

Karakterizacija i inkapsulacija polifenolnog ekstrakta i pektina ljuske crvenog luka

Soldo, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:159:209368>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-04**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

**KARAKTERIZACIJA I
INKAPSULACIJA
POLIFENOLNOG EKSTRAKTA I
PEKTINA LJUSKE CRVENOG
LUKA**

Rad je izrađen u okviru bilateralnog hrvatsko - slovenskog projekta "Razvoj liposoma obloženih pektinom i proteinima kao novih inkapsulacijskih sustava kvercetina dobivenog iz agro-industrijskog otpada" u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Zavodu za Prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc Draženke Komes, red. prof. u trajnom zvanju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć asistentice Monike Ostrman, mag. ing.

Veliko hvala mentorici prof. dr. sc. Draženki Komes na ukazanom povjerenju, pomoći, dostupnosti, susretljivosti, strpljivosti i podršci tijekom svih faza izrade rada.

Posebno se zahvaljujem asistentici Moniki Ostrman, mag. ing., na nesebičnom darivanju vremena i znanja te strpljivosti tijekom provedbe eksperimentalnog dijela rada, ali i za svaku pomoć nakon.

Najveću zahvalu upućujem članovima obitelji i prijateljima koji su uvijek uz mene te su bili najveća podrška tijekom studiranja.

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

KARAKTERIZACIJA I INKAPSULACIJA POLIFENOLNOG EKSTRAKTA I PEKTINA LJUSKE CRVENOG LUKA

Marija Soldo, 992/N

Sažetak: Cilj ovog rada bio je ispitati potencijal ljuske crvenog luka kao izvora polifenolnih spojeva (kvercetin) i pektina. Primjenom konvencionalne i ultrazvučne metode pripremljeni su polifenolni ekstrakti ljuske crvenog luka koji su zatim inkapsulirani u sustave nosača alginata i pektina pripremljene u različitim omjerima (A, AP_80:20, AP_70:30 i AP_60:40). Inkapsulacija je provedena metodom ionskog geliranja. Pektin korišten u sustavu nosača također je dobiven ekstrakcijom iz ljuske crvenog luka. Karakterizacija polifenolnog ekstrakta provedena je određivanjem udjela ukupnih polifenola, antioksidacijskog kapaciteta i udjela pojedinačnih polifenola promjenom HPLC metode. Ekstrahiranom pektinu određena je molarna masa, stupanj esterifikacije, udio galakturonske kiseline te pH vrijednost. Formiranim hidrogel česticama određena su fizikalno-kemijska svojstva, inkapsulacijska učinkovitost te kinetika otpuštanja ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima. Ultrazvučna metoda rezultirala je većim udjelom polifenola među kojima dominiraju kvercetin i njegovi derivati. Ekstrahirani pektin je visokometilirajući te je u svrhu dobivanja stabilnih inkapsulacijskih sustava miješan s alginskom. Binarni alginatno-pektinski sustavi rezultirali su hidrogel česticama najboljih bioaktivnih i mehaničkih svojstava.

Glavne riječi: *ionsko geliranje, ljuska crvenog luka, kvercetin, pektin, polifenoli*

Rad sadrži: 65 stranica, 21 sliku, 15 tablica, 133 literaturnih navoda

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: Monika Ostrman, mag. ing.

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. *Nada Vahčić* (zamjena)

Datum obrane: 23. siječnja 2019.

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

CHARACTERIZATION AND ENCAPSULATION OF POLYPHENOL EXTRACT AND PECTIN FROM ONION PEEL

Marija Soldo, 992/N

Abstract: The aim of this study was to investigate the potential of the onion peel as a source of polyphenol compounds (quercetin) and pectin. Polyphenolic onion peel extracts were prepared by conventional and ultrasonic methods and then encapsulated in alginate and pectin carrier systems prepared at different concentrations (A, AP_80: 20, AP_70: 30 and AP_60: 40). Encapsulation was carried out using method of ionic gelation. Used pectin was also extracted from onion peel. The characterization of the polyphenolic extract was performed by determining the content of total polyphenols, antioxidant capacity and the content of individual polyphenols by HPLC method. Extracted pectin was characterized by molar mass, degree of esterification, the content of galacturonic acid and pH value. Formed hydrogel particles were tested for physico-chemical characteristics, encapsulation efficiency and release kinetics of total polyphenols and antioxidant capacity in simulated gastrointestinal conditions. Ultrasonic method resulted in a higher content of polyphenols, dominated by quercetin and quercetin derivatives. The extracted pectin was high methoxyl and in order to obtain more stable encapsulation systems it was mixed with alginate. Binary alginate-pectin systems resulted in hydrogel particles with the best bioactive and mechanical properties.

Keywords: *ionic gelation, onion peel, quercetin, pectin, polyphenols*

Thesis contains: 65 pages, 21 figures, 15 tables, 133 references

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: *Monika Ostrman*, BSc

Reviewers:

1. PhD. *Ksenija Marković*, Full professor
2. PhD. *Draženka Komes*, Full professor
3. PhD. *Ksenija Durgo*, Full professor
4. PhD. *Nada Vahčić*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 23. January 2019.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. CRVENI LUK (<i>Allium cepa</i> L.).....	3
2.1.1. Kemijski i biokemijski sastav crvenog luka.....	4
2.1.1.1. Kvercetin.....	6
2.1.2. Zdravstveni učinci crvenog luka i kvercetina.....	9
2.2. INKAPSULACIJA.....	10
2.2.1. Metode inkapsulacije.....	11
2.2.1.1. Ionsko geliranje.....	13
2.2.2. Materijali za inkapsulaciju aktivnih tvari	14
2.2.2.1. Prirodni biopolimeri korišteni za inkapsulaciju biološki aktivnih tvari	15
2.2.3. Primjena inkapsulacije u prehrambenoj industriji	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. MATERIJAL.....	20
3.1.1. Uzorci	20
3.1.2. Kemikalije	20
3.1.3. Aparatura i pribor	21
3.2. METODE.....	22
3.2.1. Priprema polifenolnog ekstrakta crvenog luka.....	22
3.2.2. Karakterizacija polifenolnog sastava ekstrakta ljuske crvenog luka	23
3.2.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola (UP)	23
3.2.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom.....	24
3.2.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	25
3.2.2.4. Određivanje pojedinačnih polifenola primjenom tekućinske kromatografije visoke	26
djelotvornosti (HPLC)	26
3.2.3. Izdvajanje pektina.....	28
3.2.4. Karakterizacija pektina.....	29
3.2.4.1. Određivanje ekvivalentne (molarne) mase i stupnja esterifikacije pektina	29
3.2.4.2. Određivanje udjela galakturonske kiseline	30
3.2.4.3. Određivanje pH izoliranog pektina	30
3.2.5. Inkapsulacija ekstrakta ljuske crvenog luka	30
3.2.6. Karakterizacija formuliranih čestica.....	31
3.2.6.1. Određivanje udjela vode (suhe tvari)	31
3.2.6.2. Određivanje veličine formuliranih čestica	32
3.2.6.3. Određivanje boje formuliranih čestica	32
3.2.6.4. Određivanje mehaničkih svojstava formuliranih čestica.....	33

3.2.6.5. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta	34
3.2.6.6. Praćenje otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz inkapsuliranih čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima	34
4. REZULTATI I RASPRAVA	35
4.1. KARAKTERIZACIJA POLIFENOLNOG EKSTRAKTA	35
4.1.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta	35
4.1.2. Određivanje pojedinačnih polifenola primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)	36
4.2. KARAKTERIZACIJA PEKTINA	36
4.3. KARAKTERIZACIJA FORMULIRANIH ČESTICA	37
4.3.1. Fizikalno-kemijska svojstva čestica	37
4.3.1.1. Određivanje udjela vode u inkapsuliranim česticama	37
4.3.1.2. Boja inkapsuliranih čestica	39
4.3.1.3. Određivanje veličine i mehaničkih svojstava inkapsuliranih čestica	40
4.3.2. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta	42
4.3.2.1. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije ukupnih polifenola	42
4.3.2.2. Određivanje učinkovitosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom	43
4.3.2.3. Određivanje učinkovitosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	44
4.3.3. Praćenje otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz inkapsuliranih čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima	45
4.3.3.1. Praćenje otpuštanja ukupnih polifenola u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima	45
4.3.3.2. Praćenje otpuštanja kvercetina u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima	47
4.3.3.3. Praćenje otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima	48
4.3.4. Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva razbijenih hidrogel čestica	53
5. ZAKLJUČCI	54
6. LITERATURA	55

1. UVOD

Suočavajući se s posljedicama neracionalnog korištenja prirodnih resursa i sve većeg onečišćenja okoliša, brojne grane industrije, ali i sami pojedinci, počeli su tražiti rješenja i načine kojima bi smanjili zagađenje, razvili i provodili održive procese proizvodnje te iskoristili agro-industrijski otpad. Posebno područje interesa vezano je uz bacanje hrane i gubitke koji nastaju tijekom proizvodnje hrane. Gubitci hrane odnose se na gubitke nastale tijekom berbe sirovina, prerade i proizvodnje hrane, dok se otpad odnosi na gubitke nastale tijekom distribucije i potrošnje hrane (Stancu i sur., 2016). Procjenjuje se kako 24 % ukupne hrane koja se isporučuje za ljudsku potrošnju otpada na gubitke i otpad hrane, dok na razini Europe otpad hrane čini više od 50 % ukupnog otpada hrane na razini kućanstva (Kummu i sur., 2012). Budući da gubitci hrane imaju velik utjecaj i na druge korake u proizvodnji, posebice ekonomsku komponentu, ni ne čudi kako se veliki naponi ulažu u razumijevanje, ispitivanje sastava i korisnih komponentata te poboljšanje iskoristivosti agro-otpada. Različite skupine spojeva kojima se pripisuje veća dodana vrijednost do sada su izolirane iz agro-otpada, primjerice ugljikohidrati, polifenolni spojevi, proteini i pektini. Njihova iskoristivost u prehrambenoj industriji u stalnom je porastu zahvaljujući funkcionalnim svojstvima te niskoj cijeni proizvodnje. Posebna pozornost pridaje se ekološki prihvatljivim načinima proizvodnje te zelenoj kemiji. Crveni luk uzgaja se u cijelom svijetu, a zbog zanimljivog kemijskog sastava pripisuju mu se brojni zdravstveni učinci kao što su antioksidacijsko, antimikrobno, antiupalno, antikancerogeno, utjecaj na koncentraciju lošeg kolesterola (LDL) te na smanjenje krvnog tlaka (Pereira, 2017). Crveni luk posebno je poznat po sadržaju kvercetina i njegovih derivata koji se najviše doprinose brojnim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje. Na razini Europe godišnje se baci oko 450 000 tona otpada luka, a na svjetskoj razini značajnije više. Vanjski slojevi luka, kao što je ljuska, čine glavninu otpada, a istraživanja pokazuju kako je ona dobar izvor polifenolnih spojeva (Mourtzinos, 2018) te pektinskih oligosaharida (Baldassarre i sur., 2018) koji imaju pozitivan učinak na zdravlje čovjeka. Budući da su polifenolni spojevi osjetljivi na vanjske utjecaje, ali i uvjete u gastrointestinalnom sustavu, za njihov transport, bolju iskoristivost i zaštitu često se koristi tehnika inkapsulacije. Ova tehnika pronalazi široku primjenu u prehrambenoj industriji, posebice obogaćivanju prehrambenih proizvoda. Zbog svih navedenih razloga cilj ovog rada bio je ekstrahirati polifenolne spojeve iz ljuske crvenog luka te ih inkapsulirati u različite sustave nosača primjenom metode ionskog geliranja. Kao nosači za inkapsulaciju koristit će se čisti alginat i aginatno-pektinski sustavi

različitih koncentracija, pri čemu će se koristiti pektin izoliran iz ljuske crvenog luka. U radu će se primjeniti i različite metode pripreme ekstrakta ljuske crvenog luka. Polifenolnom ekstraktu odredit će se udjel ukupnih polifenola, antioksidacijski kapacitet i udjeli pojedinačnih polifenola, dok će se pektinu izoliranom iz ljuske crvenog luka odrediti molarna masa, stupanj esterifikacije, udio galakturonske kiseline te pH. Karakterizacija inkapsuliranih čestica provest će se određivanjem fizikalno-kemijskih svojstava, inkapsulacijske učinkovitosti i kinetike otpuštanja ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. CRVENI LUK (*Allium cepa* L.)

Uporaba crvenog luka seže u daleku ljudsku povijest, a povijesni podaci govore kako se prije 6000 godina uzgajao na području Mezopotamije i Egipta, gdje se kao biljka najviše pojavljuje na freskama grobnica (Dragić, 2014). Crveni luk (*Allium cepa* L.) je biljka iz obitelji *Liliaceae* čiji je uzgoj danas rasprostranjen širom svijeta, posebice u Aziji i Europi. Podneblje i okoliš u kojemu se uzgaja utječu na rast, oblik, izgled i sastav luka, ali generalno gledajući može se reći da se radi o vrlo zahvalnoj biljci u pogledu uzgoja. Crveni luk (Slika 1) je samo jedna od brojnih *Allium* vrsta koja se koristi u ljudskoj prehrani, a najčešće kultivirane vrste prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Kultivirane *Allium* vrste (Griffiths i sur., 2002)

Vrsta	Podvrsta	Naziv
<i>A. cepa</i>	<i>cepa</i>	crveni luk
	<i>ascalonicum</i>	ljutika
	<i>aggregatum</i>	šalota
	<i>proliferum</i>	egipatski luk
<i>A. fistulosum</i>		zimski luk
<i>A. sativum</i>		češnjak
<i>A. ampeloprasum</i>	<i>porrum</i>	poriluk
	<i>aegyptiacum</i>	divlji poriluk
<i>A. schoenoprasum</i>		vlasac
<i>A. chinense</i>		kineski češnjak
<i>A. tuberosum</i>		kineski vlasac

Podaci Organizacije za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO) ukazuju na porast proizvodnje i potrošnje crvenog luka, a posljednji rezultati pokazuju kako se u 2017. godini proizvelo gotovo 98 milijuna tona. Kada se uspoređi proizvodnja tijekom posljednjih dvadesetak godina jasno je vidljivo kako se proizvodnja luka udvostručila, te se može reći kako se sa svakom godinom proizvodnja povećava gotovo dva puta. Među najveći europskim proizvođačima su Nizozemska, Španjolska, Poljska i Ukrajina, dok je najveći svjetski proizvođač Kina s proizvedena 24 milijuna tona, što je ujedno i ¼ ukupne proizvodnje crvenog luka. Što se tiče potrošnje na europskoj razini najveća potrošnja zabilježena je u

Ukrajini, Španjolskoj i Poljskoj, dok se na svjetskoj razini ističu Kina, Egipat i Indija. U Republici Hrvatskoj godišnja potrošnja je oko 36000 tona (FAOSTAT 2017). Proizvodnja luka se može podijeliti u tri kategorije: luk za prodajna mjesta, dehidrirani luk za procesiranu hranu te salatni zeleni luk koji se koristi za svježu potrošnju (Griffiths i sur., 2002). Prvenstveno se koristi u kuhinji kao poboljšivač okusa i arome jela, i to u različitim oblicima. Zahvaljujući pozitivnim zdravstvenim učincima kao što su antimikrobno, antialergijsko, antihistaminsko, diuretičko, respiratorno i antikancerogeno, široku primjenu pronalazi u narodnoj medicini (Marotti i Piccaglia, 2002).



Slika 1. *Allium cepa* L.(Anonyomus 1)

2.1.1. Kemijski i biokemijski sastav crvenog luka

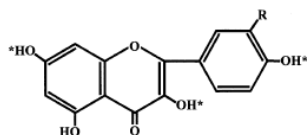
Podaci o kemijskom sastavu crvenog luka pokazuju kako najveći udjel čini voda i to u rasponu od 80 do 95 %, dok preostali dio najviše čine ugljikohidrati. Najmanji udjel sastava čine vitamini i mineralne tvari. U Tablici 2 prikazane su vrijednost različitih nutrijenata na 100 g crvenog luka (Akash i sur., 2014).

Tablica 2. Nutritivna vrijednost različitih nutrijenata na 100 g crvenog luka (Akash i sur., 2014).

SASTOJAK	UDJEL (na 100 g)
Voda	89,11 g
ugljikohidrati	9,34 g
vlakna	1,7 g
proteini	1,1 g
masti	0,1 g
tiamin (B1)	0,046 mg
riboflavin (B2)	0,027 mg
niacin (B3)	0,116 mg
vitamin B6	0,12 mg
vitamin C	7,4 mg
vitamin E	0,02 mg
kalcij	23 mg
željezo	0,21 mg
magnezij	0,129 mg
fosfor	29 mg
Kalij	146 mg
Natrij	4 mg
Cink	0,17 mg
folat (B9)	19 µg
vitamin K	0,4 µg

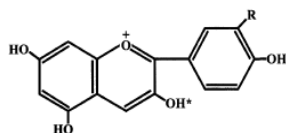
Nutritivni sastav crvenog luka je kompleksan, a istraživanja su pokazala kako je u brojnim zemljama upravo luk glavni izvor prehrambenih fenola. Isto tako bogat je i drugim bioaktivnim spojevima, kao što su fruktooligosaharidi i spojevi sa sumporom. Luk, posebice crvene vrste, bogate su flavonoidima-antocijanima i flavonima, od koji se posebno ističu kvercetin i njegovi derivati (Roldán i sur., 2008). Rezultati istraživanja koje su proveli Hertog i suradnici (1992) te Hollman i Arts (2000) pokazuju visoke razine kvercetina u luku u odnosu na druge vrste voća i povrća korištenih u radu. Antocijani su nositelji karakteristične crvene boje, a flavoni žute boje mesnatog dijela te smeđe boje same ljuske. Uz flavonoide značajna i važna skupina spojeva prisutna u crvenom luku su alk(en)il cistein sulfoksidi (ACSOs) koji su nositelji specifične arome i okusa luka, koja se stvara nakon djelovanja enzima alinaze. Kemijske strukture značajnih spojeva prisutnih u crvenom luku prikazane su na Slici 2. U luku je identificirano šesnaest različitih flavonskih spojeva kao što su kempferol,

kvercetin, izorhamnetin te njihovi derivati. Od antocijana detektirani su cijanidini- cijanidin 3-glukozid, cijanidin 3-laminaribiozid, cijanidin-3-malonilglukozid i cijanidin-3-malonilaminaribiozid (Griffiths i sur., 2002). Ljuska crvenog luka ima visok udio kvercetina, 2-10 % w/w, i njegovih derivata (Ramos and sur., 2006). Uz navedene spojeve nedavna istraživanja potvrđuju i prisustvo drugih bioaktivnih spojeva kao što su saponini i peptidi (Suleria i sur., 2014).



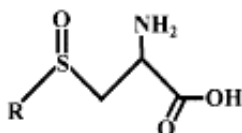
Flavoni

R=H Kempferol
 R=OH Kvercetin
 R=OCH₃ Izorhamnetin
 *=strana glikozilacije



Antocijani

R=OH Cijanidin
 R=OCH₃ Peonidin
 *=strana glikozilacije



R=CH₃ (+)-S-metil-L-cistein sulfoksid
 R= CH₃- CH₂- CH₂ (+)-S-propil-L-cistein sulfoksid
 R=CH₃-CH=CH Trans-(+)-S-(Propen-1-y1)-L-cistein sulfoksid

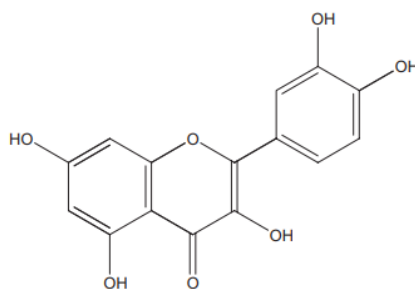
Alkil cistein sulfoksidi

Slika 2. Kemijske strukture značajnih spojeva crvenog luka (Griffiths i sur., 2002)

2.1.1.1. Kvercetin

Kvercetin (3,5,7,3',4'-pentahidroksiflavon) je prirodni polifenol, sekundarni biljni metabolit. Pojavljuje se u tri oblika, kao aglikon te dva glikozida: kvercetin-40-O-glikozid i kvercetin-3,40-O-diglikozid. Zahvaljujući broju i položaju slobodnih hidroksilnih grupa kvercetin je među najjačim antioksidantima (Lighfoot Vidal i sur., 2016). Prisutan je u voću, povrću, ljekovitom bilju i bezalkoholnim pićima, a njegova prisutnost značajnija je u luku, jabukama, crnom vinu i čajevima gdje je prisutan u obliku glukozida. Karakteristična svojstva kvercetina

kao što su niska topljivost u vodi i degradacija pri izloženosti visokim temperaturama, svjetlosti i/ili kisiku otežavaju ugradnju kvercetina u funkcionalnu hranu. S druge pak strane kemijska nestabilnost i niska bioraspoloživost u gastrointestinalnim uvjetima ograničavaju biološku aktivnost samog kvercetina, a time i pozitivne učinke na zdravlje (Aceituno-Medina i sur., 2015). Tako je primjerice kvercetin dobro topiv u dimetil sulfoksidu (150 mg/mL, 25 °C), umjereno topiv u etanolu (4,0 mg/mL, 37 °C), a slabo topiv u vodi (0,01 mg/mL, 25 °C). Koncentracija kvercetina i njegovih derivata može se značajno smanjiti zbog reakcija oksidacije i degradacije tijekom procesiranja i skladištenja hrane (Wang i sur., 2016). Sve ove specifičnosti kvercetina veliki su izazov i za prehrambenu industriju. Bioraspoloživost kvercetina nakon oralne konzumacije je, zbog slabe topljivosti u vodi i kompleksnog metabolizma u jetri, manja od 2%. Apsorpcija glikozida kvercetina ovisi o vrsti vezanog šećera. Istraživanja pokazuju kako se glikozidi kvercetina prisutni u luku bolje apsorbiraju u odnosu na one prisutne u primjerice čaju. U tankom crijevu se učinkovito hidroliziraju u aglikonski oblik pomoću β -glukozidaza i kao takvi apsorbiraju. Kvercetin glukuronska kiselina i njezini derivati sumporne kiseline bolje se apsorbiraju u odnosu na čisti kvercetin. Na samu apsorpciju utječu sastav hrane i stupanj glikozilacije kvercetina. Metabolizam kvercetina se odvija u tankom crijevu, bubrezima i jetri, a reakcijama biotransformacije u tankom crijevu i jetri nastaju njegovi metaboliti (Li i sur., 2016). Ispitivanje provedeno na štakorima pokazalo je povećanu apsorpciju kvercetina u slučaju kada se uzimao sa pektinom. Dobiveni rezultati mogu se povezati sa pozitivnim učinkom pektina na morfološka svojstva tankog crijeva (Nishijama i sur., 2015).



