2.3.1. Konvencionalne metode ekstrakcije

Većina konvencionalnih metoda ekstrakcije temelji se na tzv. ekstrakcijskoj snazi različitih otapala koja se koriste uz primjenu topline i/ili miješanja (Azmir i sur., 2013). Općenito za

povećanje ekstrakcijske učinkovitosti iz čvrstih uzoraka vrijedi da treba povećati površinu međufaznog djelovanja (usitnjavanjem), povećati brzinu gibanja faza i produljiti vrijeme trajanja ekstrakcije. Ekstrakcija organskih tvari iz čvrste faze može se provoditi pri sobnoj temperaturi (maceracija) i pri povišenoj temperaturi (infuzija i dekokcija) (Blekić i sur., 2011). Ekstrakcija otapalom vrlo je korisna metoda u usporedbi s drugim metodama zbog niske cijene i jednostavnosti izvođenja. Međutim, za ovu metodu koriste se i toksična otapala, često su potrebne velike količine istih te je vrijeme trajanja tih metoda poduže. Uz to, postoji i mogućnost toplinske degradacije spojeva od interesa (Kumar i sur., 2017).

Maceracija, infuzija i dekokcija

Maceracija je metoda koja se koristi u proizvodnji vina, a koja se danas široko koristi u istraživanju ljekovitog bilja (Azwanida, 2015). U ekstrakciji tipa mecaracija, usitnjeni biljni materijal se miješa s pogodnim otapalom i ostavlja stajati na sobnoj temperaturi nekoliko dana (najmanje 3), uz često miješanje (Handa, 2008). Miješanje je potrebno kako bi se poboljšala difuzija otapala i kako bi se uklonila koncentrirana otopina u neposrednoj blizini površine uzorka i tako povećao prinos ekstrakcije (Azmir i sur., 2013). Smjesa se zatim odvoji od nastalog taloga i pročisti se filtracijom (Handa, 2008). Radi se o jednostavnoj metodi ekstrakcije kojoj je cilj izdvajanje vrijednih komponenti iz inertnog materijala tretiranjem selektivnim otapalom (Singh, 2008). Maceracija organskim otapalima je već dobro istražena tehnika ekstrakcije antioksidansa iz prirodnih materijala (Razavi i Kenari, 2016). Nedostatke maceracije predstavlja duljina trajanja i ekstrahirajuća moć koja je dosta niža u odnosu na druge metode (Da Silva, 2016).

Ekstrakcije tipa infuzije i dekokcije koriste isti princip kao i maceracija, u obje metode sirovina se miješa s pogodnim otapalom, ali se smjesa dodatno zagrijava. Zbog toga je vrijeme kontakta materijala i otapala prilikom ekstrakcije tim dvjema metodama kraće, što ujedno skraćuje cijeli postupak ekstrakcije. Dekokcija je prikladna metoda ekstrakcije samo za toplinski stabilne spojeve jer se ovdje materijal zagrijava u otapalu pri visokoj temperaturi. Dekokcija se često koristi za pripremu ekstrakata tvrdih biljnih materijala (npr. korijenja i ljuske) i obično rezultira većim udjelom otopljenih spojeva u usporedbi s maceracijom i infuzijom (Azwanida, 2015). Ekstrahirajuća moć maceracije je time najveća u usporedbi s ostale dvije konvencionalne metode.

Osnovni nedostaci konvencionalnih metoda ekstrakcije su upotreba organskih otapala, visok utrošak energije zbog zagrijavanja, toplinska razgradnja termolabilnih spojeva te dugo trajanje

tih metoda ekstrakcije (Mourtzinou i sur., 2018). Stoga, u novije vrijeme se sve intenzivnije istražuju ekološki povoljnije metode ekstrakcije koje ujedno rezultiraju visokokvalitetnim ekstraktima (Razavi i Kenari, 2016). Da bi se prevladala ta ograničenja konvencionalnih metoda, uvode se nove koje se nazivaju inovativnim metodama ekstrakcije (Azmir i sur., 2013).

2.3.2. Inovativne metode ekstrakcije

Ultrazvučna ekstrakcija

Ekstrakcija bioaktivnih tvari ultrazvukom (20-100 kHz) jedna je od novijih metoda ekstrakcije kojom je omogućena visoka reproducibilnost, kraće vrijeme trajanja, jednostavnije rukovanje te niže temperature i manje količine korištenih otapala (Jambrak i Drmić, 2010). Prilikom korištenja ultrazvuka, dolazi do širenja ultrazvučnih valova kroz medij i nastajanja kavitacijskih mjehurića koji rastu i onda se urušavaju oslobađajući veliku količinu energije što uzrokuje bubrenje stanica te probijanje staničnih stjenki (Jambrak i Drmić, 2010.; Azmir i sur., 2013). Time ultrazvuk omogućuje bolju difuziju otapala u materijal, poboljšavajući prijenos mase, a time i ekstrakcijsku učinkovitost (Kumar i sur., 2017). Kao i kod drugih ekstrakcijskih tehnika, veličina čestica i vrsta otapala su, između ostalog, važni čimbenici za postizanje učinkovite ekstrakcije (Azmir i sur., 2013). Ova tehnika je vrlo lako primjenjiva jer se može koristiti uobičajena laboratorijska oprema poput ultrazvučne kupelji (Altemimi i sur., 2017). Također, ova se tehnika ekstrakcije smatra ekološki prihvatljivom zbog smanjene količine korištenog otapala i energije u odnosu na konvencionalne metode (Altemimi i sur., 2017).

Mikrovalna ekstrakcija

Mikrovalna ekstrakcija je privukla pozornost istraživača kao nova tehnika za izdvajanje bioaktivnih spojeva iz različitih vrsta biljaka i nusproizvoda (Altemimi i sur., 2017). Mikrovalovi su dio elektromagnetskog zračenja u frekvencijskom području od 300 MHz do 300 GHz. Čine ih dva okomita oscilirajuća polja - električno i magnetsko polje (Azmir i sur., 2013). Prilikom mikrovalnog tretmana dolazi do zagrijavanja cijelog volumena simultano pri čemu dolazi do narušavanja vodikovih veza i rotacije dipola što rezultira pojačanim prodiranjem otapala u materijal te se na taj način pospješuje prijenos mase iz čvrstog uzorka. Mikrovalna ekstrakcija pogodna je za izdvajanje termolabilnih spojeva, kao što su polifenoli (Blekić i sur., 2011). Ova vrsta ekstrakcije se često koristi kao alternativa konvencionalnim

metodama za ekstrakciju antioksidansa zbog kraćeg trajanja ekstrakcije i manjeg potrebnog volumena otapala u odnosu na konvencionalne metode (Altemimi i sur., 2017).

Ekstrakcija superkritičnim fluidima

Superkritično stanje fluida postiže se podvrgavanjem neke tvari temperaturi i tlaku iznad njegove kritične točke pa fluid poprima svojstva plina, poput difuzivnosti, viskoznosti i površinske napetosti, te svojstva tekućine poput gustoće i sposobnosti solvatacije (Azmir i sur., 2013). Zbog svoje niske viskoznosti i relativno visoke difuzivnosti, superkritični fluidi imaju bolja transportna svojstva od tekućina, mogu lako difundirati kroz čvrste materijale i omogućuju puno kraće vrijeme ekstrakcije u odnosu na one tekućim otapalima (Da Silva i sur., 2016). Ekstrakcija superkritičnim fluidima koristi se za ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz različitih biljnih materijala, poput ljekovitog bilja i agro-industrijskog otpada, a također i iz algi i mikroalgi. Primjerice, superkritični ugljikov dioksid (SC-CO₂) zanimljiva je alternativa organskim otapalima, a odlikuje ga neeksplozivnost, netoksičnost i niska cijena (Kumar i sur., 2017). Ekstrakcija superkritičnim fluidima smatra se ekološki prihvatljivom metodom.

Ekstrakcija subkritičnom vodom

Ekstrakcija subkritičnom vodom je možda najperspektivniji novi pristup ekstrakciji. Subkritična voda se odnosi na vodu temperature između 100 i 374 °C i tlaka koji je dovoljno visok da je održi tekućom (ispod kritičnog tlaka od 22 MPa). Takva ekstrakcija je pogodna za ekstrakciju polifenolinskih spojeva iz različitih supstrata, uključujući i prehrambene namirnice, a također je i ekološki prihvatljiva (Kumar i sur., 2017).

Enzimska ekstrakcija

Enzimi se široko koriste za ekstrakciju bioaktivnih komponenata iz otpada hrane. Biljna tkiva, iz kojih se uglavnom ekstrahiraju antioksidansi, sadrže polisaharide poput celuloze, hemiceluloze i pektina koji djeluju kao prepreke pri oslobađanju unutarstaničnih tvari. U tom slučaju, enzimi poput celulaze, β-glukozidaze, ksilanaze, β-glukonaze i pektinaze pomažu u razgradnji stanične stijenke i depolimerizaciji polisaharida iz nje olakšavajući oslobađanje bioaktivnih komponenti. Osim toga, zbog upotrebe vode kao otapala umjesto organskih otapala, ova metoda ekstrakcije je i ekološki prihvatljivija za izdvajanje bioaktivnih spojeva i ulja iz agro-industrijskog otpada (Kumar i sur., 2017).

Različiti sekundarni metaboliti, mineralne tvari i vitamini mogu se izdvojiti iz agro-industrijskog otpada koristeći različite metode ekstrakcije (Kumar i sur., 2017), a koji se onda

moгу implementirati u nove, funkcionalne prehrambene proizvode. U sljedećih nekoliko godina stručnjaci očekuju razvoj niza različitih metoda ekstrakcije visokovrijednih spojeva iz različitih vrsta agro-industrijskog otpada.

U tablici 1 prikazan je pregled korištenih konvencionalnih i inovativnih metoda ekstrakcije na uzorcima ljuske luka i mahune graška.

Tablica 1. Metode ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz ljuske crvenog luka i mahune graška

<i>Metoda</i>	<i>Uzorak</i>	<i>Ispitivana svojstva</i>	<i>Referenca</i>
<i>Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija</i>	Mahuna graška	Analiziran je udjel ukupnih polifenola.	Ordoñez i sur., 2019
<i>Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija</i>	Mahuna graška	Apsorpcija, metabolizam i antioksidacijska aktivnost, <i>in vivo</i>	Guo i sur., 2019
<i>Pulsirajuće električno polje</i>	Ljuska ljubičastog luka	Analiziran je udjel ukupnih polifenola i flavonoida te antioksidacijski kapacitet.	Liu i sur., 2018
<i>Ekstrakcija subkritičnom vodom</i>	Ljuska crvenog luka	Analiziran je udjel ukupnih polifenola i flavonoida te antioksidacijski kapacitet.	Munir i sur., 2018
<i>Ekstrakcija dubokim eutektičkim otapalima</i>	Ljuska ljubičastog luka	Analiziran je udjel ukupnih polifenola, antioksidacijski kapacitet te je provedena HPLC analiza.	Pal i sur., 2018
<i>Maceracija, ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, ekstrakcija superkritičnim CO₂</i>	Ljuska crvenog luka	Analiziran je udjel kvercetina, udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet.	Razavi i sur., 2016
<i>Infuzija 70 %-tnim etanolom, vrućom vodom i ekstrakcija subkritičnom vodom</i>	Ljuska crvenog luka	Analiziran je udjel kvercetina, udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet.	Lee i sur., 2014

2.4. PRIMJENA IZDVOJENIH SPOJEVA IZ AGRO-INDUSTRIJSKOG OTPADA LUKA I GRAŠKA

Ljuska luka i mahuna graška vrlo su vrijedni izvori raznih bioaktivnih spojeva, od kojih se ponajviše ističu polifenoli i to posebno flavanol kvercetin i/ili njegovi glikozidi koji se u značajnom udjelu prisutan u obje vrste spomenutog agro-industrijskog otpada. Ovi su spojevi

poznati zbog svojeg pozitivnog djelovanja na ljudsko zdravlje pa se, nakon ekstrakcije i karakterizacije, oni koriste u kreiranju novih prehrambenih proizvoda ili se njihova svojstva primjenjuju u tehnološke svrhe.

Ljuska luka se već neko vrijeme istražuje u znanstvenim krugovima pa se u literaturi nalazi dovoljno informacija o izdvojenim spojevima i njihovim karakteristikama te potencijalnim mogućnostima primjene istih. Ona se koristi kao izvor bioaktivnih spojeva, ali i u proizvodnji hrane. Sve je veći broj znanstvenih radova u kojima se istražuje primjena praha ljuske luka ili ekstrakta za proizvodnju nekog prehrambenog proizvoda ili poboljšanje njegovih svojstava (Tablica 2).

S druge strane, mahuna graška je tek nedavno postala potencijalno zanimljiva sirovina za daljnja istraživanja pa se tako u literaturi ne nalazi puno informacija o novim načinima primjene izdvojenih bioaktivnih spojeva. Mahuna graška se danas uglavnom koristi kao stočna hrana ili u proizvodnji biogoriva. Relativno je malo podataka koji govore o primjeni mahune graška u proizvodnji hrane (Tablica 2).

Tablica 2. Primjena izdvojenih spojeva iz ljuske luka i mahune graška

<i>Oblik primjene</i>	<i>Primjena za konačni proizvod</i>	<i>Referenca</i>
<i>Prah ljuske luka</i>	Produljenje roka trajanja kobasica od mehanički otkošenog ribljeg mesa	Bedrničec i sur., 2020
<i>Ekstrakt ljuske luka</i>	Proizvodnja funkcionalnog kruha	Piechowiak i sur., 2020
<i>Ekstrakt ljuske crvenog luka</i>	Proizvodnji biorazgradivih filmova na bazi funorana kao antioksidativni materijal za pakiranje	Ju i Song, 2019
<i>Ekstrakt ljuske luka</i>	Prehrambena bojila – primjena u proizvodnji jogurta	Mourtzinis i sur., 2018
<i>Prah ljuske luka</i>	Ekstrudirani proizvodi s boljim funkcionalnim svojstvima	Tonyali i Sensoy, 2017
<i>Ekstrakt ljuske luka</i>	Crveno prehrambena bojilo – primjena u proizvodnji bombona	Om-Hashem i sur., 2016
<i>Prah mahune graška</i>	Priprema instant juhe od graška	Hanan i sur., 2020

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Biljni materijal

U ovome radu korišten je čvrsti otpad nakon čišćenja crvenog luka te čvrsti otpad nakon čišćenja svježeg zelenog graška. Otpad luka (ljuska crvenog luka, oznaka: OP (*engl.* onion peel)) dobiven je kao stvarni otpad iz restoranske pripreme hrane, a sastojao se od vanjske suhe ljuske, vanjskih mesnatih listova, vrškova i korjenčića te dijelova glavice koji nisu bili prikladni za konzumaciju. Otpad graška (mahuna graška, oznaka: PP (*engl.* pea pod)) dobiven je izdvajanjem zelenih zrna, odnosno sačinjavale su ga prazne mahune graška. Oba uzorka sušena su u laboratorijskom sušioniku pri 50 °C do udjela vode od približno 10 %, a zatim su usitnjeni pomoću mlinca za kavu te prosijani kroz sito veličine pora 450 µm. Tako pripremljeni uzorci čuvani su u papirnatim vrećicama uz dodatak male količine silikagela kako bi se spriječilo nakupljanje vlage, na tamnom mjestu i pri sobnoj temperaturi.

