

Optimizacija ekstrakcijskih uvjeta hemicelulozne frakcije mahune graška

Modec, Matea

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:159:175163>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Matea Modec 763/PI

**OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJSKIH
UVJETA HEMICELULOZNE
FRAKCIJE MAHUNE GRAŠKA**

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Draženke Komes, red. prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć asistentice Aleksandre Vojvodić, dipl. ing.

Rad je izrađen u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost “Sustainable Production of Bioethanol and Biochemicals from Agricultural Waste Lignocellulosic Raw Materials” (SPECH-LRM; broj 9158).

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJSKIH UVJETA HEMICELULOZNE FRAKCIJE MAHUNE GRAŠKA

Matea Modec, 763/PI

Sažetak: U skladu sa svjetskim trendovima iskorištavanja biljnih ostataka za izdvajanje vrijednih sastojaka, cilj ovog rada je optimizirati ekstrakcijske uvjete izdvajanja ksilana iz hemicelulozne frakcije mahune graška, s potencijalnom primjenom u prehrambenoj, ali i drugim industrijama. U tu svrhu praćen je utjecaj delignifikacije te promjena koncentracije kalijevog hidroksida i duljina trajanja alkalne ekstrakcije. U izdvojenim frakcijama hemiceluloze i celuloze primjenom HPLC metode, uz prethodnu PMP derivatizaciju, odredit će se monomerni sastav ugljikohidrata. Približno 41 % suhe tvari sirovine čine strukturni polisaharidi, u čijem sastavu dominiraju ksiloza i glukoza, odnosno ukupni gluklan i ukupni ksilan. Udjel ksilana u mahuni graška je 11,7 %, odnosno približno četvrtina udjela strukturnih polisaharida. Primijenjenim postupcima izdvojene su tri frakcije: topljiva i netopljiva hemiceluloza te celulozni ostatak. Od 100 % inicijalno prisutne ksiloze u originalnom uzorku, u topljivoj i netopljivoj hemiceluloznoj frakciji je, nakon niza ekstrakcija, iskorištenje ksiloze u većini uzoraka bilo oko 100 %, što znači da nije došlo do značajne degradacije ksilana tijekom primijenjenih ekstrakcijskih postupaka. Veliki utjecaj na iskorištenje imala je delignifikacija, koja je povećala ekstraktibilnost hemiceluloze. Promjena koncentracije KOH (2M i 4M) i vremena trajanja alkalne ekstrakcije (2h i 4h) nije imala značajan utjecaj na ekstrakciju ksilana. Mahuna graška je dobar izvor ksilana, koji se izdvaja uglavnom u netopljivoj hemiceluloznoj frakciji homopolimernog sastava.

Ključne riječi: hemiceluloza, HPLC, ksilan, mahuna graška

Rad sadrži: 50 stranica, 12 slika, 3 tablice, 76 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: Aleksandra Vojvodić, dipl. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Božidar Šantek
2. Prof. dr. sc. Draženka Komes
3. Izv. prof. dr. sc. Ksenija Marković
4. Prof. dr. sc. Nada Vahčić (zamjena)

Datum obrane: 28. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

OPTIMIZATION OF EXTRACTION CONDITIONS OF PEA POD HEMICELLULOSE FRACTION

Matea Modec, 763/PI

Abstract: In accordance with the world trends in exploitation of plant residues for obtaining valuable ingredients, the aim of this study was to optimize the extraction conditions of xylan from the hemicellulose fraction of the pea pod, with the potential usage in the food industry, as well as the other industries. Extraction conditions that were optimized are: delignification, concentration of KOH in the alkal extraction and also the duration of this extractions. In the separated fractions of hemicellulose and cellulose using the HPLC method, with the previous PMP derivatization, the monomeric carbohydrate composition will be determined. Structural polysaccharides, whose composition is dominated by xylose and glucose (total glucan and total xylan) make approximately 41 % of dry matter of the raw material. The content of xylan in pea pod is 11.7 %, or approximately one quarter of the share of structural polysaccharides. Three fractions were isolated using different extraction conditions: the soluble and the insoluble hemicellulose and the cellulose residue. In most samples, utilization of xylose in the soluble and the insoluble hemicellulose fraction after a series of extraction steps was about 100 % of the initially present xylose, meaning there was no significant degradation of xylan during the extraction procedures applied. Delignification of samples, which helped the extraction of hemicellulose, had a great influence on such high utilization rates. The change in KOH (2M and 4M) and alkaline extraction time (2h and 4h) did not have a significant effect on xylan extraction. Pea pod is a good source of xylan, which is mostly separated in the insoluble hemicellulose fraction of homopolymeric composition.

Key words: hemicellulose, HPLC, pea pod, xylan

Thesis contains: 50 pages, 12 figures, 3 tables, 76 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Draženka Komes, Full Professor

Technical support and assistance: Aleksandra Vojvodić, BSc.

Reviewers:

1. PhD. Božidar Šantek, Full Professor
2. PhD. Draženka Komes, Full Professor
3. PhD. Ksenija Marković, Associate Professor
4. PhD. Nada Vahčić, Full Professor (replacement)

Thesis defended: 28th of september, 2017

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. POTENCIJAL AGROINDUSTRIJSKOG OTPADA	3
2.2. POLISAHARIDI STANIČNE STIJENKE BILJAKA	4
2.2.1. Hemiceluloza	5
2.2.1.1. Manani	5
2.2.1.2. Ksilani	6
2.2.1.3. Ksiloglukani	7
2.2.1.4. β -glukani	8
2.2.2. Celuloza	8
2.2.3. Lignin	9
2.3. METODE EKSTRAKCIJE HEMICELULOZE	9
2.3.1. Ekstrakcija lužinom	10
2.4. PRIMJENA HEMICELULOZE I NJEZINIH DERIVATA	11
2.5. PRIMJENA TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE U ANALIZI HEMICELULOZNE FRAKCIJE	12
2.6. MAHUNA GRAŠKA	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJAL	14
3.1.1. Biljna sirovina	14
3.1.2. Kemikalije	14
3.1.2.1. Izdvajanje hemiceluloze	14
3.1.2.2. Određivanje monosaharidnog profila polisaharidnih frakcija	15
3.1.3. Oprema i uređaji	16
3.1.3.1. Izdvajanje hemiceluloze	16
3.1.3.2. Određivanje monosaharidnog profila polisaharidnih frakcija	18
3.2. METODE RADA	19
3.2.1. Izdvajanje etanolno-ekstraktibilnih tvari	19
3.2.2. Izdvajanje pektina razrijeđenom kiselinom	20
3.2.3. Delignifikacija natrijevim kloritom i octenom kiselinom	21
3.2.4. Ekstrakcija hemicelulozne lužinom	23
3.2.5. Dijaliza i liofilizacija	24
3.2.6. Analiza monosaharidnog profila polisaharidnih uzoraka	27
3.2.6.1. Potpuna kiselinska hidroliza	27
3.2.6.2. Derivatizacija monosaharida 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on (PMP) reagensom	29

3.2.6.3. Analiza PMP derivata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti
(HPLC) 30

4. REZULTATI I RASPRAVA	32
5. ZAKLJUČCI	44
6. LITERATURA	45

1. UVOD

U industrijskoj i agroindustrijskoj proizvodnji i preradi primarnih biljnih sirovina dolazi do stvaranja nusproizvoda koji se smatraju nejestivima, no, iz njihovog kemijskog sastava proizlazi visok potencijal primjene u drugim industrijskim granama, kao što su petrokemijska industrija, biomedicina ili obrada otpadnih voda.

Budući da otpadni biljni materijal predstavlja izvor mnogih vrijednih sastojaka, njegova ponovna upotreba u određenom industrijskom procesu ima potencijalno veliku važnost, čime on postaje vrijedna sekundarna sirovina.

Ugljikohidrati sekundarnih biljnih sirovina važna su skupina spojeva, zbog svojih brojnih fizioloških uloga, kako u biljnim stanicama (gdje održavaju staničnu strukturu i sudjeluju u brojnim biološkim procesima) tako i za druge organizme, odnosno konzumente. Jedan od tih ugljikohidrata spada u složene ugljikohidrate, a to je hemiceluloza.

Hemiceluloza je, općenito, definirana kao polisaharad staničnih stijenki jednogodišnjih i višegodišnjih biljaka (Shuaiyang i sur., 2012). Postoje četiri tipa hemiceluloze, koje se razlikuju po strukturi, a to su ksilan, ksiloglukan, manan te β -glukani (Ebringerova, 2006). Od ta četiri tipa hemiceluloze, ksilan je u najvećem udjelu prisutan u biljnom svijetu. Čini između 25-35 % suhe biomase drvenastog tkiva dvosupnica i lignificiranog tkiva jednosupnica te gotovo 50 % tkiva žitarica (Petzold i sur., 2006).

Ksilan je, u zadnjih nekoliko godina, populariziran zbog svojih funkcionalnih svojstava, koja mogu naći primjenu u prehrambenoj, ali i u drugim industrijama. Postoje različiti tipovi ksilana, čija je sličnost u tome što su monomerne (ksilozne) jedinice povezane β -1,4-vezama (Viikari i sur, 2002). Molekularna veličina, stupanj grananja i monosaharidi od kojih se sastoje bočni lanci određuju fizička i biološka svojstva ksilana i mogućnosti njegove primjene u industriji (Cantu-Jungles i sur., 2016).

Prisutnost drugih vrsta polimera, kao što su celuloza, škrob, pektin, arabinogalaktan, ksiloglukan, galaktomanan, protein i fenoli, može rezultirati potrebom za razvojem skupljih i/ili stupnjevitih postupaka njegove ekstrakcije, kako bi se dobio ksilan poželjne čistoće (Ebringerova i Heinze, 2000).

Njegovo izdvajanje temelji se na nizu ekstrakcijskih metoda, čiji je cilj odvojiti ga od drugih ugljikohidratnih i neugljikohidratnih struktura (npr. celuloze) te povećati njegovu ekstraktibilnost. S druge strane, analiza monomernog sastava sekundarnih biljnih sirovina omogućava dublji uvid u kvantitativni i kvalitativni sastav polisaharida (ksilana) njihovih

staničnih stijenki te zahtijeva određene predradnje, kao što je kiselinska hidroliza, koja utječe na povećanje topljivosti i degradaciju strukture polisaharida. Degradacijom polisaharida nastaju monomeri, koji se potom analiziraju uz pomoć tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), koja se u mnogim istraživanjima za navedene uzorke i tehnike njihove ekstrakcije, pokazala najboljim izborom (Corradini, 2000).

Među brojnim primjenama ksilana je i primjena kao prebiotičkog supstrata, koji mogu stimulirati rad poželjnih bakterija u probavnom sustavu (Samanta i sur., 2015). U biomedicini, ksilan se koristi za pripremu pentozan polisulfata, FDA odobrenog oralnog lijeka za snižavanje kolesterola i triglicerida (Doctor i Sauls, 1983; Schuchamn i sur., 2013). Osim toga, postoji mogućnost primjene ksilana u obliku ksilan citrata, kao bioadsorbensa za tretiranje industrijskih voda (Shuaiyang i sur., 2012).

U skladu sa svjetskim trendovima iskorištavanja biljnih ostataka za izdvajanje vrijednih sastojaka, cilj ovog rada je optimirati ekstrakcijske uvjete izdvajanja ksilana iz hemicelulozne frakcije mahune graška, s potencijalnom primjenom u prehrambenoj i drugim industrijama. U tu svrhu će se pratiti utjecaj delignifikacije te koncentracije kalijevog hidroksida i duljine trajanja alkalne ekstrakcije na prinos ksilana. U izdvojenim hemiceluloznim i celuloznim frakcijama primjenom HPLC metode, uz prethodnu PMP derivatizaciju, odredit će se sastav monomera.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. POTENCIJAL AGROINDUSTRIJSKOG OTPADA

Agroindustrijske ostatke predstavlja organska biomasa, koja zaostaje u različitim fazama prerade neke primarne sirovine. Radi se o nejestivim ostacima, koji zaostaju na polju (ili nastaju kao nusproizvod neke tehnologije) te se uklanjaju iz postupka dobivanja konačnog proizvoda. Prema većini europskih regulativa, klasificiraju se kao otpad (Galanakis, 2012). Odlaganje takvog otpada može imati nepoželjan utjecaj na okoliš zbog spore biorazgradivosti, onečišćenja voda te sličnih ekoloških problema (Misi i Forster, 2002). Godinama su se ti nusproizvodi koristili kao stočna hrana i kompost, kako bi se smanjio ili čak zaustavio njihov štetan utjecaj na okoliš.

No, iako imaju negativan utjecaj na okoliš, agroindustrijski ostaci imaju i određene prednosti. Ova biomasa predstavlja obnovljive izvore, koji se stvaraju u velikim količinama te su lako dostupni i jeftini i imaju zanimljiv kemijski sastav. Danas se na agroindustrijski otpad gleda kao na potencijalan izvor vrijednih funkcionalnih sastojaka (Schieber i sur., 2001; Sonja i sur., 2009) te tako postaje vrijednom sekundarnom sirovinom. Navedena tendencija iskorištavanja agroindustrijskog otpada razvila se kao odgovor na prethodno spomenute ekonomske i ekološke probleme, ali i na povećanje standarda suvremenog tržišta te njegovih zahtjeva za pronalaskom novih izvora hranjivih sastojaka (Laufenberg i sur., 2003). Uz to, iskorištavanjem agroindustrijskog otpada u svrhu dobivanja proizvoda dodane vrijednosti, povećava se samo iskorištenje primarne sirovine, rješava se problem velike količine organskog otpada te se otvaraju brojne inovativne mogućnosti, kako u tehnološkom smislu, tako i u smislu kreiranja novih prehrambenih proizvoda.

Biljni otpad obiluje ugljikohidratima te brojnim biološki aktivnim komponentama, zbog čega je u novije vrijeme sve više zanimljiv znanstvenoj zajednici i prehrambenim tehnologizima. Ugljikohidrati sekundarnih biljnih sirovina čine važnu skupinu spojeva, zbog svojih brojnih fizioloških uloga, kako u biljnim stanicama, gdje održavaju staničnu strukturu i sudjeluju u brojnim biološkim procesima, tako i u ljudskom organizmu (konzumentima).

2.2. POLISAHARIDI STANIČNE STIJENKE BILJAKA

Stanična stijenka biljaka je dinamična i kompleksna struktura biopolimera, koji se sastoje od strukturno povezanih homo- i heteroglikana (Aspinall, 1983; Brett i Waldron, 1996).

Homopolimeri su polisaharidi građeni od samo jedne vrste monomernih jedinica, koje se ponavljaju prema nekom uzorku (primjerice celuloza, koja je građena isključivo od glukoznih jedinica). Za razliku od homopolimera, heteropolimeri nemaju jednoznačno određen sastav, a često ni strukturu, te se sastoje od različitih vrsta monomernih jedinica, povezanih različitim tipom glikozidnih veza (Aspinall, 1983).

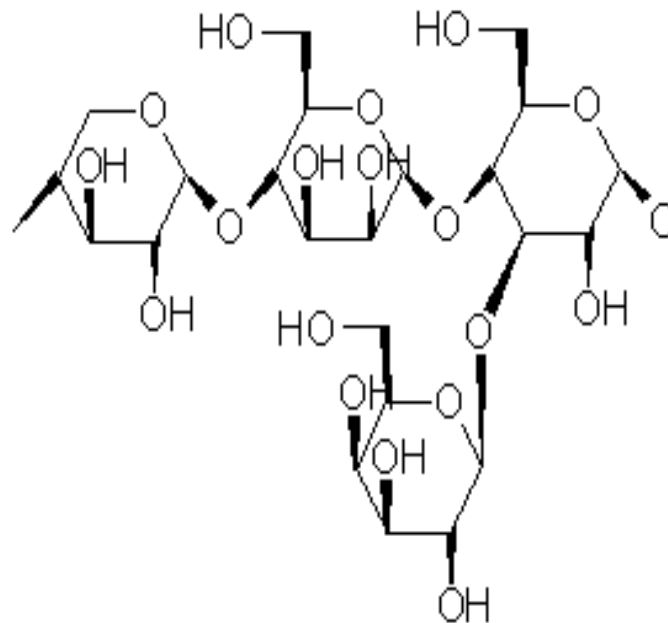
Tri samostalne, ali međusobno povezane mreže koje oblikuju mikrodomene su celuloza-hemiceluloza, pektini i strukturni proteini (Schindler, 1998).

Stanična stijenka osigurava čvrstoću biljnih tkiva te čini barijeru prolasku štetnih molekula u stanicu, dok je dovoljno porozna da omogući cirkulaciju vode, mineralnih tvari i drugih mikronutrijenata stanice. Stanična stijenka biljnih stanica sastoji se od 3 različita sloja: središnje lamele, primarne stanične stijenke i sekundarne stanične stijenke. Prilikom rasta i širenja stanica, staničnu stijenkku čine primarna stanična stijenka i središnja lamela, dok se sekundarna stanična stijenka stvara s vremenom, čime stanična stijenka postaje deblja i čvršća (Caffal i Mohnen, 2009). Središnja lamela predstavlja sloj stanične stijenke bogat pektinskim tvarima, najudaljeniji od središta stanice, koji ujedno i povezuje dvije susjedne stanice. U primarnoj staničnoj stijenci dominiraju polisaharidi (do 90 % suhe tvari), zajedno s manjim količinama glikoproteina (2-10 % s.tv), fenolnih estera (<2 % s.tv), ionski i kovalentno vezanih mineralnih tvari (1-5 % s.tv.) i enzima (Rose, 2003). Primarna stanična stijenka pomaže u održavanju strukture same stanične stijenke te u prijenosu signala iz stanica (Caffall i Mohnen, 2009). Sekundarnu staničnu stijenkku karakteriziraju veće količine celuloze i manje količine pektina, u odnosu na primarnu staničnu stijenkku (Caffall i Mohnen, 2009) te povećan udjel lignina, koji pridonosi čvrstoći same stanične stijenke (Rose, 2003).

Polisaharidi stanične stijenke biljaka nalaze se u kompleksnim međusobnim interakcijama te stvaraju složeni ugljikohidratni matriks, iz kojeg nije jednostavno izdvojiti pojedinu polisaharidnu frakciju.

