

Ekstrakcija, karakterizacija i inkapsulacija funkcionalnih sastojaka ljuske crvenog luka

Dajčić, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:159:137567>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-08**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Ivana Dajčić

7113

**Ekstrakcija, karakterizacija i inkapsulacija
funkcionalnih sastojaka ljuske crvenog luka**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i tehnologija ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Mentorica: Prof. dr. sc Draženka Komes

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija
Zavod za Prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

EKSTRAKCIJA, KARAKTERIZACIJA I INKAPSULACIJA FUNKCIONALNIH SASTOJAKA LJUSKE CRVENOG LUKA

Ivana Dajčić, 0058207255

Sažetak: U novije je vrijeme prehrambena industrija fokusirana na iskorištavanje agro-otpada u svrhu razvoja novih funkcionalnih proizvoda. Ljuska crvenog luka predstavlja značajan udio takvog otpada, koji je ujedno i bogat izvor različitih funkcionalnih sastojaka, kao što su pektin i polifenolni spojevi. Nastojeći iskoristiti taj bogati sastav, cilj ovog rada bio je ekstrahirati i karakterizirati pektin i polifenolni ekstrakt ljuske crvenog luka (*Allium cepa* L.) te ispitati njihov inkapsulacijski potencijal metodom ionskog geliranja. Kao nosači za inkapsulaciju korišteni su alginat i kombinacije alginata s pektinom ljuske crvenog luka (u omjeru 80:20, 70:30 i 60:40). Formiranim hidrogel česticama određeni su fizikalno-kemijski parametri, inkapsulacijska učinkovitost te kinetika otpuštanja ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima. Dobiveni rezultati potvrdili su da su glavni polifenolni sastojci ljuske crvenog luka kvercetin i derivati kvercetina. Ekstrahirani pektin je visokometilirajući (DE = 53,8 %) i kao takav ne može samostalno formirati stabilne hidrogel čestice. Najveći udjel pektina u stabilnim alginatno-pektinskim inkapsuliranim sustavima je 40 %. U odnosu na hidrogel čestice formirane s čistim alginatom kao nosačem, iste formirane s alginatno-pektinskim nosačima pokazale su bolja svojstva zadržavanja vode, manju elastičnost i tvrdoću, manje su veličine, tamnije boje i pokazuju brži profil otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima.

Ključne riječi: ionsko geliranje, kvercetin, ljuska crvenog luka, pektin, polifenoli

Rad sadrži: 49 stranica, 17 slika, 12 tablica, 59 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentorica: Prof. dr. sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: Monika Ostrman, mag. ing.

Datum obrane: 14. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology
Department of Food Engineering
Laboratory for technology of carbohydrates and confectionery products
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

EXTRACTION, CHARACTERIZATION AND ENCAPSULATION OF FUNCTIONAL COMPOUNDS FROM ONION PEEL

Ivana Dajčić, 0058207255

Abstract: Recently, food industry has focused on exploiting agro-waste for the development of new functional products. Onion peel represents a significant part of all agro-waste, which is also a rich source of various functional ingredients, such as pectin and polyphenol compounds. In order to exploit that rich composition, the aim of this paper was to extract and characterize pectin and polyphenol extract of the onion peel (*Allium cepa*, L.) and examine their encapsulation potential by using ionotropic gelation method. Pure alginate and alginate-pectin combinations (in proportions of 80:20, 70:30 and 60:40) were used as matrices for encapsulation. Formed hydrogel particles were tested for physical properties, encapsulation efficiency and release kinetics of total polyphenols and antioxidant capacity in simulated gastrointestinal conditions. The obtained results confirmed that the main polyphenol compounds of red onion peel are quercetin and quercetin derivatives and that extracted pectin is high methoxyl pectin with DE = 53.8 % which is not suitable for making stable hydrogel particles. The biggest share of pectin in alginate-pectin matrices that is still able to make stable hydrogel particle is 40 %. Compared to hydrogel particles formed with pure alginate as matrix, the same formed with alginate-pectin matrices showed better water retention properties, lower elasticity and hardness, were smaller and darker. Also, those particles showed faster release profiles of polyphenols and antioxidant capacity in simulated gastrointestinal conditions.

Keyword: *ionotropic gelation, pectin, polyphenols, quercetin, red onion peel*

Thesis contains: 49 pages, 17 figures, 12 tables, 59 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Draženka Komes, Full professor

Technical support and assistance: Monika Ostrman, MSc

Defence date: September 14th 2018

Sadržaj

1. UVOD.....	2
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Luk (<i>Allium cepa</i> L.)	3
2.2. Polifenolni spojevi ljuske luka	4
2.2.1. Kvercetin	5
2.2.1.1. Pozitivni učinci kvercetina	7
2.3. Inkapsulacija	8
2.3.1. Metode inkapsulacije.....	10
2.3.1.1. Ionsko geliranje.....	11
2.3.2. Materijali za inkapsulaciju.....	12
2.3.2.1. Alginat.....	13
2.3.2.2. Pektini	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. Materijal.....	17
3.1.1. Uzorci.....	17
3.1.2. Kemikalije.....	17
3.1.3. Aparatura i pribor	18
3.2. Metode	20
3.2.1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva.....	20
3.2.2. Karakterizacija polifenolnog ekstrakta	21
3.2.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola.....	21
3.2.2.2. Određivanje antoksidacijskog kapaciteta ABTS metodom.....	22
3.2.2.3. Određivanje antoksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	23
3.2.2.4. Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva ljuske crvenog luka HPLC metodom.....	24
3.2.3. Ekstrakcija pektina.....	26
3.2.4. Karakterizacija pektina	27
3.2.4.1. Određivanje ekvivalentne (molarne) mase i stupnja esterifikacije pektina.....	27
3.2.4.2. Određivanje udjela galakturonske kiseline	28
3.2.4.3. Određivanje pH ekstrahiranog pektina.....	28

3.2.5.	Inkapsulacija ekstrakta ljuske crvenog luka u alginatni i alginatno-pektinske sustave nosača.....	29
3.2.6.	Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika hidrogel čestica.....	30
3.2.6.1.	Određivanje udjela vode u formiranim hidrogel česticama	30
3.2.6.2.	Određivanje veličine pripremljenih hidrogel čestica	30
3.2.6.3.	Određivanje parametara teksture pripremljenih hidrogel čestica.....	31
3.2.6.4.	Određivanje parametara boje hidrogel čestica.....	31
3.2.6.5.	Određivanje učinkovitosti inkapsulacije ekstrakta i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta	32
3.2.6.6.	Praćenje otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima	33
4.	REZULTATI I RASPRAVA	34
4.1.	Karakterizacija polifenolnog ekstrakta ljuske crvenog luka i ekstrahiranog pektina	34
4.2.	Fizikalno-kemijska karakterizacija hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ljuske crvenog luka	35
4.2.1.	Određivanje udjela vode u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ljuske crvenog luka	35
4.2.2.	Određivanje parametara teksture hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ljuske crvenog luka.....	36
4.2.3.	Određivanje parametara boje hidrogel čestica	37
4.2.4.	Određivanje učinkovitosti inkapsulacije ukupnih polifenola ljuske crvenog luka i zadržavanja antoksidacijske aktivnosti	38
4.2.5.	Profil otpuštanja ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ljuske crvenog luka	40
5.	ZAKLJUČCI	43
6.	LITERATURA.....	44

1. UVOD

Zadnjih godina došlo je do promjene svijesti u prehrambenoj industriji i pojave tzv. „zero waste“ načina proizvodnje, odnosno pojavila se težnja za maksimalnim iskorištavanjem nusproizvoda prehrambene industrije, uštedom vode i energije, stalnim recikliranjem te korištenjem novih ambalažnih materijala. Sukladno tome, znanstvenici širom svijeta intenzivno istražuju različite metode ekstrakcije biološki vrijednih spojeva iz agro-otpada, određivanja njihovih zdravstvenih učinaka te inkorporiranja u nove funkcionalne proizvode.

Na svjetskoj razini, 2014. godine proizvedeno je okvirno 86 milijuna tona luka što ga stavlja na treće mjesto u proizvodnji povrća, odmah iza rajčice i kupusa. Nakon primarne obrade luka, zaostaje puno otpada, prvenstveno ljuska, nadzemni dio i korijen te dva mesnata sloja. Procjenjuje se da na razini Europske unije godišnje zaostane 450 000 tona takvog otpada koji se može iskorištavati za ekstrakciju biološki važnih spojeva, pri čemu se uz smanjenje količine takvog otpada, što je od važnosti za zaštitu okoliša, povećava i njegov ekonomski značaj.

Agro-otpad luka bogat je funkcionalnim sastojcima poput vlakana i polifenola, posebice kvercetinских glikozida. Kvercetin je flavonol koji privlači pažnju znanstvenika zbog brojnih pozitivnih utjecaja na zdravlje čovjeka. Prema nekim autorima, kvercetinu i njegovim derivatima pripisuju se protuupalna svojstva, pozitivni utjecaj na mikrobnu aktivnost i povećanje antioksidacijskog kapaciteta te se koristi u prevenciji nekih vrsta karcinoma. Posljednjih godina razvijen je niz metoda ekstrakcije kvercetina iz otpada luka koje uključuju konvencionalne i termalne metode te upotrebu ultrazvuka i mikrovalova (Choi i sur., 2015).

U svrhu zadržavanja stabilnosti izoliranih bioaktivnih spojeva i njihove zaštite od vanjskih utjecaja te dopreme u organizam u aktivnom obliku, uvelike se primjenjuje tehnika inkapsulacije. Radi se o tehnici pakiranja aktivnog sastojka u drugi inertni materijal pri čemu njegova funkcionalna svojstva ostaju sačuvana. Formirani inkapsulirani sustavi sve više se koriste za obogaćivanje različitih prehrambenih proizvoda i razvoj novih funkcionalnih proizvoda.

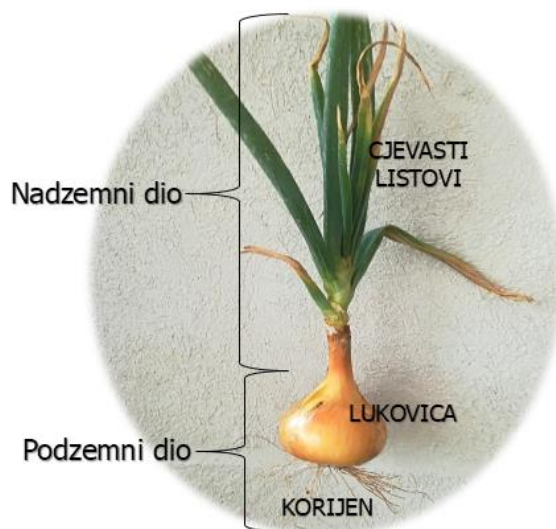
Zbog svega navedenog, u ovom radu će se ekstrahirati polifenolni spojevi ljuske crvenog luka i inkapsulirati u različite sustave nosače. Kao nosači koristit će se čisti alginat te alginatno-pektinski sustavi pripremljeni od pektina ekstrahiranog iz ljuske crvenog luka. Provest će se karakterizacija bioaktivnog potencijala polifenolnog ekstrakta te kemijska karakterizacija pektina. Dobivenim hidrogel česticama odredit će se fizikalno-kemijska svojstva, inkapsulacijska učinkovitost te kinetika otpuštanja ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Luk (*Allium cepa* L.)

Luk (*Allium cepa* L.) je povrće koje se konzumira u velikim količinama, u raznim oblicima. Uzgaja se već više od 4000 godina. Najveći broj varijeteta luka nalazimo na području Mediterana sve do Irana i Afganistana te se upravo taj dio smatra njegovim područjem podrijetla (Lawande, 2012).

Luk ima nadzemni i podzemni dio (Slika 1). Nadzemni dio čine cjevasti listovi, a podzemni se sastoji od plitkog korijena i lukovice koja je sastavljena od više zadebljanih listova postavljenih oko centralnog izdanka. Jestivi dio, lukovica, obično doseže veličinu oko 10 cm u promjeru, može biti različitog oblika (okruglog, jajastog ili izduženog) i različite boje (crvene, bijele ili žute) (Pareek i sur., 2018). Do vremena sjetve, vanjski dijelovi lukovice se osuše i čine tzv. ljusku luka koja se sve više iskorištava kao novi izvor biološki važnih spojeva poput vlakana i polifenola (prvenstveno kvercetina i ostalih flavonoida) (Choi i sur., 2015).



Slika 1. Morfologija luka

Specifičnost luka je njegov okus koji se razlikuje od varijeteta do varijeteta, a ovisi o sumpornim komponentama u njegovom sastavu. Intenzivan specifični miris i okus razlog su zašto se otpad od proizvodnje luka ne koristi kao stočna hrana i gnojivo.

U tablici 1 dane su prosječne vrijednosti sastava luka te se može vidjeti da je voda s udjelom od 88,6 do 92,8 % najzastupljeniji sastojak.