3.1.2. Kemikalije

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

Priprema ekstrakata, hidrolizata i frakcija

- Etanol (96 %), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Etil acetat, Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- Klorovodična kiselina (37 %), Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- Natrijev klorid, Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- Natrijev sulfat, bezvodni, Gram mol (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela ukupnih polifenola

- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (>97,5 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- Natrijev karbonat, bezvodni, Gram mol (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela ukupnih neflavonoida

- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Formaldehid, T. T. T. d.o.o. (Sveta Nedelja, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina (37 %-tna), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat, bezvodni, Gram mol (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

- DPPH reagens (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; min 85 % CHN), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- Metanol, J. T. Baker (Pennsylvania, SAD)

Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva HPLC metodom

- Acetonitril, HPLC kvalitete, Fischer Scientific (Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Analitički standardi polifenolnih spojeva:
 - Flavonoli:
 - Hidroksibenzojeve kiseline:
 - kvercetin (>97 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
 - kvercetin-3,4'-diglukozid (>97 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
 - kvercetin-3-glukozid, Fluka/Honeywell (Charlotte, SAD)
 - kvercetin-4'-glukozid (>97 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- Metanol, Mallinckrodt Baker B.V. (Deventer, Nizozemska)
- Mravlja kiselina
 - *p*-kumarinska kiselina (>98 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
 - protokatehinska kiselina (>97 %), Acros Organics/Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
 - sinapinska kiselina (>95 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- Voda HPLC kvalitete

Određivanje reducirajućih šećera PAHBAH metodom

- D-(-)-fruktoza (>99 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- Hidrazid *p*-hidroksibenzojeve kiseline, Sigma Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- Kalcijev klorid, bezvodni, Gram-mol (Zagreb, Hrvatska)

- Klorovodična kiselina (37 %), Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- Natrijev citrat dihidrat, T.T.T. (Sv. Nedelja, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid, u granulama, T.T.T. (Sv. Nedelja, Hrvatska)

Određivanje ketoza metodom s tiobarbiturnom kiselinom

- 2-tiobarbiturna kiselina, Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- D-(-)-fruktoza (>99 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- Klorovodična kiselina (37 %), Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)

3.1.3. Aparatura i pribor

Priprema ekstrakata i frakcija

- Analitička vaga (New Classic ML204/01), Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Centrifuga (SL 8R) s rotorom s utorima pod fiksnim kutom (HIGHConic™ III), Thermo Scientific (Massachusetts, SAD)
- Laboratorijska vaga (GF-3000 EC), A&D Instruments (Japan)
- Laboratorijski pribor: željezni stalak s mufama i klemama, teflonski magneti za miješanje, propipete, pincete, spatula, filter papir Whatman No1
- Laboratorijsko plastično posuđe: Falcon epruvete (15 i 50 mL), plastične Eppendorf epruvete (2 mL), plastične Pasteur pipete, plastične šprice (2 i 5 mL), plastični čepovi za epruvete
- Laboratorijsko stakleno posuđe: laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice, reagens boce, tikvice s okruglim dnom (50 i 100 mL), pipete, epruvete s navojem, Liebigova hladila
- Magnetska miješalica (SMHS-6), Witeg (Wertheim, Njemačka)
- pH metar (FiveEasy FE20), Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Rotacijski vakuum uparivač IKA RV 8 (Staufen, Njemačka) s vakuum pumpom IKA Vacstar digital (Staufen, Njemačka) i vodenom kupelji IKA HB digital (Staufen, Njemačka)
- Termostatirana vodena kupelj(VK 2 ERN), Inkolab (Zagreb, Hrvatska)
- Tresilica (MX-S), DLAB Scientific Co. (Beijing, Kina)
- Ultrazvučna kupelj (S 60 H) Elmasonic, Elma (Singen, Njemačka)
- Uređaj za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima MicroSYNTH (Milestone, Italija)

Spektrofotometrijske analize (ukupni polifenoli, flavonoidi, antioksidacijski kapacitet)

- Laboratorijski pribor: propipete, kivete za mjerenje u spektrofotometru
- Laboratorijsko stakleno posuđe: laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice, reagens boce, staklene epruvete s navojem i čepovima
- Mikropipete (P200, P1000, P5000), Gilson (Villiers-le-Bel, Francuska)
- Spektrofotometar (Genesys™ 10S UV-VIS), Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)

HPLC analiza (tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti)

- HPLC viala s pripadajućim navojnim čepovima sa septom, Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornija, SAD)
- Tekućinski kromatograf Agilent Series 1200, Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornija, SAD) sastavljen od degazera, kvaterne pumpe, automatskog injektora s autosamplrom, termostata kolone i DAD (engl. diode-array) detektora
- HPLC kolona Zorbax Extend C18 (4,6 x 250 mm, 5 μ m), (Santa Clara, Kalifornija, SAD)
- Analitička vaga (New Classic ML204/01), Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Laboratorijsko stakleno posuđe: reagens boce, pipete, laboratorijske čaše, odmjerne tikvice, menzure
- Laboratorijski pribor: plastične šprice (2 mL), mikrofilteri (regenerirana celuloza) veličine pora 0,2 μ m (13/45) (Macherey-Nagel, Njemačka), lađice za vaganje
- Ultrazvučna kupelj S 60 H Elmasonic, Elma (Singen, Njemačka)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema ekstrakata i hidrolizata ljuske crvenog luka i mahune graška

Ekstrakti ljuske crvenog luka i mahune graška pripremani su korištenjem različitih konvencionalnih (maceracija, infuzija, dekokcija) i inovativnih metoda ekstrakcije (ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, ekstrakcija mikrovalovima) s ciljem određivanja optimalnih uvjeta ekstrakcije s obzirom na ekstrakcijsku učinkovitost polifenolnih spojeva.

3.2.1.1. Konvencionalne metode

Maceracija

Ekstrakcija tipa maceracije (M) provedena je pri sobnoj temperaturi, u mraku, tijekom 48 h. Tijekom ukupnog trajanja maceracije, smjesa je kratko promiješana nekoliko puta. Omjer uzorak:otapalo iznosio je 1:20 (w/v), a masa uzorka iznosila je 2 g. Kao otapalo je korištena otopina etanola (80 %). Po završetku maceracije, ekstrakt je izdvojen filtracijom pomoću vakuuma (Whatman No. 1) te je kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 50 mL. Maceracija je provedena u duplikatu.

Infuzija

Ekstrakcija tipa infuzije (I) provedena je zagrijavanjem smjese uzorka i otapala pri 80 °C, pomoću uljne kupelji, tijekom 30 i 60 minuta. Uzorak i otapalo pomiješani su u omjeru 1:20 (w/v), a kao otapalo za ljusku crvenog luka korištena je otopina etanola (50 % i 80 %), dok je u slučaju mahune graška korištena destilirana voda. Uzorak je odvagano u tikvicu s okruglim dnom (100 mL) te je dodano otapalo i teflonski magnetiće. Tikvica je zatim postavljena na vodeno hladilo te je uronjena u uljnu kupelj u kojoj je održavana temperatura od 83 °C. Na magnetskoj miješalici je uključeno miješanje kako bi se postigla homogenost uzorka u cijelom volumenu otapala. Po završetku ekstrakcije, tikvica je ostavljena da se hladi nekoliko minuta, a zatim je ekstrakt izdvojen filtracijom pomoću vakuuma (Whatman No. 1) te kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 50 mL. Infuzija OP i PP pripremljena je u duplikatu.

Dekokcija

Ekstrakcija tipa dekokcije (D) provedena je zagrijavanjem smjese uzorka i otapala pri 100 °C, pomoću uljne kupelji, tijekom 20 i 60 minuta. Uzorak i otapalo pomiješani su u omjeru 1:20 (w/v), a kao otapalo za ljusku crvenog luka je korištena otopina etanola (50 % i 80 %), dok je u slučaju mahune graška korištena destilirana voda. Uzorak je odvagano u tikvicu s okruglim dnom (100 mL) te je dodano otapalo i teflonski magnetiće. Tikvica je zatim postavljena na vodeno hladilo te je uronjena u uljnu kupelj u kojoj je održavana temperatura od 105 °C. Na magnetskoj miješalici je uključeno miješanje kako bi se postigla homogenost uzorka u cijelom volumenu otapala. Po završetku ekstrakcije, tikvica se ostavljena da se hladi nekoliko minuta, a zatim je ekstrakt izdvojen filtracijom pomoću vakuuma (Whatman No. 1) te kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 50 mL. Dekokcija OP i PP provedena je u duplikatu.

Kiselinska hidroliza

Hidroliza je provedena primjenom klorovodične kiseline (konačne koncentracije 2 M) u vodi ili vodenoj otopini etanola (konačna koncentracija etanola tijekom hidrolize iznosila je 40 % (v/v)). Ekstrakti ljuske luka ili mahune graška pomiješani su s otopinom klorovodične kiseline (4 M) u omjeru 1:1 (v/v) u staklenim epruvetama s čepovima na navoj. Sadržaj je dobro homogeniziran na vorteksu, a začepljene epruvete uronjene u vodenu kupelj zagrijanu pri 80 °C (razina vode je malo iznad razine uzorka u epruveti). U svrhu definiranja optimalnog vremena hidrolize, reakcija hidrolize zaustavljena je nakon 30, 60, 90 i 120 min uranjanjem epruveta u hladnu vodenu kupelj (5-10 min). U ohlađenim hidrolizatima određeni su pojedinačni polifenoli i šećeri. Hidroliza ekstrakata provedena je u duplikatu.

Ekstrakcija tekuće-tekuće

Ekstrakcijom tekuće-tekuće s etil acetatom izdvojeni su polifenolni spojevi nakon hidrolize izvornih ekstrakata. Za uzorke OP, pipetira se 0,5 mL ekstrakta (2,5 mL za PP) u epruvetu s čepom na navoj, a zatim se doda 2 mL otopine natrijevog klorida (5 M) (2 mL za PP) i 2,5 mL demineralizirane vode (0,5 mL za PP). Homogeniziranoj otopini doda se 5 mL etil acetata i zatim se provede ekstrakcija tekuće-tekuće intenzivnim miješanjem faza pomoći vorteksa tijekom 1 min. Nakon toga, epruveta se kratko centrifugira (2000 x g, 4 °C, 1 min) kako bi se pospješilo razdvajanje faza. Gornja organska faza prebaci se u čistu epruvetu, a donja vodena se ekstrahira s jednakim volumenom etil acetata još 2 puta. U skupljene organske faze nakon svake ekstrakcije se doda bezvodnog natrijevog sulfata, uz miješanje na vorteksu, kako bi se uklonila rezidualna voda. Smjesa se centrifugira (2000 x g, 4 °C, 5 min), a supernatant se kvantitativno prenese u tikvicu za uparavanje. Organski ekstrakt se upari do suhoga pomoću rotacijskog vakuum uparivača (pri 45 °C), a suhi talog se otopi u 1 mL (0,5 mL za PP) 80 %-tnog metanola. U vodenoj fazi preostaloj nakon ekstrakcije tekuće-tekuće određuje se udjel jednostavnih šećera. Ekstrakcija tekuće-tekuće provedena je u duplikatu za svaki uzorak.

Optimizacija izdvajanja polifenola ljuske luka primjenom hidrolize i ekstrakcije

Optimizacija izdvajanja polifenola kombinacijom ekstrakcije i hidrolize na temelju preliminarnih eksperimenata, provedena je za uzorak ljuske luka. U tu svrhu, definirana su 3 načina ekstrakcije, kako je navedeno u tablici 3.

Tablica 3. Postupci izdvajanja polifenola iz ljuske luka kombinacijom konvencionalne ekstrakcije i hidrolize

Oznaka načina izdvajanja	Opis postupka
A	1 Dekokcija vodom (100 °C) tijekom 60 min.
	2 Infuzija (80 °C) otopinom etanola (80 % (v/v) i klorovodične kiseline (2 M) tijekom 60 min.
B	1 Infuzija (80 °C) vodenom otopinom klorovodične kiseline (2 M) tijekom 60 min.
	2 Infuzija (80 °C) 80 %-tnom otopinom etanola tijekom 60 min.
C	1 i 2 1 - Infuzija (80 °C) vodenom otopinom klorovodične kiseline (2 M) tijekom 60 min.
	2 – dodatak trostrukog volumena 96 %-tnog etanola u ohlađenu smjesu i ekstrakcija miješanjem pri sobnoj temperaturi tijekom 30 min.

Sva 3 navedena postupka (A, B i C) provedeni se dvostupanjski (1 i 2), ali za postupak C nisu izdvojene zasebni ekstrakti nakon svakog koraka. Pojedini koraci su uključivali infuziju ili dekokciju s prikladnim otapalima, prema prethodno opisanim uvjetima (vidi potpoglavlja 3.2.1.1.2. i 3.2.1.1.3.). Nakon svakog koraka, za postupke A i B, kvantitativno su izdvojeni zasebni ekstrakti pomoću vakuum filtracije (Whatman No. 1), a talog nakon 1. koraka korišten je kao materijal za 2. ekstrakcijski korak. U postupku C, nakon provedenog prvog koraka nisu izdvojeni ekstrakt i talog, već je smjesa uzorka i vodenog hidrolizata ohlađena, a u istu je zatim dodan trostruki volumen etanola te je nastavljena ekstrakcija miješanjem pri sobnoj temperaturi tijekom 30 min. Po završetku ekstrakcije, ekstrakt je kvantitativno izdvojen vakuum filtracijom (Whatman No. 1). Kombinirani postupci ekstrakcije i hidrolize provedeni su u duplikatu.

3.2.1.2. Inovativne metode

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (UZV) provedena je u ultrazvučnoj kupelji (200 W, 37 kHz) tijekom 30 i 60 min. Omjer uzorka i otapala iznosio je 1:20 (w/v), a kao otapalo za ljusku crvenog luka je korištena otopina etanola (50 % i 80 %), dok je u slučaju mahune graška korištena destilirana voda. Po završetku ekstrakcije ekstrakt je izdvojen filtracijom pomoću vakuuma (Whatman No. 1) te je kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 50 mL. Ekstrakcija OP i PP potpomognuta ultrazvukom provedena je u duplikatu.

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima provedena je na uređaju MicroSYNTH (Milestone, Italija). Kao otapalo u ekstrakciji korištena je voda te 50 %-tni etanol, a omjer uzorka i otapala iznosio je 1:20 (w/v). Temperatura ekstrakcije iznosila je 50 °C, a trajanje 5 min. Ekstrakcija mikrovalovima provedena je u duplikatu.

3.2.2. Karakterizacija ekstrakta

3.2.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Princip metode:

Metoda se temelji na reakciji Folin-Ciocalteu reagensa (smjesa fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline) s reducirajućim reagensom. U lužnatom mediju dolazi do okidacije fenolne skupine do fenoksidnog iona koji potom reducira komplekse fosfovolframovih i fosfomolibdenih kiselina do oksida koji daju plavi kromogen, a intenzitet nastalog obojenja mjeri se spektrofotometrijski pri 765 nm (Singleton i Rossi, 1965; Singelton i sur., 1999).

Postupak rada:

U staklene epruvete se otpipetira 3,95 mL destilirane vode, 50 µL uzorka, 0,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa (prethodno razrijeđenog s vodom u omjeru 1:2 (v/v)), a zatim i 0,75 mL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata (Na₂CO₃). Reakcijska smjesa se homogenizira i ostavi pri sobnoj temperaturi u mraku tijekom 2 h. Po isteku vremena, izmjeri se apsorbancija reakcijskih otopina pri 765 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba se priprema na isti način, ali umjesto uzorka dodaje se isti volumen destilirane vode.

Izračun rezultata:

Za izračun udjela ukupnih polifenola potrebno je izraditi baždarni pravac za jedan reprezentativni spoj. U tu svrhu se najčešće uzima galna kiselina i stoga se udjel ukupnih polifenola izračunava na ekvivalentni udjel galne kiseline, tj. ekvivalente galne kiseline (EGK). Pripremi se osnovna otopina standarda galne kiseline u 80 %-tnom metanolu, koncentracije 1 mg mL⁻¹, iz koje se pripreme sljedeća razrjeđenja: 50, 100, 200, 400, 600 i 800 µg mL⁻¹. Za pripremljena razrjeđenja se provede reakcija kako je prethodno opisano, uz slijepu probu.