2.2.1. Hemiceluloza

Hemiceluloza je, nakon celuloze, drugi najzastupljeniji biopolimer u biljnim materijalima. Prema strukturi je heteropolimer kompleksne strukture, koji se sastoji od glukoze, manoze, ksiloze, galaktoze, ramnoze, arabinoze, fukoze, glukuronske i galakturonske kiseline u različitim omjerima, ovisno o izvoru iz kojeg dolazi (Ebringerova i Heinze, 2000). U skladu s time, hemiceluloza nekog biljnog materijala često je sastavljena od raznovrsnih polisaharidnih lanaca te se često naznačuje i opisuje u množini. Hemiceluloze su razgranati polimeri, pri čemu tzv. središnji lanac, odnosno okosnicu molekule, najčešće čine β -(1 \rightarrow 4)-glikozidnom vezom povezane molekule glukoze, manoze ili ksiloze. Hemiceluloza (Slika 1) je podijeljena u četiri grupe, koje se razlikuju po strukturi, a to su ksilan, ksiloglukan, manan te β -glukani (Ebringerova, 2006).



Slika 1. Najčešća kemijska struktura hemiceluloze – ksiloza- β (1,4)-manoza- β (1,4)-glukoza- α (1,3)-galaktoza (Anonymous 1)

2.2.1.1. Manani

Manani su hemicelulozni polisaharidi, heteropolimeri, čiji središnji lanac čine jedinice D-manoze povezane β -(1 \rightarrow 4)-glikozidnom vezom. Manani se mogu naći u drvenastim („*hardwood*“) i „*softwood*“ biljkama. Dominantnu skupinu hemiceluloza mananskog tipa u „*softwood*“ biljkama čine acetilirani galaktoglukomanani, čiji središnji lanac se sastoji od D-glukoznih i D-manoznih jedinica povezanih β -(1 \rightarrow 4) vezom, dok D-galaktozne jedinice

povezane β -(1 \rightarrow 6) vezom čine bočne lance (Peng i sur., 2012). Galaktoglukomanani su jako osjetljivi na prisutnost kiseline, odnosno kiselinskom hidrolizom lako se depolimeriziraju, a posebno su osjetljive veze između bočnih lanaca galaktoze i središnjeg lanca (Sjöström, 1981).

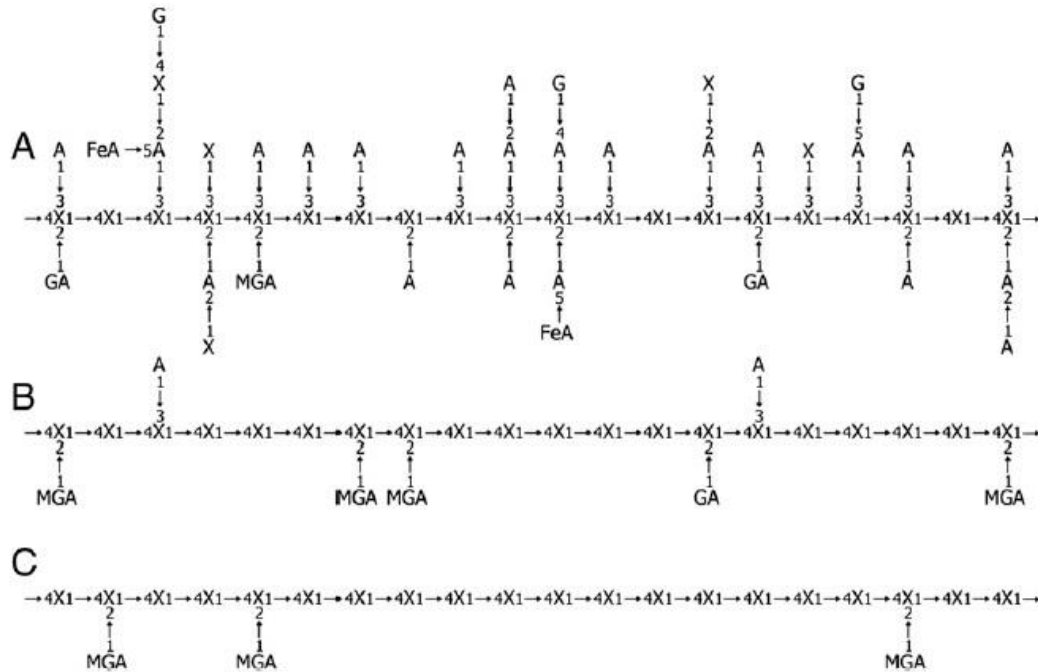
S obzirom na zastupljenost bočnih lanaca, galaktoglukomanani iz „*softwood*“ biljaka mogu se podijeliti na one relativno bogate galaktozom te relativno siromašne galaktozom, a ovisno o tome, omjer glukoze, manoze i galaktoze jest 1:3:1 ili 1:3:0.1, odnosno relativni udjel galaktoze može biti i do 10 puta manji u slučaju manje supstituiranosti bočnim lancima galaktana.

2.2.1.2. *Ksilani*

Ksilani su, strukturno gledano, polisaharidi, pri čemu u prirodi postoje različiti tipovi ksilana, čija je sličnost u tome što su monomerne (ksilozne) jedinice povezane β -1,4-vezama (Viikari i sur, 2002). Ksilan predstavlja između 25-35 % suhe biomase drvenastog tkiva dvosupnica i lignificiranog tkiva jednosupnica te skoro 50 % tkiva žitarica (Petzold i sur., 2006). Osim drvenastog bilja, ksilani se često mogu naći i u nekim jednogodišnjim biljkama i žitaricama, i do 30 % udjela u njihovoj staničnoj stijenci (da Silva i sur., 2012). Dobar izvor prirodnog ksilana čine poljoprivredne sirovine kao što su slama, kineska šećerna trska, kukuruzne stabljike i klipovi te ljuske kukuruza iz proizvodnje škroba i otpad iz šuma (Ebringerova i Hromádková, 1999). Prilikom ekstrakcije ksilana iz sekundarnih sirovina, problem predstavljaju interakcije s drugim komponentama stanične stijenke, posebice ligninom. Glavni lanac glukuronoksilana čine jedinice D-ksiloze (od kojih je većina acetilirana), povezane β -(1 \rightarrow 4) vezom. Bočne lance čine glukuronozilne jedinice (povezane jedinice glukuronske kiseline) i 4-O-metilglukuronozilne jedinice, vezane α -(1 \rightarrow 2) vezom. Arabinoglukuronoksilan je najzastupljenija vrsta hemiceluloza ksilanskog tipa u tzv. „*softwood*“ biljkama. Pojam „*softwood*“ odnosi se na pododjeljak golosjemenjača (lat. *Gymnospermae*) (Hoadley, 2000), kod kojih se sjemeni zametci nalaze otvoreno na plodnim listovima. Primjeri tih biljaka su bor, smreka, jela i slično. Kao i kod glukuronoksilana, okosnicu polimera čini lanac međusobno povezanih molekula D-ksiloze (ksilopiranozilne jedinice povezane β -(1 \rightarrow 4) vezom), dok se u sastavu bočnih lanaca nalaze 4-O-metil-D-glukuronska kiselina i L-arabinoza.

Arabinoksilani (Slika 2) predstavljaju glavni oblik ksilanskih hemiceluloza te se i ovaj tip ksilana sastoji od središnjeg lanca sastavljenog od D-ksiloznih jedinica, povezanih β -(1 \rightarrow 4)

vezom, na koje su vezani bočni arabinanski lanci. Arabinoksilane se najčešće može naći u travama te u žitaricama poput pšenice, raži, kukuruza, riže i zobi (Fincher i Stone, 1986; Hartley i Jones, 1976). Kod žitarica, najzastupljenije su u endospermu i vanjskim dijelovima zrna (Gruppen i sur., 1992).



Slika 2. Repräsentative kemijske strukture ksilana: A) trava i žitarice B) „*softwood*“ biljke C) „*hardwood*“ biljke (Deutschmann i Dekker, 2015)
(X-ksiloz, A-arabinoza, G-galaktoza, GA-glukoronska kiselina, MDA-4-O-metilglukoronska kiselina, FeA- ferulna kiselina)

2.2.1.3. Ksiloglukani

Središnji lanac ksiloglukana čine β -(1 \rightarrow 4) vezom povezane glukozne jedinice, na koje su vezani bočni lanci D-ksiloz. Ksiloglukani su vodikovim vezama čvrsto vezani s celulozom u staničnim stijenjkama biljaka, što otežava njihovu ekstrakciju (Carpita i Gibeaut, 1993). Najviše su zastupljeni u drvenastim, a manje u „*softwood*“ biljkama, dok se u travama nalaze u jako malim količinama (de Vries i Visser, 2001; Ebringerova i sur., 2005). Prema razgranatosti, postoje 2 glavna tipa ksiloglukana. Prvi oblik je ksiloglukan kod kojeg su na 3 uzastopne glukozne jedinice vezani bočni lanci ksiloz te zatim slijedi 1 glukozna jedinica bez bočnog lanca, a ovakav tip ksiloglukana pojavljuje se kod viših biljaka. Kod drugog oblika ksiloglukana, glukozne jedinice sa i bez bočnih lanaca izmjenjuju se u omjeru 2:2, a takav tip ksiloglukana nalazi se u sjemenjkama većine biljaka (Ren i Sun, 2010).

2.2.1.4. β -glukani

β -glukani su polisaharidi sastavljeni od glukoznih jedinica, povezanih β -glikozidnim vezama, a mogu biti linearne i/ili razgranate strukture. Treba naglasiti da nisu svi β -glukani hemiceluloze; npr. celuloza se strukturno sastoji od β -glukana (glukozne jedinice vezane β (1 \rightarrow 4) vezama), ali zbog razlike u vezama unutar glavnog lanca, celuloza je netopljiva u većini otapala, dok su hemicelulozni β -glukani fleksibilni i dobro topljivi (Anderson i Bridges, 1993). Hemicelulozne β -glukane nalazimo u zrnu žitarica (Roubroeks i sur., 2000) i u neendospermnim tkivima trava. Primjer hemiceluloznog β -glukana je β (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4)-glukan, nerazgranati homopolimer kod kojeg 70 % strukture otpada na β (1 \rightarrow 4)-glikozidnom vezom vezane glukozne jedinice, a 30 % na β (1 \rightarrow 3)-glikozidnom vezom vezane glukozne jedinice, te ima sposobnost stvarati viskozne otopine i gelove (Roubroeks i sur., 2000).

2.2.2. Celuloza

Celuloza je najrasprostranjenija obnovljiva organska sirovina na svijetu te čini 40-50 % suhe tvari biljaka (Sharma, 2015), a nalazi se još u bakterijama, algama i u nekim životinjama. Celuloza je linearni homopolimer, kojeg čine glukozne jedinice povezane β -(1 \rightarrow 4)-glikozidnom vezom. Kemijska formula celuloze je $(C_6H_{10}O_5)_n$ (pri čemu n označava stupanj polimerizacije, odnosno predstavlja broj glukoznih jedinica), a karakterizira je netopljivost u vodi, razrijeđenim kiselinama i razrijeđenim alkalnim otopinama pri sobnoj temperaturi.

Svaki prsten glukoze (osnovne monomerne jedinice ovog polimera) ima tri aktivne hidroksilne skupine, jednu primarnu -OH skupinu i 2 sekundarne -OH skupine, stoga celuloza stupa u velik broj reakcija preko hidroksilnih skupina. Hidroksilne skupine mogu stvarati vodikove veze između molekula glukoze unutar celuloze, što utječe na morfologiju i reaktivnost celuloznih lanaca (Gao i Tang, 1996). Celuloza se u staničnim stijenkama najčešće nalazi u obliku celuloznih filamenata, struktura oblikom sličnih cijevima, koje čine dugi lanci međusobno vezani različitim kemijskim vezama, koji se protežu u istom smjeru (Chen, 2014). Celulozni lanci pomoću vodikovih veza tvore mikrofilamentne strukture, koje uvelike povećavaju otpornost biljnih stanica na mehaničke sile (Perez i Mazau, 1998). Mikrofilamentne strukture najčešće sadrže 60-80 molekula celuloze. Ovisno o orijentaciji i rasporedu mikrofilamentnih struktura u staničnoj stijenci, količina oštećenja koje može podnijeti stanična stijenska se mijenja (Perez i Mazau, 1998).

Celuloza ima ogroman potencijal upotrebe kao obnovljivog izvora energije. Učinkovito iskorištenje otpada polisaharidnog podrijetla (poput celuloze) može pomoći u smanjenju zagađenja planete, pretvarajući ga u korisne nusproizvode, kao što su biogoriva (Sharma, 2015).

2.2.3. Lignin

Lignini su složeni aromatski heteropolimeri, koji ukružuju i učvršćuju sekundarne stanične stijenke unutar ksilemskog tkiva, stvarajući gusti matriks, koji veže celulozne mikrofibrile (Wainwright i sur., 1982) i poprečne veze drugih komponenata stanične stijenke (Ralph i sur., 2004). To je trodimenzijski polimer, čije su dominantne građevne jedinice p-kumaril alkohol, koniferil alkohol i sinapil alkohol (Yang i Jaakkola, 2011). Pruža Lignin ispunjava prostore u staničnoj stijenci između celuloze, hemiceluloze i pektinskih komponenata, naročito u vaskularnim i potpornim tkivima. Veže se na različite biljne polisaharide (npr. kovalentno je povezan s hemicelulozom), dajući mehaničku čvrstoću staničnoj stijenci te omogućavajući rast biljke u širinu (Chabannes i sur., 2001, Marton i sur., 2009).

Prema radu Breuniga i suradnika (2016), jedna od novijih mogućih primjena lignina je u svrhu zamjene ugljena u proizvodnji ulja za industriju. Zbog slične elementarne kompozicije i molekularne strukturne, lignin je predodređen da se koristi u tehnologijama ukapljivanja, koja je već dobro uspostavljena za lignit i smeđi ugljen.

2.3. METODE EKSTRAKCIJE HEMICELULOZE

Polisaharidi stanične stijenke biljaka danas se koriste u velikom broju različitih tehnologija pa se tako primjenjuju kao dodaci hrani, aditivi, u pripremi stočne hrane, kao nosači za lijekove, za proizvodnju biogoriva i u mnoge druge svrhe (Persin i sur., 2010). U skladu s time, kao i tendencijom iskorištavanja agroindustrijskih ostataka, povećao se interes za izdvajanjem polisaharida iz različitih biljnih biomasa, za što se razvijaju mnoge ekstrakcijske metode. Hemiceluloza je primjer polisaharida koji je unazad posljednjih nekoliko godina dobio na popularnosti, zbog mogućnosti njegove primjene u različitim industrijama. U skladu s time, razvijaju se metode izolacije i pročišćavanja hemiceluloza iz različitih biljnih izvora, koje će omogućiti visoke prinose istih. Hemiceluloze brojnim vodikovim vezama ulaze u interakcije i s drugim komponentama stanične stijenke, čime je njihovo izdvajanje iz kompleksnog matriksa stanične stijenke otežano (Ebringerova i Heinze, 2000). Budući da je

cilj rada ekstrakcija hemiceluloze u svrhu izdvajanja ksilana, u daljnjem tekstu navedeni su različite tehnike ekstrakcije iste.

2.3.1. Ekstrakcija lužinom

Postoje različiti načini ekstrakcije hemiceluloze iz prirodnih biljnih materijala, kao što su alkalna ekstrakcija, alkalno-peroksidna ekstrakcija i mnoge druge. Optimizacija ovih postupaka i danas je vrlo aktualna, zbog težnje za razvijanjem novih postupaka i tehnika ekstrakcije u svrhu ostvarivanja npr. maksimalnih prinosa, pročišćavanja frakcija i sl.

Cilj je razviti najprikladniju metodu za selektivno izdvajanje hemiceluloza od drugih komponenata stanične stijenke, bez degradacije iste (Peng i sur., 2012).

Tretman lignoceluloznih materijala (bogatih celulozom, hemicelulozom i ligninom) alkalnim otapalima razara staničnu stijenku, otapa hemiceluloze i lignin te hidrolizira uronske i acetilne estere (Jackson, 1977). Negativna posljedica ovakvog postupka izdvajanja je djelomična degradacija polisaharidnih lanaca, odnosno gubitak njihove prvotne strukture. Prilikom alkalne ekstrakcije, parametri koji utječu na prinos hemiceluloze su vrsta i koncentracija lužine, trajanje ekstrakcije i temperatura.

Najčešća otapala (lužine) koja se koriste za alkalnu ekstrakciju hemiceluloze su natrijev hidroksid (NaOH), kalijev hidroksid (KOH), barijev hidroksid ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) i litijev hidroksid (LiOH), od kojih NaOH i KOH ostvaruju najviše prinose (Lawther i sur., 1996). Pri jednakim koncentracijama, NaOH je efikasniji od KOH, dok primjena KOH rezultira čišćom hemicelulozom, odnosno hemicelulozom s manje primjesa.

Alkalna ekstrakcija može se provoditi i gradijentno, pri čemu se koriste lužnate otopine rastuće koncentracije, jedna za drugom. Takvim načinom ekstrakcije dobivaju se međusobno različite frakcije hemiceluloze (Sun i sur., 1996). Prije same alkalne ekstrakcije, često je potrebno odgovarajuće pripremiti biljni materijal, što ovisi o njegovom sastavu te uključuje uklanjanje hidrofilnih i lipofilnih komponenata, kao i nekih polisaharida, koji bi mogli onečistiti hemiceluloznu frakciju. Alkalna ekstrakcija iz prethodno odmašćene sirovine se u novije vrijeme koristi za ekstrakciju hemiceluloza iz pulpe šećerne repe, pšenične, rižine, ražene i ječmene slame te stabljike kukuruza (Ruzene i sur., 2008; Sun i Hughes, 1999; Sun i Sun, 2002; Sun i sur., 1996; Xiao i sur., 2001).