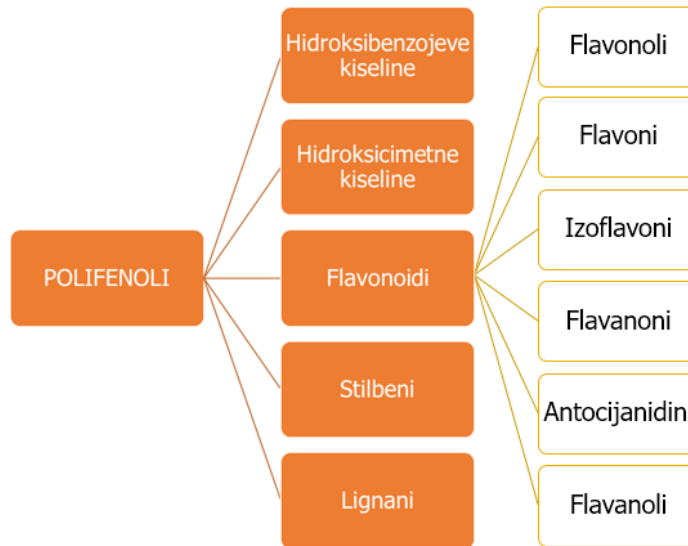
Tablica 1. Prosječne vrijednosti sastava luka (Lawande, 2012)

Sastojak	Udio
Voda	88,6 – 92,8 %
Proteini	0,9 – 16 %
Masti	U tragovima – 0,2 %
Ugljikohidrati	5,2 – 9,0 %
Minerali	0,6 %
Energetska vrijednost	23 – 38 cal 100 g ⁻¹

Proizvodnja luka već godinama raste. Kina je država s najvećom godišnjom proizvodnjom luka od 23 907 509 tona, što čini približno 28 % od ukupne svjetske proizvodnje. Slijedi je Indija s 19 415 425 tona, što čini 22,5 % svjetske proizvodnje (FAO, 2016).

2.2. Polifenolni spojevi ljuske luka

Polifenoli predstavljaju veliku grupu organskih spojeva koji pripadaju skupini sekundarnih biljnih metabolita i prisutni su u svim biljnim tkivima. Osim što su važni zbog fizioloških i morfoloških funkcija biljaka, također doprinose nutritivnoj i senzorskoj vrijednosti istih. Zajedničko im je prisustvo aromatskog prstena s vezanom jednom ili više hidroksilnih skupina (Balasundram i sur., 2006). Polifenoli uključuju nekoliko tisuća spojeva različitih kemijskih struktura, od jednostavnih hidroksimetilnih kiselina i antocijana do složenih flavonoida i tanina. S obzirom na njihovu raznolikost, najčešće se kategoriziraju prema broju ugljikovih atoma u strukturi i biosintetskom porijeklu (Kurtagić, 2017) kao što je prikazano na slici 2.



Slika 2. Podjela polifenolnih spojeva (Hardman, 2014)

Luk sadrži niz polifenolnih spojeva čija konzumacija pogodno utječe na zdravlje čovjeka i smanjuje rizik od nekih bolesti. Zapažen je njihov pozitivan utjecaj na smanjenje širenja stanica raka, povoljan utjecaj na prevenciju kardiovaskularnih bolesti i neurodegenerativnih poremećaja te katarakta (Albishia, 2013).

Polifenolni spojevi iz agro-otpada luka, odnosno iz njegove ljuske sadrže drugačije polifenolne spojeve u odnosu na jestivi dio biljke. Nedavna istraživanja pokazala su kako kvercetin, i u manjoj mjeri njegovi glikozidi koji se nalaze u ljusci luka, čine oko 80 % ukupnih flavonoida prisutnih u luku. Za razliku od jestivog dijela, ljuska sadrži značajno veću količinu flavonoida i to za oko 2 - 10 g kg⁻¹ (Albishia, 2013).

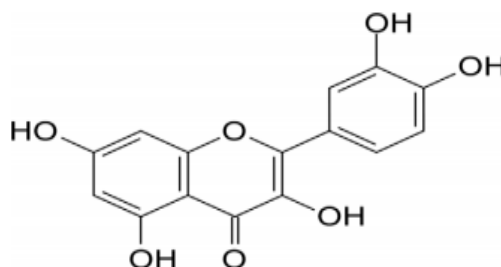
2.2.1. Kvercetin

Kvercetin, polifenolni spoj iz podskupine flavonola smatra se jednim od najvažnijih polifenola u ljudskoj prehrani (Sharma, 2018). Naziv kvercetin koristi se još od 1857. godine, a dolazi iz riječi *quercetum* (hrastova šuma) (D'Andrea, 2015). Opći podaci o kvercetinu dani su u tablici 2.

Tablica 2. Osnovni podaci o kvercetinu (D'Andrea, 2015)

KVERCETIN	
IUPAC naziv	2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksikromen-4-on
Molekulska formula	$C_{15}H_{10}O_7$
Molekulska masa	302,2357 g mol ⁻¹
Fizikalne karakteristike	Žuta igličasta ili praškasta tvar, u alkoholu je vrlo gorkog okusa
Topljivost	Vrlo topljiv u eteru i metanolu, dobro topljiv u etanolu, acetonu, piridinu, octenoj kiselini

Kvercetin se sastoji od tri prstena i pet hidroksilnih grupa. Dva aromatska prstena povezuje treći, centralni prsten s kisikom (Devasena i sur., 2014). Kemijska struktura kvercetina prikazana je na slici 3.



Slika 3. Kemijska struktura kvercetina (Pareek, 2018)

Dobar izvor kvercetina predstavljaju luk, jabuke i vino, a još ga ima i u čaju, papru, korijanderu, komoraču te bobičastom voću (Nabavi i sur., 2015). U tablici 3 dan je kratki prikaz količine kvercetina prisutnog u nekim biljnim namirnicama.

Tablica 3. Udio kvercetina u nekim biljnim namjernicama (Miltonprabu i sur., 2016; D'Andrea, 2015)

Izvor iz hrane	Udio kvercetina (mg/100g)
Kapari	233
Žuta paprika, sirova	50,3
Mango	46,9
Crveni luk, sirovi	39,21
Kakao prah	20
Brusnice	14
Šparoge, kuhane	7,61
Bijeli luk, sirovi	6,17
Borovnice	5,05
Jabuke, Crveni delišes	4,70
Trešnje/Višnje	2,64
Brokula, sirova	2,51
Zeleni čaj	2,69
Crni čaj	1,99

Kvercetin unosimo hranom najčešće u obliku glikozida. Tijekom žvakanja, probave i apsorpcije dolazi do izdvajanja šećernog dijela iz glikozida. Nekoliko je organa uključeno u metabolizam kvercetina, to su jetra, tanko i debelo crijevo te bubrezi. Pripisuju mu se brojni povoljni učinci na zdravlje. S druge strane, tek je nekoliko i uglavnom *in vitro* istraživanja pokazalo negativne učinke kvercetina, uglavnom vezane uz njegov produkt oksidacije, kvercetin-kinon (D'Andrea, 2015).

2.2.1.1. Pozitivni učinci kvercetina

Od brojnih pozitivnih učinaka na zdravlje čovjeka, posebno se ističu njegova antioksidacijska svojstva, protuuplano, neuroprotektivno te antikancerogeno djelovanje (Maturu i sur., 2018). U tablici 4 dan je pregled pozitivnih učinaka kvercetina koji su istraživani kroz zadnjih nekoliko godina.

Tablica 4. Pregled pozitivnih učinaka kvercetina istraživanih kroz zadnjih nekoliko godina

Pozitivan učinak	Testna grupa	Referenca
Reducira nastajanje AGE (engl. <i>advanced glycation end products</i>)	Kruh	Lin i Zhou, 2018
Smanjuje hiperoksično oštećenje pluća kod neonatalnih miševa	Miševi	Maturu i sur., 2018
Ima stimulirajući utjecaj na funkciju testisa i kvalitetu spermija	Štakori	Adedara i sur., 2017
Sprječava oštećenje jetre kod oboljelih od dijabetesa tipa I	Štakori	Maksymchuk i sur. 2017
Smanjuje upale kod reumatoidnog artritisa	Miševi	Haleagraharaa i sur., 2017
Smanjuje probleme pankreatitisa povezanog s hipertrigliceridemijom	Štakori	Zheng i sur., 2016

Kvercetin je poznati antioksidans, ima sposobnost vezanja slobodnih radikala i iona prijelaznih metala. Također, dobar je inhibitor lipidne peroksidacije koja može izazvati kardiovaskularne i neurodegenerativne promjene. Vezanjem slobodnih radikala, kvercetin djeluje protuupalno. Neka istraživanja pokazala su da kvercetinski aglikoni mogu zaštititi eritrocite od slobodnih radikala uzrokovanih pušenjem te da djeluje preventivno na povećanje oksidacijskog stresa uzrokovanog tjelovježbom (D'Andrea, 2015). Razna istraživanja pokazala su da kvercetin usporava rast stanica raka debelog crijeva, dojki, prostate, mozga, jetre, pluća, želuca i drugih tkiva (Gupta i sur., 2016). Također, inhibira nakupljanje masnih stanica tako da blokira unos glukoze iz krvi (Gupta i sur., 2016). Neka su istraživanja pokazala njegov pozitivan učinak na astmu, artritis, dijabetes, fizičke performanse i poremećaje raspoloženja (D'Andrea, 2015; A. Gupta i sur., 2016).

2.3. Inkapsulacija

Tehnika inkapsulacije izvorno se razvila za potrebe farmaceutske industrije gdje je i danas vrlo zastupljena, no u posljednje se vrijeme često primjenjuje i u prehrambenoj industriji. U suvremenoj prehrambenoj industriji inkapsuliraju se tvari za podešavanje okusa, boje ili teksture nekog proizvoda, dok najnoviji trend uključuje inkapsulaciju funkcionalnih sastojaka (poput

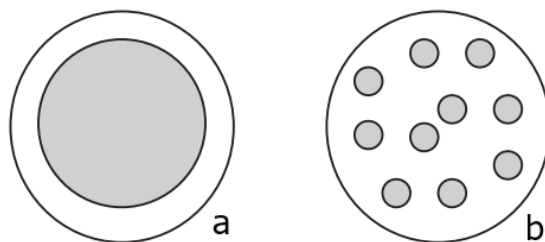
bioaktivnih tvari i probiotika) koji pogoduju zdravlju potrošača (Đorđević i sur., 2014; Kuang i sur., 2010).

Inkapsulacija se može definirati kao tehnika „pakiranja“ jedne tvari (prahova, kapljica tekućina ili plinova) unutar druge, inertne tvari, prilikom čega nastaju čestice veličine od nekoliko nm do nekoliko mm. Tvar koja se inkapsulira zove se punjenje (ili aktivna tvar, jezgra, unutarnja faza), a tvar u koju se inkapsulira zove se nosač (ili ljuska, membrana, vanjska faza, matrica). Nosač treba imati GRAS status ("generally recognized as safe") i biti u mogućnosti stvoriti barijeru između punjenja i okoline (Zuidam i Shimoni, 2010; Dias i sur., 2015). Fizikalna i kemijska svojstva nosača određuje brzinu oslobađanja aktivnih sastojaka u specifičnim okolišnim uvjetima (Kuang i sur., 2010).

Neki od razloga za primjenu inkapsulacije u prehrambenoj industriji su:

- Zaštita nestabilnih spojeva od okolišnih uvjeta i uvjeta proizvodnje
- Kontrolirano i ciljano oslobađanje sastojaka punjenja
- Maskiranje nepoželjnih okusa i mirisa
- Bolji uvjeti proizvodnje i prihvatljiviji krajnji proizvod (stabilnost, topljivost, disperzibilnost, protočnost)
- Lakše rukovanje opasnim tvarima (Kuang i sur., 2010; Zuidam i Shimoni, 2010)

Morfološki razlikujemo dvije vrste inkapsuliranih čestica: a) akumulacijski sustav i b) sustav tipa matrice koji su prikazani na slici 4. Čestice mogu, osim kugličnog, biti i sferičnog te nepravilnog oblika što zavisi o fizikalno-kemijskim svojstvima punjenja i nosača (Kuang i sur., 2010).



Slika 4. Morfologija inkapsuliranih čestica: a) akumulacijski sustav, b) sustav tipa matrice (Kuang i sur., 2010)

Čestice akumulacijskog tipa kapsula su načinjene od dva dijela, vanjskog nosača (ljuske) i unutarnjeg punjenja (aktivne tvari). U sustavu tipa matrice, aktivne tvari su heterogeno dispergirane ili mikroinkapsulirane u čvrsti nosač (Kuang i sur., 2010).

Prema istraživanju Dias i suradnika (2015), postoji više znanstvenih radova s temom implementacije inkapsuliranih čestica u prehrambeni proizvod koji pokazuju kako su mlijeko i mliječni proizvodi poput jogurta, sira i sladoleda pogodan materijal za primjenu u praksi. Također, navodi se kako se inkapsulirane čestice mogu primijeniti i u proizvodnji kruha, žitarica i pašta te čajeve, juha i mesa.

