

# Oligosaharidi iz sekundarnih biljnih sirovina - izdvajanje, karakterizacija i primjena u razvoju funkcionalnih konditorskih proizvod

---

**Vojvodić Cebin, Aleksandra**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2019**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:709645>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-10**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Aleksandra Vojvodić Cebin

**OLIGOSAHARIDI IZ SEKUNDARNIH  
BILJNIH SIROVINA - IZDVAJANJE,  
KARAKTERIZACIJA I PRIMJENA U  
RAZVOJU FUNKCIONALNIH  
KONDITORSKIH PROIZVODA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Aleksandra Vojvodić Cebin

**OLIGOSAHARIDI IZ SEKUNDARNIH  
BILJNIH SIROVINA - IZDVAJANJE,  
KARAKTERIZACIJA I PRIMJENA U  
RAZVOJU FUNKCIONALNIH  
KONDITORSKIH PROIZVODA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof.dr.sc. Draženka Komes

Zagreb, 2019.



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Aleksandra Vojvodić Cebin

**OLIGOSACCHARIDES FROM  
SECONDARY RAW MATERIALS OF  
PLANT ORIGIN- ISOLATION,  
CHARACTERIZATION AND  
IMPLEMENTATION IN THE DEVELOPMENT  
OF FUNCTIONAL CONFECTIONERY  
PRODUCTS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: PhD Draženka Komes, Full Professor

Zagreb, 2019

*Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Draženke Komes, u sklopu projekta „Održiva proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina” (kratica: SPECH-LRM, šifra projekta: 9158; period: 2014.-2018.), financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.*

*Temeljem izvješća Povjerenstva za ocjenu teme i prijedlog mentora, Fakultetsko vijeće prihvatilo je temu doktorskog rada naslova „Oligosaharidi iz sekundarnih biljnih sirovina - izdvajanje, karakterizacija i primjena u razvoju funkcionalnih konditorskih proizvoda“ na 2. redovitoj sjednici za akademsku godinu 2013./2014., održanoj 19. studenoga 2013. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o pokretanju postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija na sjednici održanoj 21. siječnja 2014. godine.*

## **Informacije o mentoru: Prof.dr.sc. Draženka Komes**

Draženka Komes redovita je profesorica u trajnom zvanju na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na kojem je zaposlena od 1998. godine. Doktorirala je 2003. godine, a od 2008. godine je pročelnica Laboratorija za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda.

Sudjeluje u izvođenju nastave na 14 predmeta koji se održavaju na preddiplomskim i diplomskim studijima te na poslijediplomskom doktorskom i specijalističkom studiju. Do sada je pod njezinim mentorstvom izrađeno 60 diplomskih radova i 44 završna rada te je bila mentorica jedne doktorske disertacije i 4 studentska rada koji su nagrađeni Rektorovom nagradom Sveučilišta u Zagrebu.

Njezin znanstveno-istraživački rad usmjeren je na primjenu inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih spojeva i ugljikohidrata biljnoga podrijetla, razvoj i primjenu suvremenih instrumentalnih tehnika za određivanje bioaktivnog potencijala različitih sirovina i prehrambenih proizvoda (posebice konditorski proizvodi, kava, čaj, biljne infuzije), mikroinkapsulaciju bioaktivnih sastojaka biljnoga podrijetla u svrhu razvoja novih funkcionalnih prehrambenih proizvoda te karakterizaciju i korištenje sekundarnih biljnih sirovina kao izvora funkcionalnih ugljikohidrata.

Usavršavala se u Julius Kühn-Institutu u Quedlinburgu (Njemačka), a kao gostujući nastavnik boravila je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu i na Poljoprivrednom fakultetu Sveučilišta u Peradeniya-i (Šri Lanka).

Koautorica je 7 poglavlja u knjigama, objavila je 124 znanstvena rada, od toga 71 znanstveni rad referiran u svjetskim bazama podataka (SCI, CC) te je sudjelovala na više od 50 međunarodnih kongresa s 94 priopćenja.

Kao članica znanstvenog ili organizacijskog odbora sudjelovala je u organizaciji 7 međunarodnih kongresa. Inicijatorica je i predsjednica Organizacijskog odbora nacionalnog stručnog skupa „Funkcionalna hrana u Hrvatskoj” i studentskog natjecanja „Ecotrophelia Hrvatska” te članica ocjenjivačkog panela europskog natjecanja „Ecotrophelia Europe“. Dobitnica je Godišnje nagrade Društva sveučilišnih nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu 2003. godine, Godišnje nagrade Hrvatske akademije tehničkih znanosti 2007. godine i Državne nagrade za značajno znanstveno dostignuće iz područja Biotehničkih znanosti 2011. godine.

Prof. dr. sc. Draženka Komes trenutno je voditeljica bilateralnog hrvatsko-slovenskog znanstvenog projekta „Razvoj liposoma obloženih pektinom i proteinima kao novih inkapsulacijskih sustava kvercetina dobivenog iz agro-industrijskog otpada“ i hrvatsko-srpskog

bilateralnog projekta „Inkapsulacija ekstrakta matičnjaka (*Melissa officinalis*) i trave iva (*Teucrium montanum*) u emulzije i liposome s ciljem dobivanja funkcionalnih dodataka prehrani“ te suradnica na nacionalnom znanstvenom projektu, financiranom od strane HRZZ-a, „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (2018.-2022.) i H2020 europskom projektu (Phoenix, poziv MSCA-RISE-2015). Koordinirala je timom s PBF-a koji je bio jedan od šest partnera na europskom FP7 projektu „Processing Raw Materials into Excellent and Sustainable End products while Remaining Fresh“, FP7-KBBE-2009-3 (2010.-2014.), u okviru kojeg je vodila radni paket pod nazivom „Assessment of improvements of conserved food quality“, a kao MC (Management Committee) članica aktivno je sudjelovala na COST projektu FA1001 pod nazivom „The application of innovative fundamental food-structure-property relationships to the design of foods for health, wellness and pleasure“ (2010.-2014.). Vodila je nacionalni znanstveni projekt „Stabilnost alkaloida i polifenola u proizvodima biljnog podrijetla“, (2008.-2012.), 2 bilateralna hrvatsko-srpska (2008.-2010.; 2016.-2017.), jedan bilateralni hrvatsko-kineski (2016.-2017.) znanstveni projekt te jedan razvojni projekt u suradnji s Ministarstvom obrane Republike Hrvatske (2008.-2010.). Bila je suradnica na četiri nacionalna znanstvena projekta, na EU programu cjeloživotnog učenja Leonardo da Vinci, bilateralnom hrvatsko-srpskom i hrvatsko-njemačkom znanstvenom projektu.

Članica je Uređivačkog odbora znanstveno-stručnog časopisa Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam te članica Uređivačkog odbora znanstvenog časopisa Food Technology and Biotechnology.

Prof. dr. sc. Draženka Komes, članica je brojnih radnih skupina, povjerenstava i odbora, kako na Prehrambeno-biotehnoškome fakultetu, tako i u Hrvatskoj gospodarskoj komori, Ministarstvu poljoprivrede, Hrvatskoj akademiji znanosti i umjetnosti te Agenciji za znanost i visoko obrazovanje.



## ZAHVALA

Veliko hvala dragoj mentorici, prof. dr. sc. Draženki Komes, na pruženoj prilici, velikom povjerenju, angažmanu i podršci tijekom izrade ovoga rada. Hvala na svemu što smo zajedno prošle, naučila sam jako puno!

Hvala povjerenstvu za ocjenu rada na konstruktivnim komentarima koji su doprinijeli konačnoj kvaliteti ovoga rada.

A huge thank you to dear friends and colleagues at laboratory Paroi Végétale et Polysaccharides Pariétaux of the French national institute for agricultural research (INRA-BIA) in Nantes, especially to Marie-Christine Ralet, PhD, Estelle Bonnin, PhD and lab engineers Jacqueline Vigouroux and Marie-Jeanne Crépeau for their knowledge, experience, kindness and so many little things that made my stay in Nantes a wonderful experience.

Thanks to Mrs. Isabelle Serventon for the support in every way.

Maud and Yves, thanks for all the fun. Merci, merci, merci!

Hvala dr. sc. Ireni Vovk i njezinom timu u Laboratoriju za prehrambenu kemiju Kemijskog instituta u Ljubljani za pomoć oko HPTLC analiza.

Hvala mojim laboratorijskim kolegicama, bivšima i sadašnjima, najviše Arijani i Ani na kolegijalnosti, prijateljstvu i svim nezaboravnim trenucima u labosu.

Hvala Sari, Moniki, Danijeli i Ani M. na doprinosu ovome radu.

Uz vas je sve bilo lakše :)

Hvala prof. dr. sc. Kseniji Durgo i Ani Huđek, mag. ing. na pomoći i angažmanu oko mikrobioloških eksperimenata. S vama je super raditi!

Zahvaljujem se kolegama sa Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo i s drugih zavoda PBF-a (a i šire) na otvorenim vratima za posudbu uređaja i kemikalija, stručne i prijateljske savjete i razgovore kroz koje smo se upoznavali.

Na kraju, najveće hvala mojoj divnoj obitelji; roditeljima na ljubavi, mudrosti, vjetru u leđa...„baka i deda servisu“, plodovima vrta i toplim juhicama; mojoj seki na velikoj podršci i vjeri u mene; mojima Jurici i Heleni na snazi, velikom strpljenju i nesebičnosti u stvaranju našeg boljeg sutra.

Ovaj rad posvećujem vama.



## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni poslijediplomski studij Prehrambena tehnologija

UDK: 543.635.24:635.25:633.35:634.51:633.63:633.74:66.094.941(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### OLIGOSAHARIDI IZ SEKUNDARNIH BILJNIH SIROVINA - IZDVAJANJE, KARAKTERIZACIJA I PRIMJENA U RAZVOJU FUNKCIONALNIH KONDITORSKIH PROIZVODA

Aleksandra Vojvodić Cebin, dipl.ing.

**Rad je izrađen** u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

**Mentor:** Prof.dr.sc. Draženka Komes

**Kratki sažetak:** Cilj ovoga rada bio je istražiti mogućnost valorizacije odabranih sekundarnih biljnih sirovina: pulpe šećerne repe (SBP), ljuske oraha (WS), ljuske kakaovog zrna (CBH), ljuske crvenog luka (OP) i mahune graška (PP) kao izvora funkcionalnih komponenata - polisaharida i polifenola. Optimizacijom postupka izdvajanja postignuti su zadovoljavajući prinosi pročišćenih frakcija ksilana iz WS i PP (delignifikacijom i alkalnom ekstrakcijom) te pektina iz SBP, CBH (kiselinskom ekstrakcijom) i OP (ekstrakcijom s kelirajućim sredstvom), čijom su daljnjom parcijalnom enzimskom hidrolizom proizvedeni ksilooligosaharidi (XOS) i pektinski oligosaharidi (POS) - oligogalakturonidi. Primjenom optimiranih uvjeta izdvajanja i enzimske hidrolize *endo*-ksilanazom ostvareno je visoko iskorištenje XOS iz WS i PP od približno 70 % i 79 % početnog udjela ksilana u sirovinama, u obliku ksilobioze i ksiloze (70:30). Primjenom *endo*-poligalakturonaze, najviša konverzija galakturonana iz OP iznosila je 41-45 % početnog udjela galakturonana u sirovini (od čega dominantno monomera (~30-50 %) i dimera (~35-40 %)), a iz CBH tek 7-8,5 % (od čega ~35-52 % monomera te di-, tri- i tetramera u podjednakom omjeru ostatka). Primjenom enzimskog koktela Viscozyme, 21-37,5 % početnog udjela galakturonana u SBP hidrolizirano je u oligogalakturonide (gotovo isključivo u monomer (približno 60-70 %) i tetramer). Osim polisaharida i oligosaharida, neizravno su izdvojeni i drugi sastojci dodane vrijednosti - polifenolni spojevi, otopljeni lignin i pročišćena celuloza, što otvara mogućnost potpune biorafinerije istraživanih sekundarnih biljnih sirovina i sličnih materijala, kao važnog aspekta održivog razvoja prehrambene industrije.

**Broj stranica:** 310

**Broj slika:** 75

**Broj tablica:** 47

**Broj literaturnih navoda:** 393

**Broj priloga:** 0

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** enzimaska hidroliza, ksilooligosaharidi, ljuska crvenog luka, ljuska kakaovog zrna, ljuska oraha, mahuna graška, pektinski oligosaharidi, PMP derivatizacija, prebiotici, pulpa šećerne repe

**Datum obrane:** 7. svibnja 2019.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. Prof.dr.sc. Božidar Šantek (predsjednik)
2. Prof.dr.sc. Branka Levaj
3. Prof.dr.sc. Drago Šubarić
4. Prof.dr.sc. Ksenija Durgo (zamjena)

**Rad je pohranjen** u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14 i u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice b.b.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

PhD Thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate study in Food Technology

UDK: 543.635.24:635.25:633.35:634.51:633.63:633.74:66.094.941(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Food Technology

### OLIGOSACCHARIDES FROM SECONDARY RAW MATERIALS OF PLANT ORIGIN- ISOLATION, CHARACTERIZATION AND IMPLEMENTATION IN THE DEVELOPMENT OF FUNCTIONAL CONFECTIONERY PRODUCTS

Aleksandra Vojvodić Cebin, MSc

**Thesis performed** at Laboratory for Chemistry and Technology of Carbohydrates and Confectionery Products at Department of Food Engineering of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb.

**Supervisor:** PhD Draženka Komes, Full Professor

**Short abstract:** The aim of this thesis was to look into the possibilities of valorizing selected secondary raw materials of plant origin: sugar beet pulp (SBP), walnut shell (WS), cocoa bean husk (CBH), onion peel (OP) and pea pod (PP) as sources of functional components - polysaccharides and polyphenols. Upon optimization of recovery procedures, satisfactory yields of purified fractions of xylan from WS and PP (by delignification and alkaline extraction) and pectin from SBP, CBH (by diluted acid extraction) and OP (by chelator-mediated extraction) were obtained. Partial enzymatic hydrolysis of the recovered polysaccharides resulted in xylooligosaccharides (XOS) and pectic oligosaccharides (POS) - oligogalacturonides. At optimal conditions of isolation and hydrolysis using *endo*-xylanase, a high yield of XOS from WS and PP was obtained, approximately 70 % and 79 %, respectively, in a form of xylobiose and xylose (70:30). Using *endo*-polygalacturonase, maximal conversion of galacturonan from OP exhibited 41-45 % of the initial galacturonan content in OP (dominating in monomer (~30-40 %) and dimer (~35-40 %)), while from CBH only 7-8,5 % (with ~30-50 % of monomer, di-, tri- and tetramer at equal proportions of the rest). Using enzymatic cocktail Viscozyme, 21-37,5 % of the initial galacturonan content in SBP was hydrolysed into oligogalacturonides (almost exclusively monomer (60-70 %) and tetramer). Other value-added components along with polysaccharides and oligosaccharides were indirectly recovered, comprising polyphenols, solvated lignin and purified cellulose, thus opening the possibility of complete biorefinery of selected secondary plant raw materials and related substrates as an important aspect of sustainable development of the food industry.

**Number of pages:** 310

**Number of figures:** 75

**Number of tables:** 47

**Number of references:** 393

**Number of supplements:** 0

**Original in:** Croatian

**Keywords:** Enzymatic hydrolysis, xylooligosaccharides, onion peel, cocoa bean husk, walnut shell, pea pod, pectic oligosaccharides, PMP derivatization, prebiotics, sugar beet pulp

**Date of the thesis defense:** 7<sup>th</sup> May 2019

**Reviewers:**

1. PhD Božidar Šantek, Full Professor (President)
2. PhD Branka Levaj, Full Professor
3. PhD Drago Šubarić, Full Professor
4. PhD Ksenija Durgo, Full Professor (substitute)

**Thesis deposited in Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology in Zagreb, Kačićeva 23; University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14 and National University Library in Zagreb, Hrvatske bratske zajednice b.b.**

## SAŽETAK

Sekundarne biljne sirovine predstavljaju biljni ostaci u različitim fazama proizvodnje namirnica biljnoga podrijetla (biljni nusproizvodi), a koji imaju potencijal ponovne primjene u različitim novim proizvodima dodane vrijednosti. Iskorištenje otpadnih biljnih materijala u prehrambene svrhe posebno je zanimljiv način valorizacije koji slijedi nove trendove smanjenja otpada u proizvodnji hrane putem zadržavanja proizvedene biomase u izravnoj prehrani ljudi u što većoj mjeri. Potencijal ovih sirovina očituje se u zanimljivom kemijskom sastavu, velikoj količini i dostupnosti s istog mjesta, niskoj cijeni i nekonkurentnosti konvencionalnoj hrani, a ponovnim iskorištenjem ostvaruju se brojni ekonomski i ekološki benefiti.

Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnosti iskorištenja polisaharida biljne stanične stijenke 5 odabranih sekundarnih biljnih sirovina: pulpe šećerne repe (SBP), ljuske oraha (WS), ljuske kakaovog zrna (CBH), ljuske crvenog luka (OP) i mahune graška (PP) za proizvodnju funkcionalnih oligosaharida - ksilooligosaharida i pektinskih oligosaharida.

Monomerni sastav polisaharida određen je novorazvijenom metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC-PDA) s pretkolonskom derivatizacijom 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on reagensom (PMP-derivatizacija). Sukladno udjelima ukupne ksiloze te galakturonske kiseline i arabinoze, istraživane sekundarne sirovine podijeljene su u sirovine bogate ksilanom (WS (~20 % s.tv.), PP (~13 % s.tv.)) i sirovine bogate pektinom (SBP (~15 % galakturonana i ~18 % arabinana u s.tv.), CBH (~8 % galakturonana u s.tv.), OP (~20 % galakturonana u s.tv.)).

Optimizacijom ekstrakcije ksilana postignuto je iskorištenje od približno 80 % ksilana izvorno prisutnog u sirovini za WS i približno 94 % za PP, pri čemu su primjena delignifikacije i reducensa u alkalnoj ekstrakciji bili od presudne važnosti za povećanje ekstraktivosti i smanjenje gubitaka ksilana. U optimizaciji ekstrakcije pektina, primjena ekstrakcije razrijeđenom kiselinom rezultirala je zadovoljavajućim iskorištenjem galakturonana iz SBP i CBH (~42 % izvorno prisutnog galakturonana u sirovini za SBP i ~39 % za CBH), dok je za uspješnu ekstrakciju istoga iz OP bilo potrebno primijeniti kelirajuće sredstvo (~52 % izvorno prisutnog galakturonana, u optimalnim uvjetima). Arabinan iz SBP značajno se degradira prilikom kiselinske ekstrakcije te ga je potrebno zasebno izdvajati primjenom lužnatog otapala. Primjenom enzima *endo*-ksilanaze, ksilan iz WS i PP uspješno je hidroliziran do ksilooligosaharida, pri čemu je najviša konverzija izdvojenog ksilana iznosila 71 i 97 % za topljivi i netopljivi ksilan iz WS (u obliku ksiloze i ksilobioze (~30:70)) te 75 i 85 % za topljivi

i netopljivi ksilan iz PP (također u obliku ksiloze i ksilobioze (~30:70)). Hidroliza izdvojenog pektina do oligogalakturonida primjenom enzima *endo*-poligalakturonaze pokazala je značajnu ovisnost o distribuciji funkcionalnih skupina na molekuli te se pokazala uspješnom u slučaju pektina OP (79-88 %-tna konverzija izdvojenog galakturonana u oligomerne oblike, s dominantnim monomerom i dimerom); za pektin CBH konverzija galakturonana bila je znatno niža, najviše 22 % (dominantno u obliku monomera), dok je aktivnost enzima na pektinu SBP bila neznatna. Primjena enzimskog koktela Viscozyme značajno je poboljšala proizvodnju oligogalakturonida iz pektina SBP (~75 %-tna konverzija galakturonana u oligomerne oblike, s dominantnim monomernim i tetramernim oblicima).

Ovim istraživanjem prikazana je jedna od mogućnosti iskorištenja odabranih sekundarnih sirovina, prvenstveno kao ekonomičnog izvora novih prebiotičkih oligosaharida. Uklapanje istih u različite oblike funkcionalnih konditorskih proizvoda potencijalno predstavlja smjer popularizacije izvorno nejestivih nusproizvoda biljne biomase u prehrani ljudi, kao i prebiotika općenito.

Tijekom izdvajanja oligosaharida, neizravno su izdvojene i druge bioaktivne komponente - različiti polifenolni spojevi, te otopljeni lignin i pročišćena celuloza, koji se također mogu iskoristiti u različitim novim oblicima dodane vrijednosti, čime bi se istaknula mogućnost potpune biorafinerije istraživanih sekundarnih biljnih sirovina.

**Ključne riječi:** enzimska hidroliza, ksilooligosaharidi, ljuska crvenog luka, ljuska kakaovog zrna, ljuska oraha, mahuna graška, pektinski oligosaharidi, PMP derivatizacija, prebiotici, pulpa šećerne repe

## SUMMARY

Plant secondary raw materials are plant residues obtained as by-products at different stages of the production of foods of plant origin, that hold the reutilization potential in various new value-added products. Reutilization of waste plant materials for food purposes is especially interesting way of valorization, in line with new trends of food waste reduction in general, aiming to keep the produced food biomass in direct human nutrition as much as possible. The potential of these raw materials is demonstrated by their rich and interesting chemical composition, abundance, availability from one place and low price. Furthermore, these materials are non-food competing and their reutilization exerts economic and ecologic benefits.

The aim of this thesis was to look into the possibilities of reutilizing cell wall polysaccharides of 5 selected plant secondary raw materials: sugar beet pulp (SBP), walnut shell (WS), cocoa bean husk (CBH), onion peel (OP) and pea pod (PP) for the production of functional oligosaccharides - xylooligosaccharides and pectic oligosaccharides.

Monomeric profile of recovered polysaccharides was determined using newly developed method of high-performance liquid chromatography (HPLC-PDA) with pre-column derivatization using 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one reagent (PMP-derivatization). Following the contents of total xylose as well as galacturonic acid and arabinose, the evaluated raw materials were divided into xylan-rich (WS (~20 % dmb), PP (~13 % dmb)) and pectin-rich (SBP (~15 % dmb of galacturonan and ~18 % dmb of arabinan), CBH (~8 % dmb of galacturonan), OP (~20 % dmb of galacturonan)).

At optimal extraction conditions approximately 80 % of initially present xylan in WS was recovered, while approximately 94 % from PP. Employment of delignification, as well as reducing agent during alkaline extraction ensured better extractability and reduced losses of xylan during the recovery procedure. For the optimization of pectin extraction, diluted acid extraction resulted with satisfactory recovery of galacturonan from SBP and CBH (~42 % of initially present galacturonan in SBP and ~39 % for CBH), while in case of OP, higher recovery yields were ensured by chelator-mediated extraction (~52 % of initially present galacturonan at optimal conditions).

Using enzyme *endo*-xylanase, xylan from WS and PP was successfully hydrolysed to xylooligosaccharides with maximum conversion of 71 % and 79 % for soluble and insoluble recovered WS xylan (in a form of xylose and xylobiose (~30:70)), while 75 % and 85 % for soluble and insoluble recovered PP xylan (also in a form of xylose and xylobiose (~30:70)).

Hydrolysis of recovered pectins to oligogalacturonides using enzyme *endo*-polygalacturonase was shown to be highly dependent on the distribution of functional groups along the molecule and was successful when implemented on OP pectin (79-88 % conversion of recovered galacturonan into oligomeric forms, dominantly monomer and dimer). For CBH pectin the conversion was markedly lower, with maximum of 22 % (dominantly as monomer), while the enzymatic activity on SBP pectin was negligible. Implementation of enzymatic cocktail Viscozyme significantly improved the production of oligogalacturonides from SBP pectin (~75 % conversion into oligomeric forms, dominating in monomer and tetramer).

This thesis has emphasized one of the many possibilities of reutilizing selected plant secondary raw materials, primarily as economically feasible source of new prebiotic oligosaccharides. Their incorporation in different functional confectionery products potentially presents a good way to popularise originally non-edible by-products of plant origin back into human nutrition, as well as prebiotics in general. During oligosaccharides recovery, other bioactive components were indirectly obtained, such as polyphenols, as well as solvated lignin and purified cellulose, also possessing the potential for further reutilization in value-added products, which in turn emphasizes the possibility of complete biorefinery of the evaluated secondary plant raw materials.

**Keywords:** Enzymatic hydrolysis, xylooligosacchrides, onion peel, cocoa bean husk, walnut shell, pea pod, pectic oligosaccharides, PMP derivatization, prebiotics, sugar beet pulp

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Otpad i gubici u proizvodnji hrane</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.1 Otpad u primarnoj proizvodnji i industrijskoj preradi biljnih sirovina</b> .....	<b>6</b>
<b>2.2 Načini upravljanja i valorizacije agro-industrijskog otpada</b> .....	<b>8</b>
<b>2.2.1 Konvencionalni načini</b> .....	<b>9</b>
2.2.1.1 Odlaganje na odlagalištima otpada .....	9
2.2.1.2 Prehrana životinja.....	10
2.2.1.3 Kompostiranje i vermikompostiranje .....	10
2.2.1.4 Dobivanje energije .....	10
<b>2.2.2 Inovativne metode</b> .....	<b>11</b>
<b>2.3 Ciljane komponente agro-industrijskog otpada i njihov povrat</b> .....	<b>13</b>
<b>2.3.1 Funkcionalni sastojci agro-industrijskog otpada</b> .....	<b>15</b>
2.3.1.1 Bioaktivni spojevi (fitokemikalije) .....	16
2.3.1.2 Prehrambena vlakna .....	19
<b>2.3.2 Mogućnosti valorizacije odabranih sekundarnih biljnih sirovina</b> .....	<b>25</b>
2.3.2.1 Pulpa šećerne repe .....	25
2.3.2.2 Ljuska oraha.....	30
2.3.2.3 Ljuska kakaovog zrna.....	33
2.3.2.4 Ljuska crvenog luka .....	36
2.3.2.5 Mahuna graška .....	40
<b>2.4 Iskorištavanje ugljikohidratne frakcije sekundarnih biljnih sirovina</b> .....	<b>44</b>
<b>2.4.1 Sastav i struktura biljne stanične stijenke</b> .....	<b>44</b>
2.4.1.1 Pektin.....	48
2.4.1.2 Hemiceluloza .....	52
2.4.1.2.1 Ksilani.....	54
2.4.1.3 Celuloza.....	57
2.4.1.4 Lignin .....	58
<b>2.4.2 Metode ekstrakcije polisaharida biljne stanične stijenke</b> .....	<b>58</b>
2.4.2.1 Ekstrakcija pektina .....	58
2.4.2.2 Ekstrakcija hemiceluloze .....	62
<b>2.4.3 Mogućnosti primjene pektina i ksilana iz sekundarnih biljnih sirovina</b> .....	<b>65</b>
<b>2.5 Oligosaharidi iz sekundarnih biljnih sirovina</b> .....	<b>67</b>
<b>2.5.1 Definicija i fizikalno-kemijska svojstva</b> .....	<b>67</b>
<b>2.5.2 Proizvodnja oligosaharida</b> .....	<b>68</b>
2.5.2.1 Ksilooligosaharidi.....	70
2.5.2.2 Pektinski oligosaharidi .....	75
<b>2.5.3 Funkcionalna svojstva</b> .....	<b>80</b>



2.5.3.1	Prebiotički učinci ksilooligosaharida i pektinskih oligosaharida.....	82
2.5.4	<i>Primjena u razvoju funkcionalnih prehrambenih proizvoda.....</i>	<i>90</i>
<b>3.</b>	<b>MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>98</b>
<b>3.1</b>	<b>Materijal.....</b>	<b>98</b>
3.1.1	<i>Priprema sekundarnih biljnih sirovina .....</i>	<i>98</i>
<b>3.2</b>	<b>Metode .....</b>	<b>99</b>
3.2.1	<i>Karakterizacija osnovnog makrokomponentnog sastava.....</i>	<i>99</i>
3.2.1.1	Određivanje udjela suhe tvari .....	99
3.2.1.2	Određivanje udjela masti.....	99
3.2.1.3	Određivanje udjela proteina.....	99
3.2.1.4	Određivanje udjela mineralnog ostatka.....	101
3.2.2	<i>Karakterizacija ekstraktibilne suhe tvari .....</i>	<i>101</i>
3.2.2.1	Priprema ekstrakata.....	102
3.2.2.1.1	<i>Vodena i etanolna ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu .....</i>	<i>102</i>
3.2.2.1.2	<i>Konvencionalna ekstrakcija 70 %-tnim etanolom .....</i>	<i>102</i>
3.2.2.2	Određivanje suhe tvari ekstrakta.....	103
3.2.2.3	Određivanje bioaktivnog sastava i antioksidacijskog kapaciteta.....	103
3.2.2.3.1	<i>Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva.....</i>	<i>103</i>
3.2.2.3.2	<i>Određivanje ukupnih neflavonoida i flavonoida.....</i>	<i>104</i>
3.2.2.3.3	<i>Određivanje pojedinačnih polifenola i metilksantina tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC-PDA).....</i>	<i>105</i>
3.2.2.3.4	<i>Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS i DPPH metodama.....</i>	<i>107</i>
3.2.3	<i>Karakterizacija ugljikohidratne frakcije.....</i>	<i>108</i>
3.2.3.1	Određivanje udjela netopljivih i topljivih vlakana.....	108
3.2.3.2	Određivanje udjela topljivog i netopljivog lignina .....	111
3.2.3.3	Određivanje udjela jednostavnih šećera .....	112
3.2.3.4	Određivanje udjela škroba .....	114
3.2.3.5	Određivanje monomernog sastava ugljikohidratne frakcije .....	116
3.2.3.5.1	<i>Priprema alkoholno-netopljivog ostatka.....</i>	<i>116</i>
3.2.3.5.2	<i>Potpuna kiselinska hidroliza.....</i>	<i>117</i>
3.2.3.5.3	<i>Određivanje monomernog sastava tankoslojnom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPTLC).....</i>	<i>118</i>
3.2.3.5.3.1	<i>Optimizacija metode .....</i>	<i>118</i>
3.2.3.5.3.2	<i>Analiza pri optimalnim uvjetima .....</i>	<i>120</i>
3.2.3.5.4	<i>Određivanje sastava neutralnih šećera plinskom kromatografijom (GC-FID) .....</i>	<i>122</i>
3.2.3.5.5	<i>Kolorimetrijsko određivanje udjela uronskih kiselina.....</i>	<i>124</i>
3.2.3.5.6	<i>Određivanje monomernog sastava tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC-PDA).....</i>	<i>127</i>
3.2.3.5.6.1	<i>Derivatizacija monosaharida 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-onom (PMP reagens) .....</i>	<i>127</i>

3.2.3.5.6.2	Optimizacija metode .....	127
3.2.3.5.6.3	Analiza pri optimalnim uvjetima .....	129
3.2.3.5.6.4	Validacija metode .....	130
3.2.3.6	Karakterizacija neugljikohidratnog dijela strukturnih polisaharida .....	134
3.2.3.6.1	<i>Određivanje stupnja metilacije i acetilacije</i> .....	134
3.2.3.6.2	<i>Određivanje vezanih fenolnih kiselina</i> .....	136
3.2.3.7	Analiza glikozidnih veza strukturnih polisaharida .....	138
3.2.3.8	Analiza veličine topljivih polisaharida ekskluzijskom kromatografijom ..	140
<b>3.2.4</b>	<b><i>Frakcioniranje polisaharida stanične stijenke</i></b> .....	<b>141</b>
3.2.4.1	Izdvajanje pektina .....	141
3.2.4.2	Delignifikacija .....	143
3.2.4.3	Izdvajanje hemicelulozne frakcije .....	144
3.2.4.4	Formiranje celuloznog ostatka .....	146
<b>3.2.5</b>	<b><i>Optimizacija izdvajanja pojedinih polisaharidnih frakcija</i></b> .....	<b>146</b>
3.2.5.1	Optimizacija izdvajanja ksilana .....	146
3.2.5.2	Optimizacija izdvajanja pektina .....	149
3.2.5.2.1	<i>Predtretman ultrazvukom visokog intenziteta</i> .....	149
3.2.5.2.2	<i>Primjena kelirajućeg sredstva</i> .....	150
3.2.5.3	Ponovljeno frakcioniranje polisaharida pulpe šećerne repe .....	152
3.2.5.3.1	<i>Izdvajanje pektinskih frakcija</i> .....	152
3.2.5.3.2	<i>Izdvajanje hemiceluloznih frakcija</i> .....	154
<b>3.2.6</b>	<b><i>Parcijalna hidroliza izdvojenih polisaharidnih frakcija</i></b> .....	<b>157</b>
3.2.6.1	Enzimski hidroliza ksilana do ksilooligosaharida .....	157
3.2.6.2	Enzimski hidroliza pektina do oligogalakturonida .....	158
3.2.6.3	Karakterizacija hidrolizata ksilana i pektina tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC-PDA) .....	160
<b>3.2.7</b>	<b><i>Evaluacija prebiotičkih svojstava monokulturom Bifidobacterium animalis ssp. lactis BLC1</i></b> .....	<b>161</b>
<b>3.2.8</b>	<b><i>Primjena pektinskih frakcija u razvoju funkcionalnih dozirnih oblika</i></b> .....	<b>162</b>
3.2.8.1	Priprema jestivog filma i mikroinkapsuliranih čestica .....	162
3.2.8.2	Karakterizacija pripremljenih funkcionalnih dozirnih oblika .....	163
<b>3.2.9</b>	<b><i>Statistička obrada rezultata</i></b> .....	<b>164</b>
<b>4.</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>165</b>
<b>4.1</b>	<b>Analiza osnovnog makrokomponentnog sastava</b> .....	<b>165</b>
<b>4.2</b>	<b>Analiza ekstraktibilne suhe tvari</b> .....	<b>169</b>
<b>4.2.1</b>	<b><i>Ekstrakcijski prinos</i></b> .....	<b>169</b>
<b>4.2.2</b>	<b><i>Jednostavni šećeri</i></b> .....	<b>170</b>
<b>4.2.3</b>	<b><i>Bioaktivni spojevi</i></b> .....	<b>171</b>
<b>4.3</b>	<b>Analiza ugljikohidratne frakcije</b> .....	<b>175</b>
<b>4.3.1</b>	<b><i>Udjeli strukturnih polisaharida</i></b> .....	<b>175</b>

<b>4.3.2</b>	<b><i>Monomerni sastav strukturnih polisaharida</i></b> .....	<b>178</b>
4.3.2.1	Razvoj metoda .....	179
4.3.2.1.1	<i>Tankoslojna kromatografija visoke učinkovitosti (HPTLC)</i> .....	179
4.3.2.1.2	<i>Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC-PDA)</i> .....	183
4.3.2.2	Usporedba s referentnom metodom (GC-FID).....	188
4.3.2.3	Validacija PMP-HPLC-PDA metode.....	192
4.3.2.3.1	<i>Linearnost</i> .....	193
4.3.2.3.2	<i>Limit detekcije i limit kvantifikacije</i> .....	193
4.3.2.3.3	<i>Ponovljivost i preciznost</i> .....	194
4.3.2.3.4	<i>Točnost</i> .....	197
<b>4.3.3</b>	<b><i>Neugljikohidratne komponente polisaharida</i></b> .....	<b>198</b>
<b>4.4</b>	<b>Inicijalni postupak frakcioniranja strukturnih polisaharida</b> .....	<b>200</b>
4.4.1	<i>Polisaharidne frakcije pulpe šećerne repe</i> .....	201
4.4.2	<i>Polisaharidne frakcije ljuske oraha</i> .....	203
4.4.3	<i>Polisaharidne frakcije ljuske kakaovog zrna</i> .....	206
4.4.4	<i>Polisaharidne frakcije ljuske crvenog luka</i> .....	208
4.4.5	<i>Polisaharidne frakcije mahune graška</i> .....	211
<b>4.5</b>	<b>Optimizacija izdvajanja ksilana iz ljuske oraha i mahune graška</b> .....	<b>214</b>
4.5.1	<i>Prinos i sastav izdvojenih frakcija</i> .....	215
4.5.2	<i>Bilance ksiloze</i> .....	221
4.5.3	<i>Strukturne karakteristike izdvojenih hemiceluloznih podfrakcija</i> .....	224
<b>4.6</b>	<b>Optimizacija izdvajanja pektina iz pulpe šećerne repe, ljuske kakaovog zrna i ljuske crvenog luka</b> .....	<b>227</b>
4.6.1	<i>Predtretman ultrazvukom visokog intenziteta</i> .....	227
4.6.2	<i>Ponovljeno frakcioniranje polisaharida pulpe šećerne repe</i> .....	231
4.6.2.1	Prinosi frakcija i monomerni sastav .....	232
4.6.2.2	Strukturne karakteristike pektinskih i hemiceluloznih frakcija .....	238
4.6.3	<i>Primjena kelatora u ekstrakciji pektina iz ljuske crvenog luka</i> .....	250
<b>4.7</b>	<b>Analiza parcijalne hidrolize ksilana i pektina te prebiotičkih svojstava dobivenih hidrolizata</b> .....	<b>256</b>
4.7.1	<i>Profil ksilooligosaharida u hidrolizatima ksilana</i> .....	256
4.7.2	<i>Profil pektinskih oligosaharida u hidrolizatima pektina</i> .....	261
4.7.3	<i>Prebiotička svojstva hidrolizata ksilana i pektina</i> .....	267
4.7.4	<i>Karakteristike funkcionalnih dozirnih oblika pripremljenih s pektinskim frakcijama iz pulpe šećerne repe i ljuske crvenog luka</i> .....	272
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	<b>276</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>281</b>

***Uvod***

## 1. UVOD

Otpad u proizvodnji hrane nastaje u svim fazama proizvodno-distribucijskog lanca. Prilikom procesiranja biljnih prehrambenih sirovina izdvajaju se različiti nejestivi dijelovi, odnosno dijelovi koji su nepogodni za konzumaciju proizvoda u određenom obliku, poput koštica, kora, ljuski, stabljika, iscrpljene pulpe i sl. Takvi biljni ostaci čine neizbježan dio ukupnog otpada u proizvodnom lancu hrane, a s obzirom da su obnovljivi, lako dostupni u velikoj količini i niske početne vrijednosti, postoji velik interes za njihovu ponovnu primjenu. Konvencionalni načini upravljanja biljnim ostacima podrazumijevaju kompostiranje, prehranu životinja, dobivanje energije ili odlaganje na odlagalištima otpada, što često veže dodatne troškove ili ekološka ograničenja. Zahvaljujući suvremenim inovativnim strategijama, u novije vrijeme se različiti biljni ostaci razmatraju kao vrijedne sekundarne sirovine za biorafineriju i daljnju proizvodnju različitih bioproizvoda (biomaterijala, bioenergije i biokemikalija). U prehrambenoj industriji posebno je zanimljiva valorizacija biljnih ostataka izdvajanjem različitih makro- i mikrosastojaka, s potencijalnim funkcionalnim učincima, koji su primjenjivi u razvoju novih prehrambenih proizvoda. S obzirom na biljno podrijetlo, u biljnim ostacima mogu se naći različiti polifenolni spojevi, koji se u funkcionalnom smislu najčešće ističu kao antioksidansi, dok među makrokomponentama uglavnom dominiraju ugljikohidrati, posebice strukturni polisaharidi - pektin, hemiceluloza i celuloza. Udjel i sastav polifenola i strukturnih polisaharida ovisi o vrsti biljnoga materijala. Polifenolni spojevi relativno su niske molekulske mase te se izdvajaju primjenom optimiranih ekstrakcijskih postupaka. Strukturni polisaharidi su makromolekule, sastavni dio biljne stanične stijenke, izrazito složenog sastava i strukture te je njihovo izdvajanje potrebno optimirati s obzirom na povezanost s drugim strukturama u nativnom matriksu, kao i fizikalno-kemijske karakteristike. Iskorištenje ugljikohidrane frakcije biljnih ostataka potencijalno doprinosi značajnoj iskoristivosti materijala, budući da, ovisno o vrsti, ista čini i više od 50 % suhe tvari. Iskoristivost biljnih polisaharida može se promatrati kroz biotehnošku primjenu, kao izvor fermentabilnih šećera za proizvodnju različitih industrijski važnih kemikalija, ali i u prehrambenom smislu kao izvor vlakana, što podrazumijeva polimerne i oligomerne ugljikohidratne oblike. Oligosaharidi se mogu izdvojiti hidrolizom strukturnih polisaharida primjenom enzimskih (najčešće), kemijskih ili fizikalnih postupaka, odnosno kombinacijom navedenih, što najčešće podrazumijeva hidrolizu pektina i/ili hemiceluloze, odnosno proizvodnju pektinskih ili hemiceluloznih oligosaharida. U funkcionalnom smislu, brojna istraživanja ukazuju na potencijal modifikacije sastava i aktivnosti crijevne mikrobiote, odnosno prebiotička svojstva oligosaharida dobivenih iz

sekundarnih biljnih sirovina, što predstavlja značajnu dodanu vrijednost u kontekstu njihove primjene u razvoju inovativnih funkcionalnih proizvoda.

U skladu s navedenim, ciljevi ovoga rada su istražiti potencijal ugljikohidratnih frakcija 5 odabranih sekundarnih biljnih sirovina - pulpe šećerne repe, ljuske oraha, ljuske kakavog zrna, ljuske crvenog luka i mahune graška izdvajanjem pročišćenih polisaharidnih frakcija i naknadnom parcijalnom enzimskom hidrolizom istih do potencijalno prebiotičkih oligosaharida. Također, razvijeni postupci analize ugljikohidrata primjenom suvremenih instrumentalnih tehnika doprinijet će novim spoznajama o sastavu i strukturi polisaharida istraživanih sirovina te će se uspostaviti svojevrsna integrirana analitička platforma primjenjiva u istraživanju ugljikohidratnih frakcija različitih sekundarnih biljnih sirovina.

***Teorijski dio***

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 Otpad i gubici u proizvodnji hrane

Proizvodnja hrane u svijetu u stalnom je porastu uslijed porasta svjetske populacije te zahtjeva složenog i dinamičnog tržišta za stalnom dostupnošću hrane i novitetima. Procjenjuje se kako će svjetska populacija do 2050. godine doseći brojku od 9 milijardi, a sukladno tome proizvodnja hrane trebala bi porasti za 60-70 % u odnosu na danas (Otles i sur. 2015). Međutim, potrebu porasta proizvodnje hrane prate brojni problemi, poput smanjenja obradivih površina uslijed širenja urbanih sredina i devastacije prirodnih resursa (zemlje, vode, biološke raznolikosti) te vezane klimatske promjene (Otles i sur., 2015). Veliki izazov današnje proizvodnje hrane čini otpad budući da, prema podacima Organizacije za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO), gotovo jedna trećina mase proizvedene hrane u svijetu se izgubi, odnosno završi kao otpad (Gustavsson i sur., 2011; Beausang i sur., 2017). Osim gubitka mase hrane, ovaj podatak u svojoj pozadini uključuje i velike ekonomske gubitke te ekološko opterećenje. S druge strane, i uz povećanu proizvodnju hrane, veliki dio svjetskog stanovništva (oko 850 milijuna ljudi u periodu 2012. - 2014. godine (FAO, IFAD i WFP, 2014)) pogođen je značajnim nedostatkom hrane, odnosno glađu. Uzevši u obzir sve navedeno, današnja praksa proizvodnje i distribucije hrane čini se dugoročno neodrživom te nove strategije proizvodnje hrane u značajnoj mjeri uključuju i odgovornosti spram otpada, odnosno smanjenje njegovog nastanka te redistribuciju ili prenamjenu hrane.

Proizvodno-distribucijski lanac hrane (*engl.* food supply chain) započinje primarnom poljoprivrednom proizvodnjom, iza koje slijede industrijska proizvodnja i prodaja, a završava potrošnjom u domaćinstvima. Tijekom ovog tzv. „životnog vijeka hrane“, hrana se gubi na različite načine uslijed tehnoloških, ekonomskih i/ili društvenih razloga. Otpad iz proizvodnje hrane (*engl.* food waste) nije lako definirati s obzirom na složenost cjelokupnog proizvodno-distribucijskog procesa, mnogobrojnih razloga gubitaka te same definicije hrane i otpada. Pojmovi poput „food waste“, „food loss“, „avoidable food waste“, „unavoidable food waste“, „potentially avoidable food waste“ i sl. često se mogu naći u literaturi koja se bavi ovom tematikom, međutim definicije istih se razlikuju (Östergren. i sur., 2014, Tablica 1).



Tablica 1. Odabrane definicije otpada i gubitaka u proizvodnji hrane za sektore proizvodnje i procesiranja (Östergren i sur., 2014).

Pojam	Definicija	Reference
Otpad iz proizvodnje hrane ( <i>engl. food waste</i> )	1) cjeloviti jestivi materijal namijenjen za ljudsku konzumaciju koji je umjesto toga odbačen, izgubljen ili uništen od strane nametnika, te može nastati u bilo kojoj fazi proizvodno-distribucijskog lanca, 2) kao (1), ali uključuje i jestivi materijal koji se s namjerom koristi za prehranu životinja ili nusproizvod procesiranja hrane preusmjeren iz namjene prehrane ljudi, 3) kao (1) i (2), ali uključujući i raskorak između konzumirane energije po glavi čovjeka te potrebne energije.	Parfitt i suradnici (2010)
Otpad iz proizvodnje hrane ( <i>engl. food waste</i> )	Gubici hrane ( <i>engl. food losses</i> ) koji se događaju na kraju proizvodno-distribucijskog lanca (prodaja i konzumacija) te se povezuju s ponašanjem prodavača i kupaca.	Gustavsson i suradnici (2011)
Otpad iz proizvodnje hrane ( <i>engl. food waste</i> )	Otpad koji nastaje tijekom industrijske prerade hrane, distribucije i krajnje konzumacije. Uključuje i svjesne izbore temeljem kojih se jestiva hrana baca.	BCFN (2012)
Otpad iz proizvodnje hrane ( <i>engl. food waste</i> )	Bilo koji organski otpad koji nastaje u fazama poslije berbe ili konzumacije hrane.	Mason i suradnici (2001)
Otpad iz proizvodnje hrane ( <i>engl. food waste</i> )	Otpad koji se sastoji od sirove ili pripremljene hrane te uključuje dijelove hrane koji su odbačeni prije, tijekom ili nakon pripreme hrane u postupcima proizvodnje, distribucije, prodaje ili uslužnih djelatnosti povezanih s hranom te uključuje ostatke od čišćenja povrća, mesa, pokvarenu hranu, suvišak ili pripremljenu hranu.	Reisinger i suradnici (2011)
Otpad iz proizvodnje hrane ( <i>engl. food waste</i> )	Podvrsta gubitaka u proizvodnji hrane koja se potencijalno može izdvojiti za ponovnu ljudsku konzumaciju.	Hodges i suradnici (2011)
Gubitak u proizvodnji hrane ( <i>engl. food loss</i> )	Gubici koji nastaju u tzv. „upstream“ procesima proizvodno-distribucijskog lanca hrane, najviše tijekom berbe, procesiranja i primarne agro-transformacije.	BCFN (2012)
Gubitak u proizvodnji hrane ( <i>engl. food loss</i> )	Odnosi se na smanjenje jestive mase hrane u dijelovima proizvodno-distribucijskog lanca u kojima nastaje isključivo jestiva hrana za ljudsku konzumaciju, a nastaju tijekom proizvodnje, nakon berbe te prilikom procesiranja.	Gustavsson i suradnici (2011)
Jestivi otpad iz proizvodnje hrane ( <i>engl. edible food waste</i> )	Hrana koja je u nekoj fazi prije odlaganja bila prikladna za konzumaciju te uključuje otpad koji se može izbjeći (pr. narezani kruh, jabuke, meso) i otpad koji se možda može izbjeći (pr. korica kruha, kora krumpira).	Reisinger i suradnici (2011)
Otpad iz proizvodnje hrane koji je moguće izbjeći ( <i>engl. avoidable waste</i> )	Jestiva ili moguće jestiva hrana.	Mason i suradnici (2011) BCFN (2012)
Otpad iz proizvodnje hrane koji nije moguće izbjeći ( <i>engl. unavoidable waste</i> )	Nejestivi dijelovi hrane (pr. kore banane).	Mason i suradnici (2011) BCFN (2012)
Gubitak nejestive mase u proizvodnji hrane ( <i>engl. inedible food loss</i> )	Sastojci ili proizvodi koji nisu namjenjeni konzumaciji prema današnjim standardima hrane (pr. kosti, kore).	Møller i suradnici (2012)

Ipak, prema novijoj definiciji proizašloj iz FUSIONS europskog projekta (Östergren i sur., 2014), otpad iz proizvodnje hrane može se definirati kao bilo koja hrana ili nejestivi dio hrane koji se iz proizvodno-distribucijskog lanca hrane uklanja (izgubi se ili preusmjerava) u obliku otpada ili se namjenjuje ponovnoj uporabi (kompostiranje, zaoravanje, anaerobna digestija, proizvodnja bioenergije, spaljivanje, odlaganje u kanalizaciju, na odlagališta otpada ili u more). U pojednostavljenom smislu, otpad u proizvodnji hrane predstavlja nekonzumirani, odbačeni ili izgubljeni dio proizvoda u nekoj od 4 osnovne faze proizvodnje i distribucije hrane: uzgoju i procesiranju, upravljanju i skladištenju, prodaji na tržištu i konzumaciji od strane potrošača (Kumar i Longhurst, 2018). Sličnu definiciju predlaže i Europska komisija u strategiji i ciljevima za kružnu ekonomiju i upravljanje otpadom, kako navode Otles i suradnici (2015), a odnosi se na hranu (uključujući i nejestive dijelove) izgublenu u proizvodno-distribucijskom lancu, osim hrane koja je namijenjena za proizvodnju bio-prozvoda, životinjsku prehranu ili redistribuiranu hranu (pr. donirana hrana). Također, svaki od pojmova koji opisuju otpad i gubitke u proizvodnji hrane ima svoje specifičnosti s obzirom na pojedinu fazu proizvodno-distribucijskog lanca u kojem otpad nastaje te se može interpretirati s masenog (najčešće), ekonomskog ili nutritivnog aspekta (Östergren. i sur., 2014).

Razlozi nastanka otpada tijekom životnog vijeka hrane mnogobrojni su i raznovrsni, ali se najčešće povezuju s potrošačkim i otpadu-orijentiranim ponašanjem potrošača-konzumenata (Parfitt i sur., 2010; Gustavsson i sur., 2011; Beausang i sur., 2017), naročito u krajnjim fazama proizvodno-distribucijskog lanca, poput prodaje na veliko i malo ili potrošnje u domaćinstvima. Međutim, izvjesna količina otpada u proizvodnji hrane neizostavno nastaje od početka proizvodnje, u ranim fazama, prilikom uzgoja, berbe, skladištenja i industrijske obrade, što se u literaturi još naziva i gubitkom hrane (*engl.* food loss), a odnosi se na kvantitativne i kvalitativne gubitke hrane uslijed kojih ista više nije pogodna za ljudsku konzumaciju (Parfitt i sur., 2010; Gustavsson i sur., 2011; Beausang i sur., 2017) te podrazumijeva gubitak kalorijske vrijednosti, nutritivnih svojstava i jestivosti u kvalitativnom smislu te jestive mase u kvantitativnom smislu. Tablica 2 prikazuje primjere otpada iz proizvodnje hrane tipičnog proizvodno-distribucijskog lanca nekog prehrambenog proizvoda.

Jedan dio gubitaka i otpada u proizvodnji hrane, u širem smislu, može se izbjeći, tj. može se spriječiti njihov nastanak promjenom ponašanja, poboljšanjem tehnologije, pažljivijim planiranjem proizvodnje, boljim praćenjem potražnje tržišta i sl., dok drugi dio neizbježno nastaje te ga najčešće čine nejestivi dijelovi hrane (nepovratna promjena kvalitete nekog proizvoda, u konvencionalnom smislu nejestivi dijelovi, izvorno nejestivi dijelovi), ali su sastavni dio sirovine.

Tablica 2. Generički prikaz proizvodno-distribucijskog lanca hrane i otpada koji nastaje u različitim fazama istoga (Parfitt i sur., 2010).

Faza proizvodno-distribucijskog lanca	Primjeri karakteristika otpada iz proizvodnje hrane
(1) Berba - postupanje sa sirovinom tijekom berbe	Jestivi usjevi ostavljeni na polju, zaorani u zemlju, pojedeni od strane ptica i glodavaca, loše optimirano vrijeme berbe, gubitak kvalitete hrane, usjevi oštećeni tijekom berbe zbog loše tehnike branja/žetve
(2) Vršidba	Gubici uslijed loše tehnike
(3) Sušenje - transport i distribucija	Loša transportna infrastruktura, gubici uslijed kvarenja i oštećivanja plodova
(4) Skladištenje	Nametnici, bolesti, kvarenje, kontaminacija, prirodno isušivanje hrane
(5) Primarno procesiranje - čišćenje, kategorizacija, ljuštenje, usitnjavanje, potapanje, sušenje, prosijavanje, mljevenje	Procesni gubici, kontaminacija tijekom procesiranja koja uzrokuje gubitak kvalitete hrane
(6) Sekundarno procesiranje - miješanje, kuhanje, prženje, kalupljenje, rezanje, ekstruzija	Procesni gubici, kontaminacija tijekom procesiranja koja uzrokuje gubitak kvalitete hrane
(7) Kontrola proizvoda - kontrola kvalitete	Odbačeni proizvodi
(8) Pakiranje - vaganje, označavanje	Neprikladno pakiranje oštećuje proizvod, gubitak zrna iz vreća, glodavci
(9) Marketing - prodaja, distribucija	Oštećivanje tijekom transporta, kvarenje, loše postupanje na tržišnici, gubici uslijed nedostatka hladnog lanca
(10) Post-konzumentna razrada recepata: tradicionalna jela, evaluacija novih jela, edukacija konzumenata	Loše skladištenje/planiranje zaliha u domaćinstvima, loša tehnika pripreme hrane - jestiva hrana bačena s nejestivom, ostaci na tanjuru, odbačena zapakirana hrana - krivo tumačenje trajnosti hrane
(11) Kraj „životnog vijeka hrane“ - bacanje hrane u različitim fazama distribucijskog lanca	Odbačena hrana može se zasebno tretirati, služiti za prehranu životinja, miješati s ostalim otpadom i odlagati na odlagalištima otpada

### 2.1.1 Otpad u primarnoj proizvodnji i industrijskoj preradi biljnih sirovina

Industrijska proizvodnja hrane u stalnom je porastu uslijed promjena potrošačkih navika i potražnje za hranom koja udovoljava specijalnim namjenama i interesima, kao što je, primjerice, tzv. brza hrana, instant hrana ili općenito hrana koja se odmah može konzumirati (Chandrasekaran, 2013). Industrijska proizvodnja hrane generira velike količine otpada koji predstavlja problem na nekoliko razina; ekonomskoj, ekološkoj i društveno-odgovornoj, te se danas ulažu veliki naponi kako bi se ostaci u proizvodnji hrane iskoristili na najbolji mogući način.

Tijekom industrijske prerade hrane, neizbježno nastaju i nusproizvodi (nusprodukti, koprodukti) za koje proizvođači nemaju primarni interes, međutim, neki od njih mogu imati potencijalni značaj te tržišnu vrijednost (Chandrasekaran, 2013). Nusproizvodi u kontekstu industrijske proizvodnje hrane mogu se definirati kao ostaci nakon izdvajanja željenog dijela

hrane za daljnje procesiranje, formulaciju proizvoda ili izravnu konzumaciju (Chandrasekaran, 2013), odnosno kao dio sirovine koji nije usmjeren nastanku primarnog proizvoda (Murugan i sur., 2013). Prema Waste Framework Direktivi Europske komisije (2008/98/EC), nusproizvod se može definirati kao tvar ili predmet koji nastaje proizvodnim procesom čija primarna svrha nije proizvodnja istih, a podliježu sljedećim standardima:

- a) izvjesna je njihova daljnja primjena,
- b) mogu se izravno primijeniti bez daljnje industrijske obrade, osim uobičajene industrijske prakse,
- c) sastavni su dio proizvodnog procesa,
- d) daljnja primjena podliježe zakonskim standardima, tj, nusproizvod ispunjava zdravstvene i ekološke standarde te standarde proizvoda za specifičnu namjenu te neće imati ukupni negativni utjecaj na zdravlje ljudi ili okoliš (Östergren, i sur., 2014).

Iz ovakve definicije teško je jasno razaznati je li nusproizvod otpad. Prema nekim interpretacijama, nusproizvodi industrijske proizvodnje hrane mogu se smatrati otpadom iz proizvodnog procesa (Tablica 1), dok prema drugima, a s obzirom na daljnju primjenu (primjerice u prehrani životinja), nusproizvode bi trebalo razmatrati u zasebnom kontekstu (Östergren, i sur., 2014). Stoga se može zaključiti da je pojmove otpada i nusproizvoda možda najbolje koristiti u kontekstu mogućnosti njihove daljnje primjene. Prema tome, ostaci industrijske prerade neke sirovine (agro-industrijski ostaci) imaju potencijal postati nusproizvod ili otpad ovisno o tome na koji način će se istima dalje upravljati. Galanakis (2012) također navodi da se u novije vrijeme sve više koristi pojam „nusproizvodi prehrambene industrije“ (engl. food by-product) umjesto „otpad“ za materijale koji imaju potencijal ponovne primjene kao izvor funkcionalnih komponentata te u razvoju novih proizvoda.

Struktura i sastav agro-industrijskih ostataka mogu biti vrlo različiti te se često radi o specifičnim ostacima uvjetovanim vrstom primarne sirovine, načinom tehnološke obrade, odnosno željenim oblikom i svojstvima glavnog proizvoda (Murugan i sur., 2013). U kontekstu hrane biljnoga podrijetla, ostatke čine različiti nejestivi dijelovi koji se izdvajaju prilikom prerade primarnih sirovina, kao i potencijalno jestivi ili jestivi dijelovi koji se izdvajaju uslijed specifičnog načina prerade sirovine nekim tehnološkim postupkom. Konkretno, najčešće se u iste ubrajaju posije žitarica, slama, ostaci iz mlinova; zatim ljuške, melasa, iscrpljena pulpa u slučaju prerade korjenastog bilja i gomolja; zatim ljuške sjemenki, pogače, dijelovi biljke u slučaju uljarica i mahunarki te kora, ljuške, kožice, sjemenke, koštice, vegetativni dijelovi biljke (stabljika, lišće), komina, iscrpljena pulpa, kod prerade voća i povrća (Galanakis, 2012; Chandrasekaran, 2013). Također, osim nekonzumnih dijelova, ostatke iz prerade biljnih sirovina

mogu činiti i cijeli plodovi koji zbog narušenih mikrobioloških ili senzorskih svojstava nisu prikladni za proizvodnju. Može se zaključiti da glavninu ostataka iz industrijske proizvodnje hrane neizbježno nastaje, što se ne može značajno mijenjati promjenom ponašanja proizvođača prema sirovinama.

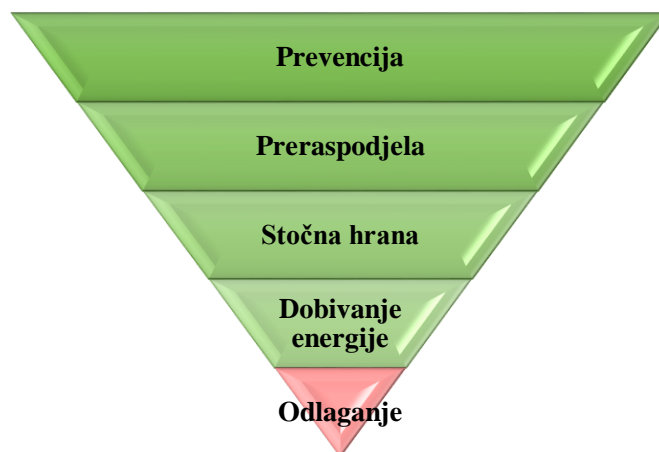
Biljni agro-industrijski ostaci složenog su i zanimljivog sastava u kojem se, ovisno o sirovini, mogu naći značajni udjeli različitih nutritivnih makro- i mikrokomponentata. Potencijal upravljanja ovakvim materijalom upravo je u kemijskom sastavu, bilo da se isti koristi cjelovito ili kao sirovina za daljnju obradu. Cjelovito korištenje uglavnom je u kontekstu konvencionalnih načina prenamjene otpadnih biljnih materijala iz industrijske proizvodnje hrane, dok su s inovativnog aspekta agro-industrijski ostaci potencijalno vrijedne sirovine za proizvodnju novih sekundarnih proizvoda (sekundarne biljne sirovine) ili alternativa (dodatak) primarnim sirovinama.

Za primarnu fazu proizvodnje hrane vrlo je teško procijeniti ukupnu količinu nastalog otpada s obzirom na heterogenost tog sektora te poteškoće u prikupljanju relevantnih podataka. Ipak, dostupni podaci ukazuju da u Europi čak do jedna trećina ukupnog otpada hrane nastaje u primarnoj proizvodnji (Bräutigam i sur. 2014). Općenito, proizvodnja voća i povrća te korjenastog povrća i gomolja generira najviše otpada u proizvodnji od svih drugih proizvoda (Gustavsson i sur., 2011; Bräutigam i sur., 2014). Prema podacima FUSION projekta za 2012. godinu (Stenmarck i sur., 2016), u Europskoj Uniji (EU-28) ukupno 30 % nastalog otpada iz proizvodnje hrane (uključujući hranu i nejestive dijelove povezane s hranom) odnosilo se na primarnu proizvodnju (11 %) i procesiranje (19 %).

## **2.2 Načini upravljanja i valorizacije agro-industrijskog otpada**

Velika količina, organski sastav i relativno visok udjel vode (pogotovo u ostacima iz prerade voća i povrća), glavni su problemi odlaganja biljnog agro-industrijskog otpada zbog velike podložnosti istoga mikrobiološkom i oksidacijskom kvarenju te visokim troškovima transporta i odlaganja. Učinkovito upravljanje ovakvim materijalom od velikog je ekonomskog i ekološkog značaja. Istraživanja pokazuju da s aspekta najpovoljnijeg utjecaja na okoliš iz LCA (*engl.* life cycle assesment) perspektive, izbor upravljanja otpadom iz proizvodnje hrane slijedi hijerarhiju piramide (Slika 1).

Prema navedenoj hijerarhiji, prioritet uspješnog upravljanja čini prevencija nastanka otpada u proizvodno-distribucijskom lancu, a slijede preraspodjela hrane prema potrebitima, korištenje u prehrani životinja, industrijska prenamjena u obliku energije te na kraju odlaganje (Beausang i sur., 2017).



Slika 1. Piramida upravljanja otpadom iz proizvodnje hrane (Beausang i sur., 2017).

U literaturi se mogu naći modifikacije navedene piramidalne hijerarhije (Otles i sur., 2015; Matharu i sur., 2016) kojima je zajedničko da se otpad iz proizvodnje hrane nastoji što duže zadržati u prehrambenom lancu te svi načini koji vode tome su visokoprioritetni. Politika Europske unije uglavnom je usmjerena ovakvom pristupu, s obzirom na razvoj odgovarajućih legislativa, težeći ponovnoj primjeni, odnosno recikliranju otpada i smanjenju količine otpada koja se odlaže na odlagalištima otpada (Otles i sur., 2015).

Osim piramidale hijerarhije, u literaturi se, u kontekstu upravljanja otpadom iz proizvodnje hrane, spominje i koncept tri R - Reduce, Reuse and Recycle koji u sebi sadrže segmente prethodno navedene piramidalne hijerarhije (Murugan i sur., 2013).

### **2.2.1 Konvencionalni načini**

Konvencionalni načini upravljanja agro-industrijskim otpadom obuhvaćaju odlaganje na odlagalištima otpada te recikliranje organske tvari za dobivanje hrane (gnojidba tla, uzgoj životinja, uzgoj gljiva) i dobivanje energije.

#### **2.2.1.1 Odlaganje na odlagalištima otpada**

Odlaganje na odlagalištima otpada metodom ukapanja u zemlju (*engl.* landfilling) koristi se za zbrinjavanje čvrstog otpada te je jedan od najčešćih načina zbrinjavanja agro-industrijskog otpada u zemljama gdje je dostupno dovoljno površine za takvu djelatnost (Murugan i sur., 2013). Iako se radi o organskom materijalu podložnom razgradnji te se odlaganje u zemlju čini kao logičan slijed, ovakav način odlaganja ne podliježe suvremenim ekološkim principima koji nastoje zatvoriti LCA (*engl.* Life Cycle Assessment) koncept-sustav pojedinih prirodnih resursa (Murugan i sur., 2013). U skladu s time, Europska unija kroz svoje direktive (European Landfill Directive (1999/31/EC) i Waste Framework Directive (2008/98/EC)) nastoji smanjiti količinu

otpada iz proizvodnje hrane koji se odlaže ukapanjem u zemlju za čak 90 % do 2020., u odnosu na količinu otpada proizvedenu do 2006. godine (Otles i sur., 2015). Uslijed zakonskih postroženja, odlaganje ukapanjem u zemlju postaje vrlo skupa opcija zbrinjavanja agro-industrijskog otpada (Van Dyk i sur., 2013).