U radu O'Dwyer-a (1926), ekstrakcija hemiceluloze iz bukve obuhvaća nekoliko koraka, pri čemu je prvi korak predekstrakcija materijala pomoću etanola ili smjese etanol-toulen (u omjeru 1:2), kako bi se odstranile sve lipofilne i hidrofilne nestrukturane komponente. Sljedeći korak je delignifikacija materijala s natrijevim kloritom, nakon čega se preostali materijal

(smjesa celuloze i hemiceluloze) tretira lužinom. Izdvojena hemiceluloza se zatim precipitira, dodatkom etanola ili acetona. Delignifikacija biljnih sirovina provodi se kako bi proces ekstrakcije hemiceluloza bio što uspješniji, odnosno kako bi se dobila hemiceluloza sa što manje primjesa (posebice lignina). Metoda delignifikacije pomoću natrijevog klorita jedna je od često korištenih metoda, a provodi se pri 60-70 °C u trajanju od 4-8 h, uz periodično dodavanje svježih obroka natrijevog klorita i octene kiseline (Hubbel i Ragauskas, 2010; Ahlgren i Goring, 1971). Ovom metodom delignifikacije može se izdvojiti i do 90 % lignina iz biomase.

2.4. PRIMJENA HEMICELULOZE I NJEZINIH DERIVATA

Hemiceluloza i njezini derivati mogu se koristiti kao gelovi, filmovi, premazi, adhezivi (ljepila), kao želirajući i stabilizirajući agensi te kao aditivi za povećanje viskoznosti u prehrambenoj i farmaceutskoj, a u manjim količinama i u drugim industrijama (Ebringerova i sur., 2005).

Hemiceluloze ksilanskog tipa se u industriji mogu primijenjivati na više različitih načina, primjerice, kao površinski aktivne tvari u stabiliziranju emulzija tipa ulje u vodi ili kao prehrambena vlakna, filmovi za pakiranje, premazi za namirnice, zgušnjivači, itd. Osim toga, utječu na svojstva tijesta i konačna svojstva pekarskih proizvoda (Li i sur., 2011; Ünlu i sur., 2009). U novije vrijeme, ksilan se koristi i za dobivanje ksilooligosaharida, šećernih oligomera sastavljenih od ksiloznih jedinica. Ksilooligosaharidi imaju prebiotičko djelovanje, budući da pospješuju rast *Bifidobacterium* i nekih vrsta *Lactobacillus* bakterija, koje žive u ljudskom probavnom sustavu (Barbosa i sur, 2010; Chung i sur, 2007).. Trenutno se ksilan u velikim količinama prevodi u ksilozu, ksilitol i furfural. Osim toga, β -glukani imaju nekoliko primjena, poput zgušnjivača u umacima, nadjevima za salate i smjesama za sladolede te mogu biti dodatak hrani kao funkcionalni sastojak. Imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje, budući da snižavaju razinu kolesterola u krvi i djeluju imunostimulativno (Othman i sur., 2011; Akramiene i sur., 2007).

Manani se mogu koristiti za izradu filmova i premaza za hranu te su filmovi i premazi na bazi manana pokazali visoku nepropusnost za kisik i masnoće, kao i veliku otpornost na mehanička oštećenja (Mikkonen i Tenkanen, 2012). Manani iz pojedinih izvora imaju funkcionalna svojstva, odnosno pozitivno djelovanje na ljudsko zdravlje, pa tako manani izdvojeni iz biljaka guar i konjac smanjuju mogućnost pojave koronarnih bolesti (također snižavanjem razine kolesterola u krvi) (Jalili, 2007).

2.5. PRIMJENA TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE U ANALIZI HEMICELULOZNE FRAKCIJE

Analiza ugljikohidrata predstavlja jedan od izazova analitičke kemije, zbog brojnih mogućih konfiguracija monosaharida i njihovih izomernih oblika (Corradini, 2000; Molnár-Perl, 2000). U analizi ugljikohidrata, kromatografske analitičke tehnike osiguravaju najveću specifičnost te predstavljaju najbolji izbor za analizu ugljikohidrata niske molekulske mase.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC, engl. *High Performance Liquid Chromatography*) prihvaćena je kao jedna od glavnih tehnika analize šećera (Corradini, 2000). Iako ova tehnika ne daje objašnjenje strukture, osigurava visoku specifičnost i osjetljivost (važno u slučajevima kada su ugljikohidrati prisutni u malim količinama) te smanjenu mogućnost interferencija.

HPLC metoda predstavlja brz, ponovljiv i točan analitički pristup separacije različitih ugljikohidrata, omogućavajući različite kombinacije stacionarnih faza i načine detekcije, bilo za ugljikohidrate koji su derivatizirani ili koji su intaktni. Najčešće korištene HPLC metode za direktnu analizu monosaharida uključuju alkilne ili aminoalkilne vezane silikatne i polimerne faze, protonirane ili metalnim kationima nabijene smole, koje mogu biti povezane s refraktivnim indeksom (RI), UV zrakama niske valne duljine ili detektorom raspršivanja svjetlosnih zraka (ELSD) te također mogu biti povezane s kromatografijom anionske izmjene visoke djelotvornosti (HPAEC) zajedno s pulsnom amperometričkom detekcijom (PAD) (Corradini, 2000).

Šećeri (monosaharidi) su hidrofilni spojevi međusobno slične strukture, koja predstavlja ograničenje u separaciji složenih smjesa, budući da slično interferiraju sa stacionarnim i/ili mobilnim fazama. Molekule šećera se, primjenom derivatizacije, mijenjaju, kako bi se prevele u oblik primjeren za analizu, čime se olakšava njihova separacija i detekcija. Do sada je razvijen veliki broj derivatizacijskih postupaka, kao npr. derivatizacijski postupak gdje se koristi reagens DNPO (2,4-dinitrofeniloctilamin), OPA (O-filaldialdehid), NAIM (naftimidazol) i sl (Harvey, 2011). Među njima, najpopularniji je derivatizacija koja koristi reagens 3-metil-1-fenil-5-pirozolin-2-on (PMP) (Li i sur, 2009). PMP reagens reagira s reducirajućim šećerima u lužnatim uvjetima, što rezultira derivatima koji dobro apsorbiraju UV svjetlost pri 245 nm te omogućavaju dobru kromatografsku vidljivost na C18 HPLC kolonama (Sun i sur, 2014; Zhang i sur, 2013; Harvey, 2011).

2.6. MAHUNA GRAŠKA

Grašak (*Pisum sativum* L.) je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice lepirnjača (*Fabaceae* syn. *Legumiosae*). Najvjerojatnije je otkriven u Afganistanu te područjima Mediterana koja su bila kasnije kolonizirane. Iz ovih područja grašak se proširio u druge dijelove Europe i Azije (Cousin, 1997). Biljke graška pokazuju određenu specifičnost rasta. Prvi čvorovi, od kojih neki daju grane, su vegetativni, dok su drugi čvorovi reproduktivni. Općenito, po dva cvijeta (od kojih se razvijaju mahune, prisutna su na svakom reproduktivnom čvoru. Broj sjemena po mahuni ovisi o sorti i uvjetima okoliša (Cousin, 1997).

Grašak predstavlja jedan od najbitnih usjeva u umjerenim klimatskim uvjetima. Poljoprivredni grašak uzgaja se za žetvu suhog sjemena za hranidbu životinja ili kao krupice, a grašak šećerac koristi se isključivo za ljudsku konzumaciju (Zhang i sur, 2016).

Iz statistike Organizacije za prehranu i poljoprivredu, Ruska Federacija (1.160.200 ha), Kanada (1.475.000 ha), Kina (905.000 ha), Indija (735.000 ha) i Australija (248.900 ha) zemlje su koje najviše proizvode suhi grašak. Ukupna proizvodnja graška u svijetu je, zbog povećane potražnje, porasla od 1993. godine. Prvih pet zemalja koje se bave proizvodnjom su Kina (1.300.915 ha), Indija (380.000 ha), Sjedinjene Američke Države (77.090 ha), Ujedinjeno Kraljevstvo (34.553 ha) i Alžir (34.110 ha).

Velike količine nusproizvoda (npr. mahuna graška) stvaraju se tijekom procesiranja graška, što predstavlja ekonomski i ekološki problem. Po navedenoj statistici, Indija je poslije Kine drugi najveći proizvođač zelenog graška. Na temelju njihove proizvodnje graška, više od jedan milijun tona mahune graška se godišnje proizvede samo u Indiji. Većina te mahune graška se tretira kao otpad (Sharma i sur., 2015). U cilju iskorištenja svake faze u obradi sirovine, posljednjih godina nalaze se novi načini iskorištavanja mahune graška, koja predstavlja izvor vrlo vrijednih komponenata, ponajviše vlakna i kalija (Mateos-Aparicio i sur., 2010). Mnoge studije indiciraju da otpad iz prerade hrane ima visoki potencijal za ugradnju u sirove proizvode ili nusproizvode visoke vrijednosti (Laufenberg i sur, 2003).



Slika 3. Mahuna graška (Anonymous 2)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Biljna sirovina

U ovome radu kao biljna sirovina korištena je suha mahuna graška. Svježi cijeli plodovi graška (svježe cijele mahune) kupljeni su na tržnici od lokalnih proizvođača. Mahuna graška je u laboratorijskim uvjetima pripravljena simulirajući uvjete u domaćinstvu, dakle čišćenjem, tj. izdvajanjem zelenih bobica graška iz mahune. Prazne mahune su potom sušene u laboratorijskom sušioniku pri 50 °C, kako bi se svježi biljni materijal stabilizirao, odnosno zaštitio od mikrobiološkog kvarenja u uvjetima dugoročnog skladištenja. U tu svrhu je bilo važno osušiti mahunu do udjela vlage manjeg od 10 %. Osušene mahune usitnjene su pomoću mlinčića za kavu te prosijane kroz sito veličine pora 450 µm, kako bi se dobila homogena frakcija fino usitjenih čestica koje su korištene u daljnjim eksperimentima (naziv uzorka - mahuna graška (oznaka uzorka PP – engl. *pea pod*).

Biljni materijal je do upotrebe čuvan u čvrstim papirnatim vrećama na tamnom i suhom mjestu.

3.1.2. Kemikalije

Sve kemikalije korištene u ovome radu bile su visoke analitičke (*p.a.*) i/ili HPLC čistoće, osim ako nije drugačije naznačeno.

3.1.2.1. *Izdvajanje hemiceluloze*

Izdvajanje etanolno-ekstraktibilnih tvari

- Aceton, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Etanol 96 %, Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)

Izdvajanje pektina razrijeđenom kiselinom

- Klorovodična kiselina 1M, Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)

- Aceton, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Etanol 96 %, Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)

Delignifikacija

- Aceton, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Etanol 96 %, Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)
- Natrijev klorit, Acros Organics (New Jersey, MA, SAD)
- Octena kiselina, J. T. Baker (Pennsylvania, SAD)

Ekstrakcija lužinom

- Aceton, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Etanol 96 %, Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)
- Kalijev hidroksid, T. T. T. d.o.o. (Sveta Nedelja, Hrvatska)
- Natrijev bor hidrid, Acros Organics (New Jersey, MA, SAD)
- Octena kiselina, J. T. Baker (Pennsylvania, SAD)

3.1.2.2. Određivanje monosaharidnog profila polisaharidnih frakcija

Potpuna kiselinska hidroliza

- Kalcijev karbonat, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Standardi monosaharida: manoza, ramnoza monohidrat, riboza, glukuronska kiselina, galakturonska kiselina monohidrat, glukoza (bezvodna), ksiloza, galaktoza, arabinoza, fukoza, LLG International (Meckenheim, Njemačka)
- Sumporna kiselina 2,5 M, Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)
- Sumporna kiselina, konc., Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)

Derivatizacija monosaharida 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on (PMP) reagensom

- 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on (PMP reagens), Acros Organics (New Jersey, Ma, SAD)
- Kloroform, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina 1M, Kefo (Ljubljana, Slovenija)
- Metanol, J. T. Baker (Pennsylvania, SAD)
- Natrijev hidroksid 1M, Kefo (Ljubljana, Slovenija)

Analiza PMP derivata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

- Acetonitril, J. T. Baker (Pennsylvania, SAD)
- Fosforna kiselina 85 %, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev dihidrogenfosfat, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidrogenfosfat dihidrat, Acros Organics (New Jersey, MA, SAD)
- Natrijev hidroksid u zrnima, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

3.1.3. Oprema i uređaji

3.1.3.1. *Izdvajanje hemiceluloze*

Izdvajanje etanolno-ekstraktibilnih tvari

- Aparatura za filtraciju pomoću vakuuma (boca sisaljka 500 mL, perforirani stakleni lijevak 250 mL, brtve, vodena vakuum sisaljka, filter papir Whatman No.1)
- Laboratorijsko posuđe: laboratorijske Duran boce (1000 ml), staklene menzure od 500 mL, plastične menzure od 1000 mL, laboratorijske boce od 2000 mL
- Tehnička vaga, AND GF 3000 EC (Massachusetts, SAD)

Izdvajanje pektina razrijeđenom kiselinom

- Aparatura za filtraciju pomoću vakuuma (boca sisaljka 500 mL, perforirani stakleni lijevak 250 mL, brtve, vodena vakuum sisaljka, filter papir Whatman No.1)
- Laboratorijsko posuđe: laboratorijske boce (Duran, 500 mL), odmjerne tikvice, laboratorijske čaše, špatule, magnetići
- pH-metar, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Tehnička vaga, AND GF 3000 EC (Massachusetts, SAD)
- Vodena kupelj, Termomedicinski aparati „Bodalec“ TKS-1 (Dugo Selo, Hrvatska)

Delignifikacija

- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Aparatura za filtraciju pomoću vakuuma (boca sisaljka 500 mL, perforirani stakleni lijevak 250 mL, brtve, vodena vakuum sisaljka, filter papir Whatman No.1)
- Laboratorijsko posuđe: laboratorijske boce (Duran, 1000 mL), laboratorijske čaše, Petrijeve zdjelice, špatule

- pH-metar, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Vodena kupelj, Termomedicinski aparati „Bodalec“ TKS-1 (Dugo Selo, Hrvatska)

Ekstrakcija lužinom

- Aparatura za filtraciju pomoću vakuuma (boca sisaljka 500 mL, perforirani stakleni lijevak 250 mL, brtve, vodena vakuum sisaljka, filter papir Whatman No.1)
- Centrifuga SL 8R s HIGHConic III Fixed Angle rotorom, Thermo Scientific (Massachusetts, SAD)
- Homogenizator Mixer Mill MM 400 s odgovarajućim adapterom za Eppendorf epruvete 1,5 i 2 mL (te odgovarajućim metalnim sačmama za male volumene), Retsch GmH (Haan, Njemačka)
- Laboratorijsko posuđe: laboratorijske boce (Duran, 1000 mL), laboratorijske čaše od 100 ml, magnetići, Falcon epruvete od 15 ml i 50 ml, staklene menzure od 250 mL i 1000 ml
- Magnetska mješalica s više pozicija, IKA (Staufen, Njemačka)
- pH-metar, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Vortex V-1 plus, Biosan (Riga, Latvija)

Dijaliza

- Centrifuga SL 8R s HIGHConic III Fixed Angle rotorom, Thermo Scientific (Massachusetts, SAD)
- Laboratorijsko posuđe: Falcon epruvete od 50 ml, laboratorijske čaše 50 i 100 mL, plastične laboratorijske čaše od 5000 mL
- Membrane za dijalizu, Cellu Sep, nominal MWCO 6000-8000 Da; 7,96 mL/cm (Membrane Filtration Products, Inc.; Taksas, SAD)
- Magnetska mješalica, Wisd SM HS-6 (Werthrim, Njemačka)

Liofilizacija

- Laboratorijsko posuđe: Petrijeve zdjelice (staklene i plastične)
- Laboratorijski zamrzivač
- Liofilizator FreeZone 1, Labconco (Kansas City, MO, SAD)

3.1.3.2. *Određivanje monosaharidnog profila polisaharidnih frakcija*

Potpuna kiselinska hidroliza polisaharidnih uzoraka

- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Automatska pipeta 20-200 μ L, 100-1000 μ L, Gilson (Wisconsin, SAD)
- Laboratorijsko posuđe: staklene epruvete s pripadajućim PP čepovima s brtvom, stakleni štapići, Eppendorf epruvete od 2 ml, špatule
- pH indikatorske trakice 0-14, LLG Labware (Meckenheim, Germany)
- Stolna centrifuga za Eppendorf epruvete od 1,5 i 2 mL
- Uljna kupelj s miješanjem HBR 4 control, IKA (Staufen, Njemačka)
- Vortex V-1 plus, Biosan (Riga, Latvija)

Derivatizacija monosaharida 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on (PMP) reagensom

- Automatska pipeta 20-200 μ L, 100-1000 μ L, Gilson (Wisconsin, SAD)
- Laboratorijsko posuđe: Eppendorf epruvete od 2 ml, plutajući stalci za Eppendorf epruvete, staklene pipete od 2 ml, propipete, staklene čaše
- pH indikatorske trakice 0-14, LLG Labware (Meckenheim, Njemačka)
- Stolna centrifuga za Eppendorf epruvete od 1,5 i 2 mL
- Vodena kupelj, Termomedicinski aparati „Bodalec“ TKS-1 (Dugo Selo, Hrvatska)
- Vortex-1 plus, Biosan (Riga, Latvia)

Analiza PMP derivata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

- Mikrofilteri od regenerirane celuloze (RC), veličine pora 0,2 μ m, promjera 15 mm, Phenomenex (SAD)
- HPLC vialice s pripadajućim navojnim čepovima sa septom, Agilent Technologies (SAD)
- HPLC kolona-Zorbax Extend-C18 Analytical 4,6x250 mm 5-micron, Agilent Technologies (SAD)
- Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s PDA („Photo Diode Array“) detekcijom- Agilent 1200 Series, Agilent Technologies (SAD)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Izdvajanje etanolno-ekstraktibilnih tvari

Opis postupka:

Izdvajanje etanolno-ekstraktibilnih tvari podrazumijeva ekstrakciju 70 %-tnim etanolom kako bi se, prvenstveno, uklonili jednostavni topljivi šećeri iz biljnog materijala, koji mogu interferirati u daljnjim analizama određivanja monosaharidnog profila. Također, osim jednostavnih šećera, ekstrakcijom hidrolakoholnom otopinom izdvajaju se i druge hidrofilne komponente male molekulske mase iz biljnog matriksa. Uzorak se miješa s otapalom u omjeru 1:10 w/v (u ovom radu korišteno je ukupno 100 g početnog uzorka i 1 L otapala, pomiješanih u laboratorijskoj boci od 1 L). Ekstrakcija se provodi pri sobnoj temperaturi uz kontinuirano miješanje tijekom 30 minuta. Nakon završene ekstrakcije, ekstrahirani materijal se od ekstrakta odvaja vakuum filtracijom preko Whatman No.1 filter papira.

