Karakterizacija pektina izoliranog pomoću ultrazvučne kupelji iz kore rajčice i njenih frakcija dobivenih prosijavanjem

Boras, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:159:417506

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Lucija Boras
840/USH

Karakterizacija pektina izoliranog pomoću ultrazvučne kupelji iz kore rajčice i njenih frakcija dobivenih prosijavanjem

Rad je izrađen u Laboratoriju za analitičku kemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr.sc. Antonele Ninčević Grassino, doc. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem svim kolegama i kolegicama Laboratorija za analitičku kemiju, Laboratorija za tehnološke operacije te Laboratorija za tehničku termodinamiku koji su na bilo koji način pomogli pri izvođenju ovog rada.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Tomislavu Bosiljkovu na korisnim idejama koje su uveliko utjecale na ovaj diplomski rad.

Zahvaljujem mentorici, doc. dr. sc. Antoneli Ninčević Grassino, na iskazanom povjerenju, vodstvu te brojnim savjetima prilikom izrade diplomskog rada.

Posebno hvala mojim roditeljima na pruženoj podršci i razumijevanju tijekom mog studiranja

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

KARAKTERIZACIJA PEKTINA IZOLIRANOG POMOĆU ULTRAZVUČNE KUPELJI IZ KORE RAJČICE I NJENIH FRAKCIJA DOBIVENIH PROSIJAVANJEM

Lucija Boras, 840/USH

Sažetak: *Biootpad predstavlja sve zanimljiviji supstrat za ponovnu preradu i izdvajanje različitih funkcionalnih sastojaka. Cilj ovog rada bio je upotrijebiti koru rajčice kao alternativnog izvora komercijalne proizvodnje pektina. Ekstrakcija kore rajčice i njenih frakcija provedena je pomoću ultrazvučne kupelji, koja omogućava efikasno izoliranje pektina, u vrlo kratkom vremenu (15, 30 i 45 min) pri temperaturi od 80 °C. Boja, vlaga, sadržaj ukupne galakturonske kiseline (UGA), ukupnih šećera (UŠ) i ukupnih fenola (UF) određen je u svrhu utvrđivanja kvalitete pektinskih izolata. Dobivene vrijednosti masenih udjela UGA, UŠ i UF, određene UV/Vis spektrofotometrijom su pokazale da pektini ne sadrže samo UGA, važnu za procjenu čistoće pektina, već i znatne količine UŠ i UF. Dakle, dobiveni pektini čine smjesu triju funkcionalnih sastojaka. Zaključno, provedeno istraživanje je pokazalo da se kora rajčice kao jeftin nusproizvod prehrambene industije može efikasno iskoristiti za recikliranje šećera i fenola, u skladu s novim trendovima razvoja cirkularne ekonomije.*

Ključne riječi: *biootpad, kora rajčice, pektin, prosijavanje, ultrazvučna ekstrakcija*
Rad sadrži: 53 stranice, 16 slika, 12 tablica, 95 literaturna navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *doc.dr.sc. Antonela Ninčević Grassino*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. Prof.dr.sc. *Suzana Rimac Brnčić*
2. Doc.dr.sc. *Antonela Ninčević Grassino*
3. Doc.dr.sc. *Tomislav Bosiljkov*
4. Izv.prof.dr.sc. *Senka Djaković* (zamjena)

Datum obrane: 25. rujna, 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

CHARACTERIZATION OF PECTIN ISOLATED BY ULTRASONIC BATH FROM TOMATO PEEL AND ITS FRACTIONS OBTAINED BY SIEVING

Lucija Boras, 840/USH

Abstract: *Bio-waste represents an increasingly interesting substrate for re-processing and separating various functional constituents. The aim of this work was used of tomato peel, as an alternative source of commercial pectin production. Extraction of tomato peel and its fraction was carried out using ultrasonic bath, which permits efficient isolation of pectin, in short time (15, 30 and 45 min), at 80 °C. Colour, humidity, content of total galacturonic acid (TGA), total sugars (TS) and total phenols (TP) was estimated, wih purpose to determine the quality of pectin isolates. The obtained mass fraction values of TGA, TS and TP, determined by UV/Vis spectrophotometry have shown that pectins contained not only TGA, important for evaluation of pectin purity, but also TS and TP. Therefore, the obtained pectins presented mixture of three functional compounds. In conclusion, the performed research has shown that tomato peel, as cheap by-products of food industry can be efficiently utilised for sugars and phenols recycling, according to the new trends of circular economy development.*

Key words: *biowaste, tomato peel, pectin, ultrasonic extraction, sieving*
Thesis contains: 53 pages, 16 figures, 12 tables, 95 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. Antonela Ninčević Grassino, Assistant professor*

Reviwers:
1. PhD. *Suzana Rimac Brnčić*, Full professor
2. PhD. *Antonela Ninčević Grassino*, Assistant professor
3. PhD. *Tomislav Bosiljkov,* Assistant professor
4. PhD. *Senka Djaković* Associate professor (substite)

Thesis defended: 25 September, 2017.

Sadržaj

1. **UVOD** ... 1
2. **TEORIJSKI DIO** ... 3
   2.1. Struktura pektina ... 3
   2.2. Proizvodnja pektina ... 4
   2.3. Komercijalni pektin i zakonske norme ... 7
   2.4. Pektinski gelovi ... 8
   2.5. Upotreba pektina u prehrambenoj industriji ... 8
   2.6. Upotreba pektina u farmaceutskoj industriji ... 9
   2.7. Ostala upotreba pektina ... 9
   2.8. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija pektina ... 10
   2.9. Analitičke metode određivanja pektina ... 11
   2.10. Mjere centralne tendencije ... 14
3. **EKSPERIMENTALNI DIO** ... 16
   3.1. Materijal ... 16
   3.2. Kemikalije ... 16
   3.3. Otopine i njihova priprema ... 17
   3.4. Aparatura i pribor ... 18
      3.4.1. Aparatura ... 18
      3.4.2. Pribor ... 18
   3.5. Određivanje raspodjele veličine čestica kore rajčice ... 18
   3.6. Priprema uzorka za ekstrakciju ... 19
   3.7. Ekstrakcija pektina pomoću ultrazvučne kupelji ... 19
   3.8. Određivanje parametara kvalitete pektina ... 22
      3.8.1. Određivanje vlage ... 23
      3.8.2. Određivanje boje ... 23
      3.8.3. Određivanje galakturonske kiseline, ukupnih šećera i ukupnih fenola ... 24
         3.8.3.1. Određivanje ukupne galakturonske kiseline ... 24
         3.8.3.2. Određivanje ukupnih šećera ... 25
         3.8.3.3. Određivanje ukupnih fenola ... 26
   3.9. Statistička analiza ... 26
4. **REZULTATI I RASPRAVA** ... 27
   4.1. Određivanje raspodjele veličine čestica kore rajčice ... 27
   4.2. Prosijavanje kore rajčice ... 28
   4.3. Efikasnost ekstrakcije ... 30
   4.4. Određivanje sadržaja vlage ... 32
   4.5. Određivanje boje ... 33
   4.6. Određivanje ukupne galakturonske kiseline ... 35
   4.7. Određivanje ukupnih šećera ... 39
   4.8. Određivanje ukupnih fenola ... 42
5. **ZAKLJUČCI** ... 45
6. **LITERATURA** ... 46

1. UVOD

Rajčica (*Lycopersicon esculentum*) je jedna od najraširenijih kultiviranih voćki u mediteranskim zemljama. Značajne količine se konzumiraju u obliku prerađenih proizvoda kao što su sok od rajčice, pelat, pire, ketchup, umak i salsa. Proizvodnja rajčica na svjetskoj razini, prema podacima iz 2014. godine (FAOSTAT-FAO, 2014) iznosila je 170 750 767 tona, a pema podacima Državnog zavoda za statistiku (DZS, 2015) tijekom 2015. godine u Republici Hrvatskoj proizvedeno je približno 42 186 tona rajčice.

Tijekom postupka industrijske prerade rajčice dolazi do nakupljanja značajnih količina otpadnih proizvoda, sastavljenih uglavnom od kore, sjemenki i male količine pulpe. Jedan dio nastalih nusproizvoda uglavnom se upotrebljava kao dodatak stočnoj hrani, dok drugi, neiskorišteni dio ostaje nezbrinut i kao takav predstavlja problem za okoliš (prikupljanje, odlaganje i prerada). Biootpad nastao preradom rajčice, poznat pod nazivom komina predstavlja najviše 4 % mase ploda, a njen sastav (Del Valle i sur., 2006) izražen na osnovi suhe tvari čine vlakana (59,03 %), ukupni šećeri (25,73 %), proteini (19,27 %), pektin (7,55 %), ukupna mast (5,85 %) i minerali (3,92 %).

Unatoč činjenici da komina rajčice predstavlja značajan izvor visoko vrijednih funkcionalnih spojeva, njena upotreba kao jeftinog bioorganskog materijala pri izolaciji biospojeva još uvijek nije dovoljno iskorištena. Ninčević Grassino i sur. (2016a) su pokazali kako se kora rajčice može koristiti kao značajan izvor izolacije pektina, a potom i njegove implementacije kao prirodnog inhibitora kositra.

Pektini su polisaharidi koji se široko koriste u prehrambenoj industriji kao sredstvo za geliranje, zgušnjavanje i stabilizaciju. Primjena pektina u prehrambenoj industriji je različita i bogata, koristi se u raznim voćnim, mliječnim i pekarskim proizvodima, slatkišima, različitim pićima, te raznim namazima. Pektin se sve više koristi i u farmaceutskoj industriji (Brejnholt, 2010) te u proizvodnji raznolikih specijalnih proizvoda, uključujući jestive i biorazgradive filmove, ljepila, pjene, plastifikatore, modifikatore površine za medicinske proizvode te materijale za biomedicinsku implantaciju (Mohnen, 2008).

Povijesno gledano, kora jabuke je bila glavni izvor komercijalne proizvodnje pektina, ali posljednjih godina i kora citrusa dobiva značajno mjesto u njegovoj proizvodnji (Brejnholt, 2010). Obje sirovine čine biootpad nastao pri industrijskoj proizvodnji soka. Osim navedenih izvora i neki drugi bioorganski materijali upotrijebljeni su za ekstrakciju pektina, kao što je komina breskve (Paga'n i Ibarz, 1999), ljuska kakaa (Vriesmann i sur., 2012), komina grožđa

(Minjares-Fuentes i sur., 2014), kora lubenice (Petkowicz i sur., 2016), kora banane (Oliveira i sur., 2016). Također, korištene su i različite vrste egzotičnog voća poput marakuje (Yapo i Koffi, 2006), manga (Koubala, i sur., 2008), papaje (Koubala, i sur., 2014) i opuncije (Lira-Ortiz i sur., 2014).

Međutim, industrijska proizvodnja ovog prehrambenog aditiva i dalje je isključivo ograničena na ekstrakciju iz kore citrusa i tropa jabuke. U cilju dobivanja maksimalnog prinosa kao i kvalitete pektina, razvijen je veliki broj ekstrakcijskih metoda. Najširu primjenu imaju konvencionalne metode (ekstrakcija refluksiranjem ili Soxhlet ekstrakcija), čiji je glavni nedostatak dugotrajnost ekstrakcijskog procesa, toplinska degradacija uzrokovana povećanjem temperature kao i neekonomičnost uslijed korištenja velikih volumena ekstrakcijskog sredstva. Stoga, da bi se izbjegli nedostaci konvencionalnih postupaka izolacije pektina, druge, inovativne tehnike, poput ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, ultrazvukom i visokim hidrostatskim tlakom, zasigurno pružaju velike i efikasne mogućnosti (Minjares-Fuentesa, i sur., 2014; Chen, i sur., 2015; Prakash i sur., 2015).

Dakle, osnovni cilj ovog istraživanja bio je:

- upotrijebiti koru rajčice i njene frakcije dobivene postupkom prosijavanja pri izolaciji pektina,
- primjeniti nekonvencionalnu, utrazvukom potpomognutu ekstrakciju, umjesto konvencionalne metode refluksiranja, u cilju skraćivanja vremena ekstrakcije te dobivanja većeg prinosa i bolje kvalitete pektinskog izolata i
- primjeniti analitičku spektrofotometrijsku metodu u ultraljubičastom (UV) i vidljivom (Vis) dijelu elektromagnetskog zračenja pri određivanju sadržaja galakturonske kiseline, ukupnih šećera i polifenola u dobivenim izolatima pektina, u cilju procjene njegove kvalitete.

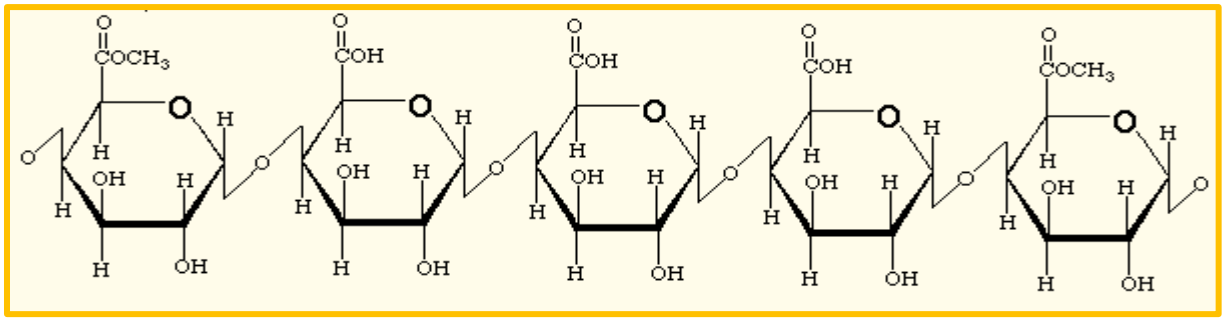
Konačno, ovim istraživanjem bi se utvrdilo čine li kora rajčice i njene prosijane frakcije potencijalne izvore izolacije pektina i njegove daljnje implementacije u različite prehrambene svrhe. Time bi se znatno doprinijelo razvoju ideja o potencijalnim mogućnostima recikliranja biootpada u skladu s novim trendovima razvoja cirkularne ekonomije.

2. TEORIJSKI DIO

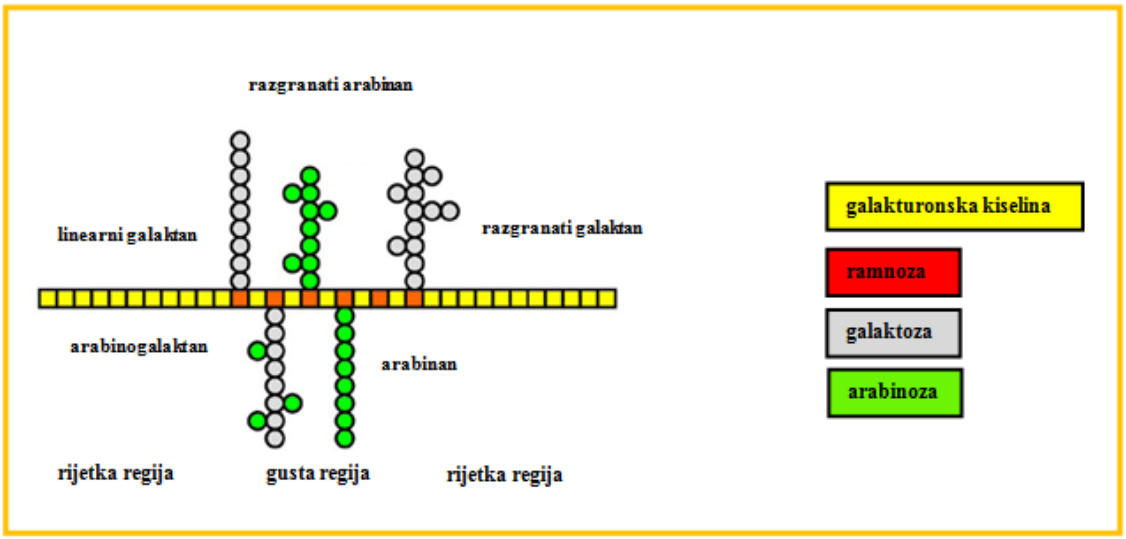
2.1. STRUKTURA PEKTINA

Pektini su prvenstveno polimeri D-galakturonske kiseline (homopolimer [1-> 4] *α*-D-galaktopiranoziluronske kiseline s različitim stupnjevima metilesterificiranih karboksilnih skupina) i ramnogalakturonana (heteropolimer ponavljanja [1-> 2] α-L-ramnozil- [1-L] *α*-D-galaktoziluronske kiseline disaharidnih jedinica), što ga čini α-D-galakturonanom (Lau i sur., 1985). D-galakturonska kiselina (Slika 1) je uvijek glavna šećerna komponenta pektina (~65 %), koja može biti djelomično metil ili acetil esterificirana na C-6, odnosno O-2 i/ili O-3 položaju, pri čemu stupanj esterifikacije ima značajan utjecaj na funkcionalna svojstva pektina. Osim D-galakturonske kiseline, ponekad mogu biti prisutne i različite količine D-galaktoze, L-arabinoze, L-ramnoze te tragovi drugih šećera, što ovisi o sirovini kao i uvjetima korištenim pri izolaciji pektina.

Dakle, pektini su blok kopolimeri (Caffall i Mohnen, 2009), tj. razgranati blokovi koji sadrže glavni galakturonanski lanac prekinut i savijen čestim jedinicama ramnoze. U razgranatom bloku molekule (Slika 2) na ramnozu su [1 -> 4] vezom pričvršćeni arabinanski i galaktanski lanci. Osim L-ramnoze, D-galaktopiranoze i L-arabinofuranoze, u bočnim lancima pektina pojavljuju se i drugi neutralni šećeri poput, D-ksilopiranoze, D-glukopiranoze i L-fukopiranoze, dok se D-apioza, 2-0-metil-D-ksiloza i 2-0-metil-fukoza pojavljuju vrlo rijetko (Caffal i Mohnen, 2009). Udio neutralnih šećera iznosi 10 do 15 % s obzirom na ukupnu pektinsku masu (Thibault i Rinaudo, 1986). Duljina lanca neutralnih šećera u rijetkoj regiji (engl. smooth region) može biti 9 do 10 ostataka, dok u gustoj (engl. hairy region) 8 do 20 (de Vries i sur. 1982; Selvendran, 1985).