#### 2.2.1.2 Prehrana životinja

Primjena agro-industrijskih ostataka u obliku stočne hrane jedna je od najčešćih „reciklirajućih“ primjena ovakvog materijala (Otles i sur., 2015) te može obuhvaćati i čvrsti i tekući otpad. Na ovaj način fizički se smanjuje konačna količina otpada namijenjenog odlaganju. Također, dio proizvedene hrane vraća se u prehrambeni lanac putem sudjelovanja u uzgoju životinja za ljudsku prehranu, a iz tog razloga, agro-industrijski ostaci korišteni na ovaj način ponekad se ne uvrštavaju u konačnu procjenu količine nastalog otpada iz proizvodnje hrane (Stenmarck i sur., 2016). Primjena agro-industrijskog otpada kao stočne hrane limitirana je vrstom otpada te nutritivnim svojstvima istoga, pri čemu su glavni nedostaci neuravnotežen sastav makronutrijenata te prisutnost komponenata koji životinjama mogu narušiti zdravlje te smanjiti prinos i kvalitetu mesa (Murugan i sur., 2013). Drugi nedostatak ove primjene su visoki troškovi sušenja u svrhu mikrobiološke stabilizacije materijala te smanjenja visokih troškova transporta (Van Dyk i sur., 2013; Otles i sur., 2015). U kontekstu biljnoga otpada, isti je zbog visokog udjela vlakana (celuloze i hemiceluloze) te niskog udjela proteina pogodan za preživače (Van Dyk i sur., 2013; Otles i sur., 2015).

#### 2.2.1.3 Kompostiranje i vermikompostiranje

Kompostiranje je postupak proizvodnje biomase anaerobnom digestijom organskog materijala uslijed djelovanja različitih mikroorganizama (plijesni, bakterija i protozoe) (Otles i sur., 2015), dok se u vermikompostiranju koriste oblici koji žive u zemlji za biokonverziju organskog otpada u proizvod nalik humusu. Oba načina rezultiraju biomasom koja se koristi kao gnojivo u svrhu poboljšavanja svojstava zemlje za uzgoj poljoprivrednih kultura. Kompostiranje i vermikompostiranje provodi se kao alternativa kada agro-industrijski otpad nije pogodno koristiti kao stočnu hranu (Murugan i sur., 2013)

#### 2.2.1.4 Dobivanje energije

Otpad iz proizvodnje hrane ima velik potencijal za dobivanje različitih oblika energije zbog visokog udjela organske tvari, odnosno karakterističnog organskog sastava koji se može prevesti u energiju pomoću prikladnih metoda (Murugan i sur., 2013) te se koristiti kao alternativni izvor energije (iz obnovljivih izvora) i nadopuna korištenju konvencionalnih,

fosilnih goriva. Osnovna dva načina konverzije u neke od oblika energije su termokemijski način i biokemijski način (Murugan i sur., 2013; Otles i sur., 2015), a izbor načina konverzije najviše ovisi o udjelu vode u materijalu.

Termokemijska konverzija agro-industrijskog otpada prikladna je za materijale relativno niskog udjela vode (vlage), manjeg od 50 %, a ovim načinom dobivaju se energijom bogati tekući i plinoviti međuprodukti (Otles i sur., 2015). Od termokemijskih metoda najčešće se koriste spaljivanje, piroliza i uplinjavanje (rasplinjavanje, gasifikacija). Spaljivanje (incineracija) je najjednostavnija metoda uništavanja agro-industrijskog otpada te se najčešće koristi za dobivanje toplinske energije koja se koristi u primarnim procesima uslijed kojih otpad i nastaje, tj. kao pomoćni izvor energije u nekom tehnološkom postupku. Također, ovaj postupak prikladan je za zbrinjavanje potencijalno opasnog organskog materijala, kao i materijala koji nije lako biorazgradiv (Murugan i sur., 2013). Prikladnost otpadnog materijala za spaljivanje najviše ovisi o udjelima vode i nesagorivih komponenata, a glavne nedostatke čine potencijalno negativan utjecaj na okoliš i relativno visok ukupni trošak postupka (Murugan i sur., 2013). Pirolizom i uplinjavanjem dobivaju se bio-ulje i sintetski plin koji se koriste kao intermedijeri za dobivanje bio-goriva (Murugan i sur., 2013).

Kod biokemijskog načina dobivanja energije iz otpadnih organskih materijala, najčešće se govori o anaerobnoj digestiji. Ovaj postupak prikladan je za otpad relativno visokog udjela vode, većeg od 50 %, u kojem se koristi aktivnost raznolike mikrobne populacije u nizu biokemijskih reakcija u anaerobnim uvjetima. Pritom nastaju bioplin (najvećim udjelom metan i ugljikov dioksid ( $\text{CO}_2$ )), kao osnovni produkt, te aktivni mulj, kao nusprodukt. Bioplin se najviše koristi za dobivanje električne energije putem toplinske energije čime se smanjuje korištenje fosilnih goriva u istu svrhu te smanjenja emisije  $\text{CO}_2$  (Pesta, 2006), dok se aktivni mulj može koristiti kao gnojivo (Nishio i Nakashimada, 2013).

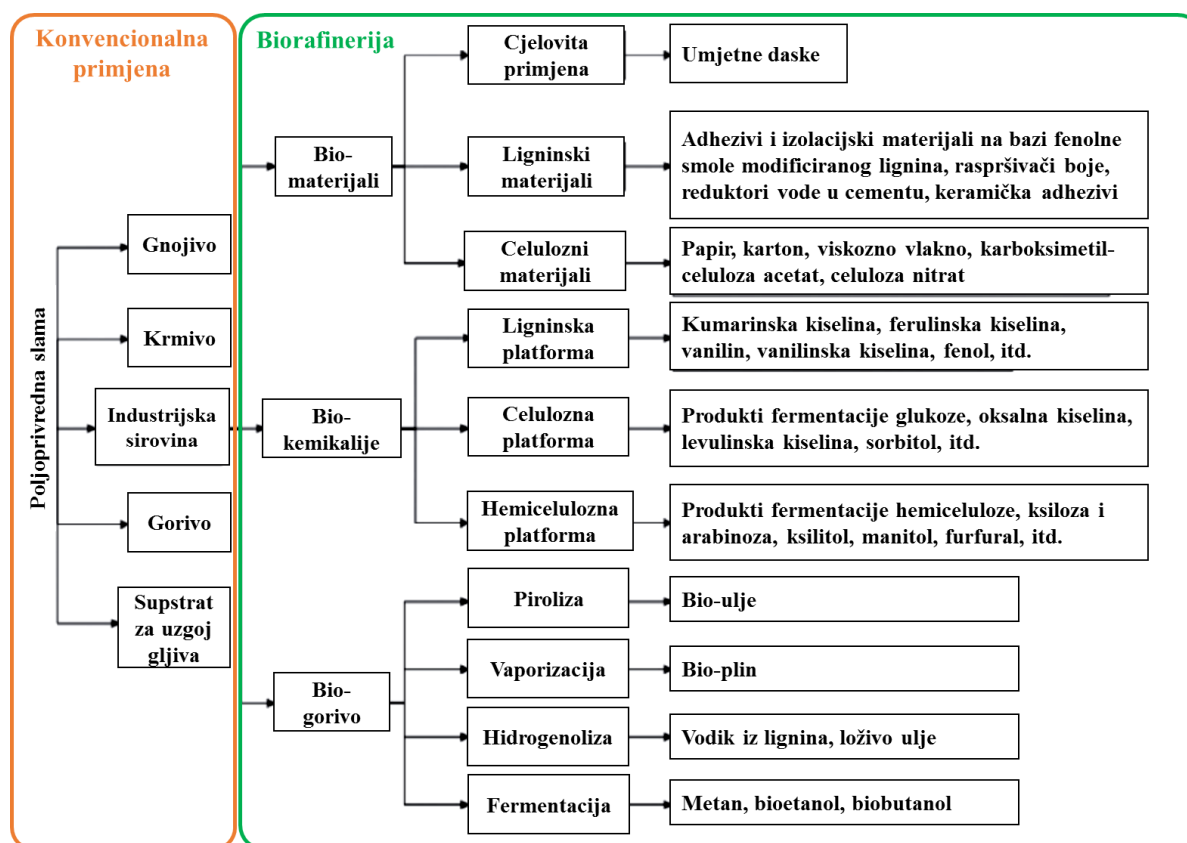
### ***2.2.2 Inovativne metode***

S obzirom na zakonska ograničenja, ekonomske razloge, sve veću svijest o utjecaju na okoliš te nemogućnost i/ili nepraktičnost primjene navedenih konvencionalnih metoda recikliranja za sve vrste organskih ostataka, u današnje vrijeme javlja se potreba za pronalaskom novih mogućnosti zbrinjavanja, tj. preusmjeravanja otpada iz proizvodnje hrane. Pritom su upravo agro-industrijski ostaci, tj. organski otpad iz industrijske prerade hrane najviše razmatran materijal u tom kontekstu zbog relativno dobre očuvanosti materijala te količinske dostupnosti s istog mjesta, primjerice tvornica za preradu određenih sirovina (Galanakis, 2012). U novije vrijeme javlja se pojam valorizacije otpada u proizvodnji hrane, a time i agro-industrijskih



ostataka, koji se može definirati kao općeniti postupak konverzije otpada u proizvode dodane vrijednosti (Chandrasekaran, 2013; Matharu i sur., 2016; Arancon i sur., 2018), pri čemu se dodana vrijednost realizira u ekonomskom i ekološkom smislu. Nove metode korištenja i recikliranja agro-industrijskih ostataka, tj. njihova valorizacija, usmjerene su na povrat vrijednih komponenata (Laufenberg i sur., 2003; Otles i sur., 2015), a povrat se može ostvariti izdvajanjem željenih komponenata, mikro- ili makronutrijenata, u izvornom obliku ili konverzijom istih do krajnjih željenih produkata. Na taj način potiče se iskorištavanje punog potencijala neke sirovine te održivost proizvodnje hrane općenito, a otpadni materijali i nusproizvodi promoviraju se u vrijedne sekundarne sirovine za daljnju industrijsku obradu, odnosno u materijale dodane vrijednosti. Osim navedenog, inovativno korištenje agro-industrijskog otpada podrazumijeva i primjenu novih, učinkovitih tehnologija, bilo da se radi o kemijskim, termokemijskim ili biokemijskim postupcima. Pozitivni učinci povrata različitih komponenata iz agro-industrijskih ostataka dalekosežni su i dugoročni. Primjenom adekvatne metodologije moguće je vratiti dio izgubljenih nutrijenata u prehrambeni lanac te tako povećati iskoristivost dostupne hrane povećanjem njezine količine ili trajnosti (Otles i sur., 2015).

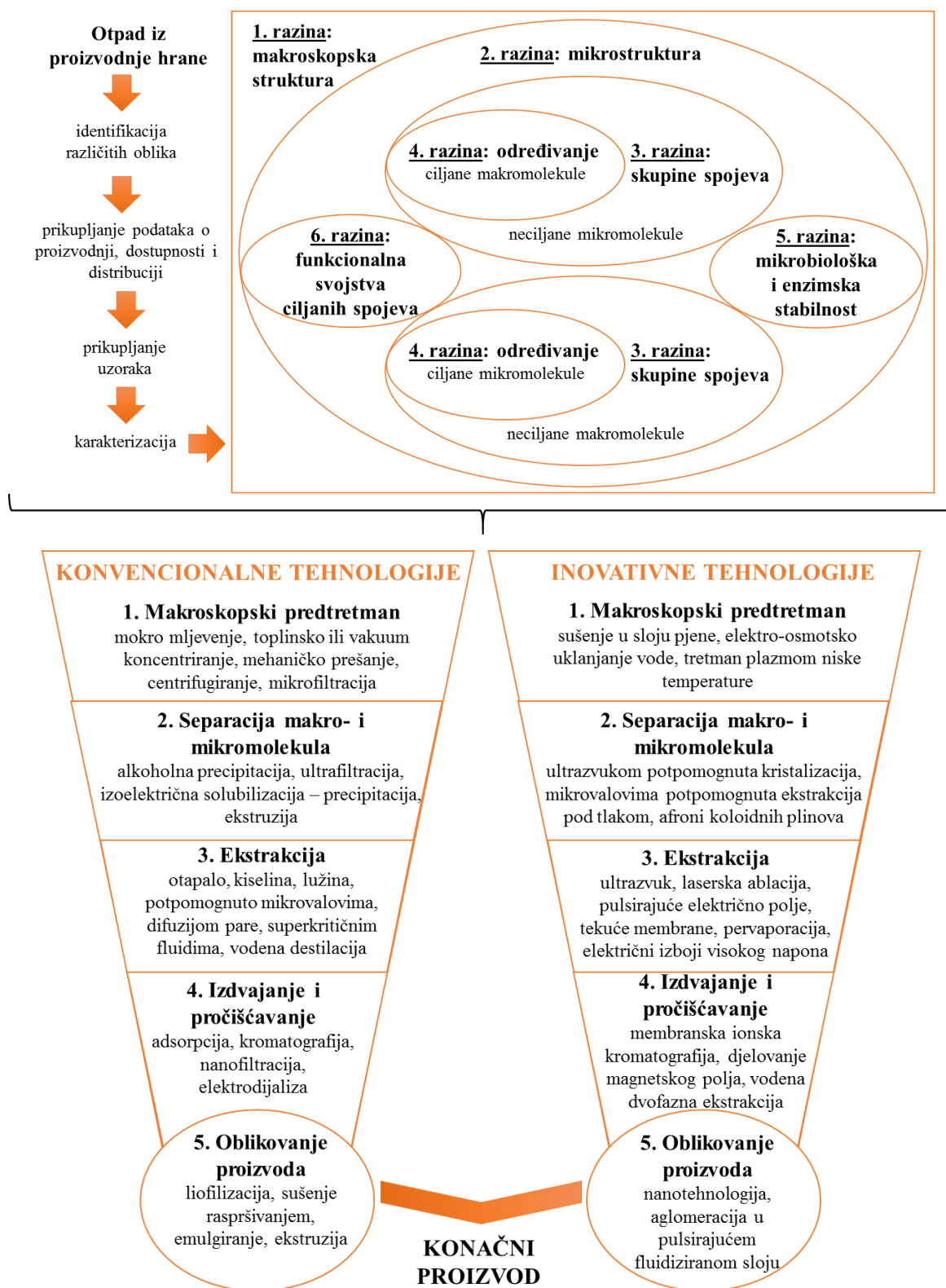
U kontekstu valorizacije agro-industrijskih ostataka sve češće se koristi pojam/koncept biorafinerije. Koncept biorafinerije analogan je klasičnom pojmu petrokemijske rafinerije, prema kojem se agro-industrijski ostaci koriste kao sekundarne sirovine za dobivanje različitih vrsta tzv. bio-proizvoda - biokemikalija, biomaterijala i bioenergije (Cherubini i Ulgiati, 2010; Chen, 2015; Carmona-Cabello i sur., 2018;). Ovaj koncept u suprotnosti je s tradicionalnim pristupom dobivanja jednog proizvoda iz sirovine te omogućuje iskorištavanje nekoliko istaknutih komponenata sekundarne sirovine, a na taj način iskorištenje iste u obliku različitih proizvoda dodane vrijednosti. Koncept biorafinerije za agro-industrijske ostatke uglavnom se istražuje i primjenjuje na lignoceluloznim materijalima, tj. biljnim sekundarnim sirovinama u kojima dominiraju celuloza, hemiceluloza i lignin, ali može se primijeniti i na ostale biljne sekundarne materijale, poput ostataka iz prerade voća i povrća. Za razliku od konvencionalnog načina iskorištavanja biljnog otpada, koncentriranog na agronomiju, stočarstvo i energetiku, novi načini iskorištavanja agro-industrijskog otpada mogu biti usmjereni u različite industrije, putem proizvodnje osnovnih (baznih, platformnih) kemikalija za različite industrijske namjene, kao što su bio-materijali, bio-energija, zatim lijekovi, kozmetički proizvodi te novi prehrambeni proizvodi (Slika 2).



Slika 2. Mogućnosti iskorištavanja poljoprivredne slame u kontekstu konvencionalne primjene i biorafinerije (Chen, 2015).

### 2.3 Ciljane komponente agro-industrijskog otpada i njihov povrat

Struktura i sastav agro-industrijskih ostataka, kao i općenito otpada iz proizvodnje hrane, može se znatno razlikovati ovisno o regionalnim, sezonskim, sirovinskim i tehnološkim parametrima (Galanakis, 2015). Povrat, tj. izdvajanje pojedine komponente ovisi o njezinom udjelu u sekundarnoj sirovini i potencijalnoj industrijskoj ili prehrambenoj važnosti, odnosno dodanoj vrijednosti konačnog proizvoda. S tog aspekta, iz biljnih agro-industrijskih ostataka najčešće se izdvajaju mikrokomponente poput polifenola i pigmenta zbog njihovih antioksidacijskih učinaka, ali također se mogu izdvajati i makrokomponente, poput ugljikohidrata koji se mogu koristiti na konvencionalan način, za poboljšanje tehnološke i senzorske kvalitete prehrambenih proizvoda, a u novije vrijeme kao i funkcionalni dodaci. Bez obzira na vrstu ciljane komponente, planiranje valorizacije agro-industrijskih ostataka može se opisati općenitom strategijom (Galanakis, 2015) koja se sastoji od nekoliko faza (Slika 3). Prvo je važno identificirati vrstu i strukturu agro-industrijskog ostatka te prikupiti podatke o količini, distribuciji i dostupnosti materijala kako bi se mogla planirati proizvodnja, iskorištenje sirovine i sl., ne nužno važno iz uskog gledišta povrata neke komponente, već iz perspektive isplativosti cjelokupnog procesa. Nakon toga se prikupljaju uzorci te slijedi njihova karakterizacija.



Slika 3. Univerzalna strategija povrata različitih mikro- i makrosastojaka iz agro-industrijskih ostataka (Galanakis, 2012; Galanakis, 2015).

U konačnici, potrebno je evaluirati faktore stabilnosti ciljanih komponenata, poput mikrobiološke i enzimske stabilnosti cjelokupnog matriksa, i zatim slijedi postupak izdvajanja

ciljane komponente ili grupe komponenata, koji se može pojednostavljeno definirati u 5 koraka, kako je opisano u radu Galanakisa (2012).

Prilikom makroskopskog predtretmana ujednačava se otpadni materijal na makroskopskoj razini kako bi se olakšalo izdvanje pojedinih komponentata, tj. povećala permeabilnost materijala, a također je poželjno koncentrirati ciljane komponente smanjenjem udjela vode te ih mikrobiološki i enzimski stabilizirati. Slijede postupci izdvajanja makromolekula i/ili mikromolekula odgovarajućim metodama te pročišćavanje i oblikovanje konačnog proizvoda. Predloženi koraci mogu se modificirati sukladno karakteristikama pojedinih ciljanih komponenata, a ukupni postupak treba zadovoljavati sljedeće ciljeve:

- a) maksimiziranje prinosa ciljanih komponenata,
- b) izdvajanje ciljanih komponenata u čistom i za konzumaciju sigurnom obliku,
- c) prilagodba potrebama procesne industrije,
- d) sprječavanje deterioracije materijala, autotoksidacije i smanjenja funkcionalnih svojstava ciljanih komponenata,
- e) osiguravanje jestivosti konačnog proizvoda u smislu prehrane kakvoće (*engl. food grade*),
- f) osiguravanje održivosti procesa u sklopu prehrambene industrije (Galanakis, 2015).

Osim identifikacije ciljanih komponenata i njihovih funkcionalnih svojstava, potrebna je integracija odgovarajućih postupaka, uključujući tehnologiju i otapala, kako bi se postigla željena učinkovitost izdvajanja. Pri odabiru postupka vrlo važnu ulogu ima poznavanje strukture biljnoga tkiva i raspodjele ciljanih komponenata unutar istoga, kao i fizikalno-kemijskih svojstava makro- i mikromolekula (Galanakis, 2015). Jednako tako, danas se sve više istražuje primjena inovativnih tehnologija za izdvajanje željenih komponentata, kao vrlo često ekološki prihvatljivijih i učinkovitijih inačica konvencionalno korištenih metoda.

### **2.3.1 Funkcionalni sastojci agro-industrijskog otpada**

Ekstrakcijom i povratom vrijednih sastojaka iz agro-industrijskih ostataka povećava se iskorištenje izvorne sirovine te se istovremeno smanjuje količina potencijalnog otpada, odnosno ostataka koji nemaju novu mogućnost primjene.

Zbog iznimno bogatog kemijskog sastava, mogućnosti valorizacije biljnih agro-industrijskih ostataka za prehranu ljudi su brojne. Biljni agro-industrijski ostaci, posebice ostaci prerade voća i povrća, potencijalno su važan izvor različitih funkcionalnih sastojaka, poput antioksidansa-polifenola, fenolnih kiselina i pigmenta (Goñi i Hervert-Hernández, 2011; Babbar i sur., 2015) te prehrambenih vlakana (McKee i Latner, 2000; O'Shea, 2012).

### 2.3.1.1 Bioaktivni spojevi (fitokemikalije)

Hrana biljnoga podrijetla sadrži brojne mikrokomponente, među kojima i sekundarne biljne metabolite koji imaju biološko djelovanje i blagotvoran učinak na zdravlje ljudi uslijed redovite konzumacije (Tomás Barberán, 2007). U skladu s time, u literaturi se ovi spojevi često navode kao fitokemikalije (fitonutrijenti), odnosno biološki aktivni (bioaktivni) spojevi, a označavaju nenutritivne komponente hrane koje pokazuju pozitivne učinke na zdravlje ljudi i povezuju se s prevencijom razvoja mnogih kroničnih stanja i bolesti (Goñi i Hervert-Hernández, 2011; Naumovski i sur., 2017). Sekundarni biljni metaboliti velika su skupina molekula različitih strukturnih i kemijskih karakteristika te lokalizacije unutar biljnih tkiva. U organizmu biljke ovi spojevi imaju različite uloge, najčešće povezane sa zaštitom od različitih biotičkih i abiotičkih faktora, te njihovo nakupljanje ovisi o stupnju razvoja biljke i potrebi za zaštitom (Naumovski i sur., 2017). S aspekta neke biljne vrste i/ili njezinih dijelova kao hrane, bioaktivni spojevi doprinose različitim senzorskim karakteristikama, poput boje, mirisa, arome (najviše izraženo kod voća i povrća) te imaju već spomenuti veliki funkcionalni potencijal. Primarna zaštitna uloga sekundarnih biljnih metabolita uvjetuje njihovo nakupljanje najčešće u vanjskim dijelovima biljnih tkiva, kao što su kora ili lišće, koja se narijetko prilikom industrijske prerade izdvajaju u obliku agro-industrijskih ostataka. Izdvajanje bioaktivnih sastojaka rastući je trend valorizacije agro-industrijskih ostataka, pri čemu se prvensteno koriste ostaci iz prerade voća i povrća zbog prirodnog bogatstva bioaktivnim spojevima (Schieber i sur., 2001; Laufenberg i sur., 2003). Mogućnost daljnje primjene može se zasnivati na iskorištavanju biološkog potencijala ovih spojeva ili pak poboljšavanju senzorskih svojstava (boje, arome) i trajnosti hrane, tj. korištenja u obliku prirodnih aditiva (Tomás Barberán, 2007; Vuong i Athenton, 2007). U kontekstu prvo navedenoga, isti se mogu koristiti kao sastojci proizvoda dodane vrijednosti namijenjenih ljudskoj prehrani i to u formulacijama nutraceutika - posebno formuliranih proizvoda, dodataka hrani, koji nalikuju farmaceutskim proizvodima te kao aktivni sastojak sadrže prirodno prisutne komponente hrane u visokim dozama koje mogu polučiti željeni zdravstveni učinak, ili pak kao sastojci funkcionalnih prehrambenih proizvoda - kao dodatak konvencionalnim proizvodima, tj. sredsvo za obogaćivanje istih, ili u razvoju inovativnih proizvoda namijenjenih poticanju zdravlja ljudi (Tomás Barberán, 2007). Korištenje bioaktivnih sastojaka kao prirodnih aditiva može se smatrati nešto konvencionalnijim pristupom, a dodana vrijednost prilikom tog načina primjene očituje se u korištenju prirodnih spojeva od kojih mnogi uz primarnu funkciju poboljšanja senzorske kvalitete mogu imati i sekundarne zdravstvene učinke. U tom smislu, bioaktivni sastojci se

moгу koristiti u različitim namirnicama kao antioksidansi (u namirnicama visokog udjela lipida), konzervansi za sprječavanje mikrobnog rasta te prirodna bojila (Vuong i Athenton, 2007). Bioaktivni spojevi, čiji potencijalno dobar izvor mogu biti agro-industrijski ostaci, mogu se podijeliti u 3 osnovne skupine; polifenoli, terpenoidi (monoterpeni (komponente arome i esencijalnih ulja), triterpeni (ergosterol, sitosterol, kampesterol) i tetraterpeni (likopen,  $\beta$ -karoten,  $\beta$ -kriptoksantin i dr.)) i organosumporne komponente (aliin i alicin iz porodice *Alliaceae* te glukozinolati iz porodice *Brassicaceae*) (Tomás Barberán, 2007). Osim u prehrambene svrhe, bioaktivni spojevi iz otpadnih biljnih ostataka imaju potencijal primjene i u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Baiano, 2007; Rodrigues i sur., 2007).

S aspekta bioloških učinaka bioaktivnih spojeva, antioksidacijsko djelovanje zasigurno je jedno od najznačajnijih i, posljedično, najviše istraživanih svojstava. Općenito, antioksidansi su vrlo važne komponente ljudske prehrane, a čine ih različite molekule, uglavnom biljnoga podrijetla, relativno male molekulske mase, (ali mogu biti i vrlo složene molekularne strukture pa i relativno velike mase), koje iskazuju zaštitno djelovanje s obzirom na oksidacijske procese uzrokovane reaktivnim kemijskim vrstama, poput slobodnih kisikovih ili dušikovih radikala, koji u biološkim sustavima imaju najsnažnije prooksidativno djelovanje (Halliwell, 1994). U živim organizmima postoje stanični antioksidacijski mehanizmi koje štite stanične makromolekule (DNK, proteine) od oksidacijskih oštećenja, međutim unos dodatnih antioksidansa prehranom općenito može poboljšati obrambeni status organizma od oksidacijskog stresa te unaprijediti postojeće mehanizme. Prema tome, antioksidansom se može smatrati svaka tvar ili molekula koja značajno odgađa ili prevenira oksidaciju neke molekule kada se nalazi u značajno manjoj koncentraciji od molekule koju štiti od oksidacijskog djelovanja (Panouillé i sur., 2007). Osim kao funkcionalni dodatak, prirodni antioksidansi često se koriste i kao prirodni aditivi koji osiguravaju stabilnost pojedinih komponenata hrane, primjerice masti, zamjenjujući tako sintetičke antioksidanse koji se dodaju tijekom industrijske proizvodnje, poput butil hidroksitoluena (BHT) ili butil hidroksianisola (BHA), a uz čije se korištenje vežu negativne konotacije te ih novije generacije informiranih potrošača izbjegavaju (Azizah i sur., 1999).

Najvažniji antioksidansi u prehrani ljudi su polifenoli (Tylewicz i sur., 2018), a osim njih izražena antioksidacijska svojstva imaju i neki karotenoidi, poput likopena i  $\beta$ -karotena (Ribeiro i sur., 2018). Polifenoli (biljni fenoli) je zajednički naziv za veliku skupinu širokorasprostranjenih biljnih molekula koje imaju određene sličnosti u strukturi s obzirom na prisutnost aromatskog prstena, odnosno arenske strukture na koji su vezane hidroksilne skupine. Ova definicija se proteže, odnosno limitira na spojeve koji imaju određena zajednička

fizikalno-kemijska ili biokemijska svojstva, uključujući topljivost, molekulsku veličinu, broj aromatskih struktura ili metabolički put nastanka, kako je navedeno u radu Belščak-Cvitanović i suradnika (2018). Polifenoli su jedna od najbrojnijih i najraznolikijih skupina sekundarnih biljnih metabolita (Scalbert i sur., 2005), brojeći i nekoliko tisuća različitih molekula, a dogovor oko ujednačene klasifikacije ni danas ne postoji u znanstvenoj zajednici te se u literaturi mogu naći različite podjele: prema prirodnom izvoru, distribuciji u prirodi, biološkoj funkciji ili kemijskoj strukturi (Belščak-Cvitanović i sur., 2018). S obzirom na zadnje navedeno, polifenoli se najčešće dijele u 5 skupina: fenolne kiseline, flavonoidi, lignani, stilbeni i ostalo (Grosso i sur., 2014), a flavonoidi se dalje mogu podijeliti na 13 podskupina (Bravo, 1998) među kojima su najvažnije flavonoli, flavanoli, flavanoni, flavoni, izoflavoni, antocijani (Scalbert i sur., 2005). S obzirom da su upravo flavonoidi najbrojnija, najraširenija i najviše proučavana skupina polifenola (Bravo, 1998), često se u literaturi spominje osnovna podjela polifenolnih spojeva na flavonoide i neflavonoide (Galanakis, 2015). Izvori polifenola u prehrani ljudi različite su namirnice biljnoga podrijetla, voće i povrće u prvom redu, a vrsta i udjeli pojedinih polifenolnih skupina i spojeva značajno variraju s obzirom na vrstu i oblik (procesiranost) namirnice. S obzirom da se voće i povrće često uzagaja sezonski ili pak uspjeva u određenim klimatskim područjima, svježih sirovina često se procesiraju kako bi im se osigurala trajnost, dostupnost tijekom cijele godine ili kako bi se dobio željeni oblik namirnice (pr. sok), što rezultira značajnom količinom biljnih ostataka, kao što su kore, kožice, pulpa, sjemenke, peteljke, komina i sl. (Tylewicz i sur., 2018). Najznačajnije količine otpada prerade voća nastaju u proizvodnji sokova i vina te konzerviranju (Panouillé i sur., 2007). Prilikom proizvodnje sokova u prosjeku oko 30-50 % sirovine izdvoji se kao ostatak (Schieber i sur., 2001), najčešće u obliku iscrpljene pulpe ili komine. Ove otpadne sirovine potencijalno su vrlo dobar izvor vodenoneekstraktibilnih polifenola i vezanih polifenola (Galanakis, 2015; Belščak-Cvitanović i sur., 2018). Prilikom konzerviranja, količina nastalog otpada nešto je manja, od 1 % (pr. brusnica) do 20-30 % (pr. brokula ili mrkva) te se uglavnom sastoji od kora, kožica, stabljika, listova (Panouillé i sur., 2007). Općenito se agro-industrijski ostaci mogu smatrati dobrim izvorom polifenola, koncentriranih u biljnim tkivima koja se ne konzumiraju u konvencionalnom smislu ili su nejestiva, ili tkivima koja se uslijed procesiranja izdvajaju i bacaju.

Uz ostatak iz prerade voća i povrća, također i ostaci iz prerade žitarica sadrže brojne značajne biljne fenole (Tylewicz i sur., 2018) te predstavljaju vjerojatno najznačajniji izvor vezanih fenolnih kiselina iz agro-industrijskih ostataka. Vezane fenolne kiseline sastavni su dio biljnih staničnih stijenki gdje su esterski vezane na polisaharidne strukture. Među njima se udjelom ističe ferulinska kiselina (iz podskupine hidroksicimetnih kiselina) (Panouillé i sur., 2007).

Izdvajanje bioaktivnih spojeva iz biljnih matriksa provodi se najčešće ekstrakcijom čvrsto-tekuće uz primjenu otapala kompatibilnih s proizvodnjom hrane (pr. etanol, etil acetat), a izbor otapala ovisi o svojstvima ciljane molekule. Osim konvencionalne ekstrakcije otapalima, danas se intenzivno istražuju i druge, ekološki prihvatljivije i/ili učinkovitije tehnike, poput ekstrakcije superkričnim fluidima ili potpomognutih ekstrakcija (ultrazvuk, mikrovalovi). Poželjno je da se u ekstrakciji koriste svježi biljni materijali s obzirom da tehnike stabilizacije materijala, pr. sušenje, ili dugotrajno čuvanje, mogu denaturirati vrijedne spojeve i prouzročiti gubitke. Također, potrebno je inaktivirati enzime, primjerice polifenol oksidazu, koji koriste bioaktivne spojeve (polifenole) kao supstrat. Dobiveni ekstrakti najčešće se koncentriraju prije krajnje primjene (nutraceutici, funkcionalni sastojak) primjenom sušenja raspršivanjem za dobivanje suhih ekstrakata, ili uparavanjem.

#### 2.3.1.2 Prehrambena vlakna

Biljni agro-industrijski ostaci, poput ostataka iz prerade voća i povrća te žitarica, u sastavu suhe tvari sadrže uglavnom ugljikohidrate te malu količinu proteina i masti (Mirabella i sur., 2014). S obzirom na dominantnu zastupljenost, upravo razmatranje iskorištavanja ugljikohidratne frakcije pruža prednost značajne iskoristivosti mase agro-industrijskih ostataka. Pritom se ugljikohidratna frakcija može iskoristiti na različite načine, a njezin povrat u nutritivne svrhe (izravno ili neizravno) može se smatrati svojevrsnim prioritetom prema prethodno opisanoj piramidalnoj hijerarhiji strategije upravljanja otpadnom biomasom iz proizvodnje hrane (Slika 1).

Korištenje biljnih agro-industrijskih ostataka u obliku prehrambenih vlakana predstavlja gotovo izravan način primjene ugljikohidratne frakcije. Osim toga, prehrambena vlakna mogu se smatrati multifunkcionalnim sastojkom s obzirom da nerijetko zadovoljavaju nekoliko funkcija u prehrambenom proizvodu, kao što su:

- a) nutritivna kvaliteta i promoviranje zdravlja,
  - b) osiguravanje željene strukture (pr. poroznost),
  - c) senzorske karakteristike (pr. tekstura, osjećaj u ustima, svježina),
  - d) fizikalne karakteristike (pr. gustoća, viskoznost),
  - e) tehnološke karakteristike (pr. sposobnost zadržavanja vode, emulgirajuća svojstva)
- (Laufenberg, 2003).

Zajednička definicija prehrambenih vlakana i danas je predmet rasprave mnogih istraživača s obzirom da postoje dva osnovna stajališta promatranja prehrambenih vlakana, a to su kemijska struktura i fiziološki učinak (Prosky, 2001), dok neki autori navode i treći, tzv. „botanički“ faktor



podjele (Guillon i sur., 2000) s obzirom da se definicije uglavnom odnose na konstituente biljnih staničnih stijenki.

Osnovnu definiciju prehrabmenih vlakana dali su Trowell i suradnici (1976), opisujući vlakna kao ostake biljnih staničnih stijenki koji su otporni na hidrolizu enzimima u ljudskom probavnom sustavu te uključuju neprobavljive polisaharide (celulozu, hemicelulozu, oligosaharide, pektin, gume) te voskove i lignin. Ova definicija bila je široko prihvaćena do ranih 1990-ih kada su uslijed napretka analitičkih metoda otkrivene i druge komponente koje pridonose fiziološkim učincima slično kao i prehrabmena vlakna, međutim ne precipitiraju u 78 %-tnom etanolu (do tada standardno prihvaćenoj metodi određivanja topljivih vlakana) (Prosky, 2001). Daljnjim naporima relevantnih regulatornih tijela te istraživačke zajednice formirana je nova proširena definicija kako je navedeno u radu Proskyja (2001): „Prehrabmena vlakna su nejestivi dijelovi biljke ili analogni ugljikohidrati koji ne podliježu digestiji ili apsorpciji u ljudskom tankom crijevu te u potpunosti ili djelomično fermentiraju u debelom crijevu. Prehrabmena vlakna uključuju polisaharide, oligosaharide, lignin i vezane biljne komponente. Prehrabmena vlakna promoviraju pozitivne fiziološke učinke kao što su laksacija i/ili smanjenje razine kolesterola i glukoze u krvi“.

Pritom, analogni ugljikohidrati podrazumijevaju komponente hrane, neprobavljive i koji se ne apsorbiraju, slične biljnim prehrabmenim vlaknima za koja su provedena istraživanja, dok se pod vezanim biljnim komponentama podrazumijevaju voskovi, suberin i kutin (Prosky, 2001). Tablica 3 prikazuje pregled glavnih prehrabmenih vlakana.

Iako ne pridonose potrebnoj energiji ili građivnim jedinicama ljudskog organizma, te se u tom smislu mogu smatrati nenutritivnim komponentama hrane, važnost vlakana u prehrani ljudi vrlo je velika budući da vlakna sudjeluju u metabolizmu, apsorpciji te ekskreciji mnogih sastojaka hrane i metaboličkih produkata njihove digestije. Uloga prehrabmenih vlakana povezuje se s mnoštvom zdravstvenih učinaka, a počeci takvih istraživanja mogu se naći u radovima trojice liječnika iz druge polovice 20. stoljeća, Burkitta, Trowella i Walkera, usmjerenima na usporedbu načina života i prehrane dijelova afričke i europske populacije s pojavnošću nekih oboljenja (Kritchevsky, 2001). Do danas su provedena brojna istraživanja o fiziološkim svojstvima i povezanim zdravstvenim učincima koja se oslanjaju na fizikalno-kemijska svojstva i/ili fermentabilna svojstva prehrabmenih vlakana (Guillon i sur., 2000; Kritchevsky, 2001). Primjerice, fizikalna svojstva zadržavanja vode i geliranja utječu na gastričko pražnjenje, formiranje fecesa i apsorpciju nutrijenata.

Tablica 3. Klasifikacija, strukturne karakteristike i najčešći izvori polisaharida koji se smatraju prehrambenim vlaknima (Guillon i sur., 2000).

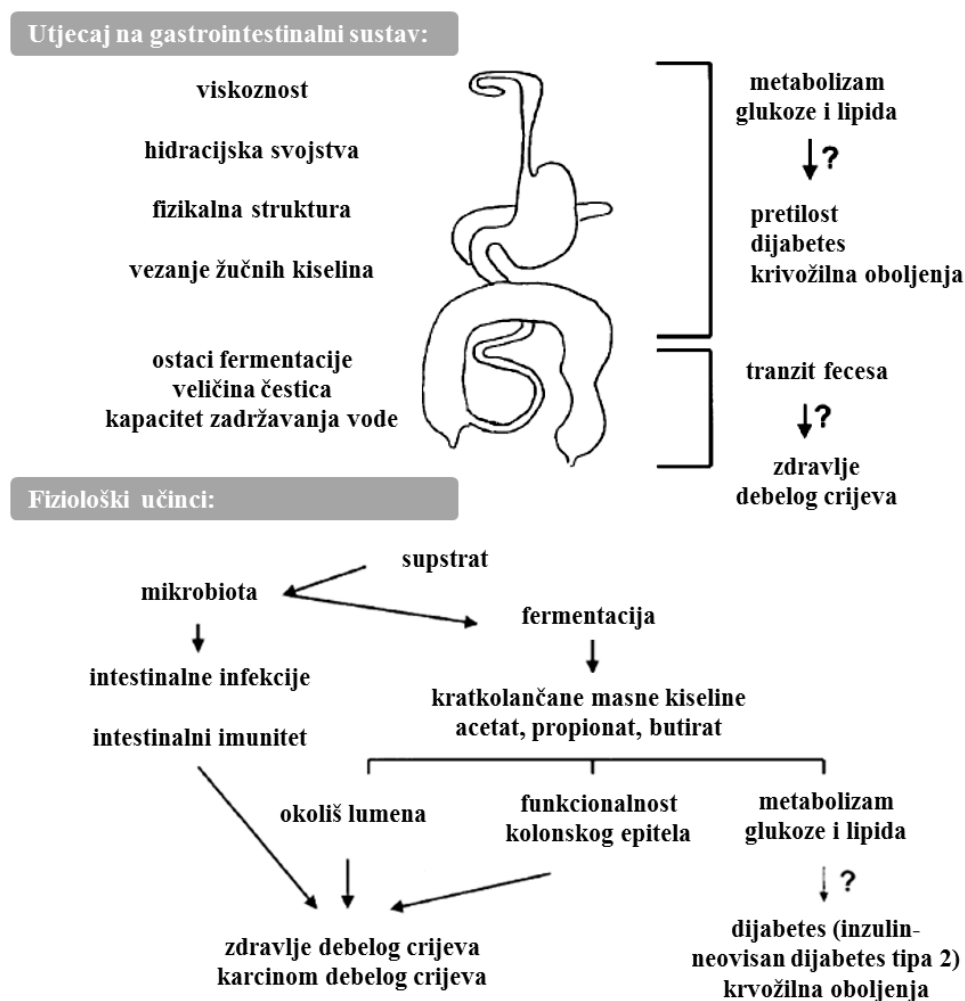
Skupina	Komponente	Struktura (veze u okosnici)	Glavni izvori
Polisaharidi: staničnih stijenki viših biljaka	Celuloza Hemiceluloze	$\beta$ -D-glukan (4-vezan) Ksiloglukan Ksilan	Dikotiledoni Dikotiledoni Monokotiledoni
	Pektinske tvari	$\beta$ -D-glukani mješovitih veza (3- i 4-vezani) Galakturonani i ramnogalakturonani Arabinan ( $\alpha$ -L-5-vezan, s bočnim lancima) Arabinogalaktan I ( $\beta$ -D-4-vezan, s bočnim lancima)	Monokotiledoni, posebno u ječmu i zobi Dikotiledoni
Druge molekule	Lignin	Kompleksni polifenolni polimer	Zrela biljna tkiva
Hidrokoloidi iz ekstraktata morskih algi	Karagenani	Sulfatirani polimeri sastavljeni od galaktoze i anhidrogalaktoze	Crvene alge, uglavnom <i>Chondrus crispus</i>
	Alginati	Polimeri D-manuronske kiseline i L-guluronske kiseline, monomeri se pojavljuju u tzv. blokovima	Smeđe alge, uglavnom <i>Laminaria digitata</i> , stabljike <i>Laminaria hyperborea</i> , <i>Ascophyllum nodosum</i> , <i>Fucus serratus</i>
Mikrobni izvori	Ksantan guma	Okosnica identična celulozi, s trisaharidnim bočnim lancima sastavljenima od $\alpha$ -D-manoze, $\beta$ -D-glukuronske kiseline i terminalne $\beta$ -D-manoze	<i>Xanthomonas campestris</i>
	Gelan guma	Linearna okosnica sastavljena od 1,3- $\beta$ -D-glukoze, 1,4- $\beta$ -D-glukuronske kiseline, 1,4- $\beta$ -D-glukoze i 1,4- $\beta$ -D-ramnoze	<i>Pseudomonas elodea</i>
Biljni egzudati	Guma arabika	Struktura slična arabinogalakatanu tipa II s kompleksnijim bočnim lancima	Različite vrste akacije
	Guma Karaya	Struktura slična pektinu, bočni lanci sadrže glukuronsku kiselinu	<i>Sterculia</i>
	Guma tragacanth	Pektinska i arabinogalaktan II struktura	<i>Astragalus gummifer</i>
Ekstrakti sjemenki	Guar guma	Galaktomanan, omjer D-galaktoze i D-manoze 1:2	Endosperm sjemenki mahunarki <i>Cyamopsis teragonolobus</i> <i>Ceratonia siliqua</i>
	Lokust (rogač) guma Psilijum	Galaktomanan, omjer D-galaktoze i D-manoze 1:4 Polisaharid sastavljen od arabinoze, ksiloze i galakturonske kiseline	<i>Plantago ovata</i>
Ekstrakti korijena	Konjac	Acetilirani glukomanan	<i>Amorphophallus konjac</i>
Modificirana na celuloza i pektin	Modificirana celuloza	Karboksimetilceluloza Metil-celuloza Hidroksimetilpropil-celuloza	
	Modificirani pektini	Visoko- i niskometilirani amidirani pektini	Komina jabuke, kore citrusa

Tablica 3. Klasifikacija, strukturne karakteristike i najčešći izvori polisaharida koji se smatraju prehranbenim vlaknima (Guillon i sur., 2000) - nastavak.

Skupina	Komponente	Struktura (veze u okosnici)	Glavni izvori
Rezistentni škrobovi	Fizički zarobljen škrob		Cjelovita zrna, sjemenke mahunarki i žitarica
	Granule rezistentnog škroba	Nativni škrob B-tipa (difrakcijom laserskih zraka)	Sirovi krumpir, zelena banana, visoko-amilozni škrobovi
	Retrogradirana amiloza		Visoko-amilozni škrobovi
Oligosaharidi	Fruktooligosaharidi $\alpha$ -galaktozidi (rafinosa, stahioza, verbaskoza)	Sastavljeni uglavnom of fruktoze (glukozil(fruktozil) <sub>n</sub> fruktoza) Saharoza(galaktoza) <sub>n</sub> ; n=1-3	Korijen cikoriije, enzimskom sintezom Grah, leća, grašak

Strukturna svojstva prehranbenih vlakana mogu utjecati na vezanje žučnih kiselina i anorganskih iona. Povećavanje mase fecesa u debelom crijevu, uslijed unosa vlakana, može pospješiti ekskreciju tvari vezanih unutar fekalne mase. Nadalje, sama vlakna, s obzirom da relativno nepromijenjena dospijevaju u debelo crijevo zbog otpornosti na probavne enzime u gornjem probavnom traktu, mogu služiti kao supstrat za rast crijevne mikrobiote, čiji metabolički produkti, poput kratkolančanih masnih kiselina, značajno mogu utjecati na ukupni metabolizam konzumenta (Kritchevsky, 2001).

Slika 4 sažeto prikazuje povezanost fizikalno-kemijskih svojstava prehranbenih vlakana i odgovarajućih zdravstvenih učinaka. Svi navedeni učinci dugoročno se povezuju s prevencijom različitih kroničnih oboljenja poput različitih stanja i bolesti uzrokovanih suvremenim načinom života: dijabetesa, bolesti probavnog sustava te nekih vrsta karcinoma (Kritchevsky, 2001, Rodríguez i sur., 2006). Svojstva prehranbenih vlakana uvelike ovise o njihovom primarnom kemijskom sastavu i strukturi, a koji su opet vezani uz izvor iz kojeg se vlakna izdvajaju te način njihove pripreme. U osnovnoj podjeli, prehranbena vlakna dijele se na topljiva (pektini, gume) i netopljiva (celuloza, lignin, neki hemicelulozni polimeri). Primjerice, apsorpcijska svojstva i vezani učinci najviše se odnose na topljiva vlakna (Nawirska i Kwaśniewska, 2005). Jednako tako, i fermentabilnost ovisi o vrsti vlakana i to o dostupnosti na razini organizacije biljnih tkiva te na razini interakcija molekula unutar tkiva, zatim o strukturi same molekule polimera i na kraju o fermentabilnosti najmanjih i osnovnih jedinica polimera (Guillon i sur., 2000). Tako su, primjerice, sekundarna biljna tkiva (zastupljena u posijama i pljevici žitarica) te visokorazgranati i nasumično razgranati polisaharidi manje podložni fermentaciji u debelom crijevu (Guillon i sur., 2000).



Slika 4. Učinci prehrambenih vlakana u gastrointestinalnom traktu (Guillon i sur., 2000).

Prehrambeni izvori vlakana mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine: vlakna u nativnom/izvornom sastavu različitih namirnica biljnoga podrijetla te vlakna u obliku dodataka, odnosno suplemenata, i to kao sastojaka prehrambenih proizvoda (> 5 %) ili aditiva (< 5 %) u istima (Guillon i sur., 2000). Valorizacija biljnih agro-industrijskih ostataka u obliku preparata prehrambenih vlakana pruža veliki potencijal dobivanja proizvoda dodane vrijednosti te su u literaturi opisani brojni primjeri za različite vrste agro-industrijskih ostataka (Larrauri, 1999; McKee i Latner, 2000; Nawirska i Kwaśniewska, 2005; O'Shea i sur., 2012). Najčešće se ovi biljni materijali koriste za pripremu tzv. koncentrata prehrambenih vlakana, odnosno suhih praškastih preparata visokog udjela vlakana, te za pripremu izolata vlakana, odnosno preparata individualnih polisaharida ili jedne skupine polisaharida (Guillon i sur., 2000).

Koncentrati prehrambenih vlakana (*engl.* (high) dietary fibre concentrates/powders) predstavljaju najjednostavniji oblik primjene, ujedno i cjelovitu primjenu agro-industrijskih ostataka u prehrambene svrhe. Pritom, sekundarna sirovina prolazi niz tehnoloških postupaka

kojma se dobiva stabilan praškasti proizvod, od kojih su najvažniji: mokro mljevenje, ispiranje, sušenje i suho mljevenje (Larrauri, 1999). Mokrim mljevenjem se usitnjava sirovina do optimalne veličine čestica, a time se olakšavaju daljnji postupci njezine obrade. Ispiranjem se uklanjaju nepoželjne komponente sirovine, primjerice mikrobiološka kontaminacija ili jednostavni šećeri koji uzrokuju nepoželjno posmeđivanje prilikom sušenja. Sušenje je osnovni postupak stabilizacije materijala u mikrobiološkom smislu, a rezultira također i smanjenjem troškova transporta i skladištenja uslijed smanjenja mase proizvoda. Ovaj korak u pripremi je ujedno i najskuplji. Suhim mljevenjem formulira se konačni pripravak za lakšu primjenu kao sastojak nekog novog proizvoda. Komercijalni zahtjevi ovakvih pripravaka su: udjel vlakana veći od 50 %, udjel vode manje od 9 %, nizak udjel lipida, niska kalorijska vrijednost (manje od 8,36 kJ/g) te neutralan okus i miris (Larrauri, 1999). Sastav i svojstva koncentrata vlakana ovise o sekundarnoj sirovini te stupnju narušavanja strukture stanične stijenke prilikom pripreme (Guillon i sur., 2000). Njihova najčešća primjena je obogaćivanje nekog prehrambenog proizvoda vlaknima, a također se mogu koristiti kao punila ili funkcionalna zamjena za neki drugi sastojak, najčešće masti (Guillon i sur., 2000). S obzirom na sastav i svojstva te željenu primjenu, mnogi koncentri vlakana u svojoj pripremi prolaze određene modifikacije kojima im se poboljšava funkcionalnost, kao što su: djelomična delignifikacija (za lignocelulozne sirovine; predtretmanom zaluženim vodikovim peroksidom), ekstruzija, inkapsulacija topljivim vlaknima u svrhu poboljšanja teksture, enzimska modifikacija u svrhu poboljšanja senzorskih svojstava (Larrauri, 1999). Obogaćivanje prehrambenih proizvoda vlaknima već je dobro poznato i primijenjeno u praksi, a najpoznatiji primjer su žitarice za doručak te različiti pekarski proizvodi obogaćeni posijama, agro-industrijskim ostatkom prerade žitarica (Rodríguez i sur., 2006). S tog gledišta, ovaj način valorizacije biljnih agro-industrijskih ostataka ne predstavlja novitet, ali ako se uzme u obzir da suvremenim načinom prehrane unosimo nedovoljne količine vlakana za prethodno navedene pozitivne učinke na zdravlje, javlja se potreba za pronalaskom i komercijalizacijom novih izvora vlakana. S obzirom na veliku varijabilnost vlakana te svojstva i učinke koji iz toga proizlaze, vlakna iz novih izvora potencijalno mogu osigurati poboljšana tehnološka ili funkcionalna svojstva krajnjeg proizvoda. Primjerice, vlakna iz voća imaju veći udjel topljivih vlakana, bolju sposobnost zadržavanja vode i ulja te bolju fermentabilnost u odnosu na vlakna iz žitarica (Larrauri, 1999). Osim obogaćivanja vlaknima, korištenje ostatka iz prerade voća i povrća za dobivanje koncentrata vlakana ima potencijal i simultanog obogaćivanja različitim bioaktivnim spojevima budući da se sekundarna sirovina koristi cjelovito (Rodríguez i sur., 2006; Goñi i Hervert-Hernández, 2011), ali i specifičnom aromom (pr. koncentri vlakana citrusa).

Izolati prehrambenih vlakana mogu se dobiti ekstrakcijom iz biljnog matriksa, sušenjem i mljevenjem izvornih prirodnih eksudata ili organskom sintezom (Guillon i sur., 2000). U kontekstu agro-industrijskih ostataka, vlakna čine neškrobni ugljikohidrati biljne stanične stijenke: pektin, hemiceluloza i celuloza, te lignin ukoliko ostaci sadrže sekundarna biljna tkiva, dok se izolati vlakana dobivaju frakcioniranjem polisaharida prikladnim otapalima te se mogu koristiti na različite načine u prehrambenoj industriji, kao poboljšivači tehnoloških i senzorskih svojstava te kao funkcionalni dodaci. Metode izdvajanja pojedinih polisaharidnih izolata (pektina i hemiceluloze) opisane su u idućim poglavljima.

### **2.3.2 Mogućnosti valorizacije odabranih sekundarnih biljnih sirovina**

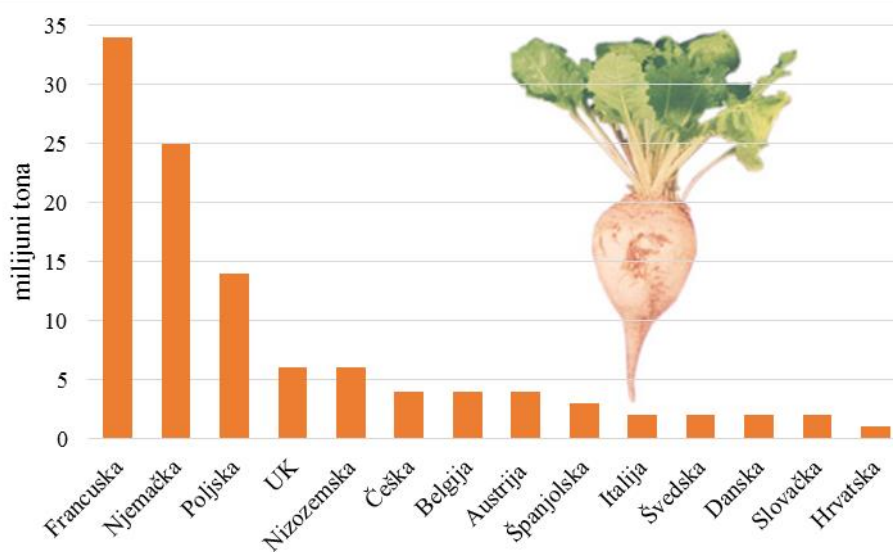
#### **2.3.2.1 Pulpa šećerne repe**

Šećerna repa vrlo je važan prehrambeni usjev te je uz šećernu trsku najvažnija sirovina za proizvodnju saharoze. Najvažnija primjena saharoze upravo je u prehrambenoj industriji (70 % ukupno proizvedenog šećera) gdje je gotovo nazamjenjiva u mnogim prehrambenim proizvodima, ali također se koristi i u drugim industrijama (18 % za proizvodnju biogoriva i 12 % za ostale industrijske primjene) (Höfer, 2015). Uzgoj repe poznat je još iz antičkih vremena kada se ova biljka uzgajala na Mediteranu u mnogim povrtnjacima u kulinarske svrhe, a kasnije se proširila Europom te se koristila i kao stočna hrana (Winner, 1993). Intenziviranje uzgoja repe započinje otkrićem Andreasa Sigismunda Marggrafa, polovicom 18. st., da su slatki kristalići dobiveni iz soka repe istovjetni onima podrijetlom iz šećerne trske. Kako je uzgoj šećerne trske vezan za tropska i subtropska područja, šećer se do tada u Europu uvezio, a otkriće novog izvora šećera koji uspijeva i u umjerenj klimi značilo je njegovu veću dostupnost široj populaciji. Daljnjim naporima selektivnog uzgoja dobivena je šećerna repa kakvu danas poznajemo (Höfer, 2015; Berlowska, 2018).

Šećerna repa (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) jedna je od 4 osnovne skupine uzgajanih vrsta repe (*Beta vulgaris* L.), dok ostale 3 čine tzv. lisnata repa (blitva), vrtna repa (cikla, žuta repa) i stočna repa (Winner, 1993.; Lange, 1999). Današnji tipovi kultivirane repe prema Ford -Lloydu i Williamsu (1975) potječu od zajedničkog pretka, tzv. „maritimne forme“, odnosno jedne od 2 podvrste (ssp. *cicla* i ssp. *vulgaris*) koje su se razvile iz podvrste *provulgaris*. Današnje uzgojene repe pripadaju jednoj od navedenih podvrsta i to podvrsti *cicla* varijeteti *cicla* i *flavescens* (tzv. lisnate repe), dok podvrsti *vulgaris* pripadaju šećerna repa, stočna repa i žuta repa i/ili cikla. U literaturi se šećerna repa također navodi kao varijetet *altissima* podvrste *vulgaris* (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *altissima*) (Anonymous 1, 2018). U industrijski iskoristivom, zreloom obliku šećernu repu čini konusni zadebljani (mesnati, sočni) korijen bijele

boje iznad kojeg rastu listovi iz tzv. glave ili krune, u obliku rozete (Elliot i Weston, 1993; Höfer, 2015). Iskoristivi dio biljke čini upravo korijen koji služi kao skladišni organ u koji biljka pohranjuje saharozu nastalu fotosintezom u nadzemnim listovima tijekom prve godine rasta (Höfer, 2015). Kad je spreman za berbu (u jesen, u prvoj godini rasta), korijen šećerne repe sadrži približno 75 % vode, 0,7-0,9 % anorganske tvari i približno 5-7 % pulpe, dok ostatak čini saharoza, čiji udjel se najčešće kreće oko 18 % (Ralet i sur., 2009; Berlowska, 2018), međutim, ovisno o kultivaru i uvjetima uzgoja, udjel saharoze može iznositi 12 - 21 % (Höfer, 2015).

Šećer (saharozu) proizvedena iz šećerne repe čini približno 20 % ukupne svjetske proizvodnje šećera (Berlowska, 2018), a prema nekim podacima i više, 25-30 % (Ralet i sur., 2009). S obzirom na industrijski značaj, šećerna repa uzgaja se u vrlo velikim količinama. Prema podacima FAO za 2016. godinu (FAOa, 2018), ukupna svjetska proizvodnja šećerne repe iznosila je oko 280 milijuna tona, od čega se gotovo 40 % (110 milijuna tona) odnosilo na proizvodnju u Europskoj uniji, koja je, uz Rusiju i SAD, među 3 najveća svjetska proizvođača šećerne repe (Ralet i sur., 2009; Berlowska, 2018). Slika 5 prikazuje razmjere proizvodnje šećerne repe unutar EU.



Slika 5. Proizvodnja šećerne repe u zemljama Europske unije u 2016. godini (FAO, 2018a).

Premda je tehnološki postupak proizvodnje šećera izrazito kompleksan, može se podijeliti u nekoliko osnovnih faza. Postupak započinje usitnjavanjem korijena repe u tzv. repine rezance i ekstrakcijom saharoze iz repinih rezanaca pomoću vruće vode koja se giba protusmjerno u difuznom tornju. Slijedi čišćenje difuznog soka od nešećernih nečistoća kalcijevim hidroksidom i ugljikovim dioksidom postupcima alkalizacije. Nakon toga se pročišćeni rijetki

sok uparava, a iz uparenog, gustog soka saharoza se izdvaja kristalizacijom. Kristalići saharoze odvajaju se centrifugiranjem, a tekući dio (matični sirup) ponovno se uparava i uvodi u kristalizator do maksimalno opravdanog iskorištenja saharoze (Ralet i sur., 2009; Höfer, 2015). Prema opisanom postupku dobiva se bijeli konzumni šećer, kao osnovni proizvod, te dvije vrste nusproizvoda iz sirovine: pulpa šećerne repe i melasa. Pulpu šećerne repe čini iscrpljeni rezanac šećerne repe preostao nakon ekstrakcije saharoze, a melasu gusta smeđa tekućina (boja se razvije tijekom uparavanja uslijed karamelizacije saharoze) na kraju ciklusa kristalizacije i centrifugiranja, iz koje više nije ekonomično izdvajati saharozu (Ralet i sur., 2009; Harland, 1993). U širem kontekstu, i glave s listovima, koje se izdvajaju u pipremi osnovne sirovine, korijena repe, također se mogu smatrati nusproizvodom proizvodnje šećera. U daljnjem tekstu razmatrat će se samo valorizacija pulpe šećerne repe.

Iz svake tone šećerne repe proizvede se približno 140 kg šećera, iz čega proizlazi da 85 % ukupne sirovine završi kao nusproizvod ili otpad (Panouillé i sur., 2007). Od toga velik dio otpada na pulpu šećerne repe te se iz jedne tone repe, dobije približno 500 kg (mokre mase, ~90 % vode) pulpe šećerne repe nakon ekstrakcije saharoze (Ralet i sur., 2009). Pulpa šećerne repe vrijedan je nusproizvod dostupan u vrlo velikoj količini, a njegova osnovna primjena je za stočnu hranu, preventivno preživača i svinja (Ralet i sur., 2009; Berłowska, 2018) zbog visoke probavljivosti, čak 90 % za navedene skupine životinja (Berłowska, 2018). Pulpa šećerne repe dostupna je u 3 osnovna oblika:


- a) mokra pulpa - udjela suhe tvari 6 - 12 % (u prosjeku 10 %),
- b) prešana pulpa - udjela suhe tvari 18 - 30 % (u prosjeku 27 %),
- c) sušena pulpa - udjela suhe tvari 87 - 92 % (u prosjeku 90 %) (Harland, 1993; Ralet i sur., 2009; Berłowska, 2018).

Sušena pulpa je najstabilniji (najtrajniji) oblik, a dobiva se naknadnim sušenjem prešane pulpe do željenog udjela suhe tvari te se najčešće isporučuje u obliku suhih briketa.

Makrokomponentni sastav pulpe šećerne repe (Tablica 4) čini ju pogodnim materijalom za različite načine valorizacije. U pulpi šećerne repe dominantna je ugljikohidratna frakcija, s najvišim udjelom vlakna (neškrobni ugljikohidrati), odnosno pojedinačnih polisaharida pektina, hemiceluloze i celuloze, zastupljenih relativno jednoliko, što je karakteristika primarnih staničnih stijenki dikotiledona (Ralet i sur., 2009). Upravo je ugljikohidratna frakcija osnova valorizacije pulpe šećerne repe u nove svrhe (za razliku od primjene kao stočna hrana) kako bi se dobili proizvodi dodane vrijednosti, a time i povećala vrijednost šećerne repe kao sekundarne sirovine.



Tablica 4. Makrokomponentni sastav pulpe šećerne repe.

Makrokomponenta		Udjel (% s.tv.)	
Ugljikohidrati		68 <sup>f</sup> ; 75 <sup>i</sup>	
Vlakna			
	<i>Ukupna</i>	76,9 <sup>d</sup> ; 70,0 <sup>e</sup> ; 75,3 <sup>j</sup>	} Glc 22 <sup>i</sup> ; 20,6 <sup>g</sup> Ara 18 <sup>i</sup> ; 19 <sup>g</sup> GalUA 18 <sup>i</sup> ; 20,2 <sup>g</sup> Gal 5 <sup>i</sup> ; 4,6 <sup>g</sup> Rha 2 <sup>i</sup> ; 1,4 <sup>g</sup> Xyl 2 <sup>i</sup> ; 1,6 <sup>g</sup> Man 1 <sup>i</sup> ; 1,3 <sup>g</sup>
	<i>Topljiva</i>	24,8 <sup>d</sup> ; 12,2 <sup>e</sup> ; 25,2 <sup>j</sup>	
	<i>Netopljiva</i>	52,1 <sup>d</sup> ; 57,8 <sup>e</sup> ; 50,1 <sup>j</sup>	
	<i>Pektin</i>	15-25 <sup>a</sup>	
	<i>Hemiceluloza</i>	30 <sup>a</sup>	
	<i>Celuloza</i>	22-24 <sup>a</sup> ; 22 <sup>g</sup>	
Saharoza		4 <sup>f</sup>	
Proteini		10,3 <sup>a</sup> ; 7 <sup>c</sup> ; 12,3 <sup>e</sup> ; 8 <sup>f</sup> ; 10 <sup>h</sup>	
Lignin		5,9 <sup>a</sup> ; 4,56 <sup>b</sup> ; 2 <sup>c</sup> ; 3,2 <sup>h</sup>	
Pepeo		3,7 <sup>a</sup> ; 8 <sup>c</sup> ; 2,5 <sup>e</sup> ; 6 <sup>h</sup>	
Lipidi		1,4 <sup>a</sup> ; 2 <sup>c</sup>	

<sup>a</sup>Berlowska (2018); <sup>b</sup>Broughton i suradnici (1995); <sup>c</sup>Dinand i suradnici (1996); <sup>d</sup>Dongowski, 2007; <sup>e</sup>Filipović i suradnici (2007); <sup>f</sup>Finkenstadt i suradnici (2014); <sup>g</sup>Guillon i suradnici (1998); <sup>h</sup>Kelly (1983); <sup>i</sup>Kühnel i suradnici (2011); <sup>j</sup>Laufenberg i suradnici (2003).

Glc - glukoza; Ara - arabinoza; GalUA - galakturonska kiselina; Gal - galaktoza; Rha - ramnoza; Xyl - ksiloza; Man - manozna.