Priprema uzorka mahune graška provedena je trostrukom etanolnom ekstrakcijom. Pri tome se za svaku sljedeću ekstrakciju talog nakon filtracije kvantitativno prenio u laboratorijsku bocu te se postupak se ponovi. Nakon trostruke ekstrakcije, ekstrahirani uzorak osušen je izmjenom otapala. U tu svrhu, talog nakon filtracije 2 puta je ispran s 350 mL 96 %-tnog etanola i zatim s 200 mL acetona. Pri tome je bilo važno dobro resuspendirati uzorak u odgovarajućem otapalu, a između svakog ispiranja uzorak je odvojen filtracijom. S obzirom da se radi o lako hlapivim i zapaljivim otapalima, cjelokupni postupak izveden je u digestoru. Nakon zadnjeg ispiranja, isprani talog prebačen je u odgovarajuću plastičnu posudu, prekriven staničevinom te ostavljen u digestoru kako bi sav aceton ishlapio. Osušeni uzorak je dodatno homogeniziran u tarioniku prije sljedećeg koraka u izdvajanju hemiceluloze.

Izračun rezultata:

Udjel etanolno-ekstraktibilne tvari dobije se određivanjem udjela suhe tvari etanolnog ekstrakta. U tu svrhu potrebno je zadržati kvantitativan način rada tijekom trostruke ekstrakcije 70 %-tnim etanolom, združiti sav dobiveni etanolni ekstrakt te istome precizno odrediti ukupni volumen. Za određivanje suhe tvari potrebno je izuzeti adekvatni alikvot homogenog ukupnog ekstrakta, a određivanje se provodi sušenjem do konstantne mase prema AOAC metodi 930.15 (AOAC, 1990).

3.2.2. Izdvajanje pektina razrijeđenom kiselinom

Depektinizacija mahune graška provedena je prema radu Suna i Hughesove (1998), uz modifikacije.

Opis postupka:

Izdvajanje pektina iz ekstrahiranog uzorka provedeno je pomoću razrijeđene klorovodične kiseline (HCl), pH 1,5 (približno 0,03M otopina, koja se priprema u odgovarajućem volumenu iz 1M otopine HCl, dok se željena pH vrijednost postiže pažljivim dodavanjem koncentrirane HCl uz praćenje promjene pH-metrom). Uzorak se miješa s otopinom HCl u omjeru 1:25 w/v (u ovome radu korišteno je 20 g ekstrahiranog uzorka i 500 mL otopine HCl, pH 1,5, pomiješanih u laboratorijskim bocama od 1 L). Estrakcija je provedena u vodenoj kupelji (važno je pripaziti da razina vode u kupelji prekriva razinu smjese u boci) u začepnoj boci pri 90 °C tijekom 2 h, uz povremeno miješanje sadržaja boce, zbog održavanja homogenosti reakcijske smjese.

Nakon provedne ekstrakcije, uzorak se ohladi na sobnu temperaturu u hladnoj vodenoj kupelji te se potom filtrira preko aparature za vakuum filtraciju (Whatman No. 4), kako bi se odvojio depektinizirani uzorak od pektinskog ekstrakta. Dobiveni talog ispire se demineralizirnom vodom prije sušenja, kako bi se isprao izdvojeni pektin te zaostala klorovodična kiselina (talog se ispire dok se ne postigne pH vrijednost filtrata otprilike 4). Depektinizirani uzorak (talog) se nakon ispiranja suši izmjenom otapala. U tu svrhu talog se ispire 2 puta s 200 mL 96 %-tnog etanola i zatim s 200 mL acetona. Prilikom svakog ispiranja potrebno je dobro resuspendirati talog u otapalu, a između ispiranja uzorak je odvojen filtracijom pomoću vakuuma. S obzirom da se radi o lako hlapivim i zapaljivim otapalima, cjelokupni postupak izveden je u digestoru. Isprani talog se nakon zadnjeg ispiranja prebaci u plastičnu posudu, prekrije staničevinom te se ostavi sušiti u digestoru dok sav aceton ne ishlapi. Dobiveni suhi depektinizirani uzorak dodatno se homogenizira u tarioniku (ili mlinčiću za kavu) i koristi kao početni materijal u daljnjem postupku izdvajanja hemiceluloze.

Izračun rezultata:

Pektin je izdvojen iz združenog pektinskog ekstrakta (matični pektinski ekstrakt + filtrat od ispiranja) alkoholnom precipitacijom, uz dodatak četverostrukog volumena 96 %-

tnog etanola. Pektinski talog je zatim filtriran, ponovno otopljen, dijaliziran i osušen liofilizacijom, dok je prinos istoga određen gravimetrijski.

3.2.3. Delignifikacija natrijevim kloritom i octenom kiselinom

Delignifikacija je provedena prema protokolu Kumara i suradnika (2013), uz modifikacije. Eksperiment je nužno provoditi u dobro ventiliranom prostoru (digestoru), zbog razvoja klorovog dioksida, toksičnog plina nagrizajućeg mirisa.

Opis postupka:

Delignifikacija depektiniziranog uzorka provedena je dodavanjem natrijevog klorita (NaClO_2) i octene kiseline (CH_3COOH) u smjesu uzorka i demineralizirane vode, pomiješanih u omjeru 1:32 w/v (u ovome radu korišteno je 15 g suhog depektiniziranog uzorka i 480 mL demineralizirane vode prethodno zagrijane na $70\text{ }^\circ\text{C}$, pomiješanih u laboratorijskoj boci od 1 L). Reaktanti natrijev klorit i octena kiselina dodaju se u omjeru 0,6 g/g uzorka, odnosno 0,6 mL/g uzorka. Nakon dodatka reaktanata, sadržaj boce se promiješa, boca se začepi (čep ne zavrtati do kraja) te stavi u vodenu kupelj termostatiranu na $70\text{ }^\circ\text{C}$. Vrijeme reakcije bilo je varijabilni parametar, kao i količina ukupno dodanih reaktanata, kako je prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Parametri provedene delignifikacije

Oznaka uzorka	Ukupno trajanje delignifikacije (h)	Ukupan broj dohrana NaClO_2 i CH_3COOH	Količina NaClO_2 i CH_3COOH u jednoj dohrani	Vrijeme dohrane
PP D1h	1	1	0,6 g (mL)/g uzorka	0 min
PP D2h	2	2	0,6 g (mL)/g uzorka	0 min; 60 min

Smjesu je tijekom reakcije potrebno povremeno miješati laganim okretanjem boce, kako bi se održala homogenost reakcijske smjese.

Tijekom delignifikacije karakterističan je razvoj klorovog dioksida, plina žutozelene boje, dok uzorak postaje bijele boje zbog oksidacijskog učinka te efekta izbjeljivanja. Nakon završene delignifikacije, boce se ohlade na sobnu temperaturu u hladnoj kupelji, a sadržaj istih kvantitativno se filtrira preko aparature za vakuum filtraciju (Whatman No. 4) u digestoru. Talog koji ostaje na filteru (holoceluloza) ispiri se demineraliziranom vodom u obrocima od

100 mL, do postizanja neutralnog pH. Matični filtrat, kao i filtrat od ispiranja, zbrinjavaju se na adekvatan način. Dobro isprani talog delignificiranog uzorka suši se izmjenom otapala. U tu svrhu talog se ispire 2 puta s 200 mL 96 %-tnog etanola i zatim s 200 mL acetona. Prilikom svakog ispiranja potrebno je dobro resuspendirati talog u otapalu, a između ispiranja se uzorak odvaja filtracijom pomoću vakuuma. Budući da se radi o lako hlapivim i zapaljivim otapalima, cjelokupni postupak potrebno je izvoditi u digestoru. Isprani talog se nakon zadnjeg ispiranja prebaci u plastičnu posudu, prekrije se staničevinom te se ostavi sušiti u digestoru dok sav aceton ne ishlapi. Dobivena osušena holoceluloza dodatno se usitnjava u tarioniku i mlinčiću za kavu te se takva koristi kao početni materijal u daljnjem postupku izdvajanja hemiceluloze.

Izračun rezultata:

Gubitak mase delignifikacijom izračunava se gravimetrijski iz razlike mase suhog uzorka prije i nakon delignifikacije (1). Zbog toga je neophodno provoditi kvantitativan način rada tijekom cijelog postupka.

$$\text{gubitak m delignif. (\%)} = (m_1 - m_2) / m_{\text{ekv1}} * 100 \quad (1)$$

Pri čemu je:

m_1 - masa suhog uzorka prije delignifikacije

m_2 - masa suhog uzorka nakon delignifikacije

m_{ekv1} - ekvivalentna masa uzorka prije delignifikacije mase originalnog uzorka

Da bi se izračunao gubitak mase delignifikacijom u odnosu na originalni uzorak, koristi se ekvivalentna masa originalnog uzorka (m_{ekv1}), koja predstavlja masu uzorka prije delignifikacije, uvećanu za gubitak mase etanolnom ekstrakcijom i depektinizacijom, tj. ekstrakcijskim koracima koji prethode delignifikaciji. Ekvivalentna masa izračunava se prema izrazu (2).

$$m_{\text{ekv1}} = m_1 / (1 - (\% \text{ ekstraktibilnih tvari} + \% \text{ pektina})/100) \quad (2)$$

Pri čemu je:

m_1 - masa uzorka prije delignifikacije

Delignifikacija mahune graška provedena je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao udjel (%) izgubljene mase s obzirom na originalni uzorak (mahuna graška prije započetog postupka izdvajanja hemiceluloze).

3.2.4. Ekstrakcija hemiceluloze lužinom

Opis postupka:

Ekstrakcija hemiceluloze lužinom provedena je iz osušene holoceluloze (dobivene nakon delignifikacije) te iz depektiniziranih uzoraka (koji nisu podvgnuti delignifikaciji), koji su ujedno predstavljali i kontrolne uzorke za praćenje utjecaja delignifikacije na ekstraktibilnost hemiceluloze iz mahune graška.

Kao otapalo u ekstrakciji lužinom korištena je otopina kalijevog hidroksida (2M i 4M KOH) s dodatkom natrijevog borhidrida (NaBH_4) u konc. 20 mM. Uzorci (delignificirani i nedelignificirani) pomiješani su s otapalom u omjeru 1:20 w/v u laboratorijskim čašicama (u ovome radu je korišteno 1 g delignificiranih uzoraka i 2 g nedelignificiranog uzorka te 20 mL, odnosno 40 mL otopine KOH), a ekstrakcija je provedena pri sobnoj temperaturi tijekom 2 h ili 4 h te uz kontinuirano miješanje na magnetskoj mješalici.

Nakon isteka predviđenog vremena ekstrakcije, sadržaj čašica se kvantitativno prenosi u Falcon epruvete od 50 mL te se alkalni supernatant, u kojem se nalazi otopljeni hemiceluloza, odvaja centrifugiranjem (8000 o/min, 10 minuta, 25 °C). Talog u epruvetama (celulozni ostatak) ispiri se 2 puta s jednakim volumenom vode kao što je bio volumen lužine u ekstrakciji te se ponovi korak centrifugiranja. Supernatant od ispiranja združuje se s matičnim supernatantom u ukupni alkalni ekstrakt iz kojeg će se izdvajati hemiceluloza. U tu svrhu alkalni ekstrakt se prvo neutralizira do pH 6 polaganim dodavanjem ledene octene kiseline, uz hlađenje otopine u ledenoj vodenoj kupelji (ili smjesi vode i leda) i kontinuirano miješanje na magnetskoj mješalici, dok se promjena pH prati pomoću pH-metra. Neutralizacija se provodi polagano, jer dolazi do pjenjenja uslijed degradacije NaBH_4 i razvoja plinovitih produkata, pri čemu točno mjerenje pH i praćenje neutralizacije može biti otežano. Također, budući da su plinoviti produkti zapaljivi i toksični, neutralizaciju alkalnog ekstrakta nužno je izvoditi u digestoru. Neutralni ekstrakt se kvantitativno prenese u menzuru te mu se izmjeri volumen, a dodatkom četverostrukog volumena 96 %-tnog etanola izdvaja se hemiceluloza u obliku precipitata (precipitacija se provodi u laboratorijskoj boci odgovarajućeg volumena, a ekstrakt iz menzure se u istu prenosi kvantitativno). Etanol je potrebno dodavati polako i uz miješanje otopine. Smjesa se čuva preko noći na +4 °C, kako bi se maksimalno inducirala precipitacija.

Nastali talog hemiceluloze kvantitativno se filtrira preko aparature za vakuum filtraciju (Whatman No. 1) (prilikom ispiranja boce u kojoj se odvijala precipitacija koristi isti sastav otapala kao prilikom precipitacije ($\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH} = 1:4$). Talog na filteru se na kraju ispiri 2 puta s 15 mL 96 %-tnog etanola te se dobro ocijedi na filteru (paziti da se ne osuši do kraja), a zatim se kvantitativno prenosi u laboratorijske čašice od 25 mL te se resuspendira u otprilike 10 mL demineralizirane vode, čime se uzorak priprema za dijalizu.

Celulozni ostatak (ostatak nakon alkalne ekstrakcije) nakon inicijalnog ispiranja vodom (pri čemu se supernatant od ispiranja združuje s matičnim alkalnim ekstraktom) dodatno se ispiri demineraliziranom vodom, do postizanja neutralnog pH supernatanta (ispiranje viška lužine), te se zatim suši izmjenom otapala, 96 %-tnog etanola i acetona, kao što je već prije opisano.

3.2.5. Dijaliza i liofilizacija

Dijaliza je membranski proces u kojem otopljene čestice male molekulske mase difundiraju kroz polupropusnu membranu iz područja veće koncentracije u područje manje koncentracije, dok se ne postigne ravnoteža. Membrane također mogu biti različite veličine pora pa se otopljene molekule mogu razdvajati i po principu ekskluzije, odnosno zadržavanja molekula većih od veličine pora s jedne strane polupropusne membrane i prolazak manjih molekula zbog razlike u koncentraciji.

Opis postupka:

Dijaliza resuspendiranih hemiceluloznih precipitata provodi se kako bi se uklonile neugljikohidratne primjese male molekulske mase od velikih polimernih lanaca hemiceluloze, poput eventualno koprecipitirane soli kalijevog acetata (nastale tijekom neutralizacije alkalnog ekstrakta) te drugih koprecipitiranih spojeva, kao i zaostalog etanola. Pročišćavanje uzoraka dijalizom nužno je, kako bi se precizno gravimetrijski mogli odrediti prinosi hemiceluloza.

Dijaliza uzoraka provedena je u tubularnim dijalizacijskim membranama pomoću demineralizirane vode. Duljina tubularne dijalizacijske membrane određuje se s obzirom na dimenzije iste (7,96 mL/cm) te ukupni volumen kojeg treba dijalizirati. Također, potrebno je uračunati i prostor za zatvaranje membrane s donje i gornje strane, kao i prostor za dodatni ulazak vode u membranu tijekom dijalize budući da dijaliza nije jednosmjernan proces. Membrane se nakon rezanja na odgovarajuće dimenzije peru i razdvajaju s unutrašnje strane

vrućom vodom, a zatim i demineraliziranom vodom, te se s jedne strane zatvaraju čvrstim čvorom. Prethodno pripremljeni uzorci resuspendiranih precipitata hemiceluloze kvantitativno se prenose s minimalnom količinom demineralizirane vode (nekoliko mL) u pripremljene dijalizacijske membrane, koje se zatvore na drugom kraju odgovarajućim zatvaračima. Membrane s uzorkom stavljaju se u plastične laboratorijske čaše od 5 L ispunjene demineraliziranom vodom, kojoj je prethodno izmjerena vodljivost pomoću konduktometra (membrana mora u potpunosti biti uronjena u tekućinu). Uspješnost dijalize također se prati konduktometrijski, dok se ne postigne početna izmjerena vodljivost, što označava završenu dijalizu. Kako bi se dijaliza provodila odgovarajućom brzinom, izvanmembransku tekućinu (dijalizat) potrebno je izmjenjivati u određenim vremenskim intervalima (svakih nekoliko sati), kako bi se kontinuirano uspostavljao koncentracijski gradijent otopljenih tvari kao pogonska sila dijalize. U ovom slučaju, dijaliza je trajala 24 h uz izmjenu dijalizata 2 puta (ukupni utrošak demineralizirane vode 15 L).

Precipitirana hemiceluloza nije se, prilikom pripreme uzorka za dijalizu, mogla u potpunosti otopiti, što je postalo još vidljivije tijekom dijalize, kada se na dnu dijalizacijske membrane izdvojila netopljiva hemicelulozna frakcija. Zbog toga je nakon završene dijalize ukupni sadržaj membrana kvantitativno prenesen u Falcon epruvete te su se dvije dobivene frakcije, topljiva i netopljiva, odvojile centrifugiranjem (8000 o/min, 10 minuta, 25 °C). Talog je nakon centrifugiranja ispiran malom količinom demineralizirane vode, a združeni supernatant kvantitativno je prenesen u Petrijeve zdjelice, koje su pokrivene izbušenim poklopcima te smrznute na -80 °C. Smrznuti uzorci sušeni su liofilizacijom tijekom najmanje 36 h. Ovako dobiveni uzorak predstavlja topljivu hemiceluloznu frakciju.

Talog netopljive hemiceluloze u Falcon epruvetama (nakon odvajanja topljive frakcije centrifugiranjem) suši se izmjenom otapala, ispiranjem 2 puta s 10 mL etanola i 1 put s 10 mL acetona (dobro resuspendirati i odvojiti otapalo centrifugiranjem između svakog ispiranja). Nakon ispiranja acetonom, epruvete se prekriju staničevinom i ostave u digestoru dok sav aceton ne ishlapi. Osušena netopljiva frakcija hemiceluloze dodatno je usitnjena u kugličnom mlinu.

Izračun rezultata:

Prinosi svih polisaharidnih frakcija dobiveni su preciznim mjerenjem masa osušenih uzoraka. Zbog toga je potrebno raditi kvantitativno tijekom cijelog postupka ekstrakcije, dijalize i sušenja.