2.3.1. Metode inkapsulacije

Metode inkapsulacije zadnjih godina predstavljaju predmet brojnih istraživanja pa se njihov broj značajno povećao. Neke se već primjenjuju na industrijskoj razini, a neke trebaju biti detaljnije istražene. Razlike u metodama inkapsulacije rezultiraju nastajanjem čestica različitih fizikalnih i mehaničkih svojstava. Te razlike se povezuju s promjenama u kinetici otpuštanja aktivnih tvari (Kuang i sur., 2010). Prema Trifković i suradnicima (2016) i Đorđević i suradnicima (2015) metode inkapsulacije mogu se kategorizirati kako je prikazano na slici 5.

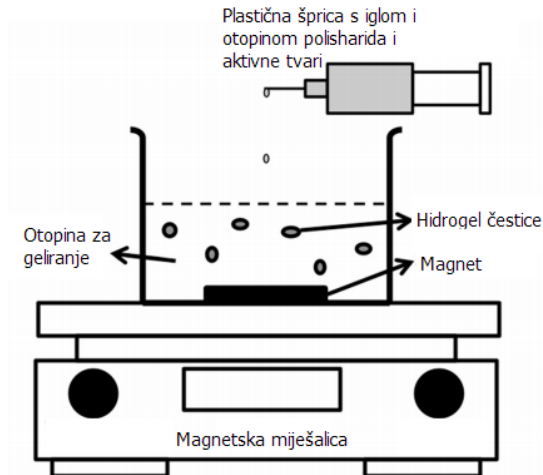


Slika 5. Klasifikacija metoda inkapsulacije

U inkapsulaciju raspršivanjem ubrajaju se sušenje raspršivanjem, raspršivanje hlađenjem i oblaganje raspršivanjem. Ove su metode dobro istražene jer većina aktivnih tvari dolazi u obliku tekućine koja treba biti osušena. Metode ekstruzije uključuju kapanje pripremljene otopine nosača i aktivne tvari u otopinu za geliranje pri čemu kapljice očvrstnu. Problem ove metode je mali proizvodni kapacitet, nedovoljan za industrijske uvjete. S druge strane, metode temeljene na koacervaciji predstavljaju obećavajući način inkapsulacije primjenjiv za industrijskoj razini. Kompleksna koacervacija uključuje nekoliko tipova polimera od kojih se kombinacija želatine i gume arabike najčešće koristi. Kod metoda koje uključuju stvaranje emulzija, najčešće se miješa slabo hidrofobni polimer u vodi uz dodatak gelirajućeg sredstva. Postoje dva načina proizvodnje takvih čestica: emulzija ulje u vodi i emulzija voda u ulju. Zbog svoje strukture, liposomi su u mogućnosti inkapsulirati hidrofilne i hidrofobne tvari kao i one amfipatske pa su zanimljivi kako prehrambenoj tako i farmaceutskoj industriji. Ciklodekstrini su prirodni oligosaharidi koji nalikuju praznim kapsulama u koje može biti umetnuta tzv. „molekula gosta.“ Inkapsulacija u kvasce primjenjiva je u prehrambenoj industriji za stabilizaciju aroma i antioksidanasa tijekom skladištenja u uvjetima velike vlage ili visokih temperatura (Trifković i sur., 2016; Đorđević i sur., 2015).

2.3.1.1. Ionsko geliranje

Ionsko geliranje je metoda inkapsulacije koja se zasniva na principu ekstruzije vodene otopine polimera s otopljenim ili dispergiranim aktivnim sastojcima koja kroz iglu štrcaljku kaplje u otopinu za geliranje pri čemu kapljice očvršćuju i nastaju sferične hidrogel čestice (Munin i Edwards-Lévy, 2011). Pripremljena otopina nosača i aktivne tvari jednostavno se ukapava u otopinu za geliranje. Na vrhu igle stvara se sitna kap koja pada u otopinu za geliranje kada gravitacijska sila prevlada silu površinske napetosti. Padanjem, kap poprima sferični oblik i kemijskim reakcijama u otopini za geliranje konačno očvrstne. Glavni čimbenik koji određuje veličinu čestica je promjer otvora igle (Đorđević i sur., 2015). Metoda inkapsulacije ionskim geliranjem ne zahtjeva specifičnu opremu i prikazana je na slici 6. Ova metoda se provodi pri relativno blagim uvjetima, bez upotrebe štetnih otapala pa se često koristi za inkapsulaciju termolabilnih tvari i živih stanica (Đorđević i sur., 2015).



Slika 6. Shematski prikaz pripreme hidrogel čestica metodom ionskog geliranja (Patel i sur., 2016)

Od nosača koji se koriste posebno su zanimljivi polisaharidi poput alginata, kitozana, *kappa*-karagenana i gelan gume zbog svojih tehnoloških karakteristika i posjedovanja GRAS statusa (Đorđević i sur., 2015). Sustav kalcij-alginat najpoznatiji je sustav za pripremu hidrogel čestica metodom ionskog geliranja. Inkapsulirati se može velik broj različitih tvari poput uljnih kapljica s aromama, stanice, probiotici, kvasci i enzimi (Zuidam i Shimoni, 2010).

2.3.2. Materijali za inkapsulaciju

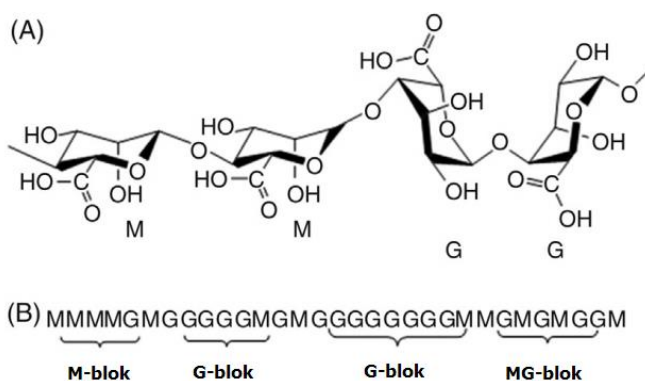
Prilikom odabira materijala za inkapsulaciju (nosača) važno je uzeti u obzir senzorske i estetske karakteristike materijala, njegovu kompatibilnost s aktivnom tvari, nutritivne vrijednosti te mehaničke karakteristike. Također, treba voditi računa o procesnim svojstvima materijala, uvjetima skladištenja i načinima oslobađanja punjenja (Augustin i sur., 2001). Općenito se svi nosači mogu podijeliti u dvije grupe, hidrofilne i hidrofobne. Osim upotrebe različitih nosača, mogu se varirati i njihove koncentracije. Podešavanjem koncentracije otopine nosača podešava se profil otpuštanja aktivnih tvari iz punila (Kuang i sur., 2010). Najčešće korišteni nosači su alginati i pektini (Ota i sur., 2017), a primjeri inkapsulacije bioaktivnih sastojaka u različite nosaše dani su u tablici 5.

Tablica 5. Primjeri inkapsulacije bioaktivnih tvari u sustave nosača na bazi alginata i pektina

Aktivna tvar	Metoda inkapsulacije	Nosač	Referenca
Polifenoli maslačka	Ionsko geliranje	Alginat pojačan proteinima sirutke, kakao prahom i rogačem	Bušić i sur., 2018
Antocijani borovnice	Sušenje raspršivanjem	Pektin	Mueller i sur., 2017
Pantotenska kiselina	Inkapsulacija u liposome, ionsko geliranje	Alginat, alginat - pektin	Ota i sur., 2017
Ekstrakt šafrana	Emulgiranje	Pektin – protein sirutke	Faridi Esfanjani i sur., 2017
Polifenoli maslačka	Ionsko geliranje	Alginat, pektin	Belščak-Cvitanović i sur., 2016
Polifenoli kakaovca	Ionsko geliranje, emulgiranje	Alginat	Lupo i sur., 2014
Ekstrakt sjemenki tajlandskog manga	Ionsko geliranje	Pektin	Nithitanakool i sur., 2013

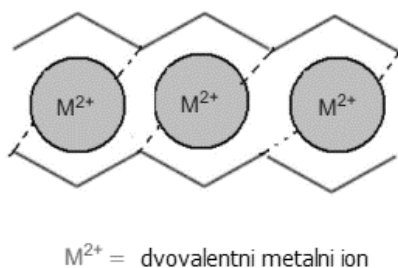
2.3.2.1. Alginat

Alginat je prirodni polisaharid dobiven iz stjenki smeđih algi koji se kemijski sastoji od α -L-guluronske kiseline (G monomer) i β -D-manuronske kiseline (M monomer) koje se nižu u promjenjivim frakcijama G-G, M-M i M-G povezanim 1, 4-glikozidnim vezama (Qin i sur., 2018; Hasnain i Nayak, 2018) što je prikazano na slici 7. Redoslijed monomera M i G može biti različit ovisno o vrsti alge, ali i u različitim tkivima iste vrste (Fertah, 2017).



Slika 7: Kemijska struktura (A) i shematski prikaz (B) molekule alginata (Qin i sur., 2018)

Pojam *alginat* se odnosi na sve derivate alginske kiseline te na nju samu (Fertah, 2017). Natrijev alginat, sol alginske kiseline komercijalno je dostupan prah koji se otapa u vodi i daje viskozne otopine. Natrijev alginat gelira u vodenoj otopini uspostavljajući ionske interakcije s različitim dvovalentnim i trovalentnim ionima (poput Ca^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+}). Metalni ioni reagiraju s karboksilnim grupama alginata i ugrađuju se u njegovu strukturu stvarajući novu, karakterističnu strukturu nalik „kutiji za jaja“ („egg box“ model) (Hasnain i Nayak, 2018) prikazanoj na slici 8. Daleko najkorišteniji ion za umrežavanje s alginatom je Ca^{2+} zbog svoje netoksičnosti i jednostavnosti primjene (Pawar, 2017). Ovo svojstvo omogućuje inkapsulaciju molekula većih i manjih molekulskih masa, a kinetika oslobađanja aktivnih tvari ovisi o pH otopine s kojom su čestice u kontaktu (Patel i sur., 2016).



Slika 8. Model „kutije za jaja“ s dvovalentnim metalnim ionima (Hasnain i Nayak, 2018)

Zbog svojstva alginata da ugušćuju vodene otopine, da geliraju u prisustvu metalnih iona bez zagrijavanja te da stvaraju filmove, alginati se u značajnoj mjeri koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj, tekstilnoj i drugim industrijama. Njihovo svojstvo geliranja pri niskim temperaturama smatra se idealnim za inkapsulaciju enzima, cijelih stanica ili živih probiotika (Qin i sur., 2018).

Međutim, struktura nastalih alginatnih čestice je vrlo porozna radi čega punilo brzo difundira u okolni prostor. Takvo svojstvo ograničava upotrebu čistog alginata kao nosača pa se on često kombinira s nekim drugim prirodnim polimerima u svrhu stvaranja nosača boljih karakteristika (Bušić, 2018).

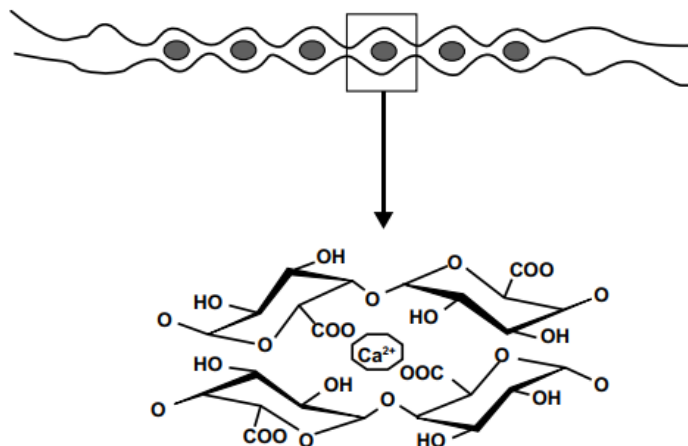
2.3.2.2. Pektini

Pektin je jedan od najsloženijih prirodnih ugljikohidrata koji se uglavnom nalazi u staničnim stjenkama viših biljaka (Baldassarre i sur., 2017) s najvećom koncentracijom u središnjoj lameli. Nezreli pektin većinom je u formi protopektina koji je u vodi netopljiv (Mu i sur., 2017).

Pektin se uglavnom sastoji od D-galakturonskih kiselina međusobno povezanih α -(1,4)-glikozidnim vezama. Razlikujemo dva dijela, homogalakturonanski dio pektina koji je građen od D-galakturonske kiseline i ramnogalakturonanski dio kojeg čine galakturonska kiselina isprepletena s ostacima ramnoze povezane s bočnim lancima šećera. Kompleksnost strukture pektina ovisi o njegovom izvoru. Prema FAO (Organizacija za prehranu i poljoprivredu), samo se pektini s udjelom galakturonske kiseline većim od 65 % ubrajaju u aditive (Baldassarre i sur., 2017; Mu i sur., 2017).