Slika 3. Kemijska struktura kvercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroksiflavon) (Rezaei-Sadabady i sur., 2014)

Sve ove specifičnosti kvercetina veliki su izazov za prehrambenu industriju, vezan uz samu ekstrakciju kvercetina, ali i njegovu inkapsulaciju. Zbog toga se provode brojna istraživanja

koja ispituju različite metode ekstrakcije kvercetina, s ciljem pronalaska najefikasnije. Prikaz biljnih izvora i najčešće korištenih metoda ekstrakcije kvercetina nalazi se u Tablici 3.

Tablica 3. Biljni izvori i metode ekstrakcije kvercetina

IZVOR KVERCETINA	METODA EKSTRAKCIJE	REFERENCA
vodeni papar <i>Polygonum hydropiper L.</i>	superkrična voda	Lekar i sur., 2014
ljuska crvenog luka <i>Allium cepa L.</i>	enzimska hidroliza	Choi i sur., 2015
šipurak <i>Rosa damascena</i>	superkrični CO ₂	Ghoreishi i sur., 2016
cvijet <i>Flos sophorae</i>	duboka eutekrična otapala	Nam i sur., 2015
ginko <i>Ginko biloba L.</i>	ekstrakcija u čvrstoj fazi	Braga i sur., 2014
luk, grodže, jabuka, rajčica	disperzivna mikroekstrakcija; tekućina-tekućina	Asadollahi i sur., 2013
vatreni trn <i>Pyracantha coccinea</i>	ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	Sahin i sur., 2016
kožica kukuruza	ultrazvuk i celulaza	JiaQi i sur., 2016
kožica bodljikave kruške	molekularno utisnuta polimer-kruto faza i ultrazvuk	Pakade i sur., 2017
muški cvijet <i>Populus tomentosa Carrière</i>	ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	Wang i sur., 2017

Udio flavonoida u luku značajno ovisi o uvjetima skladištenja, raznolikosti kultiviranja, postotku vlage, svjetlu te obradi same namirnice. Tako primjerice pečenje luka na 18 °C dovodi do degradacije kvercetina, dok kuhanje luka u kipućoj vodi dovodi do otpuštanja flavonoida u vodu za kuhanje. Isto tako različiti intenzitet svjetla utječe na skladištenje kvercetina i derivata kvercetina u luku pri čemu je najveća koncentracija zabilježena kod plavog, a najmanja kod fluorescentnog svjetla (Ko i sur., 2015).

2.1.2. Zdravstveni učinci crvenog luka i kvercetina

Uporaba crvenog luka u svrhu liječenja ljudi ima daleku prošlost i seže u vrijeme drevnog Egipta. Poznato je također da su za vrijeme Olimpijskih igara sportaši konzumirali više luka i češnjaka kako bi poboljšali sportsku izvedbu, dok su Europljani liječili nastale ugruške. Ovi primjeri ukazuju na konzumaciju luka u svrhu poboljšanja cirkulacije (Griffths i sur., 2002). Najvažnije svojstvo polifenola je njihova antioksidativna aktivnost koja je od iznimne važnosti uklanjanje slobodnih radikala i zaštitu organizma (Munin i Edwards-Levy, 2011). Zahvaljujući visokom udjelu flavonoida crvenom luku se pripisuje antioksidacijsko djelovanje (Campos i sur., 2003; Lee i sur., 2014; Nile i sur., 2013; 2017; Kim i sur., 2017) koje omogućava zaštitu organizma od brojnih bolesti povezanih s oksidacijskim stresom (Harris i sur., 2015). Sastojak luka koji se najčešće povezuje za pozitivnim učinkom na ljudsko zdravlje je kvercetin. Kvercetin može inhibirati proliferaciju različitih vrsta stanica karcinoma (karcinom prostate, gušterače, pluća i jetre) utječući na njihov rast i stanične procese (Wang i sur., 2016). Iako ima obećavajuću antikancerogenu aktivnost zbog već navedenih karakteristika kao što su slaba topljivost u vodi, niska bioraspoloživost te uvjeti tijekom procesiranja lijekova i hrane, uporaba u liječenju protiv karcinoma je ograničena. No zbog velikog zdravstvenog potencijala provode se brojna istraživanja koja ispituju i testiraju nove sustave dostave kvercetina, kao što je primjerice inkapsulacija u liposome (Rezaei-Sadabady i sur., 2014). Uz kvercetin se, osim anitoksacijskog kapaciteta i antikancerogena svojstva, vežu i anitupalna, antibakterijska i antivirusna svojstva, kao i mogućnosti opuštanja mišića (Harris i sur., 2015). Zanimljivo istraživanje Hollmana i Artsa (2000) provedeno na ispitanicima koji nemaju debelo crijevo pokazalo je kako je apsorpcija glikozida iz kvercetina (52%) daleko bolja od čistog aglikona (24%) te kako se takvi glikozidi mogu apsorbirati kod čovjeka bez prethodne mikrobne hidrolize. Kvercetin mono- i diglikozid čine 93% ukupnih sadržaja flavonola. Pretilost je bolest koja postaje sve veći javno zdravstveni problem zbog čega se ulažu veliki naponi kako bi se otkrili spojevi kojima bi se ona mogla kontrolirati. Lijekovi koji se trenutno koriste predstavljaju veliki trošak za zdravstveni sustav zbog čega se pokušavaju pronaći alternativna rješenja. Tako je nedavno objavljeno istraživanje Abduljabbar i Abdoulrahman (2018) pokazalo kako bi upravo luk mogao biti dodatak u prehrani koji bi pomogao pri smanjenju tjelesne mase ispitanika. Slično istraživanje provedeno je i na pretilim miševima s dijabetesom gdje su Yoshinari i suradnici (2012) dokazali da luk ima važnu ulogu u sprječavanju nastanka pretilosti. Oba istraživanja navode i pozitivan utjecaj konzumacije crvenog luka na razinu glukoze u krvi zbog čega se može

iskoristiti i u liječenju dijabetesa. Zdravlje i nutritivni status pojedinca iznimno su važni za normalno funkcioniranje imunog sustava, a među brojnim namirnicama koje imaju značajniji utjecaj na taj sustav nalazi se i crveni luk. Fruktooligosaharidi i organosulfatni spojevi povezuju se s pozitivnim učincima na zdravlje te se ističe njihovo imunomodulirajuće djelovanje (Kumar i sur., 2015; Prasanna i Venkatesh, 2015). Crveni luk je prepoznat kao biljka s antimikrobnim (Bankebila, 2004; Ye i sur., 2013), antifungalnim (Yin i Tsao, 1999) i antiparazitskim djelovanjem (Krstin i sur., 2018) koje se mijenja ovisno o sorti luka koja se koristi. Crveni luk ima potencijal smanjenja rizika kardiovaskularnih bolesti (Kendler, 1987) i tromboze, budući da ima velik antikoagulacijski potencijal (Dutta-Roj, 2002; Ko i sur., 2018). Istraživanje provedeno na prostati štakora otvara mogućnost primjene crvenog luka kao potencijalnog antidota za kadmij koji povećava rizik nastanka malignih bolesti prostate (Ola-Mudathir i Suru, 2015). Upravo maligne bolesti postaju glavni predmet istraživanja, posebice hrane i njihovih karakterističnih komponenti koje bi mogle imati pozitivan utjecaj na smanjenje rizika nastanka karcinoma, ali i smanjenja štetnih učinaka istog. Provedena istraživanja pokazuju kako luk općenito, pa tako i crveni luk, pomaže u prevenciji nastanka različitih vrsta karcinoma, kao što su karcinom jetre, bubrega, želudca, mozga, ezofagusa, pluća, dojki i dr. (Suleria i sur., 2013). Antikancerogeno djelovanje ljuske crvenog luka svrstava crveni luk u dobar, povoljan i dostupan izvor spojeva važnih za ljudsko zdravlje (Singh i sur., 2009). Sva navedena istraživanja ukazuju na to kako su korisni učinci crvenoga luka u korelaciji sa visokim udjelom flavonoida i spojeva sa sumporom.

2.2. INKAPSULACIJA

Kako bi ostvarila sve želje i potrebe kupaca čija znanja o važnosti pravilne prehrane i njenom utjecaju na zdravlje se neprestano proširuju, prehrambena industrija morala je i dio svoje proizvodnje prilagoditi tim potrebama, što se ostvarilo dodavanjem funkcionalnih spojeva u različite prehrambene proizvode. Istraživanja pokazuju kako su potrošači svjesni važnosti funkcionalne hrane, ali kako je ista često znala biti neukusna jer im je okus bio važniji od zdravstvenog učinka (Verbeke, 2006). Znajući ovakva razmišljanja potrošača, ali i svojstva dodanih sastojaka prehrambena industrija odredila je smjernice razvoja novih proizvoda i u koje tehnologije je potrebno ulagati. Odgovor na potrebe potrošača, ali i izazove u samoj proizvodnji funkcionalne hrane dala je i tehnika inkapsulacije. Tehnika inkapsulacije se

razvila prije otprilike pedeset godina, a njena primjena je u stalnom porastu, budući da pruža zaštitu inkapsuliranom materijalu od temperature, vlage te drugih ekstremnih uvjeta i na taj način povećava njegovu stabilnost i održivost (Gibbs i sur., 1999). Radi se o tehnici pakiranja aktivnih tvari u čestice čime se omogućava transport tih tvari na ciljana mjesta i u ciljano vrijeme, pri čemu čestice mogu biti veličine od nekoliko nm do nekoliko mm. Tako se korištenjem ove metode omogućava razlikovanje aroma, prikrivanje neželjenih komponenti okusa i mirisa, stabilizacija dodanih spojeva i/ili poboljšanje njihove dostupnosti. Ova metoda također se koristi i u proizvodnji prehrambenih materijala i produkata za imobilizaciju enzima i stanica te pri fermentaciji ili produkciji različitih metabolita (Zuidam i Nedović, 2010). Inkapsulirani materijal je uglavnom tekućina, ali može biti i u plinovitom ili čvrstom obliku. Naziva se još i jezgra materijala, aktivna i djelotvorna tvar, punjenje, unutarnja faza ili korisni teret, dok se tvar koja čini ovojnica naziva kapsula, membrana, nosač ili ljuska (Gibbs i sur., 1999; Augustin i sur., 2001). Razvijene su brojne vrste inkapsulacije na mikro i nano razinama, a svima im je zajedničko da se sastoje od tri koraka inkapsulacije: stvaranja ovojnice oko materijala koji se inkapsulira, osiguravanja nepropuštanja ovojnice i čuvanja od neželjenog utjecaja (Gibbs i sur., 1999; Mozafari i sur., 2008). Uporaba ove metode omogućila je korištenje novih spojeva u obogaćivanju hrane i tako povećala njihovu dostupnost, ali i kvalitetu samog proizvoda krajnjem potrošaču.

2.2.1. Metode inkapsulacije

Postoje brojne metode inkapsulacije, a odabir metode ovisi o svojstvima materijala koji se inkapsulira i tvari koja se koristi za stvaranje kapsule, željenom mehanizmu otpuštanja sastojaka te željenoj veličini čestica. Neke od metoda i materijala prikazane su u Tablici 4. Prema izvedbi metode inkapsulacije se mogu podijeliti na:

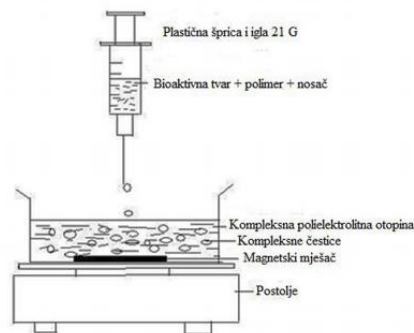
- a) Fizikalne metode: sušenje raspršivanjem, prevlačenje fluidnim slojem, ekstruzija, centrifugalna ekstruzija, inkapsulacija korištenjem superkritičnih tekućina;
- b) Fizikalno-kemijske metode: inkapsulacija hlađenjem emulzija, vruće taljenje, ionsko geliranje, isparavanje otapala-ekstrakcija, jednostavna ili složena koarcevacija;
- c) Kemijske metode: granična polikondenzacija, *in situ* polimerizacija, granična polimerizacija, granično unakrsno povezivanje („cross-linking“) (Munin i Edwards-Levy, 2011)

Tablica 4. Pregled inkapsuliranih aktivnih tvari i korištenih tehnika inkapsulacije

Aktivna tvar/sastojak	Metoda inkapsulacije	Nosač	Referenca
Vitamin B2	superkritični CO ₂ ionsko geliranje	lipidi alginat/kitozan	Couto i sur., 2016 Azevedo i sur., 2014
Vitamin B12	granično unakrsno povezivanje sušenje raspršivanjem	dekstran kitozan	Estevinho i sur., 2016 Chalasanani i sur., 2007
Vitamin C	sušenje raspršivanjem	kitozan	Estevinho i sur., 2015 Desai i sur., 2005
Vitamin D3	nanoprecipitacija	laktat	Almouazen i sur., 2012
Vitamin E	sušenje raspršivanjem visoko tlačna homogenizacija	škrob sufraktant	Hategekimana i sur., 2015 Yang i McClements, 2012
Fe	visoko učinkovita NPMC	pirol+FeCl ₃	Wu i sur., 2015
kvercetin	Ionsko geliranje	kitozan	Yan i sur., 2018
	Elektrodinamički procesi	vlakna	Jacobsen i sur., 2017
	ionsko geliranje	kitozan	Hao i sur., 2017
	ionsko geliranje	kitozan	Zhang i sur., 2007
	emulzifikacija	lipidi	Lu i sur., 2016
	<i>in situ</i> inkapsulacija	ZIF-8	Liédana i sur., 2012
kurkumin	micelarna inkapsulacija	škrob	Yu i Huang, 2010
kapsaicin	nano-inkapsulacija emulzifikacija	fosfolipid kitozan	Kumar i sur., 2016 Kaiser i sur., 2015
polifenoli maslačka	ionsko geliranje	alginat/kakao prah	Bušić i sur., 2018
polifenoli Clitoria ternatea	ekstruzija	alginat	Pasukamonset i sur., 2016
polifenoli šipka	sušenje raspršivanjem	maltodekstrin/proteini soje	Robert i sur., 2010
resveratrol	voda u ulju-ulje u vodi višestruka emulzija	kazein	Hemar i sur., 2010
askorbil palmitat	ionsko geliranje	kitozan	Yoksan i sur., 2010

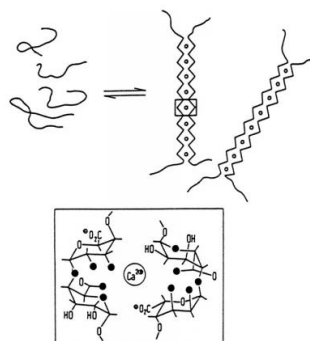
2.2.1.1. Ionsko geliranje

Postupak ionskog geliranja sastoji se od ekstruzije (istiskivanja) vodene otopine polimera kroz mlaznicu ili špricu igle, u kojoj je aktivni sastojak dispergirani ili otopljen. Kapljice se prenose u disperzivnu fazu gdje se nakon reakcije prevode u sferične čestice gela. Opisan postupak se vidi primjerice kod natrijevog alginata s disperznom fazom kalcijevog klorida (Munin i Edwards-Levy, 2011), a prikazan je na Slici 4.



Slika 4. Tehnika ionskog geliranja-formiranje hidrogela (Patil i sur., 2012)

Geliranje i umrežavanje postiže se reakcijom metalnih iona iz otopine i glukuronskih kiselina iz alginata, pri čemu se glukuronske kiseline slažu u karakterističan model koji se naziva „kutija za jaja“ (eng. „egg-box“) prikazan na Slici 5. Divalentni kation se veže na grupe α -L-glukuronske kiseline čime nastaju visoko kooperativne jedinice koje sadrže više od dvadeset monomernih jedinica. Tako nastao alginatni lanac može se povezivati s mnogo drugih lanaca što umjesto do stvaranja taloga dovodi do nastanka gel strukture (Gombotz i Wee, 2012). Na uspješnost metode utječe nekoliko čimbenika: koncentracija polimera i elektrolita za geliranje, pH otopine za geliranje, temperatura i koncentracija bioaktivnog sastojka (Patil i sur., 2012). Prednost ove metode jest svakako u tome što je umrežavanjem izbjegnuto korištenje kemijskih sredstava za umrežavanje i emulgiranje, što je često toksično za organizme te je spriječena mogućnost oštećenja tvari koja se inkapsulira, tj. bioaktivnog sastojka (Fan i sur., 2012).



Slika 5. „Kutija za jaja“ model (Gombotz i Wee, 2012)

2.2.2. Materijali za inkapsulaciju aktivnih tvari

Postoji velik broj materijala koji se koriste za inkapsulaciju tekućina, otopina i plinova, međutim samo mali broj materijala ima tzv. „GRAS“ (eng. “Generally recognized as safe”) status te je njihova uporaba dozvoljena pri proizvodnji prehrambenih proizvoda bez štetnog učinka na ljudsko zdravlje. Materijali korišteni za inkapsulaciju u prehrambenoj industriji prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Korišteni materijali za inkapsulaciju u prehrambenoj industriji (Zuidam i Nedović, 2010)

Izvor	Ugljikohidratni polimeri	Proteini	Lipidi
Biljke	škrob i derivati	gluten (kukuruz)	masne kiseline/alkoholi
	celuloza i derivati	izolati (grašak, soja)	glicerdi
	biljne izlučevine (guma arabika, karaya, mesquite)		voskovi
	biljni ekstrakti (galaktomanani, topljiva soja)		fosfolipidi
More	polisaharidi		
	karagenan alginat		

Tablica 5. Korišteni materijali za inkapsulaciju u prehrambenoj industriji - nastavak (Zuidam i Nedović, 2010)

Izvor	Ugljikohidratni polimeri	Proteini	Lipidi
Mikrobi/ životinje	ksantan	kazein	masne kiseline/alkoholi
	gelan	whey	glicerdi
	dekstran	želatina	voskovi
	kitozan		fosfolipidi

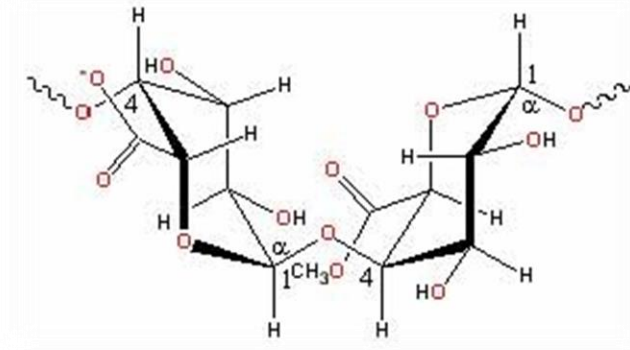
2.2.2.1. Prirodni biopolimeri korišteni za inkapsulaciju biološki aktivnih tvari

Hidrogelovi proizvedeni od biljnih materijala, zahvaljujući kompaktilnosti i razgradivosti, privlače poseban interes u području inkapsulacije. Budući da u svojoj kemijskoj strukturi sadrže određene katione/anione imaju sposobnost tvorbe mrežaste strukture unakrsno se povezujući sa suprotnim ionima. Imaju svojstvo zaštite aktivne tvari, ali i usporavaju brzinu otpuštanja istih (Patil i sur., 2012). Pri odabiru materijala za inkapsulaciju važno je i uočiti karakteristike i specifičnosti samog materijala, mehanizme reakcija, kompatibilnost sa bioaktivnim sastojkom, nutritivnom vrijednošću te senzorskim svojstvima prehrambenog proizvoda koji će se u konačnici koristiti (Augustin i sur., 2001).