Prinos hemiceluloznih frakcija (topljive i netopljive frakcije), kao i frakcije celuloznog ostatka, izračunat je s obzirom na masu suhih polisaharidnih frakcija te početnu masu uzorka (3).

$$\text{prinos frakcije (\%)} = m_7 / m_{\text{ekv2}} * 100 \quad (3)$$

$$m_{\text{ekv2}} = m_8 / (1 - (\% \text{ ekstraktibilnih tvari} + \% \text{ pektina} + \% \text{ gubitka m delignif.})/100) * 100 \quad (4)$$

Pri čemu je:

m_7 - masa suhe polisaharidne frakcije (g)

m_8 - masa holoceluloze (g)

Ekstrakcija hemiceluloze provedena je u duplikatu, a rezultati prinosa pojedinih frakcija izraženi su kao % originalnog uzorka. Prinosi topljivih i netopljivih hemiceluloznih frakcija prikazani su i kao relativni prinosi u odnosu na ukupno ekstrahiranu hemicelulozu.

Provedenim postupkom izdvajanja hemiceluloze iz mahune graška, dobiveni su uzorci navedeni u Tablici 2.

Tablica 2. Oznake provedenih eksperimenata te izdvojenih polisaharidnih frakcija prilikom izdvajanja hemiceluloze iz mahune graška

Oznaka eksperimenta	Delignifikacija*	Koncentracija KOH (M)	Vrijeme alkalne ekstrakcije (h)	Izdvojene frakcije**
D-, 2M, 2h	-	2	2	T.H., N.H., C
D-, 2M, 4h	-	2	4	T.H., N.H., C
D-, 4M, 2h	-	4	2	T.H., N.H., C
D-, 4M, 4h	-	4	4	T.H., N.H., C
D1h, 2M, 2h	1 h	2	2	T.H., N.H., C
D1h, 2M, 4h	1 h	2	4	T.H., N.H., C
D1h, 4M, 2h	1 h	4	2	T.H., N.H., C
D1h, 4M, 4h	1 h	4	4	T.H., N.H., C
D2h, 2M, 2h	2 h	2	2	T.H., N.H., C
D2h, 2M, 4h	2 h	2	4	T.H., N.H., C
D2h, 4M, 2h	2 h	4	2	T.H., N.H., C
D2h, 4M, 4h	2 h	4	4	T.H., N.H., C

*prema uvjetima prikazanim u Tablici 1

** T.H. – topljiva hemiceluloza, N.H. – netopljiva hemiceluloza, C – celulozna frakcija

3.2.6. Analiza monosaharidnog profila polisaharidnih uzoraka

Monosaharidni sastav određen je u uzorcima netopljivih i topljivih hemiceluloza te celuloznog ostatka za provedene eksperimente optimizacije izdvajanja hemiceluloze promjenom različitih uvjeta delignifikacije i ekstrakcije lužinom. Monosaharidni profil određen je i u etanolom ekstrahiranom uzorku mahune graška.

3.2.6.1. *Potpuna kiselinska hidroliza*

Postupak potpune kiselinske hidrolize prilagođen je internom protokolu Francuskog nacionalnog inštituta za istraživanja u poljoprivredi (INRA, Centar Angers-Nantes), koji je pripremljen prema radu Englysta i Cummingsa (1988).

Opis postupka:

A) Hidroliza netopljivih polisaharida (s predhidrolizom)

U staklene epruvete pažljivo se odvažuje 10 ± 1 mg (odvaga pročišćenih frakcija, tj. svih uzoraka dobivenih iz delignificirane sirovine), odnosno 25 ± 2 mg (odvaga za netopljive kompleksne uzorke, tj. celulozne ostatke nedelignificirane sirovine te etanolom ekstrahirani originalni uzorak) polisaharidnog uzorka, pazeći da uzorak ne ostaje po stijenkama epruvete. Zatim se pažljivo dodaje 250 μ L 72 %-tne v/v (13 M) sumporne kiseline (također pazeći da kiselina ne ostaje po stijenci epruvete) te se uzorak inkubira na sobnoj temperaturi tijekom 30 min, uz polagano miješanje staklenim štapićem, kojim se osigurava potpuni kontakt uzorka i jake kiseline. Svrha ovog postupka, koji se još naziva predhidrolizom, narušavanje je visoko uređene strukture netopljivih polisaharida te njihova solvatacija. Nakon završene predhidrolize, kiselina se razrjeđuje dodatkom 2,25 mL demineralizirane vode te 0,5 mL pripremljenog internog standarda riboze, koncentracije 2,4 mg/mL. Uzorci se vorteksiraju (tek onda se izvade stakleni štapići), začepi i stave u uljnu kupelj zagrijanu na 100 °C. Hidroliza na povišenoj temperaturi, nakon predhidrolize, provodi se tijekom 2h.

B) Hidroliza topljivih polisaharida (bez predhidrolize)

Kao i kod netopljivih uzoraka, topljivi polisaharidi pažljivo se odvažuju u staklene epruvete (10 ± 1 mg), doda se 1,3 mL demineralizirane vode te se uzorci otople laganim protresanjem epruvete (paziti da miješanje nije prejako, kako se uzorak ne bi zalijepio za stijenke epruvete). Zatim se dodaje 1,2 mL 2,5 M sumporne kiseline i 0,5 mL otopine

internog standarda riboze, koncentracije 2,4 mg/mL. Uzorci se ručno promiješaju laganim protresanjem epruveta ili rotacijom na najmanjoj brzini na vorteksu i stave se u uljnu kupelj zagrijanu na 100 °C, gdje se provodi hidroliza tijekom 2 h. Iznimku čine uzorci topljivog polisaharida pektina, za kojeg je hidrolizu potrebno provoditi 6 h, kako bi došlo do potpune hidrolize ramnogalakturonana, te 2 h zbog očuvanja prinosa arabinana.

I u slučaju topljivih i netopljivih polisaharida, početni uvjeti prije hidrolize na visokoj temperaturi trebali bi biti jednaki, odnosno, jednaka koncentracija kiseline u reakcijskoj smjesi (1 M) te jednaka koncentracija internog standarda (400 µg/mL).

Zajedno s uzrocima hidrolizira se i smjesa standarada, kako bi se uračunali eventualni gubici monosaharida utjecajem visoke temperature i kiselog medija. Uzorak standarada za hidrolizu priprema se u staklenoj epruveti pipetiranjem 0,5 mL otopine standarada koncentracije približno 1 mg/mL za svaki standard; zatim se dodaje 0,4 mL 2,5 M sumporne kiseline i 0,1 mL demineralizirane vode. Pripremljeni uzorak homogenizira se laganom rotacijom na vorteksu i stavi se u uljnu kupelj zagrijanu na 100 °C, tijekom cijelog predviđenog trajanja hidrolize.

C) Neutralizacija kiselih hidrolizata

Nakon završene hidrolize, uzorci u epruvetama ohlade se u hladnoj vodenoj kupelji (ili smjesi vode i leda), homogeniziraju se vorteksiranjem te centrifugiraju, kako bi se istaložile nehidrolizirane komponente. Za neutralizaciju se uzima 1 mL bistrog supernatanta u Eppendorf epruvete (2 mL), a ostatak kiselog hidrolizata može se čuvati na -20 °C. Neutralizacija se provodi dodatkom praškastog kalcijevog karbonata, čija količina se izračuna iz stehiometrije reakcije neutralizacije (za alikvot 1 mL i koncentraciju kiseline približno 1 M, količina CaCO₃ iznosi 0,110 g, odnosno dodaje se približno 0,13 g CaCO₃). Dodavanjem CaCO₃ dolazi do stvaranja teško topive soli kalcijevog sulfata (CaSO₄), zbog kojeg smjesa poprima bijelu boju i viskoznu teksturu. Također, dolazi do oslobađanja ugljikovog dioksida (CO₂), zbog čega se uzorak pjenu, stoga je CaCO₃ stoga potrebno dodavati postupno. Nakon što se doda predviđena količina CaCO₃, uzorak se centrifugira, a supernatantu se mjeri pH koji po završetku neutralizacije iznosi 6-7 (provjerava se pH indikatorskim trakicama). Ostatak neutralnog hidrolizata izdvaja se i čuva na -20 °C za potrebe daljnjih analiza.

Hidroliza svih uzoraka provedena je u duplikatu.

3.2.6.2. *Derivatizacija monosaharida 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on (PMP) reagensom*

Derivatizacija monosaharida dobivenih potpunom kiselinskom hidrolizom, kao i standarada, provedena je prema postupku Sun-a i suradnika (2014), uz manje modifikacije.

Opis postupka:

U Eppendorf epruvete od 2 mL pipetira se 50 μ L neutraliziranog hidrolizata (ili otopine standarda) te se doda 50 μ L 0,6 M otopine natrijevog hidroksida (NaOH) i dobro se izmiješa na vorteksu. Odmah zatim doda se 100 μ L PMP reagensa (0,5 M metanolna otopina), smjesa se ponovno dobro homogenizira na vorteksu, a epruveta se uroni u vodenu kupelj zagrijanu na 70 °C (epruvete je potrebno dobro začepiti, a čepove po potrebi dodatno osigurati). Derivatizacija se provodi tijekom 60 minuta pri navedenoj temperaturi (dozvoljeno odstupanje temperature je najviše 2°C), uz ponovno vorteksiranje derivatizacijske smjese nakon 1/3 i 2/3 reakcijskog vremena. Po završetku reakcije epruvete s uzorcima hlade se u hladnoj vodenoj kupelji, a reakcijska smjesa neutralizira se dodatkom 100 μ L 0,3 M otopine klorovodične kiseline (HCl) i dobro se izmiješa pomoću vorteksa. Smjesa se nadopuni demineraliziranom vodom do ukupnog volumena od 1 mL (dodati 700 μ L demineralizirane vode), a. zatim se provjeri pH dobivene otopine, koji treba biti u blago kiselom do neutralnom području (pH 4-6).

Suvišak PMP reagensa uklanja se uzastopnim (ukupno 3) ekstrakcijama s klorformom, koji se dodaje u omjeru 1:1 (v:v). Svaka ekstrakcija provodi se uz intenzivno miješanje na vorteksu tijekom najmanje 30 sekundi te potom kratkim centrifugiranjem pomoću stolne mini centrifuge, kako bi se uspješnije razdvojili vodeni i organski sloj. Pomoću automatske pipete pažljivo se izdvaja gornji vodeni sloj, u kojem se nalaze derivati monosaharida te se prenosi u novu epruvetu, u kojoj se postupak ponavlja do maksimalnog iscrpljenja suvišnog PMP reagensa (ukupno 3 puta). Gornji vodeni sloj nakon trostruke ekstrakcije kloroformom koristi se za analizu primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.

3.2.6.3. *Analiza PMP derivata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)*

HPLC analiza PMP derivata monosaharida provedena je prema metodi razvijenoj u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Opis postupka:

Derivatizirani uzorci se prije HPLC analize profiliraju kroz mikrofiltere od regenerirane celuloze veličine pora 0,2 µm u odgovarajuće viala. Analiza je provedena gradijentnom eluacijom na C18 koloni (Zorbax Extend 4,6 x 250 mm, 5 µm) kombinacijom dviju mobilne faze - 100 mM natrij-fosfatni pufer pH 8,0 (otapalo A), i acetonitril (AcN) (otapalo B). Elucija je provedena prema sljedećem gradijentu: 0 min - 12% B; 35 min 17% B; 36 min - 20% B; 45 min - 20% B; 46 min - 12% B; 65 min - 12% B, uz protok 1 mL/min i temperaturu kolone 25 °C. Detekcija PMP derivata monosaharida omogućena je primjenom PDA detektora, snimanjem signala na 245 nm. Dobiveni kromatogrami obrađeni su pomoću programa ChemStation (Agilent Technologies). Redoslijed elucije PMP-derivata određen je usporedbom retencijskih vremena pikova u uzorku s pikovima na kromatogramu smjese standarada.

Izračun rezultata:

Kvantifikacija identificiranih pikova omogućena je primjenom internog standarda (riboze), koji je u svaki uzorak dodan u istoj koncentraciji (400 µg/mL). Prvo se obradom kromatograma standarada (standardi poznate koncentracije, među kojima se nalazi i interni standard, a koji su podvrgnuti hidrolizi zajedno s uzorcima) izračunaju faktori odziva (*Response Factors* - RF) svakog monosaharida u odnosu na interni standard, prema izrazu (5).

$$RF = (A_{IS} * c_x) / (A_x * c_{IS}) \quad (5)$$

Pri čemu je:

A_{IS} - površina pika internog standarda

c_{IS} - koncentracija internog standarda

A_x - površina pika analita (standarda)

c_x - koncentracija analita (standarda)

Jednom kad se uspostave faktori odziva, ista formula primjenjuje se i za obradu kromatograma uzoraka, pri čemu su poznate površine pikova internog standarda i analita (očitaju se iz izvješća analize), koncentracija (masa) internog standarda te faktor odziva za pojedini analit, a traži se koncentracija (masa) analita.

Dobivene mase pojedinog monosaharida množe se s faktorima polimerizacije (0,9 za heksoze; 0,88 za pentoze; 0,907 za uronske kiseline i 0,89 za deoksi šećere), a udjeli odgovarajućih homopolimernih oblika (%) pojedinih monomera u uzorku izračunavaju se s obzirom na odvagu uzorka prije hidrolize.

Rezultati monosaharidnog sastava polisaharidnih uzoraka prikazani su kao srednje vrijednosti udjela (%) u odgovarajućoj frakciji.

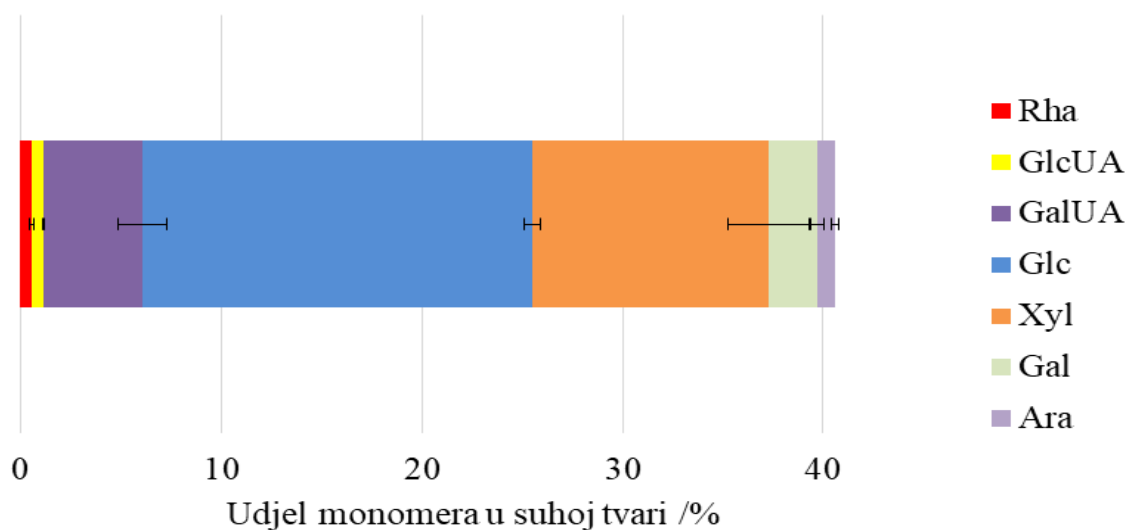
Također, uspostavljene su bilance (% iskorištenja) najzastupljenijih monosaharida usporedbom inicijalnog udjela odgovarajućeg monosaharida te udjela istog u izdvojenim polisaharidnim frakcijama (topljiva i netopljiva hemiceluloza te celulozni ostatak) i prinosima odgovarajućih frakcija.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Sekundarna biljna sirovina analizirana u ovome radu nastaje kao otpad nakon čišćenja, tj. izdvajanja zelenih bobica graška iz mahune. Mahuna graška može se svrstati u kategoriju agroindustrijskog otpada, potencijalno vrijedne sekundarne sirovine, čiji značaj danas, s razvojem koncepta održive proizvodnje i prerade hrane, sve više raste. Glavna prednost takvih sirovina je njihova dostupnost u velikoj količini, relativno niska cijena te su obnovljive prirode. U kemijskom sastavu ističu se različite komponente, ovisno o vrsti agroindustrijskog otpada, međutim, zajednička karakteristika im je dominantnost pojedinih ugljikohidrata, gradivnih komponenata staničnih stijenki biljnih sirovina. Interes za polisaharide staničnih stijenki proizlazi iz njihovog potencijala za konverziju u različite biotehnoške proizvode, a u domeni prehrambene tehnologije zbog potencijalno funkcionalnih svojstava (posebice oligosaharida).

Prema dostupnim literaturnim podacima, mahuna graška ne obiluje sekundarnim biljnim metabolitima poput polifenola, stoga je u svrhu određivanja potencijala upotrebe ovog sekundarnog biljnog materijala istražena njegova ugljikohidratna frakcija. Određivanjem monomernog sastava originalne sirovine, dobiven je uvid u dominantne komponente, a time i ciljane polisaharide za izdvajanje, a zatim je definiran postupak izdvajanja hemiceluloze u nekoliko koraka, pri čemu je posebno istražen utjecaj delignifikacije na ekstraktibilnost ove polisaharidne frakcije, kao i utjecaj koncentracije lužine i trajanja alkalne ekstrakcije. Primijenjenim postupkom izdvojene su 3 polisaharidne frakcije - topljiva hemiceluloza, netopljiva hemiceluloza te celulozni ostatak, za svaki promjenjivi parametar postupka izdvajanja. Polisaharidne frakcije analizirane su primjenom HPLC-PDA metode uz prethodnu PMP derivatizaciju, čime je određen monomerni sastav svake od njih. Određivanje monomernog (monosaharidnog) sastava osnovni je korak u identifikaciji i karakterizaciji polisaharida biljne stanične stijenke. Razvijenom metodom je moguće kvantitativno odrediti 7 neutralnih šećera (glukoza, manoz, galaktoza, arabinoza, ksiloza, ramnoza i fukoza) te 2 uronske kiseline (galakturonska i glukuronska kiselina), uz primjenu riboze kao internog standarda. Pritom, dobiveni rezultati ukazuju na ukupni udjel nekog monomera u uzorku, dok metodom nije moguće odrediti kako su identificirani monosaharidi raspoređeni u različitim polisaharidima. Kombinacijom prinosa pojedinih frakcija i monomernog sastava istih, uspostavljene su bilance dominantnih monomernih komponenata (prethodno određenih za originalnu sirovinu), kao pokazatelj uspješnosti postupka izdvajanja, s obzirom na istraživane promjenjive parametre.