Slika 1. Prikaz D-galakturonske kiseline kao osnovne strukturne jedinice pektina (Mohnen, 2008).



Slika 2. Prikaz strukture pektina (Harholt i sur., 2010).

2.2. PROIZVODNJA PEKTINA

Proces komercijalne proizvodnje pektina započinje ekstrakcijom kore citrusa ili komine jabuke. U cilju postizanja održive i kontinuirane proizvodnje pektina, potrebno je raspolagati dovoljnim količinama sirovine, dobre kvalitete. U mokrom stanju, sirovina može biti sklona gljivicama i razvoju pektinskih enzima, poput pektin metilesteraze, poligalakturonaze, pektin liaze i pektat liaze. Kora citrusa sadrži značajne količine nativne pektin metilesteraze, pa se ne preporučuje skladištenje mokre sirovine više od nekoliko sati. Radi spriječavanja kontaminacije svježu sirovinu potrebno je odmah ekstrahirati ili osušiti te skladištiti nekoliko mjeseci. Ako je sirovina, pogotovo kora citrusa koja sadrži mnogo limunske kiseline dobro oprana, a potom i osušena u uvjetima prikladnim za inaktiviranje enzima i uništavanja plijesni, bez degradacije pektina, može se dobiti vrlo kvalitetan proizvod. Budući da kora citrusa ili komina jabuke nisu dostupni tijekom cijele godine, industrijska proizvodnja pektina se mora provesti osušenom sirovinom ili zatvoriti proizvodnju van sezone svježih plodova.

Nakon prethodne obrade sirovine (sušenje i skladištenje) proces komercijalne proizvodnje pektina odvija se u nekoliko faza:

- **ekstrakcija** kore citrusa ili komine jabuke s nekom od vrućih razrijeđenih otopina anorganskih kiselina (klorovodična, nitratna i sumporna), pri čemu dolazi do oslobađanja pektina iz stanične stijenke uslijed kemijskog djelovanja uzrokovanog niskim pH vrijednostima (1,4 do 2,6) i visokim temperaturama (80 do 100 °C) (Schemin i sur., 2005).

  Budući da prinos pektina ovisi o postavljenim uvjetima ekstrakcije, ovaj proces možemo smatrati najvažnijom dijelom u dobivanju kvalitetnog pektinskog izolata. U cilju postizanja što većeg prinosa, ali i kvalitete pektina dokazano je kako se ekstrakcija ovog polisaharida može odvijati variranjem temperature i vremena ekstrakcije, ekstrakcijskog sredstva, materijala za ekstrakciju kao i metode ekstrakcije. Tako primjerice umjesto uobičajne klorovodične kiseline za ekstrakciju pektina iz kore jabuke može se upotrijebiti i limunska kiselina koja djeluje učinkovitije od klorovodične (Virk i Sogi; 2004; Schemin i sur. 2005). Osim kore limuna i komine jabuke, pri ekstrakciji pektina korištene su i neke druge sirovine poput breskve, gdje je maksimalni prinos ostvaren koristeći 70 % dušičnu kiselinu, pri temperaturi od 80 °C, pH vrijednosti 1,2 i vremenu od 60 min (Paga'n i Ibarz, 1999). Faravash i Ashtiani (2007) utvrdili su da se maksimalni prinos pektina izoliranog iz breskve može ostvariti upotrebom klorovodične kiseline (pH vrijednosti od 2,8 do 3,5) uz vrijeme ekstrakcije od 120 minuta. Rehmann i sur. (2004) ekstrahirali su pektin iz kore manga sa sumpornom kiselinom, a maksimalni prinos dobiven je pri 80 °C, pH vrijednosti 2,5 i vremenu ekstrakcije od 120 min. Ninčević Grassino i sur. (2016a) pokazali su kako porijeklo sirovine ima značajan utjecaj na sadržaj galakturonske kiseline, pa je iz kore rajčice, šarže A izolirano 52,9 %, a iz šarže B 39,6 % galakturonske kiseline. Dodatni, ali manje važan izvor pektina je i pulpa šećerne repe. Unatoč visokom sadržaju pektina, dostupnosti i relativno niskoj cijeni, šećerna repa se ne koristi kao sirovina za dobivanje pektina zbog slabe sposobnosti geliranja u usporedbi s pektinom iz jabuke i citrusa, što se uglavnom pripisuje visokom udjelu acetilnih skupina (Renard i Thibault, 1993). Čak i ako se nedostaci, poput niskog stupnja esterifikacije i prisutnosti acetilne skupine (blokira geliranje) prevladaju kemijskom modifikacijom, pektin iz repe ima veći udio neutralnih šećera i manji galakturonske kiseline, ispod dopuštene norme, pa njegova upotreba kao prehrambenog aditiva nije moguća (May, 1990). Iz svega navedenog, može se zaključiti da bi se postigao zadovoljavajući prinos, ali i kvaliteta pektina, potrebno je pronaći kompromis kod postavljanja uvjeta ekstrakcije, radi izbjegavanja de-polimerizacije i de-esterifikacije pektina.

- **filtriranje** kao druga faza u proizvodnji pektina je potrebna kako bi se odvojio filtrat s ekstrahiranim pektinom od preostalog netopljivog biljnog tkiva. Filtrirati se može pomoću filtera kao što su drvena celuloza ili perlit, a učinkovita filtracija može se ostvariti ukoliko suspenzija biljnog materijala u ekstrakcijskom sredstvu pokazuje relativno nisku viskoznost. Netopljivo biljno tkivo kao otpadna sirovina može se koristi kao stočna hrana (Brejnholt, 2010).
- **taloženje** kao treća proizvodna faza uključuje precipitaciju pektina u filtratu, dodatkom jednog od organskih otapala (etanol, propanol i aceton) u kojima je pektin netopiv, ali u kojem su mnoge nečistoće, preostale u ekstraktu topljive (Brejnholt, 2010). Taloženje s etanolom vjerojatno je najstarija poznata metoda i koristi se u komercijalnoj proizvodnji pektina. Međutim, pri postupku taloženja utrošak etanola je velik, pa se alkohol mora pažljivo obnoviti (postupkom destilacije) ili njegova upotreba nije isplativa. Iako međunarodni standardi hrane (FAO/WHO, 2016) omogućuju upotrebu etanola ili izopropanola kao organskog otapala, alternativa taloženju alkoholom je taloženje aluminijem (Seggiani i sur., 2009).
- **ispiranje** pektinskog ekstrakta etanolom i/ili acetonom radi uklanjanja preostalih topljivih tvari poput kiselina, šećera i polifenola (Shi i sur., 1995).
- **sušenje** i **mljevenje**, pri čeme se dobiva svijetlo-smeđi pektinski prah. Većina pektina trenutno prisutnih na tržištu se prodaje u suhom obliku dobivenom: (a) sušenjem raspršivanjem ili sušenjem na valjcima, (b) taloženjem kao netopljiva sol nakon čega slijedi ispiranje zakiseljenim alkoholom i sušenje, ili (c) taloženjem s alkoholom i sušenje. Način obrade ekstrakta ovisi o njegovoj konačnoj upotrebi. Najjednostavniji postupak sastoji se od koncentriranja uparavanjem i stvaranja viskozne, obično više ili manje smeđkaste tekućine koja se stavlja na tržište kao tekući pektin. Trgovina ovog proizvoda smanjuje se prvenstveno zbog veće potražnje visoko pročišćenih proizvoda.

2.3. KOMERCIJALNI PEKTIN I ZAKONSKE NORME

Prema Članku 4. Pravilnika o prehrambenim aditivima (Narodne novine, 62/2010), aditivima se ne smatraju proizvodi koji sadržavaju pektin i dobivaju se od sušene pulpe jabuke ili kore agruma ili dunja, ili iz njihove mješavine, djelovanjem razrijeđene kiseline koje prati djelomična neutralizacija natrijevim ili kalijevim solima (tekući pektin). U skladu s propisima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, 2016) pektin se smatra sigurnim prehrambenim aditivom, dodijeljene oznake prihvatljive dnevne doze (engl. acceptable daily intake - ADI) „nije specificirano“, što znači da ukupan unos pektina nema posljedica na ljudsko zdravlje u skladu sa provedenim toksikološkim, kliničkim i biokemijskim testovima. Nadalje, Američka agencija za hranu i lijekove (FDA, 2017) odobrava pektinu GRAS status (engl. Generally Recognised as Safe), prepoznat kao siguran. Treba napomenuti da Codex Alimentarius i američke specifikacije uključuju amidirani i neamidirani pektin u jednoj klasi, dok propisi Europske unije (EU regulation No 231/2012) pokazuju razliku među njima. Ipak, i amidiranom i neamidiranom pektinu dodjeljena je E440 oznaka prehrambenog aditiva. Njihova upotreba je identična, osim organske hrane, gdje je dopušteno korištenje samo neamidiranog pektina (IPPA, 2017).

Prema direktivi Europske unije (EU regulation No 231/2012) i međunarodnim standardima (FAO/WHO, 2016) najmanje 65 % pektinske supstance mora biti galakturonska kiselina kako bi se materijal klasificirao kao komercijalni pektin. Jedinice galakturonske kiseline mogu ili ne moraju biti esterificirane s metoksil skupinom, a ovisno o stupnju esterifikacije (veći ili manji od 50 %), pektin je klasificiran u dvije skupine: a) visoko (engl. high metoxyl, HM > 50 %) i nisko metoksil esterificirani (engl. low metoxyl, LM < 50 %). Također mogu se pripraviti i amidirani nisko esterificirani pektini, kod kojih se jedan dio esterskih grupa zamijeni amidnim grupama. Deesterifikacija se provodi uz pomoć amonijaka. Sve navedene vrste pektina karakterizira svojstvo želiranja. U nekim izvorima pektina, uključujući pulpu šećerne repe, jedinice galakturonske kiseline mogu se O-acetilirati. Međutim, ova vrsta pektina ne pokazuje svojstvo geliranja, pa se iz tog razloga koristi kao emulgator ili stabilizator (Renard i Thibault, 1993).

Ovisno o upotrebi, komercijalni pektin se može miješati sa šećerima, npr. sa saharozom, kao i s odgovarajućim puferskim solima kako bi se kontrolirala pH vrijednost ili dobile druge poželjne karakteristike, poput sposobnosti geliranja ili povećanja viskoznosti. Također, za upotrebu u određenim proizvodima, komercijalni pektin može se pomiješati i s drugim odobrenim prehrambenim aditivima (IPPA, 2001).

2.4. PEKTINSKI GELOVI

Najvažnije svojstvo pektina je sposobnost želiranja, odnosno stvaranja gela. Želiranje pektina predstavlja proces djelomičnog taloženja pektina uslijed njegovog prelaska iz topljivog sol u netopljivo gel-stanje, u kojem su molekule nepokretne i međusobno povezane vodikovim ili ionskim vezama. Do stvaranja ovih veza dolazi uslijed promjene naboja molekula pektina, pri čemu prisustvo kiselina i šećera svakako doprinosi njihovom nastanku. Komercijalni HM esterificirani pektin standardizira se na klasu želiranja koja izražava koliko kg šećera može biti gelirano 1 kg pektina kako bi se dobio gel sa specifičnim sastavom i čvrstoćom (Brejnholt, 2010). Različite metode se koriste za mjerenje čvrstoće gela, no najčešća je SAG metoda (IFT Committee, 1959). Provodi se tako da se u posebnim čašama, pripremljeni i očvrsnuti gel preokrene, a potom mu se izmjeri deformacija.

Dakle, stvaranje HM pektinskog gela predstavlja fizičku povezanost makromolekula uslijed dodatka vode, šećera i kiseline (pH = 2,9 - 3,2). Kod proizvodnje džemova i želea bez ili s niskim udjelom šećera, HM pektin nije u stanju tvoriti gel, tako da se koristi LM pektin, koji ne zahtijeva dodatak šećera. Uspostavljanje LM pektinskog gela je isključivo ovisno o koncentracij dvovalentnih kationa, najčešće kalcija u pektinskoj formuli proizvoda. Za razliku od HM i LM pektina te amidiranog pektina, demetilirani pektin dobiven djelomičnom deesterifikacijom metoksilnih skupina nema želirajuća svojstva.

2.5. UPOTREBA PEKTINA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

Pektin ima najveću upotrebu u proizvodnji džemova i želea. Može se dodati direktno kao suhi prah, pomiješan sa šećerom ili kao koncentrirana vodena otopina (4 - 8 %).Vrijeme i način dodavanja pektina predstavljaju važne varijable u procesima proizvodnje džemova i želea. Osim već tradicionalne upotrebe pri proizvodnji džemova i želea, pektin se koristi i u jestivim prevlakama za inhibiranje migracije lipida (Brake i Fennema, 1993), u proizvodnji instant gelova koji se primjenjuju u mnogim pekarskim proizvodima.

HM pektin se upotrebljava pri proizvodnji aromatiziranih slatkiša, a HM i LM pektini kod poboljšavanja kvalitete voćnih proizvoda (sirup bobičastog voća i jagode) koji se podvrgavaju postupcima smrzavanja i odmrzavanja. LM pektin može se dodavati i umacima za roštilj, gdje utječe na njihov okus i teksturu, kao i pri izradi jestivih, prozirnih filmova, koji spriječavaju gubitak hranjvih tvari i okusa tijekom skladištenja.

Pektin ima primjenu i u industriji pića, osobito pri stabilizaciji bezalkoholnih pića. Također, može se koristiti i pri stabilizaciji emulzija eteričnih ulja. Trenutno, najveći trend primjene pektina je u napicima od soje, kao i kiselim i fermentiranim mliječnim napicima (izbjegavanje agregacije mliječnih bjelančevina i naknadne separacije sirutke).

2.6. UPOTREBA PEKTINA U FARMACEUTSKOJ INDUSTRIJI

Poznato je kako pektin utječe na smanjenje razine kolesterola u krvi, pa njegov unos od najmanje 6 g/dan ima pozitivan učinak na smanjenje koncentracije kolesterola (Brouns i sur., 2012).

Pektin djeluje kao prirodna profilaktička supstancija protiv trovanja s toksičnim kationima. Učinkovito uklanja olovo i živu iz gastrointestinalnog trakta i respiratornih organa (Guilherme i sur., 2010). Kada se injektira intravenozno, pektin skraćuje vrijeme koagulacije krvi što je korisno u kontroli krvarenja (Srivastava i Malviya, 2011). Pektin smanjuje brzinu probave imobilizacijom sastojaka hrane u crijevima, što rezultira manjom apsorpcijom hrane. Ove osobine pektina se koriste u liječenju poremećaja povezanih s prejedanjem (Tucker i Thomas, 2009).

Pektinski hidrogelovi koriste se kao vezujuća sredstva u izradi različitih vrsta tableta, a kao nosač aktivne tvari upotrebljava se u pripravi ljekova za liječenje bolesti probavnog sustava, poput ulceroznog kolitisa, Crohnove bolesti, karcinoma debelog crijeva (Ashford, 1993; Malviya i sur., 2010).

2.7. OSTALA UPOTREBA PEKTINA

Filmovi od prirodnih proizvoda, pa tako i pektina sve su zanimljiviji jer su biorazgradivi, imaju mogućnost recikliranja i čak se mogu koristiti u nekim *in vivo* farmaceutskim primjenama (Coffin i Fishman, 1993). Pektin se može koristi i u izradi biorazgradivih slamki za piće te za pripravu membrana za ultracentrifugiranje i elektrodijalizu (Thakur i sur., 1997).

2.8. ULTRAZVUKOM POTPOMOGNUTA EKSTRAKCIJA PEKTINA

Konvencionalne metode ekstrakcije, poput refluksiranja ili Soxhlet ekstrakcije mogu uzrokovati degradaciju željenih komponenti zbog visokih temperatura i dugog vremena trajanja. Iz tog razloga upotreba nekonvencionalnih ekstrakcijskih tehnika, poput ekstrakcije ultrazvukom sve više raste, a njene osnovne karakteristike, a ujedno i prednosti u odnosu na konvencionalne tehnike su: visoka reproducibilnost u vrlo kratkom vremenu ekstrakcije, jednostavnije rukovanje, niže temperature i manja potrošnja otapala (Caili i sur., 2006; Chemat i sur., 2008). Navedene karakteristike svakako doprinose sve većoj primjeni ultrazvučne ekstrakcije u prehrambenoj industriji, znanosti i tehnologiji, uopće. S obzirom na primjenu ultrazvučna ekstrakcija može se podijeliti u dva glavna polja:

- **ultrazvuk niskog intenziteta**: pri frekvencijama, obično od 2 do 20 MHz postižu se niski intenziteti, a kreću se u rasponu od 100 $mWcm^{-2}$ do 1 Wcm^{-2} (Leadley i Williams, 2006). Pri ovim uvjetima ne dolazi do fizičkih oštećenja materijala, kao ni do kemijskih promjena ispitivanog sustava.
- **ultrazvuk visokog intenziteta**: prostire se u frekvencijskom rasponu od 20 do 100 kHz uz prošireno područje do 2 MHz, ovisno o procesnim parametrima (Brnčić i sur., 2009). Ultrazvuk visokog intenziteta, u rasponu od 1 do 1000 Wcm^{-2} stvara dovoljno energije da može uzrokovati razdvajanje intermolekularnih veza. Prolaskom ultrazvučnog vala kroz medij dolazi do nastanka longitudinalnih valova, što dovodi do stvaranja područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka (Sala i sur., 1995, Povey i Mason, 1998). Dolazi do formiranja milijuna mikroskopskih mjehurića (šupljina), koji se proširuju pod utjecajem negativnog tlaka, a potom naglo implodiraju pod utjecajem pozitivnog tlaka (Patist i Bates, 2008). Kada energija ultrazvuka nije dovoljna za zadržavane plinske faze, u mjehuriću dolazi do brze kondenzacije. Kondenzirane molekule sudaraju se velikom brzinom, stvarajući šok valove. Takvi šok valovi uzrokuju područja vrlo visoke temperature i tlaka, koji dosežu do 5500 K i 100 MPa (Brnčić i sur., 2009; Bosiljkov i sur., 2011). Ultrazvučni intenziteti iznad 1 Wcm^{-2} dovode do stabilnih kavitacija, što je glavni uzrok nastajanja fizikalnih i kemijskih promjena u materijalima koji su podvrgnuti ultrazvučnom tretmanu. U frekvencijskom području od 20 do 40 kHz ultrazvuk visokog intenziteta ima najučinkovitije djelovanje te se iz navedenog razloga većina istraživanja temelji na primjeni tog frekvencijskog područja (Patist i Bates, 2008).