Jednadžba pravca za ukupne polifenole s obzirom na standard galne kiseline glasi:

$$y = 0,0010x + 0,0162; R^2 = 0,9990$$

gdje je:

x – koncentracija galne kiseline ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

y – vrijednosti apsorbancije u odnosu na slijepu probu (ΔA) pri 765 nm

Određivanje udjela udjela ukupnih polifenola reakcijom s Folin-Ciocalteu metodom provedeno je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.2.2. Određivanje udjela ukupnih neflavonoida

Princip metode:

Dodatkom formaldehida u reakcijsku otopinu, dolazi do reakcije na pozicijama C-6 ili C-8 molekule 5,7-dihidroksi flavonoida, što rezultira nastankom metilol derivata. Isti dalje reagira s drugim flavonoidnim spojevima, također na C-6 ili C-8 položaju, itd. Ovom reakcijom nastaju kondenzirane molekule koje precipitiraju i zatim se uklanjaju filtracijom. Preostali fenolni spojevi (neflavonoidi) određuju se prema metodi za ukupne polifenole, reakcijom s Folin-Ciocalteu reagensom (Ough i Amerine, 1988).

Postupak rada:

U Eppendorf epruvetu (2 mL) se otpipetira 0,5 mL uzorka te 0,25 mL vodene otopine klorovodične kiseline (1:4, v/v) i 0,25 mL formaldehida (37 %-tna otopina). Sadržaj epruvete se promiješa na vorteksu i ostavi tijekom 24 h pri sobnoj temperaturi. Po isteku vremena se precipitirani flavonoidi u epruveti se uklone filtracijom, dok se u filtratu odredi udjel preostalih fenolnih spojeva – neflavonoida reakcijom s Folin-Ciocalteu reagenskom, kako je opisano u poglavlju 3.2.1.

3.2.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Princip metode:

DPPH metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini. DPPH radikal pokazuje jaku

apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). U prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans), dolazi do sparivanja nesparenog elektrona DPPH radikala te promjene bolje otopine radikala iz ljubičaste u žutu, što se prati mjerenjem apsorbancije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995).

Postupak rada:

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U epruvetu se otpipetira 100 μ L uzorka i zatim 3,9 mL otopine DPPH. Sadržaj se homogenizira na vorteksu i zatim se ostave u mraku pri sobnoj temperaturi tijekom 30 min. Po isteku vremena se izmjeri apsorbancija reakcijske otopine pri 515 nm. Slijepa proba se priprema na jednak način, ali se umjesto uzorka dodaje jednaki volumen metanola.

Izračun rezultata:

Za izračun antioksidacijskog kapaciteta potrebno je izraditi baždarni pravac za reprezentativni spoj kojim se postiže očekivani učinak u reakcijskoj otopini. U tu svrhu se najčešće koristi Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), vodeno topljivi analog vitamina E, i stoga se antioksidacijski kapacitet izračunava na ekvivalentnu koncentraciju Troloxa, tj. na ekvivalent Trolox-a (ET). Pripremi se osnovna otopina standarda Trolox-a u 80 %-tnom metanolu, koncentracije 10 mM, iz koje se pripreme sljedeća razrjeđenja: 0,1, 0,25, 0,5 i 0,75 mM. Za pripremljena razrjeđenja se provede reakcija kako je prethodno opisano, uz slijepu probu.

Jednadžba pravca za određivanje antioksidacijskog kapaciteta s obzirom na standard Trolox-a glasi:

$$y = 0,603x - 0,006; R^2 = 0,9993$$

gdje je:

x – koncentracija Trolox-a (mM)

y – vrijednosti apsorbancije u odnosu na slijepu probu (ΔA) pri 515 nm

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta u reakciji s DPPH reagensom provedno je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.2.4. Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva HPLC metodom

Pojedinačni polifenolni spojevi iz ekstrakta ljuske crvenog luka i mahune graška, prije i nakon hidrolize, su kvalitativno i kvantitativno određeni primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC-DAD).

Priprema uzorka:

Uzorci su prije injektiranja u kromatografski sustav profiltrirani kroz mikrofiltre 0,2 µm (regenerirana celuloza) izravno u HPLC viala.

Postupak:

Analiza je provedena prema metodi razvijenoj u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda, a prema radu Belščak-Cvitanović i suradnika (2011). U analizi je korištena kromatografska kolona Zorbax Extend C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm, 100 Å) (Agilent Technologies, SAD). Uzorak je injektiran u volumenu od 5 µL, a elucija je provedena dvokomponentnom mobilnom fazom (A - 1 % (v/v) mravlja kiselina u vodi, B - 1 % (v/v) mravlja kiselina u acetonitrilu), pri protoku od 1 mL min⁻¹ i uz gradijent kako slijedi: 0. min – 7 % B, 5. min – 7 % B, 45. min – 40 % B, 47. min - 70% B, 52. min - 70% B + 10 min ekvibracije na početne uvjete analize. Temperatura kolone iznosila je 25 °C. Detekcija analita omogućena je primjenom detektora s nizom fotodioda (engl. diode array detector, DAD), snimanjem pri valnim duljinama 260, 320, 350 i 370 nm, što odgovara maksimumima apsorpcijskih spektara očekivanih polifenolnih spojeva koji su analizirani ovom metodom.

Identifikacija i kvantifikacija:

Identifikacija pikova provedena je usporedbom retencijskih vremena s poznatim čistim standardima, kao i usporedbom apsorpcijskih spektara istih snimljenih u valnom području 190-600 nm.

Kvantifikacija identificiranih pikova provedena je korištenjem konstruiranih baždarnih pravaca za pojedini standard. Jednadžbe baždarnih pravaca s koeficijentima determinacije te valne duljine detekcije pojedinih standarada i koncentracijski raspon u kojem baždarni pravci vrijede, prikazani su u Tablici 4.

Prikupljanje i obrada podataka provedeni su aplikacijom OpenLAB CDS ChemStation (v. C.01.10) (Agilent Technologies), a rezultati su dodatno obrađeni u programu Microsoft Office Excel. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama.

Tablica 4. Baždarni pravci identificiranih bioaktivnih spojeva u analiziranim uzorcima, koeficijenti determinacije (R^2), valna duljina detekcije te koncentracijski raspon valjanosti

Polifenolni spoj	Jednadžba baždarnog pravca	R^2	Valna duljina detekcije (nm)	Koncentracijski raspon ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Protokatehinska kiselina	$y=19,022x-10,754$	1,0000	260	5-100
Kvercetin-3,4'-diglukozid	$y=3,3554x+0,0672$	1,0000	350	5-100
Rutin	$y=8,1157x+0,6797$	1,0000	350	5-100
Kvercetin-3-glukozid	$y=11,66x-0,6987$	1,0000	350	5-100
Kvercetin-4'-glukozid	$y=11,38x-0,2358$	1,0000	370	5-100
Kvercetin	$y=19,065x-6,7569$	1,0000	370	5-100
Sinapinska kiselina	$y=22,283x+13,255$	1,0000	320	5-100
<i>p</i> -kumarinska kiselina	$y=29,279+11,834$	0,9999	320	5-100

3.2.2.5. Određivanje udjela šećera u ekstraktima

Udjel šećera u ekstraktima ljuske crvenog luka i mahune graška određen je kolorimetrijski, u vodenoj fazi preostaloj nakon ekstrakcije tekuće-tekuće (vidi poglavlje 3.2.1.1.5.). Pritom su određeni ukupni reducirajući šećeri, primjenom metode s hidrazidom *p*-hidroksibenzojeve kiseline (PAHBAH) te specifično ketoze, primjenom reakcije s tiobarbiturnom kiselinom (TBA).

Određivanje udjela šećera PAHBAH metodom

Princip metode:

Hidrazid *p*-hidroksibenzojeve kiseline reagira s reducirajućim šećerima u alkalnom mediju i pri povišenoj temperaturi, dajući pritom žuto obojen anion, što služi kao osnova za spektrofotometrijsko određivanje pri maksimumu apsorpcije od 410 nm (Lever, 1972). Metoda je adaptirana za potrebe ovoga rada prema radovima McCleary i suradnika (2019) i Blakeney i Mutton (1980). Obojenje reakcije za standard fruktoze u rastoćoj koncentraciji, prikazan je u Prilogu 1.

Priprema reagensa:

Zasebno se pripreme sljedeće otopine:

- **Otopina A** – 5 % (w/v) otopina hidrazida *p*-hidroksibenzojeve kiseline (PAHBAH) u 0,5 M otopini klorovodične kiseline. Odvaže se potrebna količina PAHBAH te se pomiješa s vodom (približno ¼ konačnog volumena), a zatim se doda izračunati volumen koncentrirane HCl; otopina se dobro promiješa, ohladi na sobnu temperaturu i nadopuni do konačnog volumena destiliranom vodom. Tako pripremljena otopina može stajati 2 godine pri sobnoj temperaturi.
- **Otopina B** – pomiješa se otopina natrijevog citrata (a) i kalcijevog klorida (b) s otopinom natrijevog hidroksida (c) do konačnih koncentracija: a – 42,3 mM, b – 7,5mM i c – 0,5 M u prethodno definiranom volumenu. Tako pripremljena otopina može stajati 2 godine pri sobnoj temperaturi.

Radna otopina se priprema svježe na dan mjerenja miješanjem otopina A i B u omjeru: A:B=1:10. Tako pripremljena otopina blago je žute boje i stabilna je tijekom 4-5 sati od pripreme, a potrebno ju je čuvati na hladnom.

Postupak rada:

U epruvetu s navojem (12 mL) se otpipetira 0,5 mL uzorka, a zatim se doda 5 mL pripremljene radne otopine PAHBAH. Epruveta se zatvori, sadržaj se homogenizira kratko na vorteksu i odmah se stavlja u ključajuću vodenu kupelj na točno 5 minuta. Po isteku vremena, epruvete se izvade iz kupelji i ohlade u hladnoj vodi tijekom 5 minuta. Reakcijskoj otopini se izmjeri apsorbancija pri 410 nm unutar 15 min (od završetka reakcije), koliko je kromogen stabilan. Slijepa proba se priprema na isti način, ali umjesto uzorka se stavlja ista količina otapala u kojem su pripremljeni uzorci.

Izračun rezultata:

Za izračun udjela reducirajućih šećera potrebno je izraditi baždarni pravac. U tu svrhu se pripremi osnovna otopina standarda fruktoze u vodi, koncentracije 1 mg/mL, iz koje se pripreme sljedeća razrjeđenja: 5, 10, 25, 50, 75 i 100 µg/mL. Za pripremljena razrjeđenja se provede reakcija kako je prethodno opisano, uz slijepu probu.

Jednadžba pravca za PAHBAH metodu s obzirom na standard fruktoze glasi:

$$y = 0,112x + 0,0053, R^2 = 0,9991$$

gdje je:

x – poznata koncentracija otopine fruktoze (µg/mL),

y – vrijednost apsorbancije u odnosu na slijepu probu (ΔA) pri 410 nm.

Ako je korišten razrijeđen uzorak, koncentracije se množe s faktorom razrjeđenja.

Određivanje udjela reducirajućih šećera PAHBAH metodom provedno je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

Određivanje udjela šećera TBA metodom

Princip metode:

Izlaganjem ketoza povišenoj temperaturi u mediju zakiseljenom jakim mineralnom kiselinom, pogoduje nastanku furfuralnih derivata koji reagiraju s 2-tiobarbiturnom kiselinom (TBA), dajući intenzivno žuto obojenje čiji intenzitet se mjeri spektrofotometrijski pri 430 nm (Percheron, 1962). Za potrebe ovoga rada, metoda je preuzeta iz radova Blakeney i Mutton (1980) te Pontis (2017). Obojenje reakcije za standard fruktoze u rastoćoj koncentraciji, prikazan je u Prilogu 2.

Postupak rada:

Pripremi se 0,02 M otopina 2-tiobarbiturne kiseline u vodi, a zatim se ista pomiješa s koncentriranom klorovodičnom kiselinom (polaganim dodavanjem kiseline u otopinu TBA uz hlađenje) u omjeru 1:1 (v/v) te se otopina ohladi na sobnu temperaturu. Ovako definiranu radnu otopinu potrebno je svježe pripremiti i iskoristiti u istome danu.

U staklene epruvete se otpipetira 200 μL uzorka i zatim 2 mL pripremljene radne otopine. Epruvete se zatvore, sadržaj se homogenizira te se odmah stavi u ključajuću vodenu kupelj tijekom 6 minuta. Po isteku vremena, epruvete se izvade iz kupelji te se ohlade u hladnoj vodenoj kupelji tijekom 2 min. Potom se u epruvete doda 2 mL demineralizirane vode, reakcijska smjesa se homogenizira i izmjeri joj se apsorbancija pri 430 nm. Slijepa proba priprema se na isti način, ali umjesto uzorka sadrži isti volumen demineralizirane vode.

Izračun rezultata:

Za izračun udjela ketoza određenih TBA metodom potrebno je izraditi baždarni pravac. U tu svrhu se pripremi osnovna otopina standarda fruktoze u vodi, koncentracije 1 mg/mL, iz koje se pripreme sljedeća razrjeđenja: 5, 10, 25, 50, 75 i 100 $\mu\text{g/mL}$. Za pripremljena razrjeđenja se provede reakcija kako je prethodno opisano, uz slijepu probu.

Jednadžba pravca za TBA metodu glasi:

$$y = 0,0053x - 0,0039; R^2 = 0,9993$$

gdje je:

x – poznata koncentracija otopine fruktoze ($\mu\text{g/mL}$)

y – vrijednosti apsorbancije u odnosu na slijepu probu (ΔA) pri 430 nm

Ako je korišten razrijeđen uzorak, koncentracije se množe s faktorom razrjeđenja.

Određivanje udjela ketoza TBA metodom provedno je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Ljuska luka i mahuna graška su otpadni biljni materijali koji nastaju u ranoj fazi prilikom industrijske obrade primarne sirovine. Zbog svog bogatog sastava čine potencijalno vrijedan biljni materijal za iskorištavanje u obliku nekonvencionalnog izvora bioaktivnih tvari koje se potom mogu upotrebljavati u različite svrhe. Ljuska luka je relativno dobro istražen materijal i predstavlja vrlo bogat izvor polifenolnih spojeva, prvenstveno kvercetina i njegovih derivata. Mahuna graška je manje istražen materijal u kontekstu bioaktivnog sastava zbog čega istraživanja u tom smjeru dobivaju i veću važnost.

U ovome radu određen je utjecaj različitih uvjeta ekstrakcije na izdvajanje polifenolnih spojeva iz ljuske luka i mahune graška. U kombinaciji s postupkom kiselinske hidrolize, ekstrakcija je bila usmjerena na izdvajanje kvercetina iz obje sirovine.