Lanci poligalakturonske kiseline mogu biti djelomično esterificirani metilnim skupinama dok slobodne kiseline mogu biti djelomično ili potpuno neutralizirane natrijevim, kalijevim i amonijevim ionima. S obzirom na stupanj esterifikacije (DE) razlikujemo viskometilirane (VM) i niskometilirane (NM) pektine. Kod VM je više od 50 % karboksilnih grupa metilirano ($DE > 50\%$) dok za NM taj broj iznosi manje od 50 % ($DE < 50\%$).

Stupanj esterifikacije određuje mehanizam geliranja. VM pektini geliraju u toploj vodi ili vodenoj otopini čije je raspon pH vrlo uzak i kreće se oko 3,0. Često je potrebno dodati disperzno sredstvo kako bi se spriječilo njegovo nakupljanje u grudice. VM pektini geliraju u prisustvu šećera i kiselina. NM pektini geliraju neovisno o koncentraciji šećera i nisu toliko osjetljivi na pH, ali da bi gelirali moraju biti u prisutnosti određene količine kalcija ili drugog dvovalentnog kationa. Radi se o već poznatom modelu geliranja pod nazivom „kutija za jaja“ (Sundar Raj, 2012; Yang i sur, 2017) gdje dolazi do ionskih interakcija između karboksilnih grupa poligalakturonske kiseline u molekuli pektina i dvovalentnog kationa Ca^{2+} kako je prikazano na slici 9.



Slika 9. Shematski prikaz modela „kutija za jaja“ (Sundar Raj, 2012)

Danas se komercijalni pektin uglavnom proizvodi iz kore citrusa i pulpe jabuka, a NM pektini se na industrijskoj razini dobivaju iz VM pektina procesom deesterifikacije (Zhao i sur., 2018; Yang i sur., 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

3.1.1. Uzorci

U ovom radu, za ekstrakciju pektina i polifenolnih spojeva korištena je ljuska crvenog luka, prikupljena kao otpad studentske menze „Superfaks“ tijekom 2017. godine. Ljuska luka je odmašćena i usitnjena u električnom mlincu te prosijana radi postizanja ujednačene veličine čestica.

Pripremljeni polifenolni ekstrakt inkapsuliran je ionskim geliranjem, a kao nosač za inkapsulaciju korištena je natrijeva sol alginske kiseline iz smeđih algi, niske viskoznosti (Sigma-Aldrich Company Ltd. (Dorset, UK)) te pektin ekstrahiran iz ljuske crvenog luka.

3.1.2. Kemikalije

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

Priprema ekstrakta i ekstrakcija pektina

- Etanol (96 %-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Aceton, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Inkapsulacija

- Natrijev alginat, Sigma-Aldrich Company Ltd. (Dorset, UK)
- Pektin ekstrahiran iz uzorka (ljuska crvenog luka)
- Kalcijev klorid, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Karakterizacija hidrogel čestica

- Natrijev citrat, T.T.T. d.o.o. (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Natrijev klorid, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

- Koncentrirana klorovodična kiselina, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Dinatrij hidrogen *o*-fosfat bezvodni, Fisher Chemical (Loughborough, UK)
- Natrij dihidrogenfosfat-dihidrat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Kvarcni pjesak (oprani i žareni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela ukupnih polifenola

- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 20%-tna otopina natrijevog karbonata (Na₂CO₃), Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

- Etanol (96 %-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- 140 mM otopina kalijevog persulfata, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- 7 mM otopina 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeve soli (ABTS), Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

- Metanol, Mallinckrodt Baker B.V. (Amsterdam, Nizozemska)
- 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH), Fluka (St. Gallen, Švicarska)

Određivanje pojedinačnih polifenola HPLC metodom

- Redestilirana voda, AQUA pro injectione (Zagreb, Hrvatska)
- *o*-fosforna kiselina, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Metanol, Mallinckrodt Baker B.V. (Deventer, Nizozemska)

3.1.3. Aparatura i pribor

Priprema ekstrakta

- Čaša volumena 750 mL
- Menzura volumena 500 mL
- Magnetna miješalica, IKA C-Mag HS 7 (Staufen, Njemačka)

- Aparatura za vakuum filtraciju (odsisna boca, Buchnerov lijevak, filter papir, izvor vakuuma)
- Rotavapor, Buchi Heating Bath B-490 (Hampton, SAD)

Priprema pektina

- Duran boce volumena 1 L i 5 L, menzure volumena 500 mL
- Lijevak, termometar
- Vodena kupelj, Elmasonic S 60 H (Singen, Njemačka)
- pH metar, Mettler Toledo (Zagreb, Hrvatska)
- Aparatura za vakuum filtraciju
- Falcon tubice za centrifugiranje
- Uređaj za centrifugiranje, Thermo Scientific (Waltham, SAD)
- Plastična čaša volumena 5L
- Magnetska miješalica, IKA C-Mag HS 7 (Staufen, Njemačka)
- Membrane za dijalizu
- Rotavapor, Buchi Heating Bath B-490 (Hampton, SAD)
- Električni mlin, United Favour Development (Kowloon, Hong Kong)

Inkapsulacija

- Plastične šprice volumena 2 i 5 mL
- Igle 27G (0,4x13)
- Staklene čaše volumena 50 - 250 mL
- Magnetska miješalica, IKA C-Mag HS 7 (Staufen, Njemačka)

Karakterizacija čestica

- Aluminijske posudice s poklopcima, termometar, eksikator
- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Laboratorijski sušionik, Tehnica (Železniki, Slovenija)
- Magnetska miješalica, IKA C-Mag HS 7 (Staufen, Njemačka)
- Dino-Lite kalibracijska pločica (minimalni razmak=0,2 mm) (Naarden, Nizozemska)
- TA.HDPlus analizator teksture, Stable Micro Systems (Cardiff, UK)
- Cilindrična čelična sonda P/2, Stable Micro Systems (Cardiff, UK)

- Kolorimetar, CM – 700d, CM – A177, Konica Minolta (Tokio, Japan)

Spektrofotometrijske analize

- Staklene epruvete
- Staklene čaše volumena 250 mL
- Staklene menzure volumena 50 mL i 100 mL
- Automatske mikropipete volumena 100-1000 μ L (Gilson, SAD)
- Staklene pipete volumena 5 mL i 10 mL, propipete
- Odmjerne tikvice volumena 50 i 100 mL
- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Kiveta (10 mm) za spektrofotometrijsko mjerenje
- Spektrofotometar Helios γ , ThermoSpectronic (Cambridge, UK)

HPLC analiza

- Celulozno acetatni mikrofilteri veličine pora 0,45 μ m (CA-45/24), Machery-Nagel (Düren, Njemačka)
- HPLC viala s pripadajućim navojnim čepovima sa septom, Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)
- HPLC sustav Agilent 1200 Series (tekućinski kromatograf visoke učinkovitosti s PDA ("Photo Diode Array") detekcijom), Agilent Technologies (Santa Clara, SAD)
- HPLC kolona ACE C-18 Column (250 x 4,6 mm, 5 μ m), Advanced Chromatography Technologies (Aberdeen, Škotska)

3.2. Metode

3.2.1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva

Ekstrakt crvenog luka pripremljen je prelijevanjem 50 g usitnjenog i odmašćenog uzorka s 500 mL 70 %-tnog etanola (1:10). Ekstrakcija se provodila 30 minuta na sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje na magnetnoj miješalici. Po isteku vremena, uzorak je profiltriran na vakuum filteru te je talog ekstrahiran ponovno dva puta. Filtrat bogat kvercetinском frakcijom,

skupljen nakon sve tri ekstrakcije je uparen i potom razrijeđen destiliranom vodom u omjeru 1:1.

3.2.2. Karakterizacija polifenolnog ekstrakta

3.2.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Princip metode:

Metoda za određivanje ukupnih polifenola (UP) temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteau reagensa s nekim reducirajućim reagensom (fenoli). Smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline ili Folin-Ciocalteau reagens reagira s fenoksidnim ionom iz uzorka pri čemu dolazi do oksidacije fenoksidnog iona i redukcije Folin-Ciocalteau reagensa u plavo obojene volframove i molibdenske okside (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Reakcija traje 2 sata unutar kojih svi fenolni spojevi iz uzorka reagiraju s Folin-Ciocalteau reagensom. Intenzitet plavog obojenja se odredi spektrofotometrijski pri 765 nm (Ough i Amerine, 1988) pri čemu vrijedi da je intenzitet plavog obojenja proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

Postupak:

U staklene epruvete otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100 μ L uzorka, 500 μ L Folin-Ciocalteau reagensa koji je razrijeđen u omjeru 1:2 te 1,5 mL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3). Reakcijsku smjesu potrebno je dobro izmiješati i ostaviti 2 sata na sobnoj temperaturi. Po isteku vremena izmjeri se apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorci, ali umjesto 100 μ L uzorka sadrži isti volumen destilirane vode. Apsorbanciju slijepa probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi u daljnjem izračunu.

Udjel ukupnih polifenola izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

$$y = 0,0010x - 0,0001$$

gdje su:

x – udjel ukupnih polifenola (mg/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm

Udjel ukupnih polifenola u uzorku se određuje iz baždarne krivulje koja je konstruirana za standard galne kiseline i prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg/L). Određivanje ukupnih polifenola izvodi se u dvije paralelne probe (n=2), a rezultati se izražavaju kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama, u mg ekvivalentima galne kiseline (EGK)/g uzorka. Ako je u postupku korišten razrijeđen uzorak, dobivene vrijednosti moraju se pomnožiti s faktorom razrijeđenosti originalnog uzorka (razrjeđenjem).

3.2.2.2. Određivanje antoksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Princip metode:

Nekoliko sati prije same analize provodi se kemijska ili enzimaska oksidacija ABTS otopine pri čemu se razvija plavo-zeleni radikal-kation 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline), odnosno ABTS radikal-kation. Sama metoda temelji se na "gašenju" tog radikal-kationa. Za oksidaciju otopine ABTS-a koristi se otopina kalijevog persulfata, pri čemu se maksimum apsorbancije dostiže na valnim duljinama od 645 nm, 734 nm ili 815 nm. Dodatak antioksidansa iz uzorka rezultira redukcijom prethodno generiranog ABTS radikala, što ovisi o vremenu i mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije 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:

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 te otopine pomiješa se 88 µL otopine kalijevog persulfata (140 mM) te nadopuniti sa otopinom ABTS (7 mM) reagensa do volumena 5 mL. ABTS i kalijev persulfata reagiraju u stehiometrijskom odnosu 1:0,5 pa je pripremljenu otopinu potrebno omotati folijom i ostaviti stajati preko noći (12-16h) na sobnoj temperaturi kako bi došlo do potpune oksidacije. 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 μL uzorka pomiješa se s 4 mL pripremljenog ABTS+ radikala te se tako pripremljena smjesa ostavi stajati u mraku točno 6 minuta nakon čega se izmjeri apsorbancija na 734 nm. Prije mjerenja uzorka potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se, umjesto uzorka, 40 μL 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:

$$y = 0,303x + 0,0006$$

gdje su:

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

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm.

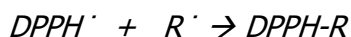
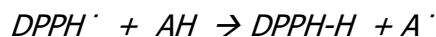
Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol/L), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom provodi se u dvije paralelene probe ($n = 2$),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

3.2.2.3. Određivanje antoksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Princip metode:

Ova se metoda temelji na redukciji DPPH radikla (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, koja je popraćena kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal radi nesparenog 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

što uzrokuje promjenu boje iz otopine iz ljubičaste u žutu što se prati mjerenjem apsorbancije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995).



Postupak:

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U epruvetu se otpipetira 100 μ L razrijeđenog uzorka i doda 3,9 mL otopine DPPH. U slijepu probu, umjesto uzorka doda se 100 μ L metanola. Nakon 30 minuta stajanja u mraku izmjeri se apsorbancija pri 515 nm.

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 (mmol Trolox-a).

Jednadžba baždarne krivulje:

$$y = 0,603x - 0,006$$

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 Troloxa/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 polifenolnih spojeva ljuske crvenog luka HPLC metodom

Pojedinačni polifenolni spojevi određeni su u ekstraktu ljuske crvenog luka kao i u citratnoj otopini razbijenih čestica primjenom HPLC metode (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti).

Priprema uzorka:

Ekstrakt ljuske crvenog luka je prije injektiranja u kromatografski sustav razrijeđen u omjeru 1:10 te profiltriran kroz celulozno-acetatni mikrofilter veličine pora 0,45 μm .

Otopine razbijenih čestica su razrijeđene s metanolom u omjeru 1:1 pri čemu je došlo do precipitacije polisaharida. Otopine su centrifugirane, a supernatant je profiltriran kroz odgovarajuće mikrofiltere prije samog injektiranja. U kromatografski sustav injektirano je 10 μL takvog uzorka te je provedena analiza pri niže opisanim uvjetima.