Tijekom obrade materijala ultrazvukom, kavitacija uzrokuju bubrenje stanica, te probijanje staničnih stijenki, što pridonosi lakšem prodiranju otapala u stanice materijala (veća brzina difuzije otapala) i učinkovitijeg otpuštanje željenih sastojaka kroz staničnu stijenku (Vinatoru, 2001; Brnčić i sur, 2009).

U cilju postizanja što veće efikasnosti ekstrakcije i odvajanja željenog analita, nužno je poznavati mehanizam i kinetiku procesa ekstrakcije. Pored otapala, temperature i tlaka potrebno je voditi računa i o vremenu obrade uzorka kao i o snazi ultrazvuka kako ne bi došlo do razgradnje kemijskih sastojaka u ekstrahiranom materijalu. Također i sam način provođenja ekstrakcije bilo ultrazvučnom kupelji ili sa sondom, direktno uronjenom u uzorak s otapalom može utjecati na veći/ili manji prinos željenog analita.

Ultrazvučne kupelji su uređaji kod kojih je pretvarač vezan na dno spremnika, te uglavnom rade pri frekvenciji od 40 kHz. Kako bi se omogućilo podešavanje temperature, mogu biti izvedene sa izolacijom i hladilom, ili sa kontroliranim grijanjem (Mason, 1998). Ultrazvučne sonde su uređaji gdje je jedan ili više metalnih klinova vezano na pretvarač, na čijoj frekvenciji i rezoniraju, pa time i osiguravaju intenzitet visoke snage. Ukoliko je potrebno povećati unos ultrazvučne energije, moguće je serijski povezati sonde ili upotrijebiti tzv. višestruke klinove, nazvane „podizači“ (Keil i Swamy, 1999).

2.9. ANALITIČKE METODE ODREĐIVANJA PEKTINA

Pektin u čistom obliku lako se identificira na temelju svojih fizičkih svojstava i reaktivnosti prema specifičnim reagensima. Međutim, u smjesi s drugim gumama ili u hrani, posebni testovi ili postupci odjeljivanja su obično potrebni kako bi se smanjile smetnje drugih sastojaka. Karakteristike otapanja, izgled otopine i izgled precipitata dobivenog nakon dodavanja alkohola korisni su preliminarni testovi za identifikaciju pektina, odnosno kvalitativnu analizu. Pektinska kiselina i kalcijev pektat su netopljivi u vodi, dok se monovalentne soli pektina i pektinske kiseline otapaju zagrijavanjem te se dobije bistra otopina iz koje se dodavanjem alkohola izdvaja ljepljivi bijeli talog.

I pektin i njegovi hidrolizati reagiraju na specifičan način s bazičnom otopinom olova acetata, dajući crveno obojani talog, a reakcija zasnovana na prisutnosti D-galakturonske kiseline u hidrolizatu koristi se kao specifični test za pektinske tvari.

Pored identifikacijskih testova, analiza galakturonske kiseline kao i ukupnih uronskih kiselina (AUA) određuje se primjenom različitih kvantitativnih analitičkih metoda (Slika 3.).

Sadržaj ukupnih uronskih kiselina i metoksil estera u pektinu obično se određuje volumetrijskom, kiselinsko - baznom titracijom (Ranganna, 1995). Budući da ova metoda omogućuje istovremeno određivanje sadržaja metoksila (MeO), uronskih kiselina (AUA) i stupnja esterifikacije (DE) još uvijek se koristi pri kvantifikaciji pektina tijekom njegove komercijalne proizvodnje. Zbog jednostavne, jeftine i brze provedbe koristili su je različiti autori pri određivanju pektina izoliranog iz kakaa (Mollea i sur., 2008), jabuke (Kumar i Chauhan, 2010; Min, i sur., 2011), papaje (Koubala i sur., 2014.), manga (Kauser i sur., 2015), suncokreta (Kang i sur., 2015) i kore rajčice (Ninčević Grassino i sur., 2016a; Ninčević Grassino i sur., 2016b). Iako jednostavna, ova analitička metoda zahtijeva pročišćavanje pektinskog izolata alkoholom, kako bi se uklonile prisutne nečistoće i interferenti koji smetaju točnom određivanju MeO, AUA i DE sadržaja. Također, ovom analitičkom metodom ne može se izbjeći problem razlikovanja D-galakturonske kiseline od ostalih uronskih kiselina.

Osim titrimetrijske metode, za kvantifikaciju uronskih kiselina u pektinu primjenjuje se i spektrofotometrijska metoda, u ultraljubičastom i vidljivom području elektromagnetskog zračenja. Kod ove metode uzorak pektina potrebno je podvrgnuti hidrolizi, uslijed čega dolazi do oslobađanja galakturonske kiseline, ali i drugih jednostavnih šećera, poput heksoza i pentoza. Uslijed dodatka kromogenih reagenasa, dolazi do stvaranja obojenih kompleksa, a njihov intenzitet ovisi i proporcionalan je količini uronskih kiselina u pektinu.

S obzirom na upotrebljeni kromogeni reagens razlikuju se sljedeće kolorimetrijske metode određivanja pektina: karbazol (McComb i McCready, 1952), *m*-hidroksidifenil (Blumenkrantz i Asboe-Hansen, 1973), 3,5-dimetilfenol ili ksilenol (Scott, 1979; Walter i sur., 1993), sulfamat-*m*-hidroksidifenil (Filisetti-Cozzi i Carpita, 1991), bakar-Folin-Ciocalteau (Antron i Barrett, 2008) i tioglikolna kiselina (Yapo, 2011). I kod ove analitičke metode radi se o određivanju ukupnih uronskih kiselina u uzorku, a u različitim znanstvenim radovima može se naći udio anhidrogalakturonske kiseline, anhidrogalakturonata, anhidrouronske kiseline, galakturonske kiseline, ukupne galakturonske kiseline i galakturona (Garna i sur., 2006; Kulkarni i Vijayanand, 2010; Min i sur., 2011; Georgiev i sur., 2012; Kang i sur., 2015; Hosseini i sur., 2016; Müller-Maatsch i sur., 2016).

Pored navedenih, razvijene su i druge analitičke metode kako bi se odredila čista galakturonska kiselina kao i eventualno prisutni neutralni šećeri u pektinima izoliranih iz različitih biljnih materijala. Tako primjerice visokodjelotvoru kromatografiju s anionskom izmjenom uz pulsirajući amperometrijski detektor (HPAEC-PAD) koriste Garna i suradnici (2006), te Geerekens i suradnici (2015), a plinsku kromatografiju (GC) s plameno - ionizacijskim detektorom (FID) i GC s masenom spektrometrijom (MS) koriste Garna i

suradnici (2007), Koubala i suradnici (2014), Christiaens i suradnici (2015) i Müller-Maatsch i suradnici (2016) pri identifikaciji i određivanju neutralnih šećera.

Među kromatografskim tehnikama korištena je i visokodjelotvorna kromatografija isključenjem na osnovi veličine čestica (HPSEC) za određivanje molekularne težine pektina i raspodjele molekulske mase (Min i sur., 2011; Georgiev i sur., 2012; Koubala i sur., 2014; Kang i sur., 2015; Geerekens i sur., 2015; Kaya i sur., 2014; Christiaens i sur., 2015).

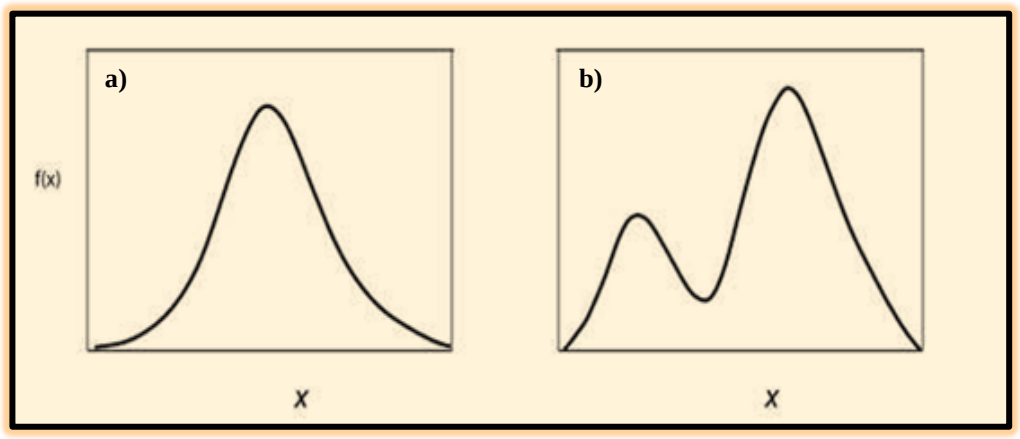
Spektralne tehnike, poput infracrvene spektroskopije s Fourier-ovom transformacijom (FTIR) i nuklearne magnetske rezonancije (NMR) korištene su pri karakterizaciji pektinske strukture (Kurita i sur., 2008; Kumar i sur., 2010; Min i sur., 2011; Gopi i sur., 2014; Hosseini i sur., 2016, Ninčević Grassino i sur., 2016a; Ninčević Grassino i sur., 2016b; Müller-Maatsch i sur., 2016).



Slika 3. Prikaz kvantitativnih analitičkih metoda korištenih pri određivanju sastojaka pektina.

2.10. MJERE CENTRALNE TENDENCIJE

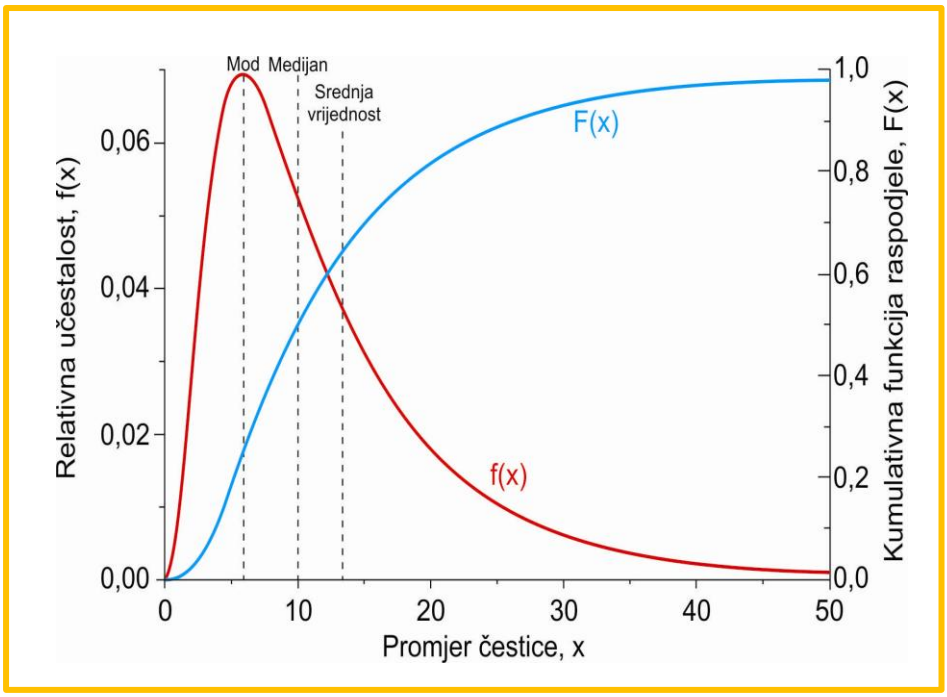
Postoji veliki broj prosječnih ili srednjih veličina kojima mogu biti opisane raspodjele veličine čestica. Za danu raspodjelu tri su najvažnije mjere centralne tendencije: mod, medijan i aritmetička sredina. Svrha određivanja centralne tendencije je prikazati sastav čestica jednom brojkom i može poslužiti kao koristan vodič u kontroli određenih procesa. Mod je veličina koja se najčešće pojavljuje i odgovara piku na krivulji frekvencijske raspodjele čestica (monomodalna, Slika 4a). Neke raspodjele mogu imati više od jednog pika te se nazivaju multimodalne distribucije, poput bimodalne (Slika 4b), a pokazuju da promatrani uzorak možda i nije u potpunosti homogen.



Slika 4. Monomodalna (a) i bimodalna (b) distribucija (Svarovsky, 2000).

Medijan je 50 % - tna veličina od koje je 50 % čestica veće i 50 % čestica manje [d (0,5)]. Medijan dijeli površinu ispod frekvencijske krivulje na dvije polovice i najlakše se određuje kumulativno, iz postotne krivulje, odnosno mjesta koje odgovara iznosu od 50 %. Aritmetička sredina je veličina do koje se dolazi računskim putem na bazi vrijednosti svakog elementa: [d (0,1)] - 10 % čestica je manje od navedene vrijednosti; [d (0,9)] - 90 % čestica je manje od navedene vrijednosti (Slika 5) (Svarovsky, 2000).

Rezultati mjerenja raspodjele veličine čestica aproksimiraju se velikim brojem analitičkih funkcija. Bilo koja funkcija predložena za opis raspodjele, treba biti primjerena rezultatima mjerenja, te mora postojati slaganje između svojstva stvarne raspodjele veličina čestice i matematičkih svojstava funkcije (Svarovsky, 2000).



Slika 5. Mod, medijan, srednja vrijednost raspodjele veličine čestica (Bosiljkov, 2011).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

U ovom istraživanju je korištena osušena kora rajčice prikupljena u području Agro Nocerina (Angri, Salerno), talijanske regije Campania (Italija). Uzorci biootpada (komina) rajčice su sadržavali koru, sjemenke i grube nečistoće, poput suhih dijelova biljke. Nakon uklanjanja nečistoća uzorci su samljeveni pomoću sjeckalice za hranu, a potom su još jednom fino usitnjeni korištenjem električnog mlinca za kavu.



Slika 6[*]. Osušena kora rajčice.

3.2. KEMIKALIJE

- Aceton (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Etanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Fenol (Acros organics, Geel, Belgija)
- Folin Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Glukoza monohidrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Galna kiselina monohidrat (Sigma-Aldrich, Hong Kong, Kina)

[*] Slike izvorno nastale u Laboratoriju za analitičku kemiju i Laboratoriju za tehnološke operacije.

- Karbazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

- Jabučni pektin (Sigma-Aldrich, Hong Kong, Kina)
- Natrijev karbonat, bezvodni (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Nitratna kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Sumporna kiselina (Kefo, Zagreb, Hrvatska)

3.3. OTOPINE I NJIHOVA PRIPREMA

U postupku ekstrakcije kore rajčice i njenih prosijanih frakcija pomoću ultrazvučne kupelji korištena je nitratna kiselina (c = 0,1 M).

Pri određivanju sadržaja galakturonske kiseline, ukupnih šećera i ukupnih fenola u uzorcima pektina korištene su slijedeće otopine:

- natrijeva hidroksida (c = 0,05 M)
  4 g NaOH otopljeno je u destiliranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 2000 mL.
- karbazola (0,1 %, *w*/*v*)
  0,1 g karbazola otopljeno je u 96 %-tnom etanolu, u odmjernoj tikvici od 100 ml.
- fenola (5 %, *w*/*v*)
  5 g fenola otopljeno je u destiliranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 100 mL.
- Folin-Ciocalteu reagensa (c = 0,2 M)
  U odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetirano je 2,5 mL 2 M Folin-Ciocalteu (FC) reagensa i do oznake nadopunjeno destiliranom vodom.
- bezvodnog natrijeva karbonata, (20 %, *w*/*v*)
  200 g Na_2CO_3 otopljeno je u 800 mL ključale destilirane vode i nakon hlađenja otopina je prebačena u odmjernu tikvicu od 1000 mL, te je dodano nekoliko kristalića Na_2CO_3. Otopina je nakon 24 h profiltrirana.

3.4. APARATURA I PRIBOR

3.4.1. Aparatura

- Aparatura za prosijavanje (Fritsch Analysette 3 PRO, Markt Einersheim, Njemačka)
- Analitička vaga (JOBST, Samobor, Hrvatska)
- Kolorimetar CM-3500d (Konica Minolta Sensing, Inc. Osaka, Japan)
- Malvern uređaj - Malvern MASTERSIZER 2000 (Worcestershire, UK)
- Ultrazvučna vodena kupelj (Elmasonic, P300H, Elma, Njemačka)
- UV/Vis Spektrofotometar (Perkin Elmer, Lambada 1, Massachusetts, SAD)

3.4.2. Pribor

- Erlenmayerova tikvica od 1000 mL
- Odmjerne tikvice volumena 25, 50 i 100 mL
- Pipete volumena 1, 2, 5, 10, 20 i 25 mL
- Staklene čaše volumena 100, 150, 250, 500, 1000 mL
- Staklene epruvete
- Staklene kivete
- Sita za prosijavanje promjera (d): 1,12; 0,9; 0,71; 0,5; 0,35 μm
- Sušionik (Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska)
- Tehnička vaga (Mikrotehna, Zagreb, Hrvatska)

3.5. ODREĐIVANJE RASPODJELE VELIČINE ČESTICA KORE RAJČICE

Osušenoj i usitnjenoj kori rajčice određena je raspodjela veličina čestica laserskim analizatorom (Malvern Masterseizer 2000, UK). Određivanje promjera čestica zasniva se na principu difrakcije laserske zrake kroz ćeliju pod kutem od 0,02 - 140°. Kroz radnu ćeliju uređaja propušta se uzorak, aodređivanje veličine čestica suhe kore rajčice temeljilo se na nedestruktivnoj analizi u rasponu od 0,02 - 2000 μm bez posebnog podešavanja optičkog sustava (Bosiljkov, 2011).