Monomerni sastav suhe tvari mahune graška prikazan je na Slici 4. Analiza je provedena na alkoholno netopljivom ostatku (preračunata na suhu tvar originalnog uzorka), kako nativno prisutni jednostavni šećeri ne bi interferirali prilikom interpretacije rezultata, odnosno kako ne bi došlo do prividnog povećanja udjela pojedinih monomera, koji su sastavni dio polisaharidnog matriksa stanične stijenke ispitivane sirovine. Ukupno je identificirano 7 monosaharida, od čega 5 neutralnih šećera (manoza, ramnoza, glukoza, ksiloza, arabinoza) te 2 uronske kiseline (glukuronska i galakturonska kiselina).



Slika 4. Monomerni sastav originalnog uzorka mahune graška (Rha - ramnoza, GlcUA - glukuronska kiselina, GalUA - galakturonska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinoza)

Iz rezultata na Slici 4. vidljivo je da približno 41 % suhe tvari sirovine čini ugljikohidratni dio strukturnih polisaharida, u čijem sastavu dominiraju ksiloza i glukoza, odnosno ukupni glukani i ukupni ksilani. Udjel ukupnog glukana u mahuni graška iznosi 19,4 % (odnosno, gotovo polovinu udjela polisaharidne suhe tvari), dok je udjel ksilana 11,7 % (odnosno, približno četvrtinu udjela polisaharidne suhe tvari). Navedene komponente predstavljaju glavninu iskoristivog ugljikohidratnog dijela mahune graška, pri čemu se ukupno prisutna glukoza može pripisati prisutnosti celuloze (u manjoj mjeri) te prisutnosti hemiceluloznih polimera koji sadrže glukozu, poput ksiloglukana, dok se ukupna ksiloza može pripisati prisutstvu značajnog udjela hemiceluloznih polisaharida ksilanskog tipa. Iz monomernog sastava može se zaključiti i o prisutnosti pektina, i to prema udjelima

galakturonske kiseline, ramnoze, galaktoze i arabinoze, kao najzastupljenijih komponenata tog polimera (McCready i Gee, 1960).

S obzirom na značajnu prisutnost hemiceluloze, u čijem sastavu pretpostavljeno dominira ksiloza, sirovina mahune graška kategorizirana je kao ksilanom bogata sirovina, koja može poslužiti kao dobar izvor za njegovu ekstrakciju i daljnje biokonverzije u različite produkte dodane vrijednosti. U tom kontekstu su za prehrambenu industriju posebno važni ksilooligosaharidi, kao funkcionalni dodaci inovativnih prehrambenih proizvoda, zbog potencijalnih prebiotičkih učinaka.

Optimizacija izdvajanja te naknadna karakterizacija hemiceluloze iz mahune graška provedena je kako bi se odredili najbolji uvjeti koji pogoduju maksimalnom iskorištenju ukupnog ksilana iz sirovine.

Izdvajanje hemiceluloze započelo je ispiranjem biljnog materijala u 70 %-tnom etanolu, nakon kojeg su uslijedile depektinizacija i delignifikacija. Svrha ovih ekstrakcijskih koraka je povećanje ekstraktibilnosti hemiceluloze, odnosno dobivanje što čišće frakcije hemiceluloze. Gubitak suhe tvari tijekom ekstrakcijskih koraka koji prethode alkalnoj ekstrakciji prikazan je u Tablici 3.

Tablica 3. Gubitak suhe tvari tijekom pripreme uzorka za alkalnu ekstrakciju

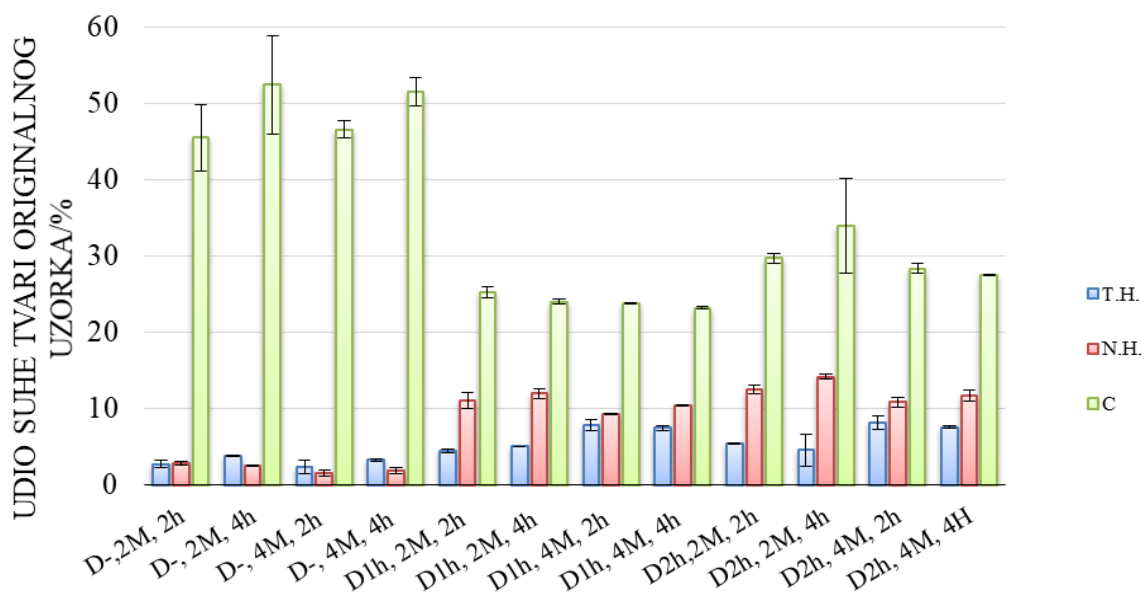
TIP EKSTRAKCIJE	GUBITAK SUHE TVARI* (%)	
EKSTRAKCIJA 70 % ETANOLOM	29,40	
DEPEKTINIZACIJA	6,88	
DELIGNIFIKACIJA	1h	2h
	1,72	10,39
UKUPNI GUBITAK MASE PRIJE ALKALNE EKSTRAKCIJE	D1h 38,00	D2h 46,67

*izražene kao % suhe tvari originalnog uzorka

Ekstrakcijom 70 %-tnim etanolom izdvojeno je približno 30 % suhe tvari sirovine, koju su činile hidrofilne komponente male molekulske mase, poput jednostavnih topljivih šećera, pigmenata, mineralnih tvari, topljivih proteina, sekundarnih biljnih metabolita i sl. Ekstrakcijom razrijeđenom kiselinom pri povišenoj temperaturi konvencionalno se izdvaja

pektin (topljivi polisaharid) iz biljnih sirovina. U ovome radu je, u postupku depektinizacije, izdvojeno približno 7 % suhe tvari sirovine, što ujedno predstavlja i približni udjel pektina u originalnoj sirovini. Naime, udjel ukupnog pektina u početnoj sirovini može se procijeniti iz udjela ukupne galakturonske kiseline, kao najzastupljenije komponente pektinske molekule, te iz udjela ukupne ramnoze, arabinoze i galaktoze, koji, ovisno o biljnom izvoru, mogu biti manje ili više zastupljeni u pektinskoj molekuli, ali se svakako ubrajaju u jedne od glavnih komponenata ovog heterogenog polisaharida. Prema navedenom, može se zaključiti da pektin u mahuni graška čini približno 10 % suhe tvari (Slika 4), od čega je većina izdvojena ekstrakcijom razrijeđenom kiselinom, dok je manji dio vjerojatno zaostao u obliku rezidualnog pektina. S obzirom da su polisahardi stanične stijenke međusobno povezani složenim interakcijama, nije ih uvijek jednostavno selektivno i u potpunosti izdvojiti u jednom koraku, stoga je prisutnost rezidualnog pektina očekivana. Ipak, prethodno izdvajanje većine pektina omogućuje izdvajanje čišće hemicelulozne frakcije.

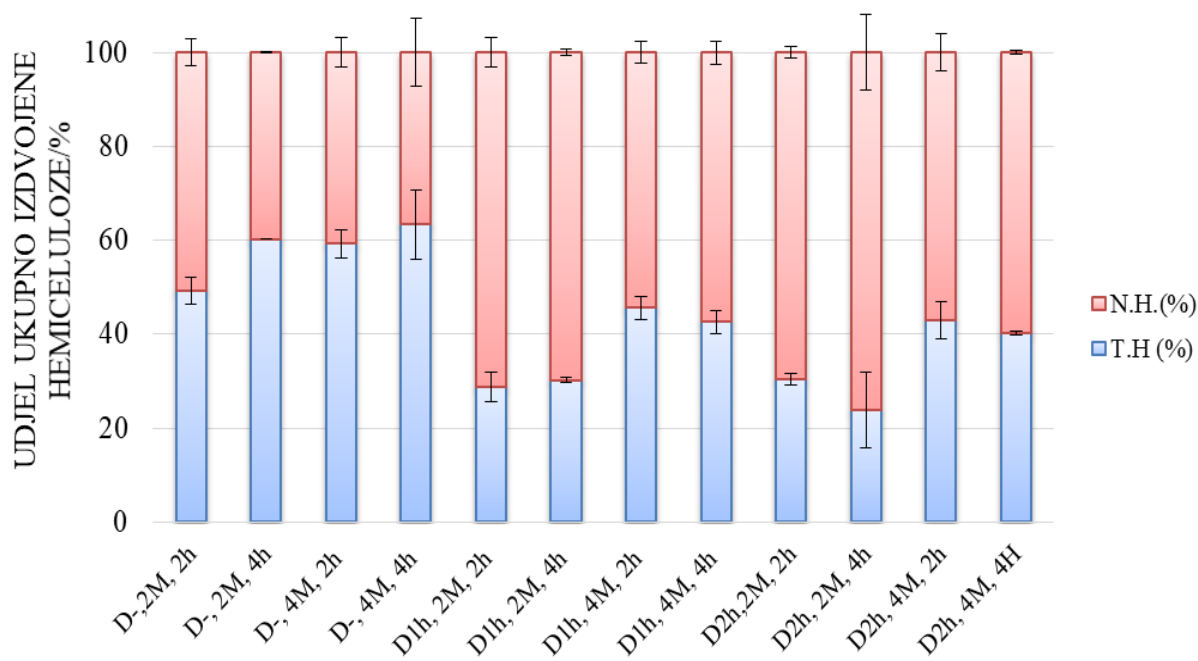
Proces delignifikacije koji je vremenski trajao duže (2h) izdvojio je puno više lignina, nego kraći proces delignifikacije (1h), što je očekivano. Konačno, sam gubitak mase veći je (odnosno, veći je udjel suhe tvari koja se izdvojila iz originalnog uzorka mahune graška) provođenjem delignifikacije kraćeg vremenskog trajanja. Smanjenje mase celuloze i lignina suglasju je s različitim alkalnim predobradama lignocelulozne biomase u radovima Park i Kim (2012) te Minmunin i suradnika (2015). Minimum i suradnici (2015) su na slonovskoj travi, vrsta Napier trave (*P. purpureum* x *P. americanum* hibrid), izvodili eksperimentalna istraživanja u laboratoriju za delignifikaciju. Proučavane su prethodne obrade uz pomoć ozona i ekstrakcije lužinom te se na temelju dobivenih rezultata odabrani najbolji uvjeti za predtretman za proizvodnju celuloznog intermedijara iz lignoceluloznog materijala. U radu Park i Kim (2012), razne biomase kao što su rižina slama i ječam, prethodno su obrađivane procesima natapanja u različitim alkalnim otopinama, uključujući natrijev hidroksid, kalijev hidroksid, vodeni amonijak i natrijev karbonat. Rezultati podupri su potencijal natrij karbonata kao otopinu za primjenu u predobradi drvenaste biomase.



Slika 5. Prinos izdvojenih polisaharidnih frakcija, izraženih kao udio originalnog uzorka mahune graška (N.T. - netopljiva hemiceluloza, T.H. - topljiva hemiceluloza, C - celulozna frakcija)

Na slici 5 vidljivo je da od ukupne mase originalnog uzorka sekundarne sirovine mahune graška, sa Slike 5 vidljivo je da je celulozna frakcija u najvećem udjelu prisutna je u nedelignificiranim uzorcima (oznaka uzoraka D-). Navedeni rezultati sugeriraju da se dio celulozne frakcije sastoji od lignina. Lignin, ukoliko se ne ukloni, istaloži se u celuloznoj frakciji te zbog toga ona nije čista celuloza. Kod uzoraka koji su delignificirani (oznaka uzoraka D1h i D2h), celulozna frakcija je u manjem udjelu, iako je, u usporedbi s ostalim frakcijama, i dalje dominantna. Netopljiva i topljiva hemiceluloza unutar originalnog uzorka mahune graška postale su dostupnije za ekstrakciju tijekom procesa delignifikacije (oznaka uzorka D1h i D2h), stoga se može pretpostaviti da je lignin taj koji sprječava maksimalno izdvajanje hemiceluloze. Proces delignifikacije utječe na prinos hemicelulozne i celulozne frakcije. Razlika prinosa između D1h i D2h vrlo je mala te više ovisi o analitičkoj preciznosti. Što se tiče nedelignificiranih uzoraka, relativno gledajući, oko 60-70 % njihovog sastava čine ugljikohidrati, a ostatak do 100 % čine proteini, mineralne tvari te druge neugljikohidratne komponente.

Budući da se prinos računa gravimetrijski, ne može se zaključiti da se hemiceluloza bolje ili lošije izdvojila, već bi, zbog kompleksnosti polisaharida, trebalo provesti analizu čistoće uzoraka, odnosno vidjeti znači li taj prinos ukupno bolje izdvajanje.



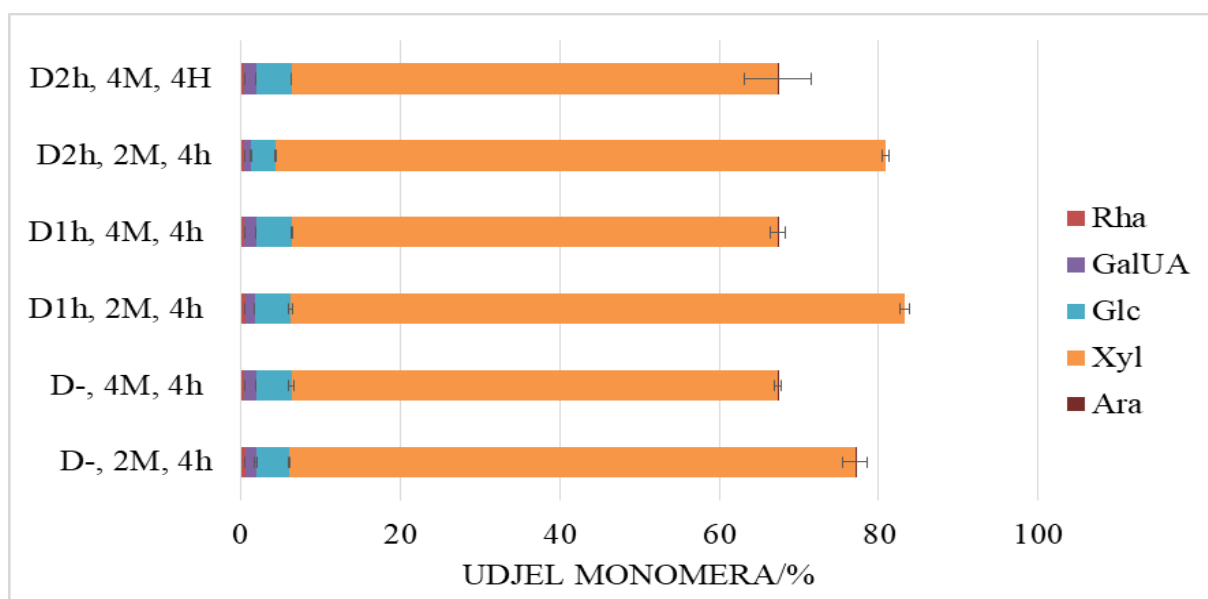
Slika 6. Relativni prinos topljive i netopljive frakcije u odnosu na ukupno izdvojenu hemicelulozu iz mahune graška

Netopljiva i topljiva hemiceluloza su se, ovisno o tipu i trajanju ekstrakcije, različito izdvojile. Na Slici 6 vidljivo da je, u uzorcima u kojima nije proveden proces delignifikacije (oznaka uzoraka D-), te je alkalna ekstrakcija trajala duže (4h), prinos topljive hemiceluloze relativno veći. Za samo 3 % više se odvojilo netopljive hemiceluloze primjenom 4M KOH, što se može povezati s analitičkom preciznošću, nego sa samim trajanjem procesa.

U uzorcima kod kojih je provedena delignifikacija (oznaka uzoraka D1h/D2h), udjel topljive hemiceluloze je manji, što sugerira da delignifikacija otežava izdvajanje topljive hemicelulozne frakcije.

Tijekom provođenja eksperimenata, dosad prikazani rezultati upućivali su na zaključak da alkalna ekstrakcija u trajanju od 4 h ima povoljniji učinak na prinos, nego alkalna ekstrakcija u trajanju od 2 h, stoga su uzorci ekstrahirani lužinom u trajanju od 4 h u nastavku istraživanja postali uzorci od interesa.

Postupcima ekstrakcije navedenima u poglavlju „Eksperimentalni dio“ izdvojene su tri polisaharidne frakcije mahune graška: topljiva hemiceluloza, netopljiva hemiceluloza i celulozna frakcija, pri čemu se monomerni sastav svake od frakcija razlikovao s obzirom na eksperimentalne uvjete (Slika 7- 9). Ovi prikazi omogućuju uvid u čiste frakcije, odnosno one frakcije s najvećim udjelom ksiloze.