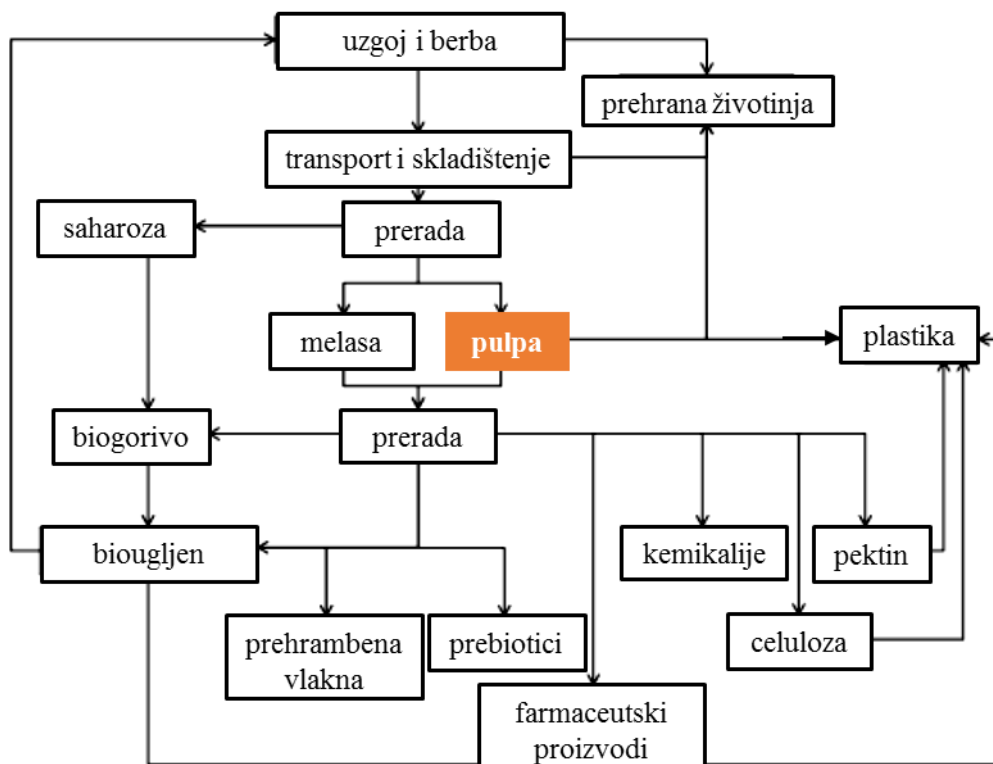
U prehrabene svrhe, polisaharidi pulpe šećerne repe mogu se primijeniti kao cjelovita vlakna (koncentrat vlakana) ili kao izolati polisaharida. Cjelovita vlakna pulpe šećerne repe danas se mogu naći pod komercijalnim nazivom Fibrex® (Nordic sugar), proizvođača Danisco Sugar A/S (Danska), čija godišnja proizvodnja iznosi oko 5000 tona (Ralet i sur., 2009). Dobivaju se industrijskom obradom pulpe šećerne repe u svrhu postizanja željenih fizikalno-kemijskih i senzornih karakteristika vlakana (neutralnost boje, okusa i određenu veličinu čestica), kako bi se ista mogla lakše implementirati u različite prehrabene proizvode. Potencijalni proizvodi za obogaćivanje su žitarice za doručak, pekarski proizvodi, tjestenina, mesni proizvodi, juhe i snack-proizvodi (Ralet i sur., 2009). U odnosu na vlakna posija žitarica (najčešće korištenih u svrhu obogaćivanja vlaknima), vlakna pulpe šećerne repe imaju smanjeni udjel fitata te bolje vežu i zadržavaju vodu, što pridonosi poboljšanoj teksturi i „mouthfeel“ svojstvu (Filipović i sur., 2007; Ralet i sur., 2009), dok se fiziološki učinci najviše očituju u smanjenom tranzitu fecesa te povećanju njegove mase, a postoji određeni pozitivan učinak i na metabolizam lipida (kolesterola) i glukoze (Ralet i sur., 2009; Anonymous 2, 2018). U kontekstu izolata, pulpa šećerne repe obiluje pektinom i arabinanom (više od 50 % stanične stijenke). Pektin iz pulpe šećerne repe slabo gelira pri standardnim uvjetima (u prisutnosti kalcijevih iona ili pri visokoj

koncentraciji šećera u kiselim uvjetima), što se uglavnom pripisuje visokom udjelu acetilnih skupina (visok stupanj acetilacije), a u određenom mjeri i relativno niskoj molekularnoj masi i visokoj razgranatosti molekule u odnosu na pektine iz voća (Ralet i sur., 2009; Berlowska, 2018). Svojstvo slabog geliranja ograničava konvencionalnu primjenu pektina pulpe šećerne repe kao sredstva za geliranje, međutim, isti bi se mogao koristiti za proizvodnju neprobavljivih pektinskih oligosaharida - oligogalakturonida, arabinoooligosaharida i galaktooligosaharida, koji pokazuju potencijal primjene kao prebiotika (Berlowska, 2018). Arabinani iz pulpe šećerne repe pokazuju učinke površinski aktivne tvari te emulgirajući potencijal (Fishman, 2009; Ralet i sur., 2009), a u lineariziranom obliku i svojstvo geliranja koje pogoduje primjeni kao zamjena za mast (McCleary i sur., 1990). Izdvajanje i pročišćavanje arabinana iz matriksa pulpe šećerne repe limitiraju njegovo korištenje pa bi dodana vrijednost u smislu zdravstvenih učinaka mogla pogodovati daljnjim istraživanjima. U tom kontekstu, arabinani iz pulpe šećerne repe mogu se smatrati supstratom za proizvodnju prebiotičkih arabinoooligosaharida.

Pulpa šećerne repe značajan je izvor vezane ferulinske kiseline (0,5 % s.tv. (Finkenstadt, 2014); 0,8 % s.tv. (Micard i sur., 1996)) čijom biokonverzijom se može proizvesti vanilin, najzastupljenija komponenta arome vanilije i ujedno najznačajnija aroma koja se univerzalno koristi u mnogim prehrambenim, kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima (Di Gioia i sur., 2011). U tu svrhu primjenjuje se biotehnoški postupak fermentacije u čvrstom/polučvrstom stanju (*engl.* solid state fermentation), odnosno postupak mikrobnog rasta i vezane metaboličke aktivnosti na netopljivim čvrstim ili polučvrstim supstratima uz nedostatak ili smanjenu količinu slobodne vode u odnosu na klasične postupke fermentacije (Laufenberg i sur., 2003). S obzirom da se sintetički vanilin danas proizvodi kemijskom sintezom iz gvajakola i nusproizvoda papirne industrije, pulpa šećerne repe te ostali agro-insutrijski ostaci bogati ferulinskom kiselinom intenzivno se istražuju kao alternativni prirodni izvori za proizvodnju vanilina kao bioaditiva.

Valorizacija pulpe šećerne repe u neprehrambene svrhe također obuhvaća iskorištavanje ugljikohidratne frakcije, a pritom se koristi fermentacijski potencijal sirovine. Prvo se polisaharidi hidroliziraju i/ili konvertiraju do fermentabilnih jedinica - monomera šećera ili furfurala (enzimski ili kemijski), čijom se fermentacijom ili biokonverzijom dobivaju različiti intermedijerni produkti kao svojevrsna platforma za daljnju proizvodnju različitih proizvoda poput biokemikalija, bioplastike i bioenergije. Primjeri tzv. platformnih kemikalija iz pulpe šećerne repe su furfural, mliječna kiselina i bioetanol (Berlowska, 2018). Osim toga, pulpa šećerne repe može se iskoristiti i u proizvodnji biokompozitnih materijala te biougljena

(Laufenberg i sur., 2003; Finkenstadt, 2014; Berlowska, 2018). Slika 6 shematski prikazuje potencijal valorizacije pulpe šećerne repe.



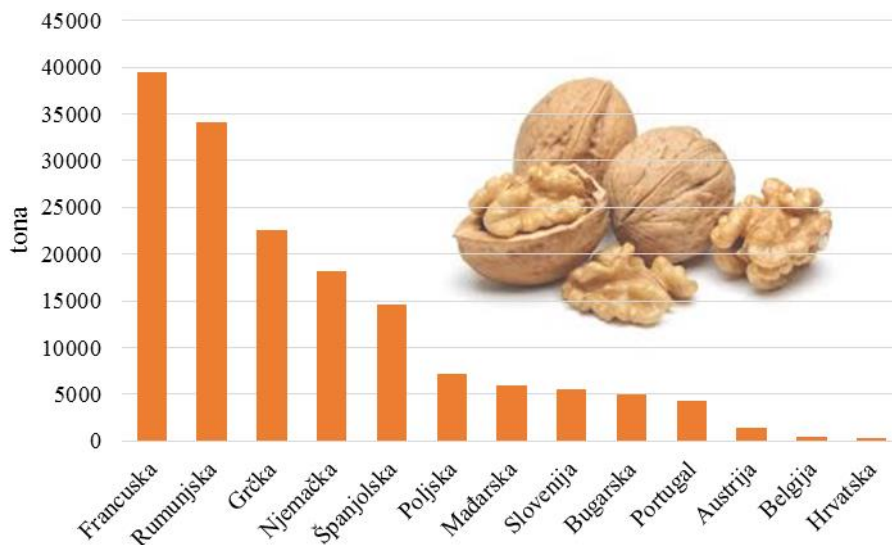
Slika 6. Prikaz mogućnosti cjelovitog iskorištavanja nusproizvoda prerade šećerne repe u proizvode dodane vrijednosti (Finkenstadt, 2014).

### 2.3.2.2 Ljuska oraha

Orah (*Juglans regia* L.) je vrsta jezgrastog voća koja predstavlja važnu sirovinu u prehrambenoj industriji, a konzumira se zbog specifičnog okusa te visokovrijednog nutritivnog sastava. Uz pekan orah, predstavlja komercijalno najznačajniju vrstu roda *Juglans*. Drvo oraha raste u umjerenom klimi te se danas uzgaja na područjima južne Europe, sjeverne Afrike, istočne Azije, Sjedinjenih Američkih Država i sjevernog dijela Južne Amerike (Martínez i sur., 2010). Komercijalno najznačajnija podvrsta oraha je tzv. obični (perzijski, engleski) orah, a smatra se da je isti podrijetlom iz središnje Azije te je proširen na europsko kopno tijekom velikih seoba naroda još u antičko doba (Prasad, 2003).

Prema podacima FAO, svjetska proizvodnja oraha za 2016. godinu iznosila je približno 3,75 milijuna tona (FAO, 2018a). Najveći dio (67,5 %) odnosi se na azijske zemlje, odnosno Kinu kao najvećeg svjetskog proizvođača, a značajnim udjelom u proizvodnji doprinose i Iran te Turska. Sjedinjene Američke Države drugi su proizvođač u svijetu (16,6 % svjetske proizvodnje), a treće mjesto odnosi se na europsku proizvodnju (~ 9 % svjetske proizvodnje).

U Europi je najveći proizvođač Ukrajina, a Europska unija doprinosi s ~ 4,6 % svjetske proizvodnje (Slika 7).

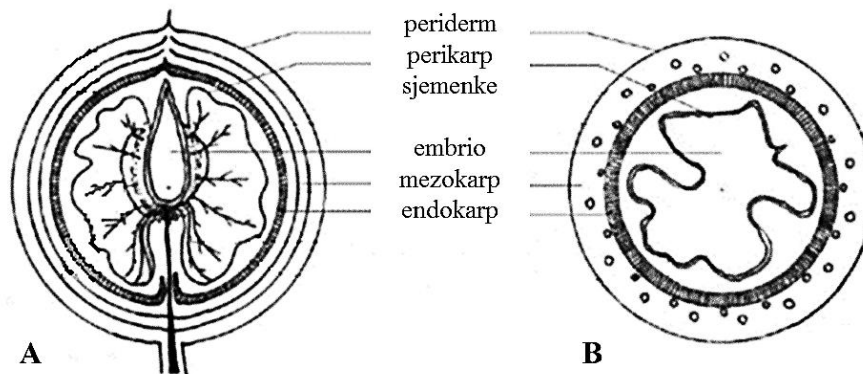


Slika 7. Proizvodnja cijelih oraha u zemljama Europske unije u 2016. godini (FAO, 2018a).

Plod oraha čine dva osnovna dijela: vanjski, sastavljen od mesnatog perikarpa, te unutarnji, koji čini jezgra, odnosno sjemenka (2 kotiledona). Komercijalno iskoristiv dio čini upravo jezgra koja je bogata uljem (u prosjeku 60 %, ali može varirati između 52 i 70 %, ovisno o varijetetu), proteinima (14,5 - 24 %), ugljikohidratima, odnosno vlaknima (12,1 - 18,3 %) te različitim vitaminima, mineralima, biljnim fenolima, tokoferolima (Prasad, 2003). Navedeni kemijski sastav čini jezgru oraha nutritivno vrijednom i energijom bogatom namirnicom, a konzumira se u svježem obliku ili tostirana, samostalno ili kao sastojak drugih prehrambenih proizvoda, u prvom redu pekarskih i konditorskih proizvoda te kao sirovina za proizvodnju ulja (Prasad, 2003; Martínez i sur., 2010).

Da bi se iskoristila jezgra oraha, plodu oraha mora se ukloniti nejestivi perikarp. Perikarp oraha sastoji se od 3 dijela: egzokarpa, mezokarpa i endokarpa, pri čemu se egzokarp i mezokarp vide kao vanjski, mesnati zeleni ovoj (ljuska), dok endokarp predstavlja smeđa čvrsta ljuska koja obavija samu jezgru (sjemenku), a iznad kojeg se nalazi mezokarp (Slika 8) (Prasad, 2003; Wu i sur., 2009; Shugang i sur., 2016). Ljuskicu oraha čine uglavnom sklereide (tip sklerenhimskih stanica, tzv. kamene stanice - *engl.* stone cells), karakterizirane kao odumrle stanice obavijene debelom i čvrstom staničnom stijenkom (~ 90 % volumena stanice (Ayrilmis i sur., 2013)) u kojima se nalazi puno lignina te čija je funkcija isključivo mehanička (Prasad, 2003; Anonymous 3, 2018).


Kad plod sazrije, zelena ljuska se otvori te ostatak ploda (jezgra obavijena čvrstim endokarpom) pada na tlo. Ovakva sirovina konvencionalno se smatra cijelim orahom. Dalje se jezgra izdvaja ljušenjem, odnosno uklanjanjem smeđe čvrste ljuske, koja je ujedno i glavni nusproizvod primarne obrade cijelih oraha.



Slika 8. Dijelovi ploda oraha u uzdužnom (A) i horizontalnom presjeku (B).

Ljuska oraha čini približno 50 % mase cijelog oraha (Prasad, 2003; Hemmati i sur., 2018), a neki autori navode i podatak od 67 % (Pirayesh i sur., 2012), što ukazuje na to da se prilikom izdvajanja jezgri dobiva velika količina otpada koji se, s obzirom na svoj sastav (Tablica 5), može smatrati potencijalno vrijednom lignoceluloznom sirovinom.

Tablica 5. Makrokomponentni sastav ljuske oraha.

Makrokomponenta		Udjel (% s.tv.)	
Ugljikohidrati		47,8 <sup>b</sup> ; 46,6 <sup>c</sup> ; 43 <sup>d</sup>	
	<i>Pektin</i>	-	
	<i>Hemiceluloza</i>	17,7 <sup>a</sup> ; 21,3 <sup>b</sup> ; 21,2 <sup>c</sup>	Glc 22,4 <sup>d</sup> Xyl 16,8 <sup>d</sup> GlcUA 1,7 <sup>d</sup> ostalo* 1,3 <sup>d</sup>
	<i>Celuloza</i>	36,9 <sup>a</sup> ; 26,5 <sup>b</sup> ; 25,4 <sup>c</sup>	
	Lignin	36,6 <sup>a</sup> ; 49,2 <sup>b</sup> ; 49,1 <sup>c</sup> ; 44 <sup>d</sup>	
	Pepeo	2,1 <sup>b</sup> ; 3,6 <sup>c</sup>	

<sup>a</sup>Altun i Pehlivan (2012).; <sup>b</sup>Ayrilmis i suradnici (2013); <sup>c</sup>Pirayesh i suradnici (2012); <sup>d</sup>Sinner i suradnici (1979); Glc - glukoza; Xyl - ksiloza; GlcUA - glukuronska kiselina; \*zbroj ostalih monomera (ramnoza, arabinoza, galaktoza).

Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, GlcUA - glukuronska kiselina.

Ljuska oraha može se koristiti za dobivanje energije spaljivanjem (pomoćno gorivo), a u usitnjenom obliku za proizvodnju kompozitnih materijala, u industriji plastike, kao abraziv, za dobivanje prirodnog bojila, u proizvodnji aktivnog ugljena za bioadsorpciju teških metala i boja, izdvajanje celuloznih fibrila za različite namjene (Prasad, 2003; Tutak i Benli, 2011; Altun

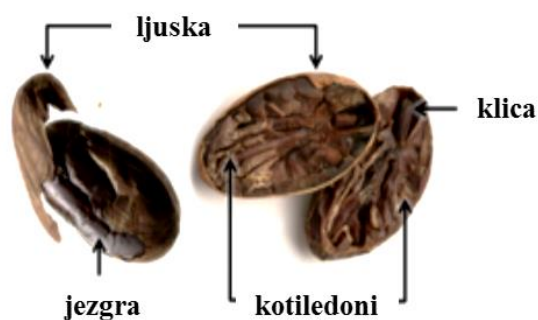
i Pehlivan, 2012; Ayrilmis i sur., 2013; Hemmati i sur., 2018), dok primjena u prehrambene svrhe nije navedena u dostupnoj literaturi.

### 2.3.2.3 Ljuska kakaovog zrna

Kakaovo zrno je osnovna sirovina u proizvodnji čokolade, najpoznatijeg i mnogima omiljenog konditorskog proizvoda. Predstavlja sjemenku ploda kakaovca (*Theobroma cacao* L.), drveta koje raste u toplim i vlažnim subtropskim i tropskim područjima (komercijalno se uzgaja između 20° sjeverne i južne zemljopisne širine), a podrijetlom je iz područja Srednje i sjevernog dijela Južne Amerike (Fowler, 2009). Kakaovo zrno poznavale su i drevne civilizacije Srednje Amerike, a koristile su ga za pripremu cijenjenog napitka (hrana bogova) te kao novac, što govori o njegovoj važnosti. I danas je kakaovo zrno vrlo cijenjeno, zbog karakterističnog okusa i arome te bogatog sastava, a kakaovi konditorski proizvodi vrlo su popularni. Prema podacima ICCO (International Cocoa Organization) za 2008. godinu, prosječna potrošnja kakaovih zrna u svijetu iznosila je 0,55 kg/osobi; europske zemlje su najveći konzumenti kakaovih proizvoda, s prosječnom godišnjom potrošnjom 1,81 kg/osobi, a među njima najviše Belgija/Luksemburg (5,97 kg/osobi) i Švicarska (5,28 kg/osobi), dok je prosječna godišnja potrošnja u Hrvatskoj iznosila 2,14 kg/osobi u ekvivalentima kakaovih zrna (Afoakwa, 2010).

Proizvodnja kakaovog zrna u svijetu za 2016. godinu iznosila je ~ 4,7 milijuna tona (FAO, 2018a), a najveći svjetski proizvođači su afričke zemlje (73,2 % svjetske proizvodnje), u prvom redu Obala Bjelokosti (~40 %) i Gana (20,5 %), a zatim zemlje Južne Amerike (16,6 % svjetske proizvodnje) te zemlje Azije i Oceanije (10,2 % svjetske proizvodnje), prema podacima za 2015./2016. godinu (ICCO, 2018). Kakaova zrna nalaze se unutar plodova (mahuna) u količini 30-45 sjemenki, ovalnog su (bademastog) oblika te su obavijena slatkastom, sluzavom i bijelom pulpom. Nakon dozrijevanja ploda, sjemenke se izvade, fermentiraju zajedno s pulpom i suše te se kao takva koriste kao sirovina (Fowler, 2009). Samo zrno (Slika 9) sastoji se od 2 kotiledona i klice, obavijenih ljuskom (testa) (Fowler, 2009). Kotiledoni čine najveći dio zrna (~ 80 %) te imaju funkciju skladišnog organa koji podržava razvitak klice i stoga su bogati mastima, proteinima i vlaknima. Ljuska čini 12 - 20 % mase zrna (Fowler, 2009; Okiyama i sur., 2017). Uklanjanje ljuske zrna vrlo je važan dio proizvodnje kakaove mase (koja se dalje koristi u proizvodnji čokolade) te, prema odredbi Europske unije (Direktiva 2000/36/EC), udjel ljuske i klice u bezmasnom dijelu kakaovog loma (usitnjene jezgre - kotiledoni) smije biti najviše 5 % (Okiyama i sur., 2017). Značajna prisutnost kakaove ljuske, osim narušavanja senzorske kvalitete konačnog proizvoda, može i otežati daljnju preradu jezgri zrna te abrazivno djelovati na površinu strojeva zbog velike tvrdoće (Okiyama i sur., 2017). Uklanjanje ljuske

kakaovog zrna provodi se toplinskim tretmanom koji uvjetuje isparavanje vode u zrnu uslijed čega se ljuska napuhne i postane lomljiva, što olakšava odvajanje od kotiledona i smanjuje gubitke. Ovaj postupak može se provoditi zasebno (prije) ili zajedno s prženjem zrna u svrhu razvitka arome (Kamphuis, 2009). S obzirom da je nepoželjan konstituent te se izdvaja iz procesa dobivanja osnovnog proizvoda (kakaove mase, čokolade), ljuska kakaovog zrna smatra se nusproizvodom.




Slika 9. Dijelovi kakaovog zrna (Okiyama i sur., 2017).

Ljuska kakovog zrna godišnje se u svijetu proizvede u velikoj količini (~700 000 tona s obzirom na dostupne podatke proizvodnje i udjela u zrnu) i predstavlja značajan nusproizvod konditorske industrije. Glavna primjena ljuske kakaovog zrna je kao sredstvo za malčiranje koje se u poljoprivredi koristi za sprječavanje pretjeranog gubitka vlage iz tla te kao mehanička zaštita od nametnika (Oddoye i sur., 2013). Danas se ipak istražuju i brojne nove mogućnosti valorizacije te primjena u prehrambene svrhe (kao izvora različitih mikro- i makrokomponentata) s obzirom na zanimljiv kemijski sastav (Tablica 6). U tom kontekstu se ljuska kakaovog zrna može iskoristiti kao izvor vlakana i fitokemikalija (polifenola i metilksantina). Vlakna iz ljuske kakaovog zrna uglavnom su netopljiva, sa značajnim udjelom celuloze i lignina, a konzumacija istih u obliku suplemenata vlakana pokazala je blagotvoran učinak na tranzit stolice u debelom crijevu prilikom liječenja konstipacije kod djece (Castillejo i sur., 2006). Lecumberri i suradnici (2007) predložili su primjenu mljevene kakaove ljuske u proizvodnji niskokaloričnih proizvoda bogatih vlaknima, poput čokoladnih keksa ili biskvita, pri čemu bi karakteristična boja i aroma kakaove ljuske pridonosila ukupnoj kvaliteti proizvoda. Mollea i suradnici (2008) evaluirali su ljusku kakaovog zrna kao potencijalno dobar izvor pektina. Dodatak topljivih vlakana ljuske kakaovog zrna (do 6 %) pokazao se isplativim u proizvodnji vlaknima obogaćenog kruha (Collar i sur., 2009) te kao zamjena za mast u proizvodnji čokoladnih muffina (Martínez-Cervera i sur., 2011). Od ostalih makrokomponentata, u sastavu ljuske kakaovog zrna nalazi se i značajan udjel proteina;



međutim, 90 %  $\alpha$ -amino dušika vezano je za oksidirane polifenole te je mogućnost dobivanja proteinskih izolata iz ljuske kakaovog zrna zanemariva (Okiyama i sur., 2017).

Tablica 6. Makrokomponentni sastav ljuske kakaovog zrna.

<b>Makrokomponenta</b>		<b>Udjel (% s.tv.)</b>	
Ugljikohidrati		39,9-49,4 <sup>b</sup> ; 23,2 <sup>e</sup>	
Vlakna			
	<i>Ukupna</i>	60,5 <sup>d</sup> ; 56,1 <sup>e</sup>	} Glc 15,7 <sup>b</sup> Ara 8,7 <sup>b</sup> GalUA 13,4 <sup>b</sup> Gal 3,9 <sup>b</sup> Rha 0,8 <sup>b</sup> Xyl 2,1 <sup>b</sup> Man n.r.
	<i>Topljiva</i>	13,1-18,6 <sup>b</sup> ; 10,1 <sup>d</sup> ; 2,9 <sup>e</sup>	
	<i>Netopljiva</i>	24,2-30,8 <sup>b</sup> ; 50,4 <sup>d</sup> ; 53,2 <sup>e</sup>	
	<i>Pektin</i>	8-9 <sup>f</sup>	
	<i>Hemiceluloza</i>	8,7 <sup>c</sup>	
	<i>Celuloza</i>	17,5-21,4 <sup>b</sup> ; 24,4 <sup>c</sup>	
	Saharoza		
Proteini	14,7 <sup>a</sup> ; 12,5-17,6 <sup>b</sup> ; 16,7 <sup>d</sup> ; 15,8 <sup>e</sup>		
Lignin	24,4 <sup>c</sup> ; 32,4 <sup>d</sup>		
Pepeo	8,2 <sup>a</sup> ; 9,3-12,0 <sup>b</sup> ; 11,4 <sup>c</sup> ; 7,4 <sup>e</sup>		
Lipidi	2,8 <sup>a</sup> ; 1,8-3,0 <sup>b</sup> ; 6,2 <sup>c</sup>		

<sup>a</sup>Fowler, 2009; <sup>b</sup>Bonvehi i Beneria (1998); <sup>c</sup>Chung i suradnici (2003); <sup>d</sup>Lecumberri i suradnici (2007); <sup>e</sup>Martínez i suradnici (2012); <sup>f</sup>Mollea i suradnici (2008).

Glc - glukoza, Ara - arabinoza, GalUA - galakturonska kiselina, Gal - galaktoza, Rha - ramnoza, Xyl - ksiloza, Man - manozna.

S obzirom na mikronutrijente, ljuska kakovog zrna može se smatrati bogatim izvorom polifenola i metilksantina koji u ljusku dospijevaju iz kotiledona tijekom fermentacije zrna (Panak Balentić i sur., 2018; Hernández-Hernández i sur., 2019). Općenito, glavne skupine bioaktivnih spojeva u kakaovom zrnu su proantocijanidini, zastupljeni s 58 %, zatim flavan-3-oli (primjerice katehini), zastupljeni s 37 %, i antocijani, zastupljeni s 4 % (Tallon, 2015). Stoga je za očekivati da se ovi spojevi u određenoj mjeri mogu naći i u kakaovoj ljusci, a ističu se upravo procijanidini, epikatehin i katehin (Panak Balentić i sur., 2018). Potencijalna važnost ljuske kakaovog zrna kao izvora ovih vrijednih spojeva može se ilustrirati odobrenom zdravstvenom tvrdnjom od strane Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) da flavanoli iz kakaovog zrna pomažu održati endotelijski-ovisnu vazodilataciju, što doprinosi normalnom protoku krvi (EFSA, 2014; Tallon, 2015). Acticoa™ (Barry Callebaut AG, Švicarska) kakaov prah i čokolada komercijalni su proizvodi nositelji ove tvrdnje, na tragu prethodnih sličnih proizvoda kao što je CocoaVia® (Mars Inc., SAD). Polifenolni ekstrakti kakaove ljuske iskazuju i antikariogeni učinak te se mogu potencijano koristiti za promoviranje dentalnog



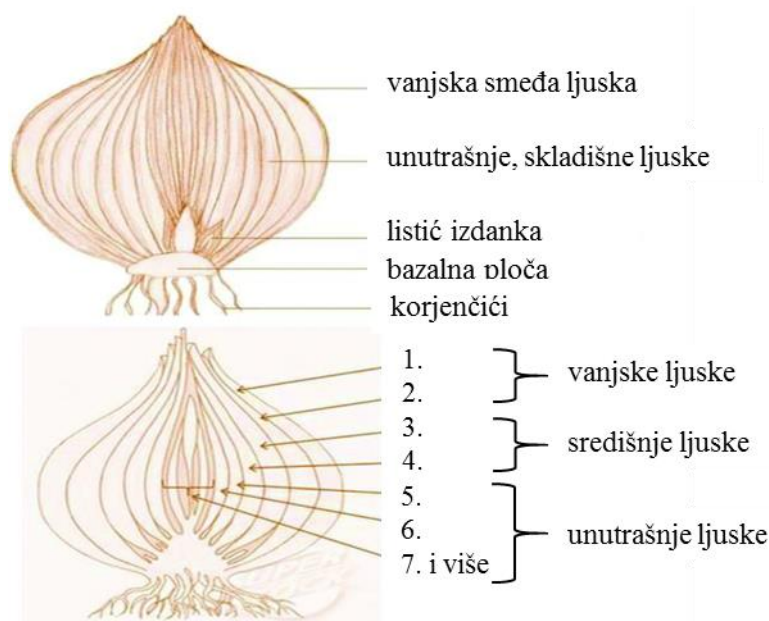
zdravlja (Ooshima i sur., 2000). Ljuska kakaovog zrna značajan je izvor i metilksantina teobromina (u prosjeku 0,9 % s.tv. (Fowler, 2009)), koji ima stimulirajući učinak na središnji živčani sustav te antioksidacijska svojstva (Panak Balentić i sur., 2018).

Ostali načini valorizacije ljuske kakaovog zrna uključuju primjenu kao dodatak stočnoj hrani, pri čemu je glavni limitirajući faktor udjel teobromina koji može bit toksičan u određenim dozama; zatim u proizvodnji biogoriva i aktivnog ugljena, odnosno bioadsorbensa (Panak Balentić i sur., 2018).

#### 2.3.2.4 Ljuska crvenog luka

Luk (*Allium cepa* L.) izrazito je cijenjena sirovina prehrambene industrije (zajedno s drugim vrstama roda *Allium*) te se, zbog specifičnog okusa, koristi kao nezamjenjiva namirnica mnogih svjetskih kuhinja, bilo kao povrće ili začim. Smatra se da je biljka podrijetlom iz središnje Azije, a uzgaja se već 4000 godina, s najranijim zapisima još iz vremena drevnog Egipta (Lewande, 2012). U svojoj tradicionalnoj primjeni, luk se koristio kao ljekovita biljka za liječenje različitih bolesti. Danas se uspješno uzgaja, prvenstveno u prehrambene svrhe, u različitim dijelovima svijeta (najviše u sjevernoj hemisferi te najmanje u tropskim područjima), zahvaljujući dobroj prilagođenosti različitim klimatskim uvjetima i različitoj dostupnosti vode. Dostupan je u mnoštvu različitih varijeteta specifičnih izgledom, bojom, okusom i aromom te je stoga postao gotovo univerzalni sastojak svih tradicionalnih kuhinja. Najčešće se uzgaja za proizvodnju svježih glavica, koje se, osušene, mogu skladištiti dulje vrijeme (i do 9 mj.). Kako bi se smanjili gubici koji nastaju produljenim skladištenjem, luk se procesira u trajnije oblike kao što su dehidrirani luk (pahuljice, kolutovi, glanule, prah), smrznuti luk i konzervirani luk (u octu ili salamuri), od kojih je najzastupljeniji dehidrirani luk (Lewande, 2012).

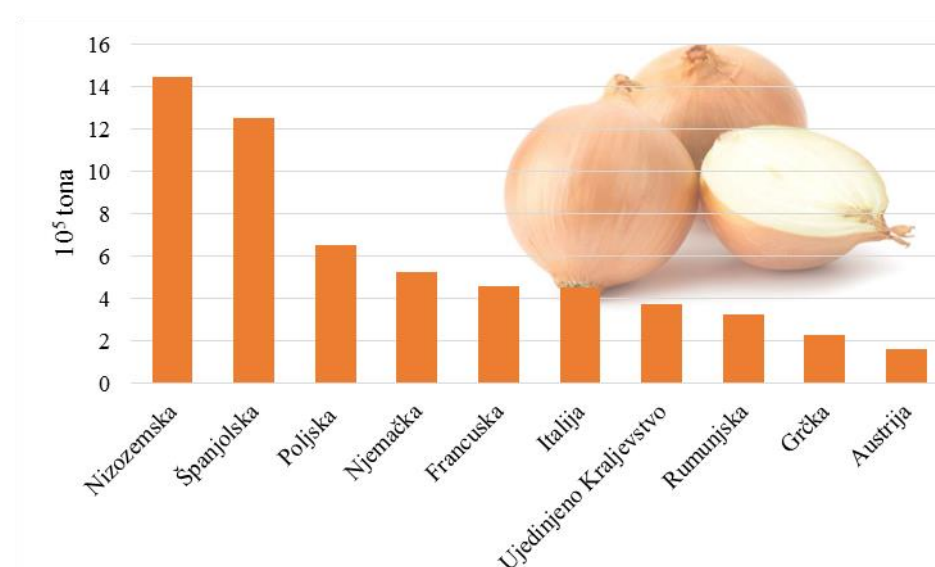
Luk je dvogodišnja biljka, međutim, kao poljoprivredni usjev uzgaja se kao jednogodišnja biljka budući da se iskoristivi dio - lukovica (glavica) luka formira se pri kraju prve godine rasta (Slimestad i sur., 2007). Lukovica je skladišni organ luka koji se formira bubrenjem cilindrično postavljenih baza listova uslijed nakupljanja vode i produkata fotosinteze (asimilata) iz nadzemnih dijelova listova. Modificirani listovi u lukovici nazivaju se još i ljuskama (*engl.* bulb scales), a međusobno su povezani na kratkoj i plostanj stabiljici u obliku diska, tzv. baznoj ploči (Currah i sur., 2012). Slika 10 prikazuje građu glavice luka. U zreloj lukovici, vanjska ljuska očvrstne i čini nepropusnu barijeru koja sprječava isušivanje lukovice (Teshika i sur., 2018).



Slika 10. Dijelovi lukovice luka (Sherma i sur., 2016).

Prema podacima FAO za 2016. godinu (FAO, 2018a), svjetska proizvodnja luka iznosila je ~ 93 milijuna tona. Najveći svjetski proizvođači su azijske zemlje s udjelom od 65,4 %, što se najviše odnosi na proizvodnju u Kini i Indiji (više od 50 %). Proizvodnja u Europi, Africi i Americama približno je jednaka (približno 11,5 %), sa značajnom proizvodnjom u Egiptu, Sjedinjenim Američkim Državama i Turskoj. Proizvodnja luka u Europskoj uniji iznosi približno 7 % svjetske proizvodnje, odnosno 62 % europske proizvodnje, s Nizozemskom i Španjolskom kao najvećim proizvođačima (Slika 11), dok je proizvodnja u Republici Hrvatskoj u 2016. iznosila približno 29 000 tona. Proizvodnja luka u svijetu u stalnom je porastu, a u posljednjih 10 godina proizvodnja je porasla za više od 25 % (FAO, 2018a). Industrijska prerada luka u neke od ranije navedenih oblika također je u porastu, što rezultira generiranjem velike količine otpada. Prema dostupnim podacima, količina otpadne biomase luka koja se godišnje proizvede u Europskoj uniji iznosi približno 500 000 tona, a najviše se generira u Španjolskoj, Velikoj Britaniji i Nizozemskoj (Waldron, 2001). Otpadna biomasa luka obuhvaća vanjske mesnate ljuske, korjenčice, vršne i donje dijelove glavice, kao i cijele glavice neprikladnih svojstava za proizvodnju (Benítez i sur., 2011; Sharma i sur., 2016). Ovakav materijal nije prikladan za konvencionalne načine zbrinjavanja; naime, zbog specifične arome, otpadna biomasa luka ne može se koristiti kao stočna hrana, a također nije pogodna za kompostiranje zbog podložnosti razvoju patogena poput *Sclerotium cepivorum* (bijela trulež) te visoke koncentracije sumpornih spojeva koji mogu opteretiti tlo, kao niti za uporabu u obliku pomoćnog goriva zbog relativno visokog udjela vlage (Jaime i sur., 2002; Benítez i sur., 2011;

Currah i sur., 2012). Stoga se sve više istražuju alternativni načini zbrinjavanja otpadne biomase luka u smislu ekstrakcije i ponovne primjene visokovrijednih sastojaka.



Slika 11. Proizvodnja luka u zemljama Europske unije u 2016. godini (FAO, 2018a).

Kemijski sastav luka ovisi o varijetetu, stupnju zrelosti, okolišu, agrotehničkim uvjetima, skladištenju i dijelu glavice koji se promatra (Benítez i sur., 2011). S obzirom na to, jednoznačno definiranje sastava otpadne biomase luka nije moguće zbog različitih udjela pojedinih dijelova glavice, međutim, ipak se otpadna biomasa luka općenito može smatrati potencijalno dobrim izvorom prehrambenih vlakana (strukturnih ugljikohidrata i fruktooligosaharida (FOS)), polifenolnih antioksidansa i organosumpornih spojeva (Sharma i sur., 2016). Vanjski listovi glavice luka, smeđa vanjska ljuska, kao i vršni dijelovi i korjenčići bogati su netopljivim vlaknima (Jaime i sur., 2002), što se može dovesti u vezu s povećanim udjelom lignina u tim dijelovima lukovice, u odnosu na druge dijelove, ali i karakteristikama strukturnih polisaharida (pektina) koji uvjetuju njihovu netopljivost, te se isti vide kao netopljiva vlakna u konvencionalno korištenim metodama. Monosaharidna analiza strukturnih polisaharida pokazala je prisutnost uronskih kiselina (galakturonske kiseline) i glukoze kao dominantnih monomera u otpadnim dijelovima luka (Ng i sur., 1998; Jaime i sur., 2002), što upućuje na prisutnost značajnog udjela pektinskih tvari i celuloze. Mogućnosti iskorištavanja pektina, kao i prehrambenih vlakana općenito, iz otpadne biomase luka, u literaturi nisu dovoljno istražene, međutim, Lecain i suradnici (1999) navode ovu sekundarnu sirovinu kao potencijalno vrijedan izvor jeftinog pektina. Od inovativnih pristupa valorizacije pektina otpadne biomase luka ističu se istraživanja Babbar i suradnika (2016a) te Baldassarre i suradnika (2018)

usmjerena na proizvodnju prebiotičkih pektinskih oligosaharida. Valorizacija celuloze, kao druge osnovne strukturne komponente otpadne biomase luka potencijalno se može usmjeriti na dobivanje fermentabilnih šećera i njihovu daljnu biotehnološku konverziju (Choi i sur., 2015). Osim strukturnih polisaharida, vlakna otpadne biomase luka u značajnom udjelu čine i nestrukturni ugljikohidrati. Općenito je udjel nestrukturnih ugljikohidrata u luku vrlo velik, čak do 65 % suhe tvari, što se odnosi na glukozu, fruktozu i fruktooligosaharide (Griffiths i sur., 2002; Davis i sur., 2007; Sharma i sur., 2016). Dok su glukozu, fruktozu i saharozu odgovorni za slatkasti okus te doprinose nutritivno-kalorijskoj vrijednosti luka, FOS se najviše ističu zbog svojih funkcionalnih svojstava, budući da su jedan od najpoznatijih prehranbenih prebiotika. Fruktooligosaharidi (FOS) su jedna od skupina fruktana, kompleksnih polimera fruktoze različitog stupnja polimerizacije (broja monomernih jedinica) koji se nadograđuju na ishodišnu molekulu saharoze i prema tome ih se može karakterizirati kao polifruktozilsaharozu. S obzirom na strukturu, fruktani se mogu podijeliti u 3 osnovne skupine: inulinski tip u kojem su fruktozilne jedinice povezane uglavnom ili isključivo  $\beta$ -(1,2) vezom, levanski tip u kojem su fruktozilne jedinice povezane uglavnom ili isključivo  $\beta$ -(2,6) vezom te razgranati tip (graminan) u kojem su zastupljena oba oblika spomenutih glikozidnih veza (Benkeblia, 2013). FOS su, u odnosu na ostale fruktane, karakterizirani nižim stupnjem polimerizacije, međutim, ni danas nije jasno određena granica između oligomernih i polimernih oblika, te se u literaturi mogu naći različiti podaci o klasifikaciji FOS s obzirom na stupanj polimerizacije (Benkeblia, 2013). Udjel FOS u luku, određenih kao zbroj FOS standarada (kestoze, nistoze i fruktofuranozilnistoze) iznosi 30-60 % udjela ukupnih fruktana, ovisno o varijetetu (Jaime i sur., 2001), što navodi na zaključak da su FOS luka uglavnom inulinskog tipa te nižeg stupnja polimerizacije, pri čemu je dominantan FOS oblik kestoza (Jaime i sur., 2001; Benítez i sur., 2012). Novija istraživanja pokazala su prisutnost i drugih FOS oblika u luku, tzv. inulin neoserije (Benkeblia, 2013). U otpadnim dijelovima luka FOS nisu toliko zastupljeni kao u industrijski značajnom dijelu glavice (udjel FOS smanjuje se prema vanjskim listovima), međutim, s obzirom na nutritivni značaj i bifidogene učinke, otpadna biomasa luka može se smatrati potencijalno vrijednim neprehramenim izvorom FOS.

U kontekstu bioaktivnih spojeva, luk obiluje flavonoidima, posebice flavonolima - kvercetinom i kvercetin-glukozidima, a u nekim varijetetima luka značajan je i udjel antocijana. Glavni predstavnici flavonola u luku su kvercetin-4'-glukozid i kvercetin-3,4'-diglukozid, s približno 80 % ukupnog udjela flavonola u cijelim glavicama luka (Benítez i sur., 2012). Glikozid-derivati flavonola dominantni su u unutaršnjim ljuskama, dok u vanjskim ljuskama prevladava kvercetin-aglikon (Downes i sur., 2009). Povećani udjel kvercetin-aglikona u vanjskim

dijelovima glavice dovodi se u vezu s deglukozilacijom glikozida kvercetina, najvjerojatnije pod utjecajem sunčeve svjetlosti (Higashio i sur., 2008). Također, naknadnom autooksidacijom kvercetin-aglikona dolazi do formiranja protokatehinske kiseline (3,4-dihidroksibenzojeva kiselina) (Takahama i Hirota, 2000) i pigmentnih tvari žute do smeđe boje (Griffiths i sur., 2002; Downes i sur., 2009), koje se tradicionalno koriste kao prirodno bojilo. Osim po sastavu ukupnih flavonoida i flavonola, različiti dijelovi glavice luka razlikuju se i po udjelu istih, pri čemu vanjske ljuske i smeđa ljuska sadrže najveći udjel ukupnih polifenola i flavonoida u odnosu na druge dijelove glavice luka (Benítez i sur., 2011), čineći otpadnu biomasu luka potencijalno vrijednim neprehrambenim izvorom kvercetina. Kvercetin se smatra moćnim prehranbenim antioksidansom s potencijalnim učinkom zaštite od pojave krvožilnih oboljenja, a također mu se propisuju i antikancerogena, antiupalna i antiviralna svojstva (Sharma i sur., 2016).

Organosumporni spojevi u luku nositelji su karakterističnog mirisa i arome, a formiraju se cijepanjem S-alk(en)yl-L-cistein sulfoksida (ACSO, aliin) pomoću enzima aliin alkil-sulfenatlijaze (alinaze) (Griffiths i sur., 2002). Najznačajniji ACSO u luku su (+)-S-metil-L-cistein sulfoksid (metiin), (+)-S-propil-L-cistein sulfoksid (propiin) i *trans*-(+)-S-(propen-1-il)-L-cistein sulfoksid (izoaliin), među kojima je dominantan izoaliin s udjelom od približno 80 %, ujedno i najodgovorniji za karakterističnu aromu luka (Griffiths i sur., 2002; Benítez i sur., 2012). Sumporni spojevi luka pokazali su brojne pozitivne učinke na zdravlje, uključujući antioksidacijske učinke, antibiotsko djelovanje te antikancerogeno djelovanje, kako je detaljno opisano u radovima Griffithsa i suradnika (2002) te Rosea i suradnika (2005), kroz različita *in vitro* i *in vivo* istraživanja različitih vrsta roda *Allium* (prvenstveno luk i češnjak).

#### 2.3.2.5 Mahuna graška

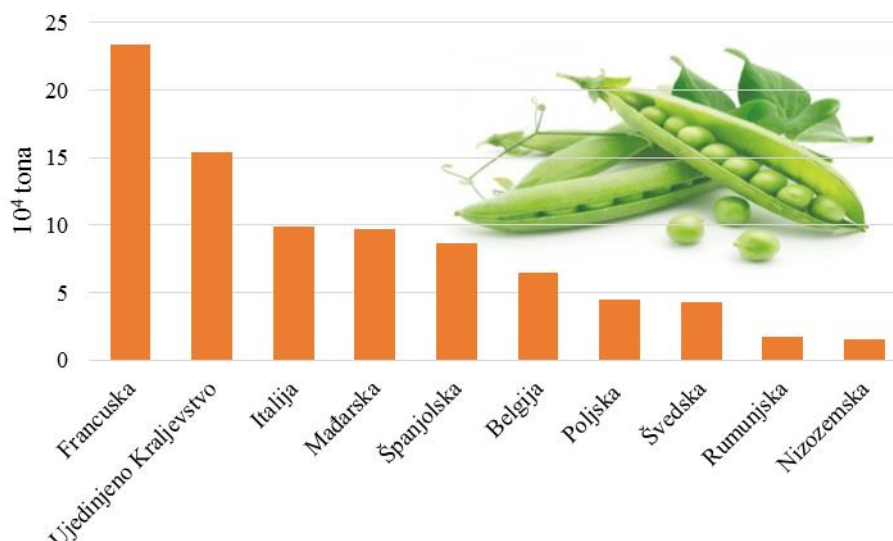
Grašak (*Pisum sativum* L. ssp. *sativum*) (povrtni grašak, poljski grašak, obični grašak) jednogodišnja je biljka iz porodice *Fabaceae* (*Leguminosae*) čiji plod (mahuna) i sjemenke (zrna) su izrazito cijenjene, te uz grah (*Phaseolus vulgaris* L.) čine najvažnije predstavnike mahunarki u prehrani ljudi (Verma i sur., 2011). O važnosti mahunarki (zrnatih mahunarki) općenito, a time i graška, govori i podatak da je Organizacija za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO) 2016. godinu proglasila godinom mahunarki u svrhu njihove popularizacije (FAO, 2018b).

Smatra se da je biljka podrijetlom iz središnje Azije i Bliskog Istoka, a dokazi o uzgoju graška sežu do 6000 godina prije Krista te se smatra jednim od najranije domesticiranih usjeva, zajedno sa žitaricama (Karkanis i sur. 2016; Khan i sur. 2016). Danas je područje uzgoja graška vrlo

veliko te se prostire između 20° i 67° sjeverne zemljopisne širine (Gagro, 1997), čemu pogoduju prilagođenost različitim klimatskim uvjetima, od polusušnih područja do umjerene morske klime, a najbolje uspijeva u hladnijim predjelima i sezonama (Karkanis i sur., 2016).

Zbog svoje prehranbene vrijednosti, grašak je vrlo rasprostranjena i široko korištena namirnica u svijetu, a dostupna je u 3 osnovna oblika, kao mahuna, zeleno (mlado) zrno i suho (zrelo) zrno graška. U obliku mahuna i zelenog zrna grašak se konzumira kao povrće, dok u obliku suhog zrna kao zrnata mahunarka (Gagro, 1997; Khan i sur., 2016). Osim za prehranu ljudi, zrno graška koristi se i u prehrani životinja (tzv. stočni grašak *P. arvense*) (Gagro, 1997). Za cijele mahune mogu se koristiti varijeteti, poput graška šećerca, čije mahune nemaju tzv. pergamentni sloj koji istu čini žilavom i neupotrebljivom za jelo. Mahune i zeleno zrno upotrebljavaju se svježi, a u svrhu produljenja trajnosti najčešće se zamrzavaju ili konzerviraju (Gagro, 1997). U kontekstu znatih mahunarki (isključivo usjevi leguminoznih biljaka koji se uzgajaju za proizvodnju suhog sjemena (Anonymous 4, 2018), suho zrno graška (koje se bere u zreloj fazi sa smanjenim udjelom vode te se industrijski naknadno dosušuje) dalje se prerađuje potapanjem, bubrenjem i ljuštenjem ovojnice zrna te zatim mljevenjem kako bi se izdvojili kotiledoni koji se najčešće koriste kao polovice, ali u obliku brašna ili izvojenih frakcija škroba, proteina i vlakana koji se zatim mogu koristiti kao sastojci različitih prehrambenih proizvoda (Khan i sur., 2016).

Prema podacima FAO za 2016. godinu (FAO, 2018a), proizvodnja graška za zeleno zrno u svijetu iznosila je ~19,9 milijuna tona. Najveći svjetski proizvođači su Kina i Indija s udjelom od ukupno 86,5 % svjetske proizvodnje (od toga se 71,7 % odnosi na Kinu), a zatim europske zemlje s udjelom od 5,8 % svjetske proizvodnje, što se najviše odnosi na Europsku uniju (4,8 % svjetske proizvodnje), dok na proizvodnju u Sjevernoj i Južnoj Americi otpada 3,6 % svjetske proizvodnje (najviše u SAD, 1,6 % svjetske proizvodnje), i na afričke zemlje 2,9 % svjetske proizvodnje. Slika 12 prikazuje razmjer proizvodnje graška za zeleno zrno u 2016. godini u zemljama Europske unije. U Republici Hrvatskoj proizvodnja graška za zeleno zrno u 2016. godini iznosila je približno 3500 tona (FAO, 2018a). U konvencionalnom smislu, iskoristivim dijelom biljke smatraju se sjemenke koje se nalaze unutar nejestive (uglavnom) mahune. Sjemenke se sastoje od 2 osnovna dijela koja se razlikuju udjelom i kemijskim sastavom, a čine ih jezgra, koja se sastoji od 2 kolitodona i klice, (embrija) te ovojnice (testa) (7-14 % cijele sjemenke) koja obavija jezgru. Cijele sjemenke su vrlo bogat izvor biljnih proteina, ugljikohidrata i mineralnih tvari, najzastupljenijih u kotiledonima, dok se na klicu i ovojnicu odnosi tek 10 % ukupne nutritivne vrijednosti (Khan i sur., 2016).




Slika 12. Proizvodnja graška u zemljama Europske unije u 2016. godini (FAO, 2018a).

Ovojnica uglavnom sačinjavaju neškrobni ugljikohidrati među kojima dominira celuloza, dok su kotiledoni bogati škrobom (~45 %) i proteinima (~25 %) u suhoj tvari (Castell i sur., 1996), a u staničnim stijenkama kotiledona dominiraju arabinozom bogati pektini i hemicelulozni polimeri (Roy i sur., 2010). Mahuna graška (prazna) predstavlja vanjsku ovojnica cijelih sjemenki koja ih štiti tijekom razvoja i služi kao mjesto vezanja te privremeni rezervoar hranjivih tvari potrebnih za razvoj (Verma i sur., 2011), ali ovaj izraz se koristi i za opis cijelog ploda graška, odnosno mahune sa zrnima (Gagro, 1997).

Berba zelenog zrna graška obavlja se u stadiju tehnološke zrelosti zrna koje je s morfološkog aspekta karakterizirano zelenim i čvrstim mahunama čija je vanjska ljuska mesnata i sočna, a zrna su dosegla približno 80 % maksimalne veličine te pokazuju povoljne fizikalno-kemijske karakteristike svojstvene stupnju tehnološke zrelosti (Anonymus 5, 2018). Berba na velikim površinama obavlja se strojno, kombajnima podešenima za berbu graška (Gagro, 1997), dok se na manjim površinama mahune beru ručno (Šestanjanj, 2016) ili strojno posebnim uređajima za berbu cijelih mahuna (Mitchel i sur., 1969). Berba graška u mahunama nosi brojne prednosti, kao što su smanjena ubrana masa u usporedbi s berbom cijele stabljike, te fleksibilnost u rasporedu berbe i prerade s obzirom da tako ubrani grašak može skladištiti nekoliko dana, za razliku od ogoljenih zrna koja se trebaju preraditi isti dan (Mitchel i sur., 1969). Ubrane cijele mahune naknadno se ljušte mehaničkim ljuštilicama, nakon čega zaostaju prazne mahune kao neiskorištena biljna biomasa. U stadiju tehnološke zrelosti randman zrna u odnosu na cijelu mahunu iznosi 38 - 45 %, te se može reći da prazna mahuna čini više od 55 % ploda graška (cijele mahune, prilikom proizvodnje zelenog graška) (Anonymous 5, 2018), a prema nekim

podacima 67 % (Mateos-Aparicio i sur., 2012) ili 30 % (Garg, 2015), što ukazuje značajnu količinu otpada koji nastaje prilikom ljuštenja cijelih mahuna graška. Ovaj biljni materijal najčešće se koristi za prehranu životinja (preživača) s obzirom na povoljan kemijski sastav, digestibilnost nutrijenata i njihovu apsorpciju (Wadhawa i sur., 2006). U novije vrijeme, povećana svijest o potrebi iskorištavanja agro-industrijskih ostataka u proizvodima dodane vrijednosti usmjerila je istraživanja potencijalne inovativne primjene vlakana mahune graška, s obzirom na njihovu dominantnost u makrokomponentnom sastavu (Tablica 7).

Tablica 7. Makrokomponentni sastav mahune graška.

Makrokomponenta	Udjel (% s.tv.)		
Ugljikohidrati	42,2 <sup>f**</sup>		
Vlakna			
 Ukupna	43,9 <sup>a</sup> ; 40 <sup>d</sup> ; 58,6 <sup>e</sup>	}	Glc 18,9 <sup>e</sup>
Topljiva	8,3 <sup>a</sup> ; 4,2 <sup>e</sup>		Ara 1,3 <sup>e</sup>
Netopljiva	35,6 <sup>a</sup> ; 54,4 <sup>e</sup>		UA 6,4 <sup>e</sup>
Pektin	-		Gal 2,8 <sup>e</sup>
Hemiceluloza	61,4 <sup>g****</sup> ; 20,5 <sup>h</sup>		Rha 0,6 <sup>e</sup>
Celuloza	16,9 <sup>e</sup> ; 26 <sup>h</sup>		Xyl 16,7 <sup>e</sup>
			Man 0,5 <sup>e</sup>
Škrob	6,8 <sup>a</sup> ;		
Nestrukturani šećeri ***	22,7 <sup>e</sup>		
Proteini	13,4 <sup>a</sup> ; 14,8 <sup>c</sup> ; 10,8 <sup>f</sup>		
Lignin	11,6 <sup>b*</sup> ; 10,1 <sup>f</sup> ; 22,1 <sup>g</sup>		
Pepeo	8,7 <sup>a</sup> ; 5 <sup>c</sup> ; 6,6 <sup>e</sup> ; 4,8 <sup>g</sup>		
Lipidi	1,6 <sup>a</sup> ; 0,4 <sup>c</sup> ; 1,3 <sup>f</sup>		

<sup>a</sup>Belghith-Fendri i suradnici (2016a); <sup>b</sup>Belghith-Fendri i suradnici (2016b); <sup>c</sup>Garg (2015); <sup>d</sup>Iwata i suradnici (2009); <sup>e</sup>Mateos-Aparicio i suradnici (2010); <sup>f</sup>Mateos-Aparicio i suradnici (2012); <sup>g</sup>Verma i suradnici (2011); <sup>h</sup>Wadhawa i suradnici (2006); \*određeno u preparatu vlakana iz mahune graška; \*\*neškrobni ugljikohidrati; \*\*\* glukoza i saharoza (87 % ukupnog udjela); \*\*\*\*odnosi se na holocelulozu (hemiceluloza + celuloza).

Gla - glukoza, Ara - arabinoza, UA - uronske kiseline, Gal - galaktoza, Rha - ramnoza, Xyl - ksiloza, Man - manoza.

Vlakna mahune graška pokazala su bifidogeni učinak, odnosno poticanje rasta *Bifidobacterium longum* JCM 1217, kao i porast broja bifidobakterija i laktobacila u uzorcima ljudskog fecesa te istih u uzorku mikrobiote *cecum*-a štakora, koji se može usporediti s učinkom poznatog prebiotika laktuloze (Iwata i sur., 2009). Vlakna mahune graška bogata su netopljivom frakcijom te je istraživana njihova primjena u proizvodnji vlaknima obogaćenog kruha (Belghith-Fendri sur., 2016b), biskvita (Belghith-Fendri i sur. 2016a), keksa (Garg, 2015) i mesnih okruglica (Kehlet i sur., 2017), gdje se pokazalo da su fizikalno-kemijska i senzorska



svojstva značajno ovisila o udjelu dodanih vlakana, pri čemu su prihvatljiviji bili uglavnom niži udjeli, osim u slučaju keksa gdje je dodatak i 20 % praha mahuna graška rezultirao prihvatljivim proizvodom (Garg, 2015). Belghith-Fendri i suradnici (2018) pokazali su da topljiva vlakna mahune graška iskazuju dobra svojstva pjenjenja i emulgiranja, a također i određena antioksidacijska i antibakterijska svojstva te se potencijalno mogu koristiti kao funkcionalni dodatak različitim prehrambenim proizvodima. S obzirom na monomerni sastav, može se zaključiti da se polisaharidi mahune graška uglavnom odnose na celulozu, ksiloglukan i ksilan, čija potencijalna daljnja primjena, pogotovo hemiceluloznih polimera (ksiloglukana i ksilana) uključuje, između ostalog, i proizvodnju ksilooligosaharida (Materos-Aparicio, 2010; Mateos-Aparicio, 2012).

Mahune graška pokazale su se i kao dobar izvor ukupnih polifenola, s antioksidacijskim kapacitetom bliskim ekstraktu kože rajčice (Babbar i sur., 2015).

Od neprehrambenih načina valorizacije, uz već spomenuto korištenje u prehrani životinja, najčešće se spominje dobivanje biougljena i daljnja primjena istoga kao jeftinog adsorbensa (Mary i sur., 2016), zatim sirovine za proizvodnju bioenergije u obliku metana (Kalia i Joshi., 1995) te supstrata za proizvodnju enzima celulaza (Verma i sur., 2011).

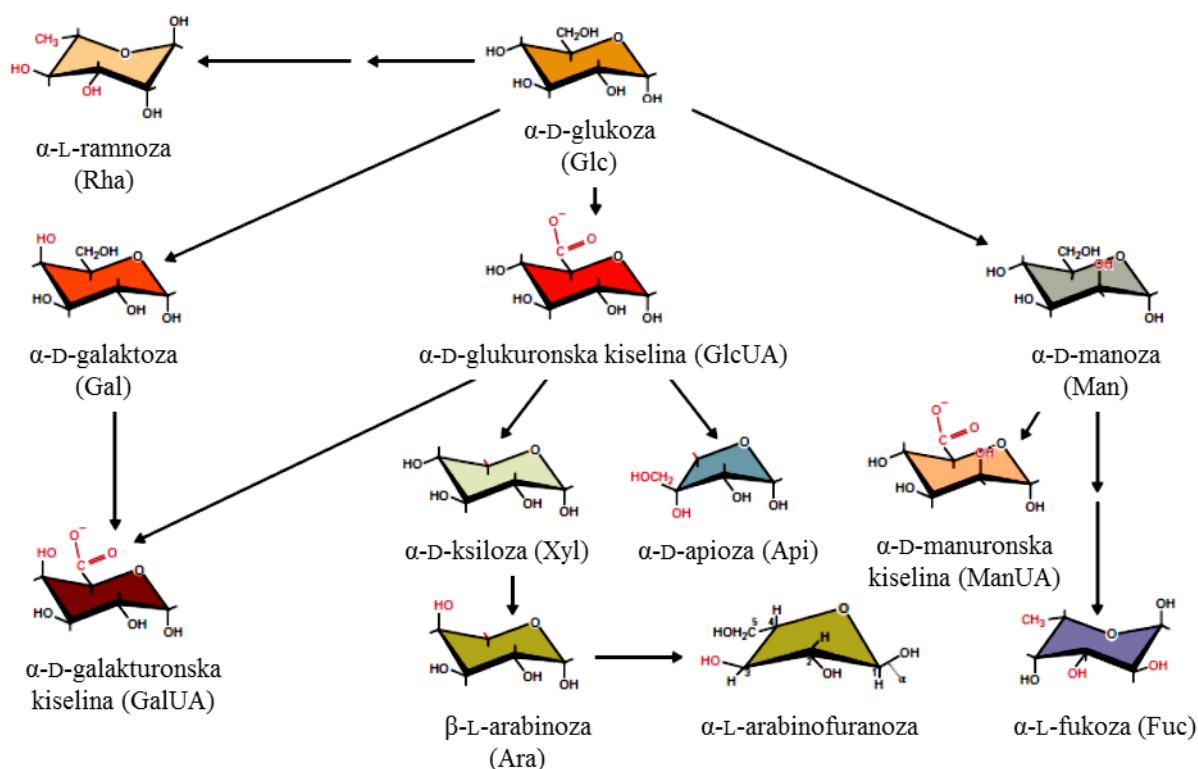
## **2.4 Iskorištavanje ugljikohidratne frakcije sekundarnih biljnih sirovina**

### **2.4.1 Sastav i struktura biljne stanične stijenke**

Biljna stanična stijenka (*engl.* plant cell wall) složena je multifunkcionalna vanjska struktura biljne stanice koja se nadovezuje na plazminu membranu (Fry, 2001). Izrazito je složenog sastava te sudjeluje u mnogim funkcijama stanice poput njezinog rasta, razvoja, obrane i potpore, a sukladno tome se kemijski i funkcionalno mijenja tijekom života stanice (Fry, 2001; Carpita i sur., 2015). S obzirom da je karakterizirana svojevrsnom dinamikom, neki autori predlažu nazive „ekstracelularni matriks“ (Roberts, 1989) ili „egzocelularni matriks“ (Wyatt and Carpita, 1993) kako bi naglasili njezinu promjenjivost stanične stijenke, te se u tom kontekstu stanična stijenka može smatrati dijelom apoplasta, odnosno područja između plazmine membrane i kutikule stanice, koji osim stanične stijenke obuhvaća i središnju lamelu te međustanični prostor ispunjen zračnim mjehurićima, vodom i otopljenim tvarima (O'Neill i York, 2003). Uloga stanične stijenke je višestruka; ona određuje oblik stanice i njezin volumen, omogućuje elastično i neelastično širenje stanice, djeluje semipermeabilno omogućujući migraciju samo malih molekula, ima zaštitnu funkciju od mehaničkih oštećenja i patogena, veže određene katione, te sudjeluje u signalizacijskom mehanizmu stanice putem specifičnih oligosaharida (Fry, 2001).

Stanične stijenke razlikuju se sastavom, veličinom i oblikom, što je usko vezano za njihovu funkciju (McDougall i sur., 1996), a čine ih dva osnovna elementa: primarna i sekundarna stanična stijenka. Primarna stanična stijenka karakteristična je svim stanicama, odnosno jedina je komponenta stanične stijenke u stanicama koje rastu. U nekim biljnim tkivima, kada stanice prestanu rasti, stanične stijenke i dalje nakupljaju materijal formirajući tzv. sekundarnu staničnu stijenku koja nastaje s unutarnje strane primarne stanične stijenke (prema protoplastu) (Fry, 2001). U proširenom smislu poimanja stanične stijenke, važno je napomenuti i središnju lamelu, tj. međustanični prostor, bogat kiselim pektinima, koji se nalazi između dvije susjedne stanice i služi kao svojevrsno ljepilo, (Fry, 2001; Carpita i sur., 2015). U kemijskom smislu, stanična stijenka sastoji se od različitih polisaharida, proteina i aromatskih tvari, od kojih su polisaharidi najdominantniji i mogu se općenito smatrati glavnom strukturnom komponentom (Carpita i sur., 2015). Iako tek desetak različitih monomera čini općeniti sastav (Slika 13), njihove različite konfiguracije, konformacije te načini međusobnog povezivanja uvjetuju raznolikost sastava, strukture i prostornih oblika biljnih polisaharida (McDougall, 1996). Polisaharidi su ujedno i osnova iskorištavanja stanične stijenke koja je, prema tome, osnovni izvor za dobivanje energije iz polisaharida ili nutritivnih i funkcionalnih komponenata, poput prehrambenih vlakana (Waldron i Faulds, 2007).