3.6. PRIPREMA UZORKA ZA EKSTRAKCIJU

Nakon određivanja promjera veličine čestica, osušena i usitnjena kora rajčice podvrgnuta je postupku prosijavanja odabirom sita različitih promjera otvora:1,12; 0,9; 0,71, 0,5 i 0,35 μm. Prosijavanje je trajalo 10 min, pri amplitudi od 2 mm i intervalu od 3 sekunde. Nakon završenog prosijavanja najveća učestalost čestica kore rajčice zaostala je na sitima promjera otvora 1,12; 0,71 i 0,35 μm čije su frakcije upotrebljene u nastavku istraživanja.

3.7. EKSTRAKCIJA PEKTINA POMOĆU ULTRAZVUČNE KUPELJI

Ekstrakcija pektina (Slika 7) ultrazvučnom kupelji je provedena na uzorcima kore rajčice (TP) i njenim frakcijama zaostalim na sitima promjera otvora 1,12; 0,71 i 0,35 (TP - 1,12, TP - 0,71 i TP - 0,35). U tu svrhu odvagano je 10 g uzorka u staklenu čašu (800 mL), a potom je dodano 300 mL 0,1 M nitratne kiseline. Čaša sa uzorcima i nitratnom kiselinom kao ekstrakcijskim sredstvom stavljena je u ultrazvučnu kupelj nakon postavljanja slijedećih ekstrakcijskih parametara:

- nepromijenjene varijable: temperatura 80 °C, frekvencija 37 kHz i snaga 100 %
- promjenjive varijable: vrijeme 15, 30 i 45 min

Nakon završetka ekstrakcije čaša s smjesom uzorak/ekstrakcijsko sredstvo je izvađena iz ultrazvučne kupelji, ostavljenja da se ohladi na sobnoj temperaturi, a potom i u hladnoj vodenoj kupelji.

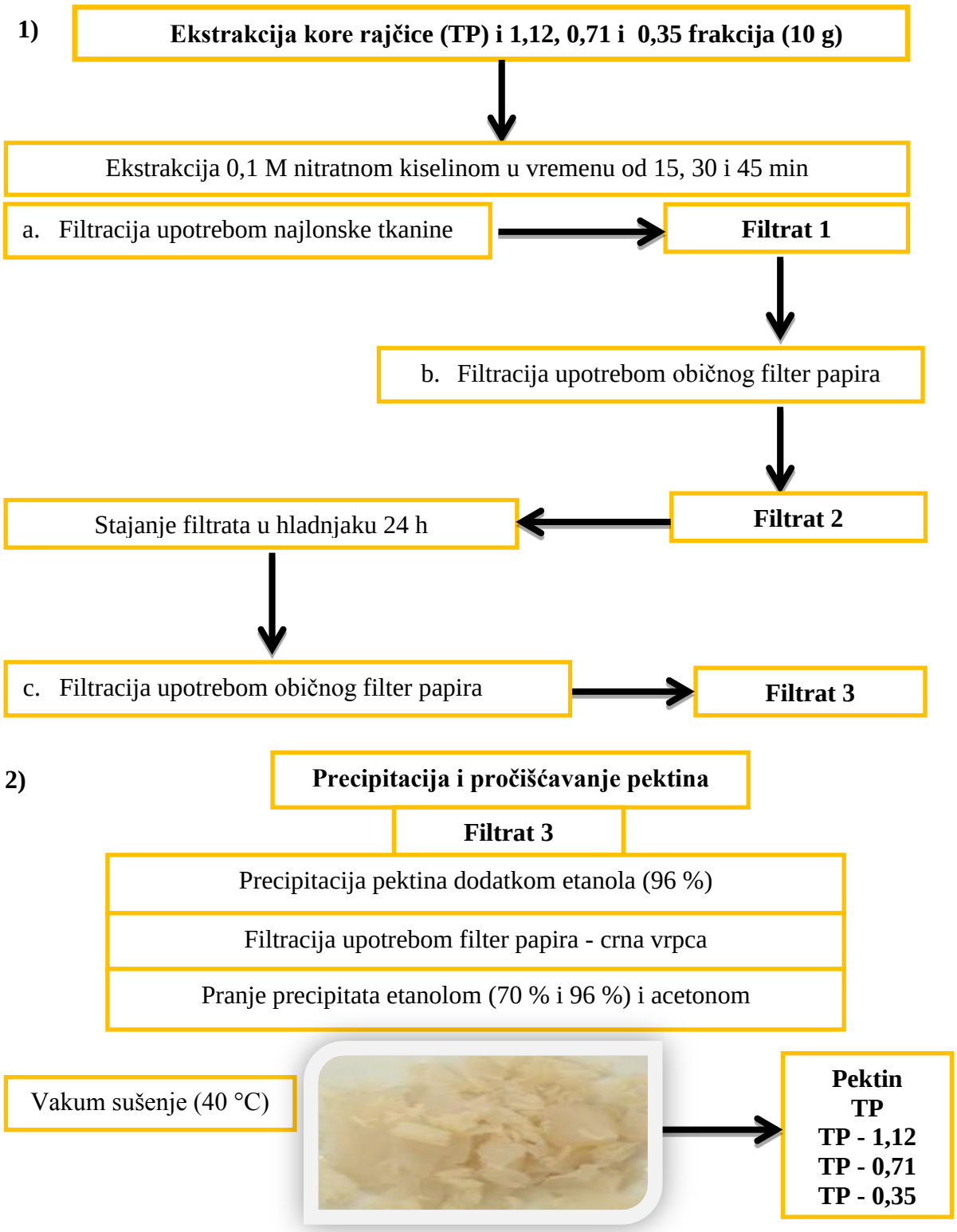
Po završetku hlađenja uzorci su ručno stiješnjeni korištenjem najlonske tkanine, još jednom procijeđeni kako bi se uklonili evantualno zaostali dijelovi kore i potom filtrirani kroz obični filter papir. Tako priređeni uzorci ostavljeni su u hladnjak na +4 °C 24 h, kako bi se postiglo taloženje onih sastojaka koji bi mogi utjecati na čistoću pektinskog ekstrakta. Nakon 24 h stajanja, uzorci su još jednom profiltrirani u Erlemayerovu tikvicu od 1 L i potom podvrgnuti postupku taloženja (precipitacije).

Taloženje pektina provedeno je upotrebom 96 % etanola, pri čemu je volumni omjer ekstrahiranog uzorka i alkohola iznosio 1:3. Erlenmayerova tikvica sa filtratom uzorka i etanolom stavljena je na mješalicu 3 h kako bi došlo do postepene koagulacije pektina. Nakon tog vremena precipitirani pektin sa etanolom stavljen je u hladnjak 24 h, čime je nakon stajanja taloga u matičnoj otopini provedena filtracija upotrebom običnog filter papira, a zatim je koagulirani pektin kvantitativno prenesen na filter papir dodatkom malih volumena 96 % etanola.

Ekstrakt pektina zaostao na filter papiru je ispran s 70 % etanolom, a zatim i s acetonom. Tako vlažan ekstrakt prebačen je u porculanske posudice te osušen u vakuum sušnici na 40 °C.

Osušeni pektin je usitnjen u tarioniku, izvagan, a zatim je izračunat prinos pektina (η) s obzirom na odvagu uzorka kore rajčice, odnosno njenih prosijanih frakcija:

$$\eta\,(\%) = \frac{m\,(\text{pektin})}{m\,(\text{kora rajčice})} \cdot 100 \qquad [1]$$



Slika 7. Shematski prikaz ekstrakcije pektina iz kore rajčice i njenih prosijanih frakcija pomoću ultrazvučne kupelji (1) i pročišćavanja pektinskih izolata (2).

3.8. ODREĐIVANJE PARAMETARA KVALITETE PEKTINA

U uzorcima pektina dobivenim ekstrakcijom kore rajčice (TP) i njenih prosijanih frakcija (TP - 1,12, TP - 0,71 i TP - 0,35) ultrazvučnom kupelji određen je udio vlage, boja, maseni udio ukupne galakturonske kiseline, ukupnih šećera i ukupnih fenola.

Sadržaj vlage određen je gravimetrijskom analitičkom metodom sušenjem uzoraka na temperaturi od 105 °C do konstantne mase.

Određivanje boje uzoraka pektina se zasniva na kolorimetrijskom, kvantitativnom određivanju vrijednosti svjetline (*L*), udjela crvene (*a*) i udjela žute boje (*b*) po CIE *L*, *a*, *b* sistemu.

Sadržaj galakturonske kiseline, ukupnih šećera i ukupnih fenola određen je UV/Vis spektrofotometrom (Perkin Elmer, Lambada 1, Massachusetts, SAD). Nakon dodatka kromogenih reagenasa (karbazol, fenol i Folin-Ciocalteu), galakturonska kiselina, šećeri i polifenoli prevode se u derivate koji apsorbiraju elektromagnetsko zračenje na valnim duljinama od 400 - 800 nm (Vis područje). Funkcijski odnos apsorbancije analita, odnosno derivata i njegove koncentracije daje Lambert-Beerov zakon:

$$A = \varepsilon\, b\, c \qquad [2]$$

gdje je A apsorbancija, ε molarni apsorpcijski koeficijent (L cm^{-1} mol^{-1}), c množinska koncentracija (mol L^{-1}) i b debljina sloja otopine (cm). Iz Lambert-Beerovog zakona je vidljivo da je apsorbancija linearno ovisna o koncentraciji analita što omogućuje jednostavno računanje koncentracije iz izmjerene apsorbancije.

Određivanje galakturonske kiseline temelji se na reakciji galakturonske kiseline s karbazolom u prisutnosti koncentrirane sumporne kiseline, a intenzitet obojenja (ljubičasto) ovisan o koncentraciji galakturonske kiseline, izmjeren je pri valnoj duljini od 525 nm (Ranganna, 1979).

Određivanje ukupnih šećera temelji se na reakciji hidrolize polisaharida, oligosaharida i disaharida koncetriranom sumpornom kiselinom na monosaharide. Produkti hidrolize reagiraju s fenolom pri čemu se razvija žuto-zlatna boja, a njen intenzitet ovisan o koncentraciji ukupnih šećera u ekstraktu, izmjeren je pri valnoj duljini od 492 nm (Dubois i sur., 1956).

Određivanje ukupnih fenola temelji se na reakciji polifenola s Folin-Ciocalteu reagensom kojeg čine smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline (Singleton i Rossi, 1965). Pri oksidaciji fenolnih spojeva u blago alkalnim uvjetima, fosfomolibdenska i fosforvolframova kiselina, reduciraju se u molibdenov oksid i volframov oksid koji su plavo

obojeni, a njihov intenzitet, ovisan o koncentraciji polifenola u ekstraktu, izmjeren je pri valnoj duljini od 760 nm.

3.8.1. Određivanje vlage

Uzorci pektina (TP, TF - 1,12, TF - 0,71 i TF - 0,35) odvagani u suhe aluminijske posudice stavljeni su u sušionik na 105 °C 4 h. Nakon sušenja posudice s uzorkom su ohlađene u eksikatoru 1 h, a zatim su ponovno vagane. Postupak sušenja i vaganja ponavljan je više puta, sve dok nije dobivena konstantna, nepromijenjena masa (m_3). Udio vlage u uzorku izračunat je prema:

$$w\ (\%) = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \cdot 100 \qquad [3]$$

gdje je m_1 - masa prazne aluminijske posudice (g), m_2 - masa aluminijske posudice s uzorkom prije sušenja (g) i m_3 - masa aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja (g).

3.8.2. Određivanje boje

Određivanje boje je provedeno kolorimetrom CM-3500d (Konica Minolta Sensing, Inc. Osaka, Japan) po CIE *L*, *a*, *b* sistemu. Hunter-ove *L*, *a* i *b* vrijednosti podudaraju se sa sljedećim rasponima boja:

- *a** vrijednost: zeleno (-*a**) ili crveno (+*a**)
- *b** vrijednost: plavo (-*b**) ili žuto (+*b**)
- *L** vrijednost: svjetlo -bijelo (*L** = 100) ili tamno-crno (*L** = 0)

Dobivene vrijednosti uzoraka pektina uspoređene su sa vrijednostima izmjerenim za jabučni pektin (referentni uzorak). Ukupna promjena boje (ΔE) izračuna se na temelju izmjerenih vrijednost boje uzorka (*L***a***b*) prema:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \qquad [4]$$

gdje je:

$\Delta L = L_{\text{uzorak}} - L_{\text{standard}}$

-ΔL - uzorak je tamniji od standarda

+ΔL- uzorak je svjetliji od standarda

$\Delta a = a_{\text{uzorak}} - a_{\text{standard}}$

-Δa- uzorak je zeleniji od standarda

+Δa- uzorak je crveniji od standarda

$\Delta b = b_{\text{uzorak}} - b_{\text{standard}}$

-Δb - uzorak je plaviji od standarda

+ Δb- zorak je žući od standarda

3.8.3. Određivanje galakturonske kiseline, ukupnih šećera i ukupnih fenola

Postupak određivanja sadržaja galakturonske kiseline, ukupnih šećera i ukupnih fenola u uzorcima pektina UV/Vis spektrofotometrijom sastojao se iz izrade baždarnog dijagrama, pripreme uzoraka za mjerenje apsorbancija (A) i izračunavanja nepoznatih masenih udjela (w) ukupne galakturonske kiseline(UGA), ukupnih šećera (UŠ) i ukupnih fenola (UF) u uzorcima pektina.

3.8.3.1. Određivanje ukupne galakturonske kiseline

- Izrada baždarnog dijagrama: odvagano je 120,5 mg galakturonske kiseline, kvantitativno prenešeno u odmjernu tikvicu od 1000 mL, nakon čega je dodano 10 ml 0,05 M otopine natrijeva hidroksida, nadopunjeno s destiliranom vodom do oznake i ostavljeno stajati preko noći. Iz pripremljene ishodne otopine galakturonske kiseline priređene su pojedinačne standardne otopine masenih koncentracija 1,6, 3,2, 6,4, 8,0, 9,6 i 13,0 $\mu g\ L^{-1}$ u odmjernim tikvicama od 100 mL, nadopunjavanjem s destiliranom vodom. Točno 2 mL pojedine otopine standarda otpipetirano je u staklene epruvete, a potom je dodano 1 ml 0,1 % (w/v) karbazola i 12 ml koncentrirane sumporne kiseline uz konstantno miješanje. Nakon dodatka kiseline, otopina je ostavljena 15 min na sobnoj temperaturi, kako bi došlo do razvitka ružičastog obojenja, a potom je nastalom kompleksu izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 525 nm. Slijepa proba je pripremljena tako da je umjesto 2 mL standarda i 1 karbazola, upotrijebljeno 2 mL destilirane vode, odnosno 1 mL 96 % etanola. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija i pripadajućih masenih koncentracija pojedinačnih standardnih otopina galakturonske kiseline nacrtan je baždarni dijagram.

- Priprema uzoraka za mjerenje apsorbancija: odvagano je 100 mg uzorka i otopljeno u 100 mL 0,05 M otopine natrijeva hidroksida. Otopina je ostavljena 30 minuta na sobnoj temperaturi kako bi došlo do deesterifikacije pektina. Točno 2 ml deesterificirane otopine razrijeđeno je s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL. Potom je otpipetirano 2 ml razrijeđene otopine, dodano 1 mL karbazola i 12 mL koncentrirane sumporne kiseline uz konstanto miješanje. Nakon 15 min priređenim uzorcima izmjerena je apsorbancija na valnoj duljini od 525 nm.
- Nepoznate masene koncentracije (μg L^{-1}) galakturonske kiseline u otopinama pektina određene su iz regresijskog pravca (baždarni dijagram), a potom su dobivene vrijednosti pretvorene u g galakturonske kiseline na 100 g uzorka, uzevši u obzir odvagu, volumen otopine pektina i razrijeđenje.

3.8.3.2. Određivanje ukupnih šećera

- Izrada baždarnog dijagrama: odvagano je 100 mg glukoze i otopljeno u destiliranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 50 mL. Iz pripremljene ishodne otopine glukoze su priređene individualne standardne otopine masenih koncentracija 5, 10, 20, 40, 60 i 80 mg L^{-1} u odmjernim tikvicama od 100 mL, nadopunjavanjem s destiliranom vodom. Nakon toga je iz svake tikvice otpipetirano po 1 mL otopine standarda u staklene epruvete, a zatim je dodano 1 mL 5 % (*v*/*v*) fenola i 5 mL koncentrirane sumporne kiseline. Nakon miješanja, zagrijavanja (5 minuta na vodenoj kupelji uz ključanje) i hlađenja u posudi s ledom, smjesa je ostavljena na tamnom mjestu 30 minutra, kako bi došlo do stvaranja žuto-zlatno obojenog kompleksa. Potom je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 492 nm. Slijepa proba je pripremljena tako da je umjesto 2 mL standarda upotrijebljena destilirana voda. Iz izmjerenih apsorbancija i pripadajućih vrijednosti masenih koncentracija je konstruiran baždarni dijagram.
- Priprema uzoraka za mjerenje apsorbancija: Odvagano je 20 mg uzorka i otopljeno u 25 mL destilirane vode, u odmjernoj tikvici. Iz te otopine je otpipetirano 2 mL alikvota i razrijeđeno s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 25 mL. Potom je u staklenu epruvetu otpipetirano 1 mL razrijeđenog uzorka, 1 mL 5 % (*v*/*v*) fenola i 5 mL koncentrirane sumporne kiseline. Daljnji postupak je identičan onom opisanom za izradu baždarnog dijagrama.
- Nepoznate vrijednosti masenih koncentracija (mg L^{-1}) ukupnih šećera u otopinama pektina određene su iz regresijskog pravca (baždarni dijagram), a potom su dobivene vrijednosti pretvorene u g ukupnih šećera na 100 g uzorka, uzevši u obzir odvagu, volumen otopine pektina i razrijeđenje.