Postupak rada:

HPLC analiza ekstrakta ljuske crvenog luka i otopine razbijenih čestica provedena je kromatografijom obrnutih faza na ACE C-18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) koloni prema metodi Belščak-Cvitanović i sur. (2016) metodom obrnutih faza pri čemu je kolona punjena nepolarnom stacionarnom fazom.

Mobilna faza: A - 2% mravlja kiselina u vodi

B - 2% mravlja kiselina u acetonitrilu

Protok: 1 mL min⁻¹

Eluiranje: gradijentno

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

Temperatura kolone: sobna

Vrijeme trajanja anlike: 45 minuta (+ 5 min Post Time).

Tablica 6. Gradijent otapala za HPLC analizu polifenolnih spojeva

t (min)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)
0	90	10
25	60	40
45	30	70

Identifikacija i kvantifikacija detektiranih spojeva:

Bioaktivni spojevi iz uzoraka su detektirani snimanjem eluata pri valnoj duljini 278 nm (UV područje) pomoću Photo Diode Array (PDA) detektora pri čemu su dobiveni karakteristični kromatogrami uzoraka. Izdvojeni spojevi detektirani su PDA detektorom pri valnim duljinama od 200 do 400 nm, uz rezoluciju od 1,2 nm. Spojevi su identificirani usporedbom vremena

zadržavanja (Rt) izdvojenih pikova na kromatogramima s vremenima zadržavanja vanjskih standarda i usporedbom u UV-spektrima te su kvantitativno određeni pomoću jednadžbi baždarnih pravaca pojedinog standarda (tablica 7).

Tablica 7. Baždarni pravci identificiranih bioaktivnih spojeva u ispitivanim uzorcima

Spoj	Jednadžba baždarnog pravca
Protokatehinska 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	$y = 15,913x + 11,838$

Opisane HPLC analize provedene su u dvije paralelne probe, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom u mg/g uzorka. Prikupljanje i obrada podataka provedena je aplikacijom Star Chromatography Workstation Version 5, a rezultati su obrađeni u programu Microsoft Office Excel.

3.2.3. Ekstrakcija pektina

Pektin je ekstrahiran iz osušenog taloga (sušenje izmjenom otapala, dva puta po 700 mL 96 % etanola, a potom s 400 mL acetona) koji je dobiven nakon ekstrakcije alkoholno topivih sastojaka iz ljuske crvenog luka 70 %-tnom otopinom etanola.

Potpuno suhi talog kiselinski je hidroliziran primjenom klorovodične kiseline (pH=1,5) u omjeru 1:25, tj. 20 grama uzorka preliveno je s 500 mL prethodno pripremljenog HCl-a te stavljeno u vodenu kupelj na 90 °C kroz 2 sata, uz povremeno miješanje svakih 15 do 20 minuta. Nakon kiselinske hidrolize, uzorak je ohlađen i filtriran preko Büchnerovog lijevka.

Dobiveni filtrat je u slijedećem koraku pomiješan s 4 puta većim volumenom 96 %-tnog etanola te je ostavljen preko noći u hladnjaku kako bi pektin precipitirao. Precipitirani pektin je profiltriran, centrifugiran i homogeniziran s minimalnom količinom destilirane vode. Homogenizat

je stavljen na dijalizu, a po završetku dijalize uparen na rotavaporu na približno 1/6 početnog volumena. Tako dobiveni upareni uzorak zamrznut je na -80 °C te sušen liofilizacijom.

Dobiveni uzorak pektina usitnjen je u električnom mlincu u rastresiti i voluminozni prah.

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, 1 g natrijevog klorida (NaCl) te odmjerenom 5 mL 96 %-tnog etanola i 100 mL destilirane vode. Sve je miješano na magnetskoj miješalici do potpunog otapanja pektina. Smjesa se potom titrira 0,1 M otopinom natrijeva hidroksida (NaOH) do pH = 7,5 i očitava se volumen utrošenog NaOH te se ekvivalentna masa (EW u g/mol) izračuna prema formuli (Aina i sur., 2012):

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

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

U neutraliziranu otopinu pektina, uz miješanje dodano je 25 mL 0,25 M otopine NaOH. Pripremljena otopina stoji 30 minuta, a po isteku vremena u nju je dodano 25 mL 0,25 M otopine klorovodične kiseline (HCl). Provedena je titracija s 0.1 M otopinom NaOH do pH =7,5. Očitana je volumen utrošenog titranta te je izračunat stupanj esterifikacije (DE (%)) prema sljedećem izrazu (Aina i sur., 2012):

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

gdje su:

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 ekstrahiranog iz ljuske crvenog luka, epruveta je stavljena u hladnu vodenu kupelj te je dodan 1 mL koncentrirane sumporne kiseline. Otopina je miješana 5 minuta staklenim štapićem, a potom je dodan još 1 mL koncentrirane sumporne kiseline i otopina je ponovno miješana u hladnoj kupelji staklenim štapićem. Zatim je dodano 0,5 mL vode i otopina se nastavila miješati idućih 5 minuta. Postupak dodavanja vode je ponovljen još jednom. Sadržaj epruvete razrijeđen je vodom u odmjernoj tikvici od 10 mL, a potom prenesen u Falcon epruvete od 15 mL te je centrifugiran 10 min na 2000 rpm.

U tri epruvete za svaki uzorak uzimano je 400 μ L alikvota iz supernatanta, zatim je dodano 40 μ L 4 M otopine H_3NSO_3 u sve epruvete te snažno miješano na Vortex-u. Potom je u sve epruvete dodano 2,4 mL 75 mM otopine $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ i ponovo snažno miješano na Vortex-u. Epruvete su stavljene u vodenu kupelj na 100 °C 20 minuta, a po isteku vremena hladene su pod mlazom hladne vode.

U dvije epruvete dodano je 80 μ L *m*-hidroksidifenilne otopine, a u treću jednaki volumen 0,5 %- tne otopine NaOH pa su otopine ponovno miješane na Vortex-u. Nakon 5-10 minuta razvije se ružičasta boja otopine te se mjeri apsorbancija na 525 nm. Iz dobivenih vrijednosti konstruira se baždarni pravac za određivanje udjela galakturonske kiseline, izražene u %. (Melton i sur., 2001).

3.2.4.3. *Određivanje pH ekstrahiranog pektina*

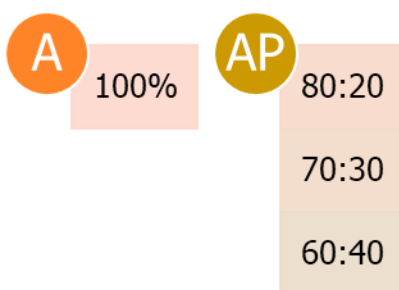
Prije samog mjerenja pH ekstrahiranog pektina, pH-metar () je potrebno kalibrirati u dvije točke (4,01 i 9,21) standardnim otopinama poznatog pH. Nakon kalibracije mjeri se pH pektina u dvije paralelne probe, a rezultat se izražava kao srednja vrijednost uz pripadajući standardnu devijaciju.

3.2.5. Inkapsulacija ekstrakta ljuske crvenog luka u alginatni i alginatno-pektinske sustave nosača

Za formiranje nosača na bazi alginata korišteni su prirodni bilopolimeri: alginat niske viskoznosti (A) i pektin (P) izoliran iz ljuske crvenog luka. Otopine alginata i pektina pripremljene su u koncentracijama od 4% (w/v). Navedeni nosači otapani su u ekstraktu ljuske crvenog luka, homogenizirani na magnetskoj miješalici te pomiješani u zadanom odnosu pri čemu su formirani sljedeći sustavi nosača:

- Čisti alginat: A (4%, w/v)
- Alginat i pektin: AP (80:20; 70:30; 60:40, w/w)

Četiri različita sustava nosača s imobiliziranim ekstraktom ljuske crvenog luka prikazana su na slici 10.



Slika 10. Prikaz formuliranih alginatnog i alginatno-pektinskih sustava nosača s inkapsuliranim ekstraktom ljuske crvenog luka

Otopina za geliranje pripremljena je otapanjem 3 %-tnog kalcijevog klorida (CaCl_2) u ekstraktu ljuske crvenog luka (w/v).

Čestice su formirane ionskim geliranjem tako da su sustavi nosača u ekstraktu ukapavani u otopinu za geliranje pomoću plastične šprice i igle od 27G (0,4 x 13 mm). Kako bi došlo do očvršćivanja kapi i formiranja njihovog sferičnog oblika, otopina za geliranje se cijelo vrijeme miješa na magnetskoj mješalici, a po završetku ukapavanja, nastavljeno je miješanje kroz dodatnih 30 minuta. Kad su čestice očvrstnule, profiltrirane su iz otopine za geliranje i spremljene u ekstraktu na +4 °C do analize.

3.2.6. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika hidrogel čestica

3.2.6.1. *Određivanje udjela vode u formiranim hidrogel česticama*

Princip metode:

Određivanje udjela vode u uzorku, odnosno udjela suhe tvari određuje se sušenjem do konstantne mase pri 105 °C pri čemu dolazi do izdvajanja slobodne vode. Udio suhe tvari određuje se kao ostatak nakon sušenja.

Postupak:

Izvagane metalne posudice s kvarcnim pijeskom se suše u sušioniku s odmaknutim poklopcima pri temperaturi od 105 °C kroz 1 sat. Po isteku vremena, poklopci se stave na posudice i sve se hladi u eksikatoru oko pola sata. Ohlađene posudice s kvarcnim pijeskom se važu s točnošću $\pm 0,0002$ g. U ohlađene i izvagane posudice odvažuje se 0,3 grama pripremljenih hidrogel čestica. Uzorci se suše u otklopljenim posudicama oko 3 sata pri 105 °C. Po završetku sušenja, posudice se poklope i prenesu u eksikator na hlađenje na sobnoj temperaturi, a potom se važu na analitičkoj vagi. Udjel vode u uzorcima izračunava se na temelju gubitka mase prema formuli:

$$\text{Udjel vode (\%)} = (a-b) \cdot 100 / m$$

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

gdje su:

a – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

b – masa posudice s uzorkom poslije sušenja (g)

m – masa uzorka (g)

Rezultati se izražavaju kao srednja vrijednost 2 mjerenja (n=2) s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.6.2. *Određivanje veličine pripremljenih hidrogel čestica*

Veličina hidrogel čestica zabilježena je digitalnom kamerom na Dino-Lite kalibracijskoj pločici (minimalni razmak = 0,2 mm). Rezultati su izraženi u mm kao srednja vrijednost svih mjerenja (n=10) s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.6.3. Određivanje parametara teksture pripremljenih hidrogel čestica

Tekstura je analizirana na TA.HDPlus analizatoru teksture (Stable Micro Systems, Velika Britanija), opremljenom s utegom od 5 kg. Analize su provedene na sobnoj temperaturi na 5 različitih čestica iz svakog sustava. 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 kako bi se postigao maksimalan omjer kompresije i smicanja. Dobiveni su dijagrami koji su obrađeni u Texture Exponent programu (Stable Micro Systems, Velika Britanija), nakon čega su izračunate vrijednosti za parametre teksture (tvrdoću i elastičnost).

Tvrdoća uzorka izražava se kao maksimalna sila (N) potrebna za kompresiju uzorka. Elastičnost (mm) je maksimalna udaljenost sonde prilikom probijanja uzorka ispod krivulje (sile) i izražena je na 50% vrijednosti očitane za tvrdoću.

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost mjerenja ($n=5$) s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.6.4. Određivanje parametara boje hidrogel čestica

Određivanje boje uzoraka provedeno je difuzno reflektirajućom spektrofotometrijom na kolorimetru (Konica Minolta, Sensing, CM – 700d, CM – A177, Japan), pri čemu je dobivena 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. Sukladno tome, 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).

Analiza je izvršena tako da su inkapsulirane čestice prenesene u petrijeve zdjelice promjera 30 mm tako da u potpunosti prekriju dno zdjelice. Područje mjerenja je podešeno na 400 do 700 nm, što odgovara vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra.

Kontrola mjerenja provedena je korištenjem računalne aplikacije SpectraMagic NX. Sva mjerenja izvršena su u SCI (eng. „Specular Component Included“) modu, koji 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 je:

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

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 – čestice pripremljene s čistim alginatom

a^*_{ref} - parametar boje referentnog uzorka (crveno) – čestice pripremljene s čistim alginatom

b^*_{ref} - parametar boje referentnog uzorka (žuto) – čestice pripremljene s čistim alginatom

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

3.2.6.5. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije ekstrakta i zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta

Kako bi se odredio udjel polifenola te antoksidacijski kapacitet formiranih hidrogel čestica, iste su razbijene u 2 %-tnoj otopini natrijeva citrata (w/v) uz snažno miješanje na magnetskoj miješalici do njihovog potpunog raspada.

Udjel polifenola je određen primjenom Folin-Ciocalteu reagensa (kako je opisano u 3.2.2.1.) i HPLC metodom (kako je opisano u 3.2.2.4.). Antioksidacijski kapacitet određivanje ABTS (opisano u 3.2.2.2.) i DPPH metodom (opisano u 3.2.2.3.).