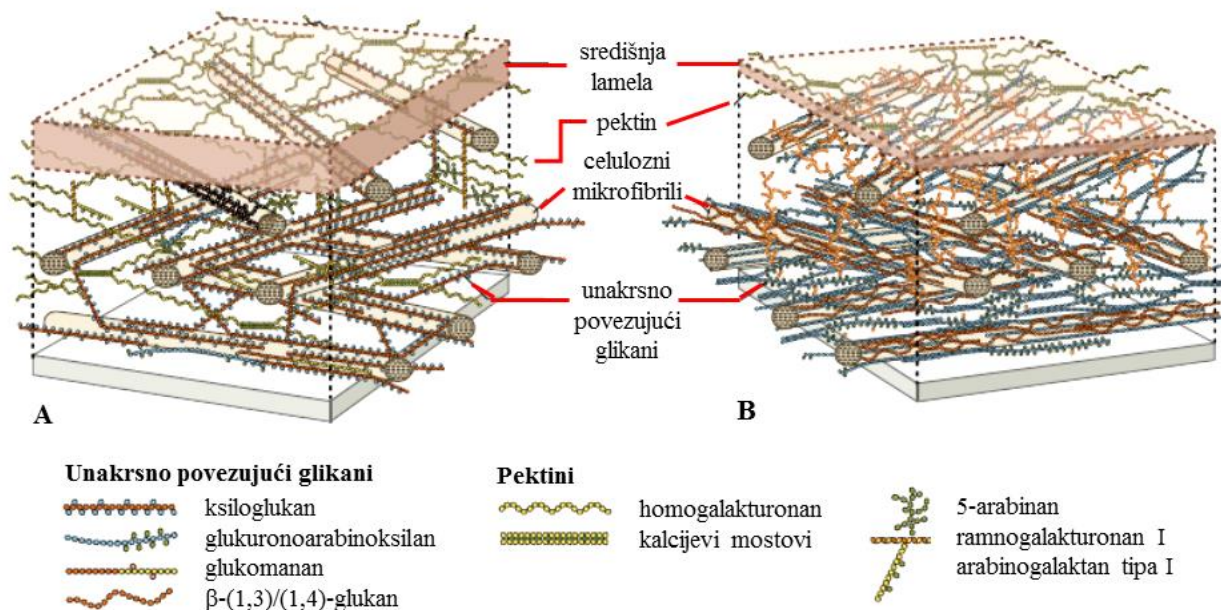
Primarne i sekundarne stanične stijenke međusobno se razlikuju sastavom polisaharida (Fry, 2001). Primarna stanična stijenka (0,1 - 10  $\mu\text{m}$ , ovisno o tkivu i biljnom izvoru) sastoji se od ~70 % vode, a u suhoj tvari ~90 % čine polisaharidi koji se mogu podijeliti u 3 osnovne skupine: pektini, hemiceluloze i celuloza (Fry, 2001). U organizacijskom smislu, primarna stanična stijenka sastoji se najčešće od dvije faze, tj. 2 odvojena, ali međusobno povezana strukturna elementa: mikrofibrila, koji ujedno predstavljaju i okosnicu stanične stijenke, te matriksa u koji su mikrofibrili uronjeni. Mikrofibrole čine molekule celuloze postavljene paralelno jedna iznad druge te međusobno se nastavljajući unutar izduženih snopova (Fry, 2001; Carpita i Gibeaut, 1993). Mikrofibrili su okruženi polisaharidima drugačijima od celuloze, koji ih obavijaju te međusobno unakrsno povezuju vodikovim vezama, čineći tako polisaharidnu mrežu. Ovi povezujući polisaharidi pripadaju skupini hemiceluloza. Mreža mikrofibrila i hemiceluloznih polimera uronjena je u matriks stanične stijenke koji se često opisuje kao amorfna struktura, s obzirom da nije visoko uređen kao primjerice mikrofibrili, a sastoji se uglavnom od pektinskih polimera (Fry, 2001; Carpita i sur., 2015). Osim mikrofibrila i matriksa, neki autori spominju i treći strukturni element primarnih staničnih stijenki, a čine ga glikoproteini i fenilpropanoidna mreža (Carpita i sur., 2015). Udjel i sastav pojedinih polisaharida u primarnoj staničnoj stijenci, kao i njihova organizacija, različiti su s obzirom na taksonomsku podjelu biljaka.



Slika 13. Monomerni šećeri koji se nalaze u sastavu polisaharida biljne stanične stijenke (Carpita i sur., 2015).

Ipak, s obzirom na zajedničke karakteristike, mogu se razlikovati 2 osnovna tipa primarnih staničnih stijenki cvjetnica: tip I, karakterističan za sve dikotiledone, monokotiledone koji ne pripadaju travama i gimnosperme, i tip II, karakterističan za trave (*Poaceae*) (Carpita i Gibeaut, 1993; O'Neill i York, 2003). U tipu I, glavni povezujući polisaharidi su ksiloglukani, a celulozno-ksiloglukanski okvir (50 % mase stanične stijenke) uronjen je u pektinski matriks (30 % mase stanične stijenke). U tipu II, glavni povezujući polisaharidi su glukuronoarabinoksilani, dok su ksiloglukani prisutni u puno manjem udjelu nego kod stijenki tipa I. Za stijenke tipa II također je karakterističan nizak udjel pektina te prisutnost  $\beta$ -glukana, kojih nema u stijenkama tipa I (Fry, 2000; O'Neill i York, 2003; Carpita i sur., 2015). Mikrofibрили u oba tipa stijenki relativno su jednaki i sastavljeni od celuloze. Slika 14 shematski prikazuje strukture osnovnih tipova primarnih staničnih stijenki. Primarna stanična stijenka, neovisno o njezinom sastavu, prisutna je u svakoj stanici koja se ireverzibilno širi, međutim, u fazi diferencijacije dolazi do promjena unutar stanične stijenke karakteriziranih očvršćivanjem njezine strukture dodatnim unakrsnim povezivanjem polisaharida ili formiranjem sekundarne stanične stijenke (10-20  $\mu$ m) (Fry, 2001). Sekundarne stanične stijenke su specijalizirani elementi koji podupiru strukturu biljke te osiguravaju specifične funkcije pojedinih biljnih tkiva.

Najčešće se mogu naći u provodnim biljnim tkivima (traheidni elementi), ali i drugim tkivima kojima je potrebna velika mehanička čvrstoća (Zhong i Ye, 2015).



Slika 14. Shematski prikaz modela strukture stanične stijenke tipa I (A) i tipa II (B) (Carpita i sur., 2015).

U kemijskom smislu, glavne strukturne komponente sekundarne stanične stijenke su celuloza, hemiceluloza i lignin. Celuloza je nosiva strukturna jedinica, odnosno nositelj mehaničke čvrstoće, kao i u primarnim staničnim stijenkama, a njezin udjel u sekundarnim staničnim stijenkama je veći. Hemicelulozni polimeri sekundarne stanične stijenke značajno su drugačiji nego kod primarne stanične stijenke te tipično obuhvaćaju ksilane (glukuronoksilan i 4-*O*-metil-glukuronoksilan) i manane (Carpita i sur., 2015; Zhong i Ye, 2015; Li i sur., 2016). Hemiceluloze sekundarnih staničnih stijenki (primjerice ksilan) doprinose mehaničkoj čvrstoći omogućujući vezanje celuloze, a time i pravilan rast same stijenke (Zhong i Ye, 2015). Lignin je aromatski polimer koji impregnira celulozno-hemiceluloznu mrežu sekundarne stanične stijenke naglašavajući tako njezinu čvrstoću i krutost te hidrofobnost (Li i sur., 2016). U tkivima sklerenhima i ksilema, lignin se inicijalno nalazi u središnjoj lameli, ali i u primarnim i sekundarnim staničnim stijenkama (Fry, 2001). Pektinski polimeri u sekundarnim staničnim stijenkama vrlo malo su zastupljeni (Li i sur., 2016). Sastav sekundarnih staničnih stijenki, kao i kod primarnih, varira ovisno o taksonomskoj razdiobi, što se najviše očituje u sastavu hemiceluloza (Zhong i Ye, 2015). U organizacijskom smislu, sekundarna stanična stijenka najčešće se sastoji od 3 sloja: S1, S2 i S3. Slojevi nastaju uslijed različite orijentacije celuloznih mikrofibriila, koja može biti okomita ili paralelna s elongacijskom osi, za razliku od primarne

stanične stijenke gdje su uvijek paralelni (Zhong i Ye, 2015). Sekundarne biljne stanične stijenke zauzimaju velik udjel u pojedinim biljnim vrstama te imaju veliku ekonomsku važnost, a najčešće se koriste za tekstil, drvenu građu i gorivo (Li i sur., 2016).

Uz polisaharide (ugljikohidrate), u staničnim stijenkama mogu se naći i neugljikohidratne komponente, vezane na polisaharide, koje značajno mijenjaju fizikalno-kemijske karakteristike istih te imaju veliku ulogu u njihovom povezivanju, a odnose se na metil-estere, metil-etera, acetil-estere i neligninske aromatske spojeve poput hidroksicinamata (Fry, 2001; Carpita i sur., 2015). Udjel ovih komponenata ovisi o vrsti biljke i tkiva te stupnju razvoja stanice.

Karakteristike polisaharida biljne stanične stijenke opisane su u sljedećim poglavljima.

#### 2.4.1.1 Pektin

Pektin je naziv za skupinu strukturno i funkcionalno izrazito složenih polisaharida koji obuhvaćaju nekoliko tzv. kiselih heteropolimera bogatih galakturonskom kiselinom (Mohnen, 2008; Yapo, 2011a). Često se u literaturi mogu naći nazivi „pektinski polisaharidi“ i „pektinske tvari“ za opis pektina, koji dodatno ističu složenost i kompleksnost strukture te naglašavaju da se ne radi o jednoznačno definiranoj molekuli. Pektin je sastavni dio biljne stanične stijenke u kojoj primarno ima strukturnu ulogu te štiti biljku od isušivanja, potpomaže rast i doprinosi mehaničkim i fizikalnim svojstvima stanice (Yapo, 2011a). Unutar biljke pektin je najviše zastupljen u primarnim stijenkama stanica koje rastu i dijele se te u središnjoj lameli, što je karakteristično za mekane dijelove biljke. Udjel pektina u biljnim tkivima ovisi o taksonomskoj pripadnosti neke biljne vrste pa tako u dikotiledonim biljkama i monokotiledonima koje ne pripadaju travama, pektin čini i do 35 % primarne stanične stijenke, karakteristično za tip I, dok u travama i staničnim stijenkama ostalih komelinidnih biljaka svega 2-10 %, te u drvenastim biljkama do 5 % (Mohnen, 2008). Pektin je sastavni dio i nekih biljnih sluzi (Yapo, 2011b).

U kemijskom smislu, pektin je heteropolimer u čijem sastavu se može naći i do 17 različitih monosaharida (Panouillé i sur., 2007; Yapo, 2011a), među kojima je udjelom najistaknutija galakturonska kiselina (GalUA) te se pektin često pojednostavljeno navodi kao polimer galakturonske kiseline (Yapo, 2011a). Strukturno je pektin blok kopolimer te se sastoji od više različitih (sastavom i strukturom) polimernih strukturnih jedinica (blokova), međusobno povezanih u istoj molekuli. Osnovni kopolimerni blokovi u pektinu su homogalakturonan (HG), ramnogalakturonan I (RG-I) te supstituirani homogalakturonani u koje se ubrajaju ramnogalakturonan II (RG-II) i ksilogalakturonan (XGA) (O'Neill i York, 2003; Panouillé i sur., 2007). Danas se smatra da postoji najmanje 8 različitih pektinskih polisaharida, uz navedene to su još i galakturonogalakturonan, apiogalakturonan, galaktogalakturonan i

arabinogalakturoan (Yapo, 2011a). HG i RG-I su najvažniji, najzastupljeniji te najviše istrživani i u literaturi opisani kopolimerni blokovi pektina koji se često opisuju kao „glatke“ i „čupave“ regije (*engl.* „smooth regions“ i „hairy regions“) molekule (Panouillé i sur., 2007).

**Homogalakturonan** (sinonimi: nesupstituirani homogalakturonan, poligalakturonska kiselina, glatka regija) je linearni pektinski homopolimer (kopolimerni blok), sastavljen isključivo od jedinica galakturonske kiseline (D-galaktopiranozil uronska kiselina, D-GalpUA), međusobno povezanih  $\alpha$ -(1,4) glikozidnom vezom. Predstavlja dominantan pektinski polimer biljne stanične stijenke (55-70 % ukupnog pektina) te može činiti 50-90 % ekstraktibilnog pektina te 80 % ukupne galakturonske kiseline biljnih staničnih stijenki (Yapo, 2011a). Karboksilne skupine D-GalpUA jedinica u HG mogu biti metil-esterificirane (položaj C-6), a također i/ili acetil-esterificirane na položajima O-2 i/ili O-3 (O'Neill i York, 2003; Yapo, 2011a). Stupanj ukupne esterifikacije te zasebno metilacije i acetilacije (molarni omjer metilnih i acetilnih skupina u odnosu na galakturonsku kiselinu) važne su karakteristike pektina koje određuju mehanizam geliranja. HG niskog stupnja esterifikacije u literaturi se još naziva i pektinska kiselina, dok je za visokoesterificirane HG uvriježen naziv pektin (O'Neill i York, 2003). Smatra se da se linearni HG sintetizira u visokometiliranom obliku (gotovo 100 %) u Golgijevom aparatu, a zatim se djelomično deesterificira u staničnoj stijenci enzimom pektin metil-esterazom (PME) (Carpita i sur., 2015) Nisko metil-esterificirani pektini uglavnom su smješteni u središnjoj lameli, dok su visoko metil-esterificirani pektini karakteristični za stanične stijenke (Yapo, 2011a).

**Ramnogalakturonan I** drugi je po zastupljenosti kopolimerni blok pektina (pektinski polimer), s udjelom 20-35 % u molekuli pektina, koji u svom sastavu osim GalUA sadrži i ramnozu (Rha), galaktozu (Gal) i arabinozu (Ara) (Yapo, 2011a). Za razliku od HG, RG-I je razgranata molekula čiju okoslicu čini ponavljajući disaharid [ $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GalpUA-(1 $\rightarrow$ ), odnosno naizmjenično povezane jedinice GalUA i Rha  $\alpha$ -(1,4) i  $\alpha$ -(1,2) glikozidnim vezama. Okosnica je razgranata na mjestu ramnopiranozilnog ostatka, najčešće na poziciji O-4 (rijetko i na O-3), a bočne lance dominantno čine neutralni šećeri galaktoza i arabinoza. Ovisno o biljnom izvoru te metodi ekstrakcije, supstituiranost RG-I može biti 20-80 %, a bočni lanci mogu biti monomerni ili oligomerni pa čak i polimerni, linearni ili razgranati (O'Neill i York, 2003; Yapo, 2011a). U funkciji bočnih lanaca najčešće se mogu naći (homo)arabinani, (homo)galaktani, arabinogalaktani tipa I i arabinogalaktani tipa II.

**Homoarabinane** čine povezane arabinofuranozilne jedinice (L-Araf)  $\alpha$ -(1,5) glikozidnom vezom, koje mogu biti u linearnoj strukturi ili razgranate na pozicijama O-2 i/ili O-3, također s L-Araf jedinicama, pri čemu su L-Araf u bočnim lancima povezane  $\alpha$ -(1,3) glikozidnom vezom.

**Homogalaktane** čine uglavnom linearni bočni lanci RG-I sastavljeni od galaktopiranozilnih (D-Galp) jedinica povezanih  $\beta$ -(1,4) glikozidnom vezom.

**Arabinogalaktani tipa I (AG-I)** sastoje se od okosnice galaktopiranozilnih jedinica povezanih  $\beta$ -(1,4) glikozidnom vezom te razgranatih na poziciji O-3 s jednom L-Araf jedinicom ili kratkim lancem  $\alpha$ -(1,2)/(1,3) vezanih L-Araf jedinica. AG-I su najčešći heterogeni bočni lanci RG-I.

**Arabinogalaktani tipa II (AG-II)** složene su strukture te karakterizirani  $\beta$ -(1,3) povezanim D-Galp jedinicama razgranatima na poziciji O-6 s relativno kratkim bočnim lancima  $\beta$ -(1,6) vezanih D-Galp koji su pak dalje razgranati na pozicijama O-3, O-4 i O-6 s terminalnom (nereducirajućom) L-Araf jedinicom ili  $\alpha$ -(1,3)/(1,5) vezanim L-Araf oligomernim jedinicama ili terminalnom D-Galp jedinicom na poziciji O-4 (Yapo, 2011b). Još uvijek nije definirano je li AG-II kovalentno vezana poddomena u stukturi pektina. Naime, AG-II struktura pojavljuje se i u glikanskom dijelu arabinogalaktan-proteina koji je često smješten u blizini RG-I te se koekstrahira s pektinom.

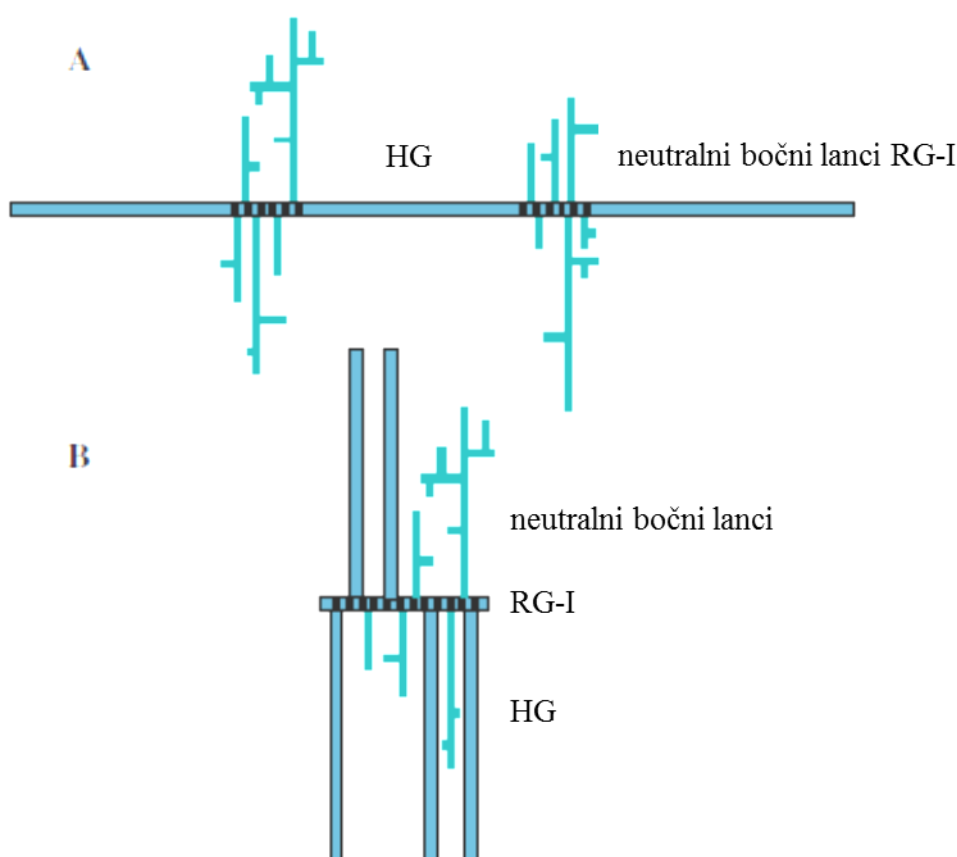
Neugljikohidratne vezane komponente RG-I odnose se na acetil-estere vezane na O-2 i/ili O-3 poziciji jedinica GalUA u okosnici, dok za prisutnost metil-estera nema uvjerljivih dokaza. Također se mogu naći i feruloil-esteri vezani na O-2/O-3/O-5 položajima u bočnim lancima arabinana i/ili na O-6 položaju D-Galp jedinca galaktana ili arabinogalaktana (Yapo, 2011a). Osim navedenih najčešćih neutralnih monomera, bočni lanci RG-I mogu sadržavati i fukožu, glukozu i galakturonsku kiselinu (Mohnen, 2008; Yapo, 2011a).

**Supstituirani galakturonani** su skupina razgranatih pektinskih polisaharida čiju okosnicu čine  $\alpha$ -(1,4) vezani D-GalpUA ostaci. Među njima se ističu ramnogalakturonan II i ksilogalakturonan.

**Ramnogalakturonan II (RG-II)** je strukturom i sastavom najkompleksniji pektinski polisaharid (kopolimerni blok) u čijem sastavu se može naći i do 12 različitih glikozilnih ostataka te više od 20 vrsta glikozidnih veza (Mohnen, 2008; Yapo, 2011a). RG-II se nalazi u staničnim stijenkama gotovo svih viših biljaka, a zastupljen je s približno 10 % (Mohnen, 2008). Iz staničnih stijenki izolira se djelovanjem enzima *endo*-poligalakturonaze (ePG), a izdvojeni polisaharidni fragmenti sastoje se od najmanje 8 D-GalpUA ostataka u okosnici te 4 karakteristična oligosaharidna bočna lanca koja u svom ukupnom sastavu sadrže rijetke, ali RG-II karakteristične glikozilne ostatke poput apioze, 2-O-metil-fukoze, 2-O-metil-ksiloze, acerinske kiseline, 2-keto-3-deoksi-D-mano-oktulosonske kiseline i 3-deoksi-D-liksoheptulosarne kiseline, (O'Neill i York, 2003; Yapo, 2011a). Bočni lanci vezani su na okosnicu galakturonana u pozicijama O-2 i O-3. Okosnica također može biti esterificirana metilnim skupinama na poziciji C-6 D-GalpUA ostatka (Yapo, 2011a).

**Ksilogalakturonani** u svom sastavu sadrže nereducirajuće ksilopiranozil (D-Xylp) jedinice ili kratke ksilanske oligomere vezane na spomenutu galakturonansku okosnicu, najčešće u položaju O-3. Najčešće se mogu naći u skladišnim tkivima biljnih reproduktivnih organa, ali i u listovima, korijenu i stabljikama (Yapo, 2011a).

Način na koji su pojedini kopolimerni blokovi (domene molekule pektina) povezane unutar jedinstvene molekule (pektinskog kompleksa) ni danas nije jednoznačno definiran te je do danas nekoliko modela koji opisuju organizaciju iste (Slika 15). Tako, smatra se da su pektinski polimeri međusobno kovalentno vezani, s obzirom da se pojedine domene izdvajaju nakon tretmana specifičnim enzimima, ali postoje i mnoge indikacije da su pojedini pektinski polisaharidi povezani i drugim kemijskim vezama (Mohnen, 2008; Yapo, 2011a).



Slika 15. Shematski prikaz modela organizacije pektinske makromolekule; A - HG i RG-I se izmjenjuju u okosnici, dok neutralna frakcija RG-I čini bočne lance (Schols i Voragen, 1996), B - RG-I čini okosnicu, a bočne lance čine HG i neutralna frakcija RG-I (Vincken et al., 2003) (Bonnin i sur., 2014).

Prema tradicionalnom i danas široko prihvaćenom modelu, pektinski kompleks čine naizmjenično povezani pektinski polisaharidi u svojim okosnicama te se u molekuli mogu razaznati tzv. glatke i čupave regije, od kojih glatke čine HG i nerazgranati RG-I, a čupave razgranati RG-I i supstituirani galakturonani (Mohnen, 2008; Yapo, 2011a). Prema novijem



modelu, okosnicu pektinskog kompleksa čini RG-I, dok se HG i supstituirani galakturonani nalaze kao bočni lanci (Vincken i sur., 2003). Zadnji predloženi model pretpostavlja kombinaciju navedenih modela (Ralet i Thibault, 2009).

Iako pektin ima dugu povijest istraživanja, potrebni su daljnji napori kako bi se razjasnila njegova izrazito složena struktura i multifunkcionalnost, a time bi se potencijalno otvorile i nove mogućnosti primjene.

#### 2.4.1.2 Hemiceluloza

Hemiceluloza je heterogena skupina polisaharida biljne stanične stijenke koji se ne odnose na celulozu i pektin. Naziv hemiceluloza prvotno se koristio za opis alkalno-ekstraktibilnih polisaharida za koje se vjerovalo da su prekursori u sintezi celuloze (Ebringerová i sur., 2005). Danas, kada je poznat put sinteze pojedinih biljnih polisaharida te njihova organizacija unutar stanične stijenke prema aktualnom modelu, ovaj naziv se ponekad smatra zastarjelim te neki autori predlažu naziv „unakrsno-povezujući glikani“ (*engl.* cross-linking glycans) sukladno biološkoj ulozi hemiceluloznih polisaharida. Ipak, unakrsno povezivanje i dalje nije dokazano kao osnovno i zajedničko svojstvo ovih polisaharida (Scheller i Ulvskov, 2010; Carpita i sur., 2015). Naziv hemiceluloza i danas se učestalo koristi s obzirom na njegovu razumljivost i raširenost, a označava polisaharide stanične stijenke (osim celuloze i pektina) karakterizirane okosnicom  $\beta$ -(1,4) povezanih monomernih jedinica glukoze, manoze ili ksiloze, koji se ekstrahiraju u alkalnim otopinama (Caffall i Mohnen, 2009; Scheller i Ulvskov, 2010; Carpita i sur., 2015).

S obzirom na strukturnu sličnost celulozi, većina hemiceluloznih polisaharida lako tvori vodikove veze s celulozom te se unutar stanične stijenke nalaze kao povezujući polisaharidi između celuloznih mikrofibrila, čineći tako celulozno-hemicelulozni okvir (kostur) kao jedan od 3 osnovna strukturna elementa stanične stijenke (Carpita i sur., 2015). Osnovna uloga hemiceluloze u staničnoj stijenci je, dakle, postizanje željenih fizikalnih svojstava stanične stijenke putem interakcija s drugim polimerima, međutim, neki hemicelulozni polisaharidi mogu se naći kao skladišni polisaharidi u sjemenkama nekih biljnih vrsta. Najčešće su to ksiloglukani, gluko- i galaktomanani te arabinoksilani (Scheller i Ulvskov, 2010).

S obzirom na dosadašnje spoznaje o zajedničkim svojstvima pojedinih hemiceluloznih polisaharida, isti se mogu podijeliti u 4 osnovne skupine: ksiloglukani, mješoviti  $\beta$ -glukani, manani i ksilani (Ebringerová i sur., 2005; Scheller i Ulvskov, 2010). Sastav i udjel hemiceluloznih polimera u staničnoj stijenci ovisi o taksonomskoj pripadnosti neke biljne vrste te tipu stanične stijenke (Tablica 8), kako je detaljnije opisano u poglavlju 2.4.1.

Tablica 8. Udjel (maseni %) hemiceluloznih polisaharida u primarnim i sekundarnim staničnim stijenjkama različitih biljnih taksonomskih skupina (Scheller i Ulvskov, 2010).

Polisaharid	Dikotiledoni		Trave		Četinjače	
	Primarna	Sekundarna	Primarna	Sekundarna	Primarna	Sekundarna
<b>Ksiloglukan</b>	20-25	-	2-5	-	10	-
<b>Glukuronoksilan</b>	-	20-30	-	-	-	-
<b>Glukuronoarabinoksilan</b>	5	-	20-40	40-50	2	5-15
<b>(Gluko)manan</b>	3-5	2-5	2	0-5	-	-
<b>Galaktoglukomanan</b>	-	0-3	-	-	+	10-30
<b><math>\beta</math>-(1,3)/(1,4)-glukan</b>	-	-	2-15	-	-	-

- odsutan ili prisutan u minimalnom udjelu; + kvantitativni podaci nisu dostupni.

U nastavku poglavlja opisan će se samo osnovne karakteristike sastava i strukture ksiloglukana, mješovitih  $\beta$ -glukana i manana. Ksilani, posebice glukuronoksilani, opisani su u zasebnom, sljedećem poglavlju s obzirom na važnost za ovu disertaciju.

**Ksiloglukani** se nalaze u staničnim stijenjkama svih kopnenih biljaka. Zastupljeni su različito s obzirom na taksonomsku pripadnost pojedine biljne vrste (u dikotiledonim kritosjemenjačama najviše, s 20-25 % udjela u primarnoj staničnoj stijenci), a mogu se naći i kao skladišni polisaharid u sjemenkama nekih biljnih vrsta (Ebringerová i sur., 2005). U staničnoj stijenci usko su vezani na celulozne mikrofibrile. Osnovnu strukturu ksiloglukana čini glukanska okosnica u kojoj su glukopiranozilne jedinice (D-Glcp) vezane  $\beta$ -(1,4) glikozidnom vezom, a na koju su zatim vezane ksilopiranozilne jedinice (D-Xylp)  $\alpha$ -(1,6) glikozidnom vezom. Supstituiranost ksilozom različita je s obzirom na izvor ksiloglukana, pri čemu se razlikuju osnovna 2 uzorka: XXXG i XXGG. U prvom uzorku se iza 3 uzastopne supstituirane glukozne jedinice (X) nalazi jedna nesupstituirana (G), dok u drugom, analogno, nakon 2 supstituirane glukozne jedinice u okosnici, slijede 2 nesupstituirane. Na ksilopiranozilne jedinice mogu biti vezane i druge monosaharidne jedinice (položaj O-2), najčešće galaktoza, koja dalje može biti fukozilirana i/ili acetilirana, te arabinoza (Scheller i Ulvskov, 2010).

**Mješoviti  $\beta$ -glukani** su gotovo jedinstveni za biljne vrste iz reda *Poales* (u koji pripadaju i žitarice te trave) gdje se najviše nalaze u zrnu, odnosno u endospermu zrna i subaleuronskom sloju (Ebringerová i sur., 2005). Komercijalno najvažniji izvori su ječam i zob (u prosjeku 5 %, u nekim kultivarima i do 12 %). Mješoviti  $\beta$ -glukani strukturno su linearne molekule glukana (D-Glcp) u kojima se nalaze 2 tipa glikozidnih veza,  $\beta$ -(1,3) i  $\beta$ -(1,4), pri čemu su  $\beta$ -(1,4) zastupljene s približno 70 %, a  $\beta$ -(1,3) s približno 30 %. Glikozidne veze nisu raspoređene nasumično, već u ponavljajućim segmentima koje čine 3 ili 4 D-Glcp jedinice povezane  $\beta$ -(1,4) vezom (zbog strukturne sličnosti s celulozom, u literaturi se ovi segmenti nazivaju celotrioil i

celotetraozil, između kojih se pojavljuje  $\beta$ -(1,3) glikozidna veza (Ebringerová i sur., 2005; Scheller i Ulvskov, 2010). Omjer celotriozilnih/celotetraozilnih segmenata ovisi o biljnom izvoru, primjerice približno 2, 3 ili 4 za zob, ječam i pšenicu (Ebringerová i sur., 2005).

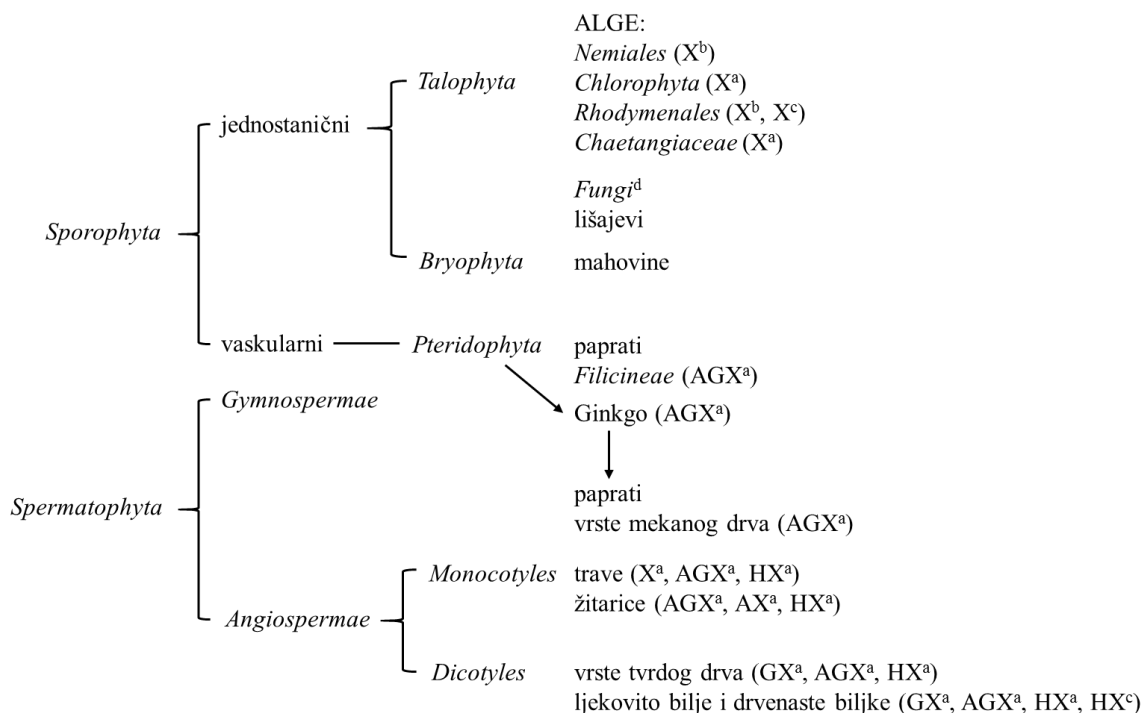
**Manani** (manoglikani) su skupina polisaharida koji su okosnici sadrže  $\beta$ -(1,4) vezanu manozu (manopiranozil, D-Manp). Sastavni su dio stanične stijenke mnogih biljaka, a često se nalaze i kao skladišni polisaharidi u sjemenkama. Najviše su zastupljeni u tzv. ranim kopnenim biljkama - mahovinama i biljkama nalik papratima (*lycophytes*), a kod sjemenjača su najzastupljeniji u sekundarnim staničnim stijenkama golosjemenjača (drvo četinjača) (Scheller i Ulvskov, 2010). Manani se najčešće dijele na galaktomanane i (galakto)glukomanane. Galaktomanane čini mananska okosnica na koju su supstituirani galaktopiranozilni ostaci (D-Galp), pri čemu stupanj supstitucije ovisi o biljnom izvoru (najčešće > 30 %) (Ebringerová i sur., 2005). Okosnicu (galakto)glukomanana čine nasumično vezane D-Manp i D-Glcp jedinice ( $\beta$ -(1,4)) na koju su  $\beta$ -(1,6) vezane D-Galp jedinice. Glukomanani koji su galaktozilirani (supstituirani) s više od 15 % (na D-Manp jedinici) nazivaju se galaktoglukomananima. (Galakto)glukomanani glavni su hemicelulozni polisaharid golosjemenjača, odnosno vrsta mekanog drva (*engl.* softwood) (Ebringerová i sur., 2005).

#### 2.4.1.2.1 Ksilani

Ksilani (ksiloglikani) je zajednički naziv za raznoliku skupinu polisaharida biljne stanične stijenke koji u osnovnoj strukturi sadrže  $\beta$ -(1,4)-vezanu ksilopiranozilnu (D-Xylp) okosnicu na koju su vezane monomerne jedinice najčešće glukuronske kiseline (glukuronopiranozil uronska kiselina, D-GlcpUA), arabinoze (arabinofuranozil, L-Araf), i/ili kratki oligosaharidi sastavljeni od ksiloze, arabinoze, galaktoze i glukoze (Ebringerová i sur., 2005).

S obzirom na zajedničke strukturne karakteristike, ksilani se mogu podijeliti na: homoksilane te heteroksilane, među kojima na arabinoksilane, glukuronoarabinoksilane, glukuronoksilane, arabinoglukuronoksilane i složene heteroksilane (Ebringerová i sur., 2005). Slika 16 prikazuje zastupljenost ksilanskih polisaharida u pojedinim biljnim taksonomskim skupinama, dok Slika 17 prikazuje strukturne karakteristike ksilanskih polisaharida.

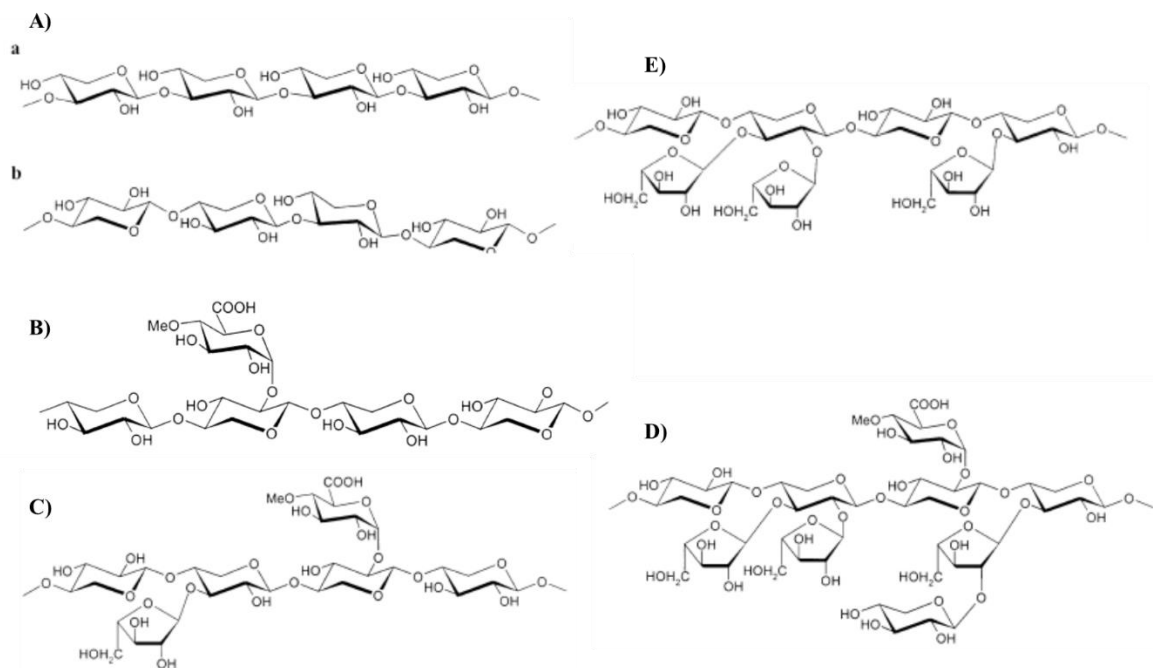
**Homoksilani** su rijetki u biljnome svijetu i mogu se naći gotovo jedino u nekim algama, u kojima se nalaze kao linearni  $\beta$ -(1,4) ili  $\beta$ -(1,3)/(1,4)-vezani polimeri (Ebringerová i Heinze, 2000). Pojavnost u višim biljkama je neznatna.



Slika 16. Pojavnost ksilanskih polisaharida u carstvu *Plantae* (Ebringerova i Heinze, 2000); X - homoksilan, GX - 4-*O*-metil-glukuronoksilan, HX - heteroksilan, AGX - arabinoglukuronoksilan, AX - arabinoksilan, <sup>a</sup> $\beta$ -(1,4)-D-Xylp okosnica, <sup>b</sup> $\beta$ -(1,4)-D-Xylp okosnica, <sup>c</sup> $\beta$ -(1,3)/(1,4)-D-Xylp okosnica, <sup>d</sup>pentozani ili polisaharidi koji sadrže ksilozu, → smjer evolucijskog razvoja.

**Arabinoksilani** su karakterizirani ksilanskom  $\beta$ -(1,4) okosnicom na kojoj se nalaze vezane  $\alpha$ -L-Araf jedinice na pozicijama *O*-2 ili *O*-3 (Ebringerová i Heinze, 2000). Ovaj tip ksilana dominantan je hemicelulozni polisaharid u zrnima žitarica, a može se naći u endospermu te perikarpu zrna, gdje je najviše koncentriran (i do 30 % u pšeničnim posijama). Arabinoksilani mogu biti neutralni ili kiseli polimeri; pritom se potonje odnosi na prisutnost glukuronske kiseline (D-GlcpUA).

**Glukuronoarabinoksilani (GAX)** se u literaturi navode kao podskupina arabinoksilana ili kao zasebna skupina ksilanskih polisaharida (Ebringerová i sur., 2005; Scheller i Ulvskov, 2010). Glukuronska kiselina u GAX djelomično se nalazi i kao 4-*O*-metil-eter (Ebringerová i sur., 2005). Zastupljenost glukuronske kiseline u GAX obično je 10 puta manja nego zastupljenost arabinoze te ovisi o biljnom izvoru i načinu ekstrakcije. Važna karakteristika arabinoksilana i glukuronoarabinoksilana je i prisutnost estera ferulinske kiseline na *O*-5 položaju L-Araf jedinica. Feruloil esteri važni su za oksidativno unakrsno povezivanje polimera, čime doprinose rekalcitranciji staničnih stijenki i biljnih tkiva (Scheller i Ulvskov, 2010).



Slika 17. Osnovne strukturne karakteristike homoksilana (A) -  $\beta$ -(1,3)-vezanih (a) i  $\beta$ -(1,3)/(1,4)-vezanih (b); 4-*O*-metil-glukuronoksilana (B); arabino-4-*O*-metil-glukuronoksilana (C); vodeno-topljivog arabinoglukuronoksilana (D) i arabinoksilana (E) (Ebringerová i sur., 2005).

**Glukuronoksilani** su podskupina ksilanskih polisaharida u kojima je ksilanska  $\beta$ -(1,4) okosnica supstituirana glukuronskom kiselinom (D-Glc<sub>p</sub>UA) uvijek u položaju *O*-2 D-Xyl<sub>p</sub> ostatka (Ebringerová i sur., 2005). Često je glukuronska kiselina 4-*O*-metilirana, a takvi ksilani se nazivaju 4-*O*-metil-glukuronoksilani (MeGX ili MGX). MGX su dominantni hemicelulozni polisaharidi u sekundarnim staničnim stijenkama dikotiledona, te su karakteristični za vrste tvrdog drva (*engl.* hardwood). Omjer metil-glukuronske kiseline i ksiloze u istima može varirati od 1:4 do 1:16, ovisno o biljnom izvoru i metodi ekstrakcije, a pretpostavlja se da u prosjeku iznosi 1:10, odnosno na svakih 10 D-Xyl<sub>p</sub> jedinica nalazi se 1 D-Glc<sub>p</sub>UA jedinica (Ebringerová i sur., 2005). Smatra se da je glukuronoksilan u nativnom obliku acetiliran na položajima *O*-2 i/ili *O*-3 D-Xyl<sub>p</sub> jedinica; međutim, velik dio acetilnih skupina se izgubi tijekom klasične ekstrakcije lužinama (Ebringerová i sur., 2005; Scheller i Ulvskov, 2010).

**Arabinoglukuronoksilani (AGX)** uz (metil)-glukuronsku kiselinu sadrže i arabinozu (L-Araf) vezanu obično u *O*-3 položaju ksilanske okosnice. AGX čine značajan udjel u staničnim stijenkama četinjača (vrste mekog drva) te lignificiranim tkivima trava i žitarica (Ebringerová i Heinze, 2000; Ebringerová i sur., 2005). Supstitucija ksilanske okosnice Me-Glc<sub>p</sub>UA značajno je viša nego kod MGX, uglavnom u omjeru 1:5.

**Složeni heteroksilani**, kao što im naziv govori, su vrlo složene strukture te kao bočne lance na  $\beta$ -(1,4)-vezanoj ksilopiranozilnoj okosnici, osim D-GlcpUA i L-Araf, sadrže i druge monomerne i/ili oligomerne jedinice (Ebringerová i sur., 2005).

#### 2.4.1.3 Celuloza

Celuloza je najzastupljeniji biljni polisaharid, čija funkcija u staničnoj stijenci je primarno strukturna, odnosno osiguravanje mehaničke čvrstoće i nosivosti. Udjel celuloze u staničnim stijenka varira s obzirom na taksonomsku klasifikaciju, vrstu tkiva te tip stanične stijenke. U prosjeku, celuloza čini 15-30 % primarnih staničnih stijenki, a u sekundarnima je puno više zastupljena (i do 98 %, primjerice u sekundarnim staničnim stijenka pamuka) (Carpita i sur., 2015). U kemijskom smislu, celuloza je linearni homopolimer glukopiranozilnih jedinica (D-Glcp) međusobno povezanih  $\beta$ -(1,4) glikozidnom vezom, a smatra se da se sintetizira na ili izvan plazmine membrane u specijaliziranim enzimskim domenama heksagonalne simetrije u obliku rozete, koje sadrže multiple celuloza sintetazne podjedinice (Pérez i Mazeau, 2004; Caffall i Mohnen, 2009). Iako ima relativno jednostavan kemijski sastav, rotacije glikozidne veze te slobodnih hidroksilnih skupina u molekuli celuloze omogućuju različite načine njezine organizacije, što uvelike određuje njezina svojstva. Celulozni lanci lako tvore vodikove veze preko slobodnih hidroksilnih skupina organizirajući se pritom u različite kristalinične strukture (Meshitsuka i Isogai, 1995; Pérez i Mazeau, 2004). Celuloza može zauzimati jedan od 4 osnovna alomorfna oblika; I, II, III i IV, što je vidljivo kao karakterističan uzorak difrakcije x-zraka. Unutar stanične stijenke celuloza se nalazi organizirana u makromolekulske strukture nalik snopovima, tzv. mikrofibrile. Mikrofibrile čini nekoliko desetaka celuloznih lanaca međusobno povezanih u snop vodikovim vezama te Van der Waalsovima silama (Caffall i Mohnen, 2009; Carpita i sur., 2015). Broj celuloznih lanaca u mikrofibrilima usko je povezan sa sintetaznim domenama te se pretpostavlja da je ukupan broj mikrofibrila djeljiv sa 6. Model s 36 lančanih molekula celuloze unutar mikrofibrila široko je prihvaćen, a odgovara širini, tako definiranog elementarnog mikrofibrila, od približno 3,8 nm (Caffall i Mohnen, 2009; Thomas i sur., 2013; Carpita i sur., 2015). Nativna celuloza (u staničnim stijenka, unutar mikrofibrila) nalazi se u kristaliničnom (alomorfnom) obliku I (celuloza I) koji je karakteriziran paralelno postavljenim lancima celuloze tako da su reduciraajući i nereduciraajući krajevi molekula postavljeni u istom smjeru. Celuloza I iskazuje svojstvo dimorfizma, odnosno može se naći u 2 oblika ovisno o načinu na koji su lanci povezani jedan povrh drugoga, tzv. I $\alpha$  i I $\beta$  konformaciji. I $\alpha$  konformacija karakterizirana je triklnskom strukturnom jedinicom unutar jednog lanca, dok je I $\beta$  konformacija karakterizirana monoklnskom strukturnom jedinicom između 2 lanca. Obje

konformacije mogu se naći u različitim udjelima unutar mikrofibrila, ovisno o izvoru celuloze, no općenito u višim biljkama dominira I $\beta$  konformacija (Meshitsuka i Isogai, 1995; Pérez i Mazeau, 2004; Caffall i Mohnen, 2009). Uzduž celuloznih mikrofibrila prisutne su domene različitog stupnja uređenosti pa se tako razlikuju visokouređene kristalinične domene, kako je prethodno opisano, parakristalinične domene manjeg stupnja uređenosti te nekristalinične, tj., amorfne domene najmanjeg stupnja uređenosti (Meshitsuka i Isogai, 1995; Martínez-Sanz i sur., 2017). Dominantno kristalinična priroda celuloznih mikrofibrila osigurava mehaničku izdržljivost stanične stijenke, što je uvjetovano njihovom biološkom ulogom, ali i relativno visoku otpornost na kemijsku razgradnju (saharifikacija celuloze).

#### 2.4.1.4 Lignin

Lignin je kompleksni polimer sastavljen od aromatskih spojeva - fenilpropanoida, primarno od 3 hidroksicinamil-alkohola, tzv. monolignola: *p*-kumaril-alkohola, koniferil-alkohola i sinapil-alkohola (Lu i Ralph - 2010). Jednoznačna definicija i podjela lignina i danas je predmet rasprave s obzirom da nije pronađena osnovna strukturna jedinica koja bi se ponavljala prema određenom obrascu. Prema tome, lignin se može razmatrati kao zajednički naziv za skupinu prirodnih fenolnih polimera, vrlo raznolikih sastavom i strukturom te karakterističnih biljnom izvoru (Lu i Ralph, 2010). Prisutnost lignina u biljnim staničnim stijenkama veže se uglavnom uz postojanje sekundarne stanične stijenke; štoviše, lignin je često osnovna razlikovna komponenta primarnih i sekundarnih staničnih stijenki (Carpita i sur., 2015). Iznimku čine primarne stanične stijenke tipa II koje u svom sastavu sadrže mrežu lignina i drugih fenilpropanoidnih spojeva, dok je u stijenkama tipa I pojavnost lignina inicirana formiranjem sekundarne stanične stijenke (Carpita i sur., 2015). Lignin može činiti značajan dio stanične stijenke, poglavito u slučaju dobro razvijenih sekundarnih stijenki (30 % i više) (Zhong i Ye, 2015). U sekundarnim staničnim stijenkama lignin osigurava dodatnu čvrstoću, krutost i vodonepropusna svojstva.

### 2.4.2 Metode ekstrakcije polisaharida biljne stanične stijenke

#### 2.4.2.1 Ekstrakcija pektina

Pektin se danas često koristi kao prehrambeni aditiv i tehnološki adjuvans za različite namjene te ga je u tu svrhu potrebno prethodno ekstrahirati iz biljnog materijala. S obzirom na heterogenost nativnog pektina, ovisno o biljnom izvoru te različitim fizikalno-kemijskim karakteristikama, ali i željene karakteristike izdvojenog pektina, pristupi ekstrakciji pektina se razlikuju.

Pektinski polimeri jedni su od najreaktivnijih biljnih polisaharida te se makromolekulske strukture pektina mogu međusobno povezivati na različite načine. Među istima se u literaturi spominju ionski mostovi, diol-estri s borovim ionom, uronil-estri, hidrofobne interakcije te veze preko ferulinske kiseline (Sila i sur., 2009). Također, pektini se nalaze blisko povezani i s drugim sastavnim polisaharidima stanične stijenske, pr. glukuronoarabinoksilanima, ksiloglukanima i celulozom. Ekstraktibilnost pektinskih polisaharida, dakle, ovisi o zastupljenosti pojedinih intracelularnih interakcija, o čemu nadalje ovisi izbor ekstrakcijskih parametara (Tablica 9). U sekvencionalnom nizu, pektinske frakcije mogu se izdvojiti ekstrakcijom hladnom i/ili vrućom vodom ili puferom, hladnom i/ili vrućom otopinom kelirajućeg sredstva, zatim vrućim razrijeđenim otopinama kiselina i na kraju hladnim otopinama kalcijeva karbonata (Voragen i sur., 1995). Van Buren (1991) na sličan način navodi da se pektinski polisaharidi unutar stanične stijenske mogu podijeliti u 3 skupine: vodeno-topljivi pektini (ekstraktibilni s vodom ili razrijeđenim puferima), zatim kelator-topljivi pektini (ekstraktibilni s kelirajućim sredstvima) te protopektini (ekstraktibilni s razrijeđenim lužinama ili vrućim razrijeđenim kiselinama). Udjel ovih tipova pektina ovisi o biljnom izvoru i biljnom tkivu. Vodeno-topljivi i kelator-topljivi pektini uglavnom se sastoje od galakturonske kiseline s približno 2 % udjela ramnoze i 10-20 % udjela neutralnih šećera. Brojnost i distribucija slobodnih karboksilnih skupina unutar molekule glavni je preduvjet za ekstraktibilnost vodom ili kelirajućim sredstvom.

Tablica 9. Vrste pektina u staničnoj stijenci s obzirom na molekularne interakcije te ekstraktibilnost različitim otapalima (Chang i sur., 1993).

Tip pektina	Povezujuće molekularne interakcije	Postupak ekstrakcije
S-tip pektina	Slabe veze / van der Waalove veze	Pomoću hladne vode
A-tip pektina	Ionske interakcije	Pomoću hladnih otopina kelirajućih sredstava
B-tip pektina	Jake vodikove veze	Pomoću vruće vode
C-tip pektina	Vodikove veze i ionske interakcije	Pomoću vrućih otopina kelirajućih sredstava
P-tip pektina	Kovalentne veze	Pomoću razrijeđenih kiselina/lužina

Kelator-ekstraktibilni pektini najčešće se nalaze u središnjoj lameli te su vezani kalcijevim ionima (oblik gela kalcijeva pektata), što se najčešće opisuje modelom „egg-box“, odnosno konformacijom koja nalikuje kutiji/kartonu za jaja (Van Buren, 1991; Renard i Thibault, 1993).



Kelirajuća sredstva poput etilendiaminotetraoctene kiseline (EDTA), cikloheksandiaminotetraoctene kiseline (CDTA), natrijeva heksametafosfata i amonijeva oksalata vežu kalcijeve ione te na taj način oslabljuju interakcije između molekula pektina, povećavajući njihovu ekstraktibilnost (Renard i Thibault, 1993). Udjel kelator-ekstraktibilnih pektina ovisi o biljnoj vrsti i tkivu; primjerice, približno 80 % u nekim vrstama mahuna, nezrelim listovima kupusa ili nezrelom luku odnosi se na kelator-ekstraktibilni pektin, zatim 40-50 % u nekim sortama jabuka te samo 3 % u šećernoj repi (Van Buren, 1991). Kelirajuća sredstva najbolje djeluju pri relativno povišenim pH vrijednostima (iznad pH 7), što pak može negativno utjecati na integritet pektinske molekule zbog mogućih  $\beta$ -eliminacijskih reakcija. Stoga je takve ekstrakcije preporučljivo provoditi pri pH 4-5 i pri nižim temperaturama, s obzirom da ekstrakcije pri povišenoj temperaturi mogu djelovati degradirajuće i pri (relativno) nižim pH vrijednostima (pH 5) (Voragen i sur., 1995).

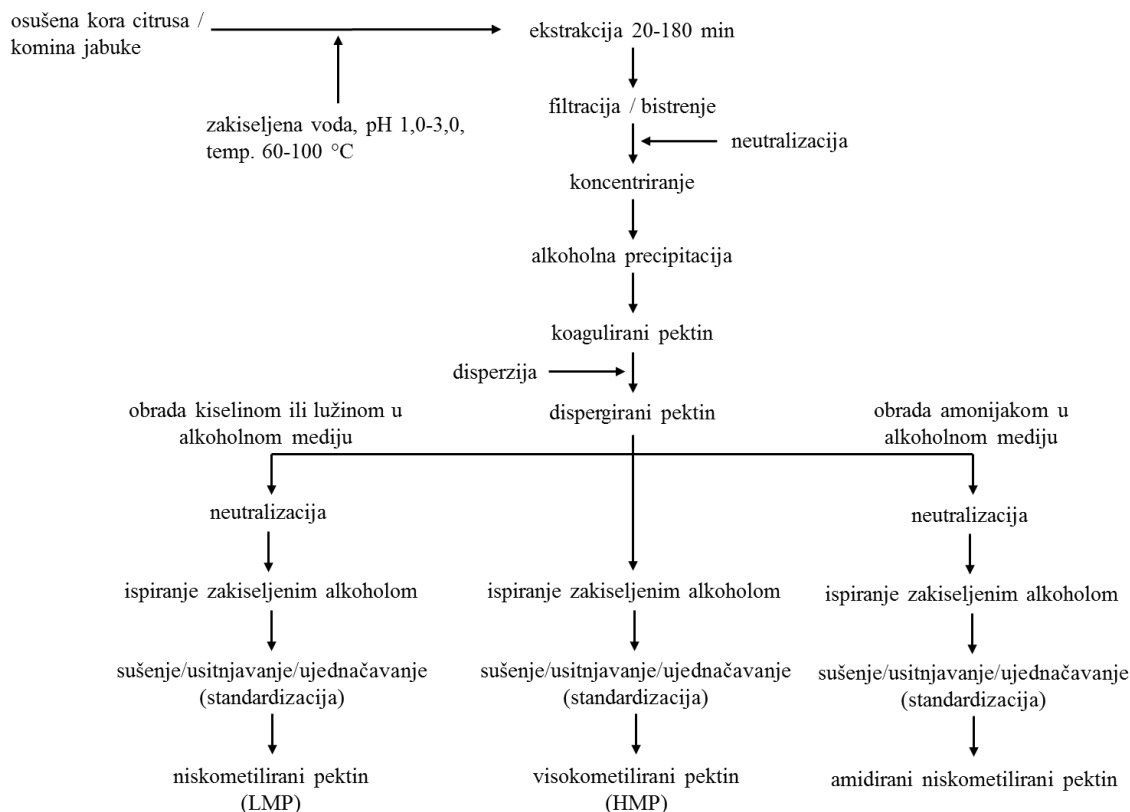
Nakon ekstrakcije vodom i kelirajućim sredstvom, preostali pektin u biljnom materijalu smatra se protpektinom koji je dobro usidren u staničnoj stijenci, a za njegovo izdvajanje potrebno je primijeniti hidrolizu kiselinom ili lužinom. Kiselinska hidroliza protopektina ujedno je i konvencionalan način proizvodnje komercijalnog pektina. Prilikom kiselinske ekstrakcije dolazi do hidrolize različitih tipova glikozidnih veza. Najslabije veze u molekuli pektina su između arabinofuranozilnih jedinica (u bočnim lancima RG-I), a najčvršće između jedinica galaktopiranozil uronske kiseline (Voragen i sur., 1995). Kiselinski-ekstrahirani pektini često sastavom nalikuju kelator-topljivim pektinima, međutim, pretpostavlja se da u nativnom obliku sadrže puno više neutralnih šećera, koji se degradiraju uslijed djelovanja kiseline (Van Buren, 1991). Za alkalno-ekstraktibilne pektine smatra se da su vezani esterskim vezama i putem oksidativnog sparivanja preko fenolnih kiselina (Voragen i sur., 1995). Jedan dio pektina preostane u biljnom materijalu i nakon intenzivnih ekstrakcija kelatorom, kiselinom i lužinom te se može smatrati neekstraktibilnim pektinom vrlo snažno vezanim za ostale polisaharide stanične stijenske.

Osnovni biljni izvori komercijalnog i industrijskog pektina su kore citrusa (limun, limeta, naranča, grejp), koje sadrže 20-30 % ekstraktibilnog pektina (u s.tv.), te kora i komina jabuke, koji sadrže 10-15 % ekstraktibilnog pektina (u s.tv.) (May, 1990; Panouillé i sur., 2007; Yapo i Gnakri, 2014; Müller-Maatsch i sur., 2016). Uz ove konvencionalne izvore, danas se istražuju i drugi agro-industrijski ostaci kao ekonomični inovativni izvori pektina, primjerice, pulpa šećerne repe, suncokretove glave te različiti ostaci iz prerade voća i povrća (Panouillé i sur., 2007; Müller-Maatsch, 2016; Adetunji i sur., 2017). Specifičnosti proizvodnje pektina variraju ovisno o vrsti sirovine te željenoj kvaliteti pektina; a osnovni parametri su pH ekstrakcijskog

otapala, omjer čvrsto-tekuće, temperatura i trajanje ekstrakcije. U pojednostavljenom i općenitom prikazu, pektin se dobiva ekstrakcijom vrućom zakiseljenom vodom (tj. vrućom razrijeđenom kiselinom). Za zakiseljavanje se najčešće koriste jake mineralne kiseline poput dušične ( $\text{HNO}_3$ ) i klorovodične kiseline ( $\text{HCl}$ ), a pH ekstrakcijskog otapala obično iznosi 1-3 (u prosjeku 2). Biljni materijal miješa se s otapalom u omjeru 1:35 - 1:15 (w/v), temperatura ekstrakcije iznosi 60-100 °C, a trajanje 20 - 180 minuta (Yapo i Gnakri, 2014; Adetunji i sur., 2017). Pektinski ekstrakt se nakon završene ekstrakcije odvaja filtracijom te se zatim uparava, a pektin se izdvaja precipitacijom alkoholom (najčešće izopropanolom, a dozvoljena je primjena i etanola i metanola) (May, 1990). Ovako izdvojen pektin karakteriziran je visokom viskoznom molarnom masom te udjelom galakturonske kiseline od najmanje 65 % (prema zahtjevu tržišta) (Yapo i Gnakri, 2014; Müller-Maatsch i sur., 2016). Ovakav pektin je također i visoko metiliran, stupnja esterifikacije približno 70 %, a s obzirom na daljnju željenu kvalitetu proizvoda, može se dodatno deesterificirati kemijskim (kiselinom ili lužinom) ili enzimskim postupcima, ili pak amidirati, u fazi uparenog ekstrakta ili alkoholne precipitacije (May, 1990; Yapo i Gnakri, 2014). Slika 18 shematski prikazuje proizvodnju komercijalnih oblika pektina. Svakako treba imati na umu da prinos pektina te fizikalno-kemijske karakteristike ovise o vrsti i kvaliteti biljne sirovine i načinu njegovog izdvajanja te je stoga potrebno optimizirati ekstrakciju pektina iz svakog novog izvora (s obzirom na željenu kvalitetu proizvoda i ekonomičnost postupka) te standardizirati konačnu kvalitetu pektina iz istog izvora.

Danas se istražuju mnoge inovativne tehnike ekstrakcije pektina sa svrhom povećanja ekstrakcijske učinkovitosti i ekonomičnosti postupka. U iste se ubrajaju ekstrakcije potpomognute enzimima, mikrovalovima, ultrazvukom i subkritičnim otapalima (Yapo i Gnakri, 2014; Adetunji i sur., 2017). Ultrazvukom-potpomognuta ekstrakcija (*engl.* ultrasound assisted extraction - UAE) je postupak u kojem se koristi akustična energija i otapalo kako bi se izdvojile željene komponente iz biljnog matriksa. Ekstrakcijska uspješnost, uz klasične ekstrakcijske parametre, temelji se na pojavi kavitacije, odnosno lokaliziranih područja izrazito visokog tlaka i temperature koja nastaju uslijed niza ekspanzija i kompresija molekula otapala tijekom širenja akustičnih valova kroz tekući medij. Kavitacijski mjehurići uzrokuju razaranje biljnih stanica uslijed čega stanični sadržaj postaje dostupniji otapalu te je poboljšan prijenos mase (Ebringerová i Hromádková, 2010). U ekstrakciji polisaharida UAE tehnikom najčešće se koriste ultrazvučne sonde, a parametri korištenja ultrazvuka odnose se na temperaturu, tlak, frekvenciju i vrijeme, a važan je također i omjer materijala i otapala (omjer čvrsto-tekuće) s obzirom da se intenzitet ultrazvuka smanjuje s povećanjem udjela čvrstih čestica (Adetunji i sur., 2017). Primjena ultrazvuka istražuje se u ekstrakciji pektina i hemiceluloza iz različitih

biljnih matriksa (Ebringerová i Hromádková, 2010; Wang i sur., 2015a), a kao osnovne prednosti ističu se smanjeno vrijeme ekstrakcije i volumen potrebnog otapala, kao i ukupna potrošnja energije. S druge strane, intenzitet ultrazvuka nehomogeno je raspodijeljen u cijelom ekstrakcijskom volumenu te može biti značajno smanjen s povećanim udjelom dispergirane čvrste faze. Također, uspješnost primjene ultrazvuka za ekstrakciju polisaharida uvelike ovisi o biljnom materijalu (Adetunji i sur., 2017).



Slika 18. Shematski prikaz konvencionalnog načina proizvodnje pektina iz kora citrusa ili komine jabuke (Yapo i Gnakri, 2014).

#### 2.4.2.2 Ekstrakcija hemiceluloze

S porastom trenda ponovnog iskorištavanja različitih agro-industrijskih ostataka, naročito lignoceluloznih materijala, u fokusu je također i potencijal iskorištavanja hemiceluloze, koja se često navodi kao drugi (uz celulozu) najzastupljeniji polisaharid u prirodi (Menon i sur., 2010). Pritom se često ističe valorizacija ksilana kao najzastupljenijeg hemiceluloznog polisaharida u mnogim vrstama agro-industrijskih ostataka (Sedlmeyer i sur., 2011; Naidu i sur., 2018). Selektivna ekstrakcija hemiceluloze jedan je od osnovnih preduvjeta za njezinu daljnju valorizaciju, napose u prehrambene svrhe.

Za izdvajanje ksilana najčešće se koriste ekstrakcija lužinom, ekstrakcija zaluženim vodikovim peroksidom, ekstrakcija organskim otapalima, ekstrakcija vrućom vodom, eksplozivna ekstrakcija vodenom parom (*engl.* steam explosion), ultrazvučna ekstrakcija, ekstruzija (Peng i sur., 2012; Naidu i sur., 2018). Pritom su u određenoj mjeri prisutne degradativne promjene koje mijenjaju nativni sastav i strukturu hemiceluloznih polimera te se odabir odgovarajuće tehnike usklađuje sa sastavom hemiceluloze unutar stanične stijenke, očuvanjem strukture i prinosa te postizanjem povoljnog omjera uložene energije i efikasnosti postupka (Naidu i sur., 2018). U cilju je, dakako, postići što veće iskorištenje biomase uz što manju degradaciju polimera te što nižu ukupnu cijenu postupka. S obzirom na heterogenost hemiceluloznih polimera općenito, a tako i ksilanskih polisahararida, usko vezanu uz biljni izvor, ne postoji univerzalan način njihove ekstrakcije.

U ekstrakciji lužinom najčešće se koriste natrijev hidroksid (NaOH), kalijev hidroksid (KOH), kalcijev hidroksid ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) i amonijev hidroksid ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) (Peng i sur., 2012; Naidu i sur., 2018), od kojih se najčešće koriste NaOH i KOH zbog viših ostvarenih prinosa (Lawther i sur., 1996; Peng i sur., 2012). Osim vrste otapala, na ekstrakcijski učinak utječu i koncentracija lužine, temperatura i vrijeme ekstrakcije (Peng i sur., 2012). Također se koristi i sekvencionalna ekstrakcija lužinom koja podrazumijeva niz ponovljenih ekstrakcija s lužinom u rastućoj koncentraciji, što rezultira izdvajanjem hemiceluloznih frakcija različitog sastava i strukture (Peng i sur. 2012; Naidu i sur., 2018). Ekstraktibilnost ksilana ograničena je fizikalnim i kovalentnim interakcijama istoga s drugim konstituentima stanične stijenke, naročito ligninom (Ebringerova i Heinze, 2000; Ebringerova i sur., 2005). Izravna ekstrakcija lužinom pokazala se uspješnom u ekstrakciji hemiceluloze iz stabljika kukuruza te slame raži i riže (Xiao i sur., 2001). S druge strane, kod mnogih sirovina nije moguće postići zadovoljavajuće prinose alkalnom ekstrakcijom, što se može objasniti različitim tipovima ksilana, odnosno različitim suspsituentima i njihovoj distribuciji duž ksilanske okosnice te značajnom zastupljenošću lignina i njegovim karakteristikama (Martínez i sur., 2016). Tako, primjerice, ksilani iz lignificiranih dijelova jednogodišnjih biljaka pokazuju bolju ekstraktibilnost u odnosu na ksilane iz drva, što se povezuje s nižim udjelom lignina, njegovom drugačijom strukturom te općenito drugačijom organizacijom stanične stijenke (Ebringerova i Heinze, 2000). U ekstrakciji ksilana iz visokolignificiranih sirovina često se koristi delignifikacija kao komplementarni postupak, neovisno o daljnjem postupku ekstrakcije ili zajedno s istim, primjerice u ekstrakciji zaluženim vodikovim peroksidom. Delignifikacija obuhvaća selektivno uklanjanje lignina iz biljnog materijala te predstavlja jedan od ključnih koraka za povećanje ekstraktibilnosti hemiceluloze ili općenito dostupnosti polisaharida stanične stijenke (Hubbel i

Ragauskas, 2010; Rabetafika i sur., 2014; Nan i sur., 2018). Pri ekstrakciji ksilana iz vrsta tvrdih drva često se koristi delignifikacija natrijevim kloritom i octenom kiselinom kao predtretman alkalnoj ekstrakciji (Ebringerova i Heinze, 2000). Ovaj postupak poznat je kao Wise-ova metoda (Wise i sur., 1946), te se zadržao kao jedna od najučestalijih laboratorijskih metoda za delignifikaciju biomase kojom se selektivno izdvaja lignin uz minimalni učinak na ksilan i gluklan u staničnoj stijenci (Ahlgren i Goring, 1971; Kumar i sur., 2013; Rabetafika i sur., 2014; Nan i sur., 2018). Metoda se temelji na oksidacijskom učinku visokoreaktivnog klorova dioksida, a provodi se u relativno blagim uvjetima: pri temperaturi 60-70 °C, tijekom 4-8 h, uz dodavanje svježih porcija natrijeva klorita i octene kiseline u pravilnim razmacima (svakih 1-2 h) (Nan i sur., 2018). Iskorištenje ovim postupkom, u smislu solvatacije lignina, može iznositi i 90 % (Kumar i sur., 2013). Preostali materijal nakon delignifikacije naziva se holoceluloza, a sastoji se od celuloze i hemiceluloze. Ovaj pojam najčešće se koristi u kontekstu drvne biomase. Ekstrakcija lužinom nakon prethodne delignifikacije (alkalna ekstrakcija holoceluloze) rezultira višim prinosima hemiceluloze (Rabetafika i sur., 2014), ista sadrži tek 1-2 % vezanog lignina te je svjetlije boje (svjetlo smeđa) u odnosu na hemicelulozu izdvojenu izravnom ekstrakcijom lužinom iz osnovne sekundarne sirovine, zbog izbjeljivajućeg učinka delignifikacijskog postupka (Peng i sur., 2012). Delignifikacija se može provesti i drugim sredstvima, od kojih se često spominje primjena zaluženog vodikovog peroksida. U ovoj reakciji osnovna reaktivna forma je hidroperoksidni anion ( $\text{HOO}^-$ ) koji reagira s nedisociranim vodikovim peroksidom, tvoreći tako reaktivne hidroksil radikale ( $^{\bullet}\text{OH}$ ) i superoksid anion radikale ( $\text{O}_2^-$ ) koji cijepaju esterske veze između hemiceluloze i lignina (Peng i sur., 2012; Rabetafika i sur., 2014).