Pektin

Pektin je kompleksni heterogeni polisaharid koji je prisutan u primarnoj staničnoj stjenici te međustaničnim područjima viših biljaka. To je polimer koji se sastoji od galakturonske kiseline kao monomera. Četiri glavne pektinske komponente su homogalakturonan (HG), ramnogalakturonan-I (RG-I), ramnogalakturonan-II (RG-II) i ksilogalakturonan (XG) (Babbar i sur., 2016). Ovisno o biljnoj vrsti i postupku ekstrakcije, karboksilne grupe djelomično su esterificirane metanolom, a u pojedinim pektinskim vrstama hidroksilne grupe djelomično su acetilirane. Neutralni šećeri poput ramanoze, glukoze i ksiloze prisutni su u udjelu 5-10 % mase galakturonske kiseline. Budući da su flavonoidi većinom prisutni u voću i povrću koje sadrži pektin od velike je važnosti poznavati njihov utjecaj na flavonoide (Nishijima i sur.,

2015). Na Slici 6 prikazan je dio molekule pektina, tj. dio glavnog lanca poligalakturonske kiseline povezan α -1,4-glikozidnom vezom.



Slika 6. Pektin-dio glavnog lanca poligalakturonske kiseline povezan α -1,4-glikozidnom vezom (Anonymous 2)

Pektini se mogu klasificirati ovisno o stupnju esterifikacije (DE), na osnovu kojeg mogu formirati mreže u kiselom i mediju s visokom koncentracijom šećera (DE >50 %) ili interakcijom sa Ca^{2+} ionima (DE < 50%) (Díaz-Rojas i sur., 2004). Stupanj metilacije (DM) govori koliki je udjel karbonilnih grupa esterificiran metanolom. Ukoliko je udjel veći od 50 % radi se o visokometilirajućem pektinu (VMP), odnosno o niskometilirajućem (NMP) ukoliko je udjel manji od 50 %. Za VMP je potrebna prisutnost visoke koncentracije čvrste tvari da bi mogli gelirati. NMP mogu gelirati u prisustvu dvovalentnih kationa, kao što je primjerice Ca^{2+} te pri vrijednostima pH od 2 do 6. Najčešći izvori pektina su kora naranče i jabuka koji predstavljaju otpad tijekom proizvodnje soka. Ekstrakcija iz kore citrusa uglavnom se provodi kiselinskom hidrolizom te uporabom soli i smole kao ekstraktanta za ionsku izmjenu. Metode i vrsta agro-otpada korištene za proizvodnju pektina prikazane su u Tablici 6. Kvaliteta samog pektina ovisi o pH otopine za ekstrakciju, vremenu i temperaturi pri kojoj se ekstrakcija provodi. Svi ovi parametri variraju ovisno o biljnoj vrsti iz koje se pektin izolira.

Tablica 6. Metode ekstrakcije pektina iz agrootpada

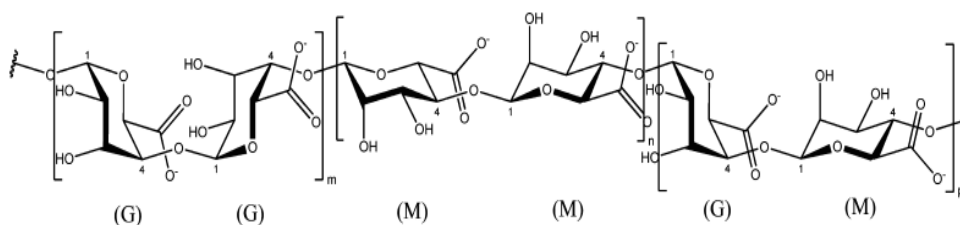
AGROOTPAD	METODA EKSTRAKCIJE PEKTINA	REFERENCA
kora grejpa	akustična kavitacija	Wang i sur., 2017
" <i>passion fruit</i> "	ultrazvuk i mikrovalovi	Sundarraaj i Ranganathan, 2018
kora naranče	kiselinska hidroliza	Tovar i sur., 2018
rajčica	ultrazvuk	Grassino i sur., 2016
lubenica	kiselinska hidroliza	Petkowicz i sur., 2017
kora manga	kiselinska hidroliza	Banerjee i sur., 2016
sisal konoplja	enzimska hidroliza i utrazvuk	Yang i sur., 2018
ljuska crvenog luka	enzimska hidroliza	Babbar i sur., 2016
jabuka	vrenje pri različitim teperaturama	Chandel i sur., 2016
artičoka	enzimska hidroliza	Sabater i sur., 2018
kora banane	kiselinska hidroliza	Oliviera i sur., 2016
kora limuna	mikrovalovi u vodi	Fidalgo i sur., 2016

U prehrambenoj industriji pektin ima široku primjenu te se koristi kao aditiv (E440), tj. sredstvo za geliranje, stabiliziranje ili zgušnjavanje u proizvodima kao što su džem, fermentirani mliječni proizvodi te sladoled. Većina pektina koje koristi prehrambena industrija ekstrahira se iz kore citrusa ili jabuke, pri niskom pH i visokoj temperaturi te se prvenstveno radi o homogalakturonanu. Pektini sa niskim DE geliraju prema modelu „kutije za jaja“. Kako bi bili povezani pomoću Ca^{2+} iona dijelovi dvaju pektinskih lanaca ne smiju sadržavati estersku grupu. Dosadašnja istraživanja potvrdila su kako je za povezivanje sa kalcijem potrebno od 7-20 blokova ostataka galakturonske kiseline. Kao vlakno prirodno prisutno u voću i povrću pektin je prepoznat kao važna nutritivna komponenta (Voragen i sur., 2009).

Alginat

Alginat je biorazgradivi, netoksični, prirodni polisaharid dobiven iz određene vrste bakterije morske smeđe alge. Natrijev alginat je natrijeva sol alginske kiseline, prirodnog polisaharida i linearnog polimera građenog od β -D-manuronske i α -D-gluronske kiseline povezane 1,4-glikozidnom vezom, u različitim omjerima i oblicima. Topiv je u vodi gdje stvara isprepletenu strukturu, a povezivanjem sa dvovalentnim ili polivalentnim kationima nastaje netopiva mrežasta struktura (Patil i sur., 2012). Proizvode ga dvije vrste bakterija *Azotobacter vinelandii* i *Pseudomonas aeruginosa*, ali se dobiva ekstrakcijom i iz više vrsta smeđih

morskih algi (Govan i sur., 1981). Alginat ima mogućnost stvaranja termo stabilnih, čvrstih gelova sa dvo- i trovalentnim kationima (osim sa magnezijem) te topivih soli sa monovalentnim metalnim ionima. Upravo zbog ovog svojstva koristi se u sustavima otpuštanja lijekova te kao potpora u reakcijama. Što je veći udio glukuronske kiseline to je i gel čvršći, u odnosu na alginat sa nižim udjelom kiseline, upravo zbog jačeg afiniteta glukuronskih ostataka za dvovalentne katione. Alginati mogu formirati i kiseli gel snižavajući pH otopine natrijeva alginata, a takvi gelovi pak pokazuju veću mehaničku čvrstoću. Kemijska struktura natrijevog alginata prikazana je na Slici 7, gdje G predstavlja glukuronsku, a M manuronsku jedinicu (Agulhon i sur., 2012).



Slika 7. Kemijska struktura natrijevog alginata (Agulhon i sur., 2011)

Iako je natrijev alginat sa više glukuronske kiseline topljiviji u vodi, nego onaj sa više manuronske, viskoznost otopine alginata je ipak povezana s njegovom koncentracijom, duljinom lanca i brojem monomernih jedinica. Alginati duljih lanaca, pri sličnim koncentracijama, imali su veću viskoznost što upućuje da na viskoznost može utjecati i molekularna masa konstituenata (Goh i sur., 2012).

2.2.3. Primjena inkapsulacije u prehrambenoj industriji

Primjenom inkapsulacije u prehrambenoj industriji omogućeno je jednostavnije rukovanje te podešavanje svojstava aktivne komponente, poboljšana je njena stabilnost u finalnom proizvodu, ali i tijekom obrade, kao i sigurnost proizvoda, može se maskirati neželjena aroma te je postignuta kontrola otpuštanja u organizmu (Zuidam i Nedović, 2010). Zahvaljujući svim navedenim prednostima metoda se primjenjuje u brojnim granama prehrambene industrije. U Tablici 7 dan je prikaz aktivnih tvari/sastojaka koji su implementirani u inkapsuliranom obliku u određene vrste namirnica te su kao takvi prisutni na tržištu.

Tablica 7. Prikaz aktivnih tvari/sastojaka implementiranih u inkapsuliranom obliku u prehrambene proizvode

Aktivna tvar/sastojak	Metoda inkapsulacije	Hrana u koju je implementirana bioaktivna tvar/sastojak	Referenca
esencijalno ulje origana	sušenje raspršivanjem	mliječni proizvodi	Baranauskienė i sur., 2005
zein-kazein + eugenol/timol	sušenje raspršivanjem	mlijeko	Chen i sur., 2015
<i>Lactobacillus casei</i>	ekstruzija	voćni sok	Chaikham i Apichartsrangkoon, 2012
vitamin C	sušenje raspršivanjem	voćni sok	Righetto i Neto, 2006
inzulin	ionsko geliranje	diabetički proizvodi	Avadi i sur., 2010
omega-3 masne kiseline	sušenje raspršivanjem	kruh	Gökmen i sur., 2011
probiotici	co-inkapsulacija	jogurt	Iyer i Kailasapathy, 2005
ekstrakt crne murve	sušenje raspršivanjem	tamna čokolada	Gültekin-Özgüven i sur., 2016
riblje ulje: omega-3 masne kiseline	sušenje raspršivanjem	glukozni sirup	Dursch i Schwarz., 2006
probiotik	ionsko geliranje	jogurt	Krasaekoopt i sur., 2006
kvercetin	sušenje raspršivanjem	sok od višnje	Elez Garofulić i sur., 2017

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci

U ovome radu korištena je ljuska crvenog luka (*Allium cepa*) kao sirovina za ekstrakciju pektina i kvercetina. Ljuska crvenog luka dobavljena je iz studentske menze Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Odmašćena ljuska luka usitnjena je u mlinu za domaćinstvo, te se kao takva koristila u ovome radu.

3.1.2. Kemikalije

Priprema ekstrakta i izdvajanje pektina:

- 1) Etanol (96%-tni), Gram-mol d.o.o. (Hrvatska)
- 2) Aceton, Gram-mol d.o.o. (Hrvatska)
- 3) Klorovodična kiselina, Kemika (Hrvatska)

Karakterizacija ekstrakta :

Određivanje udjela ukupnih polifenola:

- 1) Folin-Ciocalteu reagens Kemika (Hrvatska)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom:

- 1) Etanol, Gram-mol d.o.o. (Hrvatska)
- 2) Kalijev persulfat, Sigma-Aldrich (Njemačka)
- 3) 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS), Sigma-Aldrich (Njemačka)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

- 1) Metanol, Malinckrodt Baker B.V. (Nizozemska)
- 2) 2,2-difenil-pikrilhidrazil radikal (DPPH), Fluka (Švicarska)

Određivanje pojedinačnih polifenola HPLC metodom:

- 1) Redestilirana voda, AQUA pro injectione (Hrvatska)
- 2) Mravlja kiselina, Carlo Erba (Francuska)
- 3) Metanol, Mallinckrodt Baker B.V. (Nizozemska)

Karakterizacija pektina

- 1) Natrijev klorid, Kemika (Hrvatska)
- 2) Natrijev hidroksid, T. T. T. d.o.o (Hrvatska)
- 3) Klorovodična kiselina, Kemika (Hrvatska)
- 4) Sumporna kiselina, Kefo (Hrvatska)

Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta ljuske crvenog luka

- 1) Natrijev alginat, Sigma-Aldrich Company Ltd. (Velika Britanija)
- 2) Kalcijev klorid, Gram-mol, (Hrvatska)
- 3) Pektin, izoliran iz ljuske crvenog luka

Karakterizacija hidrogel čestica:

- 1) Natrijev citrat, T.T.T. d.o.o. (Hrvatska)
- 2) Natrijev klorid, Kemika (Hrvatska)
- 3) Koncentrirana klorovodična kiselina, Kemika (Hrvatska)
- 4) Natrijev klorid, Kemika (Hrvatska)
- 5) Natrijev hidroksid, T. T. T. d.o.o (Hrvatska)
- 6) Kalijev dihidrogen-fosfat, Kemika (Hrvatska)
- 7) Natrijev hidroksid, T. T. T. d.o.o (Hrvatska)
- 8) Kvarcni pijesak (oprani i žareni), Gram-mol d.o.o. (Hrvatska)

3.1.3. Aparatura i pribor

Za sve navedene metode korišten je stakleni (čaše, odmjerne tikvice, pipete, lijevci, menzure, pipete, Duran boce, Erlenmeyerove tikvice, odsisna boca, eksikator, epruvete) i plastični pribor (kapaljke, češe, posude, falcon epruvete, mikro-epruvete) volumena 0-500 mL. Od metalnog pribora korišteni su tronožac, azbestna mrežica, pincete i aluminijske posudice. Od ostalog pribora korištene su propipete, stalak za epruvete te četke za čišćenje. Za dodavanje malih i preciznih volumena korištene su automatske mikropipete od 20-5000 μ L.

- 1) Analitička vaga, Mettler-Toledo (Švicarska)
- 2) Tehnička vaga
- 3) Vodena kupelj, B- 490 (SAD)
- 4) Ultrazvučna kupelj, Helma S 60 H,Elmasons

- 5) Magnetska miješalica RT 5 power IKAMAG (Njemačka)
- 6) pH-metar 744 Metrohm, AG; Zofingen (Švicarska)
- 7) Spektrofotometar, Genesys 10s UV-Vis, Thermo scientific (SAD)
- 8) Laboratorijski sušionik, Tehnica Železniki (Slovenija)
- 9) Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 10) Rotacijski vakuum uparivač (R-205) s pripadajućom vodenom kupelji (B-490), Büchi (SAD)
- 11) Konduktometar Cond-330i, WTW (Njemačka)
- 12) Dino-Lite kalibracijska pločica (minimalni razmak=0,2 mm) (Nizozemska)
- 13) TA.HDPlus analizator teksture, Stable Micro Systems (Velika Britanija)
- 14) Kolorimetar, CM – 700d, CM – A177, Konica Minolta (Japan)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema polifenolnog ekstrakta crvenog luka

U cilju definiranja najučinkovitije metode, ekstrakcija ljuske crvenog luka provedena je konvencionalnom metodom bez zagrijavanja (20 °C) i sa zagrijavanjem pri 80 °C te primjenom ultrazvuka. Kod konvencionalne metode 50 g prethodno odmašćene i usitnjene ljuske crvenog luka preliveno je sa 500 mL 70 %-tne otopine etanola (1:10) te je miješano na magnetskoj miješalici tijekom 30 minuta. Jedan od uzoraka je miješan na 80 °C, a drugi na sobnoj temperaturi (20 °C). Nakon miješanja uzorci su pomoću aparature za vakuum filtraciju profiltrirani, pri čemu je zadržan talog, a filtrat skupljen u Duran bocu. Talog je ponovno preliven s 500 mL 70%-tne otopine etanola te miješan na magnetskoj miješalici tijekom 30 minuta. Cijeli postupak je ponovljen tri puta. Za ekstrakciju ultrazvučnom kupelji 5 g uzorka je preliveno sa 50 mL 70 %-tne otopine etanola te miješano 30 minuta na magnetskoj miješalici, nakon čega je uzorak profiltriran, talog zadržan, a filtrat skupljen u zasebnu Duran bocu.

3.2.2. Karakterizacija polifenolnog sastava ekstrakta ljuske crvenog luka

3.2.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola (UP)

Metoda za određivanje udjela ukupnih polifenola temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteau reagensa s nekim reducirajućim reagensom (fenoli). Folin-Ciocalteau reagens smjesa je fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka. Prilikom toga fenoksid-ion se oksidira, a Folin-Ciocalteau reagens reducira do plavo obojenih volframovog i molibdenovog oksida (Singleton i sur., 1999). Nakon dva sata reakcije, u kojoj svi fenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteau reagensom, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na 765 nm (Ough i Amerine, 1988), pri čemu je intenzitet obojenja izravno proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

Postupak rada:

U staklene epruvete otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100 μ L uzorka, 500 μ L Folin-Ciocalteau reagensa (razrijeđenog vodom u omjeru 1:2) te 1,5 mL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3). Reakcijska smjesa u epruvetama se dobro izmiješa te na ovaj način pripremljeni uzorci ostavljaju se 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbanacija razvijenog plavog obojenja na 765 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba pripremljena je na isti način kao i uzorci, osim što reakcijska smjesa umjesto 100 μ L uzoraka sadrži isti volumen destilirane vode. Apsorbanciju slijepe probe potrebno je oduzeti od apsorbanacije uzoraka, a dobivena vrijednost se koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Udjel ukupnih polifenola izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

$$y = 0,0010x - 0,0001 [1]$$

gdje su:

x – udjel ukupnih polifenola (mg/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbanacije pri 765 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje, konstruirane za standard galne kiseline, koja prikazuje ovisnost apsorbanacije o koncentraciji standarda (mg/L), određuje se udjel ukupnih polifenola u ispitivanom uzorku. Određivanje udjela ukupnih polifenola provedeno je u dvije paralelne

probe (n=2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama, u mg ekvivalenata galne kiseline (EGK)/g čestica.

3.2.2.2. *Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom*

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

Postupak rada:

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

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

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

Jednadžba baždarne krivulje:

$$y = 0,303x + 0,0006 [2]$$

gdje su:

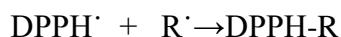
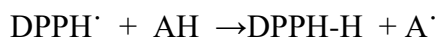
x – antioksidacijski kapacitet uzorka (mmol Trolox-a/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol/L), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom provedeno je u dvije paralelene probe (n = 2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mmol Troloxa/g uzorka. Ako je u postupku korišten razrijeđen uzorak, dobivene koncentracije moraju se pomnožiti s faktorom razrijeđenosti originalnog uzorka (razrjeđenjem).

3.2.2.3. *Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom*

Ova metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal radi nesporenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). U prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji gasi slobodne radikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje otopine u žutu, što se prati mjerenjem apsorbancije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995).



Postupak rada:

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

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

Jednadžba baždarne krivulje:

$$y = 0,603x - 0,006 [3]$$

gdje su:

x – antioksidacijski kapacitet uzorka (mmol Trolox-a/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol/L), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom provedeno je u dvije paralelene probe ($n = 2$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mmol Trolox-a/g uzorka. Ako je u postupku korišten razrijeđeni uzorak, dobivene koncentracije moraju se pomnožiti s faktorom razrijeđenosti originalnog uzorka (razrjeđenjem).

3.2.2.4. Određivanje pojedinačnih polifenola primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Pojedinačni polifenolni spojevi određeni su primjenom HPLC metode u ekstraktu LJCL-a te otopini citrata razbijenih hidrogel čestica.

Postupak rada:

Prije injektiranja u kromatografski sustav ekstrakt LJCL-a je razrijeđen u omjeru 1:10, a potom profiltriran kroz celulozno-acetatne mikrofiltere veličine pora 0,45 μm .

Otopine razbijenih čestica razrijeđene su s metanolom u omjeru 1:1. Razrijeđene su sa metanolom kako bi se uklonili polisaharidi te postigla precipitacija. Otopine su potom centrifugirane, a supernatant je, prije injektiranja, profiltriran kroz odgovarajuće mikrofiltere. 10 μL profiltriranog uzorka je injektirano u kromatografski sustav te je provedena analiza prema dolje navedenim uvjetima.

Analiza pojedinačnih polifenolnih spojeva provedena je kromatografijom obrnutih faza na ACE Excel SuperC18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) koloni (nepolarna stacionarna faza) na temelju različitosti u polarnosti pojedinih komponenata eluacijom polarnim otapalima (Belščak-Cvitanović i sur., 2016).

Mobilna faza: A – 2% mravlja kiselina u vodi

B – 2% mravlja kiselina u acetonitrilu

Protok: 1 mL/min

Eluiranje: gradijentno

Detekcija: UV/VIS Photo Diode Array ($\lambda=278$ nm)

Temperatura kolone: sobna

Vrijeme trajanja analize: 45 min (+ 5 min Post Time)

Tablica 8. Gradijent otapala za HPLC analizu polifenolnih spojeva

t [min]	Otapalo A [%]	Otapalo B [%]	Protok [mL/min]
0	90	10	1,0
45	60	40	1,0

Identifikacija i kvantifikacija detektiranih spojeva:

Snimanjem eluata na valnoj duljini 278 nm (UV područje) pomoću Photo Diode Array (PDA) detektora, provedena je detekcija bioaktivnih spojeva. Kao rezultat dobiveni su karakteristični kromatogrami uzoraka. Izdvojeni spojevi detektirani su pomoću PDA detektora pri valnim duljinama od 200 do 400 nm, uz rezoluciju od 1,2 nm. Usporedbom vremena zadržavanja (Rt) izdvojenih pikova na kromatogramima s vremenima zadržavanja vanjskih standarda te usporedbom s UV-spektrima standarda (oblik spektra i apsorpcijski maksimumi) provedena je identifikacija spojeva dobivenih kromatogramima. Kvantitativno određivanje spojeva u uzorcima omogućeno je korištenjem jednadžbi baždarnih pravaca pojedinih standarda omogućilo je kvantitativno određivanje spojeva u uzorcima (Tablica 9.).