Učinkovitost inkapsulacije ekstrakta (%) izračunata je kao omjer udjela ukupnih polifenola te antioksidacijskog kapaciteta u otopini citrata razbijenih čestica i udjela istih spojeva u početnim otopinama sustava nosača pripremljenih u ekstraktu ljuske crvenog luka.

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

Otpuštanje polifenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta iz dobivenih hidrogel čestica u simuliranim gastričnim (SGF) i intestinalnim (SIF) fluidima praćeno je određivanjem udjela ukupnih polifenola (3.2.2.1.) te određivanjem antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS (3.2.2.2..) i DPPH (3.2.2.3.) metoda. Simulirane gastrična i intestinalna otopina su pripravljene prema protokolu europske farmakopeje (European Pharmacopeia 7.0, 2010), a nisu sadržavale enzime pepsin i pankreatin. SGF je pripremljen s natrijevim kloridom i klorovodičnom kiselinom (pH=1,2), a SIF s odgovarajućim fosfatnim puferom (pH= 7,4).

Čestice dobivene ionskim geliranjem izdvojene su iz ekstrakta u kojem se čuvaju te je 0,6 g profiltriranih čestica preliveno s 30 mL SGF-a (37 °C). Čestice se u SGF-u konstantno miješaju na magnetskoj miješalici pri 100 rpm-a pri čemu je temperatura podešena na 37 °C. U određenim vremenskim razmacima iz otopine s česticama izuzima se po 2 mL tekućeg medija te se nakon svakog izuzimanja u otopinu s česticama dodaju 2 mL svježeg SGF-a. Uzorkovanje se provodi u vremenskom periodu od 2 h. Nakon 2 h čestice se profiltriraju iz otopine SGF-a, posuše te preliju s 30 mL SIF-a (37 °C). Čestice se u SIF-u konstantno miješaju pri istim uvjetima (100 rpm i 37 °C). Postupak uzorkovanja provodi se kao i kod SGF-a sve do potpunog raspada čestica.

Iz izdvojenih alikvota od 2 mL određuje se udjel ukupnih polifenola (mg ekvivalenata galne kiseline/g čestica) i antioksidacijski kapacitet (mmol Trolox-a/g čestica). Na temelju dobivenih rezultata određuje se profil otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta ljuske crvenog luka iz ispitivanih sustava nosača na bazi alginata i pektina.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Ljuska luka predstavlja značajnu količinu agro-otpada koji je bogat brojnim funkcionalnim sastojcima kao što su polifenolni spojevi i pektin koji se često koriste u prehrambenoj industriji, stoga je u ovom radu ispitivan polifenolni sastav ekstrakta ljuske crvenog luka te najpogodniji način inkapsulacije istog. Kako bi se ljuska maksimalno iskoristila, također je iz nje ekstrahirano pektin koji je ujedno korišten kao nosač za inkapsulaciju, u kombinaciji s alginatom.

4.1. Karakterizacija polifenolnog ekstrakta ljuske crvenog luka i ekstrahiranog pektina

Polifenolnom ekstraktu ljuske crvenog luka određen je antioksidacijski kapacitet i udio ukupnih polifenola (tablica 8) te je provedena analiza bioaktivnih sastojaka istog (tablica 9).

Tablica 8. Antioksidacijski kapacitet i udjel ukupnih polifenola u ekstraktu ljuske crvenog luka

ABTS (mmol Trolox-a/g čestica)	DPPH (mmol Trolox-a/g čestica)	UP (mg EGK-a/g uzorka)
0,068 ± 0,005	0,047 ± 0,003	252,1 ± 15,556

Tablica 9. Polifenolni sastav ekstrakta ljuske crvenog luka

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

Od svih prisutnih polifenolnih spojeva (fenolne kiseline – protokatehinska, hidroksibenzojeva i vanilinska; flavonoidi – kvercetin-3-glikozid, kvercetin, derivati kvercetina i luteolin), dominantni su kvercetin i njegovi derivati (9,84 mg/g uzorka). Od fenolnih kiselina dominantna je protokatehinska kiselina (0,91 mg/g uzorka).

Karakterizacija ekstrahiranog pektina prikazana je u tablici 10.

Tablica 10. Karakterizacija pektina ekstrahiranog iz ljuske crvenog luka

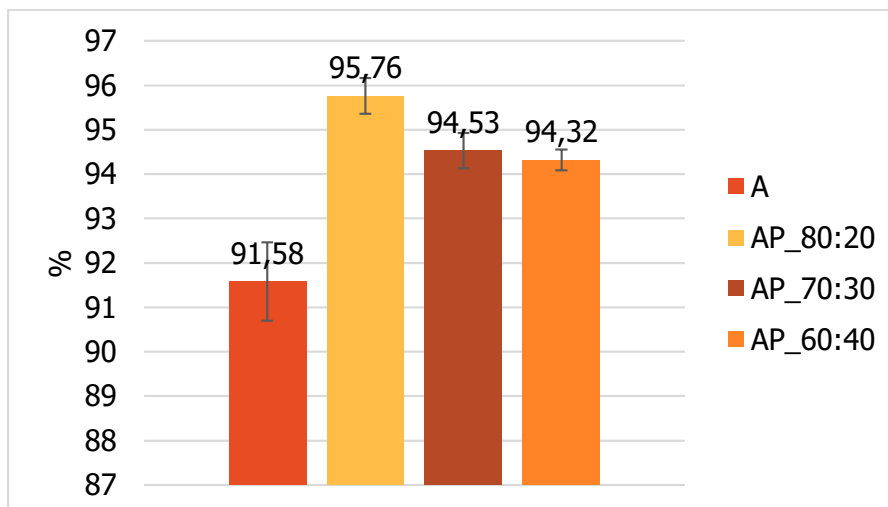
Karakteristika	Vrijednost
Stupanj esterifikacije - DE (%)	53,8 ± 1,24
pH	3,18 ± 0,00
Ekvivalentna masa - EW (g/mol)	741 ± 14,42
Galakturonska kiselina - GA (%)	58,21 ± 0,54

Iz tablice 10 je vidljivo da je ekstrahirani pektin visoko metilirajući, VM (DE = 53,8 %) te u prisustvu Ca^{2+} iona neće gelirati jednako dobro kao što to čine niskometilirajući (NM). Ipak, prema istraživanju Yang i suradnika (2013) utvrđeno da Ca^{2+} ioni utječu na sposobnost geliranja VM pektina mehanizmom koji nije u potpunosti razjašnjen i zahtjeva daljnja istraživanja. S udjelom od 58,21 % galakturonske kiseline, ekstrahirani se pektin ne smatra aditivom.

4.2. Fizikalno-kemijska karakterizacija hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ljuske crvenog luka

4.2.1. Određivanje udjela vode u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ljuske crvenog luka

Pektin ekstrahiran iz ljuske crvenog luka i korišten kao nosač pri inkapsulaciji polifenolnog ekstrakta ljuske crvenog luka je visokometilirajući (VM). Takav je u nemogućnosti samostalno formirati stabilne inkapsulirane sustave, stoga su korišteni različiti alginatno-pektinski sustavi nosača koji daju čvrste hidrogel čestice. Najveći udio pektina pri kojem dolazi do formiranja takvih čestica je 40 % (AP₆₀:40).



Slika 11. Udjel vode u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ljuske crvenog luka

Iz grafičkog prikaza udjela vode (Slika 11) dobivenog kao rezultat omjera masa prije i nakon sušenja vidljivo je da čiste alginatne čestice (A) s inkapsuliranim ekstraktom ljuske crvenog luka sadrže najmanji udjel vode (91,58 %), dok najveći udjel vode sadrže čestice AP_80:20 (95,76 %). Povećanjem udjela pektina u otopini alginata, smanjuje se udjel vode. Razlika u sadržaju vode između sustava AP_70:30 i AP_60:40 je neznatna. Prema istraživanju Tello i suradnika (2015) utvrđeno je da alginatne čestice pripremljene ionskim geliranjem imaju veliku sposobnost zadržavanja vode (94 – 96 %), a prema rezultatima ovog istraživanja se da zaključiti da dodatak VM pektina u sustav alginat-kalcij doprinosi povećanju udjela vode u formiranim česticama.

4.2.2. Određivanje parametara teksture hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ljuske crvenog luka

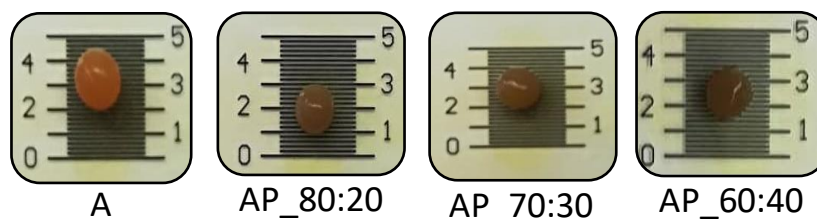
Tablica 11. Parametri teksture hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ljuske crvenog luka

Nosač	Veličina (mm)	Tvrdoća (N)	Elastičnost (mm)
A	2,48 ± 0,24	0,19 ± 0,01	0,30 ± 0,02
AP_80:20	2,40 ± 0,22	0,16 ± 0,01	0,29 ± 0,01
AP_70:30	2,18 ± 0,17	0,08 ± 0,00	0,15 ± 0,02
AP_60:40	2,34 ± 0,16	0,04 ± 0,01	0,13 ± 0,01

Iz tablice 11 vidljivo je da su najveće čestice formulirane od čiste otopine alginata kao nosača (2,48 mm) dok su najmanje čestice sustava AP_70:30 (2,18 mm). Dodatak pektina u alginatni gel rezultirao je smanjenjem veličine hidrogel čestica. Dobiveni rezultati odgovaraju istraživanju Lee i suradnika (2013) gdje je utvrđeno da alginatne čestice formirane metodom jednostavne ekstruzije (kao što je ionsko geliranje) daju čestice veće od 1 mm.

Vrijednosti dobivene za tvrdoću i elastičnost pokazuju da čestice formulirane s čistom otopinom alginata rezultiraju najtvrdim (0,19 N) i najelastičnijim (0,30 mm) česticama, odnosno, dodatkom pektina nastaju mekše i manje elastične čestice. Pritom su, čestice s najvećim udjelom pektina (AP_60:40) bile najmekše (0,04 N) i najmanje elastične 0,13 mm).

Realne čestice, slikane na kalibracijskoj pločici prilikom određivanja njihove veličine, prikazane su na slici 12.



Slika 12. Prikazi formuliranih čestica s inkapsuliranim ekstraktom ljuske crvenog luka na kalibracijskoj pločici

4.2.3. Određivanje parametara boje hidrogel čestica

Tablica 12. Parametri boje hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ljuske crvenog luka

Nosač	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
A	$30,24 \pm 0,06$	$17,89 \pm 0,15$	$24,61 \pm 0,08$	/
AP_80:20	$27,81 \pm 0,04$	$14,47 \pm 0,08$	$20,64 \pm 0,06$	$5,66 \pm 0,20$
AP_70:30	$24,30 \pm 0,14$	$9,75 \pm 0,23$	$15,06 \pm 0,39$	$13,89 \pm 0,55$
AP_60:40	$22,86 \pm 0,11$	$9,11 \pm 0,17$	$13,99 \pm 0,21$	$15,70 \pm 0,21$

Česticama su izmjerene vrijednosti L^* (svjetlina), a^* (parametar boje ispitivanog uzorka – crveno) i b^* (parametar boje ispitivanog uzorka – žuto). Čestice s najvećom vrijednosti L^* su

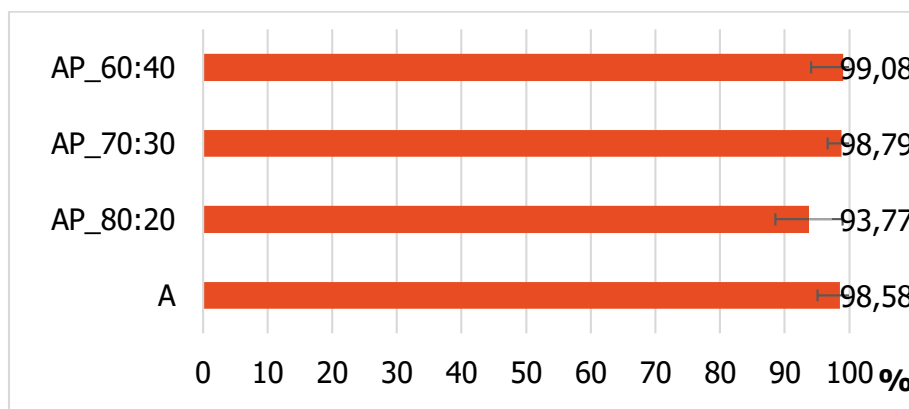
najsvjetlije i to su u ovom slučaju čestice čistog alginata (30,24). Povećanjem udjela pektina, boja čestica je tamnija, tj. vrijednost L^* se smanjuje.