3.8.3.3. Određivanje ukupnih fenola

- Izrada baždarnog dijagrama: odvagano je 0,25 g galne kiseline te kvantitativno prenešeno u odmjernu tikvicu od 100 mL dodatkom 10 mL 99,9 %-tnog metanola, koja je potom nadopujena destiliranom vodom do oznake. Iz pripremljene ishodne otopine galne kiseline su priređene individualne standardne otopine masenih koncentracija 10, 30, 50, 80 i 120 mg/L u odmjernim tikvicama od 100 mL, nadopunjavanjem s destiliranom vodom. Za određivanje njihovih apsorbancija je otpipetirano po 1 mL otopine standarda u odmjernu tikvicu od 25 mL, dodano 1,3 mL 0,2 M otopine FC reagensa, 10 mL destilirane vode i nakon 5 min 3,75 mL 20 % (*w*/*v*) otopine natrijeva karbonata, a potom je tikvica nadopunjena s destiliranom vodom do oznake. Ovako pripremljeni uzorci su ostavljeni na tamnom mjestu 2 sata, na sobnoj temperaturi, a nakon toga im je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 760 nm. Slijepa proba je pripremljena na isti način, ali umjesto 1 mL standarda upotrijebljena je destilirana voda.
- Priprema uzoraka za mjerenje apsorbancija: otopljeno je 20 mg uzorka u odmjernoj tikvici od 25 mL dodatkom destilirane vode. Od toga je otpipetirano 2 mL alikvota i razrijeđeno s destiliranom vodom na volumen od 25 mL. Daljnji postupak je identičan onom opisanom za mjerenje apsorbancije standarda.
- Nepoznate masene koncentracije (mg L^{-1}) ukupnih fenola u otopinama pektina određene su iz regresijskog pravca (baždarni dijagram), a potom su dobivene vrijednosti pretvorene u g ukupnih fenola na 100 g uzorka, uzevši u obzir odvagu, volumen otopine pektina i razrijeđenje.

3.9. STATISTIČKA ANALIZA

Statistička analiza je napravljena pomoću programskog paketa *Statistika 12* (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Korištena je multivarijantna analiza varijance (engl. multivariate analysis of variance, MANOVA), a rezultati su prikazani 3D dijagramima (linearni model). Statistička značajnost utjecaja pojedinih varijabli (vrijeme ekstrakcije i vrsta frakcije) na sadržaj galakturonske kiseline, ukupnih šećera i ukupnih fenola prikazana je *p* vrijednostima sa značajnošću ($p < 0,05$).

4. REZULTATI I RASPRAVA

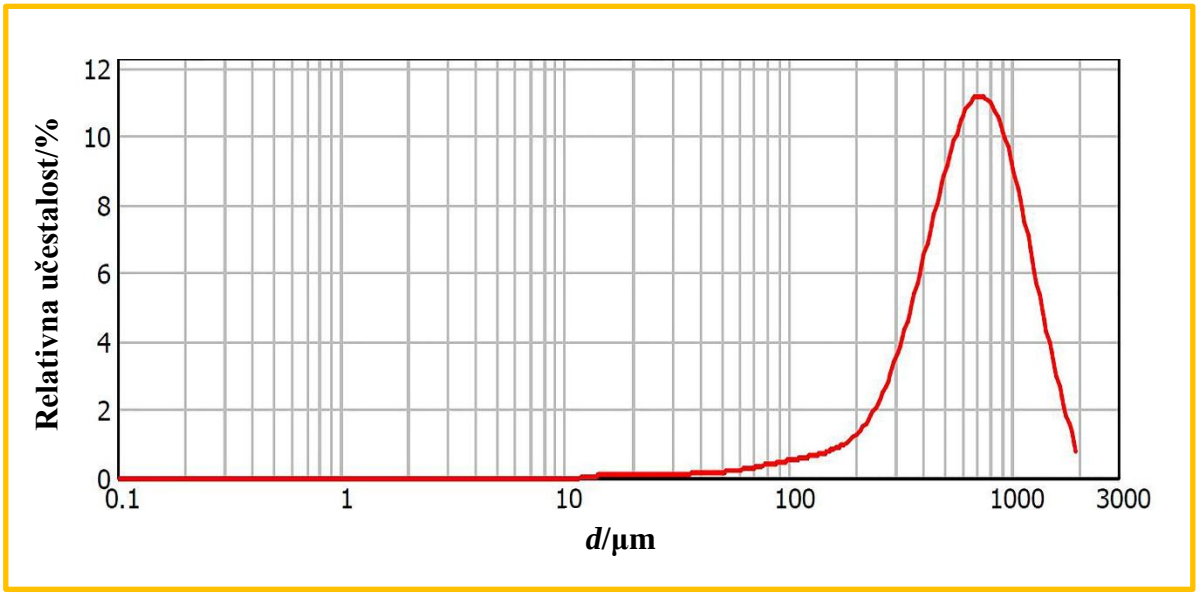
Istraživanje Ninčević Grassino i suradnika (2016a) je pokazalo da se ekstrakcija pektina iz kore rajčice primjenom konvencionalne metode odvija tijekom 24 h (prvi stupanj ekstrakcije), odnosno 12 h (drugi stupanj ekstrakcije). U cilju skraćivanja vremena ekstrakcije, ali i istovremenog dobivanja kvalitetnog pektinskog izolata, upotrijebljena je ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, kao jedna od mnogobrojnih nekonvencionalnih ekstrakcijskih tehnika.

Dakle, ekstrakcija pektina iz kore rajčice (TP) i njenih frakcija (TP - 1,12, TP - 0,71 i TP - 0,35) dobivenih prosijavanjem, provedena je upotrebom nitratne kiseline (c = 0,1 M) kao ekstrakcijskog sredstva, pri temperaturi od 80 °C i vremenu od 15, 30 i 45 minuta, pomoću ultrazvučne kupelji. Učinkovitost vremena ekstrakcije kao i postupka prosijavanja, odnosno neprosijavanja kore rajčice na kvalitetu i čistoću pektinskih izolata iz TP i TP - 1,12, TP - 0,71 i TP - 0,35 uzoraka proučavan je određivanjem boje te sadržaja ukupne galakturonske kiseline, ukupnih šećera i ukupnih fenola.

Budući da postoji vrlo mali broj dostupnih literaturnih podataka s tematikom izolacije pektina iz kore rajčice, a naročito onih koje se odnose na ekstrakciju pektina uporabom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, usporedba literaturnih podataka s rezultatima dobivenim u ovom radu bila je samo djelomično moguća.

4.1. ODREĐIVANJE RASPODJELE VELIČINE ČESTICA KORE RAJČICE

Određivanje raspodjele veličine čestica usitnjene kore rajčice (TP) provedeno je metodom laserske difrakcije (poglavlje 3.5.) na temelju koje je izvršen odabir sita za prosijavanje uzorka. Dobivena frekvencijska krivulja (Slika 8) pokazuje sljedeću raspodjelu veličine čestica s pripadajućim vrijednostima: d (0,1) = 280,31 μm, d (0,5) = 662,37 μm i d (0,9) = 1245,45 μm.



Slika 8. Dijagram ovisnosti relativne učestalosti o promjeru čestica kore rajčice.

4.2. PROSIJAVANJE KORE RAJČICE

Nakon određivanja veličine čestica laserskom difrakcijom provedeno je prosijavanje usitnjene kore rajčice, odabirom sita promjera otvora 1,12; 0,9; 0,71; 0,5 i 0,35 µm. Uslijed konstantnog protresanja sita u vremenu od 10 min dolazi do prolaska čestica kore rajčice i njihova zadržavanja na sita, ovisno o veličini (promjeru, *d*) pora. Količina kore rajčice zaostala na sitima promjera otvora 1,12; 0,9; 0,71; 0,5 i 0,35 µm prikazuje Slika 9, a Tablica 1 vrijednosti prinosa kore rajčice prije i nakon postupka prosijavanja. Frakcije promjera 1,12; 0,71 i 0,35 µm su korištene u daljnjem radu, a njihov odabir temeljen je na dobivenim vrijednostima prinosa od 12,47 %, 17,24 % i 18,81 %.



Slika 9. Prikaz frakcija dobivenih nakon prosijavanja kore rajčice (TP) kroz sita različitih veličina otvora (promjera, *d* = μm).

Tablica 1. Prinos kore rajčice (TP) ostvaren nakon postupka prosijavanja na sitima promjera 1,12; 0,9; 0,71; 0,5 i 0,35 [μm]

***d* (sita)/μm**	***m* (sita)/g**	***m* (sita s uzorkom)/g**	**η (TP)/%**
1,12	298,54	311,01	12,47
0,90	296,48	306,73	10,25
0,71	440,44	457,68	17,24
0,50	418,68	437,32	18,64
0,35	406,64	425,45	18,81
0,00	421,60	444,17	22,57

4.3. EFIKASNOST EKSTRAKCIJE

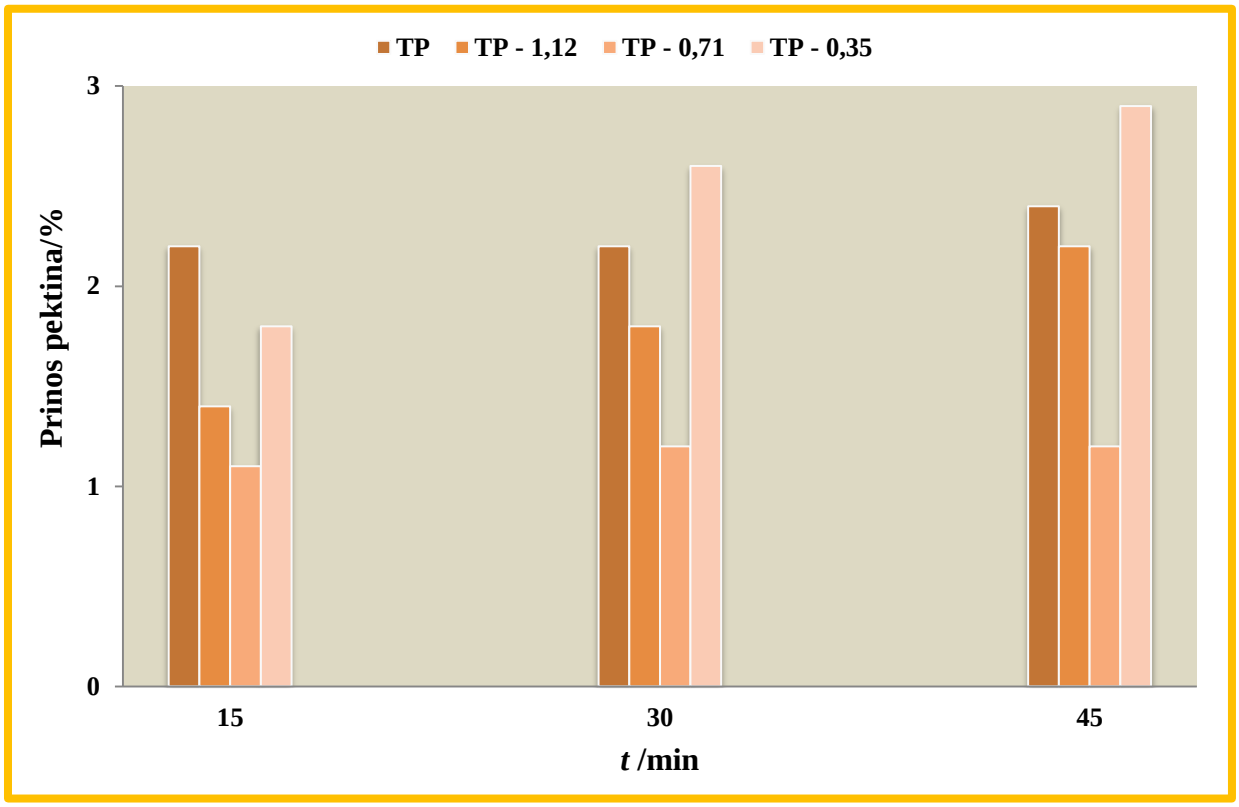
Nakon provedene ekstrakcije i sušenja pektina (Slika 7), određena je efikasnost ekstrakcije, odnosno prinos pektina (η) s obzirom na odvaganu koru rajčice (10 g). Dobivene vrijednosti kreću se u rasponu od 1,1 do 2,9 % (Tablica 2). U usporedbi s komercijalnim pektinima izoliranim iz jabuke i citrusa konvencionalnim metodama, prinos pektina iz ekstrahirane kore rajčice je vrlo nizak. Ziari i suradnici (2010) su pokazali da se prinos pektina ekstrahiranog iz jabuke kreće u rasponu od 10,1 do 15,2 %, ovisno o vremenu ekstrakcije, temperaturi i pH - vrijednosti. Khule i suradnici (2012) za pektin ekstrahiran iz citrusa dobivaju vrijednosti između 5,29 i 18,21 %, ovisno o pH vrijednosti i omjeru pektinskog ekstrakta i etanola. Ninčević Grassino i suradnici (2016b) dobivaju vrijednosti od 16,3 do 18,5 % za pektin ekstrahiran iz kore rajčice, primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pri temperaturi od 80 °C, uz oksalnu kiselinu/natrijev oksalat kao ekstrakcijsko sredstvo.

Promatrajući utjecaj vremena ekstrakcije (Slika 10) na prinos pektina jasno se vidi kako udio pektina u TP i TP - 0,71 uzorcima ostaje gotovo nepromijenjen. Dobivene vrijednosti kreću se od 2,2 - 2,4 % (TP) i 1,1 - 1,2 % (TP - 0,71). Međutim, kod TP - 1,12 i TP - 0,35 uzoraka možemo uočiti porast udjela pektina s povećanjem vremena ekstrakcije. TP - 0,35 prosijani uzorak daje najveći prinos pektina (2,6 i 2,8 % u vremenu od 30 i 45 min) u usporedbi s ostalim prosijanim frakcijama kao i neprosijanom korom rajčice. Kod TP - 0,71 frakcije dobiva se najmanji prinos pektina.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom dovodi do smanjenog prinos pektina u usporedbi s konvencionalnim metodama. Međutim,

razlozi ovako niskog iskorištenja mogu se povezati i s učestalim fazama provedenog filtriranja zbog kojih zasigurno dolazi do gubitka jedne određene količine pektina, kao i vrste upotrijebljenog ekstrakcijskog sredstva.

Na kraju može se zaključiti da iako postoji razlika u prinosu pektina s obzirom na vrijeme trajanja ekstrakcije, kod nekih uzoraka kore rajčice (TP i TP - 0,71) ona nije značajna te se može provoditi u trajanju od 15 minuta, što znatno smanjuje vrijeme ekstrakcije u usporedbi s konvencionalnim metodama.



Slika 10. Prinos pektina dobiven nakon ekstrakcije kore rajčice (TP) i njenih prosijanih frakcija (TP - 1,12, TP - 0,71 i TP - 0,35) pomoću ultrazvučne kupelji.

4.4. ODREĐIVANJE SADRŽAJA VLAGE

U Tablici 2 prikazani su rezultati određivanja sadržaja vlage u TP, TP - 1,12, TP - 0,71 i TP - 0,35 uzorcima pektina, dobivenim nakon ekstrakcije kore rajčice i njenih prosijanih frakcija pomoću ultrazvučne kupelji.

Tablica 2. Udio vlage u TP, TP - 1,12, TP - 0,71 i TP - 0,35 uzorcima pektina dobivenim nakon ekstrakcije kore rajčice i njenih prosijanih frakcija pomoću ultrazvučne kupelji.

Pektin	*t* (ekstrakcije)/min	*w* (vlaga)/%
TP	15	9,78
	30	10,86
	45	11,12
TP - 1,12	15	12,64
	30	13,56
	45	13,72
TP - 0,71	15	12,67
	30	14,26
	45	16,08
TP - 0,35	15	6,37
	30	6,54
	45	15,88

Dobivene vrijednosti kreću se u rasponu od 6,37 do 16,08 %. U usporedbi sa sadržajem vlage određenim u pektinima izoliranih iz drugih sirovina, ove dobivene vrijednosti su neznatno veće. Tako Kurita i suradnici (2008) dobivaju vrijednosti u rasponu od 8 do 9 % za pektin izoliran iz citrusa, a Iglesias i Lozano (2004) u rasponu od 7 do 11 % za pektin izoliran iz suncokreta.

Promatrajući utjecaj vremena ekstrakcije na sadržaj vlage u uzorcima pektina, može se zaključiti kako je pri kraćem vremenu ekstrakcije (15 min) dobiven i niži udio vlage. Također, jasno se vidi da pektini izolirani iz kore rajčice (TP) i njene TP - 0,35 frakcije sadržavaju najmanje vlage, pa je za očekivati da će takvi pektinski pripravci biti stabilniji tijekom dužeg skladištenja.

4.5. ODREĐIVANJE BOJE

Kontrola parametara boje pektina dobiva na sve većem značenju zbog primjene pektina pri proizvodnji gelova. Poznato je da različiti uvjeti ekstrakcije utječu na boju pektina, pa tako jako obojeni pektini mogu sadržavati polifenole ili različite pigmente, koprecipitirane u postupka taloženja pektina (Baississe i sur., 2010).