4.1. UTJECAJ UVJETA EKSTRAKCIJE NA BIOAKTIVNE KARAKTERISTIKE EKSTRAKATA LJUSKE LUKA

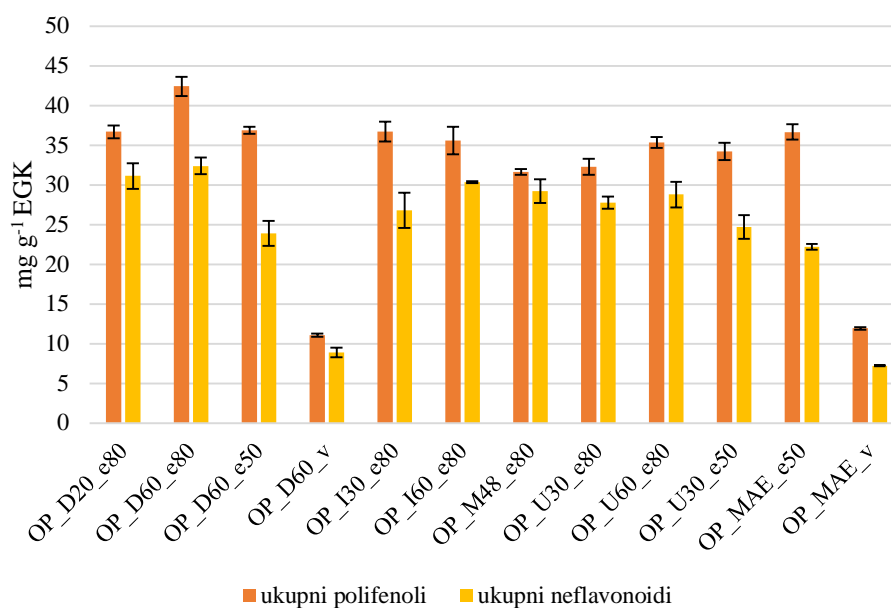
Ekstrakti ljuske crvenog luka pripremljeni su korištenjem različitih konvencionalnih (maceracija, infuzija, dekokcija) i inovativnih metoda ekstrakcije (ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, ekstrakcija mikrovalovima) te su prikazani u tablici 5. Pritom su promjenjivi parametri ekstrakcije bili sastav otapala (demineralizirana voda, otopina etanola volumnog udjela 50 % i 80 %), temperatura (sobna, 80 ° C i 100 °C) te trajanje ekstrakcije (5, 20, 30 i 60 min te 48 h).

Tablica 5. Popis uzoraka ekstrakata ljuske luka

Metoda ekstrakcije	Otapalo	Trajanje	Oznaka
Dekokcija	80 % EtOH	20 min	OP_D20_e80
		60 min	OP_D60_e80
	50 % EtOH	60 min	OP_D60_e50
		H ₂ O	60 min
Infuzija	80 % EtOH	30 min	OP_I30_e80
		60 min	OP_I60_e80
Maceracija	80 % EtOH	48 h	OP_M48_e80
Ultrazvuk	80 % EtOH	30 min	OP_U30_e80
		60 min	OP_U60_e80
	50 % EtOH	30 min	OP_U30_e50
Mikrovalovi	50 % EtOH	5 min	OP_MAE_e50
	H ₂ O	5 min	OP_MAE_v

4.1.1. Udjel ukupnih polifenola i neflavonoida u ljusci luka

Udjel ukupnih polifenola u pripremljenim ekstraktima određen je reakcijom s Folin-Ciocalteu reagensom, kao i udjel neflavonoida nakon taloženja flavonoida formaldehidom. Navedene metode vrlo se često koriste u inicijalnoj karakterizaciji bioaktivnog sastava biljnih ekstrakata za određivanje ekstrakcijske učinkovitosti. Rezultati analize udjela ukupnih polifenola i ukupnih neflavonoida prikazani su na slici 4. Najveći udjel ukupnih polifenola određen je u uzorku OP_D60_e80 (42,4 mg GAE g⁻¹) koji je pripremljen primjenom maksimalnih vrijednosti ekstrakcijskih parametara (80 % EtOH, 100 °C i 60 min). Skraćivanjem vremena ekstrakcije na 20 min ili smanjenjem udjela etanola u otapalu na 50 %, za isti tip ekstrakcije (dekokcija), ekstrakcijska učinkovitost se smanjila za približno 13 %. Približno jednak udjel ukupnih polifenola navedenome, određen je i za ekstrakciju tipa infuzije primjenom 80 %-tnog etanola, odnosno, smanjenjem ekstrakcijske temperature za 20 °C, dok trajanje same infuzije nije imalo utjecaj na ekstrakcijski prinos. Među konvencionalnim metodama ekstrakcije primjenom otopine etanola volumnog udjela jednako ili više od 50 %, kao otapala, najmanji udjel ukupnih polifenola određen je u ekstrakciji tipa maceracije te iznosi približno 75 % najvišeg određenog udjela ukupnih polifenola.



Slika 4. Udjel ukupnih polifenola i neflavonoida u ekstraktima ljuske luka

Isto navodi na zaključak kako je temperatura glavni parametar koji utječe na ekstrakciju polifenolnih spojeva iz ljuske luka, kada se kao otapalo primjenjuje otopina etanola. S druge strane, promjenom otapala, odnosno korištenjem isključivo demineralizirane vode prilikom ekstrakcije, udjel ukupnih polifenola se značajno smanjio, na svega približno 26 % maksimalno određenog udjela ukupnih polifenola. Iz navedenog se može zaključiti da ekstrakciji polifenolnih spojeva iz ljuske luka pogoduje smanjenje polarosti otapala dodatkom organskog modifikatora, kao što su etanol ili metanol, koji međusobno imaju slična svojstva. Ipak, korištenje etanola se preferira zbog njegovog GRAS statusa i puno manje toksičnosti od metanola. Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Lee i suradnika (2014) koji su također uspoređivali udjele ukupnih polifenola u ekstraktima ljuske luka dobivenih primjenom različitih otapala – 70 %-tnog etanola (60 °C/3h) i vode (80 °C/3h) te subkritične vode (100 °C i 165 °C/15 min). Rezultati su pokazali značajno veći udjel ukupnih polifenola u etanolnim ekstraktima. Od inovativnih ekstrakcijskih metoda, najveću učinkovitost, izraženo kao udjel ukupnih polifenola, pokazala je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i primjenom 50 %-tne otopine etanola kao otapala. U samo 5 min trajanja mikrovalne ekstrakcije postignut je udjel ukupnih polifenola od približno 90 % udjela dobivenog ekstrakcijom tipa dekokcije (D60_e80), odnosno jednaka ekstrakcijska učinkovitost kao i za ekstrakciju tipa dekokcije u trajanju 60 min primjenom iste vrste otapala (50 % EtOH). Ekstrakti dobiveni u ekstrakciji potpomognutoj

ultrazvukom pokazali su nešto niže udjele ukupnih polifenola u odnosu na ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima, pri čemu produljenje ultrazvučnog tretmana i smanjenje udjela etanola pogoduju većoj ekstrakcijskoj učinkovitosti. Kao i za konvencionalne metode, sastav otapala je od presudne važnosti za visoku ekstrakcijsku učinkovitost, a pritom je preferabilno otapalo otopina etanola volumnog udjela najmanje 50 %. Konvencionalne i inovativne metode pokazale su sličnu ekstrakcijsku učinkovitost za supstrat ljuske luka i za evaluirane parametre, a zaključak o optimalnim uvjetima ekstrakcije, uz udjel polifenola, svakako podrazumijeva i evaluaciju utroška vremena i energije te jednostavnost izvedbe same ekstrakcije.

Rezultati udjela ukupnih neflavonoida određenih reakcijom s Folin-Ciocalteu reagensom nakon taloženja flavonoida formaldehidom (slika 4) pokazali su relativno visoke vrijednosti, što nije bilo očekivano s obzirom na dostupne literaturne podatke da dominantne polifenole u ljusci luka čine upravo predstavnici podskupine flavonoida, flavonoli, i to kvercetin i njegovi glikozilirani konjugati. Neočekivano visoki rezultati udjela ukupnih neflavonoida mogu se objasniti relativnom neselektivnosti metode taloženja formaldehidom s obzirom na flavonole i glikozilirane oblike flavonoida općenito. Naime, smanjenje topljivosti kompleksa flavonoid-formaldehid u pretežito vodenom mediju izravno ovisi o efektu povećanja molekulske mase, kao posljedice lančane reakcije polimerizacije polifenola, zatim smanjenja polarosti molekule i smanjene hidracije polimera. Dodatan faktor kod gustih molekulskih struktura mogao bi biti i tendencija uvijanja molekule i internog povezivanja njezinih pojedinih dijelova vodikovim vezama (Singleton, 1974). Glikozilirani oblici flavonoida imaju relativno veću topljivost u vodi od odgovarajućih aglikona zbog prisutnog šećera i njegovih OH- skupina te je time i precipitacija oblika nastalih polimerizacijom teža (Singleton, 1974). Osim navedenog, sama reakcija s Folin-Ciocalteu reagensom podložna je interferenciji različitih spojeva, primjerice nekih aminokiselina, reducirajućih šećera, askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline (Sánchez-Rangel i sur., 2013) koji mogu biti prisutni u ekstraktu i dati lažno pozitivne rezultate. Jednako tako, pojedini polifenolni spojevi daju različite odzive u reakciji s Folin-Ciocalteu reagensom (Bastola i sur., 2017), te se u kombinaciji sa selektivnim taloženjem pojedinih polifenolnih skupina i mogućom prisutnošću spojeva koji interferiraju, mogu dobiti rezultati koji se ne podudaraju s očekivanjima.

U svrhu određivanja u kojoj je mjeri prilikom provedenih ekstrakcija došlo do iscrpljenja čvrstog materijala, pri specifičnim uvjetima, provedene su naknadne ekstrakcije preostalog taloga nakon izdvajanja ekstrakta vakuum-filtracijom. Naknadne ekstrakcije provedene su pri istim uvjetima kao i inicijalna ekstrakcija, dodatkom svježe pripremljenog otapala. S obzirom

na najvišu ekstrakcijsku učinkovitost, stupanj iscrpljenja sirovine određen je za ekstrakciju tipa dekokcije u trajanju 60 min otopinom etanola udjela 80 %. Provedene su 3 naknadne uzastopne ekstrakcije, a u dobivenim ekstraktima je određen udjel ukupnih polifenola te je izražen kao relativni udjel s obzirom na ukupnu vrijednost udjela ukupnih polifenola iz četiri ekstrakcije, kao zbroja pojedinačnih vrijednosti nakon svake ekstrakcije (tablica 6). Nakon četvrte uzastopne ekstrakcije dekokcijom, obojenje reakcije po Folin-Ciocalteu je bilo vrlo niskog intenziteta te se smatralo da je došlo do potpunog iscrpljenja sirovine pri datim ekstrakcijskim uvjetima.

Tablica 6. Iskorištenja ekstrakcija ljuske luka dekokcijom do iscrpljenja, s obzirom na ukupne polifenole

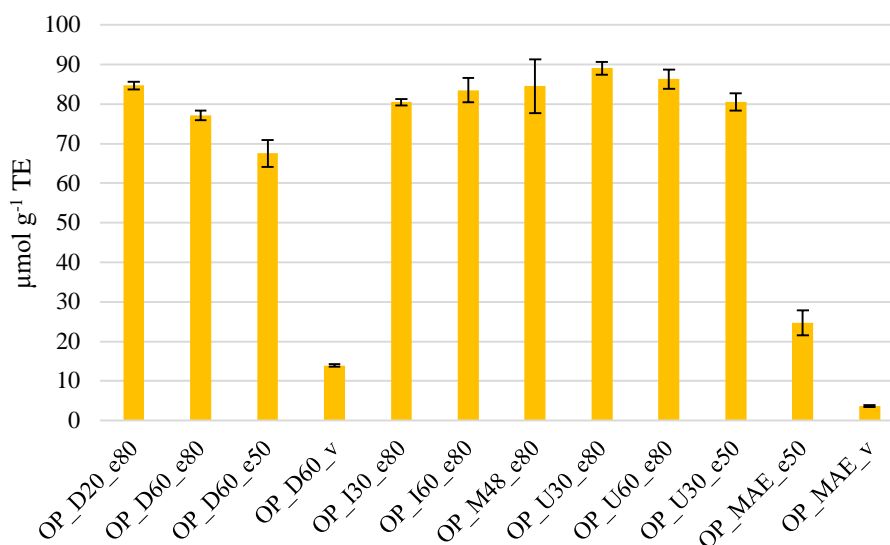
Broj uzastopnih ekstrakcija D60_e80	Relativni udjel ukupnih polifenola (%)
1	93,7 ± 0,4
2	5,7 ± 0,6
3	0,7 ± 0,1
4	0

Iz tablice je vidljivo da se gotovo 94 % ukupnih polifenola ekstrahiralo u prvoj, inicijalnoj ekstrakciji. S obzirom na utrošak vremena, energije i kemikalija, ponovljene ekstrakcije nisu potrebne, već se visoko iskorištenje postiže jednokratnom ekstrakcijom u uvjetima dekokcije u trajanju 60 min, primjenom 80 %-tnog etanola kao otapala.

4.1.2. Antioksidacijski kapacitet

Ekstraktima ljuske luka pripremljenima primjenom konvencionalnih i inovativnih metoda je, osim udjela ukupnih polifenola, određen i antioksidacijski kapacitet DPPH metodom. Rezultati, izraženi kao ekvivalenti Trolox-a po gramu početnog uzorka ($\mu\text{mol g}^{-1}$ TE) su prikazani na slici 5. Sukladno najmanjem udjelu ukupnih polifenola, najmanji antioksidacijski kapacitet ljuske crvenog luka pokazuju uzorci OP_D60_v i OP_MAE_v u kojima je kao otapalo korištena voda. Najveći antioksidacijski kapacitet određen je u ekstraktima OP_U30_e80 ($89,1 \mu\text{mol TE g}^{-1}$) i OP_U60_e80 ($86,6 \mu\text{mol TE g}^{-1}$), dakle u ekstraktima pripremljenima ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom, iako isti nisu pokazali najviše udjele ukupnih polifenola. S obzirom na relativno bliske vrijednosti udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta za različite ekstrakcije te ograničenja navedenih metoda s obzirom na specifičnost i podložnost

interferencijama, kao i općenitu kompleksnost ekstrakata biljnih materijala, određena odstupanja korelacije između navedenih metoda mogu se očekivati. Dakako, korelacija je ipak vidljiva s obzirom na vrstu otapala korištenih u ekstrakcijama, budući da su vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta etanolnih ekstrakata višestruko veće od vodenih ekstrakata, sukladno i većem udjelu ukupnih polifenola.



Slika 5. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata ljuske luka, određen DPPH metodom

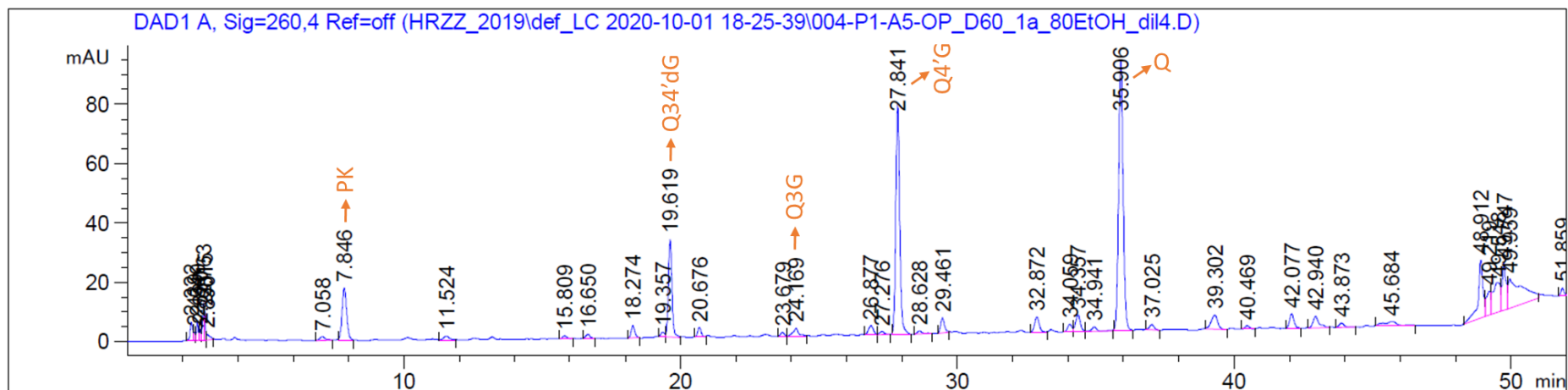
4.1.3. Udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva

U svrhu određivanja pojedinačnih polifenolnih spojeva u ekstraktima ljuske luka, provedena je HPLC analiza odabranih ekstrakata. Primjer dobivenog kromatograma, za ekstrakt OP_D60_e80, pripremljen dekokcijom u otopini 80 %-tnog etanola tijekom 60 minuta, prikazan na slici 6. Iz kromatograma je vidljivo nekoliko dominantnih pikova koji pripadaju protokatehinskoj kiselini, kvercetin-3,4'-diglukozidu (Q3,4'dG), kvercetin-4'-glukozidu (Q4'G) i kvercetinu (Q). Osim navedenih, određena je i prisutnost kvercetin-3-glukozida, s obzirom na dostupnost čistog standarda, međutim, ovaj spoj nije značajno zastupljen u ljusci luka. Iz kromatograma je također vidljiva prisutnost i drugih neidentificiranih spojeva, visinom i površinom značajno manjih u odnosu na dominantne pikove, a koji prema karakterističnom UV-VIS spektru u valnom području 190-600 nm indiciraju da se radi o konjugatima flavonola, najvjerojatnije različitim glikozidima kvercetina i/ili kempferola. Identificirani spojevi u

ekstraktima ljuske luka su i kvantitativno određeni, a rezultati su prikazani u tablici 7. Važno je primijetiti da su svi važni pikovi kromatograma uspješno identificirani te kvalitativno određeni.