Ekstrakcija organskim otapalima u literaturi poznata je i pod nazivom organosolv predtretman (Zhao i sur., 2009). Prednost ovog postupka je mogućnost recikliranja otapala. Otapalo za ekstrakciju čini organsko otapalo koje se može koristiti samostalno ili u kombinaciji s otopinom lužine ili kiseline i vode, u različitim omjerima. Organska otapala koja se najčešće koriste mogu se podijeliti na otapala niskog vrelišta (metanol i etanol) i visokog vrelišta (etilen glikol, glicerol), a kao kiselinski katalizatori koriste se mineralne kiseline (klorovodična, sumporna, fosforna) ili organske kiseline (mravlja, oksalna, acetilsalicilna) (Zhao i sur., 2009; Peng i sur., 2012; Naidu i sur., 2018). Primjena kiselinskog katalizatora ovisi o temperaturi postupka te se isti obično ne koristi pri višim temperaturama zbog osigurane autohidrolize te katalitičkog djelovanja oslobođenih kiselina iz biomase (Zhao i sur., 2009). Organosolv postupak rezultira visokim stupnjem solubilizacije lignina te se koristi kao alternativa delignifikaciji natrijevim kloritom (Peng i sur., 2012). Osim navedenih otapala, u ekstrakciji hemiceluloze često se koristi

i dimetilsulfoksid (DMSO), zasebno ili pomiješan s vodom, a osnovna prednost njegove primjene je očuvanje native strukture hemiceluloze (Peng i sur., 2012).

Od fizikalnih postupaka izdvajanja svakako treba spomenuti eksplozivnu ekstrakciju parom (*engl.* steam explosion). U ovom postupku materijal se tretira zasićenom parom pri visokom tlaku, nakon čega se tlak naglo smanji, što rezultira eksplozivnim razaranjem biljnog materijala te ujedno i depolimerizacijom lignina i narušavanjem celuloznih struktura unutar stanične stijenke, a time i povećanom ekstraktibilnosti hemiceluloze (Peng i sur., 2012; Naidu i sur., 2018). Nakon ovog postupka potrebno je provesti ekstrakciju hemiceluloze vrućom vodom. Prednosti ovog postupka su korištenje vode kao otapala te uvjeti visoke temperature i tlaka koji pogoduju kratkom vremenu zadržavanja materijala u sustavu, čime se smanjuje i mogućnost degradacije hemiceluloze (Naidu i sur., 2018).

Nakon ekstrakcije, otopljena hemiceluloza najčešće se izdvaja precipitacijom etanolom, a mogu se koristiti i druga organska otapala koja se miješaju s vodom, kao što su metanol i aceton. Ovisno o uvjetima precipitacije, u tekućoj fazi može zaostati jedan dio hemiceluloze, obično hemiceluloza male molekulske mase (Peng i sur., 2012). Osim navedene metode, postoje i drugi načini izdvajanja hemiceluloze iz otopine, bilo da se radi o izdvajanju u kvantitativnom smislu ili izdvajanju pojedinih frakcija hemiceluloznih polisaharida iz ukupnog ekstrakta, kako je opisano u radu Penga i suradnika (2012).

Tradicionalni i danas konvencionalno korišten postupak izdvajanja hemiceluloze podrazumijeva ekstrakciju lužinom, zatim neutralizaciju ekstrakta i precipitaciju hemiceluloze dodatkom etanola, a opisao ga je O'Dwyer još 1926. godine (O'Dwyer, 1926; Peng i sur., 2012). Kao i kod ekstrakcije pektina, fizikalno-kemijska svojstva ekstrahirane hemiceluloze ne ovise samo o biljnom izvoru, već i o načinu izdvajanja, pri čemu je potrebno postići kompromis između prinosa i željenih karakteristika s obzirom na daljnju primjenu.

### ***2.4.3 Mogućnosti primjene pektina i ksilana iz sekundarnih biljnih sirovina***

Pektin se konvencionalno koristi u brojnim prehrambenim proizvodima, najčešće u svrhu postizanja tehnološko-funkcionalnih svojstava proizvoda, odnosno kao sredstvo za geliranje, emulgator i stabilizator emulzija, sredstvo za zgušnjavanje, sredstvo za izradu prehrambenih filmova i premaza i sl. (Yapo i Gnakri, 2014). Osnovna primjena pektina je kao sredstva za geliranje u proizvodima na bazi voća; čak 80 % proizvedenog pektina u svijetu koristi se u proizvodnji džemova, marmelada, pekmeza i želea (Panouillé i sur., 2007). Stupanj esterifikacije, konkretno metil-esterifikacije (metilacije/metoksilacije) (*engl.* degree of methylation - DM) jedna je od najvažnijih karakteristika za ovu primjenu. S obzirom na to,

pektini se konvencionalno dijele na visokometilirane (*engl.* high methoxyl pectins - HMP; DM > 50 %) i niskometilirane pektine (*engl.* low methoxyl pectins - LMP; DM < 50 %) (Sila i sur., 2009). HMP pektini iskazuju svojstvo geliranja u prisutnosti visokog udjela suhe tvari (> 55 %) te kiselih uvjeta (pH ≤ 3,5). U uvjetima povećanog udjela suhe tvari dolazi do „istiskivanja vode“, tj. smanjenja aktiviteta vode između molekula pektina, a kiselu uvjeti sprječavaju deprotonizaciju slobodnih karboksilnih skupina usijed čega je moguće formirati stabilne interakcije između molekula pektina (Yapo i Gnakri, 2014). LMP pektini geliraju pri smanjenom udjelu suhe tvari (20-55 %) te isključivo uz prisutnost multivalentnih kationa, posebice kalcijevih iona, i snižene pH vrijednosti (pH 3-7). Nastajanje gel-strukture LMP pektina odvija se formiranjem kalcijevih mostova između nemetiliranih regija galakturonana, prema modelu „egg-box“, za što je potrebno 6-20 jedinica galaktopiranozil uronske kiseline između dva lanca (Yapo i Gnakri, 2014). S obzirom da nije potreban visoki udjel suhe tvari, LMP pektini koriste se u proizvodnji niskokaloričnih prehrambenih proizvoda.

U novije vrijeme se sve više ističe i zdravstveno-funkcionalna komponenta primjene pektina. Tako se pektin koristi kao prehrambeno vlakno, s obzirom da se ne može potpuno razgraditi u gastrointestinalnom sustavu čovjeka, te doprinosi fizikalnim i fermentativnim aspektima konzumacije prehrambenih vlakana, koji se nadalje očituju u brojnim pozitivnim zdravstvenim učincima (Endress i Mattes, 2009). Pektin iskazuje potencijalno prebiotička svojstva, međutim, ista ovise o vrsti probiotičkih bakterija te tipu pektina (Olano-Martin i sur., 2002). U kontekstu prebiotičke primjene, danas se sve više daje prednost pektinskim derivatima u obliku pektinskih oligosaharida (POS), kao novih prebiotika koji iskazuju bolja prebiotička svojstva u odnosu na pektin (Olano-Martin i sur., 2002). S obzirom na brojne inovativne izvore pektina, u obliku agro-industrijskih ostataka, čije karakteristike nisu zadovoljavajuće za komercijalnu primjenu, POS predstavljaju izrazito dobar način valorizacije pektinom-bogatih sekundarnih sirovina (Babbar i sur., 2016b). Karakteristike i proizvodnja pektinskih oligosaharida opisane su u poglavljima koja slijede.

Primjena ksilana danas se promatra kroz prizmu biorafinerije, što nudi mogućnost proizvodnje mnoštva različitih proizvoda (bioproizvoda) dodane vrijednost. Pritom, potencijalan smjer ponovne primjene ksilana ovisi o njegovom izvornom udjelu u sekundarnoj sirovini te ostvarenom prinosu u postupku izdvajanja, a također i o čistoći te fizikalno-kemijskim svojstvima izolata (Naidu i sur., 2018). Ksilan se može koristiti za proizvodnju različitih kemikalija dobivenih fermentacijom ili biokonverzijom ksiloze nakon potpune hidrolize ksilana (kemijske ili enzimске), kao platformnih kemikalija za daljnje biokonverzije ili izravnu industrijsku primjenu. Primjeri takvih vrijednih kemikalija su etanol, mliječna kiselina, furfural,

ksilitol (Naidu i sur., 2018). Ksilan se također može koristiti u proizvodnji materijala za pakiranje te hidrogelova, kao potencijalnih nosača određenih lijekova ili drugih funkcionalnih komponenata (Sedlmeyer, 2011; Naidu i sur., 2018). Možda jedan od najzanimljivijih načina valorizacije, u smislu najveće dodane vrijednosti uslijed potencijalne ponovne primjene u prehrani ljudi, jest proizvodnja oligosaharida (ksilooligosaharida) kao potencijalnih novih prebiotika (Sedlmeyer, 2011; Peng i sur., 2012). Specifičnosti proizvodnje ksilooligosaharida te njihova fizikalno-kemijska svojstva opisani su u poglavljima koja slijede.

## 2.5 Oligosaharidi iz sekundarnih biljnih sirovina

### 2.5.1 Definicija i fizikalno-kemijska svojstva

Oligosaharidi predstavljaju skupinu kratkolančanih ugljikohidrata koji se najčešće razlikuju od monosaharida i polisaharida prema stupnju polimerizacije (*engl.* degree of polymerization - DP). Ipak, takav način podjele nije jasno definiran s obzirom da je teško postaviti granicu između ovih skupina, naročito prema polisaharidima, zbog sličnosti kemijskih svojstava ili fizioloških učinaka (Voragen, 1998). Tako, broj monosaharidnih (monomernih) jedinica u oligosaharidima može značajno varirati. Prema IUB-IUPAC sustavu nomenklature, oligosaharidima se smatraju isključivo ugljikohidrati u kojima je glikozidnom vezom povezano (DP) 3-10 monosaharidnih jedinica (Barreteau i sur., 2006; Mussatto i Mancilha, 2007; Wang i sur., 2018). S obzirom da najkraći poznati prirodni polisaharid sadrži 35 monomernih jedinica, mnogi autori proširuju definiciju oligosaharida tako da ista obuhvaća i DP veći od 10, uključujući tako sve ugljikohidrate koji se nalaze između DP 1 i 35 (BeMiller, 2018). Također, i mnogi disaharidi (pr. laktuloza ili ksilobioza) pokazuju svojstva slična oligosaharidima te su čest (a često i dominantan) sastojak prebiotičkih oligosaharidnih pripravaka (Voragen, 1998). S obzirom na navedeno, oligosaharidi se u literaturi često definiraju kao ugljikohidrati DP 2-19 (25) (Barreteau i sur., 2006; Mussatto i Mancilha, 2007; Wang i sur., 2017; BeMiller, 2018). Navedeno proširenje definicije sukladno je i analitičkoj praksi izdvajanja i određivanja oligosaharida. Naime, topljivi polisaharidi se iz ekstrakata najčešće izdvajaju precipitacijom etanolom u udjelu od 78 (80) % (v/v), dok u tekućoj fazi se i dalje mogu naći otopljeni kratkolančani ugljikohidrati različitog DP. U tom kontekstu, oligosaharide predstavljaju niskomolekulski ugljikohidrati topljivi u 78 (80) % (v/v) etanolu, od kojih neki i stupnja polimerizacije do 100 (Cummings i sur., 1997; Robefroid i Slavin, 2000).

Prehrambeni oligosaharidi mogu se podijeliti na probavljive i neprobavljive, a mogu biti biljnoga ili životinjskoga podrijetla. Najveću važnost u prehrani ljudi imaju biljni neprobavljivi oligosaharidi (*engl.* non-digestible oligosacharides - NDO) s obzirom na dominantnu



zastupljenost u odnosu na druge oligosaharide te izražena funkcionalna svojstva (Mussatto i Mancilha, 2007). Općenito, fizikalno-kemijska i funkcionalna svojstva NDO ovisе o sastavu monosaharida te načinu njihovog povezivanja (tip glikozidne veze, struktura molekule), što pak ovisi o biljnom izvoru i/ili primjenjenom postupku proizvodnje (hidroliza ili sinteza).

Neprobavljivost NDO njihovo je najznačajnije svojstvo, a označava otpornost na hidrolizu u ljudskom probavnom sustavu (Roberfroid i Slavin, 2000), iz čega i proizlaze brojna fiziološki aktivna svojstva budući da ih organizam ne koristi kao izvor energije. NDO služe kao izvor ugljika i energije za mikrobiotu debelog crijeva stimulirajući rast i aktivnost određenog broja bakterijskih vrsta, posebno laktobacila i bifidobakterija. Fermentacijom NDO nastaju kratkolančane masne kiseline (acetat, propionat, butirat) te laktat i plinoviti produkti (vodik, ugljikov dioksid i metan), koji imaju brojne pozitivne učinke na zdravlje čovjeka (Mussatto i Mancilha, 2007). Prema tome, NDO se mogu smatrati prebionicima (Gibson i Roberfroid, 1995).

Od ostalih svojstava značajnih za primjenu u prehrambene svrhe, NDO su topljivi u vodi i posjeduju umjerenu slatkoću (u prosjeku 30-60 % manja slatkoća od saharoze), čiji intenzitet ovisi o kemijskoj strukturi, stupnju polimerizacije i prisutvu monosaharida i disaharida u oligosaharidnim pripravcima. Smatra se da se intenzitet slatkoće NDO smanjuje povećanjem DP (Crittenden i Playne, 1996; Voragen, 1998). Ovo svojstvo čini ih pogodnima za primjenu kao niskokalorična punila. Također iskazuju i svojstvo vezanja vode, mijenjaju temperaturu smrzavanja te mogu poboljšati teksturu i senzorska svojstva proizvoda povećanjem viskoznosti (NDO veće molekulske mase) (Voragen, 1998). S obzirom da su neprobavljivi, NDO ne pridonose energijskoj vrijednosti hrane u klasičnom smislu, ali ipak imaju određenu energijsku vrijednost koja proizlazi iz njihove fermentabilnosti u debelom crijevu (približno 1,5 kcal/g), slično kao i za topljiva prehrambena vlakna (Roberfroid i Slavin, 2000). Mnogi NDO otporni su na hidrolitičko djelovanje mikrobiote usne šupljine te pokazuju svojstvo nekariogenosti.

Kemijska stabilnost NDO ovisi o njihovom monosaharidnom sastavu, strukturi i vrsti glikozidnih veza; pritom,  $\beta$ -glikozidne veze su jače od  $\alpha$ -glikozidnih veza, heksoze su jače povezane od pentoza i deoksi-šećera, a također i piranozni oblici molekula šećera u odnosu na furanozne (Voragen, 1998).

### **2.5.2 Proizvodnja oligosaharida**

Načini proizvodnje NDO obuhvaćaju 4 kategorije:

1. ekstrakcija vrućom vodom iz prirodnih izvora i u izvornom obliku,
2. enzimska sinteza iz jednog ili smjese monosaharida ili disaharida,

3. parcijalna hidroliza (enzimska ili kemijska) viših oligosaharida ili polisaharida
4. kombinacija hidrolize i transglikozilacije (Crittenden i sur., 1996; Robefroid i Slavin, 2000).

Iz prirodnih izvora najčešće se izdvajaju oligosaharidi fruktanskog tipa (fruktotoligodaharidi - FOS) i  $\alpha$ -galaktooligosaharidi (GOS; rafinoza i derivati). Ovi NDO sastavni su dio različitih tkiva mnogih biljaka, poput lukovice, gomolja, korijena, srčike (jezgre) i sjemenke, gdje imaju ulogu rezervnih ugljikohidrata te štite biljku od abiotičkog stresa (smrzavanje, suša) (Martínez-Villaluenga i Frías, 2014). FOS se mogu naći u različitim biljnim vrstama porodica *Asteraceae* (cikorija, jeruzalemska artičoka, yacon, stevija, korijen čička), *Liliaceae* (luk, češnjak, poriluk), *Poaceae* (ječam, raž, pšenica), *Agavaceae* (agava) i *Asparagaceae* (šparoge), dok najbogatiji prirodni izvori GOS su vrste porodice *Fabaceae* (leća, grašak, slanutak, soja, grah) (Martínez-Villaluenga i Frías, 2014). Ipak, najveći dio komercijalnih NDO proizvodi se enzimskom sintezom ili hidrolizom. U enzimskoj sintezi koriste se visokospecifične glikoziltransferaze (EC 2.4.x.y.) (Saad i sur., 2013). Neovisno o načinu proizvodnje, NDO se ne nalaze u čistom obliku, već kao smjesa oligosaharida različitih DP, kao i monosaharida ili polisaharida izvorno korištenih u proizvodnji, a na tržištu su dostupni u različitim stupnjevima čistoće (Voragen, 1998). Tablica 10 prikazuje sastav i način proizvodnje najčešćih prebiotičkih NDO.

Sukladno tendenciji valorizacije ugljikohidratne frakcije agro-industrijskih ostataka, ovi otpadni i nedovoljno iskorišteni materijali mogu se smatrati potencijano dobrim izvorom novih NDO koji mogu nastati hidrolizom pektinskih ili hemiceluloznih polisaharida biljne stanične stijenke. Zbog iznimne varijabilnosti polisaharidne strukture, ovi izvori nude mogućnost otkrivanja novih oligosaharida sa značajnim fiziološkim svojstvima. Jednako tako, i hidrolitički procesi proizvodnje NDO dobivaju na važnosti, kao i inovativne tehnologije koje se mogu koristiti u tu svrhu. U tom kontekstu istražuju se sljedeći polisaharidi, odnosno potencijalni NDO iz istih (Barreteau i sur., 2006; Mussatto i Mancilha, 2007; Gómez i sur., 2017):

- ksilan → ksilooligosaharidi (XOS),
  - arabinoksilan → arabinoksilooligosaharidi (AXOS),
- glukomanan → glukomananooligosaharidi (GMOS),
- pektin → pektinski oligosaharidi (POS),
  - homogalakturnan → oligogalakturnonidi (OG),
  - supstituirani galakturnan → oligoramnogalakturnonidi (ORG),
  - arabinogalaktooligosaharidi (AGOS),
  - arabinoooligosaharidi (AOS) .

Tablica 10. Struktura i način proizvodnje najčešćih neprobavljivih oligosaharida (Crittenden i Playne, 1996; Sako i sur., 1999; Roberfroid i Slavin, 2000).

NDO	Osnovna kemijska struktura	Glikozidna veza	Način proizvodnje
<b>Fruktooligosaharidi (FOS)</b>	Glc-Fru <sub>n1</sub> , Fru-Fru <sub>n2</sub> ; n1=2-9 n2=1-9	β-(1,2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ ekstrakcija iz prirodnih izvora</li> <li>➤ enzimska sinteza iz saharoze</li> <li>➤ parcijalna hidroliza inulina</li> </ul>
<b>Galaktooligosaharidi (GOS)</b>	Glc-Gal <sub>n</sub> ; n=2-5	β-(1,6) - Gal-Gal β-(1,4) - Gal-Glc	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ enzimska sinteza iz laktoze</li> <li>➤ ekstrakcija iz prirodnih izvora</li> </ul>
<b>Izomaltooligosaharidi (IMOS)</b>	Glc <sub>n</sub> ; n=2-5	α-(1,6)	➤ parcijalna enzimska hidroliza + enzimska sinteza iz škroba
<b>Palatinoza (izomaltuloza) oligosaharidi</b>	Glc-Fru <sub>n</sub> ; n=2,4	α-(1,6)	➤ enzimska sinteza iz saharoze
<b>Laktosukroza (LAS)</b>	Gal-Glc-Fru	β-(1,4) - Gal-Glc α-(1,2) - Glc-Fru	➤ enzimska sinteza iz laktoze i saharoze
<b>Laktuloza (LA)</b>	Gal-Fru	β-(1,4)	➤ alkalna izomerizacija laktoze
<b>Ksilooligosaharidi (XOS)</b>	Xyl <sub>n</sub> ; n=2-9	β-(1,4)	➤ parcijalna hidroliza iz ksilana
<b>Sojini oligosaharidi (SOS)</b>	Gal <sub>n</sub> -Glc-Fru; n=1 ili 2	α-(1,6) - Gal-Gal α-(1,2) - Glc-Fru	➤ ekstrakcija iz prirodnog izvora
<b>Gentiooligosaharidi (GeOS)</b>	Glc <sub>n</sub> ; n=2-5	β-(1,6)	➤ enzimskom sintezom iz glukoze nakon hidrolize škroba

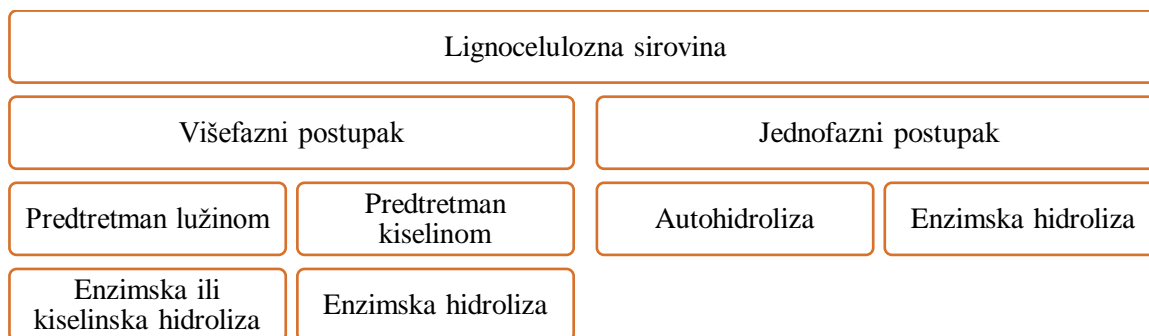
Iako se ksilooligosaharidi istražuju kao prebiotici već dugi niz godina, može ih se svrstati u skupinu nadolazećih i inovativnih prebiotika s obzirom na nove izvore u obliku različitih lignoceluloznih otpadnih materijala. Inovativnost u smislu novih oblika NDO očituje se kroz moguću prisutnost različitih funkcionalnih skupina vezanih na glikozilne jedinice polimera/oligomera. U prvom redu se to odnosi na ferulinsku kiselinu, *p*-kumarinsku kiselinu te acetilne skupine (Mussatto i Mancilha, 2007), kao i na oligosaharide razgranate strukture. Zbog svoje velike zastupljenosti u sirovinama obrađenima u ovoj disertaciji, u idućim poglavljima opisać će se specifični aspekti proizvodnje ksilooligosaharida i pektinskih oligosaharida te njihovi fiziološki učinci i potencijalna primjena.

#### 2.5.2.1 Ksilooligosaharidi

Ksilooligosaharidi (XOS) su oligomerni ugljikohidrati sastavljeni od ksiloznih monomera povezanih β-(1,4) glikozidnom vezom (Carvalho i sur., 2013). Prirodni izvori ksilooligosaharida su bambusovi izdanci, različito voće i povrće te mlijeko i med, ali u

nedovoljnom udjelu za komercijalnu iskoristivost ili ostvarenje pozitivnih zdravstvenih učinaka (Vázquez i sur., 2000). XOS se komercijalno proizvode hidrolizom ksilana, odnosno izvora bogatih ksilanom, kao što su lignocelulozne sirovine. S obzirom da ksilan predstavlja heterogenu skupinu polisaharida, u ovom kontekstu XOS se odnose na hidrolitičke produkte glukuronoksilana (4-*O*-metil-glukuronoksilana).

Proizvodnja XOS može se odvijati jednim od navedenih načina (Slika 19).

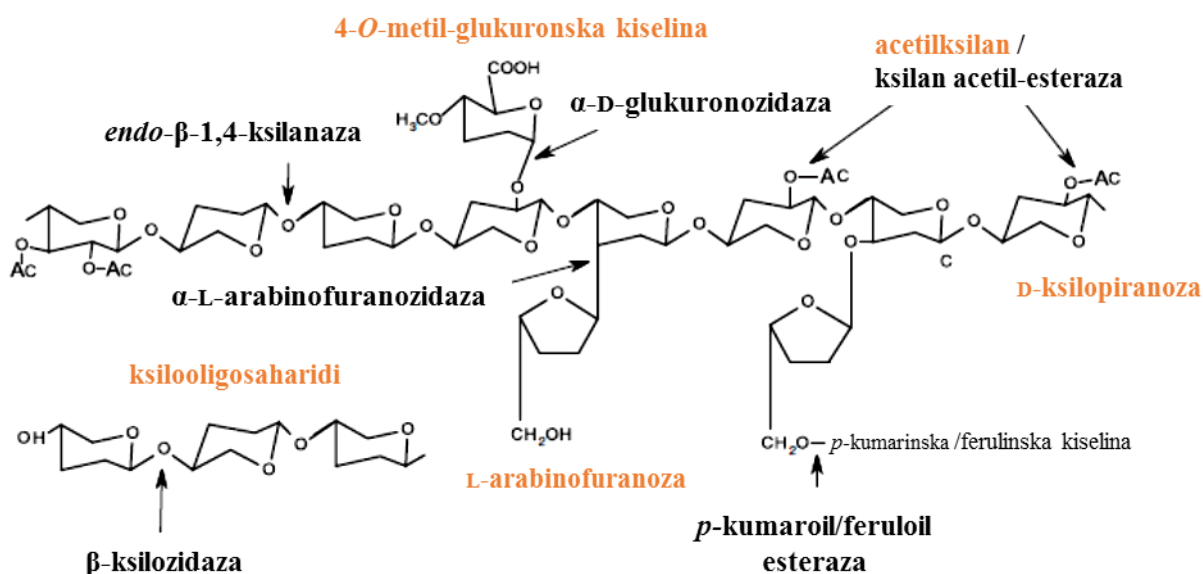


Slika 19. Načini proizvodnje ksilooligosaharida iz lignoceluloznih sirovina (Vázquez i sur., 2000; Achary i Prapulla, 2011; Carvalho i sur., 2013).

Osim navedene podjele, često se u literaturi ovi postupci grupiraju i kao kemijski, enzimski i fizikalni te njihove kombinacije (Samanta i sur., 2015).

Višefazni postupak najčešće se navodi u literaturi s obzirom da omogućuje dobivanje XOS veće čistoće te lakšu primjenu enzimski hidrolize uslijed smanjene rekalcitranciju supstrata u odnosu na izvornu sirovinu. U svrhu ekstrakcije ksilana najčešće se primjenjuje ekstrakcija lužinom (kako je opisano u poglavlju 2.4.2.2) kao predtretman, te naknadna enzimski hidroliza. Osnovni enzim za parcijalnu enzimski hidrolizu ksilana i proizvodnju XOS je *endo*- $\beta$ -1,4-ksilanaza (EC 3.2.1.8). Općenito, ksilanaze pripadaju skupini glikozid-hidrolaza (GH) iz CAZy (Carbohydrate-Active EnZYmes Database) obitelji 5, 7, 8, 10 i 11, od kojih iz obitelji 10 i 11 su najviše proučavane. *Endo*-ksilanaze nasumično hidroliziraju  $\beta$ -(1,4) glikozidnu vezu između *Xylp* jedinica ksilanske okosnice, a pripadnost obiteljima hidrolaza 10 i 11 očituje se u toleranciji na supstituciju ksilanske okosnice. GH 10 ksilanaze tolerantnije su na prisutnost supstituenata te mogu hidrolizirati glikozidne veze u blizini mjesta supstitucije, a za aktivnost zahtijevaju prisustvo 2 nesupstituirane *Xylp* jedinice. GH 11 ksilanaze za aktivnost trebaju 3 nesupstituirane *Xylp* jedinice u nizu te ne mogu hidrolizirati veze u blizini mjesta supstitucije (Hu i Saddler, 2018). Budući da pokazuju aktivnost na supstratima koji sadrže samo ksiloze te dugačkim lancima XOS, a također nemaju drugih katalitičkih aktivnosti, smatraju se tzv. pravim ksilanazama (Carvalho i sur., 2013). Osim *endo*-ksilanaze, u proizvodnji XOS mogu se

koristiti i drugi enzimi aktivni na supstratu ksilana (Slika 20) kako bi se povećao prinos XOS (Aachary i Prapulla, 2009; Akpinar et al., 2010). Egzoksilanazna aktivnost nije poželjna jer dovodi do povećanog otpuštanja ksiloze koja može inhibitorno djelovati na daljnju produkciju XOS (Carvalho i sur., 2013; Samanta i sur., 2015). Općenito su enzimske metode preferabilne u proizvodnji XOS visoke prehrambene kakvoće zbog ostvarivanja visokih prinosa, smanjenja mogućnosti nastanka degradativnih produkata, te blagih uvjeta reakcije. Enzimi se mogu dodavati izravno u reakcijsku smjesu, u imobiliziranom obliku ili se otpuštati u medij uslijed mikrobne aktivnosti (Carvalho i sur., 2013). Mikroorganizmi producenski ksilanolitičkih enzima različite su vrste rodova *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, *Phanerochaetes*, *Chytridiomycetes*, *Ruminococcus*, *Fibrobacter*, *Clostridium*, *Bacillus* i *Thermoascus*, a proizvodnja se odvija na prikladnim ligniceluloznim supstratima submerzno ili fermentacijom u čvrstom/polučvrstom stanju (Carvalho i sur., 2013).



Slika 20. Prikaz mjesta djelovanja različitih ksilanolitičkih enzima (Sunna i Antranikian, 1997).

Autohidroliza (hidrotermalni postupak, predtretman vodom) najznačajniji je fizikalni postupak proizvodnje XOS u kojem se lignocelulozna sirovina tretira vodom pri povišenom tlaku i temperaturi (150-230 °C), uslijed čega otapalo prodire u staničnu stijenku te uzrokuje depolimerizaciju lignina i hemiceluloze te bubrenje celuloze (Ruiz i sur. 2013). Pri optimiranim procesnim uvjetima, molekule vode autoioniziraju u hidronijeve (H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>) i hidroksidne (OH<sup>-</sup>) ione, od kojih hidronijevi ioni katalitički djeluju na hidrolizu glikozidnih veza, a dodatno zakiseljavanje otapala ostvaruje se hidrolizom acetilnih skupina s molekula hemiceluloze

(Carvalho i sur., 2013; Ruiz i sur. 2013; Samanta i sur., 2015). Ovaj postupak posljednjih se godina intenzivno istražuje za primjenu proizvodnje XOS iz različitih lignoceluloznih sirovina, s prednostima korištenja vode kao jedinog otapala, visoke specifičnosti s obzirom na ksilan te visokog prinosa XOS (Parajo i sur., 2004; Nabarlatz i sur., 2007; Gómez i sur., 2017). S druge strane, za izvođenje autohidrolize potrebna je specijalizirana oprema, a parametre postupka potrebno je prilagoditi sirovini, pri čemu blaži procesni uvjeti koji pogoduju hidrolizi hemiceluloze zahtijevaju naknadnu enzimsku hidrolizu za proizvodnju XOS nižih DP (Moure i sur., 2006). Tablica 11 prikazuje primjere proizvodnje XOS iz različitih lignoceluloznih sirovina.

Pročišćavanje XOS nakon hidrolize ksilana može biti vrlo složeno te postoji nekoliko pristupa ovoj problematici. XOS se u prvoj fazi mogu izdvojiti/pročistiti precipitacijom neželjenih molekula pomoću metanola, etanola, propanola ili acetona, kao u slučaju izdvajanja polisaharida, a osim nedovoljno hidroliziranih fragmentata polisaharida izdvajaju se i druge otopljene tvari (Aachary i Prapulla, 2011). Povećanjem udjela organskog otapala smanjuje se DP molekula koje mogu ostati u tekućoj fazi. Adsorpcija na materijalima s aktivnom površinom (primjerice, aktivni ugljen) najčešća je metoda pročišćavanja XOS te se koristi u kombinaciji s drugim tehnikama (Vázquez i sur., 2000; Aachary i Prapulla, 2011; Qing i sur., 2013). Membranske tehnike poput ultra- i nanofiltracije najperspektivnije su metode za visokoselektivno pročišćavanje XOS (Aachary i Prapulla, 2011).

Komercijalno dostupni XOS su praškasti preparati bijele boje te sadrže XOS različitog DP, obično od 2-5, od kojih najviše DP 2 (ksilobiozu) i DP 3 (ksilotriozu) (Gullón i sur., 2008).

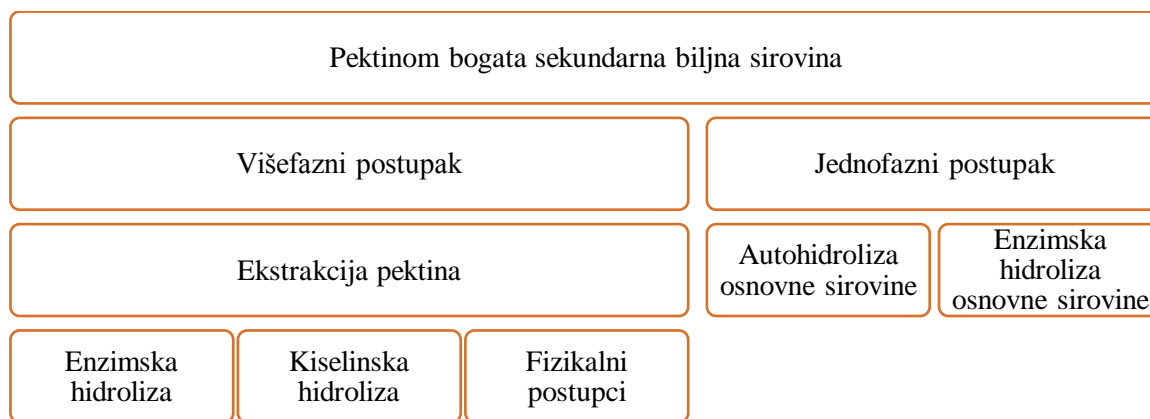
Tablica 11. Pregled sirovina i načina proizvodnje ksilooligosaharida (XOS).

Lignocelulozna sirovina	Proizvodnja XOS		Prinos ksilana	Prinos XOS	Sastav XOS	Referenca
Pšenična slama	ekstrakcija ksilana eksplozijom parom	<i>endo</i> -ksilanaza i $\beta$ -glukozidaza	36,0 % početnog udjela ksilana	71 % (8 h)	DP 2-6	Alvarez i suradnici (2017)
Kukuruzni oklasci	ekstrakcija ksilana lužinom	<i>endo</i> -ksilanaza iz <i>Aspergillus foetidus</i> MTCC 4898	17,9 % početnog udjela ksilana	60 % (8 h)	DP 2-5	Chapla i suradnici (2012)
Kukuruzni oklasci	predtretman sirovine lužinom	<i>endo</i> -ksilanaza iz <i>Aspergillus oryzae</i> MTCC 5154	40,8 % u predtretiranoj sirovini	86,7 (6 h)	DP $\geq$ 2	Aachari i Prapulla (2009)
Kukuruzni oklasci	predtretman sirovine lužinom	komercijalna ksilanaza Bioxyl P40 (Biocon Ltd., Indija)	40,8 % u predtretiranoj sirovini	89 %	DP $\geq$ 2	Aachari i Prapulla (2009)
Kukuruzni oklasci	predtretman sirovine kiselinom	komercijalna ksilanaza Bioxyl P40 (Biocon Ltd., Indija)	39,2 % u predtretiranoj sirovini	52 %	DP $\geq$ 2	Aachari i Prapulla (2009)
Stabljika duhana	ekstrakcija ksilana lužinom	<i>endo</i> -ksilanaza iz <i>Aspergillus niger</i>	21,8 % početne mase sirovine	20,7 %	DP 1-6	Akpinar i suradnici (2009)
Stabljika pamuka	ekstrakcija ksilana lužinom	<i>endo</i> -ksilanaza iz <i>Aspergillus niger</i>	21,3 % početne mase sirovine	15 %	DP 1-6	Akpinar i suradnici (2009)
Stabljika suncokreta	ekstrakcija ksilana lužinom	<i>endo</i> -ksilanaza iz <i>Aspergillus niger</i>	18,9 % početne mase sirovine	19 %	DP 1-6	Akpinar i suradnici (2009)
Pšenična slama	ekstrakcija ksilana lužinom	<i>endo</i> -ksilanaza iz <i>Aspergillus niger</i>	20,6 % početne mase sirovine	14,4 %	DP 1-6	Akpinar i suradnici (2009)
Ljuska badema		autohidroliza	~ 65 % početnog udjela hemiceluloze	~ 60 % početnog udjela ksilana	nepoznato	Nabarlatz i suradnici (2013)
Oklasci kukuruza		autohidroliza	~ 65 % početnog udjela hemiceluloze	~ 43 % početnog udjela ksilana	nepoznato	Nabarlatz i suradnici (2013)
Koštice masline		autohidroliza	~ 65 % početnog udjela hemiceluloze	~ 55 % početnog udjela ksilana	nepoznato	Nabarlatz i suradnici (2013)

### 2.5.2.2 Pektinski oligosaharidi

Pektinski oligosaharidi (POS) obuhvaćaju različite oligosaharidne derivate nastale djelomičnom depolimerizacijom pektina, primjerice oligogalakturonide (OGaU), oligoramnogalakturonide (ORhaGaU), arabinogalaktooligosaharide (AGOS), arabinooligosaharide (AOS), galaktooligosaharide (GaOS) (Gómez i sur., 2017). Istraživanja novih biljnih izvora, načina dobivanja POS, te funkcionalnih svojstava istih, potaknuta su dodanom vrijednosti POS kao novih prebiotičkih kandidata te rastućim trendom valorizacije otpada iz voća i povrća koji obiluju pektinom. Primjeri takvih vrijednih sekundarnih sirovina su već poznate pektinske sirovine koje se koriste za proizvodnju komercijalnog pektina: kore citrusa - naranča (30 % w/w) i limun (32 % w/w), te komina jabuke (21 % w/w), ali i drugi agro-industrijski ostaci bogati pektinom, poput pulpe šećerne repe (16 % w/w), breskve (18 % w/w), manga (21 % w/w), buče (22 % w/w), ljuske luka (27-34 %), pulpe krumpira (15 % w/w), komine masline (34 % w/w) (brojevi u zagradama odnose se na maseni udjel pektina u sirovini) (Gullón i sur., 2013; Babbar i sur., 2016b).

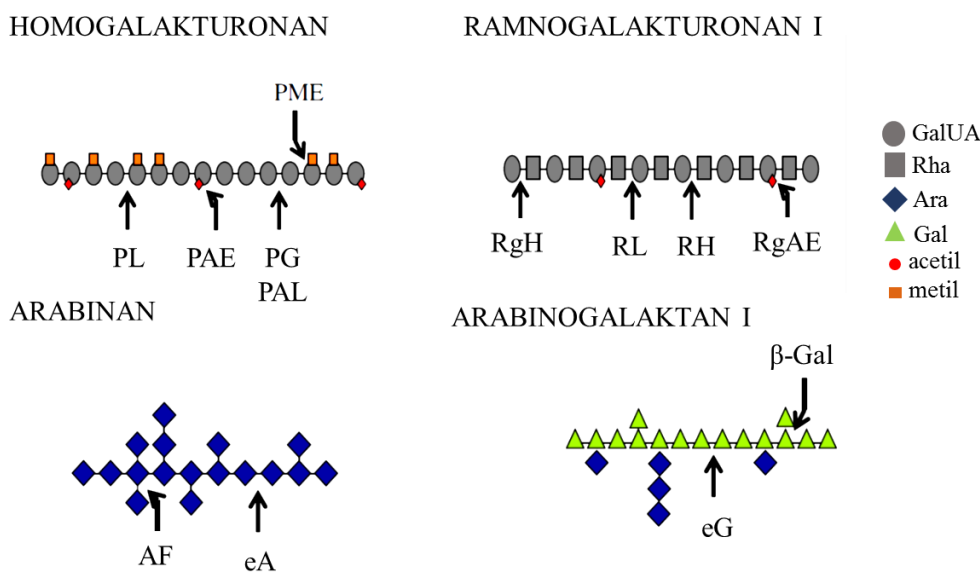
POS se mogu proizvesti depolimerizacijom izvornih pektinskih sirovina enzimskim ili fizikalnim postupcima ili parcijalnom hidrolizom prethodno ekstrahiranog pektina pomoću fizikalnih, kemijskih ili enzimskih metoda (Gullón i sur., 2013) (Slika 21).



Slika 21. Načini proizvodnje pektinskih oligosaharida iz sekundarnih biljnih sirovina (Gullón i sur., 2013).

Enzimске metode najčešće se koriste zbog svoje specifičnosti, sigurnosti i smanjene mogućnosti nastanka neželjnih produkata (Babbar i sur., 2016b). S obzirom na izrazitu složenost sastava i strukture pektinske molekule, za njezinu djelomičnu (i potpunu) depolimerizaciju koriste se različiti enzimi (Slika 22).





Slika 22. Prikaz mjesta djelovanja glavnih pektinolitičkih enzima na kopolimernim blokovima molekule pektina (Bonnin i sur., 2014); PG - *endo*-poligalakturonaza, PME - pektin metil-esteraza; PL - pektin lijaza; PAE - pektin acetil-esteraza, PAL - pektat lijaza, RgH - ramnogalakturonan galakturonohidrolaza, RL - ramnogalakturonan lijaza, RH - ramnogalakturonan hidrolaza, RgAE - ramnogalakturonan acetil-esteraza, AF - arabinofuranozidaza, eA - *endo*-arabinanaza, eG - *endo*-galaktanaza,  $\beta$ -Gal -  $\beta$ -galaktozidaza.

Pektinolitički enzimi općenito se mogu podijeliti na enzime aktivne na homogalakturonanu i enzime aktivne na ramnogalakturonanu (Bonnin i sur., 2014). Depolimerizacija homogalakturonanske regije može se odvijati putem hidrolize ili  $\beta$ -eliminacije, a specifični enzimi iskazuju aktivnost s obzirom na nisko ili visoko esterificirani supstrat. *Endo*-poligalakturonaza (EC 3.2.1.15) hidrolitički nasumično cijepa glikozidnu  $\alpha$ -(1,4) vezu između galakturonskih jedinica, te može imati različitu toleranciju s obzirom na prisutnost metilnih ili acetilnih skupina (stupanj esterifikacije homogalakturonana) (Bonnin i sur., 2014). U klasičnom smislu, *endo*-poligalakturonaza je visokospecifična za nisko metil-supstituirani galakturonan, odnosno pektinsku kiselinu (Voragen i sur., 2001; Tucker i Seymour, 2002; Babbar i sur., 2016b), dok neki autori navode zasebnu kategoriju *endo*-poligalakturonaza specifičnih za visokometilirane galakturonane, tj. *endo*-polimetilgalakturonaze (Pedrolli i sur., 2009). *Egzo*-poligalakturonaza (EC 3.2.1.67) djeluje na nereducirajućem kraju molekule te odcjepljuje po jednu ili dvije molekule galakturonske kiseline (Voragen i sur., 2001; Babbar i sur., 2016b). Pektat lijaza (transeliminaza) djeluje  $\beta$ -eliminacijski te nasumično cijepa glikozidnu vezu između dvije nesupstituirane jedinice galakturonske kiseline, pri čemu nastaje dvostruka veza na novonastalom nereducirajućem kraju galakturonske kiseline (Bonnin i sur., 2014). Pektat lijaze iskazuju specifičnost spram niskoesterificiranih HG; međutim, neke lijaze mogu biti

aktivne i kada su obje galakturonske jedinice metilirane te se tada prikladnije zovu pektin lijaze (EC 4.2.2.10), a također mogu imati i *egzo*-lijaznu aktivnost (Tucker i Seymour, 2002). Lijaze nemaju veliku važnost u prehrambenoj industriji s obzirom da su najjaktivnije u blago bazičnim uvjetima, ali imaju važnost u razgradnji pektina u debelom crijevu čovjeka (Voragen i sur., 2001). Aktivnošću enzima esteraza - pektin metil-esteraze (EC 3.1.1.11) i pektin acetil-esteraze (EC 3.1.1.6), uklanjaju se metilne i acetilne skupine sa HG, čime se može povećati dostupnost nisko esterificiranog supstrata *endo*-aktivnim enzimima (Babbar i sur., 2016b). Razgradnja ramnogalakturonanskih (RG) regija provodi se ramnogalakturonan hidrolazom ili lijazom, pri čemu prvo navedeni enzim pokazuje aktivnost na  $\alpha$ -(1,2) glikozidnim vezama, dok drugo navedeni na  $\alpha$ -(1,4) vezama između jedinica galakturonske kiseline i ramnoze (Babbar i sur., 2016b). Ovi enzimi smatraju se manje zastupljenim pektinolitičkim enzimima (Tucker i Seymour, 2002). Ramnogalakturonan acetil-esteraza zaslužna je uklanjanje acetilnih skupina s RG-I domena (Bonnin i sur., 2014). Neutralni bočni lanci pektina mogu biti supstrat arabinanazama i galaktanazama. *Endo*-arabinanaza nasumično hidrolizira  $\alpha$ -(1,5) glikozidnu vezu nesusstituiranih arabinana, *egzo*-arabinanaza hidrolizira arabinozu, arabionobiozu i arabinotriozu s nereducirajućih krajeva linearnih arabinana, a arabinofuranozidaza odcjepljuje arabinozu s bočnih lanaca arabinana i arabinanskih oligomera. *Endo*- i *egzo*-galaktanaza djeluju na  $\beta$ -(1,4) glikozidnim vezama linearnih galaktana, dok  $\beta$ -galaktozidaza hidrolizira terminalno vezane bočne lance galaktoze s galaktana i arabinogalaktana (Babbar i sur., 2016b).

Na hidrolitički profil POS utječu različiti parametri, kao što su prisutnost ili odsutnost određene enzimske aktivnosti, koncentracija enzima, vrijeme i temperatura reakcije (Babbar i sur., 2016b). Tablica 12 prikazuje neke od u literaturi dostupnih primjera proizvodnje POS..

Kemijske metode (kiselinska hidroliza) u proizvodnji POS nisu puno zastupljene zbog svoje nespecifičnosti, a od fizikalnih postupaka, kao i kod depolimerizacije ksilana, ističe se autohidroliza (Gullón i sur., 2013; Babbar i sur., 2016b).

U svrhu pročišćavanja POS najčešće se primjenjuju membranske tehnike (Babbar i sur., 2016b; Gómez i sur., 2017).

Tablica 12. Pregled sirovina i načina proizvodnje pektinskih oligosaharida (POS).

Sekundarna sirovina	Proizvodnja POS	Prinos pektina	Prinos POS	Sastav POS	Referenca
Ljuska luka	ekstrakcija pektina natrijevim heksametafosfatom	enzimski <i>endo</i> -poligalakturonazom M2 (EPG-M2) Viscozyme L (V-2010) multienzimski koktel i Pectinase multienzimski koktel (Sigma Aldrich, Njemačka)	21,3 % ukupne galakturonske kiseline	Hidroliza s EPG-M2 usmjerena je u nastajanje DP3 i DP4 za niže koncentracije enzima i kraću hidrolizu Hidroliza s Viscozyme i Pectinase koktelima generira dominantno monomere	Babbar i suradnici (2016a)
Otpadne kore limuna	autohidroliza s naknadnom membranskom filtracijom (RC 1 kDa - TFF6 Milipore, SAD)	-	22,3 % ukupnog udjela GalUA u hidrolizatu, s većim udjelom nezasićenih OGaU	DP ≤13	Gómez i suradnici (2016)
Otpadne kore limuna	autohidroliza	enzimska hidroliza autohidrolizata <i>endo</i> -poligalakturonazom ( <i>Kluyveromyces fragilis</i> ) i pektin lijazom ( <i>Aspergillus niger</i> )	-	93 % ukupnog udjela GalUA u hidrolizatu, s većim udjelom zasićenih OGaU (81 %)	Gómez i suradnici (2016)
Otpadne kore limuna	ekstrakcija pektina vodom	enzimska hidroliza autohidrolizata <i>endo</i> -poligalakturonazom ( <i>Kluyveromyces fragilis</i> ) i pektin lijazom ( <i>Aspergillus niger</i> )	-	88 % ukupnog udjela GalUA u hidrolizatu, s većim udjelom zasićenih OGaU (94 %)	Gómez i suradnici (2016)
Otpadne kore naranče	ekstrakcija materijala vodom	autohidroliza vodeno-netopljivog materijama	-	25 % vodeno-netopljivog materijala OGaU/AOS/GaOS = 10:3,8:3,2	nepoznato Martínez i suradnici (2010a)
Pulpa šećerne repe	neizotermalna autohidroliza	-	31 % sirovine (47 % AOS, 43 % OGaU, 10 % GaOA)	nepoznato	Martínez i suradnici (2010b)

Tablica 12. Pregled sirovina i načina proizvodnje pektinskih oligosaharida (POS) - nastavak.

Sekundarna sirovina	Proizvodnja POS	Prinos pektina	Prinos POS	Sastav POS	Referenca	
Pulpa šećerne repe	autohidroliza s naknadnom membranskom filtracijom (membrana RC 1 kDa - TFF6 Milipore, SAD)	-	41,5 % ukupnog udjela GalUA u hidrolizatu, s većim udjelom nezasićenih OGaU (73 %)	DP ≤13	Gómez i suradnici (2016)	
Pulpa šećerne repe	autohidroliza	-	enzimska hidroliza autohidrolizata <i>endo</i> -poligalakturonazom ( <i>Kluyveromyces fragilis</i> ) i pektin lijazom ( <i>Aspergillus niger</i> )	73 % ukupnog udjela GalUA u hidrolizatu, s većim udjelom zasićenih OGaU (58 %)	DP ≤13	Gómez i suradnici (2016)
Pulpa šećerne repe	ekstrakcija pektina vodom	-	enzimska hidroliza autohidrolizata <i>endo</i> -poligalakturonazom ( <i>Kluyveromyces fragilis</i> ) i pektin lijazom ( <i>Aspergillus niger</i> )	42,6 % ukupnog udjela GalUA u hidrolizatu, s većim udjelom nezasićenih OGaU (68 %)	DP ≤13	Gómez i suradnici (2016)
Komercijalni pektin iz pulpe šećerne repe	enzimska hidroliza sekvencionalno pektin lijazom, zatim smjesom galaktanaze, galaktozidaze, arabinanaze i arabinofuranozidaze te na kraju s ramnogalakturonazom	-	20,1 % OGaU na masu pektina, 6,7 % ORhaGaU i ORhaGaUGal na masu pektina	DP 2-8 DP 4-9	Holck i suradnici (2011a)	
Pulpa šećerne repe	enzimska hidroliza cjelovitog supstrata Celluclast 1,5 L i Viscozyme L enzimima (Sigma Aldrich, Njemačka)	-	26,5 % (w/w)	nepoznato	Babbar i suradnici (2017)	

GalUA - galakturonska kiselina, OGaU - oligogalakturonidi, GaOS - galaktooligosaharidi, AOS - arabinoooligosaharidi, ORhaGaU - oligoramongalakturonidi, ORhaGaUGal - ramongalakturonogalaktooligosaharidi.

### 2.5.3 Funkcionalna svojstva

Ksilooligosaharidi i pektinski oligosaharidi često se navode kao potencijalni prebiotici, odnosno novi prebiotički kandidati, za što je najzaslužnija njihova otpornost na razgradnju i apsorpciju u gastro-intestinalnom traktu, uslijed čega dopijevaju u debelo crijevo relativno nepromijenjeni. Na taj način postaju dostupni mikrobioti debelog crijeva koja ih može koristiti kao izvor ugljika i energije za rast i metaboličku aktivnost. Koncept prebiotika predstavili su Gibson i Roberfroid (1995) definicijom: „prebiotici su neprobavljivi sastojci hrane koji pozitivno djeluju na zdravlje domaćina selektivno stimulirajući rast i/ili aktivnost jedne ili ograničenog broja vrsta bakterija u debelom crijevu“. Razvojem istraživanja i novih spoznaja, ova definicija kasnije je izmijenjena te su prebiotici definirani kao „selektivno fermentirani sastojci koji omogućuju specifične promjene u sastavu i/ili aktivnosti intestinalne mikrobiote, što donosi pozitivne učinke na zdravlje i ukupnu dobrobit domaćina (Gibson i sur., 2004; Roberfroid, 2007). Pritom su pozitivni učinci na zdravlje indirektni, odnosno nastaju kao posljedica rasta i aktivnosti mikrobiote na prebiotičkom supstratu. Ciljane mikrobne skupine su probiotičke bakterije u debelom crijevu, laktobacili i bifidobakterije, zbog njihovog poznatog doprinosa zdravlju. Prebiotički učinak posebice se očituje u aktivnosti bifidobakterija te se stoga često koristi i naziv „bifidogeni učinak“(Anadón i sur., 2016). O važnosti bifidobakterija govori i pojam „prebiotičkog indeksa“ koji se koristi u evaluaciji prebiotičkog potencijala, a definiran je upravo kao apsolutni porast broja bifidobakterija po gramu fecesa te dnevnoj dozi (u gramima) konzumiranog prebiotika (Roberfroid, 2007; Anadón i sur., 2016). Fermentacijom prebiotika u debelom crijevu selektivno se povećava broj laktobacila i bifidobakterija, a kao produkti njihovog metabolizma nastaju kratkolančane kiseline (acetat, propionat, butirat) te laktat i plinoviti produkti (vodik, ugljikov dioksid i metan) (Anadón i sur., 2016).

Linearne kratkolančane masne kiseline (engl. short-chain fatty acids - SCFA) primarni su produkt fermentacije prebiotika (i vlakana općento), a njihova uloga u organizmu je vrlo važna. Naime, SCFA služe kao dodatan izvor ugljika i energije za intestinalnu mikrobiotu, ali i za stanice pojedinih organskih sustava domaćina. Acetat proizvode primarno bifidobakterije, a metabolizira se u mišićima, bubrezima, srcu i mozgu. Propionat najviše proizvode propionibakterije i *Bacteroides*, a isti ima važan utjecaj na jetru i smanjenje sinteze kolesterola. Butirat je osnovni izvor energije za stanice debelog crijeva (kolonocite) te utječe na smanjenje upalnih procesa i karcinogenezu, a najviše ga proizvode mikrobne vrste iz porodica *Lachnospiraceae* i *Ruminococcaceae* (Valcheva i Dieleman, 2017). Važan aspekt SCFA je i tzv. unakrsno hranjenje (engl. cross-feeding), s obzirom da pojedine intestinalne bakterije koje

ne mogu fermentirati vlakna (prebiotike), koriste SCFA kao izvor ugljika i energije, proizvodeći tako nove metabolite (SCFA) te mijenjajući njihovu ravnotežu na korist domaćina (Mäkeläinen i sur., 2009). Ovaj primjer ilustrira kompleksnost i dalekosežnost prebiotičkih učinaka, a isti se na taj način protežu na različite imunomodulatorne aktivnosti, prevenciju karcinoma, utjecaj na metabolizam lipida i glukoze, apsorpciju mineralnih tvari (Steed i Macfarlane, 2009; Saad i sur., 2013). Tablica 13 prikazuje neke od pozitivnih učinaka prebiotika.

Tablica 13. Pozitivni učinci prebiotika (Anadón i sur., 2016).

#### Učinci prebiotika

- 
- povećana proizvodnja i/ili promjena sastava SCFA
  - povećana masa fecesa te blago snižavanje pH vrijednosti lumena debelog crijeva
  - modulacija intestinalne mikrobiote, posebice bakterija koje fermentiraju ugljikohidrate, te uspostavljanje kiselijeg pH
  - smanjena proizvodnja putrefaktivnih, toksičnih, mutagenih i genotoksičnih tvari, bakterijskih metabolita i enzima
  - niska aktivnost  $\beta$ -glukuronidaze i nitroreduktaze bifidobakterija i laktobacila
  - smanjena proizvodnja krajnjih dušikovih produkata i reduktivnih enzima
  - proizvodnja butirata koji osnažuje regeneraciju intestinalnog epitela
  - povećana proizvodnja vezivnih proteina ili aktivnih nosača mineralnih tvari
  - povećan imunitet i modulacija proizvodnje mucina
- 

Osnovni kriteriji za prebiotički status su *in vitro* i *in vivo* potvrđene tvrdnje:

- 1) otpornosti na razgradnju i apsorpciju u gastrointestinalnom traktu - otpornost na kisele uvjete želuca i hidrolizu probavnim enzimima sisavaca,
- 2) fermenabilnosti od strane intestinalne mikrobiote uz selektivnu stimulaciju rasta i/ili aktivnosti intestinalnih bakterija povezanih s pozitivnim učincima na zdravlje i ukupnu dobrobit domaćina (Roberfroid, 2007).

Neki autori uz ove uvjete ističu i nužnost stabilnosti u složenim sustavima hrane, kao i tijekom pripreme iste, s obzirom na rastuću potrebu konzumacije prebiotika (Wang, 2009).

Najveći broj etabliranih prebiotika te prebiotičkih kandidata odnosi se na NDO (Wang, 2009), ali prebiotička svojstva iskazuju i neki polisaharidi, tj. vlakna u širem smislu. Može se zaključiti da se svi prebiotici smatraju prehrambenim vlaknima, međutim, nisu sva prehrambena vlakna prebiotici. Potvrđeni prebiotički NDO uključuju FOS, GOS, LA, SOS, inulin (Tablica 10), dok se kao potencijalni kandidati ističu GeOS, LAS, POS, XOS, rezistentni škrob, levani, šećerni alkoholi (Anadón i sur., 2016).

### 2.5.3.1 Prebiotički učinci ksilooligosaharida i pektinskih oligosaharida

Spoznaje o fermentativnom kapacitetu pojedinih vrsta intestinalne mikrobiote pomažu u razumijevanju mehanizma fermentacije polisaharida i oligosaharida u debelom crijevu te njihovog mogućeg učinka na dinamiku intestinalne populacije (Crittenden i sur., 2002). Najpopularnije bakterijske vrste za evaluaciju prebiotičkih svojstava su laktobacili i bifidobakterije zbog njihove velike probiotičke važnosti (Roberfroid, 2007). Različite bifidobakterije sposobne su koristiti XOS kao izvor ugljika (primjerice, *B. adolescentis*, *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. longum*), a od predloženih *B. adolescentis* najbolje koristi ksilobiozu i ksilotriozu te je najizgledniji kandidat za tzv. bifidus faktor kod odraslih ljudi, s obzirom da je u njihovom probavnom traktu rezidentna (Okazaki i sur., 1991). Prema istraživanju Crittenden i suradnika (2002), mnoge vrste laktobacila i bifidobakterija mogu koristiti XOS kao supstrat te, općenito, bifidobakterije uspješnije koriste XOS nego laktobacili. Ipak, s obzirom da komercijalni pripravci XOS, kao i kompleksni hidrolizati različitih lignoceluloznih sirovina, sadrže relativno visok udjel monosaharida (ksiloze i drugih monosaharida, primjerice glukoze), rast nekih bakterijskih vrsta zapravo se može pripisati korištenju monosaharidnih kontaminanata kao preferabilnih supstrata. U istraživanju Crittenden i suradnika (2002) ovaj efekt primijećen je kod većine istraživanih laktobacila. Korištenje XOS ( $DP \geq 2$ ) primijećeno je samo za *L. brevis*, dok je kod bifidobakterija svojstvo rasta zadržano kod gotovo svih ispitivanih vrsta. Među njima, najbolji rast bio je ostvaren za *B. adolescentis* VTT E-991436, *B. angulatum* ATCC 27535, *B. lactis* Bb-12, *B. lactis* VTT E-97847 i *B. pseudolongum* ATCC 25526. Osim laktobacila i bifidobakterija, porast na XOS kao izvoru ugljika zabilježen je i kod nekih *Bacteroides* vrsta (*B. fragilis* RHI 3001, *B. thetaiotaomicron* RHI 4171), dok za potencijalno patogene vrste, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* i *Escherichia coli*, nije zabilježen rast na XOS (Crittenden i sur., 2002).

Selektivna stimulacija rasta određenih probiotičkih bakterija, uz XOS kao izvor ugljika, uvelike ovisi o mogućnosti potpune razgradnje oligosaharida do odgovarajućih monomera, odnosno ksilanolitičkom sustavu kojeg bakterije posjeduju (Aachary i Prapulla, 2011; Chapla i sur. 2012). Efikasna i potpuna hidroliza XOS zahtijeva primjenu različitih enzima, kao što su  $\beta$ -ksilozidaza,  $\alpha$ -glukuronidaza,  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaza. Prisutnost  $\beta$ -ksilozidaze te arabinozidaze potvrđene su kod nekih bifidobakterija, primjerice, *B. adolescentis*, *B. infantis* i *B. bifidum*, dok u istim bakterijama nije potvrđena  $\alpha$ -glukuronidazna niti acetil-esterazna aktivnost (Zeng i sur., 2007).

Bifidobakterije preferabilno koriste XOS nižeg DP (2-4) (Moura i sur., 2007; Singh i sur., 2015; Ho i sur., 2018) što se može pripisati nedostatku *endo*-ksilanazne aktivnosti bifidobakterija i laktobacila (Moura i sur., 2007). U prilog tome govori i podatak da laktobacili i bifidobakterije, istraživane u radu Crittenden i suradnika (2002), nisu mogle koristiti ksilan (komercijalni polimerni supstrat iz drva breze), a prilikom fermentacije arabinoksilana (komercijalni polimerni supstrat iz pira) s *B. longum* i *B. adolescentis*, primijećeno je da bakterije koriste samo arabinansku frakciju polimernog supstrata. Ipak, u mješovitim kulturama rast bifidobakterija može se primijetiti i na XOS viših DP, što se može objasniti ksilanolitičkim djelovanjem ekstracelularnih enzima drugih bakterijskih vrsta, pr. vrsta *Bacteroides* i *Rosenburia* (Crittenden i sur., 2002; Chassard i sur., 2007; Mäkeläinen i sur., 2010). Naime, neke vrste u zajednici pomažu hidrolizu kompleksnih supstrata do oligomera (nižih DP) koje onda mogu koristiti i drugi dionici mikrobne zajednice. Osim toga, za neke bifidobakterije primijećeno je da rastu na XOS DP  $\geq 2$ , međutim, iste ne rastu jednako na ksilozi. Isto je primijećeno i kod rasta bifidobakterija na drugim vrstama neprobavljivih oligosaharida i može se objasniti postojanjem transportnih mehanizama za niskomolekulske NDO, koji omogućavaju asimilaciju i digestiju istih unutar stanice, što se smatra svojevrsnom evolucijskom prednosti određenih sojeva u uvjetima niske raspoloživosti lako dostupnih supstrata (Crittenden i sur., 2002). Sporiji rast na XOS višeg DP potencijalno može imati povoljne učinke na mikrobiotu u udaljenijim dijelovima debelog crijeva.

Osim stupnja polimerizacije, također i stupanj suspcitucije XOS utječe na mogućnost njihovog korištenja kao supstrata, a sukladno posjedovanju specifičnih enzimskih aktivnosti potrebnih za potpunu hidrolizu XOS, kako je prethodno spomenuto. Primjerice, bifidobakterije brže metaboliziraju linearne XOS te arabinoksilooligosaharide (AXOS) do kratkolančanih masnih kiselina i laktata za razliku od visokoacetiliranih XOS ili XOS supstituiranih 4-*O*-metilglukuronskom kiselinom (Voragen i sur., 2002; Achary i Prapulla, 2011).