U Tablici 3 prikazani su rezultati određivanja parametara boje u uzorcima pektina (TP, TP - 1,12, TP - 0,71 i TP - 0,35) dobivenim ekstrakcijom pomoću ultrazvučne kupelji iz kore rajčice i njenih prosijanih frakcija. U usporedbi s rezultatima dobivenim za referentni, jabučni pektin, uzorci pektina ekstrahirani iz kore rajčice i njenih frakcija su tamniji, neznatno crveniji, te žući u odnosu na referentni uzorak (L = 69,55, a = 6,52 i b = 19,13). Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom potiče koekstrakciju polifenola, likopena (Anese i sur., 2013), kao i drugih spojeva prisutnih u kompleksnoj strukturi kore rajčice (Caffall i Mohnen, 2009). Dakle, u većoj ili manjoj mjeri izražena ko-ekstrakcija ovih spojeva, kao i njihovo nepotpuno uklanjanje postupkom ispiranja (Slika 7) može dovesti do izolacije tamnijih (63,9 za TP - 0,35 pri 45 min), ali i svijetlih (49,5 za TP - 0,71 pri 30 min) uzoraka pektina.

Tablica 3. Parametri boje određeni u TP, TP - 1,12, TP - 0,71 i TP - 0,35 uzorcima pektina dobivenim nakon ekstrakcije kore rajčice i njenih prosijanih frakcija pomoću ultrazvučne kupelji.

Pektin	***t* (ekstrakcije)/min**	**Parametri boje***						
		L	***a***	***b***	**Δ*L***	**Δ*a***	**Δ*b***	**Δ*E***
TP	**15**	53,1 ± 0,9	6,9 ± 0,9	25,3 ± 0,1	-16,4 ± 0,9	0,3 ± 0,1	16,2 ± 0,1	-16,5 ± 0,9
	30	58,6 ± 0,4	7,6 ± 0,4	26,4 ± 0,6	-10,9 ± 0,4	1,1 ± 0,4	17,2 ± 0,6	-10,9 ± 0,4
	45	55,3 ± 0,3	7,3 ± 0,7	25,9 ± 0,7	-14,3 ± 0,3	0,9 ± 0,1	16,6 ± 0,7	-14,3 ± 0,3
TP - 1,12	**15**	58,3 ± 0,5	7,1 ± 0,2	25,0 ± 0,8	-11,2 ± 0,5	0,6 ± 0,3	15,9 ± 0,8	-11,2 ± 0,5
	30	50,6 ± 0,3	8,2 ± 0,6	26,3 ± 0,0	-19,0 ± 0,3	1,7 ± 0,6	17,2 ± 0,0	-19,0 ± 0,3
	45	58,1 ± 0,1	7,6 ± 0,5	24,0 ± 0,8	-15,4 ± 0,1	1,5 ± 0,5	15,8 ± 0,8	-15,4 ± 0,1
TP - 0,71	**15**	56,1 ± 0,4	7,3 ± 0,5	24,8 ± 0,1	-13,5 ± 0,4	0,8 ± 0,1	15,6 ± 0,0	-13,5 ± 0,4
	30	63,9 ± 0,4	5,6 ± 0,8	22,6 ± 0,4	-15,7 ± 0,4	0,9 ± 0,2	13,5 ± 0,4	-5,7 ± 0,4
	45	56,4 ± 0,2	6,7 ± 0,4	22,8 ± 0,3	-13,2 ± 0,2	1,4 ± 0,5	13,6 ± 0,0	-13,2 ± 0,2
TP - 0,35	**15**	55,8 ± 0,9	8,0 ± 0,5	27,0 ± 0,9	-18,4 ± 0,1	1,5 ± 0,5	17,9 ± 0,9	-13,8 ± 0,9
	30	51,2 ± 0,5	8,0 ± 0,4	27,5 ± 0,4	-13,8 ± 0,5	1,5 ± 0,4	18,3 ± 0,1	-18,4 ± 0,5
	45	49,5 ± 0,2	9,0 ± 0,1	29,0 ± 0,9	-20,0 ± 0,2	2,5 ± 0,1	19,6 ± 0,9	-20,0 ± 0,2
JABUČNI PEKTIN	/	69,55	6,52	19,13	/	/	/	/

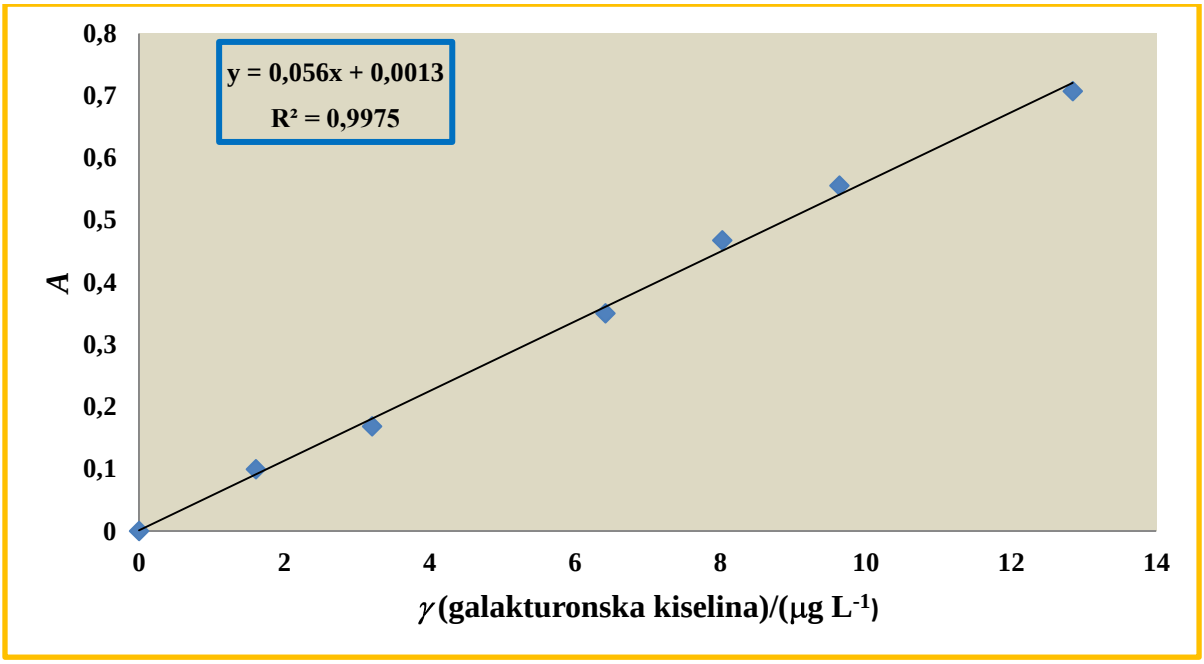
* *N* = 2, ± SD

4.6. ODREĐIVANJE UKUPNE GALAKTURONSKE KISELINE

U cilju određivanja masenog udjela ukupne galakturonske kiseline u uzorcima pektina ekstrahiranih iz kore rajčice i njenih prosijanih frakcija bilo je potrebno izraditi baždarni dijagram galakturonske kiseline. Tablica 4 prikazuje masene koncentracije galakturonske kiseline s pripadajućim vrijednostima apsorbancija na temelju kojih je konstruiran baždarni dijagram (Slika 11).

Tablica 4. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina galakturonske kiseline i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 525 nm.

Standardna otopina broj	γ (galakturonska kiselina)/(μg L^{-1})	*A*
0	0	0
1	1,6	0,099
2	3,2	0,195
3	6,4	0,335
4	8,0	0,447
5	9,6	0,500
6	13,0	0,730



Slika 11. Baždarni dijagram galakturonske kiseline.

Nepoznate vrijednosti masenih koncentracija ukupne galakturonske kiseline u uzorcima pektina (TP, TP - 1,12, TP - 0,71 i TP - 0,35) određene su iz regresijskog pravca (Slika 11), a potom su dobivene vrijednosti pretvorene u g galakturonske kiseline na 100 g uzorka (Tablica 5). Maseni udjeli galakturonske kiseline kreću se u rasponu od 13,53 do 31,80 %, ovisno o uzorku pektina i vremenu ekstrakcije (15, 30 i 45 min).

Dobiveni rezultati (Tablica 6, Slika 12) su pokazali da povećanje vremena ekstrakcije značajno utječe ($p < 0,05$) na sadržaj galakturonske kiseline u uzorcima pektina ekstrahiranih iz kore rajčice i njenih prosijanih frakcija. Najveće vrijednosti (25,19, 27,74 i 31,80 %) nađene su kod uzoraka pektina ekstrahiranih iz TP - 0,35, TP - 1,12 i TP - 0,71 frakcija, pri vremenu od 45 min. Dobiveni maseni udjeli ukupne galakturonske kiseline su u skladu s istraživanjem Ninčević Grassino i suradnici (2016b), koji dobivaju vrijednosti od 25,92 do 32,99 % kod pektina ekstrahiranog iz neprosijane kore rajčice uz oksalnu kiselinu i amonijev oksalat kao ekstrakcijsko sredstvo.

Međutim, rezultati ovog istraživanja su pokazali da postupak prosijavanja, odnosno frakcije dobivena tim prostupkom ne utječu na izolaciju pektina, a time i na prinos galakturonske kiseline. Najveći udio od 31,80 % dobiven je kod uzorka pektina ekstrahiranog iz TP - 0,71 frakcije, pri vremenu od 45 min.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je vrijeme ekstrakcije od 15 min sasvim dovoljno za izolaciju pektina iz neprosijane kore s sadržajem galakturonske kiseline od 23 %, što je u skladu s istraživanjem Ninčević Grassino i suradnici (2016b).

Tablica 5. Maseni udio galakturonske kiseline u TP, TP - 1,12, TP - 0,71 i TP - 0,35 uzorcima pektina dobivenim nakon ekstrakcije kore rajčice i njenih prosijanih frakcija pomoću ultrazvučne kupelji.

Pektin	*t* (ekstrakcije)/min	*A* ± SD	*w* (galakturonska kiselina)/% ± SD*
TP	15	0,138 ± 0,002	22,93 ± 0,58
	30	0,141 ± 0,002	23,82 ± 1,29
	45	0,125 ± 0,009	21,35 ± 0,35
TP - 1,12	15	0,087 ± 0,003	13,53 ± 0,40
	30	0,158 ± 0,001	25,55 ± 0,23
	45	0,172 ± 0,002	27,74 ± 0,35
TP - 0,71	15	0,108 ± 0,002	17,26 ± 0,35
	30	0,116 ± 0,001	18,51 ± 0,11
	45	0,196 ± 0,002	31,80 ± 0,35
TP - 0,35	15	0,107 ± 0,003	17,09 ± 0,40
	30	0,137 ± 0,000	22,12 ± 0,06
	45	0,156 ± 0,003	25,19 ± 0,47

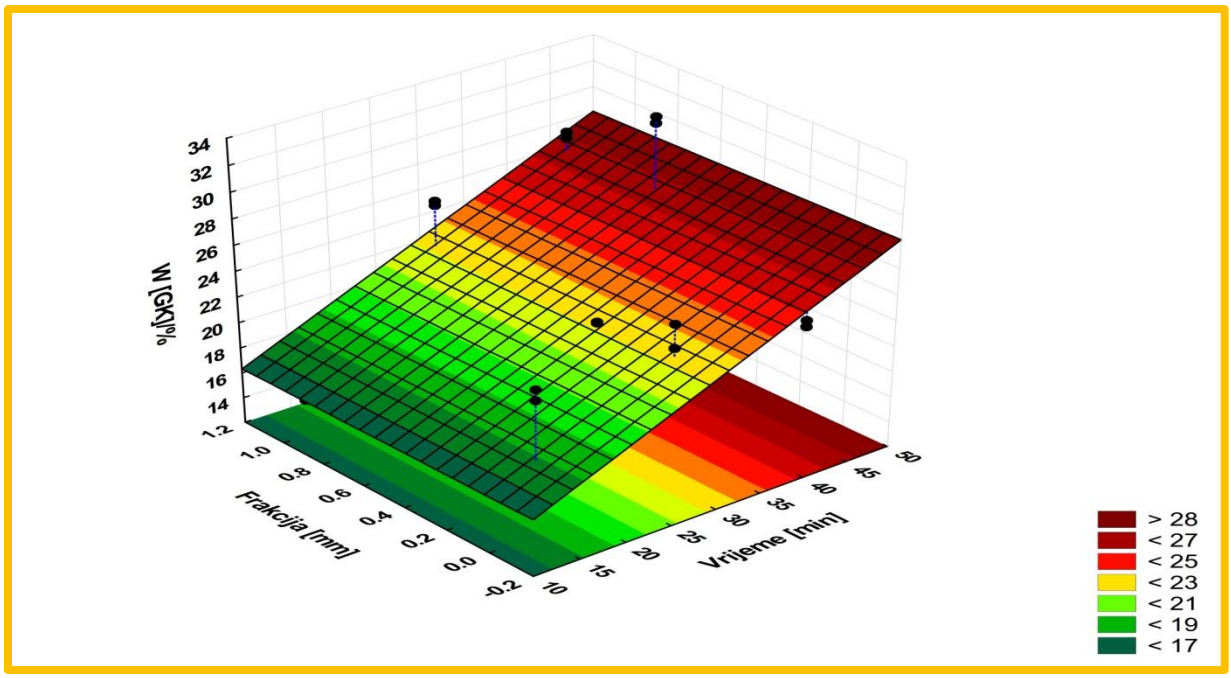
***vrijednosti ukupne galakturonske kiseline odnose se na ekvivalent galakturonske kiseline

Tablica 6. Statistička značajnost frakcije (prosijana/neprosijana) kore rajčice i vremena ekstrakcije na maseni udio galakturonske kiseline u uzorcima pektina

	***p* - vrijednost**	
	Kora rajčice*	***t* (ekstrakcije)/min**
***w* (galakturonska kiselina)/%**	0,944703	0,000804

$p < 0,05$ = statistički značajno

***prosijana (TP - 1,12, TP - 0,71 i TP - 0,35) i neprosijana (TP) i kora rajčice



Slika 12. Utjecaj frakcije (prosijana/neprosijana kore rajčice) i vremena ekstrakcije na maseni udio galakturonske kiseline u uzorcima pektina.

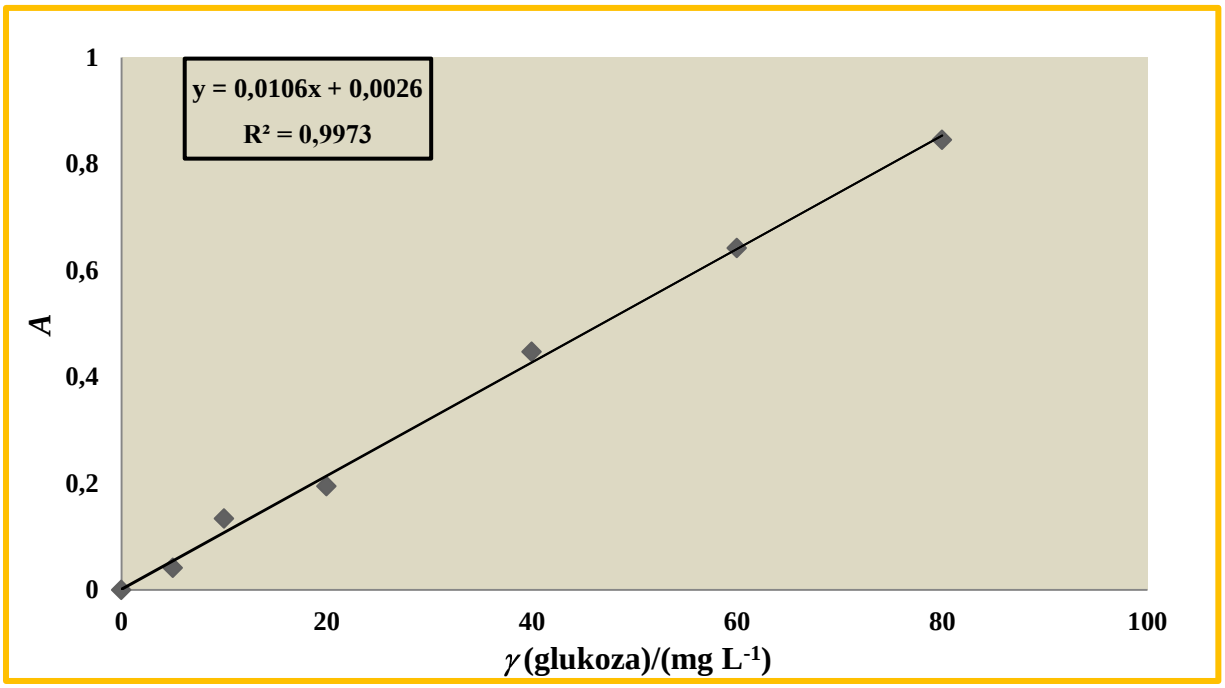
TP - 1,12, TP - 0,71 i TP - 0,35 = prosijana i TP = neprosijana kora rajčice

4.7. ODREĐIVANJE UKUPNIH ŠEĆERA

Nepoznate masene koncentracije ukupnih šećera određene su iz regresijskog pravca, nakon izrade baždarnog dijagrama (Tablica 7, Slika 13), a potom su dobivene vrijednosti pretvorene i izražene kao g ukupnih šećera na 100 g uzorka (Tablica 8).

Tablica 7. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina glukoze i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 492 nm.

Standardna otopina broj	γ(glukoza)/(mg L^{-1})	*A*
0	0	0
1	5	0,041
2	10	0,134
3	20	0,195
4	40	0,447
5	60	0,642
6	80	0,846



Slika 13. Baždarni dijagram glukoze.

Tablica 8. Maseni udio ukupnih šećera u TP, TP - 1,12, TP - 0,71 i TP - 0,35 uzorcima pektina dobivenim nakon ekstrakcije kore rajčice i njenih prosijanih frakcija pomoću ultrazvučne kupelji.