Tablica 9. Baždarni pravci identificiranih bioaktivnih spojeva u ispitivanim uzorcima

Naziv spoja	Jednadžba baždarnog pravca
Prokatehinska kiselina	$y = 31,894x + 1,9556$
Hidroksibenzojeva kiselina	$y = 40,875x + 0,972$
Vanilinska kiselina	$y = 41,684x + 2,3415$
Kvercetin-3-glikozid	$y = 29,26x - 0,4037$
Kvercetin	$y = 34,463x + 8,449$
Derivati kvercetina	$y = 34,463x + 8,449$
Luteolin	$y = 15,913x + 11,838$

HPLC analize provedene su u dvije paralelne probe, a rezultati su izraženi kao mg/g uzorka te su prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom. Za prikupljanje i obradu podataka dobivenih HPLC analizom korištena je aplikacija Star Chromatography Workstation Version 5, a obrada rezultata provedena je pomoću programa Microsoft Office Excel.

3.2.3. Izdvajanje pektina

Nakon ekstrakcije spojeva sa 70 %-tnom otopinom etanola provedeno je sušenje izmjenom otapala. Isti postupak je proveden za sve metode ekstrakcije, a jedina razlika je u volumenu spoja s kojim se talog ispiri pri čemu je volumen za konvencionalnu metodu 10 puta veći od metode ultrazvučne kupelji. Dobiveni talog je ispran tri puta, od toga dva puta sa 96%-tnim etanolom (700 mL konvencionalna/70mL ultrazvučna kupelj) i jednom sa acetonom (400mL konvencionalna/40mL ultrazvučna kupelj). Nakon svakog ispiranja provedena je filtracija pomoću Büchnerova lijevka. Talog je skupljen u plastične posude, prekriven te ostavljen da se suši na sobnoj temperaturi kako bi se iz njega izdvojio pektin. 20 grama osušenog taloga preliveno je sa 500 mL HCl-a, koji je prethodno pripremljen te podešen na pH=1,5 te je sadržaj ostavljen 2 sata u vodenoj kupelji na 90 °C, uz povremeno miješanje svakih 15-20 minuta. Nakon koraka kiselinske hidrolize uzorak je ohlađen na sobnu temperaturu te filtriran preko Büchnerova lijevka. Dobivenom filtratu je potom dodan 4 puta veći volumen 96%-tnog etanola te je sve ostavljeno u hladnjaku preko noći kako bi došlo do

precipitacije pektina. Nakon toga precipitirani pektin je profiltriran, centrifugiran i homogeniziran. Dobiveni homogenizat postavljen je na dijalizu, da bi nakon završene dijalize bio uparen na 1/6 početnog volumena na rotavaporu. Upareni uzorak je potom zamrznut na -80 °C i sušen liofilizacijom, te u konačnici usitnjen u električnom mlinu.

3.2.4. Karakterizacija pektina

3.2.4.1. Određivanje ekvivalentne (molarne) mase i stupnja esterifikacije pektina

U staklenu čašu od 250 mL izvagano je 0,5 g pektina i 1 g natrijevog klorida (NaCl), a u staklenu menzuru odmjeren je 5 mL 96%-tnog etanola i 100 mL destilirane vode. Sve je prebačeno u staklenu čašu i miješano na magnetskoj miješalici do potpunog otapanja pektina. Smjesa je potom titrirana 0,1 M otopinom natrijeva hidroksida (NaOH) dok nije postignut pH = 7,5 nakon čega je očitani volumen utrošenog NaOH te je ekvivalentna masa (EW u g/mol) izračunata prema formuli (Aina i sur., 2012):

$$EW = \frac{m(\text{pektin})}{V(\text{NaOH}) \times c(\text{NaOH})}$$

gdje su:

m (pektina) = početna masa pektina (g)

V (NaOH) = volumen otopine natrijevog hidroksida utrošen za titraciju do pH=7,5 (mL)

c (NaOH) = koncentracija otopine natrijevog hidroksida u mol/mL

Neutraliziranoj otopini pektina je, uz miješanje dodano 25 mL 0,25 M otopine NaOH. Pripremljena otopina je ostavljena 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega joj je dodano 25 mL 0,25 M otopine HCl-a. Potom je provedena titracija s 0,1 M otopinom NaOH do pH =7,5 te je očitani volumen utrošenog titranta i izračunat stupanj esterifikacije (DE (%)) prema (Aina i sur., 2012):

$$DE = \frac{100b}{a + b}$$

gdje su:

a=volumen otopine prije titracije (mL)

b = utrošeni volumen titranta (NaOH) (mL)

DE = stupanje esterifikacije (%)

3.2.4.2. *Određivanje udjela galakturonske kiseline*

U staklenu epruvetu odvagano je 5 mg pektina koji je prethodno ekstrahiran iz ljuske crvenog luka. Epruveta s uzorkom postavljena je u hladnu vodenu kupelj te je dodan 1 mL koncentrirane sumporne kiseline. Pomoću staklenog štapića otopina je miješana 5 minuta te je ponovno dodan 1 mL koncentrirane sumporne kiseline uz ponovno miješanje slijedećih 5 minuta. Potom je dodano 0,5 mL vode uz miješanje, te je ovaj postupak dodavanja vode ponovljen još jednom. Sadržaj epruvete potom je razrijeđen u odmjerne tikvici od 10 mL s vodom, a zatim prenesen u 15 mL Falcon epruvete i centrifugiran 10 minuta pri 2000 rpm. U epruvete je potom dodano 40 μ L 4 M otopine H_3NSO_3 uz snažno miješanje na Vortex-u. Zatim je u sve epruvete dodano 2,4 mL 75 mM otopine $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ uz ponovno snažno miješanje na Vortex-u. Epruvete su ostavljene u vodenoj kupelji na 100 °C tijekom 20 minuta, nakon čega su hladene pod mlazom hladne vode. Nakon hlađenja u dvije epruvete je dodano 80 μ L m-hidroksidifenilne otopine, a u treću jednaki volumen 0,5%- tne otopine NaOH, uz ponovno miješanje. Nakon 5-10 minuta, nakon što se razvije ružičasta boja otopine, uzorcima je izmjerena apsorbancija na 525 nm. Iz dobivenih vrijednosti apsorbancije konstruira se baždarni pravac, koji se koristi za određivanje udjela galakturonske kiseline, izražene u % (Melton i sur., 2001).

3.2.4.3. *Određivanje pH izoliranog pektina*

Prije određivanje pH samog pektina provedena je kalibracija pH-metra u dvije točke sa standardnim otopinama poznatih pH vrijednosti. Potom je mjereno pH pektina u dvije paralele, a rezultat je izražen kao srednja vrijednost.

3.2.5. *Inkapsulacija ekstrakta ljuske crvenog luka*

Za formuliranje sustava nosača korišteni su čisti alginat niske viskoznosti (A), koji je prirodni biopolimer, te kombinacije alginata i pektina (AP) u različitim omjerima. Otopina čistog alginata pripravljena je u koncentraciji od 4%. U kombinaciji s 4%-tnim pektinom, koncentracija alginata je također bila 4%, a nosači su pripremljeni u omjerima 80:20, 70:30 i 60:40. Otopine nosača su pripravljene otapanjem određene mase nosača u ekstraktu ljuske

crvenog luka, skupljenom tijekom provedbe ekstrakcija te pomiješane u određenim omjerima. Nakon miješanja na magnetskoj miješalici dobiveni su slijedeći sustavi, koji su se koristili u svim slijedećim koracima ovoga rada:

- a) Čisti alginat: A
- b) Alginat+pektin: AP_80:20
- c) Alginat+pektin: AP_70:30
- d) Alginat+pektin: AP_60:40

Otapanjem kalcijevog klorida u ekstraktu ljuske crvenog luka pripravljene su 3%-tne otopine za inkapsulaciju ionskim geliranjem. Za ukapavanje sustava nosača u otopinu kalcijevog klorida korištene su plastične šprice i igle 27 G (0,4 x 13 mm). Postupak inkapsulacije se provodio ukapavanjem nosača u 3%-tnu otopinu kalcijeva klorida, uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici, pri čemu je došlo do formiranja čestica sferičnog oblika. Nakon ukapavanja, čestice su ostavljene u gelirajućem mediju te miješane tijekom 30 minuta. Po završetku miješanja čestice su procijeđene i uklonjene iz otopine kalcijevog klorida, isprane sa ekstraktom te spremljene u epruvete s ekstraktom u hladnjak.

3.2.6. Karakterizacija formuliranih čestica

3.2.6.1. Određivanje udjela vode (suhe tvari)

Udjel vode, tj. suhe tvari određene je sušenjem do konstantne mase na 105 °C (prema modificiranoj AOAC 930.15 (1990b metodi) tijekom 3 sata.

Postupak rada:

U prethodno, do konstantne mase, osušene ohlađene i izvagane aluminijske posudice s kvarcnim pijeskom i poklopcem, odvagano je 0,3 g ($\pm 0,0001$) formiranih čestica. Posudica s uzorkom i poklopac suše se oko 3 sata u sušioniku pri 105 °C. Nakon sušenja, aluminijska posudica s uzorkom pokrije se poklopcem dok je u sušioniku te se prebaci u eksikator. Potom se hladi na sobnoj temperaturi te ohlađena važe na analitičkoj vagi.

Udjel vode izračuna se prema formuli:

$$\% \text{ vode} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} * 100$$

gdje su:

m₁ – masa prazne aluminijske posudice (g)

m₂ – masa aluminijske posudice s uzorkom prije sušenja (g)

m₃ – masa aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

Udjel suhe tvari računa kao razlika udjela vode od 100 % prema formuli:

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

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

3.2.6.2. Određivanje veličine formuliranih čestica

Veličina formuliranih čestica određena je snimanjem čestica (n=10) mobilnom kamerom na Dino-Lite kalibracijskoj pločici (minimalni razmak=0,2 mm) te je očitana veličina čestica. Napravljeno je deset uzastopnih mjerenja, a rezultati su prikazani kao njihova srednja vrijednost.

3.2.6.3. Određivanje boje formuliranih čestica

Određivanje boje uzoraka provedeno je difuzno reflektirajućom spektrofotometrijom na kolorimetru (Konica Minolta, Sensing, CM – 700d, CM – A177, Japan). Dobivena je reflektancija uzoraka u čitavom području vidljivog spektra te L*, a* i b* vrijednosti. Nelinearni odnosi za L*, a* i b* vrijednosti imitiraju logaritamski odgovor ljudskog oka. Ljudsko oko ima receptore za kratke (S), srednje (M) i duge (L) valne duljine koji su poznati kao plavi, zeleni i crveni receptori. L* vrijednost je osvjetljenje ili svjetlosna komponenta, koja ima vrijednosti u rasponu 1-100, dok su a* (od zelene do crvene) i b* (od plave do žute) dvije kromatske vrijednosti u rasponu od -120 do 120 (Gökmen i Sügüt, 2007). Inkapsulirane čestice dobiven ionskim geliranjem raspoređene su u Petrijevu zdjelicu promjera 50 mm, tako da je u potpunosti prekriveno dno posudice te je uzorak raspoređen u jednom sloju. Područje mjerenja podešeno je na 400 do 700 nm, tj. u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra.

Kontrola mjerenja provedena je korištenjem računalne aplikacije SpectraMagic NX. Sva mjerenja izvršena su u SCI (eng. „Specular Component Included“) On predstavlja način mjerenja boje uzorka pri kojemu se uračunavaju sjene, tj. uzorak se prikazuje onako kako ga vidi ljudsko oko (Gökmen i Sügüt, 2007). Na temelju rezultata mjerenja, ukupna promjena boje (ΔE^*) izračunata je prema formuli:

$$\Delta E^* = \sqrt{((L^* - L_{ref}^*)^2 + (a^* - a_{ref}^*)^2 + (b^* - b_{ref}^*)^2)}$$

gdje su:

ΔE^* - promjena boje ispitivanih uzoraka u odnosu na referentni

L^* - svjetlina boje ispitivanog uzorka u $L^*a^*b^*$ sustavu

a^* - parametar boje ispitivanog uzorka (crveno)

b^* - parametar boje ispitivanog uzorka (žuto)

L^*_{ref} - svjetlina boje referentnog uzorka

a^*_{ref} - parametar boje referentnog uzorka

b^*_{ref} - parametar boje referentnog uzorka

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost 3 mjerenja ($n=3$) s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.6.4. Određivanje mehaničkih svojstava formuliranih čestica

Određivanje mehaničkih svojstava provedeno je na TA.HDPlus analizatoru teksture (Stable Micro Systems, Velika Britanija), opremljenom s utegom od 5 kg. Analize su provedene na sobnoj temperaturi na pet različitih čestice svakog sustava. U svrhu postizanja maksimalnog omjera kompresije i smicanja, za probijanje uzoraka korištena je cilindrična čelična sonda P/2 (Stable Micro Systems, Velika Britanija) s ravnim dnom, uz brzinu prodiranja od 0,5 mm/s.

Dobiveni dijagrami obrađeni su u Texture Exponent programu (Stable Micro Systems, Velika Britanija), nakon čega su izračunate vrijednosti za ispitivane parametre teksture (tvrdoća elastičnost). Tvrdoća uzorka izražena je kroz maksimalnu silu (N) potrebnu za kompresiju uzoraka. Maksimalna udaljenost sonde prilikom probijanja uzorka ispod krivulje (sile) koristi za računanje elastičnosti (mm). Elastičnost je izražena na 50% vrijednosti očitane za tvrdoću.

3.2.6.5. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta

Udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet, određeni su otapanjem poznate količine profiltriranih čestica u 2%-tnoj otopini natrijevog citrata, uz snažno miješanje na vibrirajućem mikseru. Udjel ukupnih polifenola u otopini razbijenih čestica određen je primjenom Folin-Ciocalteu reagensa što je opisano u poglavlju 3.2.2.1., a određivanje antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS i DPPH metode opisano u poglavljima 3.2.2.2. i 3.2.2.3.

Tako pripremljene otopine razbijenih čestica korištene su i za određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva primjenom HPLC analize.

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

Otpuštanje ukupnih polifenolnih spojeva, kvercetina i antioksidacijskog kapaciteta iz dobivenih čestica praćeno je u simuliranim gastričnim (SGF) i intestinalnim (SIF) fluidima praćeno je određivanjem udjela ukupnih polifenola, kvercetina i antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS i DPPH metoda (opisano u poglavljima 3.2.2.1., 3.2.2.2., 3.2.2.3.). SGF se sastoji od natrijevog klorida i klorovodične kiseline (pH=1,2), dok SIF predstavlja fosfatni pufer (pH=7,4). Formulirane čestice izdvojene su iz otopine za geliranje te je približno 0,60 g profiltriranih čestica suspendirano u 30 mL SGF-a. Čestice u SGF-u konstanto su miješane na magnetskoj miješalici (podešenoj na 100 rpm), na temperaturi od 37 °C. U točno definiranim vremenskim razmacima iz otopine je izuzimano 2 mL tekućeg medija do posljednjeg izuzimanja nakon 2 h te je nakon svakog izuzimanja u otopinu s česticama dodan alikvot od 2 mL SGF-a. Čestice su zatim filtriranjem uklonjene iz otopine SGF-a i prenesene u 30 mL SIF-a, zagrijanog na 37 °C te ponovno konstantno miješane na magnetskoj miješalici pri istoj brzini kao za SGF. Uzorkovanje alikvota tekućeg medija provedeno je u određenim vremenskim razmacima na već opisani način za SGF. Dobivenim alikvotima od 2 mL određen je udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata galne kiseline/g čestica, mg kvercetina /g čestica ili mmol Trolox-a/g čestica. Na temelju dobivenih rezultata određena je kinetika otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovoga rada bio je ispitati potencijal ljuske crvenog luka (LJCL) kao izvor pektina i kvercetina koji pronalaze široku primjenu u prehrambenoj industriji, posebice razvoju polisaharidnih sustava i kreiranju inovativnih proizvoda. LJCL predstavlja veliki problem kao otpad u prehrambenoj industriji, stoga je pronalazak rješenja za smanjenje količine ove vrste agro-otpada važan s ekonomskog i ekološkog aspekta. Kako bi ispitali ranije navedeni potencijal ljuske crvenog luka provedene su dvije vrste pripreme polifenolnog ekstrakta te je ekstrahirano i pektin, nakon čega je provedena njegova karakterizacija i formiranje njegovih sustava.

4.1. KARAKTERIZACIJA POLIFENOLNOG EKSTRAKTA

4.1.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta

Polifenolnom ekstraktu pripremljenom ultrazvučnom metodom određen je udjel ukupnih polifenola te antioksidacijski kapacitet pomoću ABTS i DPPH metode. Dobiveni rezultati prikazani u Tablici 10 pokazuju kako je udjel ukupnih polifenola najveći kod ekstrakta pripremljenog UZV metodom ($49,34 \pm 4,21$ mg EGK-a/g uzorka). Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta su gotovo jednake kada je korištena konvencionalna metoda, za obje vrste metode, dok se više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta zabilježene kada je korištena ultrazvučna kupelj.

Tablica 10. Udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet u ekstraktu ljuske crvenog luka

UZORAK	UP mg EGK-a/g uzorka	ABTS mmol Trolox/g čestica	DPPH
KON 20 °C	$25,10 \pm 1,55$	$0,07 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,00$
KON 80 °C	$36,13 \pm 3,21$	$0,09 \pm 0,12$	$0,06 \pm 0,01$
UZV	$49,34 \pm 4,21$	$0,20 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,01$

4.1.2. Određivanje pojedinačnih polifenola primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Budući da su rezultati spektrofotometrijski određenih ukupnih polifenola ljuske crvenog luka i antioksidacijskih kapaciteta pokazali da ekstrakcija ultrazvučnom kupelji ima najbolje rezultate određen je i udjel polifenola u ekstraktu ljuske crvenog luka dobivenog istom metodom, a rezultatu su prikazani u Tablici 11. Među identificiranim polifenolima najveći je udjel kvercetina ($1,56 \pm 0,01$ mg/g uzorka) i derivata kvercetina ($8,28 \pm 0,04$ mg/g uzorka), dok je namanji udjel hidroksibenzojeve kiseline ($0,01 \pm 0,00$ mg/g uzorka).

Tablica 11. Udjel polifenola u ekstraktu ljuske crvenog luka dobivenom ultrazvučnom ekstrakcijom

Bioaktivna komponenta	Udjel (mg spoja/g uzorka)
Protokatehinska kiselina	$0,91 \pm 0,00$
Hidroksibenzojeva kiselina	$0,01 \pm 0,00$
Vanilinska kiselina	$0,02 \pm 0,00$
Kvercetin-3-glikozid	$0,09 \pm 0,00$
Kvercetin	$1,56 \pm 0,01$
Derivati kvercetina	$8,28 \pm 0,04$
Luteolin	$0,04 \pm 0,00$

4.2. KARAKTERIZACIJA PEKTINA

Karakterizacija pektina provedena je određivanjem slijedećih karakteristika: ekvivalentna masa, stupanj esterifikacije, udio galakturonske kiseline te pH vrijednost. Određivana su upravo ova svojstva pektina, budući da ona utječu na svojstva geliranja i zgušnjavanja te stabilizaciju pektina (Wang i sur., 2016). Dobiveni rezultati (Tablica 12) pokazuju kako se, prema stupnju esterifikacije, radi o visoko metilirajućem pektinu zbog čega u prisustvu Ca^{2+} iona neće gelirati tako dobro kao što je slučaj kod nisko metilirajućih pektina. Ova vrijednost je važna za daljnju provedbu rada i usklađivanje ostalih parametara važnih za inkapsulaciju. Budući da je DE pektina ljuske crvenog luka iznosio 53,81% svojstva geliranja su bila

izrazito slaba te je isti kombiniran s alginatom pri čemu je maksimalni udio pektina od 40% rezultirao zadovoljavajućim česticama.