Usprkos relativno velikom broju *in vivo* istraživanja, jednoznačno određena količina potrebne dnevne konzumacije XOS za poticanje selektivnog rasta bifidobakterija ni danas ne postoji. Korištene količine u istraživanjima kreću se od 1,2 do 5 g XOS dnevno (Tablica 14), međutim, pozitivni učinci primijećeni su i uz dozu od 0,7 g dnevno (Tomomatsu, 1994). Relativno mala učinkovita doza u odnosu na dobro poznate i prihvaćene prebiotike, fruktooligosaharide (FOS), indicira veliki potencijal XOS kao novih visoko učinkovitih prebiotika (Chung i sur. 2007; Anadón i sur., 2016;). S druge strane, neki autori navode relativno visoke preporučene dnevne doze XOS, 8-12 g (Samanta i sur., 2015).



Tablica 14. Pregled istraživanja prebiotičkih učinka ksilooligosaharida (XOS).

Mikroorganizam	Vrsta istraživanja	XOS	Pozitivni učinci	Referenca
Mikrobiota ljudskog fecesa, <i>B. adolescentis</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. infantis</i> <i>B. longum</i> <i>B. breve</i> <i>Bacteroides</i>	<i>in vivo</i> - analizom fecesa zdravih muških subjekata (50-60 god.) tijekom oralne administracije XOS (5 g dnevno / 3 tjedna). <i>in vitro</i> - sposobnost korištenja XOS kao izvora ugljika.	Iz breze, enzimskom hidrolizom ( <i>Trichoderma</i> ksilanaza) i pročišćavanjem, DP 1-3.	Značajan porast broja bifidobakterija te sniženje fekalnog pH za vrijeme administracije. Sve bifidobakterije uspješno koriste XOS, <i>B. adolescentis</i> najbolje koristi ksilobiozu.	Okazaki i suradnici (1990)
<i>B. pseudolongum</i> NCFB 2244 <i>B. longum</i> NCFB 2259 <i>B. bifidum</i> NCFB 2203 <i>B. bifidum</i> DSM 20082 <i>B. infantis</i> NCFB 2205 <i>B. catenulatum</i> NCFB 2246 <i>B. adolescentis</i> NCFB 2230	<i>in vitro</i>	Komercijalni XOS DP 2-4, čistoća 70 % (Suntory Co, Japan).	Jedino <i>B. pseudolongum</i> pokazao sposobnost značajnijeg rasta na XOS.	Hopkins i suradnici (1998)
<i>B. adolescentis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. acidophilus</i>	<i>in vitro</i>	Iz kukuruznih oklasaka enzimski (ksilanaza iz <i>Aspergillus foetidus</i> MTCC 4898), DP 2-5.	Sposobnost rasta sve 4 bakterije na XOS, sniženje pH medija. Za bifidobakterije bolji rast na XOS nego na glukozi, za laktobacile isto nije opaženo.	Chapla i suradnici (2012)
Mikrobiota ljudskog fecesa	<i>in vivo</i> - analiza fecesa ljudskih subjekata tijekom oralne administracije XOS (1,2 g dnevno / 6 tjedana)	Nije navedeno	Značajan porast bifidobakterija i laktobacila u odnosu na placebo te smanjen rast <i>Clostridium perfringens</i> tijekom administracije XOS	Lin i suradnici (2016)
<i>B. adolescens</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i>	<i>in vitro</i>	Iz kukuruznih oklasaka autohidrolizom, DP 2-6. Komercijalni XOS Xylo-oligo95P (Suntory Co, Japan).	Bolji rast <i>B. adolescens</i> i <i>L. brevis</i> na XOS izvorima. Veća specifična brzina rasta bifidobakterija nego laktobacila na izvorima XOS. Rast <i>B. adolescens</i> i <i>L. brevis</i> bolji na kratkolančanim (DP 2-3) XOS.	Moura i suradnici (2007)

Tablica 14. Pregled istraživanja prebiotičkih učinaka ksilooligosaharida (XOS) - nastavak.

Mikroorganizam	Vrsta istraživanja	XOS	Pozitivni učinci	Referenca
Mikrobiota ljudskog fecesa	<i>in vivo</i> - analiza fecesa ljudskih subjekata (~ 78 god.) tijekom oralne administracije XOS (4 g dnevno / 3 tjedna)	Komercijalni XOS Xylo-oligo95P (Suntory Co, Japan).	Sniženje fekalnog pH i povećanje udjela vlage u fecesu. Povećanje broja bifidobakterija.	Chung i suradnici (2007)
Mikrobiota ljudskog fecesa	<i>in vitro</i>	Iz ostataka nakon berbe ploda palme autohidrolizom, DP 4, 7, 14, 28, 44, 64. Komercijalni XOS prosječnog DP 2, (Shandong Longlive Biotechnology Co. Ltd, Kina).	Značajno povećanje broja bifidobakterija sukladno učinku komercijalnih XOS i FOS. Preferabilno su fermentabilni XOS nižih DP (do 14).	Ho i suradnici (2018)
Mikrobiota ljudskog fecesa	<i>in vivo</i> - analiza fecesa zdravih odraslih ljudskih subjekata tijekom oralne administracije XOS (1,4 g dnevno ili 2,8 g dnevno / 8 tjedna)	Komercijalni XOS (Shandong Longlive Biotechnology Co. Ltd, Kina).	Porast broja bifidobakterija, ali ne i laktobacila.	Finegold i suradnici (2014)
Mikrobiota ljudskog fecesa + <i>B. lactis</i>	u simulatoru ljudskog debelog crijeva Enteromix®	Komercijalni pripravci XOS različitog DP (2 % w/v). XOS DP2 10 (Lenzing AG, Austrija). XOS DP 2-5 (Longlive 95P (Shandong Biotechnology, Kina). XOS DP 2-10 (Lenzing AG, Austrija).	Značajan porast broja bifidobakterija, najviše za XOS DP 2-5, sukladan porastu za FOS (pozitivna kontrola). Značajan porast proizvodnje SCFA (acetat i butirat).	Mäkeläinen i suradnici (2010)

DP (degree of polymerization) - stupanj polimerizacije, FOS - fruktooligosaharidi.

Brojna istraživanja potvrđuju potencijal prebiotičkog učinka XOS (Tablica 14), ali zbog velike brojnosti, raznolikosti i kompleksnosti mikrobiote i okološa debelog crijeva, kao i široke definicije XOS (različiti sastav, strukture, DP), i dalje su potrebne dodatne potvrde kako bi im se osigurao prebiotički status (Roberfroid, 2007). Pritom je potrebno dodatno razviti analitičke metode karakterizacije supstrata i praćenja prebiotičkih markera te pažljivo osmisliti strogo kontrolirana *in vivo* istraživanja.

Komercijalna primjena XOS kao prebiotika zasad je ograničena na japansko tržište, međutim, može se očekivati da će XOS činiti značajniji udjel svjetskog tržišta prebiotika u budućnosti.

Kao i kod ksilooligosaharida, mogućnost korištenja POS za selektivnu stimulaciju rasta pojedinih mikrobnih skupina intestinalne mikrobiote ovisi o enzimskom hidrolitičkom (pektinolitičkom) sustavu bakterija, odnosno posjedovanju specifičnih enzimskih aktivnosti potrebnih za razgradnju POS do monomera. U odnosu na ksilooligosaharide, POS predstavljaju kompleksniji supstrat budući da se mogu sastojati od više različitih vrsta oligosaharida koji nisu karakterizirani samo drugačijim DP, već i znatno drugačijim monomernim sastavom (kiseli i neutralni šećeri) i/ili prisutnošću metilnih skupina. Jednako tako, POS iz homogalakturnana mogu nastati hidrolitičkim ili  $\beta$ -eliminacijskim mehanizmom, odnosno kao zasićeni ili nezasićeni oligogalakturnoni za koje intestinalna mikrobiota može imati značajno različite afinitete. Primjerice, Dongowski i Anger (1996) primijetili su da su nezasićeni OGaU glavni produkti degradacije pektina u gastrointestinalnom traktu miševa te u *in vitro* fermentaciji pektina mikrobiotom ljudskog fecesa. Holck i suradnici (2011b) ovim opažanjem smatraju OGaU intermedijarnim produktom metabolizma pektina kojeg mikrobiota može iskoristiti, međutim, potrebne su dodatne potvrde ovakvih tvrdnji.

Odnos strukture POS i vezanih funkcionalnih učinaka opisali su Onumpai i suradnici (2011) istraživanjem utjecaja nemetiliranih oligogalakturnona (OGaU, DP 1-10) dobivenih hidrolizom poligalakturnonske kiseline, metiliranih OGaU (DP 4-23) dobivenih hidrolizom pektina (DM 34,5 %), arabinoooligosaharida (AOS, DP 1-11) dobivenih hidrolizom arabinana iz repe, galaktooligosaharida (GaOS, DP 1-10) dobivenih hidrolizom galaktana iz pulpe krumpira te oligoramnogalakturnona (ORhaGaU, DP 2-19) dobivenih iz sluzi *Arabidopsis thaliana*, na promjenu sastava fekalne mikrobiote i produkciju organskih kiselina. Istraživanje je pokazalo da kiseli oligosaharidi (OGaU), bilo metilirani ili nemetilirani, kao i njihovi „roditeljski“ pektini, nisu imali nikakav bifidogeni učinak. *Bacteroides* grupa mogla je koristiti ove supstrate, osim nemetiliranih OGaU. S druge strane, AOS, GaOS te izvorni arabinan i galaktan pokazali su značajne bifidogene učinke, posebice niskomolekulske frakcije.

Također, metilirani OGaU pokazali su značajan učinak na porast *Faecalibacterium prausnitzii*, značajnog producenta butirata u debelom crijevu čovjeka. Potvrda relativno niske (ili fermentabilnosti OGaU (ili potpunog izostanka iste) može se naći i u radovima Gullón i suradnika (2011) i Gómez i suradnika (2014). U skladu s time, prebiotički učinak POS može se značajnije pripisati prisustvu neutralnih oligosaharida ili značajnijem utjecaju na druge mikrobne skupine, primjerice laktobacile (Gómez i sur., 2014). Danas se istraživanja prebiotičkih učinaka POS provode uglavnom *in vitro* koristeći fekalnu mikrobiotu (Tablica 15). U definiranim uvjetima prati se ukupni i relativni porast broja određenih mikrobnih vrsta te produkcija kratkolančanih masnih kiselina i promjena pH medija. Hidrolizati POS uvijek su smjese različitih pektinskih oligomera, čiji je profil sukladan izvornom sastavu i strukturi pektinske molekule te načinu njihove proizvodnje. Daljnje frakcioniranje POS često je nepraktično i dugotranjo te se POS najčešće evaluiraju kao cjelovit prebiotički supstrat. U tom smislu može se reći i da su prebiotički učinci specifični s obzirom na izvor POS i način njihove proizvodnje. *In vivo* istraživanja prebiotičkih učinaka POS na ljudima još uvijek nisu provedena u značajnijoj mjeri. Pregledi uglavnom *in vitro* istraživanja prebiotičkih i drugih bioloških učinaka POS mogu se naći u radovima Gullón i suradnika (2013), Babbar i suradnika (2016b) i Gómez i suradnika (2017). Dosadašnja istraživanja (Tablica 15) pokazuju da je značenje POS u prebiotičkom smislu vrlo veliko, posebice ako se uzme u obzir da se kao supstrati za proizvodnju POS mogu koristiti različiti agro-industrijski ostaci. Zbog velike varijabilnosti monomernog sastava i strukture pektinskih molekula, kao i velikog broj enzima uključenih u razgradnju pektina i POS, u kombinaciji s kompleksnošću interakcija intestinalne mikrobiote, potrebna su daljnja istraživanja prebiotičkih učinaka POS s ciljem potvrde i komercijalizacije.

Tablica 15. Pregled istraživanja pozitivnih učinka pektinskih oligosaharida (POS).

Mikroorganizam	Vrsta istraživanja	POS	Pozitivni učinci	Referenca
Mikrobiota ljudskog fecesa;  Pojedinačne vrste bifidobakterija, bakterija mliječne kiseline, klostridija, <i>Bacteriodes</i> , <i>E. coli</i>	<i>in vitro</i> - čiste kulture i mješovita fekalna kultura	POS I - dobiveni hidrolizom komercijalnog HMP iz kore citrusa s <i>endo</i> -PG u membranskom reaktoru. POS II - dobiveni hidrolizom komercijalnog LMP iz komine jabuke s <i>endo</i> -PG u membranskom reaktoru.	Preferabilnost bifidobakterija prema fermentaciji POS II (niskometiliranih oligosaharida) POS I i II pokazuju bolja prebiotička svojstva od izvornih pektina. Neki potencijalno patogeni klostridiji i <i>Bacteriodes</i> nisu mogli rasti na POS.	Olano-Martin i suradnici (2002)
Mikrobiota ljudskog fecesa	<i>in vitro</i>	POS dobiveni autohidrolizom otpadnih kora naranče te naknadnim pročišćavanjem membranskim postupcima.	Sporija asimilacijska kinetika POS što može imati pozitivne učinke na distalni dio debelog crijeva. Najmanja preferencija OGaU. Promjena relativnog udjela pojedinih skupina fekalne mikrobiote na korist laktobacila. Značajna proizvodnja SCFA (acetat > butirat > propionat)	Gómez i suradnici (2014)
Mikrobiota ljudskog fecesa i pojedinačne vrste: <i>B. adolescentis</i> DSM 20083 ili ATCC 15703 <i>B. bifidum</i> DSM 20456 ili ATCC 29521 <i>B. angulatum</i> DSM 20098 ili ATCC 27535 <i>B. pseudolongum</i> DSM 20099 ili ATCC 25526 <i>B. catenulatum</i> DSM 16992 ili ATCC 27539 <i>Bacteriodes vulgatus</i> DSM 1447 ili ATCC 8482	<i>in vitro</i>	POS iz komine jabuke nakon SSF (simultana saharifikacija i fermentacija) postupka primjenom <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 9595 i enzimskim koktelom Cellulclast 1.5L (Novozyme, Španjolska) te $\beta$ -glukozidazom iz <i>A. niger</i> , uz naknadno pročišćavanje ionskom izmjenom.	U fermentacijama pojedinačnih kultura preferabilni OS su bili GOS (gluko), bifidobakterije nisu mogle koristiti OGaU, međutim dobro su rasle na GaOS + XOS i AOS. <i>Bacteriodes vulgatus</i> je mogla koristiti OGaU. Fermentacija inokulumom fecesa pokazala je slične rezultate preferabilnosti supstrata te značajan porast SCFA (najviše acetata) te sniženje pH medija.	Gullón i suradnici (2011)
Mikrobiota ljudskog fecesa	<i>in vitro</i>	Nezasićeni POS iz komercijalnog pektina iz pulpe šećerne repe dobiveni enzimskom hidrolizom.	Smanjenje broja <i>Bacterioides</i> te povećanje broja <i>Firmicutes</i> nakon fermentacija s OGaU DP 4 i DP 5	Holck i suradnici (2011a)

Tablica 15. Pregled istraživanja pozitivnih učinka pektinskih oligosaharida (POS) - nastavak.

Mikroorganizam	Vrsta istraživanja	POS	Pozitivni učinci	Referenca
Mikrobiota ljudskog fecesa	<i>in vitro</i>	POS iz otpadne limunove kore i pulpe šećerne repe proizvedeni različitim postupcima.	POS iz limunove kore stimuliraju rast laktobacila, dok POS iz pulpe šećerne repe imaju izniman bifidogeni učinak. Relativni porast laktobacila i bifidobakterija u odnosu na ukupnu mikrobiotu je vrlo sličan učinku poznatih prebiotika (FOS). Značajnija produkcija SCFA na POS nego na izvornim pektinima.	Gómez i suradnici (2016)
Mikrobiota ljudskog fecesa	<i>in vitro</i>	AOS dobiveni hidrolizom komercijalnog arabinana iz pulpe šećerne repe enzimskim koktelom Viscozyme L (Novozymes, Danska).	Selektivna stimulacija rasta bifidobakterija preferabilno na AOS nižeg DP. Karakterističan profil SCFA za metabolizam arabinoze iznosi acetat:propionat:butirat 60-70 : 30-40 : 10.	Al Tamimi i suradnici (2006)
Mikrobiota ljudskog fecesa	<i>in vitro</i>	AOS dobiveni kao nusproizvod proizvodnje pektina pulpe šećerne repe ekstrakcijom s HNO <sub>3</sub> uz razgradnju celuloze te ultrafiltraciju i dijafiltraciju.	Značajan porast bifidobakterija neovisno o feruloiranosti AOS; preferabilnost prema AOS većeg DP. Laktobacili i <i>Firmicutes</i> nisu pokazali značajan rast u odnosu na inokulum.	Holck i suradnici (2011b)
Mikrobiota ljudskog fecesa	<i>in vitro</i>	POS iz komercijalnog pektina iz jabuke pripremljeni dinamičkom mikrofluidizacijom pod visokim tlakom.	Brža potrošnja te bolji rast bifidobakterija na POS nego na izvornom pektinu. Nema značajnog utjecaja na laktobacile nakon 24 h fermentacije. Smanjenje broja klostridija i <i>Bacteroides</i> nakon 24 h fermentacije POS.	Chen i suradnici (2013)
Različite vrste laktobacila, bifidobakterija, <i>Bacteroides</i> te sojevi <i>Clostridium perfringens</i> (interna kolekcija Institute of Food Research, Norwick, UK)  Mikrobiota ljudskog fecesa	<i>in vitro</i> - čiste kulture i mješovita fekalna kultura	POS dobiven enzimskom hidrolizom kore bergamota komercijalnim enzimskim koktelom Pectinase 26L (Biocatalysts, UK).	Bolji rast bifidobakterija nego drugih vrsta u čistim kulturama. U mješovitoj fekalnoj kulturi značajan rast bifidobakterija, laktobacila te smanjenje broja klostridija. Izračunati prebiotički indeks nakon 10 h i 24 h je bio veći za POS nego za FOS.	Mandalari i suradnici (2007)

ATCC (*engl.* American Type Cell Culture) - američka kolekcija mikroorganizama i kultura stanica; DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) - njemačka kolekcija mikroorganizama i kultura stanica; SCFA (short-chain fatty acids) - kratkolančane masne kiseline; DP (degree of polymerization) - stupanj polimerizacije; OS - oligosaharidi; POS - pektinski oligosaharidi; AOS - arabino oligosaharidi; OGaU - oligogalakturonidi; HMP/LMP (*engl.* high/low metoxyl pectin) - visoko/nisko-metilirani pektin; PG - poligalakturonaza; FOS - fruktooligosaharidi.

#### **2.5.4 Primjena u razvoju funkcionalnih prehrambenih proizvoda**

Povećana svijest potrošača o važnosti prehrane u održavanju i promoviranju zdravlja otvorila je nove mogućnosti u prehrambenoj industriji u smislu istraživanja i razvoja funkcionalne hrane. Ovaj pojam danas obuhvaća različite prehrambene proizvode sa zajedničkom karakteristikom značajnog utjecaja na zdravlje ljudi. U tom smislu, funkcionalna hrana čini zasebnu kategoriju prehrambenih proizvoda koji pripadaju isključivo domeni prehrane te nemaju terapijski učinak, već potencijalno smanjuju rizik od određenih bolesti (Roberfroid, 2002). Jedinstvena i univerzalno prihvaćena definicija funkcionalne hrane ni danas ne postoji te se slikovito može reći da zapravo postoji onoliko definicija koliko i istraživača u ovoj tematici; dok neki autori smatraju da se funkcionalna hrana treba promatrati kao koncept, radije nego kao jasno definirana skupina proizvoda (Roberfroid, 2000b; Bigliardi i Galati, 2013). Mnoge relevantne svjetske organizacije predlažu različite, ali međusobno komplementarne definicije funkcionalne hrane. Među njima, prema zajedničkom dokumentu „Scientific Concepts of Functional Foods in Europe“ nastalom kao rezultat akcije Europske komisije (Concerted Action on Functional Food Science in Europe - FUFOSE) iz 1999. godine, funkcionalna hrana definirana je kao „svaka hrana za koju je u zadovoljavajućoj mjeri dokazan pozitivan utjecaj na jednu ili više ciljanih funkcija u organizmu, koji nadilazi zadovoljavanje potrebe za nutrijentima, u smislu poboljšanja postojećeg zdravlja i opće dobrobiti i/ili smanjenja rizika od nastanka nekih bolesti“. Funkcionalna hrana prema ovoj definiciji mora ostati hrana i mora iskazivati željeni učinak prilikom konzumacije u količini prikladnoj i očekivanoj u uvjetima normalne prehrane te se ne odnosi na proizvode u obliku tableta i kapsula, već uobičajen prehrambeni obrazac (Roberfroid, 2000a; Stein i Rodríguez-Cerezo, 2008). U tom kontekstu, funkcionalnom hranom smatra se konvencionalna hrana koja se konzumira kao dio uobičajene prehrane te sadrži sastojke prirodnog podrijetla (ne sadrži sintetske sastojke), ali moguće u puno većim udjelima nego u prirodnom obliku, ili pak namirnice u koje su dodani funkcionalni sastojci koje ista prirodno ne sadrži, a čime se promovira postojeće zdravlje konzumenta smanjenjem rizika od nastanka nekih bolesti, sukladno znanstveno-odobrenim tvrdnjama (Roberfroid, 2000b). S razvojem istraživanja te jačenjem tržišta i potrebe za reguliranjem pitanja funkcionalne hrane, razvijene su novije definicije. Tako, prema prijedlogu proizašlom s panelne rasprave 17. međunarodnog kongresa Functional Food Center-a „Discovery, Utilization and Control of Bioactive Components and Functional Foods“ (San Diego, CA, SAD), funkcionalna hrana odnosi se na „prirodnu ili prerađenu hranu koja sadrži poznate ili nepoznate biološki aktivne sastojke koji u definiranoj učinkovitoj netoksičnoj

količini pružaju klinički dokazane dokumentirane pozitivne zdravstvene učinke u prevenciji, upravljanju i tretmanu kroničnih bolesti“.

Funkcionalni sastojci u hrani mogu biti makronutrijenti, koji iskazuju specifične fiziološke funkcije, zatim esencijalni mikronutrijenti, ako je njihov unos veći od dnevno preporučenog, ali i neesencijalni sastojci male ili neznatne nutritivne vrijednosti (Martirosyan i Singh, 2015).

Načini postizanja funkcionalnosti hrane su:

- uklanjanje nekog sastojka koji može iskazivati negativne učinke nakon konzumacije (pr. protein-alergen),
- povećanje koncentracije nekog nutritivnog sastojka prirodno prisutnog u hrani kako bi se mogli polučiti željeni pozitivni učinci (pr. obogaćivanje nekim mikronutrijentom kako bi se osigurao unos veći od dnevno preporučenog, a koji smanjuje rizik od određene bolesti) ili povećanje koncentracije nekog nenutritivnog sastojka hrane u svrhu postizanja željenih pozitivnih učinaka,
- dodavanje nekog sastojka koji nije prirodno prisutan u hrani te nije nužno makro- ili mikronutrijent, a za koji postoji dokaz pozitivnih učinaka (pr. nevitaminski antioksidans ili prebiotik),
- zamjena nekog sastojka (najčešće makronutrijenta, pr. masti), čiji unos je obično suvišan te može prouzročiti negativne učinke, sastojkom koji pokazuje pozitivne učinke,
- povećanje biološke raspoloživosti nekog sastojka hrane za koji je poznat pozitivan funkcionalni učinak (Roberfroid, 2000a).

Osim navedenoga, funkcionalna hrana obuhvaća i prirodnu hranu koja izvorno sadrži specifične sastojke u dovoljnoj količini da bi se ostvario pozitivan učinak na zdravlje konzumenta (Roberfroid, 2000b).

Koncept funkcionalne hrane počeo se razvijati u Japanu početkom 1980. godina prošlog stoljeća tijekom brojnih istraživanja fizioloških učinaka hrane kao tercijarnih funkcija iste (osim hranjivosti i zadovoljstva kao primarnih i sekundarnih funkcija hrane) (Ohama i sur., 2006). Izraz funkcionalna hrana postupno je zamijenjen izrazom „hrana za zdravlje“ (*engl.* health foods), a 1991. uspostavljena je regulativa označavanja hrane za specifičnu zdravstvenu namjenu (*engl.* Food for Specific Health Use - FOSHU). Kratica FOSHU i danas je sinonim za funkcionalnu hranu, jedinstvenu japanskom tržištu, međutim, u stvarnosti, tržište funkcionalne hrane FOSHU statusa predstavlja tek 30 % ukupnog tržišta funkcionalnih proizvoda u Japanu s obzirom na stroge uvjete koji se moraju zadovoljiti za odobrenje FOSHU statusa (Ohama i



sur., 2006). 1990.-ih godina u svijetu su se pojavili i drugi nazivi koji opisuju prehrambene proizvode namjenjene promoviranju zdravlja (osim FOSHU), kao što su: nutraceutici, dizajnerska hrana, f(ph)arma-hrana, vita-hrana; kao i nazivi s tradicionalnijim prizvukom: dodaci prehrani i obogaćena hrana, međutim, isti se razlikuju od pojma funkcionalne hrane (Roberfroid, 2000b; Roberfroid, 2002). Danas se funkcionalni proizvodi mogu podijeliti u 5 kategorija:

1. nemodificirani i neprerađeni (prirodni) proizvodi (*engl. whole, natural products*) - najjednostavniji oblik funkcionalne hrane, hrana u svom prirodnom obliku;
2. pojačani proizvodi (*engl. fortified products*) - proizvod u koji je dodan neki funkcionalni sastojak;
3. obogaćeni proizvodi (*engl. enriched products*) - proizvod u koji je dodan sastojak koji se u njemu izvorno ne nalazi;
4. izmijenjeni proizvodi (*engl. altered products*) - proizvod iz kojeg je nepoželjan sastojak uklonjen, smanjen njegov udjel ili zamijenjen drugim sastojkom s pozitivnim djelovanjem;
5. poboljšani proizvodi (*engl. enhanced commodities*) - proizvod u kojem je udjel neke tvari prirodno povećan primjenom posebnih uvjeta uzgoja, genetskom manipulacijom ili drugim postupcima (Kotilainen i sur., 2006; Spence, 2006; Siró i sur., 2008).

U Europskoj uniji još ne postoji formalna legislativa koja bi regulirala pitanje funkcionalne hrane, niti postoji zasebna kategorija funkcionalne hrane, kao specifična nadopuna postojećim osnovnim kategorijama: konvencionalnoj hrani, modificiranoj hrani, hrani za posebne prehrambene namjene ili medicinskoj hrani (Martirosyan i Singh, 2015). Ipak, svojevrsnu regulativu predstavljaju Uredbe na razini Europske komisije te usklađeni Zakoni i Pravilnici pojedinih država članica o navođenju prehrambenih i zdravstvenih tvrdnji, njihovom označavanju te informiranju potrošača. U Republici Hrvatskoj postoji pozitivan trend percepcije funkcionalne hrane; tako je u petogodišnjem razdoblju (2008.-2013.) povećan postotak ispitanika (punoljetni ispitanici do 25 god.) koji su upoznati s pojmom funkcionalne hrane (s 38,3 na 50,9 %), a također je zabilježen porast percepcije funkcionalne hrane kao hrane koja pomaže u održavanju zdravlja (s 35,7 na 55,6 %), kao i redovita kupovina iste (s približno 25 % na približno 45 %) (Gajdoš Kljusurić i Čačić, 2014). U Republici Hrvatskoj, funkcionalna hrana ili funkcionalni sastojci podliježu postojećim propisanim kategorijama hrane: konvencionalnoj hrani, prehrambenim aditivima, dodacima prehrani, medicinskoj hrani i hrani za posebne prehrambene namjene te su regulirani sljedećim Zakonima i Pravilnicima: Zakonom o hrani (NN 81/13), Zakonom o prehrambenim aditivima, aromama i prehrambenim enzimima

(NN 39/13a), Zakonom o hrani za posebne prehrabne potrebe (NN 39/13b), Pravilnikom o dodacima prehrani (NN 126/13), Pravilnikom o hrani za posebne medicinske potrebe (NN 100/08), Pravilnikom o hrani bez glutena (NN 83/10) i Pravilnikom o hrani namijenjenoj smanjenju tjelesne mase (NN 89/08).

Globalno tržište funkcionalne hrane u stalnom je porastu (primjerice, u razdoblju 2009. - 2013. godine zabilježen je rast od 26,7 %) s prosječnim godišnjim rastom od 8,5 % te predviđenom vrijednosti od 305,4 milijarde USD do 2020. godine (Bogue i sur., 2017). Osnovne pokretače rasta ovog tržišta predstavljaju: snažan interes potrošača za prevencijom određenih zdravstvenih problema, rastući troškovi zdravstva, produljeno očekivano trajanje života te težnja populacije srednje i starije životne dobi za boljom kvalitetom života u starosti. Prema podacima Datamonitora iznesenima u radu Bogue i suradnika (2017), većina europskih potrošača vjeruje u pozitivne učinke pravilne prehrane. Razvijeni funkcionalni proizvodi uglavnom pripadaju kategorijama mliječnih, konditorskih i pekarskih proizvoda te proizvoda namijenjenih prehrani djece, kao i bezalkoholnim napicima (Bigliardi i Galati, 2013), dok se u budućnosti predviđa najveći rast funkcionalnim napicima i funkcionalnim mliječnim proizvodima (Bogue i sur., 2017). Komercijalni interes za funkcionalnom hranom ima podlogu u znanstvenim istraživanjima. Uvidom u citiranost objavljenih radova o funkcionalnoj hrani i nutraceuticima, najviše rangirani radovi, među 100, odnose se na istraživanja prebiotika, probiotika, antioksidansa i polifenolnih spojeva (Yeung i sur., 2018), indicirajući visoku usmjerenost istraživača upravo na navedene funkcionalne sastojke.

Budući da su prirodni sastojci hrane ili se dobivaju iz prirodnih izvora te iskazuju prebiotičke učinke, mnogi NDO mogu se smatrati funkcionalnim ili potencijalno funkcionalnim sastojcima. Tržište prebiotika u stalnom je porastu; prema Global Industry Analysts-u procjenjuje se da je u 2018. godini njegova globalna vrijednost iznosila 4,8 milijardi USD, pri čemu se najveći dio odnosio na FOS i GOS, dok se potencijal primjene novih prebiotika tek treba ostvariti na svjetskom tržištu. Širenje europskog dijela tržišta uglavnom je orijentirano na nove mogućnosti prehrabne primjene prebiotika, kao što su mesni proizvodi ili snack proizvodi (Babbar i sur., 2016b). Potreba za ovakvom vrstom funkcionalnih prehrabnih proizvoda proizlazi iz općenite potrebe za većom konzumacijom prehrabnih vlakana, kojih su NDO dio (prema EU regulativi 1169/2011 (EU Science Hub, 2018) vlakna obuhvaćaju ugljikohidratne polimere DP  $\geq 3$ ). Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA), Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) i Organizacija za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO) preporučuju dnevni unos vlakana od najmanje 25-30 g za odrasle osobe, dok u većini europske populacije stvarni dnevni unos je puno manji (EU Science Hub, 2018). Prebiotička funkcionalna hrana predstavlja dobar

način povećanja unosa vlakana uz ostvarenje brojnih drugih pozitivnih učinaka na zdravlje te senzorskih svojstava prehrambenog proizvoda. Kao novi prebiotički kandidati koji se mogu proizvesti iz sekundarnih biljnih sirovina, ksilooligosaharidi i pektinski oligosaharidi predstavljaju posebno važne ekonomične potencijalno funkcionalne sastojke u budućim istraživanjima i primjeni.

Za primjenu u formulacijama funkcionalnih proizvoda, prebiotici osim stabilnosti u fiziološkom smislu, moraju iskazivati i stabilnost u tehnološkim uvjetima pripreme prehrambenih proizvoda te kompatibilnost s drugim sastojcima hrane. Također, uz izražena funkcionalna svojstva, primjena NDO u različitim funkcionalnim proizvodima osigurava i postizanje tehnološke i senzorske kvalitete, primjerice željene viskoznosti, smanjene slatkoće i/ili poželjne teksture (Wang, 2009). Ksilooligosaharidi, primjerice, imaju umjerenu slatkoću (oko 30 % slatkoće saharoze) te se mogu koristiti kao niskokalorična i nekariogena punila. Također pokazuju vrlo dobru stabilnost u relativno širokom pH području (pH 2,5-8,0) te pri visokim temperaturama (do 100 °C). Navedena svojstva osiguravaju in određene prednosti u procesnim uvjetima u odnosu na konvencionalno korištene prebiotike kao što su FOS i inulin (Vázquez i sur., 2000; Courtin i sur., 2009).

Neke od kategorija prehrambenih proizvoda u kojima se NDO mogu koristiti kao funkcionalni sastojci su: jogurti i deserti, napitci, pekarski proizvodi, juhe, umaci i namazi, dječja hrana, različiti konditorski proizvodi (Wang, 2009). Dobra topljivost u vodi ksilooligosaharida i pektinskih oligosaharida omogućuje njihovu primjenu u različitim funkcionalnim napicima kao jednim od najpopularnijih oblika funkcionalnih proizvoda. XOS kao funkcionalni prebiotički dodaci komercijalno su dostupni najviše u Aziji (Japan, Kina, Južna Korea, Vijetnam, Tajvan). Literaturni podaci navode da je prije 20-ak godina na tržištu bilo dostupno oko 100 proizvoda koji sadrže XOS, a među kojima odobreni FOSHU status su imali proizvodi YOGHURINA (Suntory Ltd., Japan), MARUSHIGE GENKISU (Marushige Ueda Co., Japan), L-ONE (Enzamin Laboratory Inc., Japan) i SUKKIRI KAICHO (Lotte Co., Japan) (Crittenden, i Playne, 1996). Noviji podaci (Mintel, Global new products database za desetogodišnje razdoblje do 2008.) pokazuju širenje tržišta novim proizvodima koji sadrže XOS, među kojima najviše u obliku dodataka prehrani (38 %), mliječnih proizvoda (25 %), konditorskih proizvoda (16 %), bezalkoholnih pića (13 %) te u dječje hrane i gotovih juha (8 %), od kojih se polovica odnosila na japansko tržište (Mäkeläinen i sur., 2009). Novija istraživanja mogućnosti primjene uglavnom su usmjerena na fermentirane mliječne napitke (Mumtaz i sur., 2008; Penksza i sur., 2018) te brašeno-konditorske proizvode kao što su keksi (Ayyappan i sur., 2016). Primjena XOS ima najveću perspektivu u razvoju funkcionalnih napitaka (na bazi soje, čaja, kaka,

bezalkoholnih pića), mliječnih proizvoda (mlijeko, jogurti, mliječni deserti, proizvodi u prahu), konditorskih i brašeno-konditorskih proizvoda (biskviti, keksi, slatka tijesta, pudinzi, slatkiši), proizvoda od voća (voćni žele, namazi) ili meda (Aachary i Prapulla, 2011). XOS se smatraju sigurnima za primjenu u prehrani ljudi; u Japanu imaju FOSHU status uz predložen dnevni unos 1-3 g (Mäkeläinen i sur., 2009). Sigurnost je potvrdila i EFSA (EFSA, 2018) za komercijalni XOS iz kukuruznih oklasaka te primjenu u jogurtu, voćnom namazu, napitku od soje i keksima. Ipak, ovakva odobrenja često imaju ograničenje za određeno tržište, tip proizvoda, udjel XOS i vezane zdravstvene tvrdnje.

Pektinski oligosaharidi još nisu komercijalizirani te u dostupnoj literaturi još uvijek se ne mogu naći praktične primjene u kontekstu razvoja funkcionalne hrane, što implicira veliko značenje i potrebu za budućim istraživanjima (Babbar i sur., 2016b).

Konditorski proizvodi posebno su zanimljiva skupina prehrambenih proizvoda koji se mogu koristiti kao potencijalno funkcionalni proizvodi, a najviše zbog svoje raširenosti, ugodnog okusa i ugođe koju izazivaju prilikom konzumacije, relativno učestale konzumacije, popularnosti u svim dobnim skupinama i cjenovne pristupačnosti. Također, primjena ovih proizvoda kao pogodnih dozirnih oblika funkcionalnih sastojaka naročito se ističe ako isti imaju nepoželjan okus. S druge strane, konditorski proizvodi su kalorične i nutrijentima relativno siromašne namirnice te se njihova konzumacija povezuje s povećanim unosom šećera (i masti za neke vrste proizvoda), a također nisu preporučljivi (neki ili svi proizvodi) za konzumaciju određenim skupinama potrošača (pr. dijabetički bolesnici, osobe s izraženom alergijom na gluten) (Godshall, 2016). Dodavanje funkcionalne komponente konditorskim proizvodima je dvojakog značaja: kao jedan od načina poboljšavanja sastava i uloge konditorskih proizvoda u prehrani, a istovremeno i kao način popularizacije određenih funkcionalnih sastojaka. Pri formuliranju konačnog proizvoda treba voditi računa o odabiru pogodne vrste konditorskog proizvoda, trenutku dodavanja funkcionalnog sastojka (kako bi isti zadržao svoja svojstva tijekom tehnološkog postupka, ali i kako ne bi izmijenio postojeće tehnološke postavke procesa), zatim očuvanju kvalitete proizvoda izmijenjenog sastava tijekom proizvodnje i skladištenja (Pickford i Jardine, 2000).

Funkcionalni konditorski proizvodi mogu se definirati kao konditorski proizvodi u kojima je dodan, uklonjen ili zamijenjen konvencionalni sastojak drugim sastojkom koji ispunjava specifičnu fiziološku funkciju i/ili nudi potencijalnu zdravstvenu korist (Pickford i Jardine, 2000). Najraniji oblici funkcionalnih konditorskih proizvoda bili su proizvodi za ublažavanje bolova u grlu te osvježivači daha, a u novije vrijeme prednjače proizvodi bez šećera (Pickford i Jardine, 2000). Prebiotici u konditorskoj industriji mogu se koristiti kao punila u proizvodima

smanjenog udjela šećera i/ili kalorijske vrijednosti te kao djelomična zamjena za mast i brašno (Żyzelewicz i sur., 2011), a to se posebno odnosi na kakaove proizvode kao što je čokolada (osim zamjene za masti) (Konar i sur., 2016) i brašneno-konditorske proizvode kao što su keksi (Ayyappan i sur., 2016). Primjena prebiotika u ovim proizvodima ograničena je zakonskim okvirima, tehnološkim karakteristikama proizvodnje te željenom kvalitetom konačnog proizvoda. Tako, dodatak prebiotika može utjecati na viskoznost, topljivost, intenzitet slatkoće, emulgirajuća svojstva i sl., a dodana količina mora biti adekvatna s obzirom na željene pozitivne učinke i tvrdnje (pr. izvor vlakana, smanjen udjel šećera ili masi, smanjena energijska vrijednost, prema važećem Zakonu (NN 39/13)) (Konar i sur., 2016). Prebiotici koji se najčešće koriste u konditorskoj industriji su polisaharidi: inulin i polidekstroza; oligosaharidi: FOS i GOS; zatim monosaharidi, kao što je tagatoza, te polioli (pr. laktitol i izomalt) (Żyzelewicz i sur., 2011; Konar i sur., 2016). Uloga prebiotika u konditorskim proizvodima može biti dvojaka, odnosno, dodavanjem istih može se postići smanjenje udjela nekog konvencionalnog sastojka (šećera ili masti) uz istovremeno osiguravanje bifidogenog učinka. Ova mogućnost potencijalno nudi prednost primjene prebiotika pred drugim funkcionalnim sastojcima. Pregled brojnih istraživanja utjecaja dodatka različitih prebiotika (najviše inulina, FOS i GOS) na reološka, nutritivna, senzorska i teksturalna svojstva čokolade prikazan je u radu Konar i suradnika (2016).

S obzirom na dostupnu literaturu, praktična primjena ksilooligosaharida i pektinskih oligosaharida u razvoju funkcionalnih konditorskih proizvoda vrlo je rijetka, a razlog tome može biti što ovi NDO još uvijek nemaju potvrđen prebiotički status na globalnom tržištu te su potrebna dodatna istraživanja u tom smjeru prije istraživanja primjene u formulacijama funkcionalnih proizvoda. Na tragu potencijala primjene ksilooligosaharida je istraživanje Ayyappan i suradnika (2016) u kojem su XOS korišteni u proizvodnji funkcionalnih keksa. Pritom, zamjena saharoze sa XOS, u udjelu 5 %, nije utjecala na fizikalno-kemijska svojstva konačnog proizvoda, a tijekom pripreme zadržana je potencijalna funkcionalnost XOS (74 % izvorno dodanih XOS je zadržano). Autori također navode kako je potencijalnu funkcionalnost ovakvog proizvoda potrebno istražiti u budućnosti, prvenstveno *in vivo* istraživanjima.

S obzirom na navedeno, ksilooligosaharidi i pektinski oligosaharidi kao novi prebiotički kandidati nude velike mogućnosti u daljnim istraživanjima, od pronalaska novih i ekonomičnih izvora, prvenstveno sekundarnih biljnih sirovina, optimizacije proizvodnje i karakterizacije, do uklapanja u nove funkcionalne prehrambene proizvode te konačne potvrde prebiotičkih svojstava. Nastavak istraživanja na XOS i POS svakako je sukladan globalnim trendovima u prehrambenoj industriji, razvijanima kao posljedica svjesnosti o ekološkoj odgovornosti, ali i

ulozi prehrane u prevenciji oboljenja, a to su valorizacija agro-industrijskih ostataka u proizvode visoke dodane vrijednosti te kreiranje inovativnih prehrambenih proizvoda namijenjenih očuvanju zdravlja ljudi.

***Eksperimentalni dio***

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1 Materijal

##### 3.1.1 Priprema sekundarnih biljnih sirovina

U ovome istraživanju korišteno je 5 sekundarnih biljnih sirovina (Tablica 16).

Tablica 16. Pregled sekundarnih biljnih sirovina korištenih u radu.

Uzorak	Oznaka uzoka	Podrijetlo	Način dobivanja/oblik
Pulpa šećerne repe	<b>SBP</b> (engl. sugar beet pulp)	Nusproizvod tehnološkog postupka (Viro tvornica šećera d.d., Hrvatska)	Nakon ekstrakcije saharoze; briketirani suhi repin rezanac
Ljuska oraha	<b>WS</b> (engl. walnut shell)	Otpad iz domaćinstva	Izdvajanjem jezgri oraha
Ljuska kakaovog zrna	<b>CBH</b> (engl. cocoa bean husk)	Nusproizvod tehnološkog postupka (Zvečevo, Hrvatska)	Prženjem kakaovog zrna
Ljuska crvenog luka	<b>OP</b> (engl. onion peel)	Otpad iz domaćinstva	Čišćenjem glavice luka
Mahuna graška	<b>PP</b> (engl. pea pod)	Otpad iz domaćinstva	Izdvajanjem zrna graška

Mahuna graška i ljuska crvenog luka dodatno su sušene u laboratorijskom sušioniku (ST-06, Instrumentaria; Hrvatska) pri 50 °C do udjela vode od približno 10 %. Ostale sirovine nisu sušene s obzirom da su bile dopremljene u suhom obliku ili su bile prirodno suhe.

Suhe sirovine, osim ljuske oraha, usitnjene su korištenjem mlinca za kavu za domaćinstvo. Ljusku oraha je, zbog tvrdoće, usitnjena u laboratorijskom vibracijskom mlinu s kuglicama (Mixer Mill MM 400, Retsch; Njemačka). Naknadnim prosijavanjem usitnjenih sirovina kroz sito veličine pora 400 µm dobivena je frakcija finih čestica koja je korištena u daljnjim eksperimentima. Suhi usitnjeni uzorci čuvani su u papirnatim vrećama na hladnom i suhom mjestu, uz dodatak male količine silika gela kako bi se spriječilo nakupljanje vlage.

U svrhu detaljne karakterizacije sakupljenih prosijanih frakcija, provedena je analiza veličine čestica metodom difrakcije laserskih zraka. U tu svrhu korišten je analizator Mastersizer 2000 (Malvern Panalytical; Ujedinjeno Kraljevstvo). Uređaj mjeri kut i intenzitet raspršenja laserskih zraka prilikom njihovog prolaska kroz rastresit uzorak, a pritom što su čestice manje, kut raspršenja je veći. Rezultati su dobiveni obradom podataka specijaliziranim programom



(Mastersizer 2000 software v. 5.60) te su prikazane veličine  $d(0,1)$ ,  $d(0,5)$  i  $d(0,9)$ . Mjerenje za svaki uzorak provedeno je 2 puta.

## 3.2 Metode

Slika 23 sažeto prikazuje preparativne i analitičke metode korištene u radu, a opisni postupak rada te korištena oprema, uređaji i kemikalije navedeni su u sljedećim podpoglavljima.

### 3.2.1 Karakterizacija osnovnog makrokomponentnog sastava

#### 3.2.1.1 Određivanje udjela suhe tvari

Udjel suhe tvari određen je prema modificiranoj AOAC 930.15 metodi (Padmore, 1990a). Ovim postupkom prati se promjena mase uzorka tijekom sušenja pri 105 °C do uspostave konstantne vrijednosti. Sušenjem pri navedenoj temperaturi dolazi do izdvajanja slobodne vode iz uzorka te se masa vlažnog uzorka kontinuirano smanjuje dok se ne izdvoji sva slobodna voda. Određivanje udjela suhe tvari provedeno je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao maseni udjel u sekundarnoj biljnoj sirovini (%) i prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

#### 3.2.1.2 Određivanje udjela masti

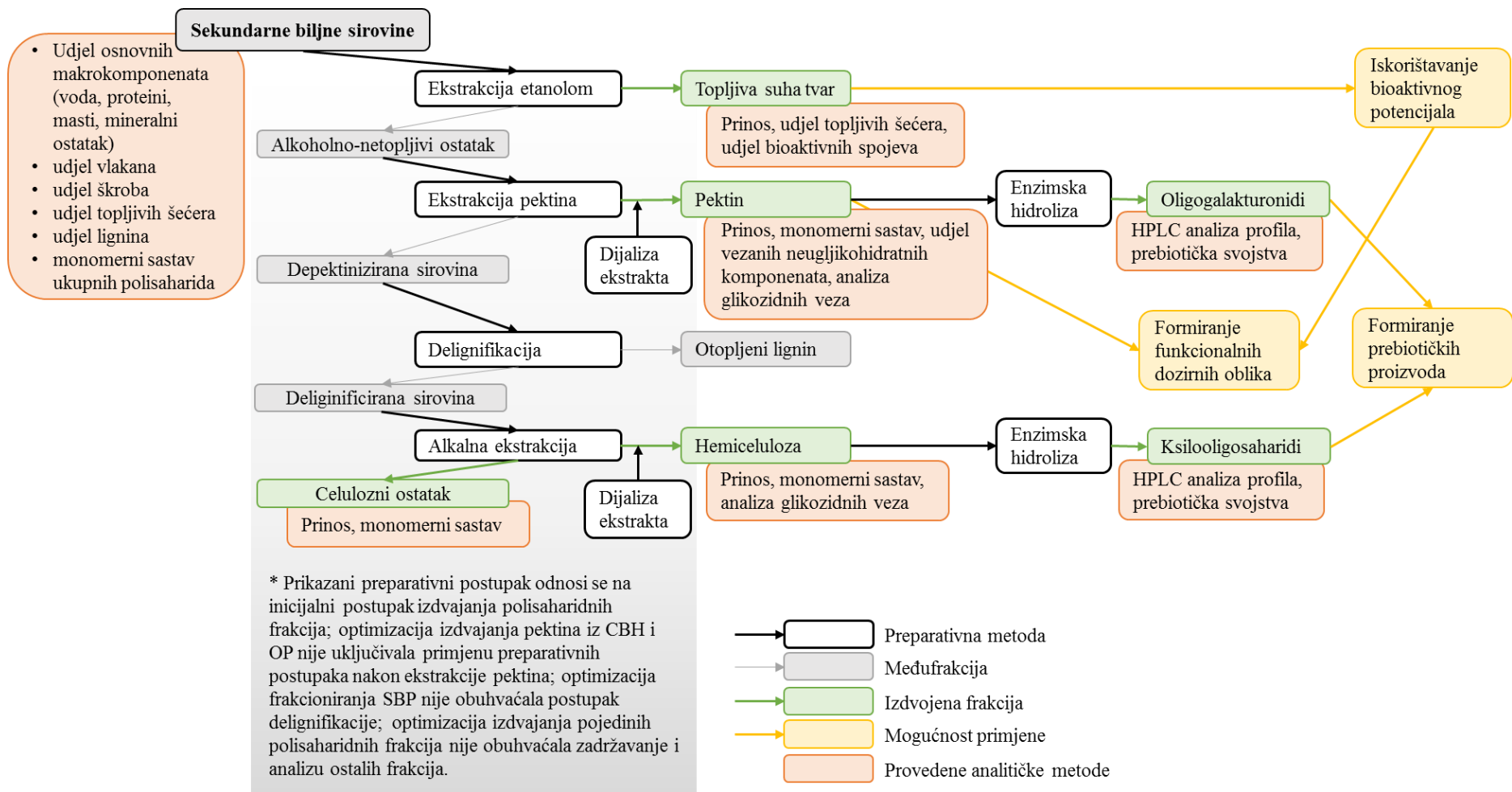
Udjel masti određen je prema modificiranoj AOAC 920.39 metodi (Padmore, 1990b) kod koje se selektivna ekstrakcija lipidnih komponenata iz biljnih supstrata provodi primjenom pogodnog otapala (nepolarno organsko otapalo) koje cirkulira principom isparavanja i kondenzacije u zatvorenoj aparaturi po Soxhlet-u. Prilikom ekstrakcije, lipidna frakcija zasebno se izdvaja u tikvici.

Određivanje udjela masti provedeno je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao maseni udjel u suhoj tvari sekundarne biljne sirovine (% s.tv.) i prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

#### 3.2.1.3 Određivanje udjela proteina

Udjel proteina određen je prema modificiranoj AOAC 976.05 metodi (metoda po Kjeldahl-u (poluautomatski)) (Padmore, 1990c). Postupak se sastoji od nekoliko koraka:

- mineralizacija - primjenom koncentrirane sumporne kiseline i katalizatora pri visokoj temperaturi se organski dušik (podrijetlom iz proteina) prevede u amonijevu sol,



Slika 23. Shematski prikaz preparativnih i analitičkih metoda korištenih u radu.

- alkalizacija i destilacija (automatski u destilacijskoj jedinici (KT 200 Kjeltex™, FOSS, Danska) - alkalizacijom (40 % NaOH w/v) se amonijeva sol nastala tijekom mineralizacije prevede u amonijak koji se zatim predestilira u otopinu borne kiseline (4 % w/v) s dodatkom indikatora bromkrezol-zeleno i metil-crveno (0,1 % v/v, svaki)
- titracija klorovodičnom kiselinom - odredi se utrošak HCl (0,1 M, volumetrijski standard) potreban za neutralizaciju amonijevih iona (neutralizacija se provodi do promjene boje indikatora).

Utrošak kiseline (HCl) za titraciju uzorka i slijepa probe preračunava se na udjel oslobođenog dušika u uzorku, a potom se udjel dušika u uzorku putem prikladnih konverzijskih faktora preračunava na udjel proteina u uzorku. Konverzijski faktori mogu se razlikovati ovisno o uzorcima i prisutnosti neproteinskog dušika u istima. U ovome radu korišten je standardni konverzijski faktor 6,25.

Određivanje udjela proteina provedeno je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao maseni udjel u suhoj tvari sekundarne biljne sirovine (% s.tv.) i prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

#### 3.2.1.4 Određivanje udjela mineralnog ostatka

Udjel mineralnog ostatka određen je prema modificiranoj AOAC 942.05 metodi (Padmore, 1990d). Pirolizom uzorka pri visokoj temperaturi (550 °C) potpuno izgaraju organske komponente dok se anorganske izdvajaju u obliku ostatka čiji udjel se određuje gravimetrijski. Određivanje udjela mineralnog ostatka provedeno je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao maseni udjel u suhoj tvari sekundarne biljne sirovine (% s.tv.) i prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

### 3.2.2 *Karakterizacija ekstraktibilne suhe tvari*

Ekstraktibilnom suhom tvari u ovome radu podrazumijevaju se nestrukturane komponente biljnoga matriksa, čije je uklanjanje potrebno kako bi se materijal adekvatno pripremio za daljnje analize, odnosno kako bi se spriječile moguće interferencije ekstraktibilnih spojeva prilikom analize strukturnih komponenti matriksa, konkretno, strukturnih ugljikohidrata.

U tu svrhu, ekstrakcija topljive suhe tvari obično se provodi hidroalkoholnom otopinom ili zasebno vodom i alkoholom, a pritom se izdvajaju anorganske komponente, nestrukturani ugljikohidrati (jednostavni šećeri i prirodno prisutni oligosaharidi), dušikovi spojevi, voskovi, pigmenti i drugi biljni sekundarni metaboliti (polifenolni spjevi) i sl. Za daljnju analizu ugljikohidrata najvažnije je u ekstrakcijskom koraku ukloniti sve nestrukturane šećere budući da

isti mogu lažno pozitivno utjecati na kvantifikaciju pojedinih šećera u sastavu strukturnih ugljikohidrata.

### 3.2.2.1 Priprema ekstrakata

#### 3.2.2.1.1 Vodena i etanolna ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu

Uzastopne ekstrakcije vodom i etanolom u aparaturi po Soxhletu provedene su prema protokolu National Renewable Energy Laboratory-ja (NREL/TP-510-42619) (Sluiter i sur., 2008b), uz manje izmjene.

#### Postupak rada:

U celuloznu čahuru za ekstrakciju odvaži se  $2,5 \pm 0,1$  g uzorka, začepi komadićem vate, te se čahura uspravno postavi u ekstraktor. Otapalo (190 mL demineralizirane vode) se ulije u prihvatnu tikvicu koja se zatim zajedno s ekstraktorom (u koji je umetnuta čahura s uzorkom) pričvrsti na vodeno hladilo i zatim se uključi grijač (pješčana kupelj). Ekstrakcija se provodi tijekom 6 h, brzinom 1-1,5 sifona po satu (jedan sifon predstavlja jednu izmjenu otapala iz ekstraktora u tikvicu putem prelivne cijevi), a vrijeme se mjeri od trenutka kada se počnu nakupljati prve kapi otapala na dnu ekstraktora. Po završetku ekstrakcije i hlađenja aparature, tikvice s ekstraktom odvajaju se od ostatka aparature, a maksimalno ocijeđene čahure stavljaju se sušiti u laboratorijski sušionik (ST-06, Instrumentaria; Hrvatska) pri najviše 60 °C. Ohlađeni vodeni ekstrakt (na sobnu temperaturu) kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 200 mL i nadopuni do oznake demineraliziranom vodom.

Osušene čahure s ekstrahiranim uzorkom postavljaju se za drugu ekstrakciju s etanolom (96 % EtOH) prema gore opisanom postupku. Ekstrakcija etanolom također se provodi tijekom 6 h, brzinom 4-6 sifona po satu, a dobiveni etanolni ekstrakt se po završetku ekstrakcije kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu primjerenog volumena i nadopunjuje do oznake.

#### 3.2.2.1.2 Konvencionalna ekstrakcija 70 %-tnim etanolom

#### Postupak rada:

U laboratorijske čaše od 100 mL pomiješa se suhi uzorak s otapalom (70 %-tni EtOH (v/v)), koji se pripremi iz 96 %-tnog etanola), u omjeru 1:10 (w/v). Smjesa se miješa pomoću magnetske mješalice (RT 5, IKA; Njemačka) tijekom 30 min i pri sobnoj temperaturi u poklopljenim čašama, nakon čega se filtrira preko Büchnerovog lijevka s Whatman No. 4 filter papirom, pomoću vakuuma. Talog na filteru kvantitativno se prenese ponovno u čašu, doda se jednak volumen svježeg otapala te se ekstrakcija ponovi pri istim uvjetima. Ekstrakcija na

opisan način provodi se ukupno 3 puta. Filtrati (ekstrakti) nakon svake ekstrakcije kvantitativno se združe, a menzutom se izmjeri ukupni volumen etanolnog ekstrakta.

### 3.2.2.2 Određivanje suhe tvari ekstrakta

Ukupna ekstraktibilna suha tvar određena je kao suha tvar pojedinog ekstrakta sukladno AOAC metodi opisanoj u poglavlju 3.2.1.1.

Ekstrakcija svakom od opisanih metoda provedena je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao maseni udjel u suhoj tvari sekundarne biljne sirovine (% s.tv.) te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

### 3.2.2.3 Određivanje bioaktivnog sastava i antioksidacijskog kapaciteta

#### 3.2.2.3.1 *Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva*

Određivanje ukupnih polifenola provedeno je spektrofotometrijski prema prilagođenoj metodi Lachman i suradnika (1998).

#### Princip metode:

Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s nekim reducirajućim agensom (polifenolni spojevi). Folin-Ciocalteu reagens (smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline) reagira s fenoksid-ionom iz uzorka prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenih volframova i molibdenova oksida. Intenzitet obojenja, izravno proporcionalan udjelu polifenola u uzorku, odredi se spektrofotometrijski pri 765 nm (Singleton i Rossi, 1965).

#### Priprema uzoraka:

Ukupni polifenoli određeni su u vodenim i etanolnim ekstraktima sekundarnih sirovina pripremljenima kako je opisano u poglavlju 3.2.2.1.1. Prema potrebi, ekstrakti (vodeni i etanolni) se razrijeđuju prije postavljanja reakcije.

#### Postupak rada:

U laboratorijsku epruvetu (15 mL) otpipetira se 0,1 mL uzorka, 6 mL demineralizirane vode te 0,5 mL razrijeđenog (s vodom, 1:2 v/v) Folin-Ciocalteu reagensa (Kemika; Hrvatska) i promiješa na vorteksu. Zatim se doda 1,5 mL 20 %-tne (w/v) otopine natrijeva karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) te opet dobro promiješa na vorteksu. Tako pripremljena reakcijska smjesa ostavi se 2 h pri sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja pri 765 nm (spektrofotometar Genesys™ 10S UV-VIS, Thermo Fisher Scientific, SAD) u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba priprema se na isti način kao i ispitivani uzorci, s razlikom da se umjesto uzorka u reakcijsku smjesu dodaje jednaki volumen demineralizirane vode.

### Izračun rezultata:

Iz osnovne otopine standarda galne kiseline (98 %, Acros Organics™, Fisher Scientific; SAD) koncentracije 1000 mg/L, pripreme se razrjeđenja 50, 100, 200, 300, 400, 600 i 800 mg/L te se ponovi prethodno opisani postupak reakcije s Folin-Ciocalteu reagensom za svako razrjeđenje. Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija galne kiseline, konstruira se pravac ovisnosti apsorbancije (Y-os ( $\Delta A$ )) o koncentraciji (X-os (mg/L)), odnosno baždarni pravac, prema čijoj jednadžbi se izračunava koncentracija ukupnih polifenola za izmjerene vrijednosti apsorbancije u uzorcima, a rezultati se izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline (*engl.* gallic acid equivalents - GAE).

Jednadžba baždarnog pravca za ukupne polifenole glasi:

$$y = 0,0011x + 0,0079; R^2 = 0,9988$$

gdje su:

y - razlika izmjerenih vrijednosti apsorbancije uzorka i slijepe probe,

x - tražena koncentracija analita u uzorku.

Mjerenja ukupnih polifenolnih spojeva provedena su u duplikatu, a udjeli su izračunati s obzirom na ukupni volumen pojedinog ekstrakta te početnu masu uzorka korištenog za ekstrakcije. Rezultati su izraženi kao maseni udjel (mg GAE/g s. tv.) u suhoj tvari početnog uzorka te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

#### *3.2.2.3.2 Određivanje ukupnih neflavonoida i flavonoida*

### Princip metode:

Flavonoidi se iz uzorka talože pomoću formaldehida koji reagira na pozicijama C-6 ili C-8 na 5,7-dihidroksi flavonoidu stvarajući metiol-derivate koji dalje reagiraju s drugim flavonoidima također na C-6 ili C-8 položaju, itd. (Kramling i Singleton, 1969; Ough i Amerine, 1988). Kondenzirane molekule nastale ovom reakcijom uklone se mikrofiltracijom, a ostatak neflavonoidnih polifenola određuje se prema opisanoj metodi za ukupne polifenole (v. prethodno poglavlje, 3.2.2.3.1).

### Postupak rada:

U Eppendorf epruvete od 2 mL pipetira se 1 mL uzorka (vodeni ili etanolni ekstrakt sekundarnih biljnih sirovina), 0,5 ml otopine klorovodične kiseline (HCl, razrijeđenje s vodom 1:4 v/v) i 0,5 mL formaldehida te se otopina ostavi 24 h na mračnom i hladnom mjestu, nakon čega se filtrira kroz mikrofiltere (Chromafil CA-25/45, Macherey-Nagel, Njemačka). Tako pripremljen novi uzorak analizira se prema opisanom postupku za određivanje ukupnih polifenola Folin-

Cioalceu-ovim reagensim (3.2.2.3.1), pri čemu u reakciji sudjeluju neflavonoidni polifenolni spojevi.

#### Izračun rezultata:

Koncentracija ukupnih neflavonoida izračunava se prema istom baždarnom pravcu kao i za ukupne polifenole, dok se koncentracija ukupnih flavonoida izračunava iz razlike koncentracije ukupnih polifenola i ukupnih neflavonoida, a rezultat se izražava, kao i kod polifenola, na ekvivalente galne kiseline (GAE).

$$\text{ukupni flavonoidi} = \text{ukupni fenoli} - \text{ukupni neflavonoidi}$$

Određivanje ukupnih neflavonoida provedeno je u duplikatu, a udjeli su izračunati s obzirom na ukupni volumen pojedinog ekstrakata te početnu masu uzorka korištenog za ekstrakcije. Rezultati udjela ukupnih neflavonoida i flavonoida izraženi su kao maseni udjel (mg GAE/g s.tv.) u suhoj tvari sekundarne biljne sirovine te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

#### *3.2.2.3.3 Određivanje pojedinačnih polifenola i metilksantina tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC-PDA)*

Analiza pojedinačnih polifenolnola i metilksantina provedena je prema modificiranoj metodi Belščak-Cvitanović i suradnika (2011).

#### Postupak rada:

Analiza bioaktivnih spojeva provedena je kromatografijom obrnutih faza na InertSustain® C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) (GL Sciences, Japan) koloni pomoću kromatografskog sustava Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, SAD) sastavljenog od kvaterne pumpe, autosamplera s injektorom, termostata kolone i PDA (*engl.* photo diode array) detektora. Mobilnu fazu činile su dvije komponente: A - 2 %-tna (v/v) otopina mravlje kiseline (HCOOH) u vodi i B - 2 %-tna (v/v) otopina mravlje kiseline u acetonitrilu. Optimalno razdavajanje komponenata postignuto je uspostavljanjem linearnog gradijenta sastava mobilne faze u vremenu prema sljedećem: 0. min: 90 % A, 10 % B; 25. min: 60 % A, 40 % B; 45. min: 30 % A, 70 % B, pri protoku od 1 mL/min. Ukupno vrijeme analize iznosilo je 50 min, uključujući 5 min stabilizacije na početne uvjete sastava mobilne faze. Temperatura kolone bila je 25 °C, a volumen injektiranih uzoraka iznosio je 20 µL (uzorci ekstrakata filtrirani su kroz mikrofiltere (Chromafil CA-25/45, Macherey-Nagel, Njemačka) prije injektiranja u kromatografski sustav). Detekcija bioaktivnih spojeva omogućena je snimanjem efluenta pri 278 nm pomoću PDA detektora. Upravljanje kromatografskim sustavom te obrada kromatograma omogućeni su programom ChemStation (Agilent Technologies, SAD).

Identifikacija i kvantifikacija detektiranih spojeva

Otopine standarada polifenolnih spojeva i metilksantina pripremljene su u koncentracijskom rasponu 5 - 100 µg/mL u 6 točaka te analizirane prema istoj metodi kao i ekstrakti. Podaci dobiveni analizom kromatograma standarada korišteni su za identifikaciju pikova u uzorcima te za kalibraciju sustava. Identifikacija je provedena usporedbom retencijskih vremena i karakterističnih apsorpcijskih spektara snimljenih PDA detektorom u rasponu valnih duljina od 190 do 400 nm. Za kvantifikaciju identificiranih analita i uzorku korišteni su odgovarajući baždarni pravci (Tablica 17).

Tablica 17. Baždarni pravci identificiranih bioaktivnih spojeva u vodenim i etanolnim ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina.

Naziv spoja	Čistoća i dobavljač	Jednadžba baždarnog pravca	Koficijent korelacije (R <sup>2</sup> )
<b>Elaginska kiselina</b>	97 % (HPLC), Fluka Biochemika; Njemačka	$y = 11,311x - 8,02$	0,9999
<b>Ferulinska kiselina</b>	99 %, Sigma-Aldrich; Njemačka	$y = 60,496x + 11,83$	1,0000
<b>Galna kiselina</b>	98 %, Acros Organics <sup>TM</sup> , Fisher Scinetific; SAD	$y = 56,244x - 31,86$	0,9999
<b>Kafein</b>	99 % (HPLC), Fluka; Njemačka	$y = 60,160x + 82,54$	0,9998
<b>Kafeinska kiselina</b>	> 99 %, Acros Organics <sup>TM</sup> , Fisher Scinetific; SAD	$y = 129,030x + 81,68$	0,9999
<b>Klorogenska kiselina</b>	95 %, Sigma-Aldrich; Njemačka	$y = 24,414x + 33,45$	0,9992
<b>Kvercetin</b>	> 95 %, Sigma-Aldrich; Njemačka	$y = 44,013x + 18,62$	0,9998
<b>Luteolin</b>	> 98 %, Sigma-Aldrich; Njemačka	$y = 39,577x + 198,40$	0,9941
<b>p-kumarinska kiselina</b>	98 %, Sigma-Aldrich; Njemačka	$y = 121,28x + 24,90$	0,9999
<b>Protokatehinska kiselina</b>	97 %, Acros Organics <sup>TM</sup> , Fisher Scinetific; SAD	$y = 34,738x - 22,37$	0,9997
<b>Teobromin</b>	99 %, Sigma-Aldrich; Njemačka	$y = 46,967x + 39,20$	0,9999
<b>Vanilinska kiselina</b>	98,5 %, Acros Organics <sup>TM</sup> , Fisher Scinetific; SAD	$y = 73,661x + 5,53$	0,9999

HPLC analize provedene su u duplikatu, a udjeli pojedinačnih polifenola i metilksantina izračunati su s obzirom na volumen dobivenih ekstrakata i početnu masu uzorka korištenog za ekstrakcije. Rezultati su izraženi kao maseni udjel (µg/g s. tv.) u suhoj tvari sekundarne biljne sirovine te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.