Parametar a^* mjeri crveno obojenje koje je najizraženije kod čestica s čistim alginatom (A) i iznosi 17,89. Dodatkom otopine pektina, crveno obojenje čestica se značajno smanjuje. Žuto obojenje izražava se parametrom b^* koji je također najveći za čestice A (24,61), a dodatkom pektina, žuta boja čestica se smanjuje.

Česticama koje su dobivene miješanjem otopine alginata i pektina izračunata je i ukupna promjena boje, ΔE^* računata u odnosu na čestice pripravljene s čistim alginatom (prema formuli u poglavlju 3.2.8.3.).

Najveća ukupna promjena boje (ΔE^*), u odnosu na čestice s čistim alginatom zabilježena je kod uzorka AP_60:40 gdje je udjel pektina najveći. Također, određena ukupna razlika u boji hidrogel čestica u odnosu na referentni uzorak vidljiva je i na slici 12.

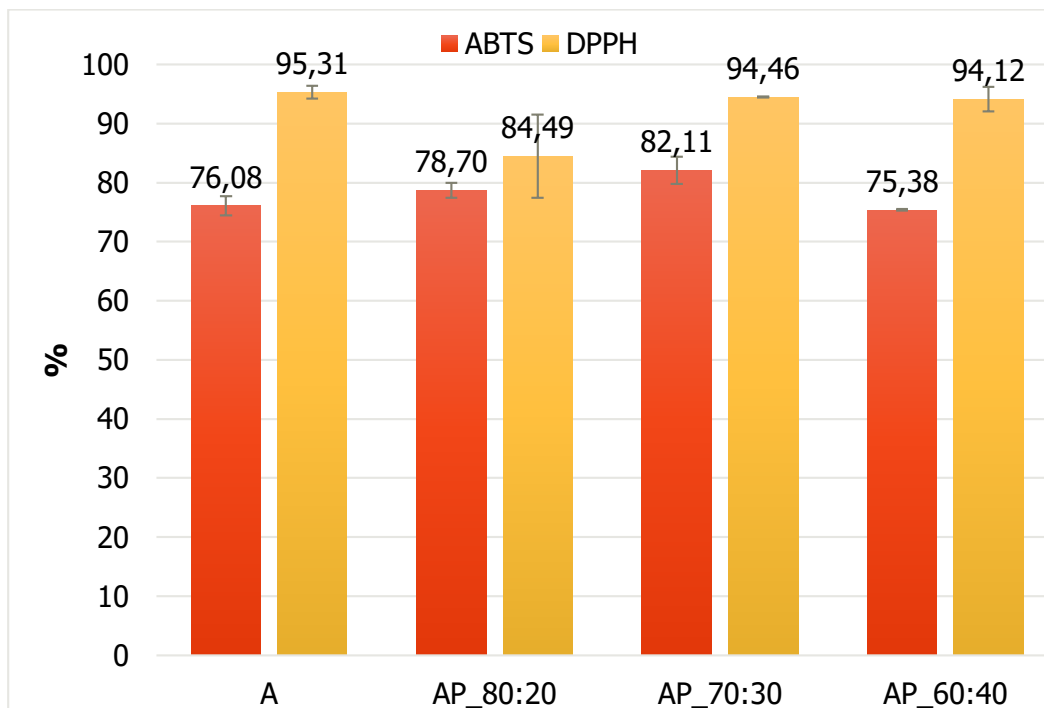
4.2.4. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije ukupnih polifenola ljuske crvenog luka i zadržavanja antoksidacijske aktivnosti



Slika 13. Učinkovitost inkapsulacije (%) ukupnih polifenola (UP) u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ljuske crvenog luka

Slika 13 prikazuje učinkovitost inkapsulacije (%) ukupnih polifenola iz ekstrakta ljuske crvenog luka u hidrogel čestice s nosačima na bazi alginata i pektina. Usporedbom rezultata vidljivo je da najveću inkapsulacijsku učinkovitost (99,08 %) pokazuje sustav s najmanjim udjelom alginata, a najvećim udjelom pektina, AP_60:40. Njegova inkapsulacijska učinkovitost je

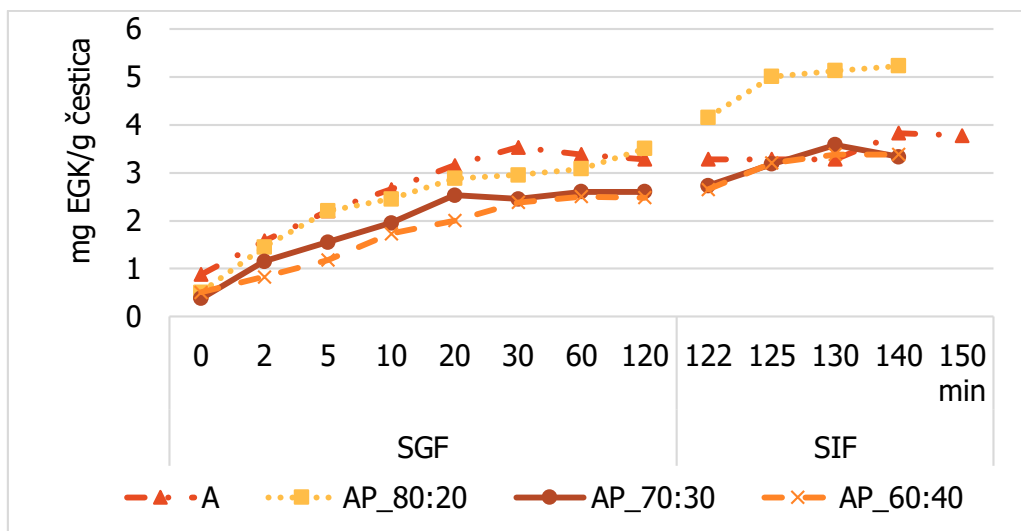
vrlo velika, iznosi 99,08 %. Također, jako visoku učinkovitost pokazuju i sustavi A te AP_70:30. Sustav AP_80:20 pokazuje najmanju inkapsulacijsku učinkovitost. Isto tako, među česticama koje sadrže pektin, one s većim udjelom pektina pokazuju veću inkapsulacijsku učinkovitost pa možemo zaključiti da dodatak ekstrahiranog pektina u sustave alginatnih nosača pogodno utječe na učinkovitost inkapsulacije polifenolnih spojeva.



Slika 14: Učinkovitost zadržavanja (%) antioksidacijskog kapaciteta određen ABTS i DPPH metodom u hidrogel česticama s inkapsuliranim ekstraktom ljuske crvenog luka

Učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta određena je ABTS i DPPH metodom. DPPH metodom utvrđeno je da uzorak A pokazuje najbolje svojstvo zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta (95,31 %), a dobra svojstva pokazuju još i uzorak AP_70:30 i AP_60:40. Sustav AP_80:20 pokazuje najmanju učinkovitost zadržavanja, što odgovara i rezultatima dobivenim za učinkovitost inkapsulacije UP. ABTS metoda daje nešto drugačije rezultate, gdje najveću učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta pokazuje sustav AP_70:30, a zatim sustavi AP_80:20 > A > AP_60:40.

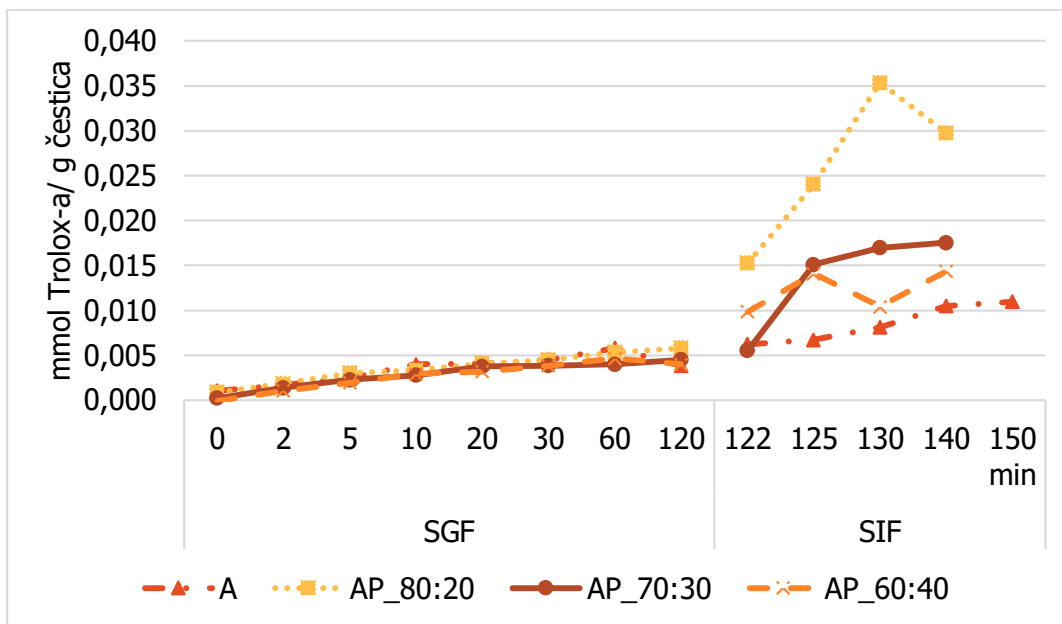
4.2.5. Profil otpuštanja ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ljuske crvenog luka



Slika 15. Profil otpuštanja ukupnih polifenola (mg EGK/g čestica) iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ljuske crvenog luka u SGF i SIF fluidima

Na slici 15 prikazan je profil otpuštanja UP iz hidrogel čestica na bazi alginata i pektina u simuliranom gastričnom (SGF) i intestinalnom (SIF) fluidu.

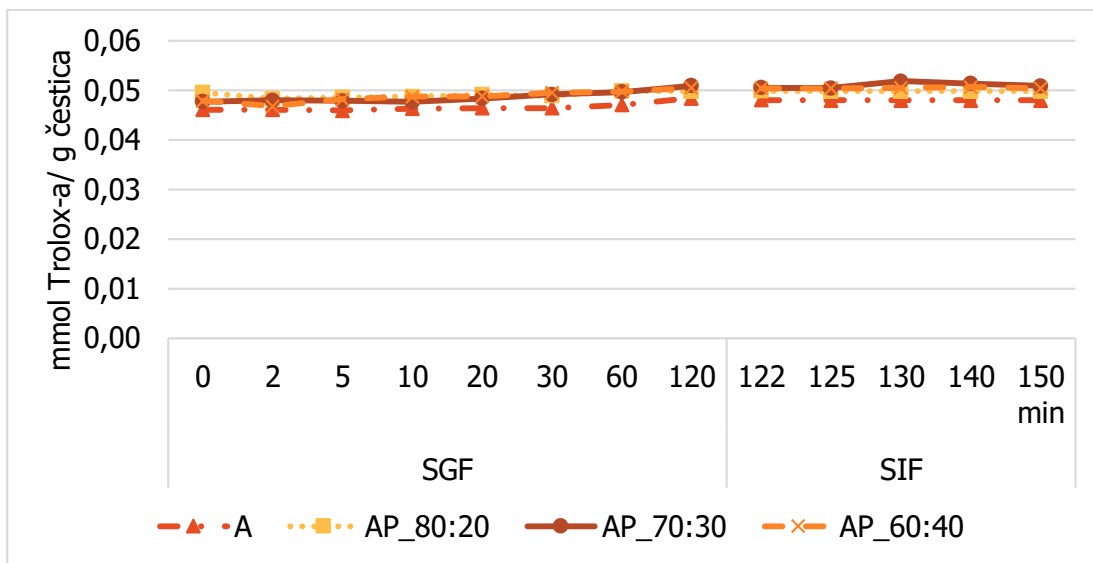
Sustav A, odnosno čiste alginatne čestice gotovo kontinuirano otpuštaju UP kroz svih 150 minuta. Između 60-te minute u SGF-u i 130-te u SIF-u dolazi do uspostave ravnoteže, a potom se nastavljaju otpuštati UP. Sustav AP_80:20 kontinuirano otpušta UP u SGF i SIF uvjetima, a ujedno dolazi i do otpuštanja najvećeg udjela UP (5,23 mg/g čestica, 140. min). Zbog navedenog, AP_80:20 pokazuje najbolji profil otpuštanja UP u gastrointestinalnim uvjetima. Kod sustava AP_60:40 dolazi do kontinuiranog otpuštanja UP sve do uspostave ravnoteže u 140-oj minuti SIF-a, ali je udjel otpuštenih UP manji od A i AP_80:20. Sustav AP_70:30 pokazuje fluktuacije u 20-oj minuti SGF-a nakon čega nastavlja kontinuirano otpuštati UP u SIF-u.



Slika 16. Profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox-a/g čestica) iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ljuske crvenog luka u SGF i SIF fluidima primjenom ABTS metode

Na slici 16 prikazano je otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta iz čestica u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima primjenom ABTS metode.