Tablica 12. Karakterizacija pektina

Karakteristika	Vrijednost
DE (%)	53,81 ± 1,24
EW (g/mol)	741,04 ± 14,42
% GalUA	58,21 ± 0,54
Ph	3,18 ± 0.00

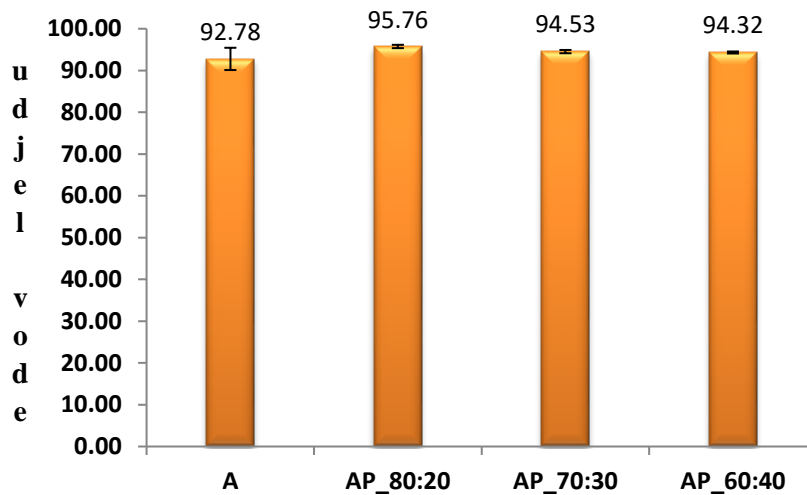
4.3. KARAKTERIZACIJA FORMULIRANIH ČESTICA

4.3.1. Fizikalno-kemijska svojstva čestica

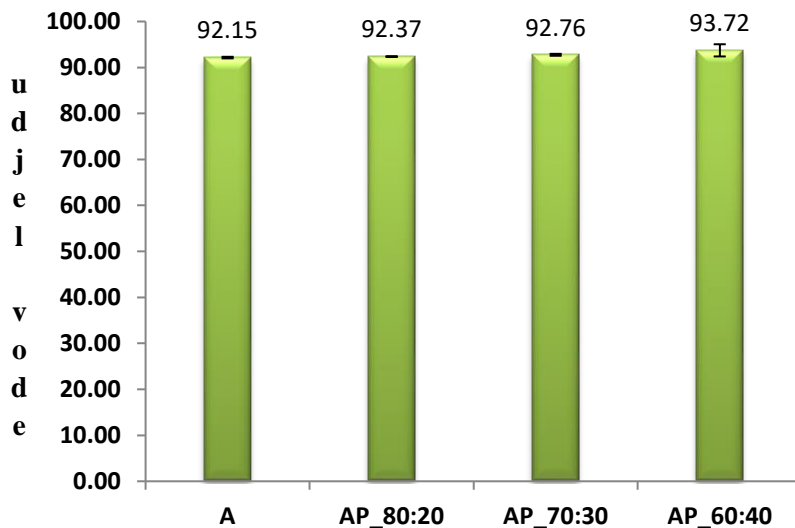
Od fizikalno-kemijskih svojstava formuliranih čestica ispitivani su udio vode prikazan na grafovima 1. i 2., veličina, tvrdoća i elastičnost prikazane u tablici 1. te boja formuliranih čestica prikazana u tablici 2.

4.3.1.1. Određivanje udjela vode u inkapsuliranim česticama

Grafički prikaz udjela vode inkapsuliranih čestica ekstrakta pripremljenog konvencionalnom metodom (Slika 8) pokazuje najveći udio vode kod čestica koje su formulirane pomoću sustava nosača AP_80:20 (95,76%), zatim slijede AP_70:30 (94,53%) i AP_60:40 (94,32%), dok je najmanji udio vode zabilježen kod čestica gdje je sustav nosača bio čisti alginat (92,78%). Sukladno udjelima vode, udio suhe tvari bio je najveći za čisti alginat, dok kod svih omjera alginata i pektina, taj udio je bio znatno manji (4,24-5,68%), a najmanja vrijednost određena za sustav AP_80:20 (4,24%). Na temelju rezultata dobivenih primjenom konvencionalne metode može se zaključiti kako smanjenjem udjela alginata u sustavima nosača AP dolazi do povećanja udjela suhe tvari, a time do smanjenja udjela vode.



Slika 8. Udjel (%) vode u inkapsuliranim česticama ekstrakta ljuske crvenog pripravljenoj KON metodom



Slika 9. Udjel (%) vode u inkapsuliranim česticama ekstrakta ljuske crvenog luka pripravljenoj UZV metodom

Rezultati dobiveni za inkapsulirane čestice ekstrakta pripravljenoj UZV metodom (Slika 9) pokazuju kako smanjenjem udjela alginata u sustavu nosača dolazi do porasta udjela vode, a smanjenja udjela suhe tvari. Tako je udio vode najveći kod sustava nosača AP_60:40 (93,72%), zatim AP_70:30 (92,76%), AP_80:20 (92,37%), a najmanji za sustav nosača A(92,15%). Uspoređujući obje metode može se zaključiti kako je u oba slučaja udio vode formuliranih čestica visok (92-96%).

4.3.1.2. Boja inkapsuliranih čestica

Tablica 13. Parametri boje inkapsuliranih čestica u ekstraktu pripremljenom KON i UZV metodom

nosač	KON			
	L*	a*	b*	ΔE
A	30,24 ± 0,06	17,89 ± 0,15	24,61 ± 0,08	/
AP_80:20	27,81 ± 0,04	14,47 ± 0,08	20,64 ± 0,06	5,66 ± 0,20
AP_70:30	24,30 ± 0,14	9,75 ± 0,23	15,06 ± 0,39	13,89 ± 0,55
AP_60:40	22,86 ± 0,11	9,11 ± 0,17	13,99 ± 0,21	15,70 ± 0,21
nosač	UZV			
	L*	a*	b*	ΔE
A	32,87 ± 0,07	15,74 ± 0,02	23,30 ± 0,11	/
AP_80:20	28,16 ± 0,09	13,50 ± 0,02	17,39 ± 0,16	7,88 ± 0,23
AP_70:30	26,36 ± 0,09	12,31 ± 0,07	15,82 ± 0,26	10,49 ± 0,22
AP_60:40	24,67 ± 0,09	11,99 ± 0,08	16,86 ± 0,24	11,09 ± 0,13

Boja hrane uz okus i miris predstavlja jednu od glavnih senzorskih komponenti (Spence, 2015). Upravo zbog ovog razloga izmjereni su parametri boje formuliranim česticama za obje vrste ekstrakta. Parametri boje izmjereni su u SCI (eng. „Specular Component Included“) modu, s to su vrijednosti L* (svjetlina), a* (parametar boje ispitivanog uzorka – crveno) i b* (parametar boje ispitivanog uzorka – žuto). Za sve sustave nosača AP izračunata je i ukupna promjena boje ΔE, u odnosu na referentnu vrijednost koja je u ovom slučaju bio čisti alginat (A). Ukupna promjena boje izračunata je prema formuli navedenoj u poglavlju 3.2.6.3. Tablica 13 donosi rezultate provedenog mjerenja. Kod primjene KON ekstrakta najsvjetlije (L*) su čestice pripremljene s čistim alginatom (30,24 ± 0,06), potom ih slijede AP_80:20 (27,81 ± 0,04), AP_70:30 (24,30 ± 0,14) te AP_60:40 (22,86 ± 0,11). Isti trend je zabilježen i kod UZV ekstrakta, no dobivene vrijednosti su bile nešto veće nego kod KON. Najsvjetliji uzorak je također bio čisti alginat (32,87 ± 0,07), zatim AP_80:20 (28,16 ± 0,09), AP_70:30 (26,36 ± 0,09), a najtamniji je bio AP_60:40 (24,67 ± 0,09). Iz navedenih rezultata može se zaključiti kako se smanjenjem udjela alginata smanjuje i svjetlina čestica, tj. one postaju tamnije. Vrijednosti a* i b* govore o jačini izraženosti crvenoga (a*) i žutoga (b*) obojenja. Kod KON ekstrakta najjače izraženo crveno obojenje, tj. najveća a* vrijednost, zabilježena je kod čestica formuliranih čistim alginatom (17,89 ± 0,15), kao i najjače izraženo žuto obojenje, najveća b* vrijednost (24,61 ± 0,08). Rezultati kada je primijenjena UZV ekstrakt pokazao je isto: najjače izraženo crveno obojenje zabilježeno je kod čestica formuliranih čistim alginatom (15,74 ± 0,02), kao i najjače izraženo žuto obojenje (23,30 ± 0,11), ali su

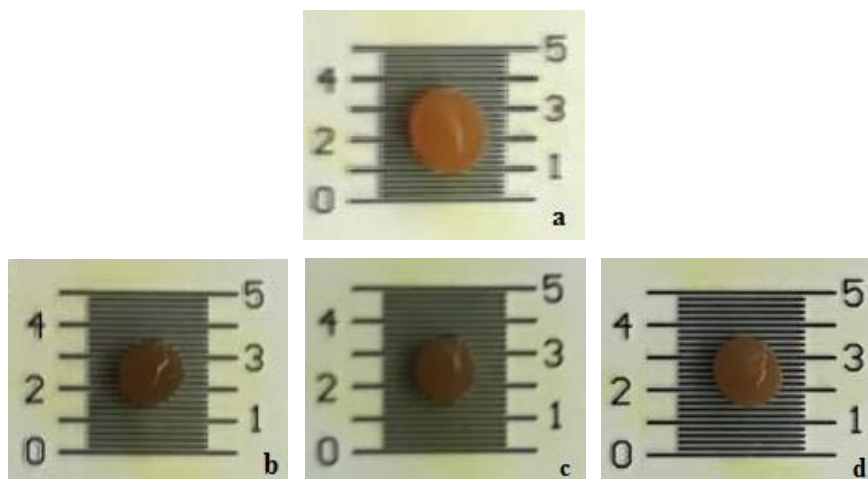
vrijednosti nešto niže nego kod KON ekstrakta. Promjena boje čestica (ΔE) izračunata je u odnosu na parametre boje čistog alginata. Tako je kod KON ekstrakta najveća promjena boje zabilježena za AP_60:40 ($15,70 \pm 0,21$), potom AP_70:30 ($13,89 \pm 0,55$), a najmanja za AP_80:20 ($5,66 \pm 0,20$). Promjena boje kod UZV metode prati isti trend, te je najveća za AP_60:40 ($11,09 \pm 0,13$), potom AP_70:30 ($10,49 \pm 0,22$) te najmanja za AP_80:20 ($7,88 \pm 0,23$).

4.3.1.3. Određivanje veličine i mehaničkih svojstava inkapsuliranih čestica

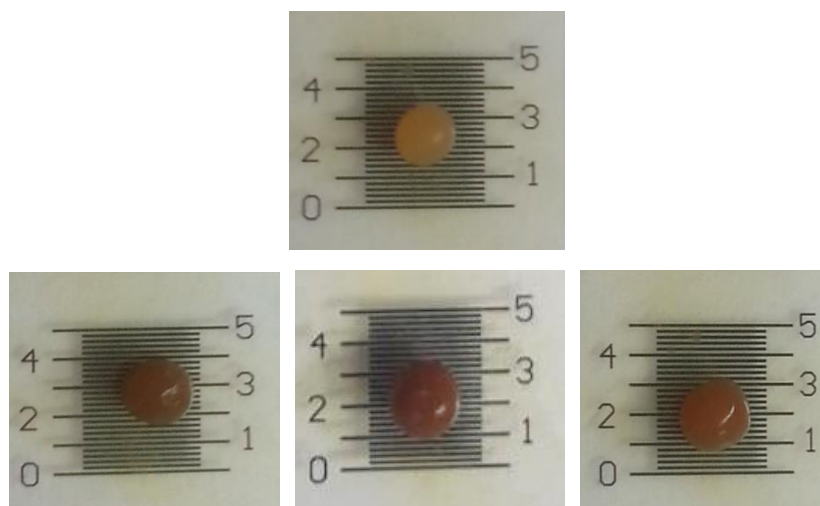
Tablica 14. Veličina i mehanička svojstva inkapsuliranih čestica u ekstraktu pripremljenom KON i UZV metodom

nosač	KON		
	Veličina [mm]	Tvrdoća [N]	Elastičnost [mm]
A	$2,48 \pm 0,24$	$0,19 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,02$
AP_80:20	$2,40 \pm 0,22$	$0,16 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,01$
AP_70:30	$2,18 \pm 0,17$	$0,08 \pm 0,00$	$0,15 \pm 0,02$
AP_60:40	$2,34 \pm 0,16$	$0,04 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$
nosač	UZV		
	Veličina [mm]	Tvrdoća [N]	Elastičnost [mm]
A	$2,34 \pm 0,18$	$0,18 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,02$
AP_80:20	$2,48 \pm 0,10$	$0,18 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$
AP_70:30	$2,40 \pm 0,13$	$0,16 \pm 0,02$	$0,29 \pm 0,01$
AP_60:40	$2,36 \pm 0,17$	$0,07 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,05$

Tablica 14. prikazuje utjecaj različitih metoda pripreme ekstrakta i koncentracije alginata i pektina na veličinu, tvrdoću i elastičnost dobivenih čestica. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako se veličina čestica, u pravilu, s povećavanjem udjela alginata, a smanjenjem pektina, kod obje vrste ekstrakta povećava. Kod KON metode najveći promjer čestica zabilježen je kod čestica formuliranih od čistog alginata ($2,48 \pm 0,24$ mm), a najmanji za nosač AP_70:30 ($2,18 \pm 0,17$ mm). Posljednji rezultat zapravo odstupa od ovoga trenda porasta, odnosno smanjenja promjera te je zabilježena manja veličina čestica od očekivane. Najveći promjer čestica kod UZV metode zabilježen je za sustav AP_80:20 ($2,48 \pm 0,10$ mm), a najmanji za čisti alginat ($2,34 \pm 0,18$ mm). Dobiveni rezultati za KON metodu u skladu su s istraživanjem Belščak-Cvitanović i suradnika (2015) gdje se pokazalo kako čestice koje formulirane s alginatom u kombinaciji s pektinom, kitozanom i karagenanom, u odnosu na čestice formulirane čistim alginatom, imaju manji promjer. Prikazi inkapsuliranih čestica ekstrakta pripremljenog KON i UZV metodama nalaze se na Slikama 10 i 11.



Slika 10. Prikazi inkapsuliranih čestica ekstrakta pripremljenog KON metodom na kalibracijskoj pločici: a-A; b-AP_60:40; c-AP_70:30; d-AP_80:20



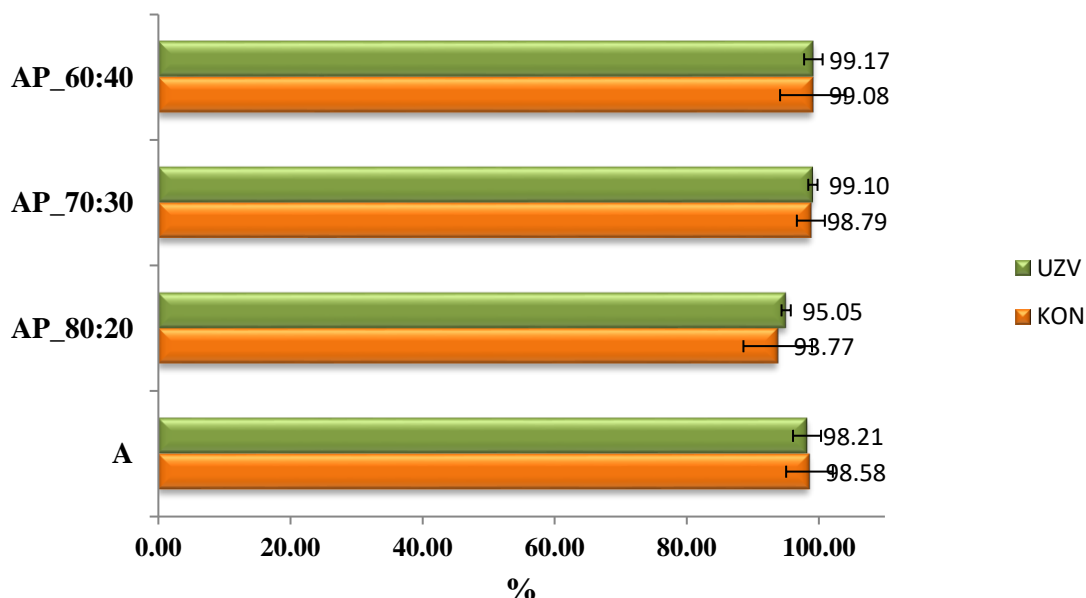
Slika 11. Prikazi inkapsuliranih čestica ekstrakta pripremljenog UZV metodom na kalibracijskoj pločici: a-A; b-AP_60:40; c-AP_70:30; d-AP_80:20

Smanjenjem koncentracije alginata u formuliranim česticama dolazi do smanjenja srednje vrijednosti tvrdoće samih čestica. Ovaj trend ja zabilježen za obje vrste ekstrakcije. Rezultati dobiveni za KON metodu pokazuju kako je za čestice formulirane pomoću čistog alginata bilo potrebno uložiti najviše sile (N) za kompresiju čestice ($0,19 \pm 0,01$ N), a najmanje za AP_60:40 ($0,04 \pm 0,01$ N). Kada je korištena UZV metoda formulirane čestice za koje je upotrjebljena najviša sila su A i AP_80:20 ($0,18 \pm 0,03$ i $0,18 \pm 0,01$ N), a najmanje za AP_60:40 ($0,07 \pm 0,01$ N). Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti kako kombiniranjem alginata s pektinom nije došlo do povećanja tvrdoće čestica u odnosu na one

koje su formulirane pomoću čistoga alginata te da je promjena u tvrdoći čestica formuliranih pri različitim koncentracijama alginata manja kada su iste pripravljene UZV metodom. Kada se uspoređi elastičnost formuliranih čestica vidljivo je kako se smanjenjem koncentracije alginata smanjuje i elastičnost čestica s KON pripremljenim ekstraktom. Tako su najviše elastične čestice formulirane čistim alginatom ($0,30 \pm 0,02$ mm), a najmanje čestice sustava AP_60:40 ($0,13 \pm 0,01$ mm). Kod UZV metode elastičnost je gotovo ista za tri sustava A ($0,29 \pm 0,02$ mm), AP_80:20 ($0,30 \pm 0,01$ mm) i AP_70:30 ($0,29 \pm 0,01$ mm), dok je značajno manja za AP_60:40 ($0,11 \pm 0,05$ mm). Ovi rezultati pokazuju kako ova metoda pripreme ekstrakta nema značajniji utjecaj na promjenu elastičnosti formuliranih čestica, u odnosu na KON metodu gdje je promjena elastičnosti čestica, s promjenom udjela alginata i pektina, značajnija.

4.3.2. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta

4.3.2.1. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije ukupnih polifenola

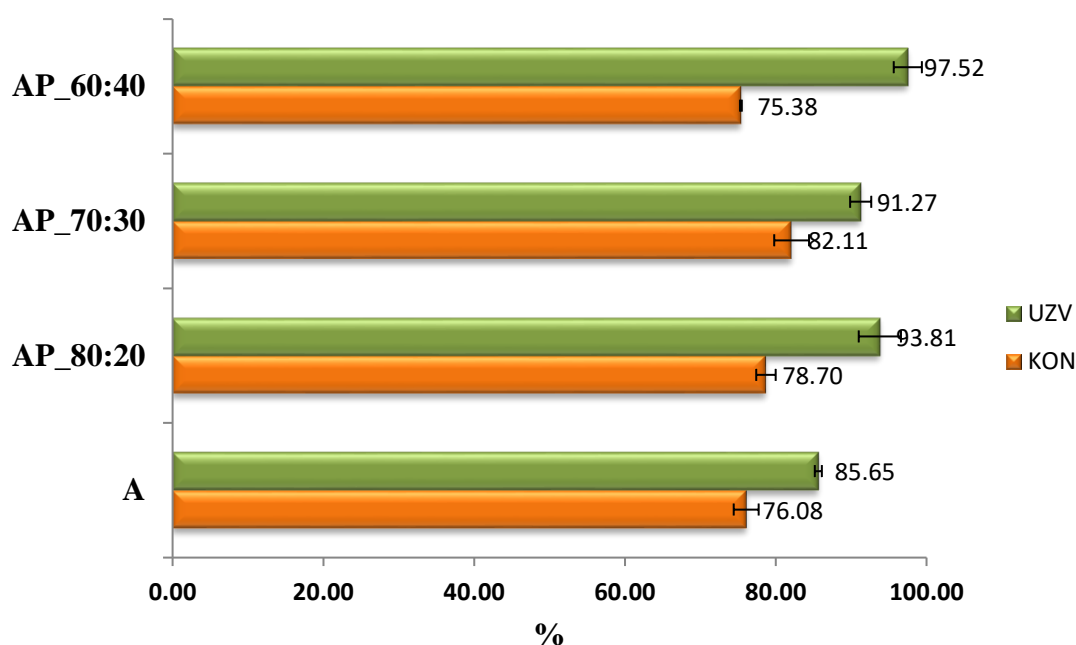


Slika 12. Učinkovitost inkapsulacije (%) ukupnih polifenola u razbijenim hidrogel česticama

Slika 12. prikazuje učinkovitosti ukupnih polifenola u česticama formuliranim s različitim sustavima nosača i ekstrakta ljuske crvenog luka pripremljenima pomoću dvije metode. Iz

grafičkog prikaza može se zaključiti kako je učinkovitost korištenih sustava, za obje metode, na bazi kombinacije alginata i pektina visoka. Kod KON ekstrakta najveća učinkovitost zabilježena je za čestice sustava AP_60:40 (99,08%), potom AP_70:30 (98,79%) i A (98,58%), dok je za čestice sustava AP_80:20 (93,77%) izmjerena najmanja učinkovitost ukupnih polifenola. Učinkovitost inkapsulacije je kod UZV ekstrakta bila veća u odnosu na KON ekstrakte. Najveću inkapsulacijsku učinkovitost pokazao je sustav AP_60:40 (99,17%), nakon čega slijede AP_70:30 (99,1%) i A (98,21%), a učinkovitost sustava AP_80:20 (93,77%) bila je nešto manja.