Iz tablice je vidljivo da izdvajanju protokatehinske kiseline pogoduje veća polarnost otapala te su najviši udjeli određeni u vodenim ekstraktima i ekstraktima nižeg volumnog udjela etanola. Relativno polarna priroda protokatehinske kiseline vidljiva je i iz rane elucije tijekom HPLC analize kada u mobilnoj fazi ima relativno malo organskog modifikatora. Najviši udjeli protokatehinske kiseline određeni su u vodenom ekstraktu dobivenom primjenom mikrovalova (OP_MAE_v, 2,82 mg g⁻¹) te u vodenom ekstraktu dobivenom dekokcijom tijekom 60 min (OP_D60_v, 1,83 mg g⁻¹). Značajan udjel (1,68 mg g⁻¹) određen je i u 50 %-tnom etanolnom ekstraktu dobivenom primjenom mikrovalova. S druge strane, kvercetin aglikon nije topljiv u vodi, a njegovi glikozidi su također relativno slabo topljivi pa je u vodenim ekstraktima određen mali udjel ovih spojeva ili oni uopće nisu bili detektirani. Očekivano, najviši udjeli kvercetina određeni su u etanolnim ekstraktima, kao i udjel identificiranih glikozida kvercetina.

Budući da se ljuska luka pokazala kao bogat izvor kvercetina u različitim oblicima te uzimajući u obzir njegove funkcionalne značajke, izračunat je prinos ekstrakcija s obzirom na udjel ukupnog kvercetina, izračunato kao zbroj kvercetin aglikona i kvercetina iz glikozida. Najveći udjel ukupnog kvercetina određen je u dekoktima (OP_D60_e80 i OP_D60_e50). Zanimljivo je istaknuti rezultate dobivene ekstrakcijom mikrovalovima u etanolu. Takav tretman traje vrlo kratko, tek 5 min, u usporedbi sa 60 min koliko traje dekokcija, a udjel ekstrahiranog kvercetina je 50 % manji u odnosu na dekokciju. Udjel ekstrahirane protokatehinske kiseline, u uzorku s vodom je pak 60 % veći u odnosu na onaj dobiven dekokcijom. Ovi rezultati upućuju na potrebe daljnjih istraživanja i optimiranja uvjeta kojima bi se ekstrakcija mikrovalovima mogla primijeniti za slične potrebe.



Slika 6. Kromatogram ekstrakta ljuske crvenog luka (PDA, 260 nm) pripremljenog dekocijom u otopini 80 %-tnog etanola tijekom 60 minuta (PK – protokatehinska kiselina; Q3,4'dG – kvercetin-3,4'-diglukozid; Q3G – kvercetin-3-glukozid; Q4'G – kvercetin-4'-glukozid; Q – kvercetin)

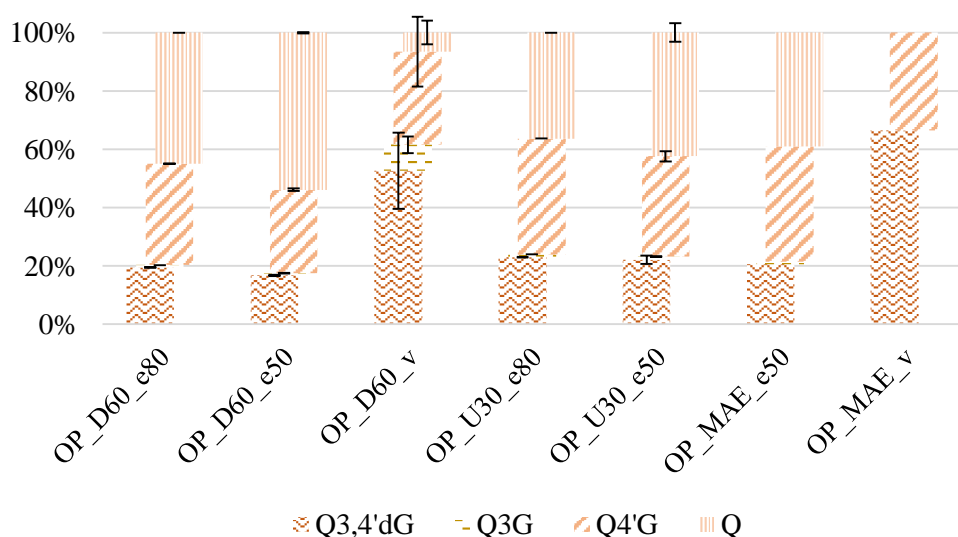
Tablica 7. Udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva u odabranim ekstraktima ljuske luka

Uzorak	Protokatehinska kiselina, mg g ⁻¹	Kvercetin-3,4'-diglukozid (Q3,4'dG), mg g ⁻¹	Kvercetin-3-glukozid (Q3G), mg g ⁻¹	Kvercetin-4'-glukozid (Q4'G), mg g ⁻¹	Kvercetin (Q), mg g ⁻¹	Ukupno kvercetina, mg g ⁻¹
OP_D60_e80	1,09 ± 0,03	5,36 ± 0,23	0,17 ± 0,01	7,07 ± 0,21	5,96 ± 0,20	13,26 ± 0,45
OP_D60_e50	1,29 ± 0,05	4,89 ± 0,35	0,16 ± 0,00	6,19 ± 0,30	7,57 ± 0,49	14,06 ± 0,85
OP_D60_v	1,83 ± 0,11	0,97 ± 0,03	0,12 ± 0,01	≤ 0,05	≤ 0,1	0,88 ± 0,19
OP_U30_e80	0,80 ± 0,04	4,86 ± 0,17	0,15 ± 0,01	6,21 ± 0,19	3,70 ± 0,11	10,18 ± 0,32
OP_U30_e50	0,91 ± 0,01	5,14 ± 0,13	0,18 ± 0,01	5,92 ± 0,09	4,74 ± 0,52	11,19 ± 0,39
OP_MAE_e50	1,68 ± 0,09	3,35 ± 0,20	≤ 0,1	4,78 ± 0,12	3,07 ± 0,15	7,86 ± 0,07
OP_MAE_v	2,82 ± 0,13	≤ 0,1	n.d.	0,03 ± 0,00	n.d.	0,06 ± 0,00

Profil te udjeli pojedinačnih polifenolnih spojeva određenih u ovome istraživanju u skladu su s literaturnim podacima za ljusku luka, uz manje varijacije koje se mogu pripisati nativnim razlikama u samim istraživanim materijalima s obzirom na varijetet luka, sastav same sekundarne sirovine (odnos suhe ljuske i mesnatih listova) te način njezine stabilizacije (sušenje), kao i pripreme samog ekstrakta. Prema istraživanju Benítez i suradnika (2011), udjel kvercetin-3,4'-diglukozida u ljusci luka dva španjolska varijeteta iznosio je 9,49 mg g⁻¹, udjel kvercetin-4'-glukozida iznosio je 7,37 mg g⁻¹, a udjel kvercetina 0,59 mg g⁻¹. Kvercetin-3-glukozid je određen u najmanjem udjelu s 0,42 mg g⁻¹. Također, u spomenutom istraživanju određena je i prisutnost još dva spoja, izorhamnetina-3,4'-diglukozida i izorhamnetina-4'-glukozida.

Prema rezultatima udjela kvercetina i dominantnih glikozida, izračunata je raspodjela ukupnog kvercetina s obzirom na dominantne oblike u kojima se nalazi u ljuski luka (slika 7). Iz slike je vidljivo da se u pripremljenim etanolnim ekstraktima kvercetin dominantno nalazio u glikoziliranim oblicima, s udjelom 50 - 65 %. Pritom je značajniji bio udjel kvercetina iz 4'-glikoziliranog oblika. U vodenim ekstraktima udjel ukupnog kvercetina je izuzetno nizak i gotovo se u cijelosti odnosi na glikozilirane oblike, s obzirom na netopljivost kvercetina u vodi.

Prema tome, teorijski se može odrediti udjel kvercetina koji se može ekstrahirati iz ljuske crvenog luka.



Slika 7. Raspodjela udjela ukupnog kvercetina iz aglikona i glikozida u odabranim ekstraktima ljuske luka

Temeljem dobivenih rezultata, u kontekstu postizanja maksimalnog prinosa kvercetina iz ljuske luka, odabrane su dekokcija i infuzija kao preferabilne metode izdvajanja. S obzirom da se većina ukupno prisutnog kvercetina u ekstraktima nalazi u glikoziliranom obliku, za izdvajanje kvercetin aglikona potrebno je provesti hidrolizu, odnosno cijepanje glikozidne veze između aglikona te jedne ili više vezanih molekula šećera. U nastavku je opisana svojevrsna optimizacija hidrolitičkih uvjeta.

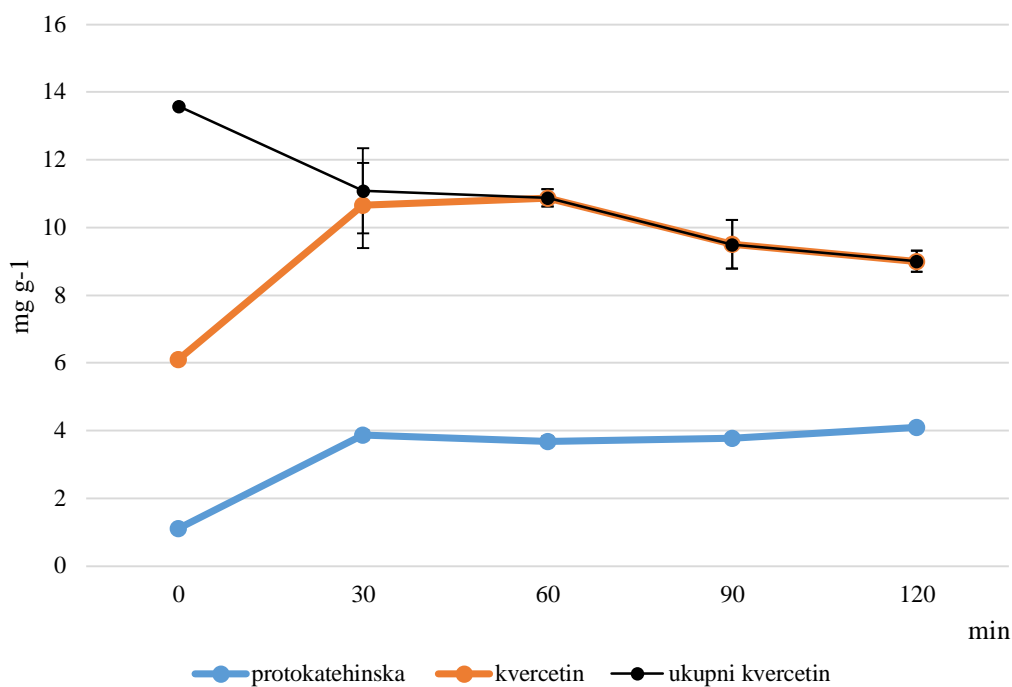
4.2. UTJECAJ UVJETA HIDROLIZE NA IZDVAJANJE POLIFENOLNIH SPOJEVA I JEDNOSTAVNIH ŠEĆERA U EKSTRAKTIMA LJUSKE LUKA

Hidrolizom s jakom kiselinom, kao što je klorovodična kiselina, dolazi do kidanja glikozidnih veza između kvercetina i šećera koji čine glikozide kvercetina. Kidanjem tih veza, očekivano je da se u uzorku poveća udjel kvercetin aglikona kako je objašnjeno u poglavlju 4.1.3. te da se oslobode jednostavni šećeri.

4.2.1. Hidroliza etanolnog ekstrakta

Optimizacije vremena hidrolize provedena je na ekstraktu OP_D60_e80, u 4 vremenske točke, uz konstantne uvjete temperature hidrolize od 80 °C i konstantnu koncentraciju kiseline od 2 M. Tijekom hidrolize, u definiranim vremenskim razmacima praćeni su udjeli kvercetina i protokatehinske kiseline, a rezultati su prikazani na slici 8.

Već unutar prvih 30 min vidljiv je dvostruki efekt ove reakcije. Paralelno se odvija hidroliza glikozida, što je rezultiralo porastom udjela kvercetin aglikona, međutim istovremeno se udjel ukupnog kvercetina smanjio u odnosu na teorijsku početnu vrijednost zbog degradacije istog uslijed uvjeta kiselosti reakcijske smjese te povišene temperature. Također je zamijećeno i istovremeno povećanje udjela protokatehinske kiseline. Naime, za protokatehinsku kiselinu prisutnu u ljusci luka smatra se da nastaje oksidacijom upravo kvercetin aglikona (Takahama i Hirota, 2000). Protokatehinska kiselina (3,4-dihidrobenzojeva kiselina) samo je jedan od oksidacijskih produkta kvercetina (Zenkevich i sur., 2007; Zhou i Sadik, 2008).



Slika 8. Dinamika hidrolize ekstrakta ljuske luka dobivenog dekokcijom u 80 %-tnom etanolu tijekom 60 minuta

Povećanje udjela protokatehinske kiseline može se protumačiti na dva načina: (i) protokatehinska kiselina nastaje isključivo oksidacijom kvercetina te se pritom može izračunati, s obzirom na rezultate smanjenja udjela ukupnog kvercetina i povećanja udjela protokatehinske kiseline, da iz jedne molekule kvercetina oksidacijom nastaju dvije molekule protokatehinske kiseline, (ii) protokatehinska kiselina nastaje dijelom zbog oksidacije kvercetina, a dijelom zbog hidrolize glikozidnih derivata protokatehinske kiseline. Za potvrdu bilo koje od navedenih mogućnosti povećanja udjela protokatehinske kiseline prilikom hidrolize ekstrakata ljuske luka, potrebno je provesti dodatna istraživanja, odnosno na temelju dostupnih literaturnih podataka i rezultata dobivenih u ovome radu nije moguće jasno zaključiti koja mogućnost je više vjerojatna. Kvantitativna hidroliza kvercetin glikozida u ekstraktu i degradacija ukupnog kvercetina događa se u prvih 60 minuta trajanja reakcije (slika 8). Daljnjom hidrolizom dolazi do daljnjeg smanjenja udjela ukupnog kvercetina pa je vrijeme hidrolize ograničeno na 60 min. U istom vremenu se postiže i ustaljena koncentracija udjela protokatehinske kiseline.

4.2.2. Utjecaj hidrolitičkih uvjeta na izdvajanje frakcija bogatih kvercetinom i protokatehinskom kiselinom

Kako je prethodno navedeno, ljuska luka je bogat izvor kvercetina, ali i protokatehinske kiseline. Kako bi se iz tog biljnog materijala ostvario maksimalni prinos spomenutih vrijednih spojeva, osmišljene su tri metode ekstrakcije uz hidrolizu (tablica 3). Udjel izdvojene protokatehinske kiseline, kvercetina i njegovih glikozida u pripremljenim ekstraktima, prikazan je u tablici 8.