Pektin	*t* (ekstrakcije)/min	*A* ± SD	*w* (ukupni šećeri)/% ± SD*
TP	15	0,137 ± 0,001	13,73 ± 0,14
	30	0,141 ± 0,002	14,23 ± 0,21
	45	0,158 ± 0,004	15,99 ± 0,36
TP - 1,12	15	0,207 ± 0,007	20,99 ± 0,73
	30	0,193 ± 0,021	20,98 ± 0,00
	45	0,180 ± 0,001	18,19 ± 0,00
TP - 0,71	15	0,185 ± 0,009	18,54 ± 0,87
	30	0,168 ± 0,016	17,15 ± 1,61
	45	0,103 ± 0,019	11,76 ± 0,00
TP - 0,35	15	0,149 ± 0,003	15,14 ± 0,24
	30	0,162 ± 0,002	16,32 ± 0,22
	45	0,152 ± 0,007	15,00 ± 0,00

***vrijednosti ukupnih šećera odnose se na ekvivalent glukoze

Dobivene vrijednosti masenih udjela ukupnih šećera u uzorcima pektina kreću se u rasponu od 11,76 do 20,99 % ovisno o uzorku, kao i vremenu ekstrakcije. Najniže vrijednosti (13,73 - 15,99 %) dobivene su kod TP (neprosijana kore rajčice) uzoraka ekstrahiranih u vremenu od 15 do 45 min. TP - 1,12 frakcija daje najveće, dok TP - 0,71 i TP - 0,35 najniže vrijednosti, što je u suprotnosti s njihovim, većim izmjerenim vrijednostima galakturonske kiseline. Dakle, može se zaključiti da postoji izvjesna negativna korelacija između udjela galakturonske kiseline i ukupnih šećera u uzorcima pektina, tj. veći sadržaj galakturonske kiseline povezan je s nižim sadržajem ukupnih šećera.

Promatrajući utjecaj vremena ekstrakcije (Slika 14) na sadržaj ukupnih šećera u uzorcima pektina, može se zaključiti kako vrijeme ekstrakcije ne utječe značajno ($p < 0,05$, Tablica 9) na njihov prinos. Nadalje, ako promatramo utjecaj frakcije (Slika 14), može se zaključiti da svakoj dobivenoj frakciji (neprosijana/prosijana kora rajčice) pripadaju i različite vrijednosti masenih udjela, što znači da ovaj parametar značajno utječe ($p < 0,05$, Tablica 9) na prinos ukupnih šećera u uzorcima pektina.

Za razliku od prethodnog istraživanja Ninčević Grassino i suradnika (2016b), gdje su dobivene niže vrijednosti ukupnih šećera (od 2,70 do 3,80 %), u ovom radu maseni udjeli veći

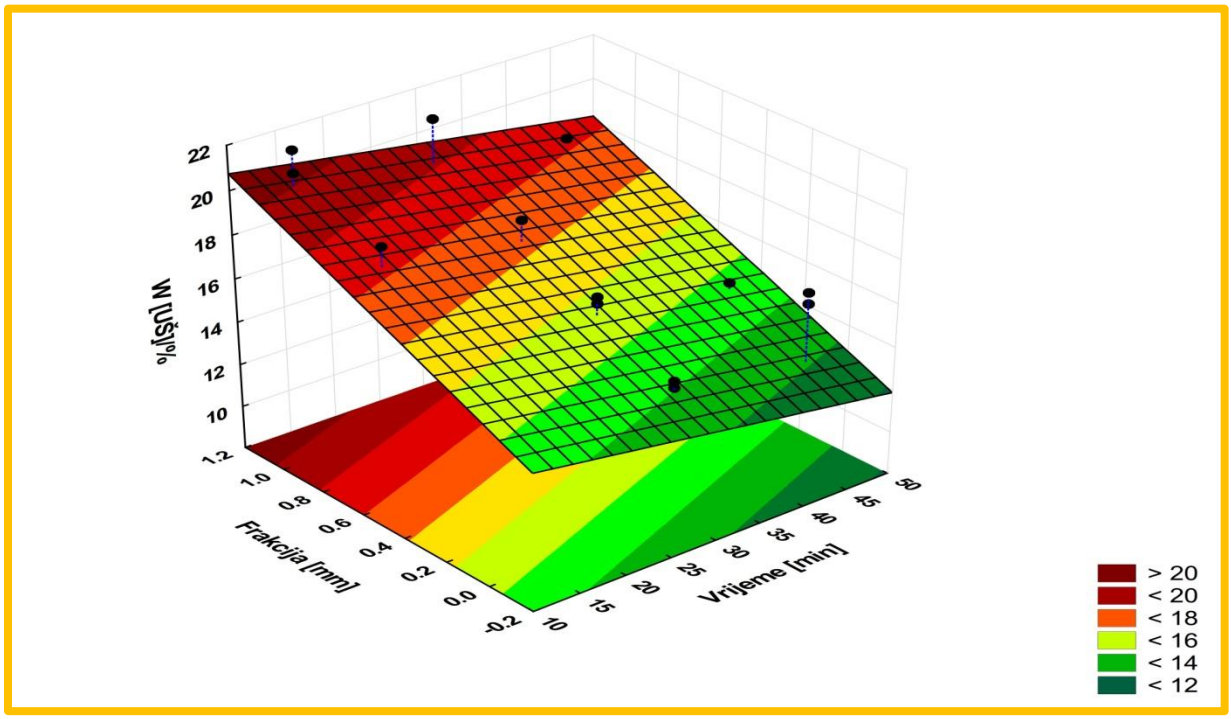
od oko 5 % dovode do zaključka kako kutikula rajčice sadržava značajne količine ukupnih šećera, koje nije bilo dovoljno ukloniti niti učestalim ispiranjem pektinskog izolata s etanolom, odnosno acetonom.

Tablica 9. Statistička značajnost frakcije (prosijana/neprosijana) kore rajčice i vremena ekstrakcije na maseni udio ukupnih šećera u uzorcima pektina.

	***p* - vrijednost**	
	Kora rajčice*	***t* (ekstrakcije)/min**
***w* (ukupni šećeri)/%**	0,000181	0,064974

$p < 0,05$ = statistički značajno

***prosijana (TP - 1,12, TP - 0,71 i TP - 0,35) i neprosijana (TP) kora rajčice



Slika 14. Utjecaj frakcije (prosijana/neprosijana kore rajčice) i vremena ekstrakcije na maseni udio ukupnih šećera u uzorcima pektina.

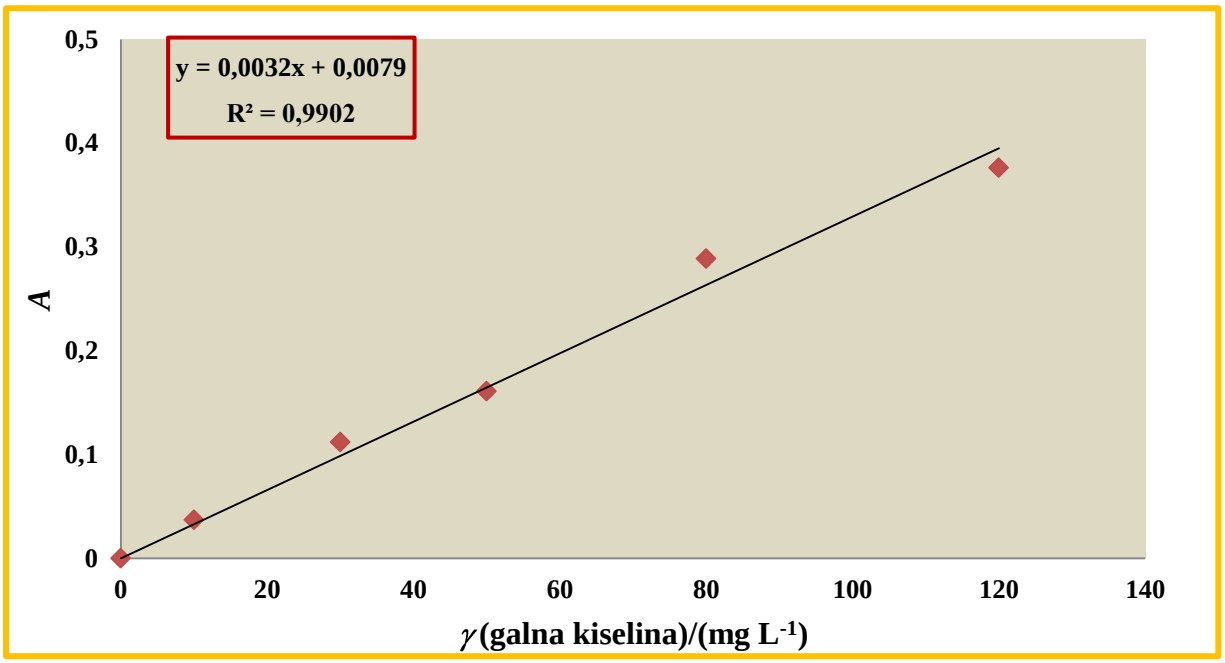
TP - 1,12, TP - 0,71 i TP - 0,35 = prosijana i TP = neprosijana kora rajčice

4.8. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA

S obzirom na činjenicu da se tijekom postupka ekstrakcije pektina iz kore rajčice mogu ko-ekstrahirati i polifenoli (Peschel i sur., 2006), u ovom radu određen je i njihov sadržaj primjenom UV/Vis spektrofotometrije. Nepoznate masene koncentracije ukupnih fenola određene su iz regresijskog pravca, nakon izrade baždarnog dijagrama (Tablica 10, Slika 15), a potom su dobivene vrijednosti pretvorene i izražene kao g ukupnih fenola na 100 g uzorka (Tablica 11).

Tablica 10. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina galne kiseline i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 760 nm.

Standardna otopina broj	γ(galna kiselina)/(mg L^{-1})	*A*
0	0	0
1	10	0,037 ± 0,000
2	30	0,112 ± 0,001
3	50	0,161 ± 0,000
4	80	0,289 ± 0,001
5	120	0,376 ± 0,000



Slika 15. Baždarni dijagram galne kiseline.

Tablica 11. Maseni udio ukupnih fenola u TP, TP - 1,12, TP - 0,71 i TP - 0,35 uzorcima pektina dobivenim nakon ekstrakcije kore rajčice i njenih prosijanih frakcija pomoću ultrazvučne kupelji.

Uzorak	*t* (ekstrakcije)/min	*A* ± SD	*w* (ukupni fenoli)/%) ± SD*
TP	15	0,093 ± 0,003	41,14 ± 1,37
	30	0,083 ± 0,000	37,76 ± 0,00
	45	0,086 ± 0,000	38,13 ± 0,00
TP - 1,12	15	0,090 ± 0,001	39,89 ± 069
	30	0,071 ± 0,001	30,26 ± 0,35
	45	0,062 ± 0,001	26,31 ± 0,35
TP - 0,71	15	0,067 ± 0,002	28,19 ± 1,02
	30	0,066 ± 0,000	28,51 ± 0,00
	45	0,069 ± 0,001	29,74 ± 0,35
TP - 0,35	15	0,080 ± 0,000	34,96 ± 0,35
	30	0,071 ± 0,000	31,30 ± 0,00
	45	0,069 ± 0,000	29,83 ± 0,00

***vrijednosti fenola odnose se na ekvivalent galne kiseline

Rezultati određivanja udjela ukupnih fenola u uzorcima pektina pokazuju da se dobivene vrijednosti kreću u rasponu od 26,31 do 41,14 % ovisno o uzorku i vremenu ekstrakcije. Najveći maseni udjeli ukupnih fenola (37,76 - 41,14 %) nađeni su kod uzoraka dobivenih ekstrakcijom neprosijane kore rajčice (TP). Nešto niže vrijednosti daju TP - 1,12 (26,31 - 39,89 %), TP - 0,71 (28,19 - 29,74 %) i TP - 0,35 (29,83 - 34,96 %) uzorci ekstrahirani iz prosijane kore rajčice. Dakle, možemo zaključiti da vrsta frakcije (prosijana/ neprosijana kora rajčice) značajno utječe ($p < 0,05$, Tablica 12, Slika 16) na smanjenje ukupnih fenola u pektinskim izolatima.

Isto tako, promatrajući utjecaj vremena ekstrakcije (Slika 16) na sadržaj polifenola u uzorcima pektina jasno se može uočiti da povećanje vremena ekstrakcije značajno utječe ($p < 0,05$, Tablica 12) na smanjenje udjela polifenola.

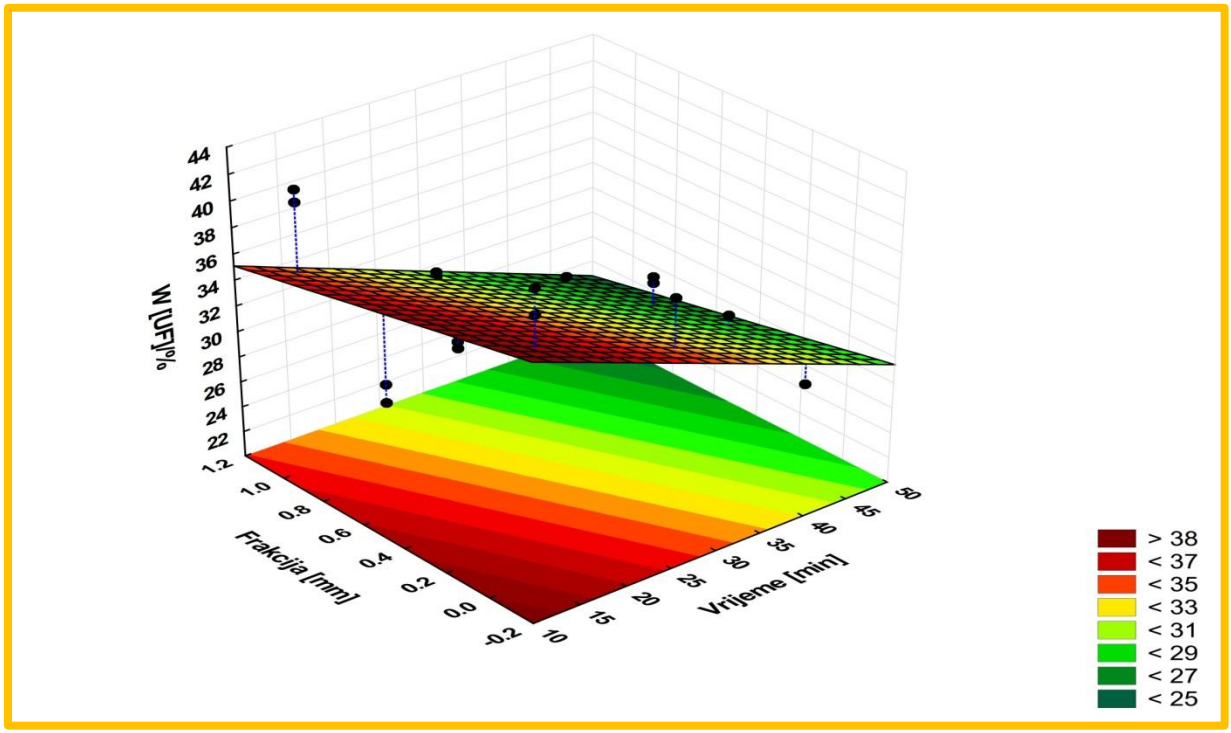
Peschel i suradnici (2006), koristeći etanol kao ekstrakcijsko otapalo, dobivaju slične masene udjele (42,00 ± 6,19 %). Navedeno dovodi do zaključka da se kora rajčice može korisiti i kao dobar izvor fenolnih spojeva.

Tablica 12. Statistička značajnost frakcije (prosijana/neprosijana) kore rajčice i vremena ekstrakcije na maseni udio ukupnih fenola u uzorcima pektina.

	***p* – vrijednost**	
	Kora rajčice*	***t* (ekstrakcije)/min**
***w* (ukupni fenoli)/%**	0,023433	0,000755

$p < 0,05$ = statistički značajno

***prosijana (TP - 1,12, TP - 0,71 i TP - 0,35)i neprosijana (TP) i kora rajčice



Slika 16. Utjecaj frakcije (prosijana/neprosijana kore rajčice) i vremena ekstrakcije na maseni udio ukupnih fenola u uzorcima pektina.

TP - 1,12, TP - 0,71 i TP - 0,35 = prosijana i TP = neprosijana kora rajčice

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Ultrazvučna ekstrakcija pektina iz kore rajčice pokazala se efikasnom tehnikom s obzirom na smanjeno vrijeme ekstrakcije (15 - 45 min), no uzimajući u obzir dobiveni prinos pektina možemo ju smatrati manje učinkovitom.
2. Postupak prosijavanja kore rajčice utječe na prinos ukupnih šećera i ukupnih fenola, ali ne i ukupne galakturonske kiseline u pektinskim izolatima.
3. Kraće vrijeme ekstrakcije (15 min) daje pektinske izolate s nižim udjelom vlage, pa će takvi pektinski pripravci biti stabilniji tijekom dužeg skladištenja, te povoljni za odgovarajuće specifične primjene.
4. Boja pektinskih izolata pokazuje da je tijekom ekstrakcije pektina došlo i do koekstrakcije drugih spojeva prisutnih u kutikuli kore rajčice, poput likopena i polifenola.
5. S obzirom da pektini sadrže i koekstrahirane polifenole, potrebno je u budućim postupcima ekstrakcije kore rajčice i izolacije pektina poboljšati postupke pročišćavanja i ispiranja.
6. Budući da pektini osim galakturonske kiseline (w < 65 %), sadrže i relativno visok udio ukupnih šećera i fenola, pektinski izolati dobiveni u ovom radu mogli bi se koristiti kao izvor, smjesa triju funkcionalnih sastojaka. Sukladno tome, i kora rajčice kao obećavajući izvor recikliranja istih.