4.3.2.2. Određivanje učinkovitosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

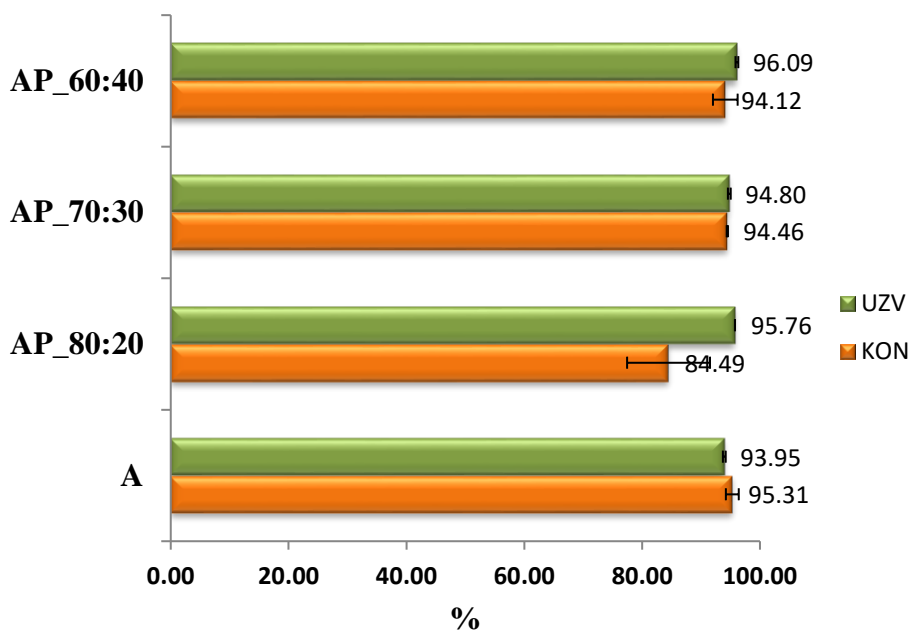


Slika 13. Učinkovitost zadržavanja (%) antioksidacijskog kapaciteta u razbijenim hidrogel česticama određena ABTS metodom

Iz dobivenih rezultata za učinkovitost zadržavanja (Slika 13) može se zaključiti kako se radi o visoko učinkovitim sustavima. U slučaju KON metode najveća učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta određena je za sustav AP_70:30 (82,11%), potom slijede AP_80:20 (78,70%) i A (76,08%) dok se najmanje učinkovitim pokazao sustav AP_60:40 (75,38%). Kod UZV ekstrakta rezultati učinkovitosti ne prate trend kao kod KON ekstrakta, već su zapravo i suprotni. Tako se najučinkovitijim pokazao sustav AP_60:40 (97,52%),

zatim ga slijede AP_80:20 (93,81%) i AP_70:30 (91,27%) te čisti alginat (85,65%), kao sustav s najmanjom učinkovitošću zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta.

4.3.2.3. Određivanje učinkovitosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

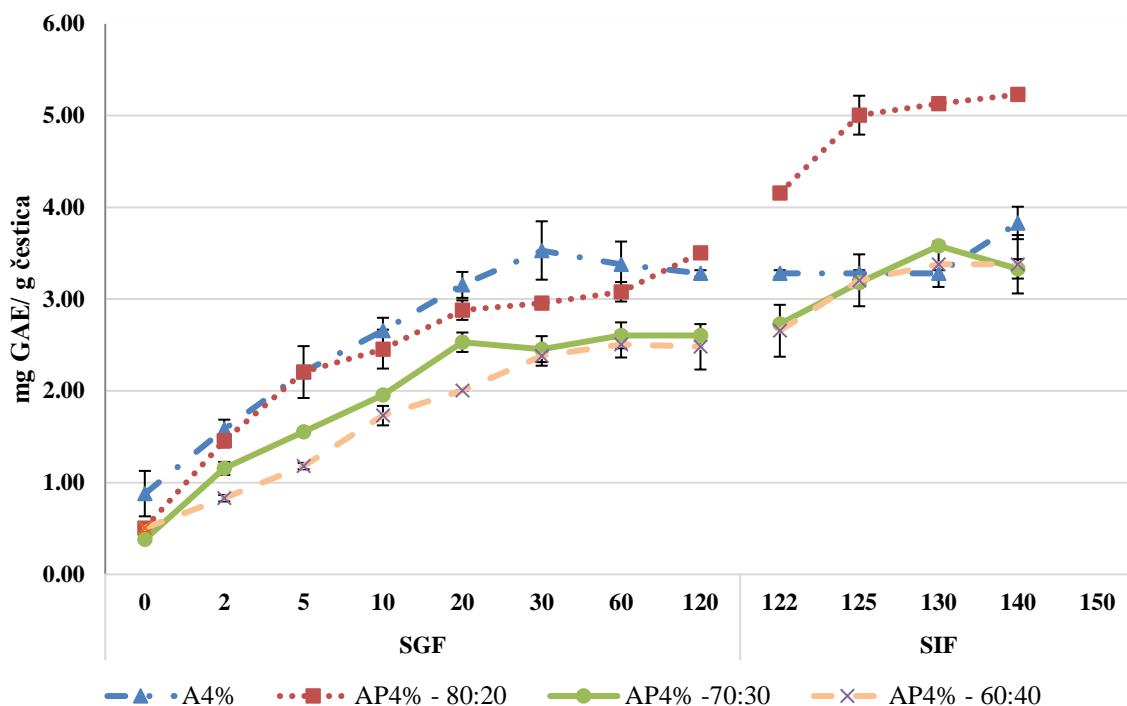


Slika 14. Učinkovitost zadržavanja (%) antioksidacijskog kapaciteta u razbijenim hidrogel česticama određena DPPH metodom

Uz ABTS, određivanje učinkovitosti antioksidacijskog kapaciteta u formuliranim hidrogel česticama određeno je i DPPH metodom, a dobiveni rezultati prikazani su na Slici 14. Rezultati pokazuju kako nema značajne razlike u učinkovitosti ovisno o metodi pripreme ekstrakta, te su dobivene vrijednosti gotovo jednake za sve vrste sustava čestica, ali s visokom učinkovitošću zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta. Značajnija razlika u rezultatima ovisno o metodi ekstrakcije zabilježena je jedino za sustav AP_80:20. Najveća učinkovitost kod KON metode zabilježena je za sustav čistog alginata (95,31%), zatim za AP_70:30 (94,46%) i AP_60:40 (94,11%), a najmanja za sustav AP_80:20 (84,49%). Za čestice s UZV ekstraktom najučinkovitiji je sustav AP_60:40 (96,09%), potom A (93,95%), AP_80:20 (95,76%), a najmanju učinkovitost imao je sustav AP_70:30 (94,77%).

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

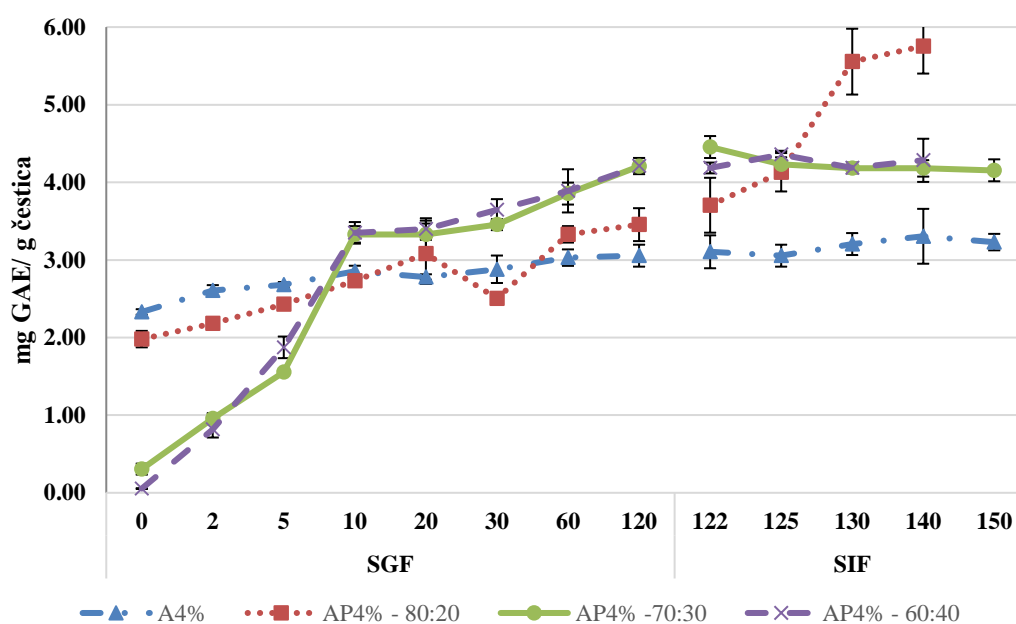
4.3.3.1. Praćenje otpuštanja ukupnih polifenola u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima



Slika 15. Kinetika otpuštanja ukupnih polifenola (mg GAE/g čestica) iz razbijenih hidrogel čestica u SGF i SIF fluidima s KON ekstraktom

Slika 15. prikazuje kinetiku otpuštanja ukupnih polifenola u simuliranim gastičnim (SGF) i intestinalnim (SIF) uvjetima u slučaju kada je korišten KON ekstrakt. Iz rezultata je vidljivo kako postoji povezanost udjela alginata i pektina u formuliranim česticama s otpuštanjem ukupnih polifenola, odnosno što je veća koncentracija alginata u formuliranim česticama to je otpuštanje ukupnih polifenola sporije. Navedeni trend može se primijeniti na čestice izložene SGF fluidu. Otpuštanje ukupnih polifenola iz sustava AP_60:40 odvijalo se kontinuirano tijekom 130 minuta, nakon čega je došlo do uspostavljanja ravnoteže u SIF fluidu. Otpuštanje iz ovih čestica je bilo brže u odnosu na ostale sustave čestica. Kontinuirano otpuštanje čestica tijekom prvih 20 minuta zabilježeno je za sustav AP_70:30, nakon čega je došlo do blagog pada koncentracije ekvivalenta GAE/g čestica, a potom do uspostavljanja ravnoteže u 60-toj minuti. Za čestice sustava čistog alginata i AP_80:20 u prvih 10 minuta došlo je do otpuštanja oko 50% količine ukupnih polifenola, dok je ista količina za sustave AP_70:30 i AP_60:40

postignuta tek tijekom izlaganja u SIF fluidu, odnosno otpuštanje ukupnih polifenola iz posljednja dva navedena sustava bilo je sporije. Nakon izlaganja SIF fluidu ponovno dolazi do kontinuiranog otpuštanja polifenola od 122. do 140. minute, a potom do pada koncentracije ekvivalenta GAE/ g čestica. Za sustav AP_80:20 otpuštanje polifenola bilo je kontinuirano kroz cijelo vrijeme izlaganja SGF i SIF fluid, uz dobivanje najvećeg udjela polifenola u SIF-u. Otpuštanje ukupnih polifenola iz A bilo je kontinuirano u prvih 30 minuta izlaganja čestica SGF fluidu, nakon čega je došlo do pada koncentracije ekvivalenta GAE/g čestica. Potom je došlo do uspostavljanja ravnotežnog stanja u SIF fluidu, sve do 120-te minute, nakon čega ponovno dolazi do porasta koncentracije ekvivalenta GAE/g čestica.

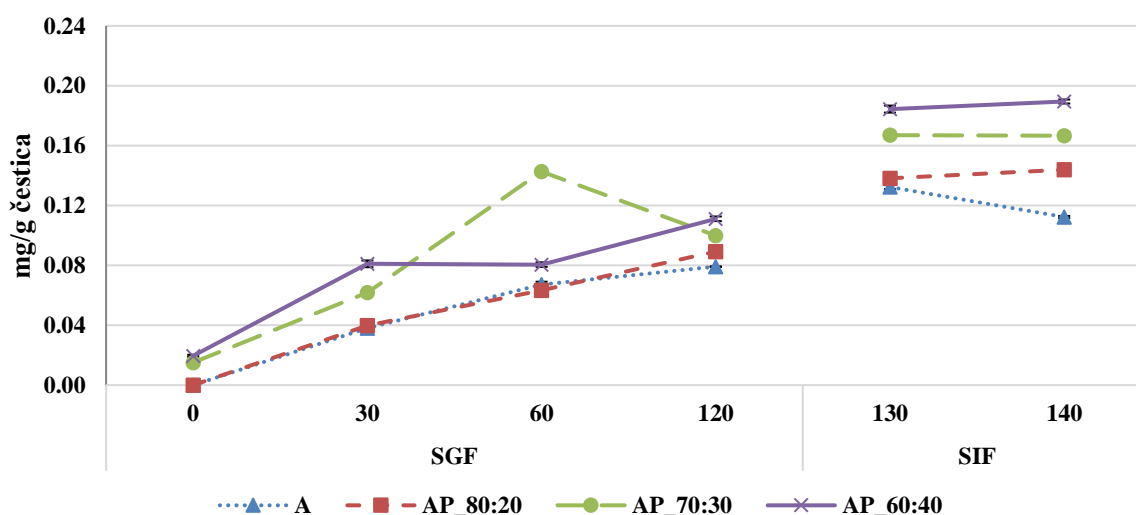


Slika 16. Kinetika otpuštanja ukupnih polifenola (mg GAE/g čestica) iz razbijenih hidrogel čestica u SGF i SIF fluidima s UZV ekstraktom

Kinetika otpuštanja ukupnih polifenola iz formuliranih čestica s UZV ekstraktom u SGF i SIF fluidima prikazana je na Slici 16. Kao i kod KON ekstrakta, i kod UZV ekstrakta postoji povezanost udjela alginata u česticama s otpuštanjem ukupnih polifenola iz istih. Otpuštanje ukupnih polifenola iz čestica sustava AP_70:30 i AP_60:40 gotovo je jednako. Tijekom cijelog izlaganja ekstrakta SGF fluidu dolazi do kontinuiranog otpuštanja polifenola nakon čega u SIF fluidu za AP_70:30 dolazi do smanjenja otpuštanja polifenola i uspostavljanja ravnoteže u 130-toj minuti. Izlaganjem čestica sustava AP_60:40 SIF fluidu u prve tri minute dolazi do porasta, a slijedećih pet do smanjenja koncentracije polifenola nakon čega posljedično uspostavlja i ravnotežu u SIF fluidu. Sustav AP_80:20 pokazuje kontinuirano

otpuštanje ukupnih polifenola tijekom prvih 20 minuta, nakon čega 30-te minute dolazi do smanjenog otpuštanja. Kontinuirano otpuštanje nastavljeno je od 30-te minute u SGF fluidu te se nastavilo tijekom čitavog vremena izlaganja SIF fluidu. Ovaj sustav, kao i kod KON ekstrakta, tijekom izloženosti SIF fluidu, pokazuje najsporije otpuštanje od 125-te minute. Rezultati pokazuju kako je za sustav čistog alginata najsporije otpuštanje u prvih pet minuta, međutim tijekom izlaganja SGF i SIF fluidu je bilo kontinuirano uz minimalne promjene koncentracije ekvivalenta GAE/g čestica. Kod UZV ekstrakta 50% otpuštene količine ukupnih polifenola gotovo je jednako za sve sustave čestica, s naglaskom na povećanje otpuštanja ukupnih polifenola za sustave AP_70:30 i AP_60:40, što nije bio slučaj za sustav s KON ekstraktom.

4.3.3.2. Praćenje otpuštanja kvercetina u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima

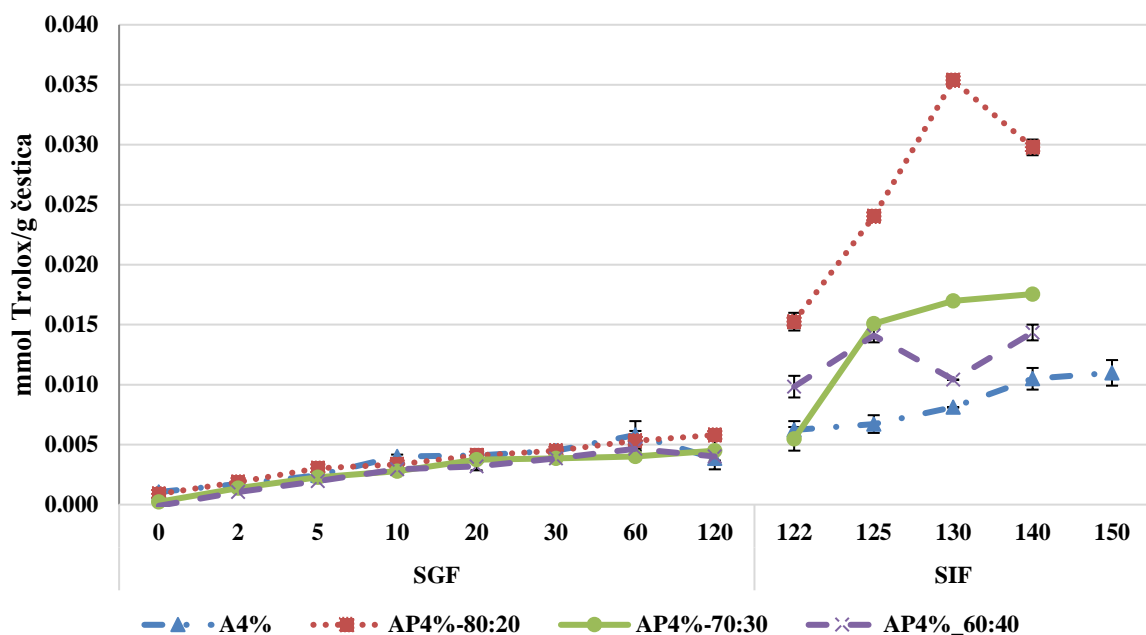


Slika 17. Kinetika otpuštanja kvercetina (mg /g čestica) iz razbijenih hidrogel čestica u SGF i SIF fluidima s UZV ekstraktom

U ovome radu uz kinetiku otpuštanja ukupnih plifenola praćena je i kinetika otpuštanja kvercetina iz formuliranih čestica s UZV ekstraktom, a rezultati su prikazani na Slici 17. Tijekom prvih 30 minuta dolazi do kontinuiranog otpuštanja svih sustava čestica. Taj trend se tijekom cijele izloženosti SGF i SIF fluidu nastavlja samo za sustav AP_80:20. Otpuštanje kvercetina je za sustav čistog alginata kontinuirano sve do izloženosti SIF fluidu u 130-toj minuti nakon čega dolazi do smanjenja koncentracije kvercetina. Za sustav AP_60:40 od 30-te do 60-te minute dolazi do uspostavljanja ravnoteže, a zatim do kontinuiranog otpuštanja

koje se nastavlja i tijekom izloženosti SIF fluidu. Otpuštanje kvercetina iz čestica sustava AP_70:30 odvijalo se kontinuirano do 60-te minute kada dolazi do smanjenog otpuštanja kvercetina, a izlaganjem SIF fluidu opet do porasta istog uz uspostavljanje ravnoteže. Izlaganjem SGF fluidu najbolji profil otpuštanja pokazuju čestice sustava AP_70:30 i AP_60:40, iz kojih je otpuštena najveća količina kvercetina tijekom 120 minuta. Dobiveni rezultati pokazuju kako je za sve sustave čestica nakon izloženosti SIF fluidu u prvih deset minuta došlo do značajnijeg povećanog otpuštanja kvercetina.