Tablica 8. Udjel protokatehinske kiseline, kvercetina i njegovih glikozida u ekstraktima i hidrolizatima dobivenima kombiniranim postupcima ekstrakcije i hidrolize

Uzorak	Protokatehinska kiselina (PK), mg g ⁻¹	Kvercetin-3,4'-diglukozid (Q34'dG) ₁ , mg g ⁻¹	Kvercetin-4'-glukozid (Q4'G), mg g ⁻¹	Kvercetin (Q), mg g ⁻¹	Ukupno kvercetina, mg g ⁻¹
A1	1,79 ± 0,08	0,13 ± 0,01	0,81 ± 0,03	0,47 ± 0,02	1,08 ± 0,00
A2	0,58 ± 0,02	n.d.	0,15 ± 0,04	10,44 ± 0,03	10,54 ± 0,00
Ukupno	2,37 ± 0,06	0,13 ± 0,01	0,96 ± 0,07	10,91 ± 0,05	11,62 ± 0,00
B1	3,62 ± 0,36	n.d.	n.d.	0,88 ± 0,02	0,88 ± 0,02
B2	0,44 ± 0,01	n.d.	n.d.	7,19 ± 1,14	7,19 ± 1,14
Ukupno	4,06 ± 0,23	n.d.	n.d.	8,07 ± 0,06	8,07 ± 0,06
C1	4,25 ± 0,10	n.d.	n.d.	9,86 ± 0,22	9,86 ± 0,22

Ekstrakcija A provedena je u dva koraka, pri čemu je u prvom koraku (A1) provedena dekokcija vodom u trajanju 60 min, a zatim (A2) je preostali talog hidroliziran otopinom 2M klorovodične kiseline u 80 %-tnom etanolu. U prvom koraku je izdvojen značajan udjel protokatehinske kiseline (1,79 mg g⁻¹), dok u drugom, očekivano, je ostvaren visok prinos kvercetina (10,44 mg g⁻¹) uz gotovo kvantitativnu hidrolizu glikozida. Ekstrakcija ljuske crvenog luka, prema metodi A, rezultirala je konačnim udjelom ukupnog kvercetina od 11,62 mg g⁻¹, ekstrahiranim dominantno u etanolnom ekstraktu te udjelom protokatehinske kiseline od 2,37 mg g⁻¹, koja se ekstrahirala u vodi u prvom koraku ekstrakcije. Zanimljivo je primijetiti kako je u drugom koraku ekstrakcije izdvojen relativno nizak prinos protokatehinske kiseline, uz kvantitativnu hidrolizu glikozida i oslobađanje kvercetin agikona, suprotno onome što je primijećeno kod optimizacije vremena hidrolize (slika 8). Uvjeti su se, između ostalog, razlikovali u koncentraciji etanola prilikom hidrolize, što je moglo doprinijeti takvom odstupanju te je isto potrebno dodatno istražiti u sljedećim istraživanjima.

Prema metodi B, u prvom koraku je provedena hidroliza zakiseljenom vodom, a potom je provedena ekstrakcija u etanolu radi izdavanja oslobođenog kvercetina. Protokatehinska kiselina se izdvojila u prvom koraku ekstrakcije, s udjelom značajno većim nego u prvom koraku metode A, tj. bez prisutne hidrolize. Očekivano, kvercetin se dominantno izdvojio u drugom koraku (B2), kada je primijenjen etanol u ekstrakciji. Ipak, prinos kvercetina bio je znatno niži nego kod A2 ekstrakcije, vjerojatno zbog degradacije dijela kvercetina prilikom kiselinske hidrolize u prvom koraku ili pak uslijed dužeg izlaganja povišenoj temperaturi (u prvom i u drugom koraku).

Metoda C predstavljala je modifikaciju metode B u smislu da je prvo provedena hidroliza zakiseljenom vodom, a zatim je dodan etanol te je nastavljena relativno kratka ekstrakcija pri sobnoj temperaturi. Ovom metodom je postignut najviši prinos protokatehinske kiseline, od 4,25 mg g⁻¹ te relativno visok prinos kvercetina, od 9,86 mg g⁻¹. Metoda C pokazala se kao potencijalno optimalna metoda za izdvajanje visokih prinosa protokatehinske kiseline i kvercetina iz luka, koji zajedno čine približno 1,4 % sekundarne sirovine - ljuske luka. U ovoj metodi se također koristi i najmanje toplinske energije za zagrijavanje.

Iz dobivenih rezultata kombiniranih metoda ekstrakcije i hidrolize, može se zaključiti da se dio ukupnog kvercetina neizbježno smanjuje zbog djelovanja kiseline i povišene temperature. Gubitak ukupnog kvercetina iznosi približno ¼. Pritom se taj gubitak djelomično reflektira u porastu udjela protokatehinske kiseline, što se čini ovisnim o koncentraciji etanola prilikom hidrolize, kao i drugim parametrima hidrolize, poput temperature i vremena, što je potrebno dodatno istražiti.

Metabolizam kvercetina u ljudskom organizmu je već poznat. Manji dio apsorpcije se odvija u želucu dok se glavina apsorbira u tankom crijevu. Prije apsorpcije, glikozidu kvercetina se u organizmu, enzimskim putem uklanjaju vezani šećeri. Glikozidi kvercetina pokazali su veću bioraspoloživost od kvercetin aglikona, koji je netopljiv u lumenu crijeva (Almeida i sur., 2018). Imajući to na umu, s prehrambeno-funkcionalnog aspekta je zanimljiva cjelovita primjena ekstrakata ljuske luka, bogatog glikozidima, dok je izdvajanje kvercetin aglikona na opisani način potencijalno zanimljivo i primjenjivo u njegovoj proizvodnji za druge različite namjene. Ipak, s napretkom prehrambene industrije, napose u segmentu razvoja funkcionalne hrane te razvojem metoda povećanja bioraspoloživosti funkcionalnih sastojaka, primjena kvercetin aglikona u formulacijama obogaćenih prehrambenih proizvoda ima sigurnu perspektivu.

4.2.3. Udjel jednostavnih šećera

Luk općenito, a time djelomično i ljuska luka, smatraju se bogatim izvorima fruktooligosaharida (FOS) (Benitez i sur., 2012), a pritom se, u kontekstu ljuske luka, dva vanjska mesnata lista navode kao izvor fruktana i fruktooligosaharida (Jaime i sur., 2001). Također, u značajnom udjelu u ljusci luka mogu biti prisutni i jednostavni šećeri, poput fruktoze, glukoze i saharoze (Jaime i sur., 2001; Benitez i sur., 2012; Vojvodić i sur., 2016). Prema literaturi, veći udjel šećera (glukoze, fruktoze, saharoze i fruktana) u luku nalazi se u unutarnjim, jestivim dijelovima glavice luka (Benítez i sur., 2011). Osim toga, dominantni flavonol glikozidi u ljusci luka su zapravo glukozidi te je za očekivati da se tijekom hidrolize u svrhu izdvajanja kvercetina, u ekstraktima zaostaje značajna količina jednostavnih šećera.

Udjeli reducirajućih šećera i ketoza u ekstraktima dobivenima prethodno opisanim metodama kombinacije ekstrakcije i hidrolize - A, B i C, određeni su PAHBAH i TBA metodama. Prije same provedbe metoda bilo je nužno ukloniti kvercetin, zbog snažne interferencije sa samim metodama, tj. trenutnog razvoja intenzivno žute boje reakcijske smjese. Kvercetin je izdvojen ekstrakcijom tekuće-tekuće s etil acetatom, a udjel šećera je određen u preostaloj vodenoj fazi nakon ekstrakcije. Rezultati udjela reducirajućih šećera i ketoza prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Udjel jednostavnih šećera u ekstraktima i hidrolizatima ljuske luka dobivenima kombiniranim postupcima ekstrakcije i hidrolize

Uzorak	Udjel reducirajućih šećera		Udjel ketoza	
	mg mL ⁻¹	% wt	mg mL ⁻¹	% wt
A1	1,71 ± 0,04	4,56 ± 0,38	1,10 ± 0,05	2,93 ± 0,24
A2	0,84 ± 0,02	2,10 ± 0,05	0,22 ± 0,01	0,55 ± 0,03
Ukupno	2,55 ± 0,02	6,67 ± 0,29	1,32 ± 0,04	3,48 ± 0,26
B1	4,55 ± 0,10	11,37 ± 0,25	1,24 ± 0,01	3,10 ± 0,02
B2	0,02 ± 0,00	0,06 ± 0,01	n.d.	n.d.
Ukupno	4,57 ± 0,10	11,43 ± 0,25	1,24 ± 0,01	3,10 ± 0,02
C	2,07 ± 0,03	10,13 ± 0,17	1,15 ± 0,05	3,00 ± 0,03

Iz prikazanih rezultata, vidljivo se da je metodom A izdvojeno nešto manje reducirajućih šećera nego metodom B. Pritom, u prvom koraku (A1) je izdvojeno 2/3 ukupnog udjela reducirajućih šećera za metodu A. U drugom koraku (A2), određeni reducirajući šećeri dominantno potječu od oslobođene glukoze nakon hidrolize kvercetin-glikozida, što je i vidljivo i u relativno niskom udjelu ketoza u ovom ekstraktu. Razlika između A1 i B1 ekstrakcija bila je u dodatku kiseline

(B1) te je moguće da su u A1 šećeri prisutni u oligomernim oblicima (FOS) i/ili u obliku nereducirajućih dimera (sahariza) i stoga je bilo manje dostupnih reducirajućih krajeva za stupanje u reakciju. Kiselinom hidrolizom u vodenom mediju (B1) je došlo do cijepanja glikozidnih veza, a time se oslobodio i veći broj reducirajućih krajeva. Udjel ketoza (fruktoze) u ukupnim reducirajućim šećerima u B1 ekstraktu iznosio je približno 27 %. S obzirom na kvantitativnu hidrolizu glikozida u koraku B1, u ovom ekstraktu su se izdvojili i svi oslobođeni šećeri, te se u sljedećem koraku (B2) izdvojila neznatna količina reducirajućih šećera, najvjerojatnije preostale glukoze. Maseni udjel ukupno izdvojenih šećera (reducirajući šećeri) metodom B iznosio je 11,43 % te se gotovo u potpunosti izdvaja iz sirovine u prvom koraku (hidroliza u vodenom mediju). Slični rezultati kao za metodu B postignuti su i metodom C, tj. hidrolizom i ekstrakcijom je izdvojeno $2,07 \text{ mg mL}^{-1}$ reducirajućih šećera, što je činilo oko 10 % masenog udjela u ljusci luka. Niža koncentracija šećera u ekstraktu u odnosu na B1 ekstrakciju rezultat je većeg ukupnog volumena ekstrakta u C metodi.

Šećeri koji zaostaju u ekstraktu nakon izdvajanja polifenolnih spojeva mogu se koncentrirati uparavanjem ili membranskim postupcima te se iskoristiti za različite fermentacijske postupke.

Prema nekim radovima, ljuska luka se može koristiti kao materijal za fermentaciju. Zbog svojeg bogatog sastava, prvenstveno zbog velikog udjela polifenola, ali i šećera, ona se može koristiti za razvoj novih funkcionalnih proizvoda. Tinello i suradnici (2017) su istraživali mogućnost fermentacijskog učinka bakterija roda *Lactobacillus* i *Streptococcus* na podlozi napravljenoj od slatke sirutke i soka pripremljenog od ljuske luka. Dokazali su da pripremljena podloga omogućuje rast bakterija *L. fabifermentans*, *L. plantarum* i *S. macedonicus*, a da za to koriste neke šećere iz medija. Također, u istraživanju Kimoto-Nira i suradnika (2020), provedena je fermentacija ljuske luka bakterijama mliječne kiseline s ciljem proizvodnje nove funkcionalne hrane. Dakle, postoji potencijal da se ljuska luka koristi u fermentacijske svrhe upravo zbog bogatstva šećerima. Također, šećerni dio ekstrakta ljuske luka mogao bi se koristiti samostalno kao podloga za provođenje fermentacije, potencijalno nakon ugušćivanja.

4.3. UTJECAJ UVJETA EKSTRAKCIJE NA BIOAKTIVNE KARAKTERISTIKE EKSTRAKATA MAHUNE GRAŠKA

Ekstrakti mahune zelenog graška pripremani su korištenjem različitih konvencionalnih (maceracija, infuzija, dekokcija) i inovativnih metoda ekstrakcije (ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, ekstrakcija mikrovalovima) koji su prikazani u tablici 10. Pritom su promjenjivi

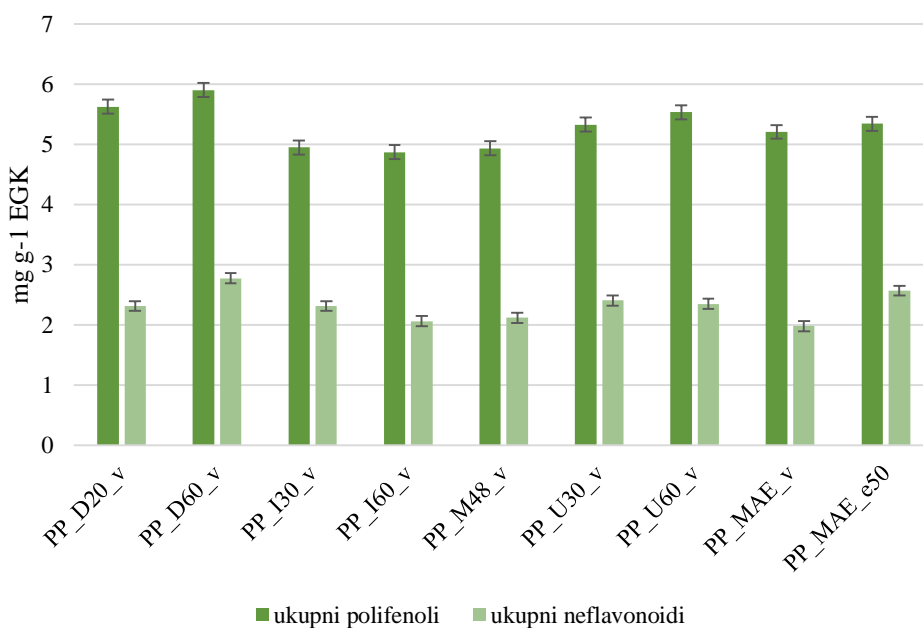
parametri ekstrakcije bili sastav otapala (demineralizirana voda, otopina etanola volumnog udjela 50 %), temperatura (sobna, 80 °C i 100 °C) te trajanje ekstrakcije (5, 20, 30 i 60 min te 48 h).

Tablica 10. Popis uzoraka ekstrakata mahune graška

Metoda ekstrakcije	Otapalo	Trajanje	Oznaka
Dekokcija	H ₂ O	20 min	PP_D20_v
		60 min	PP_D60_v
Infuzija	H ₂ O	30 min	PP_I30_v
		60 min	PP_I60_v
Maceracija	H ₂ O	48 h	PP_M48_v
Ultrazvuk	H ₂ O	30 min	PP_U30_v
		60 min	PP_U60_v
Mikrovalovi	H ₂ O	5 min	PP_MAE_v
	50 % EtOH	5 min	PP_MAE_e50

4.3.1. Udjel ukupnih polifenola i neflavonoida

S ciljem određivanja ekstrakcijske učinkovitosti navedenih metoda ekstrakcije, određen je udjel ukupnih polifenola reakcijom s Folin-Ciocalteu reagensom, kao i udjel neflavonoida nakon taloženja flavonoida formaldehidom. Rezultati su vidljivi na slici 9.