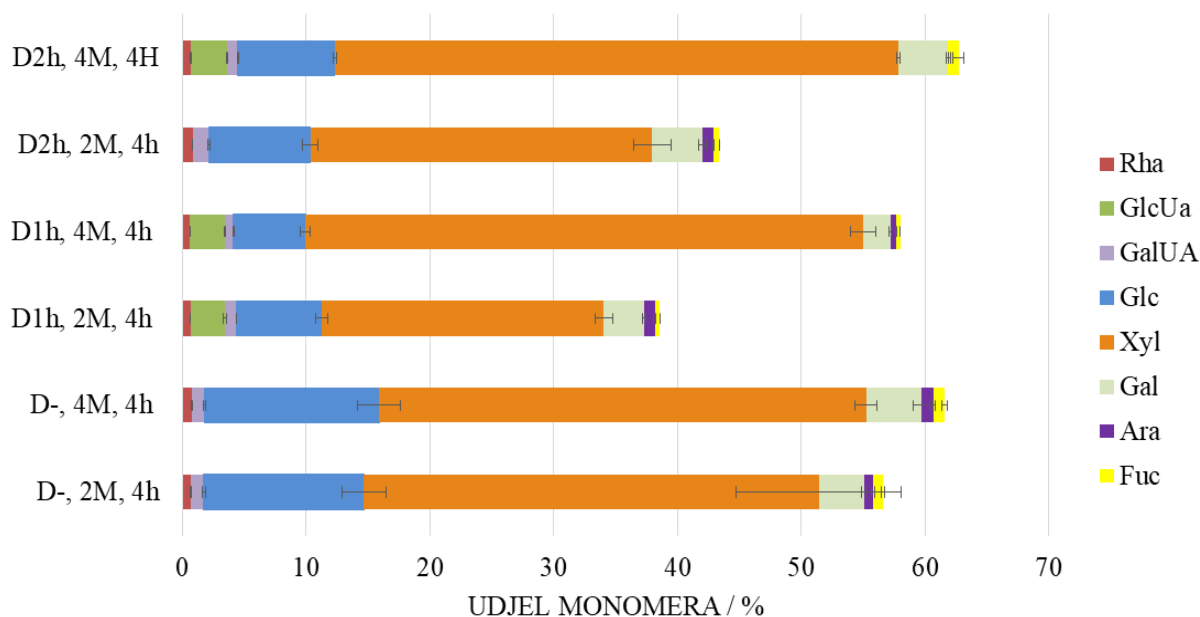


Slika 7. Monomerni sastav netopljivih hemiceluloznih frakcija, izdvojenih iz mahune graška primjenom različitih ekstrakcijskih uvjeta (Rha - ramnoza, GalUA - galakturonska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinoza)

U sastavu netopljive hemiceluloze dominira ksiloza, kao što je vidljivo na Slici 7. Veći dio ksiloze otpada na polisaharid ksilan, dok manji dio može otpasti na druge tipove polisaharida, kao što je ksiloglukan.

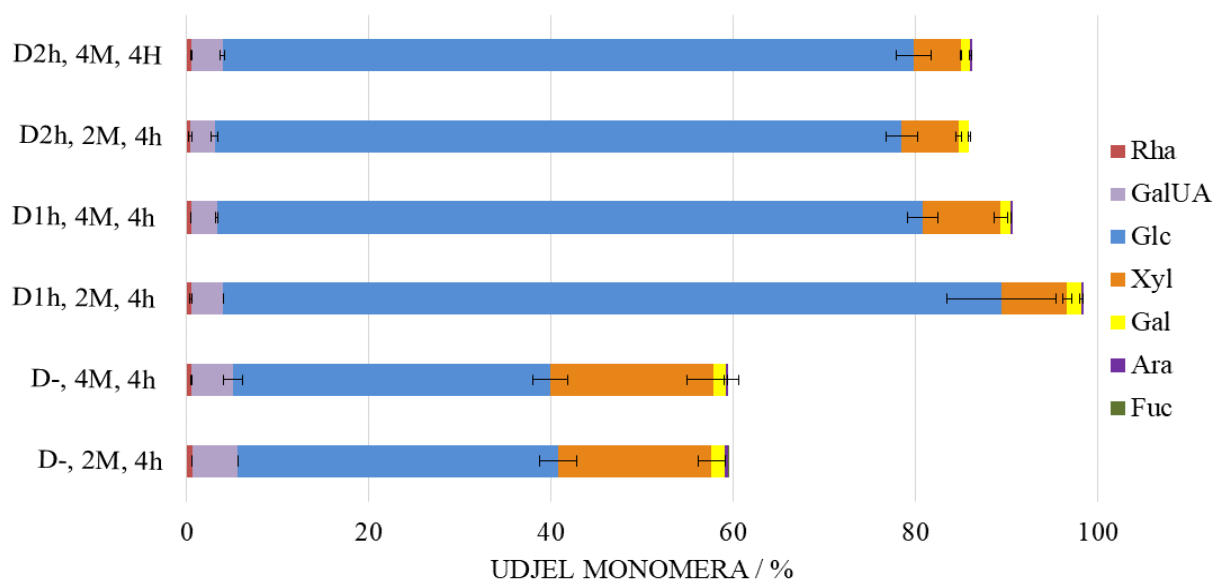
U uzorcima ekstrahiranim 2M KOH izdvojeno je više ksiloze (otprilike 10 % više), što sugerira da nije potrebna veća koncentracija KOH kako bi se izdvojio jednak udjel ksiloze. Također, prisutni su i drugi monomeri: galakturonska kiselina (GalUA), ramnoza (Rha), arabinoza (Ara) te galaktoza (Gal), koji predstavljaju četiri osnovna konstituenta pektinskih polisaharida (McCready i Gee, 1960), iz čega se može pretpostaviti da je u netopljivoj hemicelulozi prisutan i rezidualni pektin, odnosno, da otprilike 7 % pektina izdvojenog iz originalnog uzorka (Tablica 3) ne predstavlja sav izdvojeni pektin.

Udjel glukoze u netopljivoj hemicelulozi je manji nego u ostalim frakcijama, dok je u različitim eksperimentima otprilike jednak.



Slika 8. Monomerni sastav topljivih hemiceluloznih frakcija, izdvojenih iz mahune graška primjenom različitih ekstrakcijskih uvjeta (Rha - ramnoza, , GlcUA - glukuronska kiselina, GalUA - galakturonska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinoza, Fuc - fukoza)

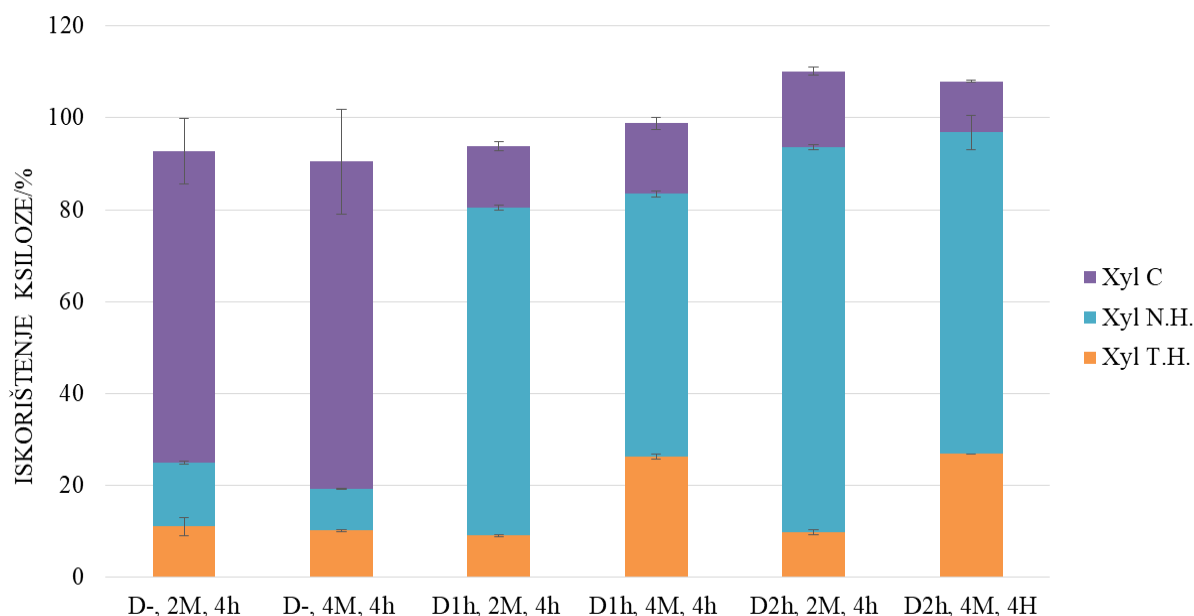
Sa Slike 8 vidljivo je da je ksiloza dominantni monomer u topljivim hemiceluloznim frakcijama svih uzoraka. Alkalnom ekstrakcijom s 4M KOH izdvojena je ksiloza u najvećem udjelu. Udjel glukoze veći je u nedelignificiranim (oznaka uzoraka D-), nego u delignificiranim uzorcima. Udjel ramnoze (Rha), galakturonske kiseline (GalUA), galaktoze (Gal) i arabinoze (Ara) veći je u frakciji topljive hemiceluloze, u odnosu na netopljivu hemicelulozu, što moguće uvjetuje topljivost hemiceluloze, budući da ti monomeri predstavljaju četiri osnovna konstituenta pektina (McCready i Gee, 1960), a pektin je topljivi polisaharid. Pretpostavlja se da su pektinski polimeri povezani s hemiceluloznim lancima i na taj način omogućuju njihovu topljivost. Moguća je prisutnost više polimera ksiloglukana u mahuni graška, zbog većeg udjela glukoze u odnosu na ksilozu.



Slika 9. Monomerni sastav celulozne frakcije, izdvojene iz mahune graška primjenom različitih ekstrakcijskih uvjeta (Rha - ramnoza, GalUA - glukuronska kiselina, Gal - galakturonska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinoza, Fuc - fukoza)

Celulozna frakcija mahune graška, bez obzira na uvjete procesa delignifikacije i alkalne ekstrakcije, sadrži visok udjel glukoze (Slika 9), što je specifično za celulozu. Osim toga, iz rezultata je vidljivo da postupak delignifikacije povećava čistoću celulozne frakcije mahune graška. Također, vidljivo je da je, u uzorcima koji nisu delignificirani (oznaka uzoraka D-), ksiloza prisutna u većem udjelu, nego u delignificiranim uzorcima. Udjel ksiloze je, relativno gledajući, u nedelignificiranim uzorcima 8-9 % veći, nego u uzorcima koji su delignificirani. Na prisutnost rezidualnog pektina upućuju i relativno visoki udjeli arabinoze (Ara), galaktoze (Gal), galakturonske kiseline (GalUA) i ramnoze (Rha).

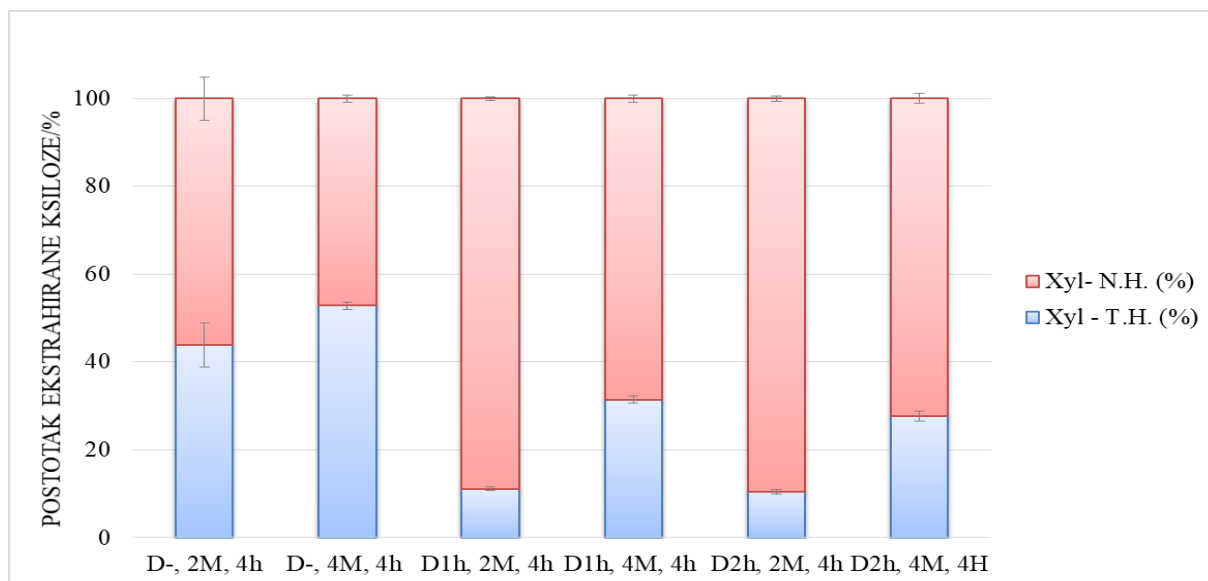
Kako bi se dobili realni pokazatelji iskorištenja ksiloze u odnosu na početni sastav originalnog uzorka mahune graška (Slika 4), izračunata je bilanca ksilana, koja je izražena kao ukupno iskorištenje ksiloze (odnosno, uspoređen je udjel ksiloze u svim odvojenim polisaharidnim frakcijama s početnim udjelom ksiloze). Na temelju bilanci moguće je definirati udjele inicijalno pristune ksiloze izdvojene tijekom svakog provedenog eksperimenta te raspodjelu i udjele ksiloze u polisaharidnim frakcijama.



Slika 10. Bilanca ksiloze za primijenjene postupke izdvajanja hemiceluloze iz mahune graška, izraženo kao % iskorištenja u odnosu na inicijalni udjel ksiloze u sirovini (xyl, T.H. - ksiloza iz frakcije topljive hemiceluloze, xyl N.H. - ksiloza iz frakcije netopljive hemiceluloze; xyl, C - ksiloza iz celulozne frakcije)

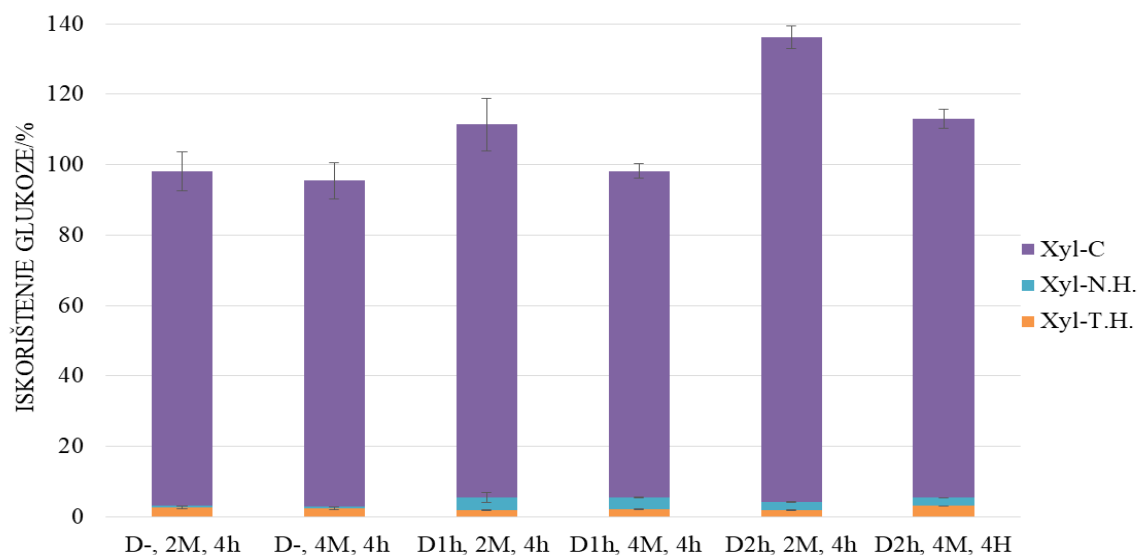
Bilanca ksiloze (Slika 10) predstavlja iskorištenje ksilana kroz tri odvojene polisaharidne frakcije. U uzorcima koji nisu delignificirani, maksimalno 25 % ukupno prisutne ksiloze izdvojeno je u hemiceluloznoj frakciji, dok je većina ksiloze zaostala u celuloznoj frakciji u obliku rezidualne ksiloze. Provedbom postupka delignifikacije, odnos se promijenio, te je vidljivo da je većina ksiloze prisutna u topljivoj i netopljivoj hemiceluloznoj frakciji. Sa Slike 10 vidljivo je da gotovo 15 % ksiloze (Xyl C) nije moguće izdvojiti u hemiceluloznoj frakciji pomoću primijenjenih uvjeta, već ona zaostaje u celuloznoj frakciji mahune graška. Prinosi iznad 100 % predstavljaju analitičku pogrešku.

Usporedbom Slike 6 i Slike 10, odnosno usporedbom prinosa frakcija i prinosa čiste ksiloze, vidljivo je da njihovi omjeri nisu isti. Npr., za uzorak D2h 4M-4h, odnos topljive/netopljive frakcije bio je 40/60 %, no, s obzirom na čistoću, realan omjer bliži je odnosu 30/70 % čiste ksiloze, iz čega se može zaključiti da, iako prinos frakcija ide u korist topljive hemiceluloze, koja se lakše izdvaja navedenim procesima, njezina čistoća nije dobra, jer se većina ksiloze, kao što je vidljivo prema prikazu na Slici 7, nakon procesa delignifikacije nalazi u netopljivoj hemicelulozi.



Slika 11. Relativno iskorištenje ekstraktibilne ksiloze za primijenjene postupke izdvajanja hemiceluloze iz mahune graška (Xyl-T.H. - ksiloza iz frakcije topljive hemiceluloze, Xyl-N.H. - ksiloza iz frakcije netopljive hemiceluloze)

Relativno iskorištenje ekstraktibilne ksiloze predstavlja omjer ukupno izdvojenog ksilana u topljivoj i netopljivoj hemiceluloznoj frakciji. Prema rezultatima na Slici 11 vidljivo je da je ksiloza većinom prisutna u netopljivoj frakciji hemiceluloze. Takvi rezultati sugeriraju da je čistoća netopljive hemicelulozne frakcije veća od čistoće topljive frakcije te bi se u procesu izdvajanja hemiceluloze trebalo orijentirati na izdvajanje netopljive frakcije.