#### 3.2.2.3.4 Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS i DPPH metodama

Antioksidacijski kapacitet vodenih i etanolnih ekstrakata sekundarnih biljnih sirovina određen je s obzirom na ekvivalentni učinak vodeno-topljivog analoga vitamina E (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) - Trolox (Sigma Aldrich, Njemačka) kao Trolox-ekvivalentni antioksidacijski kapacitet (*engl.* Trolox equivalent antioxidant capacity - TEAC). ABTS Metoda temelji se na oksido-redukcijskoj reakciji „gašenja“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kation (Sigma Aldrich; Njemačka)), koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a (Re i sur., 1999). DPPH metoda temelji se na redukciji 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH (Fluka; Njemačka)) radikala u metanolnoj otopini. DPPH radikal radi nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm), dok u prisutnosti elektron donora (antioksidans koji „gasi“ slobodne radikale) dolazi do stabilizacije DPPH radikala sparivanjem elektrona te do promjene ljubičaste boje (oksidirani oblik radikala) otopine u žutu (reducirani oblik radikala) (Brand-Williams i sur., 1995).

##### Postupak rada:

##### *ABTS metoda:*

Pripremi se otopina ABTS radikala, oksidacijom 7 mM vodene otopine ABTS reagensa s 140 mM kalijevim peroksodisulfatom, do konačne koncentracije otopine kalijeva peroksodisulfata od 2,45 mM. Pripremljena otopina ostavi se preko noći (najmanje 12-16 h) pri sobnoj temperaturi i u mraku kako bi reakcija bila potpuna. Na dan analize otopina se razrijedi etanolom (96 %) do konačne koncentracije ABTS radikala od 1 % (v/v), tako da apsorbanacija te otopine pri 734 nm iznosi  $0,70 \pm 0,02$ . Alikvot 20  $\mu$ L uzorka (vodeni ili etanolni ekstrakt sekundarnih biljnih sirovina) pomiješa se s 2 mL otopine ABTS radikala u laboratorijskoj epruveti te se izmjeri apsorbanacija pri 734 nm (spektrofotometar Genesys™ 10S UV-VIS, Thermo Fisher Scientific, SAD) nakon točno 6 minuta reakcije u mraku, u odnosu na slijepu probu.

##### *DPPH metoda:*

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U laboratorijsku epruvetu se otpipetira 0,1 mL uzorka (vodeni ili etanolni ekstrakt sekundarnih biljnih sirovina), doda se 3,9 mL otopine DPPH i reakcijska smjesa se promiješa na vorteksu. Začepljene epruvete ostave se u mraku pri sobnoj temperaturi tijekom 30 min, nakon čega se mjeri apsorbanacija (spektrofotometar Genesys™ 10S UV-VIS, Thermo Fisher Scientific, SAD)

pri 515 nm, u odnosu na slijepu probu. U obje metode slijepa proba sadrži jednaki volumen otapala umjesto uzorka.

#### Izračun rezultata:

Iz osnovne otopine standarda Trolox-a koncentracije 1 mM, pripreme se razrjeđenja 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM i 0,8 mM te se ponove prohodno opisani postupci reakcije s ABTS i DPPH radikalima za svako razrjeđenje.

Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija Trolox-a, konstruira se pravac ovisnosti promjene apsorbancije (Y-os ( $\Delta A$ )) o koncentraciji (X-os (mmol/L)), odnosno baždarni pravac. Promjena apsorbancije izračuna se oduzimanjem vrijednosti apsorbancije reakcijske smjese s uzorkom od iste za slijepu probu. Koristeći baždarni pravac, izračuna se koncentracija Trolox-a kojom se postiže jednak reakcijski učinak (smanjenje intenziteta obojenja izvorne otopine radikala pri istim uvjetima).

Jednadžbe baždarnih pravca glase:

$$\text{ABTS} \quad y = 0,2915x + 0,0055; R^2 = 0,9993$$

$$\text{DPPH} \quad y = 0,6115x - 0,0097; R^2 = 0,9997$$

Gdje su:

y - razlika izmjerenih vrijednosti apsorbancije slijepe probe i uzorka,

x - tražena ekvivalentna koncentracija standarda koja daje isti učinak.

Analiza Trolox-ekvivalentnog antioksidacijskog kapaciteta provedena je u duplikatu, a konačni rezultat izračunat je s obzirom na ukupni volumen pojedinog ekstrakata te početnu masu uzorka korištenog za ekstrakcije. Rezultati su izraženi kao maseni udjel ( $\mu\text{mol TE/g s.tv.}$ ) ekvivalenata Trolox-a (TE - *engl.* Trolox Equivalents) u suhoj tvari sekundarne biljne sirovine te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

### **3.2.3 Karakterizacija ugljikohidratne frakcije**

#### 3.2.3.1 Određivanje udjela netopljivih i topljivih vlakana

Udjel ukupnih vlakana određen je integriranom enzimsko-gravimetrijskom metodom AOAC 2011.25 (McCleary i sur., 2012) korištenjem seta za određivanje ukupnih vlakana (K-INTDF, Megazyme, Irska). Primijenjenom metodom određena su netopljiva i topljiva vlakna velike molekulske mase, odnosno ukupna vlakna velike molekulske mase kao njihov zbroj.

#### Princip metode:

Enzimskom hidrolizom uzoraka razgrađuju se nestrukturani ugljikohidrati i proteini, nakon čega zaostaju strukturalni ugljikohidrati koji se gravimetrijski zasebno određuju kao topljiva i

netopljiva vlakna te se u istima naknadno analiziraju udjeli proteina i mineralnog ostatka u svrhu korekcije rezultata.

#### Postupak rada:

##### *Enzimska hidroliza uzoraka*

Odvaže se  $1,000 \pm 0,005$  g usitnjenog uzorka u laboratorijske boce od 250 ml (Duran®, Njemačka). Uzorak se navlaži s 1 mL etanola (96 %-tni), a zatim se doda se 40 mL 50 mM maleat-pufera (pH 6,0) koji sadrži pankreasnu  $\alpha$ -amilazu i amiloglukozidazu. Puffer se prethodno pripremi na način da se otopi 11,6 g maleinske kiseline u 1600 mL demineralizirane vode te se podesi pH dodatkom 4 M NaOH do vrijednosti 6,0. U prepremljenu otopinu doda se 0,6 g kalcijeva klorida dihidrata ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) te se nadopuni do oznake (2 L). Neposredno prije primjene, u 290 mL pripremljenog pufera otopi se 0,10 g  $\alpha$ -amilaze, a zatim se doda i 0,3 mL amiloglukozidaze. Uzorci se inkubiraju na tresilici (Certomat RM, Sartorius, Njemačka) pri 37 °C tijekom 16 h, pri brzini okretaja 150 rpm. Enzimska reakcija zaustavlja se dodatkom 3 mL 0,75 M trizma bazične otopine (konačni pH ~ 8,2) te zagrijavanjem reakcijske smjese u vodenoj kupelji pri 95-100 °C tijekom 20 minuta. Sadržaj boca ohladi se do 60 °C i potom se doda 100  $\mu\text{L}$  otopine proteaze. Sadržaj se inkubira pri 60 °C tijekom 30 minuta na tresilici. Enzimska reakcija proteazom zaustavlja se dodavanjem 4 mL 2 M octene kiseline (konačni pH ~ 4,3).

##### *Netopljiva vlakana*

Sadržaj boce nakon uzastopnih enzimskih hidroliza filtrira se pomoću vakuuma preko lončića s filtracijskom površinom od sinteriranog stakla (sinter lončići volumena 50 mL, poroziteta 40 - 100  $\mu\text{m}$ , Duran®, Njemačka). Za korištenje, lončiće je potrebno prethodno pravilno pripremiti - lončići moraju biti dobro oprani, izžareni u mufolnoj peći, ohlađeni i izvagani. Kao pomoćno filtracijsko sredstvo koristi se Celite® 545 AW (Sigma-Aldrich, Njemačka) koji se prethodno (u fazi pripreme lončića) nanosi u ravnomjernom sloju (~1 g) na filtracijsku površinu lončića. Budući da talog na sinter lončićima u koraku nakon enzimske hidrolize predstavlja netopljiva vlakna, vrlo je važno kvalitativno prenijeti sav sadržaj boce na filter, što se čini pomoću tople vode zagrijane na 60 °C (ukupno 20 mL). Sakupljeni filtrat nadopuni se do volumena 70 mL i sačuva za određivanje topljivih vlakana. Ostatak na lončiću ispere se s dvije porcije od 15 mL 78 %-tnog etanola, 96 %-tnog etanola i acetona, a filtrat od ispiranja se baca. Lončići s talogom suše se pri 105 °C (ST-06, Instrumentaria; Hrvatska) do konstantne mase, nakon čega se ohlade u eksikatoru i važu. Izvagani lončići čuvaju se za dodatne analize u svrhu korekcije rezultata.

##### *Topljiva vlakna*

Topljiva vlakna određuju se iz filtrata nakon izdvajanja netopljivih vlakana preko sinter lončića. Sakupljeni filtrat (70 mL) potrebno je zagrijati na 60 °C, a zatim se dodaje četverostruki volumen (280 mL, volumen izmjeren pri sobnoj temperaturi) 96 %-tnog etanola zagrijanog na 60 °C, uz intenzivno miješanje (pripremiti u laboratorijskoj staklenoj boci od 500 mL (Duran®, Njemačka)). Smjesa se ostavi pri sobnoj temperaturi tijekom 60 minuta, nakon čega se istaložena topljiva vlakna filtriraju pomoću vakuuma na sinter lončićima s pomoćnim filtracijskim sredstvom (kao za netopljiva vlakna). Topljiva vlakna kvantitativno se prenesu pomoću 78 %-tnog etanola, a talog se ispere s dvije porcije od 15 mL 78 %-tnog etanola, 96 %-tnog etanola i acetona (filtrat od ispiranja se baca). Lončići s talogom topljivih vlakana suše se pri 105 °C do konstantne mase, nakon čega se ohlade u eksikatoru i važu. Izvagani lončići čuvaju se za dodatne analize u svrhu korekcije rezultata.

#### Izračun rezultata:

Masa netopljivih (NV) i topljivih (TV) vlakana određuje se iz razlike konstantne mase lončića s talogom (nakon sušenja pri 105°C) te čistog izarenog lončića s pomoćnim filtracijskim sredstvom, dok se udjel istih računa s obzirom na početnu masu uzorka (ili masu suhe tvari) kojom se započinje enzimska hidroliza.

U svrhu dobivanja što točnijih rezultata, potrebno je odrediti udjele proteina (v. poglavlje 3.2.1.3) i mineralnog ostatka (v. poglavlje 3.2.1.4) u talozima netopljivih i topljivih vlakana. Prilikom analize proteina i mineralnog ostatka, kao uzorak za analizu koristi se cijeli talog sa sinter lončića (zajedno s pomoćnim filtracijskim sredstvom). U slučaju analize proteina, isti se prebacuju u epruvete za digestiju, dok se za analizu mineralnog ostatka talog mineralizira u sinter lončićima. Lončice je potrebno pažljivo zagrijavati i hladiti u mufolnoj peći kako ne bi došlo do pucanja. Masa (udjel) ukupnih vlakana izračuna se prema izrazu:

$$m (NV \text{ ili } TV) = m_1 - m_2 - m_{\text{proteini}} - m_{\text{mineralni ostatak}}$$

Gdje su:

$m_1$  - masa sinter lončića s talogom,

$m_2$  - masa praznog sinter lončića s pomoćnim filtracijskim sredstvom.

Analiza netopljivih i topljivih vlakana napravljena je u 4 paralele, dok su korekcijske analize napravljene u duplikatu. Rezultati udjela topljivih i netopljivih vlakana velike molekulske mase izraženi su kao maseni udjel (%) u sirovoj ugljikohidratnoj frakciji te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

### 3.2.3.2 Određivanje udjela topljivog i netopljivog lignina

Udjeli netopljivog i topljivog lignina u uzorcima sekundarnih biljnih sirovina određeni su prema prilagođenom protokolu po predlošku metode National Renewable Energy Laboratory-ja NREL/TP-510-42618 (Sluiter i sur. 2008a).

#### Princip metode:

Gravimetrijsko određivanje ostatka nakon potpune kiselinske hidrolize biljnog supstrata (polisaharida), pri čemu lignin ostaje uglavnom nehidroliziran (Klasonov lignin).

#### *Priprema kiselinskih hidrolizata*

#### Postupak rada:

Odvaže se  $0,3000 \pm 0,0010$  g uzorka u laboratorijsku epruvetu (15 mL), oprezno se doda  $3,00 \pm 0,01$  mL 72 %-tne (w/w) sumporne kiseline ( $H_2SO_4$ ) te se smjesa pažljivo i temeljito homogenizira pomoću staklenog štapića, pritom pazeći da je cjelokupni materijal ravnomjerno navlažen kiselinom. Sadržaj u epruveti ostavi se pri sobnoj temperaturi tijekom 1 h uz povremenu (svakih 10 min) homogenizaciju staklenim štapićem. Po završetku inkubacije, sadržaj epruvete pažljivo se kvantitativno prenese u laboratorijsku bocu od 100 mL (Duran®, Njemačka) pogodnu za autoklaviranje, pri čemu se sumporna kiselina razrjeđuje vodom do udjela 4 % (w/w) (dodaje se ukupno  $84,00 \pm 0,04$  mL vode). Boca se začepi (čep ne zavrtati do kraja) i autoklavira (autoklav tip 7510945, Sutjeska, Srbija) tijekom 1 h (izotermno) pri 121 °C.

#### *U kiselini netopljiv lignin (Klasonov lignin)*

Nakon autoklaviranja, boca se ohladi do sobne temperature u hladnoj vodenoj kupelji, a potom se njezin sadržaj filtrira pomoću vakuuma preko prethodno pripremljenih lončića sa filterskom površinom od sinteriranog stakla (sinter lončići volumena 50 mL, poroziteta 40 - 100  $\mu$ m, Duran®, Njemačka). Iz dobivenog filtrata izuzima se alikvot 50 mL za određivanje u kiselini topljivog lignina, a potom se ostatak taloga iz boce kvantitativno prenese na sinter lončić i ispire s najmanje 50 mL demineralizirane vode. Talog na sinter lončiću suši se u laboratorijskom sušioniku (ST-06, Instrumentaria; Hrvatska) pri 105 °C do konstantne mase, nakon čega se lončić hladi u eksikatoru do sobne temperature i važe.

Lončići za filtraciju pripremaju se na način da se dobro operu (po potrebi se i žare u mufolnoj peći pri 550 °C tijekom 2 h), a na osušene lončiće stavlja se ravnomjieran sloj (~ 1 g) pomoćnog filtracijskog sredstva Celite® 545 AW (Sigma-Aldrich, Njemačka) te se lončići zatim suše pri 105 °C do konstantne mase, hlade u eksikatoru i važu.

### *U kiselini topljiv lignin*

Udjel topljivog lignina određuje se spektrofotometrijski (Genesys™ 10S UV-VIS, Thermo Fisher Scientific, SAD) u alikvotu filtrata kiselinskog hidrolizata izdvojenome neposredno nakon filtracije u kiselini netopljivog lignina. Mjerenje se provodi pri 240 nm, u kiveti od kvarcnog stakla volumena 4 mL i duljine puta svjetlosti 1 cm, uz 4 % (w/w) sumpornu kiselinu kao slijepu probu. Uzorci za mjerenje razrijeđuju se po potrebi (4 % (w/w) sumpornom kiselinom) tako da vrijednost apsorbancije iznosi 0,7 - 1,0. Analizu je potrebno provesti unutar 6 h od provedene kiselinske hidrolize.

#### Izračun rezultata:

Udjel u kiselini netopljivog lignina (KNL) izračuna se prema izrazu:

$$\% KNL = \frac{m_2 - m_1}{m_{uzorak}} * 100$$

Gdje su:

$m_1$  - masa sinter lončića pripremljenog za filtraciju,

$m_2$  - masa sinter lončića s talogom nakon sušenja do konstantne mase.

Udjel u kiselini topljivog lignina izračunat je prema izrazu:

$$\% KTL = \frac{UV_{abs} * V * f_{DIL}}{\epsilon * L * m_{uzorak}} * 100$$

Gdje su:

$UV_{abs}$  - razlika vrijednost apsorbancije pri 240 nm uzorka i slijepe probe,

$V$  - volumen filtrata (0,087 L)

$f_{DIL}$  - faktor razrijeđenja uzorka,

$\epsilon$  -apsorpcijski koeficijent pri zadanoj valnoj duljini (25 L/g cm)

$L$  - duljina kvarcne kivete za mjerenje

Potpuna kiselinska hidroliza, a zatim i određivanje udjela netopljivog i topljivog lignina provedeni su u duplikatu. Rezultati su izraženi kao maseni udjel (% s.tv.) u suhoj tvari sekundarne biljne sirovine te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

#### 3.2.3.3 Određivanje udjela jednostavnih šećera

Jednostavni šećeri (glukoza, fruktoza i saharoza) određeni su u vodenom, etanolnom i 70 %-tnom etanolnom ekstraktu sekundarnih biljnih sirovina primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti s refrakcijskom detekcijom (HPLC-RID), prema metodi Laboratorija za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Priprema ekstrakata opisana je prethodno (poglavlje 3.2.2.1).

### Postupak rada:

U svrhu pripreme uzorka za analizu, alikvot ekstrakta pomiješa se s acetonitrilom u omjeru 1:1 (v/v) kako bi se sastav uzorka približio sastavu mobilne faze, a time i zaštitio kromatografski sustav od eventualne neželjene precipitacije otopljenih tvari u uzorku uslijed promjene sastava otapala. Smjesa uzorka i acetonitrila ostavljena je tijekom 1 h pri -20 °C kako bi se maksimalno potaknula precipitacija, a zatim su uzorci profiltrirani kroz PTFE Chromafil mikrofiltere veličine pora 0,2 µm (Macherey-Nagel, Njemačka) u posudice za uzorkovanje (HPLC vial). Ovako pripremljen uzorak je razrijeđen u odnosu na izvorni ekstrakt, pri čemu faktor razrjeđenja iznosi 2 (koji se koristi za izračun rezultata).

Analiza jednostavnih šećera provedena je kromatografijom hidrofilnih interakcija (*engl.* HILC - hydrophilic interaction liquid chromatography) na Luna NH2 koloni (Phenomenex, SAD) (polarna stacionarna faza) i kromatografskim sustavom Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, SAD) u sklopu kojeg se nalaze kvaterna pumpa, autosampler s injektorom, termostatska kolona te refrakcijski detektor. Mobilnu fazu činila je smjesa vode i acetonitrila, pomiješanih u omjeru 80:20 (v/v). S obzirom na refraktometrijsku detekciju (mjerenjem relativne promjene indeksa loma), uspostavljena je isključivo izokratna elucija analita pri protoku od 1 mL/min. Temperatura kolone, kao i detektora, iznosila je 35 °C, a volumen injektiranih uzoraka 10 µL. Separacija analita pri ovim uvjetima postignuta je unutar 15 min (trajanje metode), od čega se zadnjih 3 min odnosilo na stabilizaciju sustava prije početka sljedeće analize. Upravljanje kromatografskim sustavom te obrada kromatograma omogućeni su programom ChemStation (Agilent Technologies, SAD).

### Izračun rezultata:

Identifikacija spojeva provedena je usporedbom retencijskih vremena pikova na kromatogramima uzoraka s kromatogramima standarada, dok su za kvantifikaciju korištene površine ispod pikova dobivene nakon integracije kromatograma. Baždarni pravci (Tablica 18) za svaki identificirani spoj (šećer) definirani su nakon analize otopina standarda u koncentracijskom rasponu 0,1 - 2,0 mg/mL, prema istoj metodi kojom su analizirani i ekstrakti, te koreliranjem poznatih koncentracija s odgovarajućim površinama ispod dobivenih pikova. Koristeći odgovarajuće baždarni pravce, iz vrijednosti dobivenih površina identificiranih pikova u kromatogramima uzoraka izračunate su odgovarajuće koncentracije šećera u uzorku. Udjeli šećera izračunati su s obzirom na ukupni volumen ekstrakta te početnu masu uzoraka korištenih u ekstrakcijama. HPLC analize provedene su u duplikatu, a rezultati su izraženi su kao maseni udjeli (% s.tv.) u suhoj tvari sekundarne biljne sirovine i kao maseni udjeli u

ugljikohidratnoj frakciji pojedine sirovine, te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

Tablica 18. Baždarni pravci za određivanje udjela jednostavnih šećera HPLC-RID metodom.

Naziv spoja	Čistoća i dobavljač	Jednadžba baždarnog pravca	Koeficijent korelacije ( $R^2$ )
<i>D-(+) - glukoza monohidrat</i>	Fluka; Njemačka	$y = 78\,734x + 696,91$	0,9999
<i>D-(-) - fruktoza</i>	> 99 %, Sigma-Aldrich; Njemačka	$y = 107\,115x + 510,11$	0,9999
<i>Saharoza</i>	> 99,5 %, Sigma-Aldrich; Njemačka	$y = 102\,962x + 255,36$	0,9998

#### 3.2.3.4 Određivanje udjela škroba

Određivanje udjela škroba u sekundarnim biljnim sirovinama provedeno je prema internom protokolu Francuskog nacionalnog instituta za istraživanja u poljoprivredi (INRA, Centar Angers-Nantes, BIA, laboratorij Paroi Végétale et Polysaccharides Pariétaux), koji je pripremljen prema radu McCleary i suradnika (1997), te AACC 76-13.01 i AOAC 996.11 metodama opisanima u Megazyme protokolu za određivanje ukupnog škroba (Megazyme, 2018).

##### Princip metode:

Enzimska hidroliza škroba  $\alpha$ -amilazom i amiloglukozidazom, nakon čega se jedinice glukoze kvantificiraju kromatografski te preračunavaju na udjel škroba u uzorku.

##### Priprema pufera:

###### *Natrij-MOPS pufer (50 mM, pH 7,0)*

Za pripremu 100 ml pufera, otopi se 1,156 g 3-(N-morfolino) propansulfonske kiseline (dinatrijeva sol, M9381, Sigma Aldrich, Njemačka) u 60 mL deionizirane vode, podese se pH do 7,0 dodatkom 1 M klorovodične kiseline (HCl) uz praćenje na pH-metru, nakon čega se doda 74 g kalcijeva klorida dihidrata ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) i volumen se dopuni do 100 mL.

###### *Natrij-acetatni pufer (200 mM, pH 4,5)*

Za pripremu 100 mL pufera, otopi se 2,721 g natrijeva acetata trihidrata ( $\text{NaCOOCH}_3 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) u 60 mL deionizirane vode, namjesti se pH na vrijednost 4,5 dodatkom koncentrirane octene kiseline ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) i nadopuni se volumen do 100 mL.

##### Postupak rada:



Precizno se odvažuje  $10,0 \pm 0,5$  mg uzorka u laboratorijsku epruvetu s debelim stijenkama i navojnim čepom (12 mL, Pyrex®, Corning; SAD). U epruvetu se pažljivo doda 0,1 mL otopine ramnoze (L-ramnoza monohidrat, 99 %, Sigma-Aldrich; Njemačka) 20 mg/mL, koja služi kao interni standard te 0,2 mL MOPS pufera. Epruveta se lagano protrese rukom, pritom pazeći da uzorak ne ostaje na stijenci epruvete. Uzorak se ostavi preko noći pri sobnoj temperaturi. Idući dan pripremi se i standardni uzorak škroba (kukuruzni škrob) na sličan način - odvaga standardnog uzorka iznosi  $5,0 \pm 0,5$  mg te se u isti dodaje 0,2 mL standardne otopine ramnoze i 0,2 mL MOPS pufera. Pripremljeni uzorci i standardni uzorak u začepljenim epruvetama stave se u termoblok (QBH2, Grant Instruments; Ujedinjeno Kraljevstvo), zagrijan pri 120 °C, tijekom 5 min. Zatim se odmah prebace u drugi termoblok zagrijan pri 100 °C, čepovi se nježno otpuste kako bi se spriječilo pjenjenje, doda se 0,3 mL termostabilne  $\alpha$ -amilaze koncentracije 100 U/mL (30x razrijeđenje komercijalnog enzimskog preparata - termostabilna  $\alpha$ -amilaza iz *Bacillus licheniformis* 3000 U/mL (EC 3.2.1.1), Megazyme; Irska) u MOPS puferu, te se smjesa inkubira 6 min uz miješanje na vorteksu svake 2 min. Nakon toga, epruvete se prebace u vodenu kupelj zagrijanu pri 50 °C, pričekaju se 5 min kako bi se izjednačila temperatura, te se doda 0,4 mL natrij-acetatnog pufera pH 4,5 i 0,1 mL otopine amiloglukozidaze koncentracije 20 U/mL (amiloglukozidaza iz *Aspergillus niger* 200 U/mL (EC 3.2.1.3), Megazyme; Irska) te se smjesa inkubira daljnjih 30 min. Hidrolizati se zatim prebace u Eppendorf epruvete od 2 mL i centrifugiraju pri 12 000 o/min (5804 R, Eppendorf; Njemačka) pri sobnoj temperaturi tijekom 10 min. Supernatant se izdvoji i razrijedi prema potrebi prije analize.

Razrijeđeni uzorci hidrolizata analiziraju se HPAEC kromatografijom (*engl.* high-performance anion exchange chromatography) pomoću Dionex™ ICS 3000 sustava (Thermo Fisher Scientific, SAD) s Dionex™ CarboPac™ PA 1 4 x 250 mm kolonom (Thermo Fisher Scientific, SAD) te uz elektrokemijsku detekciju s referentnom Ag/AgCl elektrodom. Analiza se provodi tijekom 7 min, izokratnom eluacijom mobilnom fazom (dvokomponentni sustav: A - 500 mM otopina natrijeva hidroksida i B - voda HPLC kvalitete, automatski miješani u omjeru 20:80 (A:B (v/v))), pri temperaturi kolone 25 °C i volumenu injektiranog uzorka 20  $\mu$ L. Prije analize uzorci se filtriraju kroz PVDF 0,45  $\mu$ m mikrofiltere (Macherey-Nagel; Njemačka). Upravljanje kromatografskim sustavom te obrada kromatograma omogućeni su specijaliziranim programom Chromeleon (Thermo Fisher Scientific, SAD).

#### Izračun rezultata:

Kvantifikacija se provodi uspostavom faktora odziva (*engl.* response factor - RF) analita (glukoze) u odnosu na interni standard (ramnozu). Iz analize uzoraka standarda rastućih koncentracija (2, 4, 6, 12, 20, 30, 40  $\mu$ g/mL svaki) konstruiraju se odgovarajući baždarni pravci

za glukozu i ramnozu te se odaberu vrijednosti koncentracije i površine pika za svaki standard, koje odgovaraju sredini baždarnog pravca. Uzevši u obzir tako dobivene vrijednosti, odredi se faktor odziva analita s obzirom na interni standard, prema izrazu:

$$RF = \frac{A_{IS} * c_x}{A_x * c_{IS}}$$

Gdje su:

$A_{IS}$  - površina pika internog standarda,  
 $c_{IS}$  - koncentracija (masa) internog standarda,  
 $A_x$  - površina pika analita (standarda),  
 $c_x$  - koncentracija (masa) analita (standarda).

Ista formula primjenjuje se i za kvantifikaciju pikova u uzorku, pri čemu su poznate površine pikova internog standarda i analita, koncentracija (masa) internog standarda te faktor odziva za pojedini analit (u ovom slučaju, glukozu), a traži se koncentracija (masa) analita. Također, u obzir treba uzeti i razrjeđenje uzorka, a konačni udjel glukoze u uzorku preračunava se na udjel škroba korištenjem faktora 0,9 koji korigira vrijednost s obzirom na anhidro oblik polimera. Određivanje škroba provedeno je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao maseni udjel (%) u sirovoj ugljikohidratnoj frakciji pojedine sirovine i prikazani kao srednje vrijednosti s odgovarajućom standardnom devijacijom.

### 3.2.3.5 Određivanje monomernog sastava ugljikohidratne frakcije

#### 3.2.3.5.1 Priprema alkoholno-netopljivog ostatka

Alkoholno-netopljivi ostatak (*engl.* alcohol insoluble residue - AIR) pripremaju se uzastopnim ekstrakcijama 70 %-tnim etanolom, u adekvatnoj količini za daljnje eksperimente i analize (cca 100 g), kako je prethodno opisano u poglavlju 3.2.2.1.2. Svrha ovakve pripreme uzoraka prvenstveno je uklanjanje jednostavnih šećera koji mogu interferirati, odnosno lažno uvećati prinos pojedinih monosaharida - sastavnih dijelova strukturnih ugljikohidrata.

Nakon uzastopnih ekstrakcija, ekstrahirani materijal osuši se izmjenom otapala. U tu svrhu prvo se 2 puta uzastopno miješa (ispire) s 96 %-tnim etanolom u omjeru 1:3,5 (w/v) (između dva ispiranja, otapalo se odvaja filtracijom na Büchnerovom lijevku s Whatman No.4 filter papirom, pomoću vakuuma), a zatim 1 put s acetonom u omjeru 1:2 (w/v), koji se također ukloni filtracijom. Ekstrahirani materijal zatim se suši u digestoru u tankom sloju u plitkoj posudi velike ishlapne površine, prekriven staničevinom. S obzirom da su etanol i aceton lako hlapiva i zapaljiva otapala, postupak se provodi u dobro ventiliranom prostoru (digestor). Nakon što ishlapi aceton, osušeni materijal se po potrebi dodatno usitni u tarioniku s tučkom.

### 3.2.3.5.2 Potpuna kiselinska hidroliza

Potpuna kiselinska hidroliza prodrzumijeva potpunu dezintegraciju polisaharida do monomera koji ih sačinjavaju, a koji se naknadno određuju prikladnim instrumentalnim metodama. Postupak potpune kiselinske hidrolize prilagođen je prema internom protokolu Francuskog nacionalnog instituta za istraživanja u poljoprivredi (INRA, Centar Angers-Nantes, BIA, laboratorij Paroi Végétale et Polysaccharides Pariétaux), koji je pripremljen prema radu Englysta i Cummingsa (1988).

#### *Netopljivi uzorci*

U staklene epruvete (12 mL, Pyrex®, Corning; SAD) pažljivo se odvaže  $25,0 \pm 2,0$  mg (AIR uzorci sekundarnih biljnih sirovina ili drugi netopljivi polisaharidni uzorci), pazeći da uzorak ne ostaje po stijenkama epruvete. Zatim se pažljivo doda 250  $\mu$ L 72 % (v/v) (13 M) sumporne kiseline (također pazeći da kiselina ne ostaje po stijenci epruvete) te se uzorak inkubira pri sobnoj temperaturi tijekom 30 min uz miješanje saklenim štapićem (kojim se osigurava potpuno vlaženje uzorka jakim kiselinom). Svrha ovog postupka, koji se još naziva predhidroliza, je narušavanje 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 (otopina *myo*-inozitola (min. 99 %, Sigma Aldrich, Njemačka) koncentracije 5 mg/mL ili otopina D(-)-riboze (98 %, Sigma-Aldrich; Njemačka, koncentracije) 2,4 mg/mL. Uzorci se promiješaju na vorteksu (tek onda se izvade stakleni štapići), začepi i stave u uljnu kupelj (HBR 4 control, IKA; Njemačka) zagrijanu pri 100 °C ili u termoblok zagrijan pri istoj temperaturi, u kojima se hidroliza provodi tijekom najmanje 2 h. Nakon završene hidrolize, uzorci u epruvetama ohlade se u hladnoj vodenoj kupelji (ili smjesi vode i leda), promiješaju se na vorteksu te centrifugiraju (SL 8R, Thermo Fisher Scientific, SAD) kako bi se istaložile nehidrolizirane komponente. Za neutralizaciju se uzima 1 mL bistrog supernatanta u Eppendorf epruvete (2 mL), a ostatak kiselog hidrolizata se može čuvati pri -20 °C. Neutralizacija se provodi dodatkom praškastog kalcijeva karbonata ( $\text{CaCO}_3$ ), čija količina se izračuna iz stehiometrije reakcije neutralizacije (za alikvot 1 mL i koncentraciju kiseline približno 1 M, količina  $\text{CaCO}_3$  iznosi 0,110 g, odnosno dodaje se približno 0,13 g  $\text{CaCO}_3$ ). Dodavanjem  $\text{CaCO}_3$  dolazi do stvaranja teško topljive soli kalcijeva sulfata ( $\text{CaSO}_4$ ) zbog koje smjesa poprima bijelu boju i pastoznu teksturu. Također dolazi do oslobađanja ugljikova dioksida ( $\text{CO}_2$ ), zbog čega se uzorak pjeni te je  $\text{CaCO}_3$  stoga potrebno dodavati postupno. Nakon što se doda predviđena količina  $\text{CaCO}_3$ , uzorak se centrifugira, a supernatantu se izmjeri pH (pomoću indikatorskih trakcija za područje 0-14, Macherey-Nagel; Njemačka) koji po

završetku neutralizacije iznosi 6,5-7,0. Neutralizirani hidrolizat izdvaja se i čuva pri -20 °C za potrebe daljnjih analiza.

#### *Topljivi uzorci*

Topljivi polisaharidi pažljivo se odvažu u staklene epruvete ( $10,0 \pm 1,0$  mg), doda se 1,3 mL demineralizirane vode te se uzorci otope 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. Uzorci se ručno promiješaju laganim protresanjem epruveta ili rotacijom pri najmanjoj brzini na vorteksu i stave se u uljnu kupelj zagrijanu pri 100 °C gdje se provodi hidroliza tijekom 2 h. Iznimku čine uzorci topljivog polisaharida pektina, čiju hidrolizu je potrebno provoditi tijekom 6 h, kako bi došlo do potpune hidrolize ramnogalakturonana, te tijekom 2 h, zbog očuvanja prinosa arabinana. Nakon hidrolize pri 100 °C, epruvete s uzorcima se ohlade i centrifugiraju te se izuzme alikvot 1 mL bistrog supernatanta za neutralizaciju kalcijevim karbonatom, kako je prethodno opisano.

#### *3.2.3.5.3 Određivanje monomernog sastava tankoslojnom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPTLC)*

##### *3.2.3.5.3.1 Optimizacija metode*

HPTLC je najnapredija tehnika tankoslojne kromatografije koja koristi čvrsti pločasti nosač na koji se nanosi uzorak i preko kojeg prelazi fronta mobilne faze, na taj način razdvajajući pojedine komponente u uzorku s obzirom na njihov relativno različit afinitet prema mobilnoj i stacionarnoj fazi. Optimizacija ovakvog kromatografskog postupka u smislu poboljšanja separacije analita provodi se kombiniranjem značajki stacionarne (različite vrste nosača, impregnacija nosača) i mobilne faze (sastav, pH) te vremena (broj uzastopnih razvijanja) i načina razvijanja ploče (vertikalno, horizontalno, sa ili bez prethodnog zasićivanja komore parama mobilne faze). Optimizacija separacije monosaharida provedena je s obzirom na impregnaciju silika gel ploče, promjenu sastava i pH mobilne faze te ukupnog broja razvijanja ploče. Tablica 19 prikazuje ispitivane kromatografske uvjete.

#### Priprema stacionarne faze:

Ploču, tj. stacionarnu fazu činila je komercijalno dostupna silika gel ploča (HPTLC Silica Gel 60, Merck; SAD) dimenzija 20 x 10 cm. Pločom se treba pažljivo rukovati kako se ne bi oštetila fina površina silike. Nakon uzimanja iz originalnog pakiranja, s ploče se lagano otpuhne eventualno prisutna fina prašina mikroskopskih čestica silike te se po potrebi ploča pažljivo izreže na manje komade pomoću posebnog rezača (Smartcut plate cutter, Camag; Švicarska). U svrhu analize jednostavnih šećera, ploča se koristila kao takva, neimpregnirana, te impregnirana. Impregnacija je provedena uranjanjem u 0,3 M ili 0,5 M otopinu natrijeva

dihidrogenfosfata ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) kojoj je podešena pH vrijednost na 3,0; 5,0 ili 7,0. Impregnacija ploče izvodi se automatiziranim uređajem za uranjanje (Chromatogram Immersion Device, Camag; Švicarska) s pripadajućom kadicom za otapalo, koje uvijek istom podešenom brzinom uranja ploču te ju zadržava u kadici za definirano vrijeme (1 min) (reproducibilnost pripreme ploče od velike je važnosti za daljnju analizu). Nakon uranjanja, višak tekućine s ploče lagano se ocijedi na papirnom ubrusu te se ploča suši sušilom za kosu podešenim na najmanju brzinu puhanja zraka. Suha ploča (na izgled) dodatno se suši u laboratorijskom sušioniku pri  $110\text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 30 min, nakon čega se hladi na zraku pokrivena staničevinom, a ohlađena je spremna za nanošenje uzoraka.

Tablica 19. Kromatografski parametri prilikom optimizacije razdvajanja monosaharida tankoslojnom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPTLC)

	Mobilna faza	Omjer otapala (v/v/v/v)	Razvijanje ploče	Impregnacija
a)	AcN:H <sub>2</sub> O:EtOAc:1-PrOH	17:3:4:4	3x	-
b)	AcN:H <sub>2</sub> O:EtOAc:1-PrOH	17:1:6:6	3x	-
c)	AcN:H <sub>2</sub> O:EtOAc:1-PrOH	18:3:6:6	3x	-
d)	AcN:H <sub>2</sub> O:EtOAc:1-PrOH:HCOOH	17:3:4:4:1	3x	-
e)	AcN:H <sub>2</sub> O:EtOAc:1-PrOH	17:3:4:4	2x	0,5M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
f)	AcN:H <sub>2</sub> O:EtOAc:1-PrOH	17:3:4:4	3x	0,5M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
g)	AcN:H <sub>2</sub> O:EtOAc:1-PrOH	17:3:4:4	3x	0,5M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH=3,0
h)	AcN:H <sub>2</sub> O:EtOAc:1-PrOH	17:3:4:4	3x	0,5M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH=5,0
i)	AcN:H <sub>2</sub> O:EtOAc:1-PrOH	17:3:4:4	3x	0,5M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH=7,0
j)	AcN:H <sub>2</sub> O:EtOAc:1-PrOH	17:3:4:4	3x	0,3M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH=5,0

#### Priprema uzorka:

Kao uzorak korištena je smjesa standarada očekivanih monosaharida (ukupno 7): D-(+)-manoze, D-(+)-galaktoze, D-(+)-ksiloze, D-(+)-arabinoze, L-(+)-ramnoze monohidrata (LGC Standards; UK), D-(+)-glukoze monohidrata (Fluka; Njemačka) te uronske kiseline (D-(+)-galakturonske kiseline (Sigma-Aldrich; Njemačka). Uzorak se nanosio 8 mm od donjeg ruba ploče te u širini (*engl.* band width) 1 cm i ekvivalentnoj koncentraciji 1 ili 2 mg/mL (svi šećeri, osim ramnoze, nanoseni su u volumenu 1  $\mu\text{L}$  (koncentracija izvorne otopine standarda 1 mg/mL), dok je ramnoza nanosena u volumenu 2  $\mu\text{L}$  (koncentracija izvorne otopine standarda

1 mg/mL)) pomoću poluautomatiziranog uređaja za nanošenje uzoraka (Linomat 4, Camag; Švicarska) i mikolitarske igle (25 µL, Hamilton, SAD).

Ploča s nanešenim uzorkom razvijana je u vertikalnom položaju u dvostrukoj kadici za razvijanje s pregradom, unutarnjih dimenzija koje odgovaraju ploči 20 x 10 cm (Twin Trough Chamber, Camag; Švicarska), koja se prethodno zasićuje s 20 mL otapala za razvijanje (mobilne faze) tijekom najmanje 10 min.

#### Razvijanje kromatograma:

Ploča se razvija do 80 mm od donjeg ruba ploče (prethodno označiti olovkom visinu razvijanja ploče), nakon čega se pažljivo izvadi i ocijedi na papirnom ubrusu te se osuši ravnomjernim i polaganim prijelazima struje toplog zraka iz sušila za kosu preko ploče (izvoditi u digestoru). Postupak razvijanja ploče ponavljan je ukupno najmanje 2 puta te najviše 3 puta, svaki puta u prethodno zasićenim kadicama. Nakon završenog razvijanja, osušena ploča se derivatizira uranjanjem u DAP reagens (*engl.* diphenylamine-aniline-phosphoric acid) koji se priprema kao 2 %-tna (w/v) otopina difenilamina (ACS reagens, min. 99 %, Sigma Aldrich; Njemačka) i anilina (ACS reagens, min. 99,5 %, Sigma Aldrich; Njemačka) (udjel svakog spoja je 2 %) u 20 %-tnoj (v/v) otopini fosforne kiseline u metanolu. Derivatizacija se izvodi automatiziranim uređajem za uranjanje ploče (vrijeme zadržavanja 2 s), a mokra ploča se potom ocijedi na papirnom ubrusu te se pažljivo osuši sušilom za kosu. Nakon toga, ploča se stavi grijati na horizontalni grijač (TLC Plate Heater, Camag; Njemačka) (donji dio ploče potrebno je dobro obrisati vodom i etanolom kako se ne bi zalijepio za grijaću ploču) pri 150 °C tijekom 3-5 min kako bi došlo do reakcije između analita (šećera) i adsorbiranog derivatizacijskog reagensa. Pritom analiti razvijaju karakteristično obojenje, odnosno kromatogram postaje vidljiv.

#### 3.2.3.5.3.2 Analiza pri optimalnim uvjetima

##### Priprema stacionarne faze:

Stacionarna faza je prije analize impregnirana 0,5 M otopinom NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> podešene pH vrijednosti na 5,0, kako je opisano u prethodnom poglavlju.

##### Priprema uzoraka:

Uzorci neutraliziranih kiselinskih hidrolizata (priprema uzoraka opisana u poglavlju 3.2.3.5.2) razrjeđuju se metanolom (MeOH) u omjeru 1:1 (v/v) te se filtriraju kroz PVDF mikrofiltere veličine pora 0,2 µm (Macherey-Nagel, Njemačka) u posudice za uzorkovanje (HPLC vial). Priprema uzoraka u lako hlapivom otapalu potrebna je kako bi se uzorak lakše nanio na ploču, tj. kako bi tekuća faza lakše ishlapila pod strujom dušika prilikom nanošenja uzorka. Priprema

hidrolizata, kako je opisano u poglavlju 3.2.3.5.2, nije podrazumijevala u konkretnom slučaju HPTLC metode, dodatak internog standarda, već je umjesto dodan jednaki volumen vode.

#### *Nanošenje uzoraka na stacionarnu fazu*

Nanošenje uzoraka provedeno je automatiziranim uređajem za uzimanje i nanošenje uzoraka - autosamplera (Automatic TLC Sampler ATS4, Camag; Švicarska), a parametri nanošenja podešeni su u programu WinCATS (Camag, Švicarska). Uzorci su nanoseni u volumenu 10  $\mu\text{L}$ , 8 mm od donjeg ruba te 15 mm od bočnog ruba ploče, a širina nanosa iznosila je 8 mm (horizontalni razmak između 2 nanosa automatski se podešava s obzirom na ukupan broj uzoraka, dimenziju ploče i širinu pojedinog nanosa).

#### Razvijanje kromatograma:

Mobilnu fazu za razvijanje ploče činio je četverokomponentni sustav acetonitril:voda:etil acetat:1-propanol (17:3:4:4 v/v/v/v, čistoće otapala p.a., osim acetonitrila (HPLC grade)), a razvijanje je provedeno ukupno 3 puta do 80 mm fronte, u prethodno zasićenim kadicama. Ploča je između svakog razvijanja pažljivo ocijeđena i osušena sušilom za kosu. Derivatizacija kromatograma provedena je kako je opisano u prethodnom poglavlju.

#### Dokumentiranje, obrada i izračun rezultata:

Ohlađene derivatizirane ploče dokumentirane su pomoću VideoStore sustava (Camag; Švicarska) koji je opremljen Reprstar 3 transiluminatorom te foto kamerom. Digitalne fotografije snimljene su pri bijelom osvjetljenju te u remisijsko-transmisijском načinu rada transiluminatora, a naknadno su obrađene primjenom specijaliziranog programa (WinCATS, Camag; Švicarska).

Identifikacija je provedena usporedbom retencijskih faktora ( $R_f$ ) pojedinog analita (šećera) s retencijskim faktorima odgovarajućih standarada. Retencijski faktor definira se kao omjer duljine prijeđenog puta svakog analita s duljinom fronte otapala do koje se razvija kromatogram te je definiran za svaki šećer pomoću programa za analizu fotografije. Kvantifikacija pojedinog šećera u uzorku provedena je vanjskim standardima koji su na ploču nanoseni u rastućoj koncentraciji. Kalibracija je provedena u 7 točaka u koncentracijskom rasponu 50 - 350  $\mu\text{g/mL}$  za galakturonsku kiselinu, galaktozu, manozu, arabinozu, ksilozu, te 100 - 700  $\mu\text{g/mL}$  za glukozu i 200 - 800  $\mu\text{g/mL}$  za ramnozu. S obzirom na promjenjive uvjete tijekom analize, kalibracija smjesom standarada provedena je za svaku ploču, tj. svaku analizu. Obradom digitalne fotografije razvijene ploče pomoću specijaliziranog programa dobiveni su odgovarajući kromatogrami za svaki uzorak i smjesu standarada, kao i površine ispod pikova analita. Na temelju kromatograma standarada konstruirane su baždarne krivulje za svaki šećer, koje su korištene za kvantifikaciju istih u uzorku. Udjeli pojedinačnih šećera (u anhidro obliku)

u uzorku izračunati su s obzirom na ukupni volumen hidrolizata i početnu masu uzorka korištenu za potpunu kiselinsku hidrolizu te koristeći polimerizacijske faktore (za prijetvorbu u anhidro oblik) za pojedini šećer (0,88 za pentoze, 0,90 za heksoze, 0,907 za uronske kiseline i 0,89 za deoksi šećere).

HPTLC analize provedene su u triplikatu, a rezultati su izraženi kao maseni udjeli (% s.tv.) pojedinog šećera (tj. njegova anhidro oblika) u suhoj tvari sekundarne biljne sirovine (pritom je uzet u obzir gubitak suhe tvari tijekom ekstrakcije 70 %-tnim etanolnom) te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

#### 3.2.3.5.4 Određivanje sastava neutralnih šećera plinskom kromatografijom (GC-FID)

Postupak je proveden prema adaptiranoj metodi laboratorija Paroi Végétale et Polysaccharides Pariétaux 725-LA2-MO-MET-1998-193 Francuskog nacionalnog insituta za istraživanja u poljoprivredi (INRA, Centar Angers-Nantes, BIA), koja je pripremljena prema radovima Blakeney i suradnika (1983) te Englysta i Cummingsa (1988).

##### Princip metode:

Metoda se temelji na redukciji šećera (aldehidne ili keto skupine u molekuli) do odgovarajućih alkohola (alditola) te acetilacijom istih do alditol acetata. Dobiveni derivati pogodni su za analizu plinskom kromatografijom. Ovom metodom kvalitativno i kvantitativno se određuju neutralni šećeri: heksoze - galaktoza, manoza, glukoza; pentoze - arabinoza i ksiloza i deoksi šećeri - ramnoza i fukoza, uz prisutnost internog standarda *myo*-inozitola.

##### Priprema uzoraka:

Uzorci se pripremaju potpunom kiselinskom hidrolizom (poglavlje 3.2.3.5.2), a kao interni standard, u ovoj metodi koristi se *myo*-inozitol (5 mg/mL). Osim uzorka, za analizu se priprema i smjesa standarada očekivanih šećera, u koncentraciji 1 mg/mL (svaki) koja služi za kalibraciju metode. Smjesa standarada podvrgava se hidrolitičkim uvjetima kako je predviđeno i za uzorke (osim predhidrolize, koja se ne provodi na smjesi standarada), što se ponavlja prilikom svake pripreme uzoraka (potpune hidrolize). Hidrolizati dobiveni nakon potpune kiselinske hidrolize (bistri supernatant) ne neutraliziraju se kalcijevim karbonatom, već se se koriste kao takvi.

##### Postupak rada:

Alikvot 0,5 mL kiselog hidrolizata neutralizira se dodatkom 0,15 mL 25 %-tne otopine amonijaka, u epruveti s navojnim čepom (12 mL, Pyrex®, Corning, SAD), promiješa se na vorteksu te se provjeri pH indikatorskim papirićem (pH ~ 9). Šećeri u uzorcima zatim se reduciraju dodatkom 0,1 mL svježe pripremljene otopine natrijeva borohidrida (NaBH<sub>4</sub>) koncentracije 100 mg/mL u 3 M otopini amonijaka, uzorak se promiješa na vorteksu, dobro



začepi i stavi grijati pri 40 °C u vodenu kupelj tijekom 1 h. Nakon završene redukcije, epruvete se stavljaju u ledenu kupelj (smjesa vode i leda) te se u njih dodaju 2 obroka po 50 µL koncentrirane octene kiseline kako bi se degradirao suvišak NaBH<sub>4</sub>. Kiselina se pažljivo dodaje zbog burne i egzotermne reakcije (zato se uzorak istovremeno hladi), a između 2 dodavanja kiseline, uzorak se dobro promiješa na vorteksu. Izuzme se alikvot 0,15 mL reduciranog uzorka te se otpipetira u laboratorijsku epruvetu (20 mL). U daljnjem koraku provodi se acetilacija prethodno nastalih alditola dodatkom 2 mL acetat anhidrida (Sigma Aldrich; Njemačka) te 0,2 mL N-metilimidazola (Sigma Aldrich; Njemačka). Otopina se dobro promiješa na vorteksu te ostavi tijekom 20 min pri sobnoj temperaturi u digestoru. Reakcija se zaustavlja dodatkom 5 mL vode (snažno homogenizirati na vorteksu). Pročišćavanje i koncentriranje dobivenih alditol acetata provodi se ekstrakcijom u 1,5 mL diklormetana. Nakon separacije faza, donji organski sloj izdvoji se (pažljivo se prenese pipetom) u posude za uzorkovanje (GC vials) koje se hermetički zatvore.

Analiza alditol acetata provedena je plinskom kromatografijom (Autosystem XL GC, Perkin Elmer; SAD) s plamen-ionizacijskim detekcijom i GC kolonom (DB225 30 m x 0,32 mm, 0,25 µm, SGE Analytical Science, Australia). Temperatura injektora iznosila je 220 °C; injektirano je 1 µL uzorka u *split* načinu rada (1:50). Analiza je provedena izotermno pri temperaturi 205 °C i uz vodik (H<sub>2</sub>) kao mobilnu fazu (H<sub>2</sub> se doprema iz generatora vodika (Hydrogen Generator 9400, Packard Instrument Company; SAD)), pri protoku 4 mL/min.. Temperatura detektora iznosila je 220 °C, uz napon od -200 V. Analiza kromatograma omogućena je specijaliziranim programom TotalChrom (Thermo Fisher, SAD).

#### Izračun rezultata:

Identifikacija je provedena usporedbom relativnih retencijskih vremena (u odnosu na interni standard) pikova na kromatogramima uzorka i smjese standarada. Kvantifikacija je provedena korištenjem internog standarda, formulom kako je navedeno u izračunu rezultata u poglavlju 0. GC-FID analiza provedena je u triplikatu, a rezultati su izraženi kao maseni udjeli (% s.tv.) pojedinog šećera (tj. njegova anhidro oblika, koristeći polimerizacijske faktore: 0,88 za pentoze, 0,90 za heksoze, 0,907 za oronske kiseline i 0,89 za deoksi šećere) u suhoj tvari sekundarne biljne sirovine ili analizirane polisaharidne frakcije (prilikom analize hidrolizata sekundarnih sirovina uzet je u obzir i gubitak suhe tvari u obliku 70 %-tnog etanolnog ekstrakta prilikom pripreme AIR) te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

### 3.2.3.5.5 Kolorimetrijsko određivanje udjela uronskih kiselina

Postupak je proveden prema adaptiranoj metodi laboratorija Paroi Végétale et Polysaccharides Pariétaux 725-LA2-MO-MET-1998-192 Francuskog nacionalnog instituta za istraživanja u poljoprivredi (INRA, Centar Angers-Nantes, BIA) primjenom poluatomatiziranog kontinuiranog protočnog analizatora (SAN<sup>PLUS</sup> SYSTEM, Skalar Analytical; Nizozemska), a na temelju rada Blumenkrantz i Asboe-Hansen-a (1973) kasnije nadopunjenog radovima Ahmed i Labavitch-a (1977) te Thibault-a (1979).

#### Princip metode:

Metoda se temelji na reakciji između furfurnih derivata šećera, koji nastaju djelovanjem koncentrirane sumporne kiseline pri povišenoj temperaturi i *m*-hidroksidifenila (MHDP), pri čemu nastaju ružičasto-crveni kondenzacijski produkti čiji se intenzitet obojenja mjeri fotometrom. Iako i neutralni šećeri podliježu reakciji, intenzitet obojenja u reakciji s uronskim kiselinama daleko je veći i stoga je metoda pogodna za uzorke koji sadržavaju značajnu količinu uronskih kiselina u svom sastavu. Za analizu manuronske kiseline u reakcijsku smjesu je potrebno dodati i natrijev tetraborat, a navedena sol također intenzivira obojenje koje potječe od glukuronske kiseline (Filisetti-Cozzi i Carpita, 1991).

#### Priprema uzoraka:

Za netopljive uzorke potrebno je prethodno provesti potpunu kiselinsku hidrolizu, a kao uzorak za analizu uronskih kiselina koristi se kiseli hidrolizat bez prethodne neutralizacije. Topljivi uzorci važu se (5 - 10 mg) u odmjerne tikvice od 10 mL te se otupe u 2 mL vode. Uzorcima se dodaje 2 mL 0,1 M otopine natrijeva hidroksida (NaOH) u svrhu saponifikacije. Saponifikacija se nakon 30 min (pri sobnoj temperaturi) zaustavlja neutralizacijom uzorka dodavanjem ekvimolarne količine klorovodične kiseline (HCl, također 2 mL), a uzorci se zatim dopunjavaju do oznake. Saponifikacija uzoraka provodi se kako bi se uklonile prvenstveno metilne skupine s molekule polisaharida, budući da metil-uronska kiselina i uronska kiselina daju drugačiji intenzitet obojenja, a hidrolitički uvjeti koji se uspostavljaju tijekom analize nisu dovoljni kako bi hidrolizirali vezu metil-uronska kiselina *in situ* pa je isto potrebno prethodno osigurati. Budući da sustav može analizirati samo tekuće uzorke, netopljivi uzorci se prethodno hidroliziraju (v. poglavlje 3.2.3.5.2) prilikom čega se hidroliziraju i metilne skupine poliuronidnih molekula te stoga nije potrebna saponifikacija hidrolizata.

#### Postupak rada:

MHDP (85 %, Sigma Aldrich; Njemačka) reagens priprema se (u odgovarajućem volumenu, najmanje 100 mL) u koncentraciji 400 mg/L u 1/8 M otopini natrijeva hidroksida, u tamnoj

boci (ili se obično staklo obloži aluminijskom folijom) i čuva u hladnjaku do upotrebe. Otopina natrijeva tetraborata (ACS reagens, min 99,5%, Sigma Aldrich; Njemačka) priprema se u koncentriranoj sumpornoj kiselini najmanje 12 h prije analize kako bi se sva sol tetraborata otopila (11,9 g  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$  otopi se u 2,5 L of  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

Poluautomatizirani kontinuirani protočni analizator pripremi se za rad; namjestite se cjevčice za dovod otapala na peristaltičku pumpu, a na usisnoj strani se urone u odgovarajući reagens (MHDP i otopina tetraborata u  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , u svaki reagens zasebno), uključite se grijači, cirkulacija hladne vode kroz hladilo te fotometar i pislač. Pričekajte se 20-ak minuta kako bi se sustav ustalio, tj. postigla bazna linija na pislaču. U specijalne bunariće za uzorke postavite se prvo otopine standarada (glukuronske i galakturonske kiseline) za kalibraciju sustava, a zatim i uzorci. Iza serije kalibracijskih standarada te serije paralelnih uzoraka postavlja se bunarić s vodom koji služi da se uzorci odvoje baznom linijom. Automatizirana igla uzima uzorak iz bunarića i nanosi ga u uređaj, gdje se miješa s reagensima prilikom kontinuiranog protoka kroz sustav. Reakcijska smjesa se zatim zagrijava, a uslijed hidrolitičkog djelovanja povišene temperature i sumporne kiseline, dolazi do cijepanja molekula topljivih polisaharida te daljnje konverzije do furfurnih produkata koji reagiraju s *m*-hidroksidifenilom dajući ružičasto-crveno obojenje. Reakcijska smjesa se hladi prolaskom kroz sustav hladila te ulazi u protočnu ćeliju fotometra (520 nm) koji zatim prenosi signal do pislača te se iscrtava linija u obliku pika.

Nakon analize uzoraka otopinom tetraborata i MHDP reagensom, postupak se ponavlja kako je opisano, ali se reakcija, umjesto otopinom tetraborata i MHDP-om, provodi koncentriranom kiselinom i MHDP-om. Pritom se sustav ne zaustavlja, već se samo zamijeni reagens na usisnoj strani te se pričekuje dok se sustav ne ustali pri novim uvjetima. Također je potrebno sustav ponovno kalibrirati standardom galakturonske kiseline, nakon čega slijedi analiza uzoraka.

Korištenjem tetraborata postiže se specifičnost reakcije s obzirom na vrstu uronske kiseline budući da tetraborat intenzivira obojenje za glukuronsku kiselinu, dok u reakciji bez tetraborata obojenje uglavnom dolazi od galakturonske kiseline (ako su u uzorku prisutna oba spoja). Reakcijom s tetraboratom određuju se ukupne uronske kiseline, bez tetraborata galakturonska kiselina, a glukuronska kiselina se određuje iz razlike odziva za navedene reakcije.

#### Izračun rezultata:

Odziv sustava u ovoj metodi predstavlja visina (mm) iscrtanih pikova, kao rezultat mjerenog intenziteta obojenja prilikom prolaska reakcijske smjese kroz ćeliju fotometra. Visina svakog pika od bazne linije mjeri se ravnalom. Koreliranjem visine pikova standarada s pripadajućim koncentracijama konstruiraju se baždarni pravci. Koncentracijski raspon za oba standarda iznosio je 10 - 100  $\mu\text{g/mL}$  u 6 točaka. Prvo se, iz rezultata visine pika u uzorku i baždarnog

pravca za galakturonsku kiselinu iz reakcije s tetraboratom, izračuna koncentracija ukupnih uronskih kiselina na ekvivalent galakturonske kiseline. Zatim se isto ponovi za reakciju sa sumpornom kiselinom za isti uzorak i taj se podatak koristi za izračun udjela galakturonske kiseline u uzorku. Budući da se iz reakcije sa sumpornom kiselinom dobiva relevantan podatak o koncentraciji galakturonske kiseline, taj podatak se koristi da bi se izračunala ekvivalentna visina koja bi se dobila u reakciji s tetraboratom kada bi uzorak sadržavao samo galakturonsku kiselinu. Iz razlike stvarne visine iz reakcije s tetraboratom (odziv s obzirom na ukupne uronske kiseline u uzorku) te izračunate ekvivalentne visine galakturonske kiseline za istu reakciju, izračuna se visina pika koja potječe od glukuronske kiseline. Dobivena visina se preko baždarnog pravca za glukuronsku kiselinu u reakciji s tetraboratom preračunava na koncentraciju glukuronske kiseline u uzorku, odnosno masenog udjela u početnoj masi uzorka ako se uzme u obzir volumen hidrolizata (za netopljive uozrke) ili otopljenog uzorka (saponificiranog, za topljive uzorke) te početna masa uzorka za hidrolizu (netopljivi uzorci) ili saponifikaciju (topljivi uzorci).

U slučaju da uzorak osim uronskih kiselina sadrži i visok udjel neutralnih šećera, potrebno je napraviti korekciju za neutralne šećere - propustiti standard glukoze, kao predstavnika heksoza, te arabinoze ili ksiloze, kao predstavnika pentozu, pri čemu se raspon koncentracija definira s obzirom na poznatu koncentraciju neutralnih šećera u uzorku hidrolizata (GC analiza). Iz baždarnog pravca za neutralne šećere te poznate koncentracije istih u uzorku izračuna se ekvivalentna visina koja bi se dobila kada bi uzorak sadržavao samo neutralne šećere. Uz pretpostavku da je ukupna visina pika uzorka rezultat reakcije svih monosaharida u uzorku, oduzimanjem ekvivalentne visine za neutralne šećere od ukupne visine, rezultat se korigira s obzirom na utjecaj neutralnih šećera.

Kolorimetrijska analiza uronskih kiselina MHDP metodom provedena je u triplikatu, a rezultati su izraženi kao maseni udjeli (% s.tv.) galakturonske ili glukuronske kiseline, odnosno ukupnih uronskih kiselina (tj. njihova anhidro oblika, koristeći polimerizacijski faktor 0,907) u suhoj tvari sekundarne biljne sirovine ili analizirane polisaharidne frakcije (pritom je, u slučaju analize hidrolizata sekundarnih sirovina, uzet u obzir gubitak suhe tvari u obliku 70 %-tnog etanolnog ekstrakta prilikom pripreme AIR) te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

### 3.2.3.5.6 Određivanje monomernog sastava tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC-PDA)

#### 3.2.3.5.6.1 Derivatizacija monosaharida 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-onom (PMP reagens)

Derivatizacija monosaharida dobivenih potpunom kiselinskom hidrolizom, kao i standarada, provedena je prema postupku Sun-a i suradnika (2014), uz manje modifikacije. Za analizu se koriste neutralizirani kiselinski hidrolizati (v. poglavlje 3.2.3.5.2).

#### Opis postupka:

U Eppendorf epruvete od 2 mL pipetira se 50  $\mu$ L uzorka neutraliziranog hidrolizata (ili otopine standarada poznate koncentracije), zatim se doda 50  $\mu$ L 0,6 M otopine natrijeva hidroksida (NaOH) te se reakcijska smjesa dobro izmiješa na vorteksu. Odmah zatim doda se 100  $\mu$ L PMP reagensa (M70800 Sigma-Aldrich, Njemačka) (0,5 M metanolna otopina), smjesa se ponovno promiješa na vorteksu, a epruveta se uroni u vodenu kupelj (TKS-1, termomedicinski aparati „Bodalec“, Hrvatska) zagrijanu pri  $70 \pm 2$  °C (epruvete je potrebno dobro začepiti, a čepove po potrebi dodatno osigurati). Derivatizacija se provodi tijekom 60 minuta pri navedenoj temperaturi, uz ponovno miješanje na vorteksu nakon 20. i 40. minute. Po završetku reakcije, epruvete s uzorcima hlade se u hladnoj vodenoj kupelji, a reakcijska smjesa neutralizira se dodatkom 120  $\mu$ L 0,3 M otopine klorovodične kiseline (HCl) i dobro se promiješa na vorteksu. Smjesa se nadopuni demineraliziranom vodom do ukupnog volumena od 1 mL (dodati 680  $\mu$ L demineralizirane vode) te se provjeri pH dobivene otopine (pH 4-6). Suvišak PMP reagensa uklanja se uzastopnim ekstrakcijama s kloroformom, koji se dodaje u omjeru 1:1 (v:v). Ukupno se izvode 3 ekstrakcije, a svaka uz intenzivno miješanje na vorteksu tijekom najmanje 30 sekundi te potom kratko centrifugiranje 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 PMP derivati monosaharida, koji se prenosi u novu epruvetu te se postupak ponavlja do maksimalnog iscrpljenja suvišnog PMP reagensa (ukupno 3 puta). Gornji vodeni sloj nakon trostruke ekstrakcije kloroformom koristi se za analizu monomernog sastava primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.

#### 3.2.3.5.6.2 Optimizacija metode

S obzirom na prirodu analita (PMP derivata šećera), koji su ionizirajuće molekule uslijed keto-enolne tautomerizacije uvjetovane promjenom pH vrijednosti, optimizacija HPLC metode najviše je bila usmjerena na sastav mobilne faze.