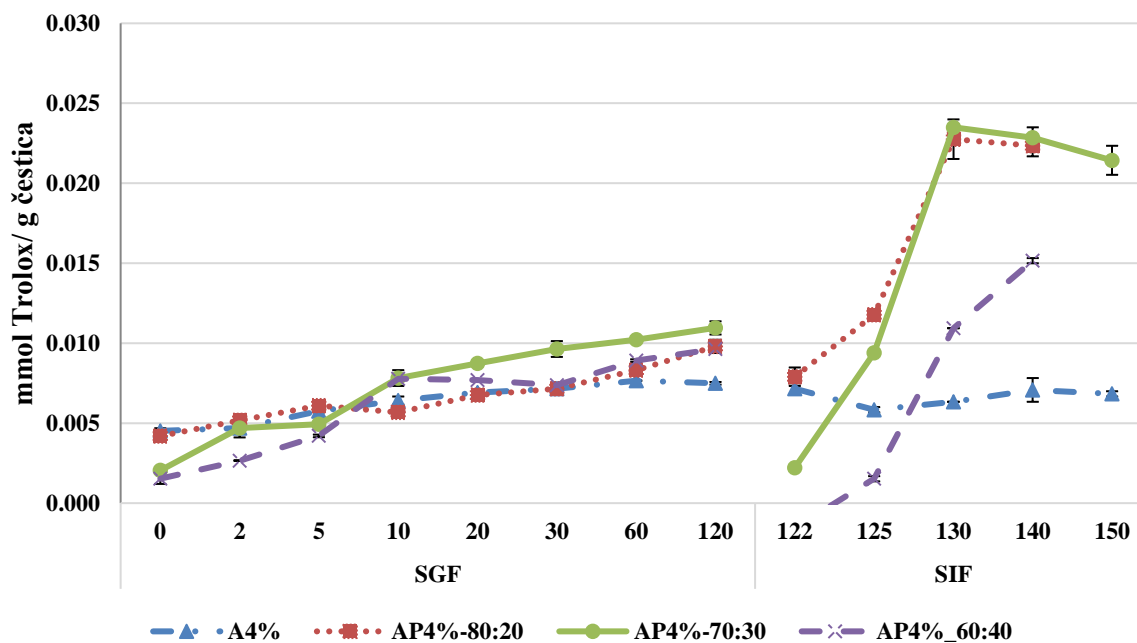
4.3.3.3. Praćenje otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima



Slika 18. Kinetika otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox-a/g čestica) iz razbijenih hidrogel čestica u SGF i SIF fluidima određena ABTS metodom s KON ekstraktom

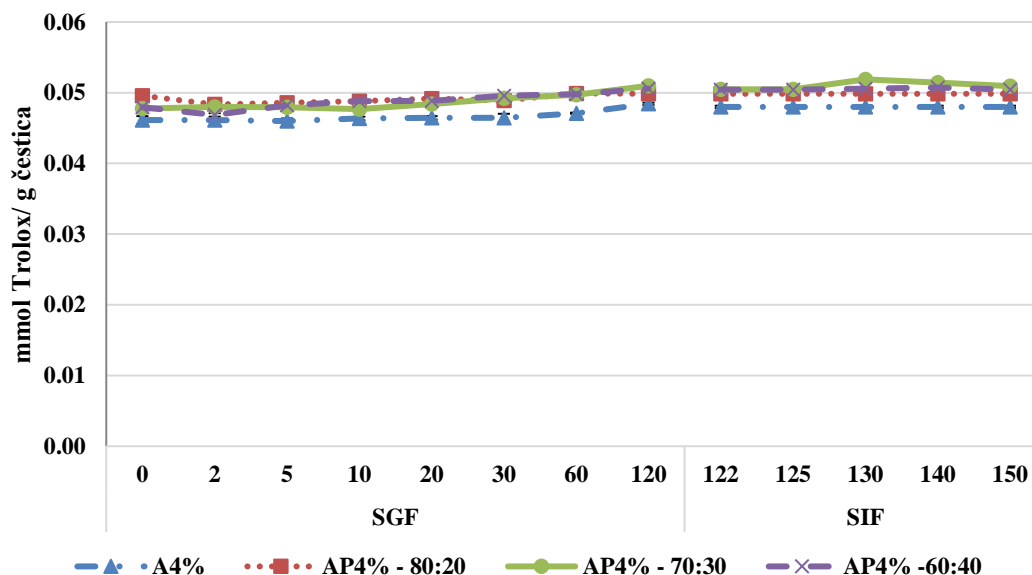
Na Slici 18 prikazana je kinetika otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta iz formuliranih čestica s KON ekstraktom u SGF i SIF fluidima određena ABTS metodom. Iz rezultata je vidljivo kako je kinetika otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta za sustave AP_70:30 i AP_60:40 bilo gotovo podjednako tijekom prvih 20 minuta, te je ona bilo nešto brža u odnosu na preostala dva sustava. Slično ponašanje je uočeno za sustave čistog alginata i AP_80:20 kod kojih je kinetika otpuštanja bilo gotovo podjednako unutar prvih 60 minuta. Nakon toga dolazi do pada koncentracije ekvivalenta Trolox-a/g čestica do 120-te minute za sustav čistog alginata, a potom do kontinuiranog otpuštanja nakon 122. minute, tj nakon izloženosti SIF

fluidu. Za sustav AP_80:20 je vidljivo kontinuirano otpuštanje unutar 130 minuta, s naglašenim porastom koncentracije ekvivalenta Trolox-a/g čestica nakon izlaganja SIF fluidu, nakon čega je došlo do pada navedenog ekvivalenta. Što se tiče sustava AP_70:30 nakon izlaganja SIF fluidu došlo je do kontinuiranog otpuštanja iz čestica, uz značajniju promjenu koncentracije unutar prve 3 minute. Za sustav AP_60:40 su pak zabilježene skokovite promjene tijekom izloženosti SIF fluidu uz porast unutar prve tri minute, pad nakon pet minuta te ponovni porast koncentracije ekvivalenta Trolox-a/g čestica posljednjih 10 minuta. U SIF fluidu je najsporiji profil otpuštanja zabilježen je kod čestica sustava čistog alginata, dok su najbolji profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta pokazale čestice sustava AP_80:20.



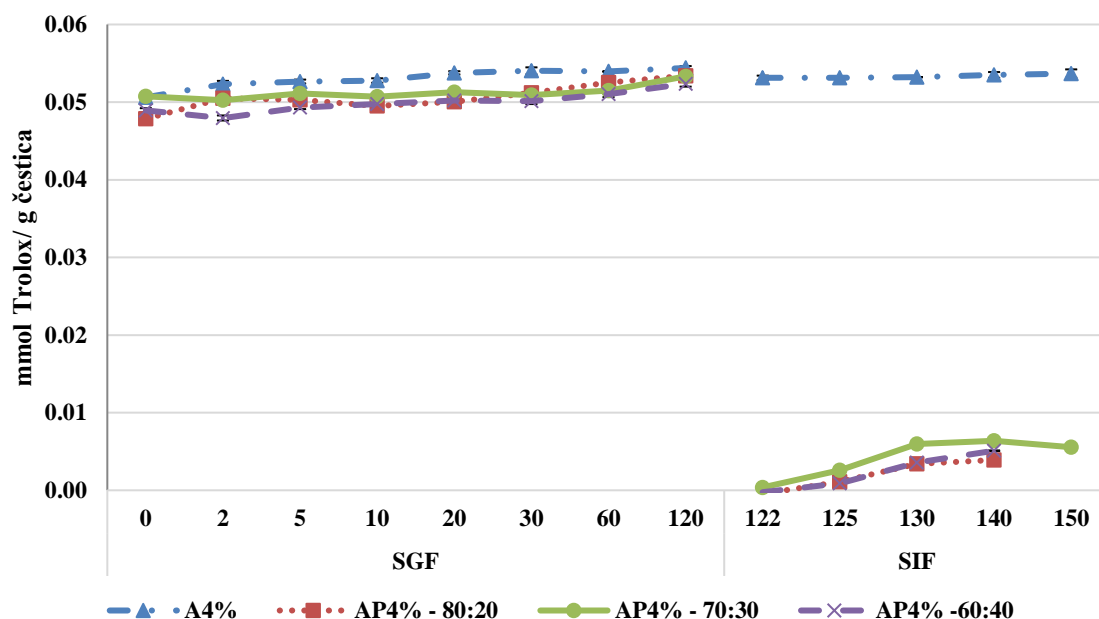
Slika 19. Kinetika otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox-a/g čestica) iz razbijenih hidrogel čestica u SGF i SIF fluidima određena ABTS metodom s UZV ekstraktom. Za čestice kod kojih je inkapsuliran UZV ekstrakt rezultati kinetike otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta u SGF i SIF fluidima, određeni ABTS metodom, prikazani su na Slici 19. Dobiveni rezultati ukazuju na kontinuirano otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta tijekom cijele izloženosti SGF i SIF fluidu jedino za AP_60:40 sustav čestica. Kod ostalih sustava zabilježene su određene varijacije. Otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta tijekom izlaganja SGF fluidu brže je za čestice sustava AP_70:30. Tako kod sustava čistog alginata tijekom prve tri minute izloženosti SIF fluidu dolazi do smanjenja, potom od 140-te minute do povećanja koncentracije ekvivalenta Trolox-a/g čestica nakon čega se uspostavlja

ravnotežno stanje. Isto tako za sustave AP_80:20 i AP_70:30 kontinuirano otpuštanje se odvija do 130 minute, nakon čega dolazi do smanjenja koncentracije ekvivalenta Trolox-a/g čestica. Za sve sustave čestica, osim čistog alginata, nakon izlaganja SIF fluidu dolazi do značajnijeg pada, a potom i rasta koncentracije ekvivalenta Trolox-a/čestica.



Slika 20. Kinetika otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox-a/g čestica) iz razbijenih hidrogel čestica u SGF i SIF fluidima određena DPPH metodom s KON ekstraktom

Na Slici 20. prikazana je kinetika otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta iz formuliranih čestica u SGF i SIF fluidima primjenom DPPH metode kad je inkapsuliran KON ekstrakt. Svi sustavi čestica pokazuju kontinuirano otpuštanje unutar 120 minuta izloženosti simuliranom SGF fluidu. Svi sustavi čestica nakon izlaganja u SIF fluidu postižu ravnotežno stanje koje se odvija tijekom cijelog vremena izloženosti ovome fluidu, osim sustava AP_70:30 kod kojega se ravnoteža uspostavlja u prve tri minute nakon čega do 130-te minute dolazi do porasta, a potom do 140-te pada koncentracije ekvivalenta Trolox-a/g čestica nakon čega je uspostavljena ravnoteža. Najsporiju kinetiku otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta ipak pokazuju čestice sustava čistog alginata i to tijekom izlaganja u oba fluida.



Slika 21. Kinetika otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox-a/g čestica) iz razbijenih hidrogel čestica u SGF i SIF fluidima određena DPPH metodom s UZV ekstraktom

Kinetika otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta iz formuliranih čestica u SGF i SIF fluidima određena DPPH metodom, za UZV ekstrakt slična je rezultatima dobivenim za KON ekstrakt. Rezultati prikazani na Slici 21 pokazuju kako kod svih sustava čestica dolazi do kontinuiranog otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta tijekom izloženosti SGF fluidu. Jedino je za sustav čistog alginata nakon izlaganja SIF fluidu došlo do postizanja ravnotežnog stanja te ovaj sustav čestica otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta najveće tijekom cijelog izlaganja simuliranim gastrointestinalnim uvjetima. Za preostale sustave čestica, AP_80:20, AP_70:30 i AP_60:40, izlaganjem SIF fluidu došlo je do naglog pada koncentracije ekvivalentna Trolox-a/g nakon čega je uslijedilo kontinuirano otpuštanje u SIF fluidu.

Tablica 13. Udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva (mg/g čestica) zadržan u alginatnim hidrogel česticama

Uzorak			Kemijski skoj						
			Prokatehinska kiselina (mg/g)	Hidroksibenzojeva kiselina (mg/g)	Vanilinska kiselina (mg/g)	Kvercetin-3-glikozid (mg/g)	Kvercetin (mg/g)	Derivati kvercetina (mg/g)	Luteolin (mg/g)
Razbijene hidrogel čestice	KON	A	0,663±0,006	0,006±0,000	n.d.*	n.d.	0,112±0,001	0,596±0,001	n.d.
		AP_80:20	0,547±0,003	0,003±0,000	n.d.	n.d.	0,350±0,002	0,583±0,001	n.d.
		AP_70:30	0,510±0,003	0,003±0,000	n.d.	n.d.	0,370±0,001	0,524±0,001	n.d.
		AP_60:40	0,494±0,005	0,003±0,000	n.d.	n.d.	0,336±0,000	0,517±0,002	n.d.
	UZV	A	0,712±0,009	0,028±0,000	n.d.	n.d.	0,013±0,002	0,523±0,010	n.d.
		AP_80:20	0,894±0,005	0,038±0,001	n.d.	n.d.	0,191±0,002	0,809±0,001	n.d.
		AP_70:30	0,858±0,013	0,039±0,000	n.d.	n.d.	0,312±0,001	1,004±0,003	n.d.
		AP_60:40	0,752±0,001	0,035±0,001	n.d.	n.d.	0,207±0,001	0,800±0,005	n.d.

* n.d.-nije detektiran

4.3.4. Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva razbijenih hidrogel čestica

Pojedinačni polifenolni spojevi razbijenih hidrogel čestica određeni su metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), a rezultati dobivene analize su prikazani u Tablici 13 te su izraženi kao mg polifenolnog spoja/g biljke. U slučaju KON ekstrakta rezultati iz Tablice 13 pokazuju kako je nakon razbijanja čestica, za sustav čistog alginata, najveći udio prokatehinske kiseline ($0,663 \pm 0,006$ mg/g), potom derivata kvercetina ($0,596 \pm 0,001$ mg/g) i kvercetina ($0,112 \pm 0,001$ mg/g), a najmanji hidroksibenzojeve kiseline ($0,006 \pm 0,000$ mg/g). Isti poredak vrijednost koncentracije određen je i za sustav AP_80:20, prokatehinska kiselina ($0,547 \pm 0,003$ mg/g), derivati kvercetina ($0,583 \pm 0,001$ mg/g), kvercetin ($0,350 \pm 0,002$ mg/g) te hidrokisbenzojeva kiselina ($0,003 \pm 0,000$ mg/g). Za sustav čestica AP_70:30 najveći udjel pripada derivatima kvercetina ($0,524 \pm 0,001$ mg/g), zatim slijede prokatehinska kiselina ($0,510 \pm 0,003$ mg/g) i kvercetin ($0,370 \pm 0,001$ mg/g), dok je najmanji udjel hidroksibenzojeve kiseline ($0,003 \pm 0,000$ mg/g). Sustav AP_60:40 pokazuje isti trend udjel identificiranih spojeva. Rezultati za KON ekstrakt upućuju na to kako smanjenjem udjela alginata u česticama dolazi do smanjenja udjela prokatehinske i hidroksibenzojeve kiseline te derivata kvercetina. Povećanje udjela polifenola smanjenjem udjela alginata zabilježeno je jedino u slučaju kvercetina. Uspoređujući rezultate dobivene za UZV ekstrakt može se vidjeti kako su dobivene vrijednosti udjela polifenola veće u odnosu na KON ekstrakt, osim kod kvercertina čiji udjeli su bili niži izuzev sustava AP_70:30 u kojemu je udjel kvercetina bio blizu udjela kvercetina s KON ekstraktom.

5. ZAKLJUČCI

1. Među primijenjenim metodama pripreme ekstrakta ljuske crvenog luka, ultrazvučna metoda rezultirala je polifenolnim ekstraktom najvećeg udjela ukupnih polifenola i najvišeg antioksidacijskog kapaciteta.
2. U polifenolnom ekstraktu ljuske crvenog luka dominira kvercetin i derivati kvercetina.
3. Karakterizacijom pektina ekstrahiranog iz ljuske crvenog luka određeno je da je isti visokometilirajući ($DE > 53,81\%$) te je zbog slabijeg kapaciteta geliranja u formuliranju inkapsulacijskih sustava polifenolnog ekstrakta ljuske crvenog luka kombiniran s alginatom, u maksimalnom omjeru do 40% pektina.
4. Veličina, tvrdoća i elastičnost hidrogel čestica povećavaju se povećanjem udjela alginata, neovisno o metodi pripreme ekstrakta.
5. Dodatkom pektina ljuske crvenog luka dobivene su i tamnije hidrogel čestice.
6. Učinkovitost inkapsulacije ukupnih polifenola i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta veći su kod čestica u pektinsko-alginatnim sustavima, u odnosu na čisti alginat, a u tim sustavima ostvareno je i sporije otpuštanje ukupnih polifenola u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima.

6. LITERATURA

- Abduljabbar, A. A., Abdourahman, K. K. (2018) Onion (*Allium cepa*) and Garlic (*Allium sativa* L.) Oil effects on Blood Glucose Levels and Body Weight of Local Quails in Erbil Province. *J Pure Applied Sci.* **30**, 158–167
- Aceituno-Medina, M., Mendoza, S., Rodríguez, B. A., Lagaron, J. M., López-Rubio, A. (2015) Improved antioxidant capacity of quercetin and ferulic acid during in-vitro digestion through encapsulation within food-grade electrospun fibers. *J. Funct. Foods* **12**, 332–341.
- Agulhon, P., Markova, V., Robitzer, M., Quignard, F., Mineva, T. (2012) Structure of alginate gels: Interaction of diuronate units with divalent cations from density functional calculations. *Biomacromolecules* **13**, 1899–1907.
- Agulhon, P., Robitzer, M., David, L., Quignard, F. (2012) Structural regime identification in ionotropic alginate gels: Influence of the cation nature and alginate structure. *Biomacromolecules* **13**, 215–220.
- Aina, V. O., Barau, M. M., Mamman, O. A., Zakari, A., Haruna, H., Umar, M. S. H., Abba, Y. B. A. (2012) Extraction and Characterization of Pectin from Peels of Lemon. *Br. J. Pharmacol. Toxicol.* **3**, 259–262.
- Akash, M. S. H., Rehman, K., Chen, S. (2014) Spice plant *Allium cepa*: Dietary supplement for treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nutrition* **30**, 1128–1137.
- Almouazen, E., Bourgeois, S., Jordheim, L. P., Fessi, H., Briançon, S. (2012) Nano-encapsulation of Vitamin D 3 Active Metabolites for Application in Chemotherapy: Formulation Study and in Vitro Evaluation. *Pharm Res.* **30(4)**, 1137–1146.
- Anonymous 1, <<https://www.konzum.hr/klik/#!/products/50000381/luk-crveni>> Pristupljeno 01. prosinca 2018.
- Anonymous 2, <www.tehnologijahrane.com>. Pristupljeno 1. prosinca 2018.
- Asadollahi, T., Dadfarnia, S., Haji Shabani, A. M., Amirkavei, M. (2013) Separation/preconcentration and determination of quercetin in food samples by dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic drop -flow injection spectrophotometry. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 1103–1109.
- Augustin, M. A., Sanguansri, L., Margetts, C., Young, B. (2001) Microencapsulation of food ingredients. *Food Aus.* **53**, 219–223.
- Avadi, M. R., (2010) Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **6**, 58–63.

- Azevedo, M. A., Bourbon, A. I., Vicente, A. A., Cerqueira, M. A. (2014) Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2. *Int. J. Biol. Macromol.* **71**, 141–146.
- Babbar, N., Baldassarre, S., Maesen, M., Prandi, B., Dejonghe, W., Sforza, S., Elst, K. (2016) Enzymatic production of pectic oligosaccharides from onion skins. *Carbohydr. Polym.* **146**, 245–252.
- Babbar, N., Dejonghe, W., Gatti, M., Sforza, S., Elst, K. (2016) Pectic oligosaccharides from agricultural by-products: production, characterization and health benefits. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 594–606.
- Baldassarre, S., Babbar, N., Van Roy, S., Dejonghe, W., Maesen, M., Sforza, S., Elst, K. (2018) Continuous production of pectic oligosaccharides from onion skins with an enzyme membrane reactor. *Food Chem.* **267**, 101-110.
- Banerjee, J., Vijayaraghavan, R., Arora, A., MacFarlane, D. R., Patti, A. F. (2016) Lemon juice based extraction of pectin from mango peels: Waste to wealth by sustainable approaches. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **4**, 5915–5920.
- Benkeblia, N. (2004) Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Food Sci. Technol.* **37**, 263–268.
- Baranauskienė, R., Venskutonis, P. R., Dewettinck, K., Verhé, R. (2005) Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.) and marjoram (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into milk protein-based matrices. *Food Res Int.* **39(4)**, 413-425.
- Belščak-Cvitanović A., Bušić A., Barišić L., Vrsaljko D., Karlović S., Špoljarić I., Vojvodić A., Mršić G., Komes D. (2016) Emulsion templated microencapsulation of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols and β -carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin. *Food Hydrocoll.* **57**, 139-152.
- Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Karlović, S., Djaković, S., Špoljarić, I., Mršić, G., Ježek, D. (2015) Improving the controlled delivery formulations of caffeine in alginate hydrogel beads combined with pectin, carrageenan, chitosan and psyllium. *Food Chem.* **167**, 378-386.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wiss Technol.* **28**, 25-30.
- Braga, L. R., Rosa, A. A., Dias, A. C. B. (2014) Synthesis and characterization of molecularly imprinted silica mediated by Al for solid phase extraction of quercetin in Ginkgo biloba L. *Anal. Methods* **6**, 4029–4037.
- Bušić, A., Belščak-Cvitanović, A., Wang, Y., Vojvodić, A., Karlović, S., Špoljarić, I., Mršić, G., Veršec, P., Vučilovski, J., Komes, D. (2018) Structuring new alginate network aimed for delivery of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols using ionic gelation and new filler materials. *Food Res. Int.* **111**, 244–255.

- Campos, K. E., Diniz, Y. S., Cataneo, A. C., Faine, L. A., Alves, M. J., Novelli, E.L. (2003) Hypoglycaemic and antioxidant effects of onion, *Allium cepa*: Dietary onion addition, antioxidant activity and hypoglycaemic effects on diabetic rats. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **54**, 241–246.
- Chandel, V., Vaidya, D., Kaushal, M., Gupta, A., Verma, A. K. (2016) Standardization of eco-friendly technique for extraction of pectin from apple pomace. *Indian J. Nat. Prod. Resour.* **7**, 69–73.
- Chaikham, P., Apichartsrangkoon, A. (2012) Comparison of bioactive components in pressurized and pasteurized longan juices fortified with encapsulated *Lactobacillus casei* 01. *High Press. Res.* **32**, 316–322 .
- Chalasanani, K. B., Russell-Jones, G. J., Jain, A. K., Diwan, P. V., Jain, S. K. (2007) Effective oral delivery of insulin in animal models using vitamin B12-coated dextran nanoparticles. *J. Control. Release* **122**, 141–150.
- Chen, H., Zhang, Y., Zhong, Q. (2015) Physical and antimicrobial properties of spray-dried zein-casein nanocapsules with co-encapsulated eugenol and thymol. *J. Food Eng.* **144**, 93–102.
- 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.
- Couto, R., Alvarez, V., Temelli, F. (2017) Encapsulation of Vitamin B2 in solid lipid nanoparticles using supercritical CO₂. *J. Supercrit. Fluids* **120**, 432–442.
- Desai, K. G. H., Park, H. J. (2005) Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. *J. Microencapsul.* **22**, 179–192.
- Díaz-Rojas, E. I., Pacheco-Aguilar, R., Lizardi, J., Argüelles-Monal, W., Valdez, M. ., Rinaudo, M., Goycoolea, F. (2004) Linseed pectin: Gelling properties and performance as an encapsulation matrix for shark liver oil. *Food Hydrocoll.* **18**, 293–304.
- Dragić, M. (2014) Ljubavne divinacije u kulturnoj baštini Hrvata, Bošnjaka, Srba I Poljaka. *Ethnologica Dalmatica.* **21**, 103-124.
- Dutta-Roy, A. K. (2002) Dietary components and human platelet activity. *Platelets* **13**, 67–75.
- Drusch, S., Schwarz, K. (2005). Microencapsulation properties of two different types of n-octenylsuccinate-derivatized starch. *Eur Food Res Technol.* **222**, 155–164.
- Elez Garofulić, I., Zorić, Z., Pedisić, S., Dragović-Uzelac, V. (2017) Retention of polyphenols in encapsulated sour cherry juice in dependence of drying temperature and wall material. *LWT - Food Sci. Technol.* **83**, 110–117.
- Estevinho, B. N., Carlan, I., Blaga, A., Rocha, F. (2016) Soluble vitamins (vitamin B12 and vitamin C) microencapsulated with different biopolymers by a spray drying process. *Powder Technol.* **289**, 71–78.