Slika 12. Bilanca glukoze za primijenjene postupke izdvajanja hemiceluloze iz mahune graška, izražena kao % iskorištenja u odnosu na inicijalni udjel glukoze u sirovini (Xyl-T.H. - ksiloza iz frakcije topljive hemiceluloze, Xyl-N.H. - ksiloza iz frakcije netopljive hemiceluloze; Xyl-C - ksiloza iz celulozne frakcije)

Sa Slike 12 vidljivo je da je glukoza većinom prisutna u celuloznoj frakciji, što je očekivano, budući da navedeni monosaharid predstavlja glavnu komponentu monomernog sastava celuloze (Sharma, 2015). Glukoza je fermentabilna te postoji mogućnost njenog iskorištenja u procesu proizvodnje bioetanola. Također, prinosi iznad 100 % predstavljaju analitičku pogrešku, jer nije moguće dobiti više glukoze nego što je prisutno u originalnom uzorku.

Na temelju navedenih rezultata može se ustanoviti da ni vrijeme (2h i 4h) ni molalnost lužine u procesu alkalne ekstrakcije nije imalo veliki utjecaj na bilancu ksiloze (što je vidljivo s prikaza na Slici 10) te nema utjecaj na ukupno iskorištenje ksiloze, no imalo je utjecaj na raspodjelu ksiloze unutar topljive i netopljive frakcije (Slika 11). Ovisno u kojoj frakciji se želi izdvojiti više ksiloze, koristiti će se određena koncentracija lužine (KOH). Primjenom jače lužine, odnosno kalijevog hidroksida (KOH) veće molalnosti, izdvaja se manje netopljive hemiceluloze u odnosu na topljivu hemicelulozu. Može se reći da je bolje izdvojiti netopljivu hemicelulozu, jer je po monomernom sastavu čišća nego topljiva hemiceluloza (Slika 7).

Od 100 % inicijalno prisutne ksiloze u originalnom uzorku, u topljivoj i netopljivoj hemiceluloznoj frakciji nakon niza ekstrakcija, iskorištenje ksiloze je u većini uzoraka oko 100 % (Slika 10), što znači da nema značajne degradacije ksilana tijekom ekstrakcijskog postupka i da je izdvojen u 100%-tnom obliku te je veliki utjecaj na to imala delignifikacija koja je povećala ekstraktibilnost hemiceluloze.

Mahuna graška je vrijedna sirovina ksilanskog tipa te ksilanska hemiceluloza uglavnom otpada na homopolimerni ksilan, koji se uglavnom odvaja u netopljivoj hemicelulozi.

5. ZAKLJUČCI

1. Razvijenim postupkom izdvojene su 3 polisaharidne frakcije - topljiva hemiceluloza, netopljiva hemiceluloza te celulozni ostatak.
2. Monomerni sastav mahune graška te svih izdvojenih polisaharidnih frakcija određen je primjenom HPLC-PDA metode uz prethodnu PMP derivatizaciju, gdje je ukupno identificirano 7 monosaharida, od čega 5 neutralnih šećera (manoza, ramnoza, glukoza, ksiloza, arabinoza) te 2 uronske kiseline (glukuronska i galakturonska kiselina).
3. Udjel ukupnog glukana u mahuni graška iznosi 19,4 % (odnosno, gotovo polovinu polisaharidne suhe tvari), dok je udjel ksilana 11,7 % (odnosno, približno četvrtinu polisaharidne suhe tvari). Navedene komponente predstavljaju glavnu iskoristivog ugljikohidratnog dijela mahune graška.
4. Depektinizacijom je iz mahune graška izdvojeno približno 7 % pektina (izraženo na ukupnu suhu tvar sirovine), što ujedno predstavlja i približan udjel pektina u originalnoj sirovini.
5. Proces delignifikacije koji je vremenski trajao duže (2h) izdvojio je puno više lignina, nego kraća delignifikacija (1h).
6. Delignifikacija je povećala ekstraktibilnost hemiceluloze.
7. Promjena koncentracije KOH (2M i 4M) i vremena trajanja alkalne ekstrakcije (2h i 4h) nije imala veliki utjecaj na ekstrakciju ksilana. Nema značajne degradacije ksilana tijekom ekstrakcijskog postupka.

6. LITERATURA

Ahlgren, P.A., Goring, D.A.I. (1971) Removal of wood components during chlorite delignification of black spruce. *Can. J. Chem.* **49**, 1272-1275.

Akramiene, D., Kondrotas, A., Didziapetriene, J., Kevelaitis, E. (2007) Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina* **43**, 597-606.

Anderson, J.W., Bridges, S.R. (1993) Hypocholesterolemic effects of oat bran in humans. U: Oat bran (Wood, P.J., ured.), MN: AAOC, Paul, str. 139-157.

Anonymous 1 Hemiceluloza

<<https://bs.wikipedia.org/wiki/Hemiceluloza#/media/File:Hemicellulose.png>>

Pristupljeno 16. lipnja 2017.

Anonymous 2 Pea Pod

<<https://kikkerland.com/products/peapod-pill-case>>

Pristupljeno 16. lipnja 2017.

Aspinall, O.G. (1983) The polysaccharides, 2. izd., Academic Press Inc., New York.

Barbosa, A.M., Dekker, R.F.H., Giese, E.C. (2010) Bioactive oligosaccharides: production, biological functions and potential commercial applications. Nova Science Publishers Inc, Hauppauge, NY, USA.

Brett, T., Waldron, K. W. (1996) Physiology and biochemistry of plant cell walls, 2. izd., Chapman & Hall, London, str. 42-43.

Breunig, M., Gebhart, P., Hornung, U., Kruse, A., Dinjus, E. (2016) Direct liquefaction of lignin and lignin rich biomasses by heterogenic catalytic hydrogenolysis. *Biomass Bioenerg (u tisku)*, 1-9.

Caffall, K.H., Mohnen, D. (2009) The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* **344**, 1879-1900.

Cantu-Jungles, T.M., Iacomini, M., Cipriani, T.R., Cordeiro, M.C. (2016) Isolation and characterizaion of xylan with industrial and biomedical applications from edible açai berries (*Euterpe oleraceae*). *Food Chem. (u tisku)*

Carpita, N.C., Gibeaut, D.M. (1993) Structural models of primary-cell walls in flowering plants: consistency of molecular-structure with the physical-properties of the walls during growth. *Plant J.* **3**, 1-30.

Chabannes, M., Ruel, K., Yoshiaga, A., Chabbert, B., Jauneau, A., Joseleau, J.P., Boudet, A.M. (2001), In situ analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels. *Plant J.* **28** (3), 271-282.

- Chen, H. (2014) *Biotechnology of lignocellulose, Theory and practice*, Chemical Industry Press i Springer Science+Business Media, London, str. 25-72.
- Chung, Y., Hsu, C., Ko, C., Chan, Y. (2007) Dietary intake of xylooligosaccharides improves the intestinal microbiota, fecal moisture, and pH value in the elderly. *Nutr.Res.* **27**, 756-61.
- Corradini, C. (2000) Liquid Chromatography. U: *Encyclopedia of Separation Science* (Adlard, E.R., Cooke, M., Poole, C.F., Wilson, I.D., ured.) Academic Press, San Diego, str. 2224-2235.
- Cousin, R. (1997) Peas (*Pisum sativum* L.). *Field Crop Res.* **53**, 111-130.
- Da Silva, A.C., Rodrigues Marcelino, H., Salgado Gomes, M.C., Oliveira, E.E., Nagashima Jr, T., Tabosa Egito, E.S. (2012) Xylan, a promising hemicellulose for pharmaceutical use. U: *Products and applications of biopolymers*, (Verbeek, J., ured.), InTech, Rijeka, str. 61-84.
- De Vries, R.P., Visser, J. (2001) Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 497-522.
- Deutschmann R., Dekker, R.F.H. (2012) From plant biomass to bio-based chemicals: Latest developments in xylan reserach. *Biotechnol. Adv.*, **30**, 1627-1640.
- Doctor, V., Sauls, V. (1983) Isolation and anticoagulant properties of a new sulfated xylan: Comparison with heparin and sodium pentosan polysulfate (SP-54). *Thromb Res.*, **30**, 573-538.
- Ebringerova, A. (2006) Structural diversity and application potential of hemicelluloses. *Macromol. Symp.* **232**, 1-12.
- Ebringerova, A., Heinze, T. (2000) Xylan and xylan derivatives-biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromol. Rapid Commun.* **21**, 542-556.
- Ebringerova, A., Hromádková, Z. (1999) Xylans of industrial and biomedical importance. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **16**, 325-346.
- Ebringerova, A., Hromádková, Z., Heinze, T. (2005) Hemicellulose. *Adv. Polym. Sci.* **128**, 1-67.
- Fincher, G.B., Stone, B.A. (1986) Cell walls and their components in cereal grain technology. U: *Advances in cereal science and technology*, (Pomeranz, Y., ured.), American Association of Cereal Chemists Inc, St. Paul, str. 207-95.
- Galanakis, C.M. (2012) Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trend. Food Sci. Technol.* **26**, 68-87.
- Gao, J., Tang L.G. (1996) *Cellulose science*, Science Press, Peking

- Gruppen, H., Hamer, R.J., Voragen, A.G.J. (1992) Water-unextractable cell wall material from wheat flour. 2. Fraction of alkali-extracted polymers and comparison with water-extractable arabinoxylans. *J. Cereal. Sci.* **13**, 53-67.
- Hartley, R.D., Jones, E. C. (1976) Diferulic acid as a component of cellwalls of *Lolium multiflorum*. *Phytochemistry* **15**, 1157-1160.
- Harvey, D. J. (2011) Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **879**, 1196-1225.
- Hoadley, B.R. (2000) Understanding wood, a craftman's guide to wood technology, The Taunton Press, Inc., Newtown, str. 17.
- Hubbell, C.A., Ragauskas, A.J. (2010) Effect of acid-chlorite delignification on cellulose degree of polymerization. *Bioresour. Technol.* **101**, 7410-7415.
- Jackson, M.G. (1977) The alkali treatment of straws. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2**, 105-130.
- Jalili, T., Medeiros, D.M., Wildman, R.E.C. (2007) Dietary fiber and coronary hearth disease. U: Handbook of nutraceuticals and functional food (Wildman, R.E.C., ured.), 2. izd., Taylor and Francis group, LLC, Boca Raton, str. 131-142.
- Laufenberg, G., Kunz, B., Nystroem, M. (2003) Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresour. Technol.* **87**, 167-198.
- Lawther, J.M., Sun, R.C., Banks, W.B. (1996) Effects of extraction conditions and alkali type on yield and composition of wheat straw hemicellulose. *J. Appl. Polym. Sci.* **60**, 1827-1837.
- Li, X., Shi, X., Wang, M., Du, Y. (2011) Xylan chitosan conjugate - A potential food preservative. *Food Chem.* **126**, 520-525.
- Marton, T.P., Estevez, J.M., Fachuang L, Ruel, K., Denny, M.W., Somerville, C., Ralph, J. (2009) Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture. *Curr. Biol.* **19**, 169-175.
- Mateos-Aparicio, I., Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M.J., Zapata-Revilla, M.A., Tenorio-Sanz, M.D. (2010) Pea pod, broad bean and okara, potential sources of functional compounds. *Food Sci. Technol.* **43**, 1467-1470.
- McCready, R.M., Gee, M. (1960) Determination of pectic substances by paper chromatography. *J. Agric. Food. Chem.* **8**, 510-513.
- Mikkonen, K.S., Tenkanen, M. (2012) Sustainable food-packaging materials based on future biorefinery products: xylans and mannans. *Trends Food Sci. Technol.* **28**, 90-102.
- Minmunin, J., Limpitpanich, P., Promwungkwa, A. (2015) Delignification of elephant grass for production of cellulosic intermediate. *Energy Procedia* **79**, 220-225.

- Misi, S.N., Forster, C.F. (2002) Semi-continuous anaerobic co-digestion of agrowastes. *Environ. Tech.* **23**, 45-451.
- Molnár-Perl, I. (2000) role of chromatography in the analysis of sugars, carboxylic acids and amino acids in food. *J. Chromatogr. A* **891**, 1-32.
- O'Dwyer, M.H. (1926) The hemicelluloses. Part IV. The hemicelluloses of beech wood. *Biochem. J.* **20**, 656-664.
- Park, Y.C., Kim, J.S. (2012) Comparison of various alkaline pretreatment methods of lignocellulosic biomass. *Energy* **47**(1), 31-5.
- Peng, F., Peng, P., Xu, F., Sun, R.C. (2012) Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnol. Adv.* **30**, 879-903.
- Perez, S., Mazeau, K. (1998) Conformations, structures, and morphologies of celluloses. U: Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility (Dummitriu, S., ured.), Marcel Dekker Inc., New York, str. 41-68.
- Persin, Z., Stana-Kleinschek, K., Foster, T.J., van Dam, J.E.G., Boeriu, C.G., Navard, P. (2010) Challenges and opportunities in polysaccharides research and technology: The EPNOE views for the next decade in the areas of materials, food and health care, *Carbohydr. Polym.* **84**, 22-32.
- Petzold, K., Schwikal, K., Gunther, W., Heinze, T. (2006) Carboxymethyl xylan-control of properties by synthesis. *Macromol. Symp.* **232**, 27-36.
- Ralph, J., Bunzel, M., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Grabber, J.H., and Steinhart, H. (2004) Peroxidase-dependent cross-linking reactions of p-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochem. Rev.* **3**, 79-96.
- Ren, J.-L., Sun, R.-C. (2010) Hemicelluloses. U: Cereal straw as resource for sustainable biomaterials and biofuels: chemistry, extractives, lignins, hemicelluloses, cellulose, (Ren, J.L., ured.) Elsevier B.V., Amsterdam, str. 73-119.
- Rose, J.C.K. (2003) The plant cell wall, Blackwell Publishing Ltd, New York.
- Roubrokes, J.P., Anderson, R., Aman, P. (2000) Structural features of (1-3),(1-4)- β -D-glucan and arabinoxylan ractions isolated from rye bran. *Carbohydr. Polym.* **42**, 3-11.
- Ruzene, D.S., Silva, D.P., Vicente, A.A., Goncalves, A.R., Teixeira, J.A. (2008) An alternative application to the Portuguese agro industrial residue: wheat straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **147**, 85-96.
- Sahoo, S., Sahoo, R., Lochan, P. (2010) Tamarinid seed polysaccharide: a versatile biopolymer for mucoadhesive applications. *J. Pharmaceut. Biomed.* **8**, 1-12.
- Samanta, A., Jayapal, N., Jayaram, C., Roy, S., Kolte, A., Senani, S. (2015) Xylooligosaccharides as prebitotics from agricultural by-products: Production and applications. *Carbohydr. Diet. Fibre* **5**, 62-71.

Schieber, A., Stintzing, F.C., Carle, R. (2001) By-products of plant food processing as a source of functional compounds-recent developments. *Trends Food Sci. Tech.* **12**, 401 - 413.

Schindler, T. M. (1998) The new view of the primary cell wall. *Z. Pflanzenkrankh* **191**, 499-508.

Schuchman, E.H., Ge, Y., Lai, A., Borisov, Y., Faillace, M., Eliyahu, E. (2013) Pentosan polysulfate: A novel therapy for the mucopolysaccharidoses. *PloS ONE*, **8** (1)

Sharma, R., Rawat, R., Bhogal, R.S., Oberoi, H.S. (2015) Multi-component thermostable cellulolytic enzyme production by *Aspergillus niger* HN-1 using pea pod waste: Appraisal of hydrolytic potential with lignocellulosic biomass. *Process Biochem.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.01.025>

Shuaiyang, W., Huiling, L., Chuanfu, L., Feng, P., Runcang, S. (2012) Preparation of xylan citrate - A potential adsorbent for industrial wastewater treatment. *Carbohydr. Polym.* **92**, 1960-1965.

Sjöström, E. (1981) Wood polysaccharides. U: Wood chemistry, fundamentals and applications. (Sjöström, E., ured.) Academic Press, New York, str. 61-67.

Sonja, D., Čanadanovič-Brunet, J., Četković G. (2009), By-products of fruits processing as a source of phytochemicals. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.*, **15**, 191-202.

Sun, R., Hughes, S. (1999) Fractional isolation and physico-chemical characterization of alkali-soluble polysaccharides from sugar beet pulp. *Carbohydr. Polym.* **38**, 273-281.

Sun, R.C., Lawther, J.M., Bank, W.B. (1996) Fractional and structural characterization of wheat straw hemicelluloses. *Carbohydr. Polym.* **29**, 325-31.

Sun, R.C., Sun, X.F. (2002) Fractional and structural characterization of hemicelluloses isolated by alkali and alkaline peroxide from barley straw. *Carbohydr. Polym.* **49**, 415-423.

Sun, X., Wang, H., Han, X., Chen, S., Zhu, S. & Dai, J. (2014) Fingerprint analysis of polysaccharides from different *Ganoderma* by HPLC combined with chemometrics methods. *Carbohydr. Polym.*, **114**, 432-439.

Ünlü, C.H., Günister, E., Atici, O. (2009) Synthesis and characterization of NaMt biocomposites with corn cob xylan in aqueous media. *Carbohydr. Polym.* **76**, 585-592.

Viikari, L., Poutanen, K., Tenkanen, M., Tolan, J.S. (2002) Hemicellulases. *Encyclopedia of Bioprocess Technology*

Wainwright, S.A., Biggs, W.D., Currey, J.D., and Gosline, J.M. (1982) *Mechanical Design in Organisms*, Princeton University Press, Princeton (NY).

Xiao, B., Sun, X.F., Sun, R.C. (2001) Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. *Polym. Degrad. Stab.* **74**, 307-319.

Yang, G., Jaakkola P. (2011) Wood chemistry and isolation of extractives from wood, Literature study for BIOTULI project, University of Applied Sciences, Saimaa.

Zhang, L. Y., Xu, J., Zhang, L. H., Zhang, W. B. & Zhang, Y. K. (2003) Determination of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone-labeled carbohydrates by liquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. B*, **793**, 159–165.

Zhang, X., Wan, S., Hao, J., Hu, J., Yang, T., Zong, X. (2016) Large-scale evaluation of pea (*Pisum sativum*L.) germplasm for cold tolerance in the field during winter in Qingdao. *Crop J.* **4** (5), 377-383.