Slika 9. Udjel ukupnih polifenola i neflavonoida u ekstraktima mahune graška

Najveći udjel ekstrahiranih polifenola je određen u uzorku PP_D60_v (5,9 mg g⁻¹ EGK), primjenom maksimalnih vrijednosti ekstrakcijskih parametara (100 °C i 60 min) za vodenu ekstrakciju. Slijedi uzorak PP_D20_v za čiju ekstrakciju je smanjeno vrijeme trajanja na 20 min što je rezultiralo smanjenjem ekstrakcijske učinkovitosti metode tipa dekokcija za 5 % pa se može zaključiti da trajanje dekokcije ne predstavlja značajan utjecaj na ekstrakcijsku učinkovitost metode. Ekstrakcije tipa infuzije pokazale su međusobno gotovo jednake rezultate ukupnih polifenola pa se može zaključiti da trajanje same infuzije nije imalo utjecaj na ekstrakcijski prinos. Ekstrakcijska učinkovitost za infuziju je bila 15 % manja od one koju pokazuje metoda tipa dekokcije. Iste rezultate pokazuje i metoda tipa maceracije koja je među konvencionalnim metodama ekstrakcije primjenom vode kao otapala, rezultirala najmanjim udjelom ukupnih polifenola, 83 % najvišeg određenog udjela ukupnih polifenola. Uspoređujući ekstrakcijska iskorištenja konvencionalnih metoda, može se zaključiti da se dekokcija u trajanju od 60 min u vodi pokazala najboljom metodom ekstrakcije od ispitanih.

Približan udjel ukupnih polifenola kao u slučaju ekstrakcije dekokcijom, određen je za uzorak PP_U60_v (5,5 mg g⁻¹ EGK), pripremljen pomoću ultrazvuka, koji je od inovativnih metoda pokazao najviši prinos. Također, zanimljivi su rezultati dobiveni ekstrakcijom mikrovalovima. U samo 5 min ekstrahirano je gotovo 90 % udjela ukupnih polifenola dobivenih ekstrakcijom tipa dekokcije. Promjenom polarnosti otapala, tj. upotrebom 50 %-tnog etanola kao otapala nije postignuta značajna promjena ekstrakcijske učinkovitosti, kao u slučaju ljuske luka.

Rezultati udjela ukupnih neflavonoida određenih reakcijom s Folin-Ciocalteu reagensom nakon taloženja flavonoida formaldehidom su pokazali da ukupni neflavonoidi čine gotovo polovicu ukupnih polifenola u uzorcima.

Ipak, vidljivo je kako je uzorak mahune graška puno siromašniji izvor polifenolnih spojeva u odnosu na ljusku luka. Uspoređujući udjel ukupnih polifenola ta dva biljna materijala, mahuna graška ima oko 85 % manje ukupnih polifenola u odnosu na ljusku luka.

4.3.2. Antioksidacijski kapacitet

Ekstraktima mahune graška pripremljenima primjenom konvencionalnih i inovativnih metoda je, osim udjela ukupnih polifenola, određen i antioksidacijski kapacitet DPPH metodom. Rezultati, izraženi kao ekvivalenti Trolox-a po gramu početnog uzorka (μmol g⁻¹ TE) su prikazani na slici 10.



Slika 10. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata mahune graška, određen DPPH metodom

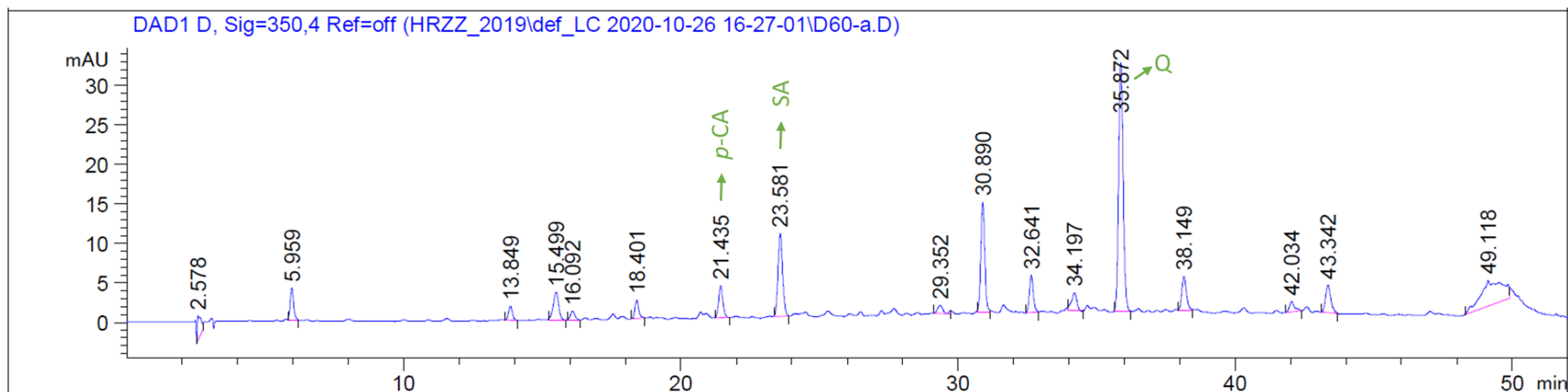
Iz rezultata je vidljivo kako je antioksidacijski kapacitet ekstrakta mahune graška poprilično ujednačen neovisno o kojoj metodi ekstrakcije se radi (26,5 - 30,8 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$). Ipak, antioksidacijski kapacitet mahune graška je puno manji u odnosu na ekstrakt ljuske luka, neovisno o kojoj metodi ekstrakcije se radi i predstavlja tek oko 35 % antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta ljuske luka.

4.3.3. Udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva nakon hidrolize

U svrhu djelomične identifikacije polifenolnih spojeva prisutnih u ekstraktima mahune graška, provedena je hidroliza. Naime, na inicijalnim kromatogramima izvornih ekstrakata nije bilo moguće identificirati dominantne pikove, s obzirom na dostupne standarde te je hidroliza iskorištena kako bi se oslobodili aglikoni, tj. osnovni oblici polifenolnih spojeva iz eventualno prisutnih konjugata te se tako olakšala njihova identifikacija. HPLC analizom hidrolizata uzorka PP_D60_v, pripremljenog dekocijom u vodenoj otopini tijekom 60 minuta, dobiven je kromatogram prikazan na slici 11. Uspješno su identificirana tri pika na kromatogramu, koji pripadaju *p*-kumarinskoj kiselini (*p*-CA), sinapinskoj kiselini (SA) i kvercetin (Q). Iz ovih rezultata je vidljivo da se u ekstraktima mahune graška mogu očekivati konjugati hidroksicimetnih kiselina, prvenstveno *p*-kumarinske i sinapinske kiseline te flavonola kvercetina. Iz kromatograma je također vidljiva prisutnost i drugih spojeva koje nije bilo moguće identificirati u uvjetima provedene analize. Iz tog razloga, potrebna su dodatna

istraživanja kojima bi se identificirali za sada nepoznati spojevi prisutni u hidroliziranom uzorku, ali i izvornom ekstraktu. Identificirani spojevi u hidroliziranim ekstraktima ljuske luka su i kvantitativo određeni, a rezultati su prikazani u tablici 11. Od svih ispitanih ekstrakata mahune graška, najveći udjel *p*-kumarinske kiseline određen je u ekstraktu dobivenom primjenom infuzije u trajanju od 30 min (PP_I30_v, 112,23 $\mu\text{g g}^{-1}$) te infuzije u trajanju 60 min (PP_I60_v, 111,60 $\mu\text{g g}^{-1}$). Najveći udjel sinapinske kiseline određen je u ekstraktu dobivenom infuzijom u trajanju od 60 min (PP_I60_v, 89,92 $\mu\text{g g}^{-1}$) te infuzijom u trajanju od 30 min (PP_I30_v, 85,94 $\mu\text{g g}^{-1}$). Kvercetin je bio prisutan u znatno većem udjelu od navedenih kiselina. Najviše ga je određeno u ekstraktu dobivenom infuzijom u trajanju od 30 min (PP_I30_v, 257,98 $\mu\text{g g}^{-1}$), a gotovo identičan rezultat dobiven je za vrijeme ekstrakcije od 60 min (PP_I60_v, 257,58 $\mu\text{g g}^{-1}$). Dakle, metode ekstrakcije tipa infuzije dale su najbolje rezultate za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz mahune graška pri čemu je, od svih detektiranih spojeva, u najvećem udjelu prisutan flavonol kvercetin pa se mahuna graška može smatrati relativno dobrim izvorom kvercetina. Usporedbom svih navedenih rezultata, konvencionalne metode ekstrakcije su ipak pokazale bolje rezultate u odnosu na inovativne tehnike.

Mahuna graška je u kontekstu izdvajanja polifenolnih spojeva vrlo nov i neistražen materijal zbog čega istraživanja u tom smjeru dobivaju i veću važnost.



Slika 11. Kromatogram hidrolizata (PDA, 350 nm) ekstrakta mahune graška, pripremljenog dekokcijom vodom tijekom 60 minuta (*p*-CA – *p*-kumarinska kiselina; SA – sinapinska kiselina; Q – kvercetin)

Tablica 11. Udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva u hidrolizatima odabranih ekstrakata mahune graška

Uzorak	<i>p</i> -Kumarinska kiselina (<i>p</i> -CA), $\mu\text{g g}^{-1}$	Sinapinska kiselina (SA), $\mu\text{g g}^{-1}$	Kvercetin (Q), $\mu\text{g g}^{-1}$
PP_D60_v	98,01 ± 9,36	77,56 ± 6,15	171,31 ± 19,15
PP_I30_v	112,23 ± 2,85	85,94 ± 0,43	257,98 ± 20,55
PP_I60_v	111,60 ± 6,01	89,92 ± 4,14	257,58 ± 1,30
PP_U30_v	107,33 ± 3,11	74,66 ± 2,02	254,19 ± 6,01

5. ZAKLJUČCI

S obzirom na rezultate dobivene u ovom radu, izvode se sljedeći zaključci:

1. Konvencionalne metode u pripremi ekstrakata ljuske luka pokazale su se preferabilnima zbog svoje jednostavnosti izvedbe; ekstrakcija tipa dekokcije (100 °C) primjenom otopine etanola volumnog udjela 80 %, tijekom 60 min i uz omjer uzorka i otapala 1:20 (w/v) rezultirala je najvišim udjelom ukupnih polifenola (42,4 mg GAE g⁻¹); jednostrukom ekstrakcijom pri navedenim uvjetima postignuto je iskorištenje od najmanje 94 % ukupno postignutog udjela ukupnih polifenola u uzastopnim ekstrakcijama do iscrpljenja.
2. Inovativne metode ekstrakcije također su pokazale visoku ekstrakcijsku učinkovitost u ekstrakciji ukupnih polifenola iz ljuske luka; u ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima postignuto je iskorištenje od 90 % u 5 min ekstrakcije, u odnosu na najviši udjel ukupnih polifenola, određen u dekoktu.
3. Za visoku ekstrakcijsku učinkovitost, s obzirom na udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet, od iznimne važnosti je pravilan odabir otapala; pritom, najviši udjeli ukupnih polifenola iz ljuske luka postignuti su primjenom vodeno-etanolne otopine najmanjeg volumnog udjela etanola 50 %.
4. Prema rezultatima HPLC analize, dominantni polifenolni spojevi u ljusci luka su protokatehinska kiselina te kvercetin i njegovi glikozidi, od kojih su najviše zastupljeni kvercetin-3,4'-diglukozid i kvercetin-4'-glukozid.
5. Kvercetin je u ljusci luka prisutan kao aglikon te u obliku glikozida; pritom, kvercetin iz glikozida čini približno 50-65 % ukupnog kvercetina, dok ostatak čini kvercetin aglikon. Za izdvajanje ukupnog kvercetina iz ljuske luka, potrebno je uz ekstrakciju provesti i kiselinsku hidrolizu.
6. Optimalni parametri izdvajanja kvercetina iz ljuske luka su hidroliza i ekstrakcija tipa infuzije pri 80 ° C vodenom otopinom klorovodične kiseline (2M) tijekom 60 min, a zatim nastavljena ekstrakcija miješanjem pri sobnoj temperaturi i uz dodatak trostrukog volumena 96 %-tnog etanola. Pri ovim uvjetima se izdvaja 9,86 mg g⁻¹ kvercetina, približno 75 % određenog udjela ukupnog kvercetina u vodeno-etanolnim ekstraktima i 4,25 mg g⁻¹ protokatehinske kiseline.

7. Kombinacijom hidrolize i ekstrakcije, iz ljuske luka izdvaja se višestruko veći udjel protokatehinske kiseline nego samom ekstrakcijom, što je rezultat djelomične degradacije kvercetina tijekom hidrolize, a potencijalno i hidrolize glikozidnih konjugata protokatehinske kiseline, što je potrebno dodatno istražiti.
8. U hidrolizatima ljuske luka su osim polifenolnih spojeva, zastupljeni i jednostavni šećeri, glukoza i fruktoza, koji se, uz nativnu prisutnost u sekundarnoj sirovini ljuske luka, dodatno akumuliraju uslijed hidrolize fruktooligosaharida, glukozida kvercetina i saharoze. Šećeri koji zaostaju nakon izdvajanja polifenolnih spojeva, mogu se iskoristiti u različitim fermentacijskih procesima.
9. U ekstrakciji polifenola iz mahune graška, sve primijenjene ekstrakcijske tehnike su pokazale vrlo sličnu ekstrakcijsku učinkovitost s obzirom na udjel ukupnih polifenola (TPC) i antioksidacijski kapacitet (DPPH) koji su najviše iznosili 5,9 mg g⁻¹ EGK za TPC i 30,8 μmol TE g⁻¹ za DPPH; ipak, oba ova parametra su bila značajno niža nego u slučaju ekstrakcije ljuske luka. Za razliku od polifenola ljuske luka, polifenoli mahune graška dobro se ekstrahiraju u demineraliziranoj vodi.
10. Kiselinska hidroliza ekstrakata mahune graška značajno je pridonijela identifikaciji polifenolnih spojeva prisutnih u ekstraktu, a pritom su isti djelomično identificirani kao konjugati *p*-kumarinske kiseline, sinapinske kiseline i kvercetina.
11. S obzirom na primijenjene metode ekstrakcije, najveći udio žć-kumarinske kiseline (112,23 μg g⁻¹) sinapinske kiseline (89,92 μg g⁻¹) i kvercetina (257,98 μg g⁻¹) određen je u ekstraktu pripremljenom infuzijom pri 80 ° C tijekom 30 min. Produljenje infuzije do 60 min nije rezultiralo porastom udjela ekstrahiranih polifenola.

6. LITERATURA

Almeida, A. F., Borge, G. I. A., Piskula, M., Tudose, A., Tudoreanu, L., Valentová, K., Williamson, G., Santos, C. N. (2018) Bioavailability of Quercetin in Humans with a Focus on Interindividual Variation. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **17**(3), 714–731.

Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D., Lightfoot, D. (2017) Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants.* **6**(4), 42.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini N. A. N., Omar, A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* **117**(4), 426 – 436.

Azwanida, N. N. (2015) A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants.* **4**(3).

Bastola, K. P., Guragain, Y. N., Bhadriraju, V. Vadla-ni, P.V. (2017) Evaluation of standards and interfering compounds in the determination of phenolics by folin-ciocalteu assay method for effective bioprocessing of biomass. *Am. J. Anal. Chem.* **8**, 416-431.

Bedrníček, J., Kadlec, J., Laknerová, I., Mráz, J., Samková, E., Petrášková, E., Hasonová, L., Vácha, F., Kron, V., Smetana, P. (2020) Onion Peel Powder as an Antioxidant-Rich Material for Sausages Prepared from Mechanically Separated Fish Meat. *Antioxidants.* **9**, 974.

Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., Komes, D. (2018) Overview of polyphenols and their properties. U: Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications, 1.izd. (Galanakis, C., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 3–44.