Iz prikaza je vidljivo da je profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta svih sustava u SGF uvjetima sličan gdje dolazi do njegovog polaganog i kontinuiranog otpuštanja. U SIF-u dolazi do značajnijeg otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta. Kontinuirani profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta pokazuje sustav A te sustav AP_70:30. Kod sustava AP_70:30 dolazi do većeg otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (0,017 mmol Trolox-a/g čestica, 140. min). Najveći udjel otpuštenog antioksidacijskog kapaciteta pokazuje sustav AP_80:20 (0,035 mmol Trolox-a/g čestica, 130. min).



Slika 17. Profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta (mmol Trolox-a/g čestica) iz hidrogel čestica s inkapsuliranim ekstraktom ljuske crvenog luka u SGF i SIF fluidima primjenom DPPH metode

Slika 17 prikazuje otpuštanje antioksidacijskog kapaciteta primjenom DPPH metode gdje vrlo brzo dolazi do uspostave ravnoteže kod svih sustava u SGF i SIF uvjetima. Do najvećeg udjela otpuštenog antioksidacijskog kapaciteta dolazi u 130-oj minuti SIF-a gdje se otpušta 0,052 Trolox-a/g čestica.

5. ZAKLJUČCI

1. Kvercetin i derivati kvercetina dominantni su polifenolni spojevi u ekstraktu ljuske crvenog luka.
2. Pektin ekstrahiran iz ljuske crvenog luka je visokometilirajući (DE = 53,8 %) čime je smanjena njegova sposobnost inkapsulacije. Kombinirajući ga s alginatom, maksimalni udjel tog pektina od 40 % rezultirao je stabilnim inkapsuliranim sustavom.
3. Dodatkom pektina ljuske crvenog luka u alginatni nosač dolazi do povećanja udjela vode u hidrogel česticama (2,7 – 4,2 %).
4. Dodatak pektina ljuske crvenog luka u alginatni nosač rezultirao je tamnijim česticama manje veličine te manje tvrdoće i elastičnosti, u odnosu na nosač od čistog alginata.
5. Dodatak pektina ljuske crvenog luka u sustav nosača na bazi alginata rezultirao je povećanjem inkapsulacijske učinkovitosti.
6. Alginatno-pektinske čestice pokazuju brži profil otpuštanja polifenola i antioksidacijskog kapaciteta u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima u usporedbi s čistim alginatnim česticama. Sustav AP_70:30 pokazuje najpoželjniji kontinuirani profil otpuštanja antioksidacijskog kapaciteta.

6. LITERATURA

Adedara I. A., Subair I. T., Ego V. C., Oyediran O., Farombi E. O. (2017) Chemoprotective role of quercetin in manganese-induced toxicity along the brain-pituitary-testicular axis in rats. *Chemico-Biological Interactions* **263**: 88 - 98.

Aina V. O., Barau M. M., Mamman O. A., Zakari A., Haruna H., Hauwa Umar M. S., Abba Y. B. (2012) Extraction and Characterization of Pectin from Peels of Lemon (*Citrus limon*), Grape Fruit (*Citrus paradisi*) and Sweet Orange (*Citrus sinensis*). *British Journal of Pharmacology and Toxicology* **3**: 259 - 262.

Albishia T., Johna J. A., Al-Khalifab A. S., Shahidi F. (2013) Antioxidative phenolic constituents of skins of onion varieties and their activities. *Journal of Functional Foods* **5(3)**: 1191 – 1203.

Augustin M. A., Sanguansri L., Margetts C., Young B. (2001) Microencapsulation of food ingredients. *Food Australia* **53**: 220 – 223.

Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **99**: 191 – 203.

Baldassarre S., Babbar N., Van Roy S., Dejonghe W., Maesen M., Sforza S., Elst K. (2017) Continuous production of pectic oligosaccharides from onion skins with an enzyme membrane reactor. *Food Chemistry* **267**: 101 - 110.

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 Hydrocolloids* **57**: 139 – 152.

Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **28**: 25 – 30.

Bušić A., Belščak-Cvitanović A., Vojvodić-Cebin A., Karlović S., Kovač V., Špoljarić I., Mršić G., Komes D. (2018) Structuring new alginate network aimed for delivery of dandelion

- (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols using ionic gelation and new filler materials. *Food Research International* **111**: 244 - 255.
- 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 Chemistry* **188**: 537-542
- D'Andrea G. (2015) Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?. *Fitoterapia* **106**: 256 - 271.
- Devesana T., Durga M., Nathiya S. (2014) Quercetin encapsulated quercetin and its application – a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **6**(10): 20 – 26.
- Dias M. I., Ferreira I. C. F. R., Barreiro M. F. (2015) Microencapsulation of bioactives for food applications. *Food and Function* **6**: 1035 – 1052.
- Dorđević V., Balanč B., Belščak-Cvitanović A., Lević S., Trifković K., Kalušević A., Kostić I., Komes D., Bugarski B., Nedović V. (2015) Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Engineering Review* **7**: 452 – 490.
- FAOSTAT (2016) Food and Agriculture Organization of the United Nations, <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>> Pristupljeno 23. lipnja 2018.
- Faridi Esfanjani A., Jafari S. M., Assadpour E. (2017) Preparation of a multiple emulsion based on pectin-whey protein complex for encapsulation of saffron extract nanodroplets. *Food Chemistry* **221**: 1962 – 1969.
- Fertah M. (2017) Seaweed Polysaccharides, Elsevier Inc., str. 11 – 13.
- 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.
- Gupta A., Birhman K., Raheja I., Sharma S. K., Kar H. K. (2016) Quercetin: A wonder bioflavonoid with therapeutic potential in disease management, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2016 **6**(3): 248 – 252.

- Haleagraharaa N., Miranda-Hernandez S., Alima M. A., Hayesa L., Birdc G., Ketheesan N. (2017) Therapeutic effect of quercetin in collagen-induced arthritis. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **90**: 38 - 46.
- Hardman W. E. (2014) Diet components can suppress inflammation and reduce cancer risk. *Nutrition Research and Practice* **8(3)**: 233 – 240.
- Hasnain M. S., Nayak A. K. (2018) Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery, Elsevier Inc. str. 39 – 73.
- Khiari Z., Makris D. P. (2010) Stability and transformation of major flavonols in onion (*Allium cepa*) solid wastes. *Journal of Food Science and Technology* **49(4)**: 489 – 494.
- Kuang S. S., Oliveira J. C., Crean A. M. (2010) Microencapsulation as a Tool for Incorporating Bioactive Ingredients into Food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **50(10)**: 951 – 968.
- Kurtagić H. (2017) Polifenoli i flavonoidi u medu. *Hrana u zdravlju i bolesti* **6(1)**: 28 – 35.
- Lawande K. E. (2012) Handbook of herbs and spices. Woodhead. str. 417
- Lee B., Ravindra P., Chan E. (2013) Size and Shape of Calcium Alginate Beads Produced by Extrusion Dripping. *Chemical Engineering Technology* **36(10)**: 1627 – 1642.
- Lesjak M., Beara I., Simin N., Pintać D., Majkić T., Bekvalac K., Orčić D., Mimica-Dukić N. (2018) Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *Journal of Functional Foods* **40**: 68 – 75.
- Lin J., Zhou W. (2018) Role of quercetin in the physicochemical properties, antioxidant and antiglycation activities of bread. *Journal of Functional Foods* **40**: 299 – 306.
- Lupo B., Maestro A., Porras M., Gutiérrez J.M., González A. (2014) Preparation of alginate microspheres by emulsification/internal gelation to encapsulate cocoa polyphenols. *Food Hydrocolloids* **38**: 56 - 65.
- Maksymchuk O., Shysh A., Rosohatska I., Chashchyn M. (2017) Quercetone prevents type 1 diabetic liver damage through inhibition of CYP2E1. *Pharmacological Reports* **69(6)**: 1386 - 1392.

- Maturu P., Wei-Liang Y., Androutsopoulos V. P., Jiang W., Wang L., Tsatsakis A. M., Couroucli X. I. (2018) Quercetin attenuates the hyperoxic lung injury in neonatal mice: Implications for Bronchopulmonary dysplasia (BPD). *Food and Chemical Toxicology* **114**: 23 – 33.
- Melton D. L., Smith B. G. (2001) Determination of the Uronic Acid Content of Plant Cell Walls Using a Colorimetric Assay. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* **1**:736 - 739.
- Miltonprabu S., Tomczyk M., Skalicka-Woźniak K., Rastrelli L., Daglia M., Nabavi S. F., Alavian S. M., Nabavi S. M. (2016) Hepatoprotective effect of quercetin: From chemistry to medicine. *Food and Chemical Toxicology* **108**: 365 - 374.
- Mu T., Sun H., Zhang M., Wang C. (2017) Sweet Potato Pectin, Elsevier Inc. str. 183 – 261.
- Mueller D., Jung K., Winter M., Rogoll D., Melcher R., Kulozik U., Schwarz K, Richling E. (2017) Encapsulation of anthocyanins from bilberries - Effects on bioavailability and intestinal accessibility in humans. *Food Chemistry* **248**: 217 - 224.
- 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 Chemistry* **201**: 37 – 45.
- Munin A., Edwards-Lévy (2011) Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics* **3(4)**: 793 – 829.
- Nabavi S. F., Russo G. L., Daglia M., Nabavi S. M. (2015) Role of quercetin as an alternative for obesity treatment: You are what you eat!. *Food Chemistry* **179**: 305 - 310.
- Nithitanakool S., Pithayanukul P., Bourgeois S., Fessi H., Bavovada R. (2013) The Development, Physicochemical Characterisation and in Vitro Drug Release Studies of Pectinate Gel Beads Containing Thai Mango Seed Kernel Extract. *Molecules* **18(6)**: 6504 – 6520.
- Ota A., Istenič K., Skrt M., Šegatin N., Žnidaršič N., Kogej K., Poklar Ulrih N. (2017) Encapsulation of pantothenic acid into liposomes and into alginate or alginate–pectin microparticles loaded with liposomes. *Journal of Food Engineering* **229**: 21 – 31.

Ough C. S., Amerine M.A. (1988) Methods for analysis of musts and wine, John Wiley & Sons. Inc. str. 196 – 221.

Pareek S., Sagar N. A., Sharma S., Kumar V. (2018) Onion (*Allium cepa* L.). U: Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2. izd., Yahia E. M., ur., John Wiley & Sons Ltd. str. 1145 – 1147.

Patel N., Lalwani D., Gollmer S., Injeti E., Sari Y., Nesamony J. (2016) Development and evaluation of a calcium alginate based oral ceftriaxone sodium formulation. *Progress in Biomaterials* **5**: 117–133.

Pawar S. N. (2017) Seaweed Polysaccharides, Elsevier Inc., str. 111 – 155.

Qin Y., Jiang J., Zhao L., Zhang J., Wang F. (2018) Biopolymers for Food Design, Elsevier Inc. str. 409 – 429.

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.

Sharma R., Oberoi H. S., Dhillon G. S. (2016) Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production, Elsevier Inc. str. 45.

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.

Sundar Raj A. A., Rubila S., Jayabalan R., Ranganathan T. V. (2012) A Review on Pectin: Chemistry due to General Properties of Pectin and its Pharmaceutical Uses. *Open Access Scientific Reports* **1(12)**: 1 – 4.

Tello F., Falfan-Cortes R. N., Martinez-Bustos F., Martins da Silva V., Dupas Hubinger M., Grosso C. (2015) Alginate and pectin-based particles coated with globular proteins: Production, characterization and anti-oxidative properties. *Food Hydrocolloids* **43**: 670 - 678.

Trifković K., Tadić G., Bugarski B. (2016) Short Overview of Encapsulation Technologies for Delivery of Bioactives to Food. *Journal of Engineering & Processing Management* **8**: 103 - 111.

Yang X., Nisar T., Liang T., Hou Y., Sun L., Guo Y. (2017) Low methoxyl pectin gelation under alkaline conditions and its rheological properties: Using NaOH as a pH regulator. *Food Hydrocolloids* **79**: 560 - 571.

Yang Y., Zhang G., Hong Y., Gu Z., Fang F. (2013) Calcium cation triggers and accelerates the gelation of high methoxy pectin. *Food Hydrocolloids* **32**: 228 – 234.

Zhao S., Yang F., Liu Y., Sun D., Xiu Z., Ma X., Zhang Y., Sun G. (2018) Study of chemical characteristics, gelation properties and biological application of calcium pectate prepared using apple or citrus pectin. *International Journal of Biological Macromolecules* **109**: 180 – 187.

Zheng J., Wu J., Chen J., Liu J., Lu Y., Huang C., Hu G., Wang X., Zeng Y. (2016), Therapeutic effects of quercetin on early inflammation in hypertriglyceridemia-related acute pancreatitis and its mechanism. *Pancreatology* **16(2)**: 200 - 210.

Zuidam N. J., Shmoni E. (2010) Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. U: Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing, 1. izd., Zuidam N. J., Nedović V. A., ur., Springer. str. 3 - 29.

Izjava o izvornosti

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

Ivana Dajčić

ime i prezime studenta