Fan, W., Yan, W., Xu, Z., Ni, H. (2012) Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. **90**, 21–27.

FAOSTAT (2018) The Food and Agriculture Organization, <<http://www.fao.org/home/en/>>. Pristupljeno 05. siječnja 2019.

Fidalgo, A. Ciriminna, R., Carnaroglio, D., Tamburino, A., Cravotto, G., Grillo, G., Ilharco, L. M., Pagliaro, M. (2016) Eco-Friendly Extraction of Pectin and Essential Oils from Orange and Lemon Peels. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **4**, 2243–2251. doi:10.1021/acssuschemeng.5b01716

Ghoreishi, S. M., Hedayati, A., Mousavi, S. O. (2016) Quercetin extraction from *Rosa damascena* Mill via supercritical CO₂: Neural network and adaptive neuro fuzzy interface system modeling and response surface optimization. *J. Supercrit. Fluids* **112**, 57–66.

Gibbs, B. F., Kermasha, S. (1999) Encapsulation in the food industry. *International J Food Sci Nutr.* **50**, 213–224.

Goh, C. H., Heng, P. W. S., Chan, L. W. (2012) Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydr. Polym.* **88**, 1–12.

Gökmen, V. Mogol, B. A., Lumaga, R. B., Fogliano, V., Kaplun, Z., Shimoni, E (2011) Development of functional bread containing nanoencapsulated omega-3 fatty acids. *J. Food Eng.* **105**(4), 585–591.

Gombotz, W. R., Wee, S. F. (2012) Protein release from alginate matrices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 194–205.

Govan, J. R. W., Fyfe, J. A. M., Jarman, T. R. (1981) Isolation of Alginate-producing Mutants of *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas mendocina*. *J. Gen. Microbiol.* **125**, 217–220.

Gökmen V., Sügüt I. (2007) Computer-vision Based Analysis of Colour as a Tool for Food Process Control. U: Focus on Food Engineering Research and Development, Pletney V. N., ur., Nova Publishers. str. 17 – 27

Grassino, A.N., Brnčić, M., Vikić-Topić, D., Roca, S., Dent, M., Brnčić, S.R. (2016) Ultrasound Assisted Extraction and Characterization of Pectin from Tomato Waste. *Food Chem.* **198**, 93-100.

Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B., Smith, B. (2002) Onions - A global benefit to health. *Phyther. Res.* **16**, 603–615.

Gültekin-Özgülven, M., Karadag, A., Duman, S., Özkal, B., Özçelik, B. (2016) Fortification of dark chocolate with spray dried mulberry (*Morus nigra*) waste extract encapsulated in chitosan-coated liposomes and bioaccessibility studies. *Food Chem.* **201**, 205-212.

- Hao, J., Guo, B., Yu, S., Zhang, W., Zhang, D., Wang, J., Wang, Y. (2017) Encapsulation of the flavonoid quercetin with chitosan-coated nano-liposomes. *Food Sci. Technol.* **85**, 37–44.
- Harris, S., Brunton, N., Tiwari, U., Cummins, E. (2015) Human exposure modelling of quercetin in onions (*Allium cepa* L.) following thermal processing. *Food Chem.* **187**, 135–139.
- Hategekimana, J., Masamba, K. G., Ma, J., Zhong, F. (2015) Encapsulation of vitamin E: Effect of physicochemical properties of wall material on retention and stability. *Carbohydr. Polym.* **124**, 172–179.
- Hemar, Y., Cheng, L. J., Oliver, C. M., Sanguansri, L., Augustin, M. (2010) Encapsulation of resveratrol using Water-in-Oil-in-Water double emulsions. *Food Biophys.* **5**, 120–127.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Venema, D. P. (1992) Optimization of a Quantitative HPLC Determination of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids in Vegetables and Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1591-1598.
- Hollman, P. C. H., Arts, I. C. W. (2000) Flavonols, flavones and flavanols - Nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1081–1093.
- Official Methods of Analysis of AOAC International, 15th ed., Vol. 1. Arlington (1990) Secs. 930.15
- Iyer, C. Kailasapathy, K. (2005) Effect of Co-encapsulation of Probiotics with Prebiotics on Increasing the Viability of Encapsulated Bacteria under In Vitro Acidic and Bile Salt Conditions and in Yogurt. *J. Food Sci.* **70**, 18–23.
- Jacobsen, C., García-Moreno, P. J., Mendes, A. C., Mateiu, R. V., Chronakis, I. S. (2017) Use of Electrospinning for Encapsulation of Sensitive Bioactive Compounds and Applications in Food. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **9**, 1–25.
- JiaQi, T., YanYang, X., BoXin, S., Ya, D., YaXin, W. (2016) Optimization on extraction process of quercetin in corn silk by cellulase and ultrasound. *Journal of Food Safety and Quality*. [online] **7**, 1667-1673, < <https://www.cabdirect.org/> > . Pristupljeno 02. siječnja 2019.
- Kaiser, M. Pereira, S., Pohl, L., Ketelhut, S., Kemper, B., Gorzelanny, C., Goycoolea, F. M (2015) Chitosan encapsulation modulates the effect of capsaicin on the tight junctions of MDCK cells. *Sci. Rep.* **5**, 1–14 (2015).
- Kendler, B. S. (1987) Garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*): A review of their relationship to cardiovascular disease. *Prev. Med. (Baltim).* **16**, 670–685.
- Kim, S., Kim, D-B., Jin, W., Park, J., Yoon, W., Lee, Y., Kim, S., Lee, S., Kim, S., Lee, O-H., Shin, D., Yoo, M. (2018) Comparative studies of bioactive organosulphur compounds and antioxidant activities in garlic (*Allium sativum* L.), elephant garlic (*Allium*

ampeloprasum L.) and onion (*Allium cepa* L.). *Nat. Prod. Res.* **32**, 1193–1197. doi: 10.1080/14786419.2017.1323211

Ko, E. Y., Nile, S. H., Jung, Y. S., Keum, Y. S. (2018) Antioxidant and antiplatelet potential of different methanol fractions and flavonols extracted from onion (*Allium cepa* L.). *Biotech* **8**, 155-164.

Ko, E. Y., Nile, S. H., Sharma, K., Li, G. H., Park, S. W. (2015) Effect of different exposed lights on quercetin and quercetin glucoside content in onion (*Allium cepa* L.). *Saudi J. Biol. Sci.* **22**, 398–403.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. C. (2006) Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. *LWT - Food Sci. Technol.* **39**, 177–183.

Krstin, S., Sobeh, M., Braun, M., Wink, M. (2018) Anti-Parasitic Activities of *Allium sativum* and *Allium cepa* against *Trypanosoma b. brucei* and *Leishmania tarentolae*. *Medicines*. **5**, 37.

Kumar, V. P., Prashanth, K. V. H., Venkatesh, Y. P. (2015) Structural analyses and immunomodulatory properties of fructo-oligosaccharides from onion (*Allium cepa*). *Carbohydr. Polym.* **117**, 115–122.

Kummu, M., de Moel, H., Porkka, M., Siebert, S., Varis, O., Ward, P. J. (2012) Lost food, wasted resources: Global food supply chain losses and their impacts on freshwater, cropland, and fertiliser use. *Sci. Total Environ.* **438**, 477–489.

Lee, K. A., Kim, K. T., Jung Kim, H., Chung, M. S., Chang, P.S., Park, H., Paik, 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**, 615–621. doi: 10.1007/s10068-014-0084-6

Lekar, A. V., Borisenko, S. N., Vetrova, E. V., Sushkova, S. N., Borisenko, N. I. (2014) Extraction of quercetin from *Polygonum hydropiper* L. by subcritical water. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* **9**, 1–5.

Li, S. Yin, H., Wyman, I. W., Zhang, Q., Macartney, D. H., Wang, R. (2016) Encapsulation of Vitamin B1 and its phosphate derivatives by cucurbit[7]uril: Tunability of the binding site and affinity by the presence of phosphate groups. *J. Org. Chem.* **81**(3), 1300–1303.

Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Tabassum Chaudhry, M., Wang, S. Liu, H., Yin, Y. (2016) Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients* **8**, 1–14.

Liédana, N., Galve, A., Rubio, C., Téllez, C., Coronas, J. (2012) One-Step Encapsulation of Caffeine in MOF. *ACS Appl Mater Interfaces.* **4**(9), 5016–5021. doi:10.1021/am301365h.

Lightfoot Vidal, S., Rojas, C., Bouza Padín, R., Pérez Rivera, M., Haensgen, A., González, M., Rodríguez-Llamazares, S. (2016) Synthesis and characterization of

polyhydroxybutyrate- co -hydroxyvalerate nanoparticles for encapsulation of quercetin. *J. Bioact. Compat. Polym.* **31**, 439–452.

Lu, W., Kelly, A. L., Miao, S. (2016) Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. *Trends Food Sci. Technol.* **47**, 1–9.

Marotti, M., Piccaglia, R. (2002) Characterization of flavonoids in different cultivars of onion (*Allium cepa* L.). *J. Food Sci.* **67**, 1229–1232.

Melton, L. D., Smith, B. G. (2001) Determination of the Uronic Acid Content Of Plant Cell Walls Using A Colorimetric Assay. *Handb. Food Anal. Chem.* **1–2**, 735–738.

Mourtzinis, I., Prodromidis, P., Grigorakis, S., Makris, D. P., Biliaderisa, C. G., Moschakis, T. (2018) Natural food colourants derived from onion wastes: Application in a yoghurt product. *Electrophoresis.* **39**, 1975–1983, doi:10.1002/elps.201800073

Mozafari, M. R. Khosravi-Darani, K., Gokce Borazan, G., Cui, J., Pardakhty, A., Yurdugul, S. (2008) Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *Int. J. Food Prop.* **11**, 833–844.

Müller-Maatsch, J., Bencivenni, M., Caligiani A., Tedeschi, T., Bruggeman, G., Bosch, M., Petrusan, J., Van Droogenbroeck, B., Elst, K., Sforza, S. (2016) Pectin content and composition from different food waste streams. *Food Chem.* **201**, 37–45.134

Munin, A., Edwards-Lévy, F. (2011) Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics* **3**, 793–829, doi: 10.3390/pharmaceutics3040793.

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.

Nam, M. W., Zhao, J., Lee, M. S., Jeong, J. H., Lee, J. (2015) Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: Application to flavonoid extraction from *Flos sophorae*. *Green Chem.* **17**, 1718–1727, doi: 10.1039/c4gc01556h

Nedović, V., Kalušević, A., Manojlović, V., Lević, S., Bugarski, B. (2011) An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci.* **1**, 1806–1815.

Nile, S. H., Nile, A. S., Keum, Y. S., Sharma, K. (2017) Utilization of quercetin and quercetin glycosides from onion (*Allium cepa* L.) solid waste as an antioxidant, urease and xanthine oxidase inhibitors. *Food Chem.* **235**, 119–126.

Nile, S. H., Park, S. W. (2013) Total phenolics, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activity of three colored onions (*Allium cepa* L.). *Front. Life Sci.* **7**, 224–228.

Nishijima, T., Takida, Y., Saito, Y., Ikeda, T., Iwai, K. (2015) Simultaneous ingestion of high-methoxy pectin from apple can enhance absorption of quercetin in human subjects. *Br. J. Nutr.* **113**, 1531–1538.

- Nishijima, T., Iwai, K., Saito, Y., Takida, Y., Matsue, H. (2009) Chronic ingestion of apple pectin can enhance the absorption of quercetin. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 2583–2587.
- Ola-Mudathir, F. K., Suru, S. M. (2015) Onion and garlic extracts as potential antidotes for cadmium-induced biochemical alterations in prostate glands of rats. *Andrologia* **47**, 1075–1082.
- Oliveira, T. Í. S., Rosa, M. F., Cavalcante, F. L., Pereira, P. H. F., Moates, G. K., Wellner, N., Mazzetto, S. E., Waldron, K. W., Azeredo, H. M. C. (2016) Optimization of pectin extraction from banana peels with citric acid by using response surface methodology. *Food Chem.* **198**, 113–118.
- Ough C. S., Amerine M.A. (1988) *Methods for analysis of musts and wine*, John Wiley & Sons. Inc., str. 196 – 221.
- Pakade, V. E., Molefe, E. D., Tavengwa, N. T. (2017) Quantitative determination of trace concentrations of quercetin from prickly pear skin complex sample extracts by application of molecularly imprinted polymers. *J. Environ. Chem. Eng.* **5**, 1186–1195.
- Pasukamonset, P., Kwon, O., Adisakwattana, S. (2016) Alginate-based encapsulation of polyphenols from *Clitoria ternatea* petal flower extract enhances stability and biological activity under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocoll.* **61**, 772–779.
- Patil, P., Chavanke, D., Wagh, M. (2012) A review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelspheres. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **4**, 27-32.
- Pereira, G. S., Cipriani, M., Wisbeck, E., Souza, O., Strapazzon, J. O., Gern, R. M. M. (2017) Onion juice waste for production of Pleurotussajor-caju and pectinases. *Food Bioprod. Process.* **106**, 11–18.
- Petkowicz, C. L. O., Vriesmann, L. C., Williams, P. A. (2017) Pectins from food waste: Extraction, characterization and properties of watermelon rind pectin. *Food Hydrocoll.* **65**, 57–67.
- Prasanna, V. K., Venkatesh, Y. P. (2015) Characterization of onion lectin (*Allium cepa agglutinin*) as an immunomodulatory protein inducing Th1-type immune response in vitro. *Int. Immunopharmacol.* **26**, 304–313.
- Ramos, F. A., Takaishi, Y., Shirotori, M., Kawaguchi, Y., Tsuchiya, K., Shibata, H., Higuti, T., Tadokoro, T., Takeuchi, M. (2006) Antibacterial and antioxidant activities of quercetin oxidation products from yellow onion (*Allium cepa*) skin. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 3551–3557.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine.* **26**, 1231 – 1237.

- Rezaei-Sadabady, R., Eidi, A., Zarghami, N., Barzegar, A. (2014) Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of quercetin and quercetin-encapsulated liposomes. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **44**, 128–134.
- Righetto, A. M., Netto, F. M. (2006). Vitamin C stability in encapsulated green West Indian cherry juice and in encapsulated synthetic ascorbic acid. *J Sci Food Agric.* **86**(8), 1202–1208.
- Robert, P. Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., Saenz, C. (2010) Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *Int. J. Food Sci. Technol.* **45**, 1386–1394. doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02270.x
- Roldán, E., Sánchez-Moreno, C., de Ancos, B., Cano, M. P. (2008) Characterisation of onion (*Allium cepa* L.) by-products as food ingredients with antioxidant and antibrowning properties. *Food Chem.* **108**, 907–916.
- Sabater, C., Corzo, N., Olano, A., Montilla, A. (2018) Enzymatic extraction of pectin from artichoke (*Cynara scolymus* L.) by-products using Celluclast *Carbohydr. Polym.* **190**, 43–49.
- Şahin, S., Aybastier, Ö., Demir, C. (2016) Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Quercetin and Cyanidin from *Pyracantha coccinea* and Their Scavenging Effect on Free Radicals. *J. Food Biochem.* **40**, 472–479.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamela-Raventós R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means od Folin-Ciocalteau reagent. *Methods in Enzymology.* **299**: 1179.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamela-Raventós R. M. (1999) Flavanoids and other polyphenols. *Methods in Enzymology.* **299**: 152
- Singleton V. L., Rossi J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture.* **16**: 144 – 158
- Singh, B. N. Singh, B. R., Singh, R. L., Prakash, D., Singh, D. P., Sarma, B. K., Upadhyay, G., Singh, H. B. (2009) Polyphenolics from various extracts/fractions of red onion (*Allium cepa*) peel with potent antioxidant and antimutagenic activities. *Food Chem. Toxicol.* **47**, 1161–1167.
- Spence, C. (2015) On the psychological impact of food colour. *Flavour* . **4**, 21-36. doi:10.1186/s13411-015-0031-3.
- Stancu, V., Haugaard, P., Lähteenmäki, L. (2016) Determinants of consumer food waste behaviour: Two routes to food waste. *Appetite* **96**, 7–17.
- Suleria, H. A. R., Butt, M. S., Anjum, F. M., Saeed, F., Khalid, N. (2013) Onion: Nature Protection Against Physiological Threats. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **55**, 50–66. doi: 10.1080/10408398.2011.646364

- Sundarraaj, A. A., Ranganathan, T. V. (2018) Comprehensive review on ultrasound and microwave extraction of pectin from agro-industrial wastes. *10*, 2773–2782.
- Tovar, A. K., Godínez, L. A., Espejel, F., Ramírez-Zamora, R. M., Robles, I. (2018) Optimization of the integral valorization process for orange peel waste using a design of experiments approach: Production of high-quality pectin and activated carbon. *Waste Manag.* **85**, 202–213.
- Verbeke, W. (2006) Functional foods: Consumer willingness to compromise on taste for health? *Food Qual. Prefer.* **17**, 126–131.
- Voragen, A. G. J., Coenen, G. J., Verhoef, R. P., Schols, H. A. (2009) Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct. Chem.* **20**, 263–275.
- Wang, B., Desiree, C., Zhao, J., Zhao, S. (2018) Optimization of Ultrasound-assisted Extraction of Quercetin , Luteolin , Apigenin , Pinocembrin and Chrysin from *Flos populi* by Plackett-Burman Design Combined with Taguchi Method. *Chiang Mai J. Sci.* **45**, 427–439.
- Wang, W., Sun, C., Mao, L., Ma, P., Liu, F., Yang, J., Gao, Y. (2016) The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **56**, 21–38.
- Wang, W. Wu, X., Chantapakul, T., Wang, D., Zhang, S., Ma, X., Ding, T., Ye, X., Liu, D. (2017) Acoustic cavitation assisted extraction of pectin from waste grapefruit peels: A green two-stage approach and its general mechanism. *Food Res. Int.* **102**, 101–110.
- Wang, W., Ma, X., Jiang, P., Hu, L., Zhi, Z., Chen, J., Ding, T., Ye, X., Liu, D. (2016). Characterization of pectin from grapefruit peel: A comparison of ultrasound-assisted and conventional heating extractions. *Food Hydrocoll.* **61**, 730–739.
- Wu, Z.-Y. , Xu, X.X., Hu, B. C., Liang, H. W., Lin, Y., Chen, L. F., Yu, S. H. (2015) Iron Carbide Nanoparticles Encapsulated in Mesoporous Fe-N-Doped Carbon Nanofibers for Efficient Electrocatalysis. *Angew. Chemie* **127**, 8297–8301. doi: 10.1002/anie.201502173.
- Yan, L. Wang, R., Wang, H., Sheng, K., Liu, C., Qu, H., Zheng, L. (2018) Formulation and characterization of chitosan hydrochloride and carboxymethyl chitosan encapsulated quercetin nanoparticles for controlled applications in foods system and simulated gastrointestinal condition. *Food Hydrocoll.* **84**, 450–457.
- Yang, Y., McClements, D. J. (2012) Encapsulation of vitamin E in edible emulsions fabricated using a natural surfactant. *Food Hydrocoll.* **30**, 712–720.
- Yang, Y., Wang, Z., Hu, D., Xiao, K., Wu, J. Y. (2018) Efficient extraction of pectin from sisal waste by combined enzymatic and ultrasonic process. *Food Hydrocoll.* **79**, 189–196.
- Ye, C. L., Dai, D. H., Hu, W. L. (2013) Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.). *Food Control* **30**, 48–53.

- Yin, M., Tsao, S. (1999). Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species. *Intl J Food Microbiol.* **49**, 49–56.
- Yoksan, R., Jirawutthiwongchai, J., Arpo, K. (2010) Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **76**, 292–297.
- Yoshinari, O., Shiojima, Y., Igarashi, K. (2012) Anti-Obesity Effects of Onion Extract in Zucker Diabetic Fatty Rats. *Nutrients.* **4**, 1518-1526. doi: 10.3390/nu4101518.
- Yu, H., Huang, Q. (2010) Enhanced in vitro anti-cancer activity of curcumin encapsulated in hydrophobically modified starch. *Food Chem.* **119**, 669–674.
- Zhang, C. Li, X., Zhan, Z., Cao, L., Zeng, A., Chang, G., Liang, Y. (2018) Transcriptome Sequencing and Metabolism Analysis Reveals the role of Cyanidin Metabolism in Dark-red Onion (*Allium cepa* L.) Bulbs. *Sci. Rep.* **8**, 1–10 (2018).
- Zuidam, N. J., Nedović, V. A. (2010) Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing, Springer Science+Business Media, New York, str. 1-101.