Belščak-Cvitanović, A., Stanojević, R., Manojlović, V., Komes, D., Juranović Cindrić, I., Nedović, V., Bugarski, B. (2011) Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Res. Int.* **44**, 1094-1101.

Benítez, V., Mollá, E., Martín-Cabrejas, M. A., Aguilera, Y., López-Andréu, F. J., Cools, K., Terry, L. A., Esteban, R. M. (2011) Characterization of Industrial Onion Wastes (*Allium cepa* L.): Dietary Fibre and Bioactive Compounds. *Plant Foods Hum. Nutr.* **66**(1), 48–57.

- Blakeney, A. B., Mutton, L. L. (1980) A simple colorimetric method for the determination of sugars in fruit and vegetables. *J. Sci. Food. Agric.* **31**, 889-897.
- Blekić, M., Režek Jambrak, A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3**(1), 32-47.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT* **28**, 25-30.
- Bystrická, J., Musilová, J., Vollmannová, A., Timoracká, M., Kavalcová, P. (2013) Bioactive components of onion (*Allium cepa* L.) — a Review. *Acta Aliment.* **42**(1), 11–22.
- Cheng, A., Chen, X., Jin, Q., Wang, W., Shi, J., Liu, Y. (2013) Comparison of Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Red and Yellow Onions. *Czech J. Food Sci.* **5**(31), 501–508.
- Choi, I.S., Cho, E.J., Moon, J-H., Bae, H-J. (2015) Onion skin waste as a valorization resource for the by-products quercetin and biosugar. *Food Chem.* **188**, 537–542.
- Coman, V., Teleky, B.-E., Mitrea, L., Martău, G. A., Szabo, K., Călinoiu, L.-F., Vodnar, D. C. (2019) Bioactive potential of fruit and vegetable wastes. *Adv. Food Nutr. Res.* doi:10.1016/bs.afnr.2019.07.001
- Da Silva, R. P. F. F., Rocha-Santos, T. A. P., Duarte, A. C. (2016) Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *Trends Analyt Chem.* **76**, 40–51.
- Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2**(2), 22-33.
- Dueñas, M., García-Estévez, I. (2020) Agricultural and Food Waste: Analysis, Characterization and Extraction of Bioactive Compounds and Their Possible Utilization. *Foods.* **9**(6), 817.
- Fahim, J. R., Attia, E. Z., Kamel, M. S. (2019) The phenolic profile of pea (*Pisum sativum*): a phytochemical and pharmacological overview. *Phytochem Rev.* **18**, 173–198.
- FAO (2020) The state of food and agriculture. FAO- Food and Agriculture Organization of the United States. <<http://www.fao.org/state-of-food-agriculture/2019/en/>> Pristupljeno: 2. veljače 2021.
- Gudelj, I (2019) Ciljevi održivog razvoja - provedba na globalnoj razini i provedbeni status u Republici Hrvatskoj. *Hrvatske vode* **27**(109), 245 -251.

- Guo, F., Xiong, H., Wang, X., Jiang, L., Yu, N., Hu, Z., Sun, Y., Tsao, R. (2019) Phenolics of Green Pea (*Pisum sativum* L.) Hulls, their Plasma and Urinary Metabolites, Bioavailability and in vivo Antioxidant Activities in a Rat Model. *J. Agric. Food Chem.* **67**, 11955–11968.
- Hanan, E., Rudra, S. G., Sagar, V. R., Sharma, V. (2020) Utilization of pea pod powder for formulation of instant pea soup powder. *J. Food Process. Preserv.* doi: 10.1111/jfpp.14888
- Handa, S. S. (2008) An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. U: *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. (Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., Rakesh, D. D., ured.), ICS-UNIDO, Trieste, Italy, str. 22.
- Hardman, W. E. (2014) Diet components can suppress inflammation and reduce cancer risk. *Nutr Res Pract.* **8**(3), 233-240.
- Helkar, P. B., Sahoo A. K., Patil, N. J. (2016) Review: Food Industry By-Products used as a Functional Food Ingredients. *Int J Waste Resour.* **6**(3), 248.
- Jaime, L., Martinez, F., Martin-Cabrejas, M. A., Molla, E., Lopez-Andreu, F. J., Waldron, K. W., Esteban, R. M. (2000) Study of total fructan and fructooligosaccharide content in different onion tissues. *J Sci Food Agric.* **81**(2), 177–182.
- Ju, A., Song, K. B. (2019) Incorporation of yellow onion peel extract into the funoran-based biodegradable films as an antioxidant packaging material. *Int. J. Food Sci. Technol.* **55**, 1671–1678.
- Kavalcová, P., Bystrická, J., Tomáš, J., Karovičová, J., Kuchtová V. (2014) Evaluation and comparison of the content of total polyphenols and antioxidant activity in onion, garlic and leek. *Potravinarstvo.* **8**, 272-276.
- Kimoto-Nira, H., Ohashi, Y., Amamiya, M., Moriya, N., Ohmori, H., Sekiyama, Y. (2020) Fermentation of onion (*Allium cepa* L.) peel by lactic acid bacteria for production of functional food. *J. Food Meas. Charact.* **14**, 142–149
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Etherton, T. D. (2002) Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med*, **113**(9), 71–88.
- Kumar., K., Yadav, A. N., Kumar, V., Vyas, P., Dhaliwal, H. S. (2017) Food waste: a potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. *Bioresour. Bioprocess.* **4**(1), 18.

- Lee, K. A., Kim, K. T., Kim, H. J., Chung, M. S., Chang, P.-S., Park, H., Pai, H. D. (2014) Antioxidant activities of onion (*Allium cepa* L.) peel extracts produced by ethanol, hot water, and subcritical water extraction. *Food Sci. Biotechnol.* **23**(2), 615–621.
- Lever, M. (1972) A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Anal. Biochem.* **47**, 273-279.
- Ly, T. N., Hazama, C., Shimoyamada, M., Ando, H., Kato, K., Yamauchi, R. (2005) Antioxidative Compounds from the Outer Scales of Onion. *J. Agric. Food Chem.* **53**(21), 8183–8189.
- Mateos-Aparicio, I., Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M.-J., Zapata-Revilla, M.-A., Tenorio-Sanz, M.-D. (2010) Pea pod, broad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. *Food Sci. Technol.* **43**(9), 1467–1470.
- McCleary, B., Charmier, L. M. J., McKie, V. A., McLoughlin, C., Rogowski, A. (2019) Determination of fructan (inulin, FOS, levan and branched fructan) in animal food (animal feed, pet food, and ingredients): single-laboratory validation, First Action 2018.07. *J. AOAC Int.* **102** (3), 883-892.
- Metrani, R., Singh, J., Pratibha Acharya, Jayaprakasha, G. K., Pati, B. S. (2020) Comparative Metabolomics Profiling of Polyphenols, Nutrients and Antioxidant Activities of Two Red Onion (*Allium cepa* L.) Cultivars. *Plants.* **9**, 1077.
- Mourtzinis, I., Prodromidis, P., Grigorakis, S., Makris, D. P., Biliaderis, C. G., Moschakis, T. (2018) Natural food colorants derived from onion wastes: Application in a yoghurt product. *Electrophoresis.* **39**(15), 1975–1983.
- Munir, M. T., Kheirkhah, H., Baroutian, S., Quek, S. Y., Young, B. R. (2018) Subcritical water extraction of bioactive compounds from waste onion skin. *J. Clean. Prod.* **183**, 487–494.
- Nimbalkar, P. R., Khedkar, M. A., Chavan, P. V., Bankar, S. B. (2018) Biobutanol production using pea pod waste as substrate: Impact of drying on saccharification and fermentation. *Renew. Energy.* **117**, 520–529.
- Om-Hashem, A. A., Hanan, M. A., Nessrien, M. N., Effat, A. A. (2016) Effect of Different Extraction Methods on Stability of Anthocyanins Extracted from Red Onion peels (*Allium cepa*) and Its Uses as Food Colorants. *BNNI.* **4**(47), 1-24.

- Ordoñez S., L. E., Osorio Mora, O., Pinchao P., Y. A. (2019) Evaluation of the effect of different factors on the ultrasound assisted extraction of phenolic compounds of the pea pod. *DYNA*. **86**(210), 211–215.
- Ough, C. S., Amerine, M. A. (1988) *Methods for analysis of musts and wine*, 2. izd, John Wiley & Sons, New York.
- Pal, C. B. T., Jadeja, G. C. (2018) Deep Eutectic Solvents-based Extraction of Polyphenolic Antioxidants from Onion (*Allium cepa* L.) Peel. *J. Sci. Food Agric.* doi:10.1002/jsfa.9395
- Percheron, F. (1962) Dosage colourimétrique du fructose et des fructofuranosides par l'acide thiobarbiturique. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.* **255**, 2521-2522.
- Piechowiak, T., Grzelak-Błaszczak, K., Bonikowski, R., Balawejder, M. (2020) Optimization of extraction process of antioxidant compounds from yellow onion skin and their use in functional bread production. *LWT*. **117**, 108614.
- Pontis, H. G. (2017) *Methods of analysis of carbohydrate metabolism in photosynthetic organisms. Plants, green algae, and cyanobacteria*. Academic Press (Elsevier), London, str. 18-19.
- Prakash, D., Singh, B. N., Upadhyay, G. (2007) Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*, L.). *Food Chem.* **102**(4), 1389–1393.
- Razavi, R., Kenari, R. E. (2016) Antioxidant activity of red onion (*Allium cepa* L.) peel extract produced by maceration, ultrasonic assisted and supercritical extraction techniques. Proceedings of the 24th Iranian Food Science and Technology Congress, IFSTA Congress, Teheran, Iran.
- Sagar, N. A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E. M., Lobo, M. G. (2018) Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. Sagar*. **17**(3), 512–531.
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., Jacobo-Velázquez, D. A. (2013) The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods*. **5**, 5990–5999.
- Sharma, K., Mahato, N., Nile, S. H., Lee, E. T., Lee, Y. R. (2016) Economical and environmentally-friendly approaches for usage of onion (*Allium cepa* L.) waste. *Food Funct.* **7**(8), 3354–3369.

Singh, J. (2008) Maceration, Percolation and Infusion Techniques for the Extraction of Medicinal and Aromatic Plants. U: *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. (Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., Rakesh, D. D., ured.), ICS-UNIDO, Trieste, Italy, str. 67-68.

Singh, R. S., Kaur, N., Kennedy, J. F. (2019) Pullulan production from agro-industrial waste and its applications in food industry: A review. *Carbohydr.* **217**, 46-57.

Singleton, V. L. (1974) Analytical fractionation of the phenolic substances of grapes and wine and some practical uses of such analyses. U: *Chemistry of Winemaking*, (Webb, A., ur.), Advances in Chemistry Series, ACS Publications, Washington DC, str. 184-211.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. U: *Methods in Enzymology*, Vol. 299, Oxidants and antioxidants Part A, (Packer, L, ur.), Academic Press (Elsevier), str. 152-178.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* **16**, 144-158.

Song, Q., Li, J., Zeng, Y. (2015) Minimizing the increasing solid waste through zero waste strategy. *J. Clean. Prod.* **104**, 199-210.

Takahama, U., Hirota, S. (2000) Deglucosylation of quercetin glycosides to the aglycone and formation of antifungal agents by peroxidase-dependent oxidation of quercetin on browning of onion scales. *Plant Cell Physiol.* **41**, 1021-1029.

Tassoni, A., Tedeschi, T., Zurlini, C., Cigognini, I. M., Petrusan, J.-I., Rodríguez, Ó., Neri, S., Celli, A., Sisti, L., Cinelli, P., Signori, F., Tsatsos, G., Bondi, M., Verstringe, S., Bruggerman, G., Corvini, P. F. X. (2020) State-of-the-Art Production Chains for Peas, Beans and Chickpeas—Valorization of Agro-Industrial Residues and Applications of Derived Extracts. *Molecules.* **25**(6), 1383.

Tinello, F., Vendramin, V., Barros Divino, V., Treu, L., Corich, V., Lante, A., Giacomini, A. (2017) Co-fermentation of onion and whey: A promising synbiotic combination. *J Funct Foods.* **39**, 233–237.

Tonyali, B., Sensoy, I. (2017) The effect of onion skin powder addition on extrudate properties. *Acta Hortic.* **1152**, 393–398.

UN (2021) United Nations Department of Economic and Social Affairs. Sustainable Development. The 17 Goals. <https://sdgs.un.org/goals>. Pristupljeno: 11. veljače 2021.

Vojvodić, A., Komes, D., Jurić, S., Nutrizio, M., Belščak-Cvitanović, A., Bušić, A. (2014). The Potential of Agro-industrial Waste as a Source of Dietary Functional Components. U: Frece, J., ur. *Proceedings of the 8th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists*. Koprivnica: Baltazar d.o.o., 36-41.

Vojvodić, A., Komes, D., Vovk, I., Belščak-Cvitanović, A., Bušić, A. (2016) Compositional evaluation of selected agro-industrial wastes as valuable sources for the recovery of complex carbohydrates. *Food Res. Int.* **89**, 565-573.

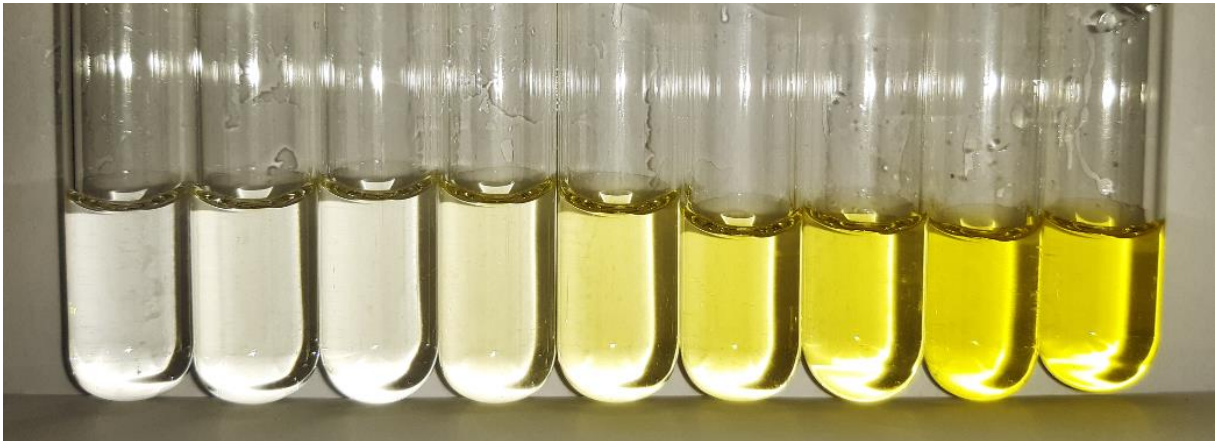
Zenkevich, I. G., Eshchenko, A. Y., Makarova, S., V., Vitenberg, A. G., Dobryakov, Y. G., Utsal, V. A. (2007) Identification of the products of oxidation of quercetin by air oxygen at ambient temperature. *Molecules* **12**, 654-672.

Zhou, A., Sadik, O. A. (2008) Comparative Analysis of quercetin oxidation by electrochemical, enzymatic, autoxidation, and free radical generation techniques: a mechanistic study. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 12081-12091.

7. PRILOZI



Prilog 1. Obojenja reakcije PAHBAH metode za slijepu probu te rastuće koncentracije standarda fruktoze (5, 10, 25, 50, 75 i 100 mg ml⁻¹, s lijeva na desno)



Prilog 2. Obojenja reakcije TBA metode za slijepu probu te rastuće koncentracije standarda fruktoze (5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 i 200 mg ml⁻¹, s lijeva na desno)

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

A handwritten signature in blue ink that reads "Ivana Dajčić". The signature is written in a cursive style with a distinct loop at the end of the last name.

Ime i prezime studenta