6. LITERATURA

- Anese, M., Mirolo G., Beraldo, P., Lippe, G. (2013) Effect of ultrasound treatments of tomato pulp on microstructure and lycopene *in vitro* bioaccessibility. *Food Chem.* **136**, 458-463.
- Anthron, G. A., Barrett, D. M. (2008) Combined enzymatic and colorimetric method for determing the uronic acid and methylester content of pectin: Application to tomato products. *Food Chem*. **110**, 239-247.
- Ashford, M., Fell, J., Attwood, D., Sharma, H., Woodhead, P. (1993) An evaluation of pectin as a carrier for drug targeting to the colon. *J. Control. Release.* **26**, 213-220.
- Baississe, S., Ghannem, H., Fahloul, D., Lekbir, A. (2010) Comparison of Structure and Emulsifying Activity of Pectin Extracted from Apple Pomace and Apricot Pulp. *World J. Dairy Food Sci.* **5**, 79-84.
- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. (1973) A new method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem*. **54**, 484-489.
- Bosiljkov, T. (2011) Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na stupanj homogenizacije i fizikalna svojstva sojinog, kravljeg, ovčjeg i kozjeg mlijeka, Doktorski rad, Prehrambeno- biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Bosiljkov, T., Tripalo B., Brnčić M., Ježek D., Karlović S., Jagušt I. (2011) Influence of high intensity ultrasound with different probe diameter on the degree of homogenization (variance) and physical properties of cow milk. *Afr. J. Biotechnol.* **10**, 34-41.
- Brake, N. C., Fennema, O. R. (1993) Edible coatings to inhibit lipid migration in a confectionery product, *J. Food Sc.* **58**, 1422-1425.
- Brejnholt, S. M. (2010) Pectin. U Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents, (Imeson, A., ured.), Blackwell Publishing, Chichester, str. 237-266.
- Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, D., Ježek, D., Vikić Topić, D., Karlović, S., Bosiljkov, T. (2009b) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Hrvat. Čas. Prehrambenu Tehnol. Biotehnol. Nutr*. **4**, 32-37.
- Brouns, F., Theuwissen, E., Adam, A., Bell, M., Berger, A., Mensink, R. P. (2012) Cholesterol-lowering properties of different pectin types in mildly hyper-cholesterolemic men and women. *Eur. J. Clin. Nutr.* **66**, 591-599.

- Caffall, K. H., Mohnen, D. (2009) The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohyd. Res*. **344**, 1879-1900.
- Caili, F., Haijun, T., Quanhong, L., Tongyi, C., Wenjuan, D. (2006) Ultrasound assisted extraction of xyloglucan from apple pomace. *Ultrason. Sonochem*. **13**, 511-516.
- Chemat, F., Tomao, V., Virot, M. (2008) Ultrasound assisted extraction in food analysis. U: Handbook of food analysis instruments, (Ötleş, S., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 85- 103.
- Chen, H., Fu, X., Luo, Z. (2015) Properties and extraction of pectin-enriched materials from sugar beet pulp by ultrasonic-assisted treatment combined with subcritical water. *Food Chem.* **168**, 302-310.
- Christiaens, S., Uwibambe, D., Uyttebroek, M., Van Droogenbroeck, B.,Van Loey, A. M., Hendrickx, M. E. (2015) Pectin characterisation in vegetable waste streams: A starting point for waste valorisation in the food industry. *LWT - Food Sci. Tech*. **61**, 275-282.
- Coffin, D. R., Fishman, M. L. (1993) Viscoelastic properties of pectin/starch blends. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1192-1197.
- De Vries, J. A., Rombouts, F. M., Voragen, A. G. J., Pilnik, W. (1982) Enzymic degradation of apple pectins. *Carbohydr. Polym.* **2**, 25-33.
- Del Valle, M., Cámara, M., Torija, M. E. (2006) Chemical characterization of tomato pomace. *J. Sci. Food Agr*. **86**, 1232-1236.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem*. **28**, 350-354.
- DZS (2015) Proizvodnja povrća, voća i grožđa u 2015. - prethodni podaci. DZS - Državni zavod za statistiku, <https://www.dzs.hr/>. Pristupljeno 23. kolovoza 2017.
- FAO/WHO (2016) Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=3043>. Pristupljeno 23. kolovoza 2017.
- FAOSTAT-FAO (2014) Statistical Database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://www.fao.org>. Pristupljeno 23. kolovoza 2017.

- Faravash, R. S., Ashtiani, F. Z. (2007) The effect of pH, ethanol volume and acid washing time on the yield of pectin extraction from peach pomace. *Int. J. Food Sci. Technol*. **42,** 1177-1187.
- FDA (2017) GRAS Substances (SCOGS) Database. FDA - The US Food and Drug Administration, <https://www.fda.gov/>. Pristupljeno 23. kolovoza 2017.
- Filisetti-Cozzi, T. M. C. C., Carpita, N. C. (1991) Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal. Biochem*. **197**, 157-162.
- Garna, H., Mabon, N., Robert, C., Cornet, C., Nott, K., Legros, H., Wathelet, B., Paquot, M. (2007) Effect of Extraction Conditions on the Yield and Purity of Apple Pomace Pectin Precipitated but Not Washed by Alcohol. *J. Food Sci*. **72**, C1-C9.
- Garna, H., Mabon, N., Robert, C., Nott, K., Wathelet, B., Paquot, M. (2006) Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. *Food Chem*. **96**, 477-484.
- Geerkens, C. H., Nagel, A., Meike Just, K., Miller-Rostek, P., Kammerer, D. R., Schweiggert, R. M., Carle, R. (2015) Mango pectin quality as influenced by cultivar, ripeness, peel particle size, blanching, drying, and irradiation. *Food Hydrocolloid*. **51**, 241-251.
- Georgiev, Y., Ognyanov, M., Yanakieva, I., Kussovski, V., Kratchanova, M. (2012) Isolation, characterization and modification of citrus pectins. *J. BioSci. Biotech*. **1**, 223-233.
- Gopi, D., Kanimozhi, K., Bhuvaneshwari, N., Indira, J., Kavitha, L. (2014) Novel banana peel pectin mediated green route for the synthesis of hydroxyapatite nanoparticles and their spectral characterization. *Spectrochim. Acta A*. **118**, 589-597.
- Guilherme, M. R., Reis, A. V., Paulino, A. T., Moia, T. A., Mattoso, L. H., Tambourgi, E. B. (2010) Pectin-based polymer hydrogel as a carrier for release of agricultural nutrients and removal of heavy metals from wastewater. *J. Appl. Polym. Sci.***117**, 3146-3154.
- Harholt, J., Suttangkakul, A., Scheller, H. V. (2010) Biosynthesis of pectin. *Plant Physiol.* **153**, 384-395.
- Hosseini, S. S., Khodaiyan, F., Yarmand, M. S. (2016) Optimization of microwave assisted extraction of pectin sour orange peel and its physicochemical properties. *Carbohydr. Polym*. **140**, 59-65.

- IFT Committee (1959) Pectin Standardization: Final report of the IFT Committee. *Food Technol*. **13**, 496-500
- Iglesias, M. T., Lozano, J. E. (2004) Extraction and characterization of sunflower pectin. *J. Food Eng.* **62**, 215-223.
- IPPA (2001) Facts About Pectin. IPPA - International Pectin Producers' Association, <http://www.ippa.info/index.htm>. Pristupljeno 23. kolovoza 2017.
- IPPA (2017) Pectin in Organic Food Products. IPPA - International Pectin Producers' Association, <http://www.ippa.info/index.htm>. Pristupljeno 23. kolovoza 2017.
- Kang, J., Hua, X., Yang, R., Chen, Y., Yang, H. (2015) Characterization of natural low-methoxyl pectin from sunflower head extracted by sodium citrate and purified by ultrafiltration. *Food Chem*. **180**, 98-105.
- Kauser, S., Saeed, A., Iqbal, M. (2015) Comparative studies on conventional (water-hot acid) and non-conventional (ultrsonication) procedures for extraction and chemical characterization of pectin from peel waste of mango cultivar *Chaunsa*. *Pak. J. Bot*. **47**, 1527-1533.
- Kaya, M., Sousa, A., Crépeau, M. J., Sørensen, S. O., Rallet, M. C. (2014) Characterization of citrus pectin samples extracted under different conditions: influence of acid type and pH of extraction. *Ann. Bot*. **114**, 1319-1326.
- Keil, F. J., Swamy, K. M. (1999) Reactors for sonochemical engineering-present status. *Rev. Chem. Eng.* **15**, 85-155.
- Khule, N. R., Mahale, N. B., Shelar, D. S., Rokade, M. M., Chaudhari, S. R. (2012) Extraction of pectin from citrus fruit peel and use as natural binder in paracetamol tablet. *Der Pharmacia Lettre*, **4**, 558-564.
- Koubala, B. B., Christiaens, S., Kansci, G., Van Loey, A. M., Hendrickx, M. E. (2014) Isolation and structural characterisation of papaya peel pectin. *Food Res. Int.* **55**, 215-221.
- Koubala, B. B., Kansci, G., Garnier, C., Ralet, M.C., Thibault, J. F. (2008) Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from "Améliorée" and "Mango" mango peels. *Food Hydrocolloid.* **22**, 1345-1351.
- Kulkarni, S. G., Vijayanand, P. (2010) Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (Passiflora edulis f. flavicarpa L.). *Food Sci. Technol-Leb.* **43**, 1026-1031.

- Kumar, A., Chauhan, G. S. (2010) Extraction and characterization of pectin from apple pomace and its evaluation as lipase (steapsin) inhibitor. *Carbohydr. Polym*. **82**, 454-459.
- Kurita, O., Fujiwara, T., Yamazaki, E. (2008) Characterization of the pectin extracted from citrus peel in the presence of citric acid. *Carbohydr. Polym*. **74**, 725-730.
- Lau, J. M., McNeil, M., Darvill, A. G., Albersheim, P. (1985) Structure of backbone of rhamnogalacturonan. I. A pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants, *Carbohydr. Res.* **137**, 111-125.
- Leadley, C. E., Williams, A. (2006) Pulsed electric field processing, power ultrasound and other emerging technologies. U: Food processing handbook (Brennan, J. G., ured.) Wiley-VCH, Weinheim, str. 201-235.
- Lira-Ortiz, A. L., Reséndiz-Vega, F., Ríos-Leal, E., Contreras-Esquivel, J. C., Chavarría-Hernández, N., Vargas-Torres, A., Rodríguez-Hernández, A. I. (2014) Pectins from waste of prickly pear fruits (Opuntia albicarpa Scheinvar 'Reyna'): Chemical and rheological properties. *Food Hydrocolloid.* **37**, 93-99.
- Malviya, R., Srivastava, P., Bansal, M., Sharma, P. K. (2010) Mango peel pectin as a superdisintegrating agent. *J. Sci. Ind. Res. India*. **69**, 688-690.
- Mason, T. J. (1998) Power ultrasound in food processing- the way forward. U: Ultrasound in Food Processing, (Povey, M. J. W. i Mason, T. J. ured.), Blackie Academic & Professional, London, str. 105-126.
- May, C. (1990) Industrial pectins: sources, production and applications. *Carbohydr. Polym*. **12**, 79-99.
- McComb, E. A., McCready, R. M. (1952) Colorimetric determination of pectic substances. *Anal. Chem*. **24**, 163-165.
- Min, B., Lim, J., Ko, S., Lee, K. G., Lee, S. H., Lee, S. (2011) Environmentally friendly preparation of pectins from agricultural byproducts and their structural/rheological characterization. *Bioresour. Technol*. **102**, 3855-3860.
- Minjares-Fuentes, R., Femenia, A., Garau, M. C., Meza-Velázquez, J. A., Simala, S., Rosselló, C. (2014) Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: A response surface methodology approach. *Carbohyd. Polym.* **106**, 179-189.
- Mohnen, D. (2008) Pectin structure and biosynthesis, *Curr. Opin. Plant. Biol*. **11**, 266-277.

- Mollea, C., Chiampo, F., Conti, R. (2008) Extraction and characterization of pectins from cocoa husks: A preliminary study. *Food Chem*. **107**, 1353-1356.
- Müller-Maatsch, J., Bencivenni, M., Caligiani, A., Tedeschi, T., Bruggeman, G., Bosch, M., Petrusan, J., Van Droogenbroeck, B., Elst, K. and Sforza, S. (2016) Pectin content and composition from different food waste streams. *Food Chem*. **201**, 37-45.
- Ninčević Grassino, A., Brnčić, M., Vikić-Topić, D., Roca, S., Dent, M., Rimac Brnčić, S. (2016b) Ultrasound Assisted Extraction and Characterization of Pectin from Tomato Waste. *Food Chem*. **198**, 93-100.
- Ninčević Grassino, A., Halambek, J., Đaković, S., Rimac Brnčić, S., Dent, M., Grabarić, Z. (2016a) Utilization of tomato peel waste from canning factory as a potential source for pectin production and application as tin corrosion inhibitor. *Food Hydrocolloid.* **52**, 265-274.
- Oliveira, T. I. 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.
- Paga´ n J, Ibarz A. (1999) Extraction and rheological properties of pectin from fresh peach pomace. *J. Food Eng*. **39**, 193-201.
- Patist, A., Bates D. (2008) Ultrasonics innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innov Food Sci Emerg.* **9**, 147-154.
- Peschel, W., Ránchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzía, I., Jiménez, D., Lamuela-Raventós, R., Buxaderas, S., Codina, C. (2006) An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chem.* **97**, 137-150.
- Petkowicz, C. L. O., Vriesmann, L. C., Williams, P. A. (2017) Pectins from food waste: Extraction, characterization and properties of watermelon rind pectin. *Food Hydrocolloid.* **65**, 57-67.
- Povey, M. J. W., Mason, T. J. (1998) Ultrasound in Food Processing, Blackie Academic & Professional, London.
- Prakash Maran, J., Priya B. (2015) Ultrasound-assisted extraction of pectin from sisal waste. *Carbohyd. Polym.* **115**, 732-738.
- Pravilnik o prehrambenim aditivima (2010) *Narodne novine* **62**, Zagreb.

- Ranganna S. (1979) Manual of Analysis of Fruti and Vegetable Products, Tata McGraw-Hill Publ. Co. Ltd., New Delhi, str. 634.
- Ranganna S. (1995) Handbook of analysis and quality control for fruits and vegetable, 2. izdanje, Mc Graw Hill Publishers, New Delhi.
- Regulation (EU) No. 231/2012 laying down specifications for food additives listed in Annexes II and III to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council 1. European Commission 9 March 2012.
- Rehmann, Z. U., Salatiya, A. M., Shah, W. H. (2004) Utilization of mango peels as a source of pectin. *J. Chem. Soc. Pak.* **26**, 73–76.
- Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F.(1993) Structureand properties of apple and sugar beet pectins extractedby chelating agents. *Carbohydr. Res.* **244**, 99-114.
- Sala, F. J., Burgos, J., Condon, S., Lopez, P., Raso, J. (1995) Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. U: New methods of Food Preservation (Gould, G.W., ured.), Blackie Academic and Professional, London, str. 176-204.
- Schemin, M. H. C., Fertonani, H. C. R., Waszczynskyj, N., Wosiacki, G. (2005) Extraction of pectin from apple pomace. *Braz. Arch. Biolo. Technol*. **48**, 259-266.
- Scott, R. W. (1979) Colorimetric determination of hexuronic acids in plant materials. *Anal. Chem*. **51**, 936-941.
- Seggiani, M., Puccini, M., Pierini, M., Giovando, S., Forneris, C. (2009) Effect of different extraction and precipitation methods on yield and quality of pectin. *Int. J. Food Sci. Tech.* **44**, 574-580.
- Selvendran, R. R. (1985) Developments in the chemistry and biochemistry of pectic and hemicellulosic polymers. *J. Cell. Sci*. 1985 (Supplement 2), 51-88.
- Shi, X. Q., Chang, K. C., Schwarz, J. G., Wiesenborn, D. (1995) Effect of countercurrent ethanol washing on sunflower pectin quality. *Carbohyd. Polym.* **27**, 171-175.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult*. **16**, 144-158
- Srivastava, P., Malviya, R. (2011) Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry - An overview. *Indian J. Nat. Prod. Res*. **2**, 10-18.
- Svarovsky, L. (2000) Characterization of particles suspended in liquids. U: Solid-Liquid Separation, 4.izd. (Svarovsky, L., ured.), Butterworth-Heinemann, Oxford, str. 30-65.

- Thakur, B. R., Singh, R. K., Handa, A. K., Rao, M. A. (1997) Chemistry and uses of pectin - a review. *Crit. Rev. Food Sci.* **37**, 47-73.
- Thibault, J. F., Rinaudo, M. (1986) Chain association of pectic molecules during calcium-induced gelation. *Biopolymers*, **25**, 455-468.
- Tucker, L. A., Thomas, K. S. (2009) Increasing total fiber intake reduces risk of weight and fat gains in women. *J. Nutr.* **139**, 576-581.
- Vinatoru, M. (2001) An owerview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem*. **8**, 303-313.
- Virk, B. S., Sogi, D. S. (2004) Extraction and characterization of pectin from apple pomace (Malus Pumila CV Amri) peel waste. *Int. J. Food Prop*. **7**, 1-11.
- Vriesmann, L. C., Teófilo, R. F., Petkowicz, C.L.O. (2012) Extraction and characterization of pectin from cacao pod husks (Theobroma cacao L.) with citric acid. *Food Sci. Technol-Leb.* **49**, 108-116.
- Walter, W. M., Fleming, H. P. MacFeeters, R. F. (1993) Base-mediated firmness retention of sweet potato products. *J.Food Sci*. **58**, 1572-1578.
- WHO (2016) Evaluation of certain food additives. WHO - World Health Organization, <http://www.who.int/en/>. Pristupljeno 23. kolovoza 2017.
- Yapo, B. M. (2011) Improvement of compositional quality of monocot pectin extracts contaminated with glucuronic acid-containing components using a step-wise purification procedure. *Food Bioprod. Process*. **88**, 283-290.
- Yapo, B. M., Koffi, K. L. (2006) Yellow passion fruit rind-a potential source of low-methoxyl pectin. *J. Agr. Food Chem.* **54**, 2738-2744.
- Ziari, H., Ashtiani, F. Z., Mohtashamy, M. (2010) Comparing the effectiveness of processing parameters in pectin extraction from apple pomace. *Afinidad* **67**, 374- 379.