Korišten je komatografski sustav Agilent 1200 Series s kolonom Zorbax Extend C18 (4,6 x 250 mm; 5 $\mu$ m) (Agilent Technologies, SAD) i dvokomponentnom mobilnom fazom (komponenta A - 20 mM natrij-fosfatni pufer (različitih pH vrijednosti), komponenta B - acetonitril (AcN)). Prva faza optimizacije HPLC metode osmišljena je s obzirom na promjenu 3 pH vrijednosti vodene komponente mobilne faze (fosfatni pufer) te 4 različita udjela organskog dijela mobilne faze (acetonitrila). Kombinacijom navedenih promjenjivih parametara mobilne faze kreirane su zasebne izokratne metode prema kojima je analizirana derivatizirana smjesa 10 monosaharida iste koncentracije (250  $\mu$ g/mL), sačinjena od 8 neturalnih šećera (D-(+)-manoz, D-(+)-galaktoza, D-(+)-ksiloza, D-(+)-arabinoza, L-(+)-ramnoza monohidrat (LGC Standards; UK), D-(+)-glukoza monohidrat (Fluka; Njemačka), D-(-)-riboza (Sigma-Aldrich; Njemačka) i L-(-)-fukoza (Acros Organics<sup>TM</sup>, Thermo Fisher; SAD) te 2 uronske kiseline (D-glukuronska i D-(+)-galakturonska kiselina (Sigma-Aldrich; Njemačka). Tablica 20 i Tablica 21. prikazuju varijacije u sastavu mobilne faze te parametre definiranih izokratnih metoda.

Tablica 20. Prikaz kombinacija sastava mobilne faze prilikom optimizacije HPLC-PDA metode za analizu monomernog sastava polisaharida.

		<b>pH vrijednost vodene komponente mobilne faze (natrij-fosfatni pufer)</b>		
		<b>7,0</b>	<b>7,5</b>	<b>8,0</b>
<b>Početni udjel AcN (vol %)</b>	<b>15</b>	pH7,0_AcN15	pH7,5_AcN15	pH8,0_AcN15
	<b>16</b>	pH7,0_AcN16	pH7,5_AcN16	pH8,0_AcN16
	<b>17</b>	pH7,0_AcN17	pH7,5_AcN17	pH8,0_AcN17
	<b>18</b>	pH7,0_AcN18	pH7,5_AcN18	pH8,0_AcN18

Svrha izokratnih analiza bila je uočiti utjecaj pH vrijednosti mobilne faze te udjela organske faze na razlučivost pikova na kromatogramu, što će poslužiti kao temelj za daljnju optimizaciju. Nakon definiranja najboljeg kromatograma dobivenog izokratnom metodom, ista metoda je modificirana promjenom načina eluacije u gradijentno kako bi se osigurala željena razlučivost kromatograma.

Tablica 21. Parametri definiranih izokratnih metoda.

<b>Promjenjivi parametri</b>	
Mobilna faza	Tablica 20
<b>Stalni parametri</b>	
Stacionarna faza	Zorbax Extend C18, 4,6 x 250, 5 $\mu\text{m}$
Elucija	izokratno
Protok	1 mL/min
Temperatura kolone	30 $^{\circ}\text{C}$
Detekcija	PDA, 245 nm
Volumen injektiranja	10 $\mu\text{L}$
Temperatura autosamplera	5 $^{\circ}\text{C}$
Trajanje metode	50 min

### 3.2.3.5.6.3 Analiza pri optimalnim uvjetima

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

#### Priprema uzoraka:

Derivatizirani uzorci se prije HPLC analize profiltriraju kroz mikrofiltre od regenerirane celuloze veličine pora 0,2  $\mu\text{m}$  (Phenomenex; SAD). Osim uzoraka hidrolizata, derivatizira se i uzorak smjese standarada očekivanih monosaharida, u kojoj se također nalazi interni standard (svaki analit u koncentraciji 250  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### Opis postupka:

Analiza se provodi na C18 koloni Zorbax Extend 4,6 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies, SAD) dvokomponentnom mobilnom fazom: A - 100 mM natrij-fosfatni pufer pH 8,0; B - acetonitril (AcN), uz gradijentnu eluciju kako slijedi: 0. min - 12 % B; 35. min 17 % B; 36. min - 20 % B; 45. min - 20 % B; 46. min - 12 % B; 65. min - 12 % B, pri protoku 1 mL/min, temperaturu kolone 25  $^{\circ}\text{C}$  te snimanje efluenta u UV području, pri 245 nm. Dobiveni kromatogrami obrađeni su pomoću programa ChemStation (Agilent Technologies, SAD).

#### Izračun rezultata:

Identifikacija PMP-derivata provodi se usporedbom retencijskih vremena pikova u uzorku s pikovima na kromatogramu smjese standarada. Kvantifikacija identificiranih pikova provodi se pomoću internog standarda, formulom kako je navedeno u izračunu rezultata u poglavlju 0. Kao

interni standard korištena je riboza čija koncentracija u svakom uzorku je iznosila 400 µg/mL (interni standard dodaje se prilikom potpune kiselinske hidrolize, v. poglavlje 3.2.3.5.2).

HPLC-PDA analiza PMP-derivata provedena je u triplikatu, a rezultati su izraženi kao maseni udjeli (% s.tv.) pojedinog šećera (tj. njegova anhidro oblika koristeći polimerizacijske faktore: 0,88 za pentoze, 0,90 za heksoze, 0,907 za oronske kiseline i 0,89 za deoksi šećere) u suhoj tvari sekundarne biljne sirovine (pritom je uzet je u obzir gubitak suhe tvari u obliku 70 %-tnog etanolnog ekstrakta prilikom pripreme AIR) ili analizirane polisaharidne frakcije, te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

#### 3.2.3.5.6.4 Validacija metode

Validacija HPLC metode može se definirati kao postupak prikupljanja dokumentiranih dokaza da je valjanost i izvodljivost razvijene metode unutar granica njezine namjene, tj. da će metoda pokazivati relevantne rezultate prilikom svake primjene (Jimidar i sur., 2007). Najčešći validacijski parametri, odnosno izvedbene karakteristike metode koje se određuju su: točnost, preciznost (ponovljivost i intermedijarna preciznost), specifičnost, limit detekcije, limit kvantifikacije, linearnost, raspon i robusnost (Shabir, 2003). Validacija razvijene HPLC-PDA metode za određivanje PMP-derivata neutralnih šećera i uronskih kiselina provedena je prema radovima Dai i suradnika (2010) i Lv i suradnika (2009) s obzirom na sljedeće validacijske parametre: linearnost, limit detekcije, limit kvantifikacije, preciznost (ponovljivost i intermedijarna preciznost) i točnost.

##### *Linearnost metode*

Linearnost metode potvrđena je uspostavljanjem ovisnosti između omjera površine pika odgovarajućeg monosaharida (x) s površinom pika internog standarda (IS) ( $A_x/A_{IS}$ ) i omjera odgovarajuće koncentracije monosaharida s koncentracijom internog standarda u uzorku ( $c_x/c_{IS}$ ), za dobivene rezultate analize smjese standarada i internog standarda. S obzirom da je primjena internog standarda u ovom postupku nužna kako bi se kompenzirali eventualni kvantitativni gubici tijekom derivatizacije, linearnost za definirano koncentracijsko područje određena je upravo s obzirom na koncentraciju internog standarda kako će se koristiti prilikom analize uzoraka.

Analiza je provedena prema parametrima metode kako je definirano u prethodnom poglavlju, a smjesa standarada sadržavala je 8 neutralnih šećera (glukoza, manoz, galaktoza, ksiloza, arabinoza, ramnoza, fukoza, riboza), od kojih je riboza služila kao interni standad, te 2 uronske kiseline (glukuronska i galakturonska kiselina). Raspon koncentracija svakog monosaharida iznosio je 10-400 µg/mL, u 10 točaka, dok je koncentracija internog standarda u svakom uzorku



(svaka mjerna točka) bila stalna i iznosila je 400 µg/mL. Dobiveni podaci obrađeni su programom Excel, Microsoft Office 2013 paketa, te su određene jednadžbe krivulja linearanosti (nagib pravca i odsječak na osi y) te koeficijenti determinacije ( $R^2$ ). Određivanje linearnost metode provedeno je u triplikatu.

#### *Limit detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ)*

Limit detekcije može se definirati kao najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne nužno i kvantificirati kao točna vrijednost (ICH, 2005); odnosno, to je najmanja vrijednost koncentracije čiji odziv se jasno može razlikovati od šuma. Limit kvantifikacije definira se kao najmanja količina (koncentracija) analita koja se može odrediti s odgovarajućom preciznosti i točnosti.

Za određivanje LOD i LOQ korištena je metoda određivanja standardne devijacije odsječka na osi y, pri čemu su korišteni izrazi:

$$LOD = 3,3 * \frac{\sigma}{S}$$

$$LOQ = 10 * \frac{\sigma}{S}$$

Gdje su:

$\sigma$  - standardna devijacija odziva (standardna devijacija odsječka na osi y ili rezidualna standardna devijacija regresijske linije),  
S - nagib kalibracijskog pravca.

Određivanje LOD i LOQ provedeno je u 7 točaka, u triplikatu, a koncentracijski raspon iznosio je 2,5 - 100 µg/mL. Uzorci standarada analizirani su prema HPLC-PDA metodi pri optimalnim uvjetima, a podaci površina pikova za svaku koncentracijsku točku, te odgovarajućih koncentracija, obrađeni su u programu programu Excel, Microsoft Office 2013 paketa, pomoću funkcije LINEST. Dobivene vrijednosti standardne devijacije odsječka na osi y uvršene su u odgovarajuće izraze za izračun LOD i LOQ. Dobivene vrijednosti LOQ potvrđene su dodatnom HPLC-PDA analizom.

#### *Preciznost*

Preciznost se može definirati kao bliskost slaganja mjerenih rezultata, pri čemu se uzastopno mjeri isti homogeni uzorak pri definiranim uvjetima. U tom smislu, da bi se metoda mogla karakterizirati kao precizna, mjereni rezultati moraju imati minimalno raspršenje od srednje vrijednosti. Preciznost metode može se razmatrati kroz tri aspekta:

- 1) ponovljivost - podrazumijeva preciznost pri istim operativnim uvjetima kroz kraći vremenski interval. Ponovljivost se često naziva i untardnevna preciznost (*engl. intraday precision*),

- 2) intermedijarna preciznost - podrazumijeva unutarlaboratorijske varijacije kao što su različiti instrumenti, različiti analitičari ili preciznost mjerena kroz više dana i sl. (*engl.* interday precision),
- 3) reproducibilnost - podrazumijeva interlaboratorijsku preciznost.

U ovome radu određena je ponovljivost metode uzastopnim analizama PMP derivata smjese 10 standarada koncentracije 250 µg/mL (svakog standarda) među kojima se nalazio i interni standard (riboza, u istoj koncentraciji). Tablica 22 prikazuje plan određivanja preciznosti metode.

Tablica 22. Prikaz plana eksperimenata za određivanje preciznosti metode.

		DAN 1	DAN 2	DAN 3	
<b>stmix 1</b>	<b>mjerenje</b>	1	1	1	<i>intermedijarna preciznost, n=15</i>
		2	2	2	
		3	3	3	
		4	4	4	
		5	5	5	
		<i>ponovljivost, n=5</i>	<i>ponovljivost, n=5</i>	<i>ponovljivost, n=5</i>	
<b>stmix 2</b>	<b>mjerenje</b>	1	1	1	<i>intermedijarna preciznost, n=15</i>
		2	2	2	
		3	3	3	
		4	4	4	
		5	5	5	
		<i>ponovljivost, n=5</i>	<i>ponovljivost, n=5</i>	<i>ponovljivost, n=5</i>	
<b>stmix 3</b>	<b>mjerenje</b>	1	1	1	<i>intermedijarna preciznost, n=15</i>
		2	2	2	
		3	3	3	
		4	4	4	
		5	5	5	
		<i>ponovljivost, n=5</i>	<i>ponovljivost, n=5</i>	<i>ponovljivost, n=5</i>	
		<i>ponovljivost, n=15</i>	<i>ponovljivost, n=15</i>	<i>ponovljivost, n=15</i>	<i>intermedijarna preciznost, n=45</i>

Za određivanje ponovljivosti metode, analiza iste smjese standarada provedena je 5 puta u jednom danu ( $n = 5$ ), a dobiveni rezultati retencijskog vremena (*engl.* retention time - RT) i površine pikova pojedinih monosaharida (*engl.* area - A) obrađeni su u programu Excel,

Microsoft Office 2013 paketa, te prikazani kao vrijednost % RSD (*engl.* relative standard deviation), koja se izračuna primjenom izraza:

$$\%RSD = \frac{SD}{AVG} * 100$$

Gdje su:

SD - standardna devijacija n mjerenja,

AVG - srednja vrijednost n mjerenja.

Također je određena i intermedijarna preciznost uzastopnim analizama istog uzorka tijekom 3 dana (uz 5 uzastopnih mjerenja u danu, n=15), odnosno praćenjem retencijskog vremena i površine pikova te računanjem % RSD. Za određivanje intermedijarne preciznosti, promjena analitičkih uvjeta uključivala je rad više analitičara, odnosno pripremu svježe mobilne faze (kritična točka analize) svaki dan analize prema prethodno definiranom postupku.

S obzirom da HPLC analizi prethodi derivatizacija uzorka, ponovljivost i intermedijarna preciznost određena je i za paralelno pripremljene uzorke smjese standarada (u triplikatu), tj. za sam postupak derivatizacije.

S obzirom na primjenu internog standarda u ovoj metodi, relativne standardne devijacije (% RSD) izračunate su za apsolutne vrijednosti retencijskog vremena i površine te relativne vrijednosti retencijskog vremena i površine, u odnosu na interni standard, za svaki analit.

#### *Točnost*

Točnost se može definirati kao bliskost slaganja neke konvencionalno točne vrijednosti ili prihvaćene referentne vrijednosti i izmjerene vrijednosti, odnosno kao stupanj podudarnosti rezultata dobivenih primjenom metode i očekivanih točnih rezultata (ICH, 2005). Točnost metode može se odrediti na više načina:

- 1) usporedbom rezultata dobivenih nekom metodom s rezultatima dobivenima primjenom etablirane referentne metode,
- 2) analizom uzoraka poznate koncentracije te usporedbom dobivenih rezultata s točnim očekivanim rezultatima, pri čemu je uzorak poznate koncentracije:
  - a) kontrolni ili certificirani referentni uzorak
  - b) poznati uzorak u kojeg je dodana određena poznata količina analita.

U ovome radu točnost metode određena je dodavanjem poznate količine analita (monosaharida) u poznati uzorak alkoholno netopljivog ostatka ljuške kakaovog zrna (CBH). Uzorak ljuške kakaovog zrna izabran je kao referentni uzorak jer sadrži sve monosaharide od interesa. Uzorak alkoholno-netopljivog ostatka pripremljen je ekstrakcijskim postupkom kako je opisano u poglavlju 3.2.2.1.2. Suhi uzorak alkoholno netopljivog ostatka podvrgnut je hidrolizi

sumpornom kiselinom pri povišenoj temperaturi (uz prethodnu predhidrolizu), kako je opisano u poglavlju 3.2.3.5.2, a prije hidrolize u uzorak je dodan interni standard riboza (400 µg/mL u uzorku). U pripremljeni uzorak (neutralizirani hidrolizat) dodane su poznate količine svih monosaharida (za čije određivanje je optimirana HPLC metoda) u tri različite koncentracije (konačne koncentracije u uzorku):

- 1) 25 µg/mL - manoz, ramnoza, glukuronska kiselina, ksiloza, galaktoza, arabinoza i fukoza te 100 µg/mL - glukoza i galakturonska kiselina (najzastupljeniji šećeri u hidrolizatu CBH)
- 2) 50 µg/mL - manoz, ramnoza, glukuronska kiselina, ksiloza, galaktoza, arabinoza i fukoza te 200 µg/mL - glukoza i galakturonska kiselina (najzastupljeniji šećeri u hidrolizatu CBH)
- 3) 75 µg/mL - manoz, ramnoza, glukuronska kiselina, ksiloza, galaktoza, arabinoza i fukoza te 300 µg/mL - glukoza i galakturonska kiselina (najzastupljeniji šećeri u hidrolizatu CBH).

Novi (s dodanim monosaharidima) uzorci te izvorni uzorak derivatizirani su u triplikatu, a dobiveni derivati analizirani su razvijenom HPLC-PDA metodom. Rezultati su obrađeni programom Excel, Microsoft Office 2013 paketa, a točnost metode izračunata je usporedbom određenih vrijednosti koncentracije monosaharida u analiziranim novim uzorcima (koji sadrže dodane standarde monosaharida) s očekivanom, teorijski uvećanom vrijednosti koncentracije monosaharida u istima. Rezultati točnosti metode izraženi su kao postotak od očekivane točne vrijednosti, s pripadajućom vrijednosti relativne standardne devijacije (% RSD).

### 3.2.3.6 Karakterizacija neugljikohidratnog dijela strukturnih polisaharida

#### 3.2.3.6.1 Određivanje stupnja metilacije i acetilacije

Određivanje stupnja metilacije i acetilacije primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti uz refrakcijsku detekciju (HPLC-RID) provedeno je prema metodi laboratorija Paroi Végétale et Polysaccharides Pariétaux 725-LA2-MO-MET-2004-288 Francuskog nacionalnog instituta za istraživanja u poljoprivredi (INRA, Centar Angers-Nantes, BIA), adaptiranoj prema radu Levigne i suradnika (2002b).

#### Princip metode:

Saponifikacijom uzoraka u lužnatom mediju dolazi do oslobađanja esterski vezanih metilnih i acetilnih skupina koje se određuju primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti s refrakcijskom detekcijom (HPLC-RID) uz interni standard izopropanol.

### Postupak rada:

Odvaže se  $5,0 \pm 0,5$  mg uzorka u Eppendorf epruvetu od 2 mL te se doda 0,5 mL otopine bakrova sulfata pentahidrata ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) koncentracije 1 mg/mL, u koju je dodan izopropanol u koncentraciji 0,7 mg/mL, a zatim i 0,5 mL otopine natrijeva hidroksida (NaOH) koncentracije 1 M. Epruvete se začepi, dobro promiješaju na vorteksu i drže pri 4 °C (u hladnoj komori) tijekom 1 h (uz intenzivno miješanje na vorteksu svakih 10 min). Saponificirani uzorci zatim se propuste kroz kationski izmjenjivač u  $\text{H}^+$  formi (Alltech® Maxi Clean™ IC-H kolone, 0,5 mL (Grace Davison Discovery Sciences, SAD) preko šprice (prethodno se izmjenjivač ispiri s 10 mL deionizirane vode te se posuši istiskivanjem suvišne vode) te se filtrat skuplja u posudice za uzorkovanje (HPLC vials). Svrha filtriranja kroz IC-H kolone je uklanjanje suviška bakrovih iona te precipitiranog pektina. Zbog visoke hlapivosti metanola, octene kiseline i izopropanola, cijeli postupak potrebno je provoditi pri niskoj temperaturi (u hladnoj komori, pri 4 °C).

Osim uzoraka, na jednak način priprema se i otopina standarada; u Eppendorf epruvetu od 2 mL otpipetira se 0,25 mL vodene otopine standarda metanola (MeOH) koncentracije 0,8 mg/mL te 0,25 mL vodene otopine standarda octene kiseline (AcA) koncentracije 0,8 mg/mL, a zatim i 0,5 mL vodene otopine  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  koncentracije 1 mg/mL, u kojoj se nalazi interni standard, izopropanol, u koncentraciji 0,7 mg/mL (koncentracija standarada metanola i octene kiseline iznosi 0,2 mg/mL, dok koncentracija izopropanola (internog standarda) iznosi 0,35 mg/mL i istovjetna je koncentraciji izopropanola u uzorcima). Saponifikacija, kao i za uzorke, traje 1 h uz miješanje na vorteksu svakih 10 min, nakon čega se uzorak standarda filtrira kroz IC-H kolonu.

Uzorci i standardi analiziraju se HPLC uređajem opremljenim autosamplerom (Waters 717 plus autosampler, Waters; SAD), pumpom (Waters 590, Waters; SAD), termostatom kolone, kolonom LiChrospher® 100 RP-18e (5  $\mu\text{m}$ ) LiChroCART® 250-4 (Merckmilipore, SAD) i refrakcijskim (*engl.* refraction index - RI) detektorom (Waters 2414, Waters; SAD). Elucija se provodi izokratno 4 mM otopinom  $\text{H}_2\text{OS}_4$  pri 1 mL/min, uz temperaturu kolone 15 °C i volumen injektiranih uzoraka 20  $\mu\text{L}$ . Vrijeme analize je 25 min. Upravljanje uređajem i obrada kromatograma omogućeni su programom Chromeleon™ v. 6.8 Chromatography Data System (Thermo Fisher, SAD).

### Izračun rezultata:

Identifikacija pikova metanola i octene kiseline u uzorcima provedi se usporedbom retencijskih vremena s kromatogramom smjese standarada. Kvantifikacija identificiranih pikova provodi se internim standardom, prema formuli kako je navedeno u poglavlju 0.

Stupanj metilacije (DM) i/ili acetilacije (DA) pektina izračuna se kao molarni omjer metanola, odnosno octene kiseline u uzorku i poligalakturonata, prema izrazima:

$$m_{GalUA} = m_{sample} * \%GalUA$$

$$\%DM = \frac{m_{MeOH}}{M_{MeOH}} * \frac{M_{GalUA}}{m_{GalUA}} * 100$$

$$\%DA = \frac{m_{AcA}}{M_{AcA}} * \frac{M_{GalUA}}{m_{GalUA}} * 100$$

uz:  $M_{MeOH} = 32$  g/mol;  $M_{AcA} = 60$  g/mol;  $M_{GalUA} = 176$  g/mol.

Pritom je potrebno prethodno odrediti udjel GalUA.

Određivanje stupnja metilacije i acetilacije provedeno je u triplikatu, a rezultati su izraženi kao stupanj metilacije (DM) i stupanj acetilacije (DA) ili kao maseni udjeli metila ili acetila u suhoj tvari odgovarajućeg uzorka te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

#### 3.2.3.6.2 Određivanje vezanih fenolnih kiselina

Vezane fenolne kiseline određene su prema metodi 1268-MO-MET-2015 laboratorija Paroi Végétale et Polysaccharides Pariétaux Francuskog nacionalnog instituta za istraživanja u poljoprivredi (INRA, Centar Angers-Nantes, BIA), adaptiranoj prema radu Waldron i suradnika (1996).

##### Princip metode:

Deesterifikacija (saponifikacija) vezanih fenolnih kiselina u lužnatom mediju nakon čega se iste pročišćavaju i ekstrahiraju organskim otapalom te analiziraju primjenom HPLC-UV metode. Preduvjet određivanja vezanih fenolnih kiselina je prethodna ekstrakcija materijala s obzirom na slobodne fenolne kiseline (priprema AIR uzorka, v. poglavlje 3.2.3.5.1).

##### Postupak rada:

Odvaži se  $20,0 \pm 1,0$  mg suhog uzorka (za pretpostavljen udjel vezanih fenolnih kiselina 1-5 %) u prozirne laboratorijske epruvete s navojnim čepom (12 mL, Pyrex®, Corning, SAD) te se doda 2 mL 2 M otopine natrijeva hidroksida (NaOH). Epruvete se stave u vodenu kupelj zagrijanu pri 35 °C, epruvete se odčepe, a na vrh se postavi nastavak za dovod dušika (lagana struja plina, u digestoru) kako bi se stvorila inertna atmosfera na površini. Epruvete se zaštite od svjetla aluminijskom folijom. Deesterifikacija traje 30 min, nakon čega se dodaje 0,2 mL internog standarda (otopina 3,4,5-trihidroksi-*trans*-cinaminske kiseline (TMCA, 96 %, American Custom Chemicals Corporation; SAD) u 0,2 M NaOH (koncentracija TMCA 0,5 mg/mL), smjesa se dobro promiješa na vorteksu, a epruvete se zatim centrifugiraju (5804 R, Eppendorf; Njemačka; 3000 x g pri 20 °C) kako bi se odvojio netopljivi materijal te se za daljnji

postupak izuzima alikvot 1 mL supernatanta. Supernatant se zakiseli dodatkom 1 mL 2 M otopine klorovodične kiseline (HCl), nakon čega se provjerava pH otopine (indikatorskim trakicama u području 0-7 (Macherey-Nagel; Njemačka)) koji treba biti vrijednosti 2,0. Postizanje pH 2 je vrlo važno budući da se pri tom pH oslobođene kiseline nalaze u protoniranom obliku što je važno za njihovu kasniju ekstrakciju u organsko otapalo. U otopinu se zatim dodaje 3 mL etil-etera, smjesa se intenzivno promiješa pomoću vorteksa, a separacija faza ubrza se centrifugiranjem (5804 R, Eppendorf; Njemačka; 3000 x g pri 20 °C). Gornja organska faza pažljivo se prebaci u čiste epruvete od tamnog stakla, a otapalo se otpari u digestoru u struji dušika uz zagrijavanje do najviše 40 °C (vodena kupelj). Suhi ekstrakt resuspendira se u 1 mL 50 %-tnog metanola te prenese u posudice za uzorkovanje (HPLC vials) od tamnog stakla.

Kod analize topljivih uzoraka, odvaže se  $10 \pm 0,5$  mg uzorka te se isti otope u 0,9 mL 2 M NaOH, a nakon nakon 30 min saponifikacije dodaje se 0,1 mL internog standarda (TMCA 0,5 mg/mL u 0,2 M NaOH) te se nastavi postupak kako je prethodno opisano. Za tekuće uzorke se pipetira točno 0,9 mL uzorka te se dodaje 1 mL 4 M NaOH, a nakon 30 min saponifikacije dodaje se 0,1 mL internog standarda (TMCA 0,5 mg/mL u 0,2 M NaOH) i dalje slijedi protokol kako je prethodno opisano.

HPLC-UV analiza fenolnih kiselina provodi se kromatografijom obrnutih faza na HPLC uređaju koji se sastoji od autosamplera (Dionex AS, Thermo Fisher Scientific; SAD), kvaterne pumpe (Dionex UltiMate™ 3000, Thermo Fisher Scientific; SAD), termostata kolone te UV detektora (Spectra SYSTEM UV2000, Thermo Separation Products; SAD), i koloni Vision HT C18 HL (4,6 x 250 mm, 5 $\mu$ m). Elucija se provodi gradijentno dvokomponentnom mobilnom fazom (A - acetonitril; B - natrij-acetat pufer pH 4,6 (4,5 g natrijeva acetata trihidrata otopiti u 700 mL vode, dodati 2,2 mL koncentrirane octene kiseline, provjeriti pH i nadopuniti do 1 L)), a gradijent je uspostavljen prema sljedećem: 0. min - 15 % A, 85 % B; 5. min - 15 % A, 85 % B; 20. min - 25 % A, 75 % B; 20,5. min - 15 % A, 85 % B; 25. min - 15 % A, 85 % B. Protok mobilne faze iznosi 1 mL/min, temperatura kolone 30 °C, a volumen injektiranog uzorka 20  $\mu$ L. Kromatogrami se dobivaju snimanjem efluenta u UV području, pri 280 i 320 nm. Upravljanje instrumentom te obrada kromatograma omogućeni su programom Chromeleon (Thermo Fisher Scientific; SAD).

#### Izračun rezultata:

Identifikacija se provodi usporedbom relativnih retencijskih vremena (u odnosu na interni standard) pikova na kromatogramima uzorka i smjese standarda. Smjesa standarda sadržava fenolne kiseline od interesa i interni standard u koncentraciji koja se koristi pri analizi uzoraka

(*trans*-ferulinska (> 99 %, Sigma-Aldrich; Njemačka) i *p*-kumarinska kiselina (> 98 %, Sigma-Aldrich; Njemačka) u koncentraciji 100 µg/mL, uz TMCA kao interni standard (100 µg/mL)) te se podvrgava postupku jednako kao i uzorak (tretira se kao tekući uzorak). Kvantifikacija se provodi internim standardom, prema formuli kako je navedeno u poglavlju 0.

Analiza vezanih fenolnih kiselina provedena je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao maseni udjeli u suhoj tvari (% s.tv.) sekundarne biljne sirovine ili analizirane polisaharidne frakcije, odnosno kao molarni omjer specifične fenolne kiseline i anhidro oblika određenog/određenih šećernih monomera u uzorku (stupanj feruloilacije, DF - analogno opisanom izračunu za određivanje stupnja metilacije/acetilacije u poglavlju 3.2.3.6.1) te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

### 3.2.3.7 Analiza glikozidnih veza strukturnih polisaharida

Glikozidne veze u molekulama polisaharida određene su metodom permetilacije prema internom protokolu Francuskog nacionalnog instituta za istraživanja u poljoprivredi (INRA, Centar Angers-Nantes, BIA, laboratorij Paroi Végétale et Polysaccharides Pariétaux), koji je pripremljen prema radu Anumula i Taylor-a (1992).

#### Postupak rada:

Uzorci topljivih polisaharida pripremljeni su kao vodene otopine koncentracije ~0,8 mg/mL i kvantitativno su propuštene preko jakog kationskog izmjenjivača. U tu svrhu, korištene su Poly-Prep® (Bio Rad; SAD) kromatografske kolone za niskotlačnu ili gravitacijsku kromatografiju koje se pune (1 mL) Dowex 50WX4 jakim kationskim izmjenjivačem u H<sup>+</sup> formi (Dow Chemicals; Njemačka). Svrha ionske izmjene u ovome slučaju je postizanje kisele (deprotonirane) forme polisaharida za potrebe daljnje analize. Uzorak se propušta kap po kap u tikvicu s okruglim dnom (25 mL) postavljenu na dnu kolone te se ispiru vodom (u dvostukom volumenu uzorka). Uzorak u tikvici uparava se do suhoga pomoću rotacijskog vakuum uparivača (R-200, Büchi; Njemačka) pri najviše 40 °C. Upareni uzorak pažljivo se kvantitativno prenese s 4 x 0,25 mL demineralizirane vode u epruvete s navojnim čepom (12 mL, Pyrex®, Corning; SAD). Uzorci se zatim suše liofilizacijom (LYO GT2 Basic, SRK System Technik; Njemačka). U osušene uzorke (te ostale netopljive uzorke odvage ~0,8 mg) dodaje se 1 mL dimetilsuloksida (DMSO, bezvodni, min. 99,9 %, Sigma Aldrich; Njemačka) te se uzorci zagrijavaju pri 80 °C u vodenoj kupelji tijekom 1 h uz povremenu sonikaciju od nekoliko minuta u ultrazvučnoj kupelji (Elmasonic S 10H, Elma Schmidbauer GmbH; Njemačka) kako bi se pospiješilo otapanje uzoraka (pogotovo izvorno netopljivih). Uzorci se zatim postupno hlade na sobnu temperaturu tijekom idućih približno 20 min. U ohlađene uzorke



dodaje se 1 mL prethodno svježe pripremljenog metilsulfil karbaniona (priprema je opisana zasebno u nastavku teksta) te 0,5 mL metil jodida ( $\text{CH}_3\text{I}$ , > 99 %, Sigma-Aldrich; Njemačka), epruvete se dobro začepi i intenzivno miješaju na vorteksu uz povremenu sonikaciju tijekom 5-7 min pri sobnoj temperaturi. Zatim se dodaje još 0,25 mL  $\text{CH}_3\text{I}$  te se postupak ponovi. S obzirom na hlapivost i toksičnost metil jodida, postupak se provodi uz propisane zaštitne mjere. U uzorke se zatim dodaje 2 mL demineralizirane vode i 2 mL kloroforma u svhu ekstrakcije permetiliranih polisaharida, epruvete se ponovno začepi i dobro promiješaju, a centrifugiranjem (5804 R, Eppendorf; Njemačka; 3000 x g pri 20 °C) se pospešuje razdvajanje faza. Gornja vodena faza odvaja se u otpad, a donja organska dodatno se ispiri s 3 x 2 mL vode uz miješanje i centrifugiranje kako je opisano. Nakon ispiranja, sloj kloroforma otparava se do suhoga u struji dušika i pri 40 °C (vodena kupelj) u digestoru.

Otpareni uzorci hidroliziraju se trifluoroctenom kiselinom (TFA, min. 99 %, Sigma-Aldrich; Njemačka) te se derivatiziraju do alditol acetata, koji su u ovom slučaju djelomično metilirani alditol acetati (*engl.* partially methylated alditol acetates - PMAAs). U tu svrhu, u epruvete sa suhim uzorcima, dodaje se 0,4 mL vode i 0,1 mL internog standarda *myo*-inozitola (otopina koncentracije 0,5 mg/mL), a zatim i 0,5 mL 4 N trifluoroctene kiseline (TFA), nakon čega se epruvete zatvore, dobro promiješaju i stave u termoblok (QBH2, Grant Instruments; Ujedinjeno Kraljevstvo) pri 120 °C tijekom 2,5 h. Nakon kiselinske hidrolize, epruvete se hlade, a TFA se otparuje na rotacijskom vakuum uparivaču (R-200, Büchi; Njemačka) pri najviše 40 °C. Suhi ostatak ispiri se s 0,5 mL vode koja se također otpari. Isprani suhi talog u epruveti reducira se borhidridom te acetilira acetanhidridom, kako je prethodno opisano u poglavlju 3.2.3.5.4, uz modifikaciju da se alkalizacija uzorka prije redukcije provodi na način da se suhi talog dobro resuspendira u 50  $\mu\text{L}$  vode te se doda jedna kap 3 N otopine amonijaka, a pH (> 9) se provjeri izuzimanjem kapljice uzorka vrhom nastavka za pipetu (provjeri se na mjestu distinktivne promjene boje na pH indikatorskoj trakici). Nakon derivatizacije, PMAA se ekstrahiraju u diklormetanu (Sigma-Aldrich; Njemačka) i prenose u posudice za uzorkovanje (GC vials) te hermetički zatvaraju „crimp“ tehnikom.

GC-MS analiza provedena je u laboratoriju BIBS platforme Francuskog nacionalnog instituta a istraživanja u poljoprivredi (INRA BIA UR1268 Biopolymers Interactions Assemblies, Platform BIBS, INRA, F-44300 Nantes, Francuska) prema etabliranoj metodi i uz stručno vodstvo inženjera u laboratoriju. Pritom je korišten GC-MS uređaj Trace-GC-ISQ Thermo™ (Thermo Fisher Scientific; SAD) s nepolarnom TraceGOLD™ TG-1MS GC (30m x 0,25mm, 0,25 $\mu\text{m}$ ) kolonom (Thermo Fisher Scientific, SAD). Mobilnu fazu činio je  $\text{H}_2$  pri protoku 1,5 mL/min. Uzorci su injektirani pri temperaturi 240 °C. Temperaturni program analize bio je

postavljen kako slijedi: izotermno pri 60 °C (0-5 min), zatim je temperatura podignuta do 315 °C (3 °C/min) te je zadržana pri 315 °C daljnje 2 min. Temperatura izvora elektrona u detektoru bila je 230 °C. Mase su dobivene skeniranjem u rasponu m/z 100 do 500. Upravljanje GC-MS uređajem te obrada kromatograma omogućeni su specijaliziranim programom Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, SAD).

#### *Priprema metilsulfinil karbaniona:*

U 0,1 mL 50 %-tne vodene otopine NaOH (415413, Sigma-Aldrich; Njemačka) dodaje se 0,2 mL metanola te se smjesa dobro promiješa na vorteksu. Zatim se pažljivo dodaje 6 mL DMSO dok se NaOH-MeOH smjesa nalazi u suspenziji (na vorteksu). Tako dobivena smjesa centrifugira se pri 10 000 o/min i sobnoj temperaturi tijekom 10 min (3K30 - rotor 12150, Sigma; Njemačka), nakon čega se supernatant DMSO skupi u otpad, a talog se resuspendira u 6 mL svježeg DMSO te se postupak ponovi kako je opisano. Ispiranje s DMSO provodi se ukupno 3 puta. Nakon ispiranja, talog se dobro resuspendira u 2 mL DMSO te se koristi kao fina suspenzija (potrebno dobro promiješati prije svake primjene). Karbanion je potrebno za svaku analizu svježe pripremiti.

#### Izračun rezultata:

Identifikacija PMAAs provedena je usporedbom relativnih retencijskih vremena (u odnosu na interni standard) s istima u internoj bazi podataka (platforma BIBS, INRA BIA) te na temelju masenog spektra fragmenata.

Relativni udjel pojedinog PMAA, a time i odgovarajuće glikozidne veze, izračunat je kao omjer površine pika određenog PMAA te ukupne površine svih identificiranih pikova te u odnosu na odgovarajući odzivni faktor (u odnosu na interni standard), prema internom predlošku izračuna (platforma BIBS i PVPP laboratorij, INRA BIA).

#### 3.2.3.8 Analiza veličine topljivih polisaharida ekskluzijskom kromatografijom

Analiza veličine i mase topljivih polisaharida provedena je prema internom protokolu Francuskog nacionalnog instituta za istraživanja u poljoprivredi (INRA, Centar Angers-Nantes, BIA, laboratorij Paroi Végétale et Polysaccharides Pariétaux) ekskluzijskom kromatografijom (*engl.* high-performance size-exclusion chromatography - HPSEC).

#### Postupak rada:

Uzorci topljivih polisaharida otopljeni su u vodi u koncentraciji ~3 mg/mL te im je izmjeren pH pomoću pH indikatorskih trakica za pH područje 0-14 (Macherey-Nagel; Njemačka). Vrijednosti pH podešene su na 5-6 (osobito vrijedi za uzorke pektina) dodatkom malog volumena (5-50 µL, ovisno o početnom pH, kao i vrsti uzorka) 0,05 M litijeva hidroksida

(LiOH), kako bi se spriječilo stvaranje aglomerata koji interferiraju sa stvarnim rezultatima. Uzorci su zatim profiltrirani kroz mikrofiltere veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  (CA25/45, Macherey-Nagel; Njemačka), a u slučaju jako viskoznih otopina korišteni su Whatman® GD/X polipropilenski mikrofilteri veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich; Njemačka). Filtrirani uzorci sakupljeni su u posudice za uzorkovanje (HPLC vials).

Size-exclusion analiza uz multidetekciju provedena je na HPLC uređaju sastavljenom od autosamplera (Series 200 Autosampler, Perkin Elmer; SAD), pumpe (PU-1580, Jasco Corporation; Japan) te serijski povezanih refrakcijskog (RI) detektora (Viscotek RI Detector (VE-3580), Malvern Panalytical; Ujedinjeno Kraljevstvo), viskozimetra, „light-scattering“ detektora (Viscotek 270 Dual Detector, Malvern Panalytical; SAD) i UV detektora (LDC SpectroMonitor 3000, Milton Roy; SAD) podešenog na 280 nm te HPLC kolone Shodex™ OHPak SB-805 HQ (Showa Denko K.K.; Japan). Mobilnu fazu činila je 50 mM otopina natrijeva nitrata, protok je bio podešen na 0,813 mL/min; temperatura kolone iznosila je 22 °C, a volumen injektiranog uzorka 50  $\mu\text{L}$ . Upravljanje instrumentom te obrada kromatograma omogućeni su programom OmniSEC 4.7.0 (Malvern Panalytical; Ujedinjeno Kraljevstvo).

#### Izračun rezultata:

Sustav je kalibriran s obzirom na dekstran (T 73K, čistoća 100 %, MW 73253 Da, Mn 58341 Da, IVw (0,268), dn/dc 0,147) i pululan (P 73K, čistoća 100 %, MW 72812 Da, Mn 68283 Da, IVw (0,343), dn/dc 0,147) (Malvern Panalytical; Ujedinjeno Kraljevstvo).

Podaci distribucije molekulskih masa u obliku srednje brojčane molekulske mase Mn (*engl.* number average molecular weight), srednje masene molekulske mase Mw (*engl.* weight average molecular weight) te unutrašnje (intrinzičke) viskoznosti dobiveni su kao izlazni parametri analize nakon računalne obrade kromatograma. Faktor polidisperzije (*engl.* polydispersity factor) izračunat je kao omjer Mw i Mn vrijednosti. Osim toga, izračunata je i relativna zastupljenost pojedine populacije kao omjer RI signala (površina ispod pika) u odnosu na ukupnu površinu, s obzirom da je RI signal proporcionalan koncentraciji.

### **3.2.4 Frakcioniranje polisaharida stanične stijenke**

Frakcijsko izdvajanje polisaharida odabranih sekundarnih sirovina provedeno je na prethodno ekstrahiranim (70 %-tni EtOH) - AIR uzorcima.

#### 3.2.4.1 Izdvajanje pektina

Izdvajanje pektinskih tvari provedeno je prema radu Sun i Hughes (1998), uz manje modifikacije.

### Opis postupka:

Odvaže se  $20,0 \pm 1,0$  g AIR uzorka u laboratorijsku staklenu bocu (1000 mL, Duran; Njemačka) te se doda 500 mL (1:25 w/v) otopine HCl, pH = 1,5 (otopina se prethodno pripremi u dostatnom volumenu zakiseljavanjem demineralizirane vode klorovodičnom kiselinom (4 M), pri čemu se postizanje željene pH vrijednosti prati pomoću pH-metra (FiveEasy™ FE20 s LE409 elektrodom, Mettler Toledo, Švicarska); koncentracija HCl je približno 0,03 M. Pripremljena smjesa (u začepljenim bocama) stavi se u vodenu kupelj zagrijanu pri 90 °C, a ekstrakcija se provodi tijekom 2 h, uz povremeno miješanje. Nakon ekstrakcije, boce se kratko ohlade u hladnoj vodi te se njihov sadržaj filtrira na Büchnerovom lijevku s Whatman No.4 filter papirom, pomoću vakuuma. Kolač na filteru, koji predstavlja depektiniziranu sirovinu, ispire se s 250 mL tople demineralizirane vode, kako bi se uklonio zaostali pektin, a voda od ispiranja združi se s izvornim pektinskim ekstraktom (filtratom). Pektin se iz ekstrakta izdvaja precipitacijom etanolom u omjeru 1:4 (voda:etanol, v/v). Smjesa se ostavi u hladnjaku pri 4 °C tijekom 2 h kako bi se maksimalno potaknula precipitacija, a nakon toga se precipitat filtrira na Büchnerovom lijevku s Whatman No.4 filter papirom, pomoću vakuuma. Po potrebi se pektinski ekstrakt prije precipitacije može upariti na rotacijskom vakuum uparivaču (Heidolph; Njemačka) pri najviše 50 °C (u svrhu uštede utroška etanola). Talog pektina kvantitativno se resuspendira u 40 mL demineralizirane vode na magnetskoj mješalici (RO 5, IKA, Njemačka). Resuspendirani pektin kvantitativno se prenosi u prethodno pripremljene membrane za dijalizu (Cellu Sep T2, nominal MWCO 6000 - 8000 Da; 7,96 mL/cm; Membrane Filtration Products Inc.; SAD). U svrhu pripreme, tubularna membrana se izreže na odgovarajuću duljinu (ovisno o volumenu koji se dijalizira, procijenjenom volumenu vode koji će povratno ući u membranu, specificiranim dimenzijama membrane te uzimajući u obzir prostor za zatvaranje membrane) te se dobro opere iznutra i izvana vrućom vodom, a zatim i demineraliziranom vodom. Membrana se zatvori na jednom kraju čvrstim čvorom, a nakon punjenja se istisne višak zraka se te zatvori i drugi kraj membrane prikladnom stezaljkom. Puna membrana u potpunosti se uroni u plastičnu posudu volumena 5 L ispunjenu demineraliziranom vodom i stavi na magnetsku mješalicu (Wise Stir SM HS-6, Wise; Njemačka) i lagano miješanje. Dijaliza se prati mjerenjem provodljivosti izvanmembranske tekućine (permeata) pomoću prijenosnog konduktometra sa sondom (Cond 330i, WTW; Njemačka). Permeat se izmjenjuje ovisno o postignutim vrijednostima provodljivost, u početku češće (svakih nekoliko sati), kasnije rjeđe, kako bi se osigurao stalan koncentracijski gradijent. Broj izmjena permeata ovisi o volumenu dijalizata (tekućina unutar membrane) i koncentraciji otopljenih tvari, a o tome ovisi i ukupno trajanje dijalize. Dijaliza se provodi dok se ne postigne stalna vrijednost provodljivosti

permeata, bliska početnoj vrijednosti provodljivosti demineralizirane vode prije same dijalize. Nakon završetka, dijalizirani sadržaj kvantitativno se prenese u tikvicu s okruglim dnom ili u velike Petrijeve zdjelice (koje se pokrivaju izbušenim plastičnim poklopcima) te zamrzne pri -80 °C. Po potrebi se dijalizirani sadržaj centrifugira prije zamrzavanja (ako se uočavaju neotopljene čestice). Ovako pripremljeni uzorci suše se liofilizacijom (FreeZone 1, Labconco; SAD).

Talog depektiniziranog materijala dodatno se ispiri demineraliziranom vodom dok se ne postigne pH vrijednost oko 4, a zatim se suši izmjenom otapala. U tu svrhu talog se ispiri 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 se odvaja filtracijom pomoću vakuuma. Budući da se radi o lako hlapivim i zapaljivim otapalima, postupak je potrebno izvoditi u digestoru. Isprani talog se nakon zadnjeg ispiranja prebaci u plitku posudu velike ishlapne površine (tako da se u istoj nalazi u što tanjem sloju), prekrije se staničevinom te se ostavi u digestoru dok sav aceton ne ishlapi. Dobiveni suhi depektinizirani uzorak dodatno se homogenizira u tarioniku (ili mlinicu za kavu) i koristi kao početni materijal u daljnjem postupku frakcioniranja.

#### Izračun rezultata:

Ekstrakcija pektina provedena je u duplikatu, a prinos je izračunat gravimetrijski na temelju poznate mase posude za liofilizaciju te mase uzorka s posudom nakon sušenja te preračunat na maseni udjel (% s.tv.) u suhoj tvari sekundarne biljne sirovine, uzimajući u obzir gubitak mase (suhe tvari) tijekom etanolne (70 %) ekstrakcije.

#### 3.2.4.2 Delignifikacija

Delignifikacija depektiniziranih sirovina provedena je prema prema protokolu predloženom u radu Kumar i suradnika (2013), uz modifikacije.

Postupak je neophodno izvoditi dobro ventiliranom prostoru zbog razvoja para klorova dioksida koji ima nadražujuće djelovanje, a otpadne kemikalije potrebno je zbrinuti na adekvatan način, pazeći pritom da se ne miješaju s drugim potencijalno reaktivnim kemikalijama.

Odvaži se  $15,0 \pm 1,0$  g osušenog i usitnjenog depektiniziranog materijala u staklene laboratorijske boce (1000 mL, Duran; Njemačka) te se doda 480 mL demineralizirane vode (1:32 w/v), prethodno zagrijane na 70 °C (volumen izmjeriti pri sobnoj temperaturi), a zatim i 9 g natrijeva klorita ( $\text{NaClO}_2$ ) (0,6 g/g uzorka) te 9 mL ledene octene kiseline ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (0,6 mL/g uzorka). Sadržaj boce dobro se promiješa te se boca začepi (čep se ne zavrne do kraja) i stavi u termostatiranu vodenu kupelj pri 70 °C. Smjesa se inkubira pri navedenoj temperaturi

tijekom 2 h, uz često ručno miješanje (lagana vrtnja) boce kako bi se održala homogenost reakcijske smjese. Tijekom delignifikacije dodavani su svježi obroci natrijeva klorita i ledene octene kiseline u jednakoj količini kao i na početku, a prihranjivanje je provedeno u razmacima od 30 min. Broj dodanih novih obroka određen je s obzirom na prethodno određene udjele lignina (Tablica 23).

Tablica 23. Raspored prihranjivanja reaktantima prilikom delignifikacije sekundarnih biljnih sirovina.

Uzorak	Ukupan broj obroka	Vrijeme dodavanja (min)
Pulpa šećerne repe	1	0
Ljuska oraha	4	0, 30, 60, 90
Ljuska kakaovog zrna	4	0, 30, 60, 90
Ljuska crvenog luka	1	0
Mahuna graška	2	0, 60

Tijekom delignifikacije ovom metodom, karakterističan je razvoj klorova dioksida žuto-zelene boje, dok materijal postaje bijele boje zbog oksidacijskog učinka klorova dioksida i efekta izbjeljavanja.

Nakon završene delignifikacije, boce se ohlade na sobnu temperaturu u hladnoj vodenoj kupelji, a njihov sadržaj se filtrira (u dobro ventilirnom prostoru!) na Büchnerovom lijevku s Whatman No.4 filter papirom, pomoću vakuuma. Talog na filteru (holoceluloza) ispiru se demineraliziranim vodom do neutralnog pH (otprilike s ukupno 250 mL vode, raspoređeno u nekoliko obroka, a po potrebi i više, dok se ne postigne željeni pH). Filtrat od ispiranja se baca, a isprani talog suši se izmjenom otapala. U tu svrhu talog se ispiru 2 puta s 150 mL 96 %-tnog etanola i zatim s 100 mL acetona. Prilikom svakog ispiranja potrebno je dobro resuspendirati talog u otapalu, a između ispiranja uzorak se odvaja filtracijom pomoću vakuuma. Budući da se radi o lako hlapivim i zapaljivim otapalima, postupak je potrebno izvoditi u digestoru. Isprani talog se nakon zadnjeg ispiranja prebaci u plitku posudu velike ishlapne površine tako da se nalazi u što tanjem sloju, prekrije se staničevinom te ostavi u digestoru dok sav aceton ne ishlapi. Suhi uzorak holoceluloze po potrebi se dodatno homogenizira u tarioniku ili mlincu za kavu te se koristi kao početni materijal u daljnjem postupku izdvajanja hemiceluloze.

### 3.2.4.3 Izdvajanje hemicelulozne frakcije

Izdvajanje hemiceluloznih tvari iz delignificiranih sirovina provedeno je prema radu Rabetafika i suradnika (2014), uz modifikacije.

Odvaže se  $10,0 \pm 0,5$  g delignificiranog materijala u laboratorijske staklene boce (250 mL, Duran; Njemačka), doda se 200 mL 2 M otopine natrijeva hidroksida (NaOH) (1:20 (w/v)) te se ekstrakcija provodi na magnetskoj mješalici pri sobnoj temperaturi tijekom 4 h. Po završetku alkalne ekstrakcije, sadržaj se filtrira preko Büchnerovog lijevka s Whatman No.4 filter papirom, pomoću vakuuma, a talog se ispiri s 2 x 50 mL demineralizirane vode. Voda od ispiranja združuje se s izvornim ekstraktom. Alkalni ekstrakt neutralizira se polaganim dodavanjem (kap po kap) koncentrirane klorovodične kiseline, uz miješanje, do pH vrijednosti 6,0. Hemiceluloza se iz neutraliziranog ekstrakta izdvaja precipitacijom etanolom (96 %) u omjeru 1:4 (v/v), uz snažno miješanje. Nakon dodatka etanola (približno 1200 mL, ovisno o konačnom izmjerenom volumenu neutraliziranog ekstrakta), smjesa se dobro promiješa i ostavi u hladnjaku pri 4 °C tijekom 2 h kako bi se maksimalno potaknula precipitacija hemiceluloznih polisaharida iz otopine. Po potrebi se neutralizirani ekstrakt može upariti pomoću rotacijskog vakuum uparivača pri najviše 50 °C, kako bi se smanjio utrošak etanola. Precipitat hemiceluloze kvantitativno se filtrira na Büchnerovom lijevku s Whatman No.4 filter papirom, a talog se ispere s dva obroka po 15 mL 78 %-tnog etanola te 15 mL 96 %-tnog etanola. Izdvojena hemiceluloza kvantitativno se resuspendira u 40 mL vode demineralizirane vode i kvantitativno prebaci u prethodno pripremljenu dijalizacijsku membranu. Dijaliza se provodi kako je opisano u prethodnom poglavlju ekstrakcije pektina (3.2.4.1).

Prilikom neutralizacije alkalnog ekstrakta hemiceluloze, može se dogoditi zamućenje otopine uslijed precipitacije netopljivih čestica pri novim uvjetima u otopini, a postojanje netopljive frakcije još je vidljivije nakon dijalize. U tom slučaju se dijalizat hemiceluloze centrifugira pri 8000 o/min i sobnoj temperaturi (model SL 8R s HIGHConic III s Fixed Angle 6x50 mL rotorom, Thermo Scientific; SAD), a supernatant i talog tretiraju se kao zasebni uzorci, tj. topljiva i netopljiva hemiceluloza. Kao i u slučaju pektina, uzorci hemiceluloze zamrzavaju se pri -80 °C (talog netopljive hemiceluloze ostaje u Falcon konusnim epruvetama (50 mL) za centrifugiranje, dok se supernatant zamrzava u tikvicama s okruglim dnom prikladnog volumena ili širokim Petrijevim zdjelicama) i suše liofilizacijom (FreeZone 1, Labconco; SAD).

#### Izračun rezultata:

Alkalna ekstrakcija hemiceluloze prvedena je u duplikatu, a prinos je izračunat gravimetrijski nakon liofilizacije te preračunat na maseni udjel (% s.tv.) u suhoj tvari sekundarne biljne sirovine, uzimajući u obzir gubitak mase delignifikacijom, gubitak mase depektinizacijom te gubitak mase etanolnom (70 %) ekstrakcijom.

#### 3.2.4.4 Formiranje celuloznog ostatka

Talog nakon ekstrakcije hemiceluloze, dodatno se ispiri dok se ne postigne neutralna pH vrijednost (ili blizu neutralne). Talog se suši izmjenom otapala; u tu svrhu ispiri se 2 puta s 50 mL 96 %-tnog etanola i zatim s 50 mL acetona. Prilikom svakog ispiranja potrebno je dobro resuspendirati talog u otapalu, a između ispiranja uzorak se odvaja filtracijom pomoću vakuuma. Budući da se radi o lako hlapivim i zapaljivim otapalima, postupak je potrebno izvoditi u digestoru. Isprani talog se nakon zadnjeg ispiranja prebaci u plitku posudu velike ishlapne površine, prekrije se staničevinom te ostavi sušiti u digestoru dok sav aceton ne ishlapi.

Prinos celuloznog ostatka izračunat je gravimetrijski na temelju poznate mase posude za sušenje te mase uzorka s posudom nakon sušenja, te preračunat na udjel u početnoj masi sirovine (% s.tv.) uzimajući u obzir gubitak mase alkalnom ekstrakcijom, delignifikacijom, depektinizacijom te etanolnom (70 %) ekstrakcijom. S obzirom da su alkalne ekstrakcije provedene u duplikatu, također je i određivanje udjela celuloznog ostatka provedeno u duplikatu.

### 3.2.5 Optimizacija izdvajanja pojedinih polisaharidnih frakcija

#### 3.2.5.1 Optimizacija izdvajanja ksilana

Optimizacija izdvajanja ksilana provedena je na uzorcima ljuske oraha i mahune graška na temelju prethodno opisanog postupka frakcioniranja (poglavlje 3.2.4). Promjena parametara u svrhu optimizacije prinosa hemicelulozne frakcije provedena je u koracima delignifikacije i alkalne ekstrakcije, dok je prethodna priprema materijala (70 % etanolna ekstrakcija i depektinizacija), kao i formiranje celuloznog ostatka provedeno kako je prethodno upisano (poglavlja 3.2.2.1.2 i 3.2.4.1), s time da etanolni i pektinski ekstrakti nisu dalje iskorištavani.

Tablica 24 prikazuje parametre optimizacije delignifikacije i alkalne ekstrakcije.

U delignifikaciji je korišteno korišteno 5 g depektiniranog uzorka, dok u alkalnoj ekstrakciji 2 g. Volumeni korištenih otapala i reagenasa također su proporcionalno smanjeni (prema zadanim omjerima korištenima u inicijalnom postupku). Delignifikacija je provedena u 2 razine ukupnog trajanja postupka te ukupne količine dodanih reaktanata za svaki uzorak, a dobivena holoceluloza (D2h i D4h za WS te D1h i D2h za PP, Tablica 24) je nakon temeljitog ispiranja vodom sušena izmjenom otapala. U alkalnoj ekstrakciji korišten je dodatak natrijeva borhidrida ( $\text{NaBH}_4$ , min. 98 %, Sigma Aldrich; Njemačka) u koncentraciji 20 mM (u otapalu definirane koncentracije KOH), kako bi se spriječila oksidativna depolimerizacija krajeva polimera. S obzirom na dodatak  $\text{NaBH}_4$ , neutralizacija ukupnog alkalnog ekstrakta provedena je ledenom



octenom kiselinom, umjesto klorovodičnom kiselinom, uz hlađenje. Neutralizacija je izvođena polagano i uz obavezno polagano miješanje s obzirom na prisutnost pjene na površini tekućine uslijed oslobađanja plinovitih produkata, a koja može otežati kontakt s kiselinom kao i mjerenje pH. Neutralizirani ekstrakt dijaliziran je uz demineraliziranu vodu, a nakon odvajanja netopljive frakcije centrifugiranjem, topljiva hemiceluloza je precipitirana dodatkom četverostrukog volumena 96 %-tnog etanola. Topljiva i netopljiva hemiceluloza sušene su liofilizacijom (FreeZone 1, Labconco; SAD). Osim ekstrakcije holoceluloze, tj. prethodno delignificiranih uzoraka, alkalna ekstrakcija provedena je i na nedelignificiranim uzorcima (nedelignificirani uzorci (oznaka D-, Tablica 24) pripremljeni su ekstrakcijom 70 %-tnim etanolom i depektinizacijom, kako je prethodno opisano).

Prinosi hemiceluloznih frakcija prilikom optimizacije ekstrakcije ksilana određeni su gravimetrijski te su izraženi kao maseni udjel u suhoj tvari (% s.tv.) sekundarne biljne sirovine, uzimajući u obzir prilikom izračuna gubitke mase iz svih prethodnih ekstrakcija. Optimizacija za svaku kombinaciju optimizacijskih parametara provedena je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

Tablica 24. Parametri optimizacije ekstrakcije ksilana iz ljuske oraha (WS) i mahune graška (PP).

Izmijenjeni parametri	INICIJALNO		OPTIMIZACIJA							
	Uzorak	WS	PP	WS	PP	WS	PP	WS	PP	
<b>Reaktanti</b>	NaClO <sub>2</sub> + HAc; 0,6 g (mL)/g uzorka (1 obrok)									
<b>Temperatura</b>	70 °C									
<b>Delignifikacija</b>	<b>Ukupno trajanje reakcije (h)</b>	2	2	2	4	1	2			
	<b>Prihranjivanje (broj obroka)</b>	4 - svakih 30'	2 - svakih 60'	2 - svakih 60'	4 - svakih 60'	1	2 - svakih 60'			
<b>Oznaka uzoraka</b>	-	-	D2h	D4h	D1h	D2h	D-	D-		
<b>Alkalna ekstrakcija</b>	<b>Otopalo</b>	2M NaOH		2M KOH + 20mM NaBH <sub>4</sub> 4M KOH + 20mM NaBH <sub>4</sub>						
	<b>Temperatura</b>	sobna								
	<b>Trajanje reakcije (h)</b>	4								
	<b>Oznaka uzoraka</b>	-	-	WS D2h_2M D2h_4M	WS D4h_2M D4h_4M	PP D1h_2M D1h_4M	PP D2h_2M D2h_4M	WS D-_2M D-_4M	PP D-_2M D-_4M	

### 3.2.5.2 Optimizacija izdvajanja pektina

#### 3.2.5.2.1 Predtretman ultrazvukom visokog intenziteta

Ultrazvuk visokog intenziteta korišten je kao predtretman konvencionalnoj metodi ekstrakcije pektina opisanoj u postupku frakcioniranja strukturnih polisaharida (poglavlje 3.2.4.1).

Prethodno etanolom (70 %) ekstrahirani uzorci pulpe šećerne repe, ljuske kakaovog zrna i ljuske crvenog luka (AIR uzorci) pomiješani su s otopinom klorovodične kiseline (pH 1,5) u omjeru 1:25 (w/v) (korišteno je 5 g uzorka te 125 mL otapala, pomiješano u laboratorijskoj staklenoj boci od 250 mL) te su odmah tretirani ultrazvukom visokog intenziteta. Pritom je korišten uređaj (Ultraschallprozessor UP 400s, Hielscher GmbH; Njemačka) normirane maksimalne snage 400 W i frekvencije 24 kHz te sonda promjera 7 mm koja se uranjala do polovice volumena tretirane smjese. Uređaj je radio pri amplitudi od 100 % i u punom ciklusu rada (kontinuirani rad ultrazvuka), a predtretman je trajao 5 ili 10 min. Predtretman ultrazvukom nije proveden u termostatiranim uvjetima te je svakih 1 min očitavana temperatura smjese pomoću laserskog termometra, uključujući početak i kraj predtretmana. Porast temperature je bio nelinearan, a konačna temperatura za predtretman u trajanju od 5 min iznosila je u prosjeku 48°C (za sve tri sirovine), a za predtretman od 10 min, 57,5°C. Nakon završenog predtretmana, boce s tretiranim uzorcima su začepljene te uronjene u vodenu kupelj u kojoj se provodila daljnja ekstrakcija pektina pri 90 °C tijekom 2 h, kako je prethodno opisano (poglavlje 3.2.4.1).

Prinos pektinskih frakcija određen je gravimetrijski nakon liofilizacije pektinskih ekstrakata te izražen kao udjel u suhoj tvari sekundarne biljne sirovine (% s.tv.). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom. Ekstrakcija pektina uz pomoć predtretmana ultrazvukom visokog intenziteta provedena je u duplikatu.

S obzirom da se ultravučna snaga raspršuje kroz toplinsku energiju (Režek Jambrak i sur., 2010), apsorbirana akustična snaga (P) izračunata je iz izraza (Margulis i Margulis, 2003; Režek Jambrak i sur., 2010):

$$P(W) = m * c_p * \frac{dT}{dt}$$

Gdje su:

m - ukupna masa tretiranog uzorka (g),

$c_p$  - specifični toplinski kapacitet medija (za vodu: 4,183 J/gK),

$dT/dt$  - promjena temperature u jedinici vremena (nagib pravca ovisnosti temperature o vremenu; K/s).

Intenzitet (I) i gustoća ( $\delta$ ) snage izračunati su prema izrazima:

$$I \left( \frac{W}{m^2} \right) = \frac{P}{A}$$

$$\delta \left( \frac{W}{m^3} \right) = \frac{P}{V}$$

Gdje su:

A - površina poprečnog presjeka ultrazvučne sonde (cm<sup>2</sup>),

V - volumen tretiranog uzorka (cm<sup>3</sup>).

### 3.2.5.2.2 Primjena kelirajućeg sredstva

Ekstrakcija pektina kelirajućim sredstvom etilendiaminotetraoctenom kiselinom (EDTA) provedena je na uzorku ljuske crvenog luka prema modificiranom postupku Renard i Thibaulta (1993).

#### Priprema 50 mM acetatnog pufera (Na-Ac) pH 4,6:

Za pripremu 1 L 50 mM acetatnog pufera pH 4,6 precizno se odvaži 2,01 g natrij-acetata i otopi u približno 900 mL demineralizirane vode. Otopini se doda 1,5 mL octene kiseline uz miješanje te se pripremljenom puferu precizno izmjeri pH (EasyFive™ FE20, Mettler Toledo, Švicarska). Po potrebi se pH podesi na željenu vrijednost dodavanjem vrlo male količine koncentrirane octene kiseline ili pripremljene otopine natrijeva hidroksida, 5 M (nekoliko kapi). Volumen pufera podesi se do 1 L u odmjernoj tikvici.

#### Priprema 50 mM fosfatnog (Na-Ph) pufera pH 7,0:

Za pripremu 1 L 50 mM fosfatnog pufera pH 7,0 precizno se odvaži 3,22 g natrijeva dihidrogenfosfata dihidrata i 4,33 g dinatrijeva hidrogenfosfata koji se otope u približno 900 mL demineralizirane vode. Otopini se izmjeri pH pomoću pH metra (EasyFive™ FE20, Mettler Toledo, Švicarska), koji se po potrebi podesi na željenu vrijednost dodavanjem male količine koncentrirane fosforne kiseline ili natrijeva hidroksida. Konačni volumen pripremljenog pufera podesi se u odmjernoj tikvici (1 L).

#### Postupak rada:

Ekstrakcija pektina iz ljuske crvenog luka pomoću EDTA (dinatrijeva sol dihidrat, Kompleksal III, Kemika; Hrvatska) provedena je pri dvije različite pH vrijednosti otapala i pri dvije temperature. U ekstrakciji je korišteno 2 g AIR uzorka ljuske crvenog luka koji se odvaži u laboratorijske boce od 250 mL (za ekstrakciju pri povišenoj temperaturi) ili u staklene čaše od 100 mL (za ekstrakciju pri sobnoj temperaturi) te se uzorku doda 50 mL otapala (odgovarajući pufer s dodatkom EDTA (100 mM; u izračunu potrebne mase EDTA uračunata je korekcija za vodu (dihidrat)). Ekstrakcija pri povišenoj temperaturi provodi se pri 90 °C u začepljenim bocama (kako bi se spriječilo isparavanje otapala) uz periodično ručno miješanje smjese (polagana vrtnja boce); odnosno u poklopljenim čašicama na magnetskoj mješalici (RO 5, IKA;

Njemačka) pri sobnoj temperaturi. Trajanje ekstrakcije u oba slučaja iznosi 2 h. Nakon isteka vremena, sadržaj boca/čaišica kvantitativno se filtrira na Büchnerovom lijevku s Whatman No.4 filter papirom, pomoću vakuuma, a talog na filteru ispiri se s 25 mL odgovarajućeg pufera bez EDTA. Isprani talog kvantitativno se prenosi natrag u bocu/času te se ekstrakcija prema opisanom postupku ponovi tijekom sljedeća 2 h.

Dobiveni pektinski ekstrakti (filtrati) nakon 1. i 2. ekstrakcije kvantitativno se združe, precizno se izmjeri konačni volumen te se ukupnom ekstraktu doda 4 puta veći volumen 96 %-tnog etanola (etanol se dodaje polako uz istovremeno miješanje otopine). Smjesa se ostavi u hladnjaku pri 4 °C tijekom noći kako bi se maksimalno potaknula precipitacija pektinskih tvari. Dobiveni precipitati kvantitativno se filtriraju na Büchnerovom lijevku s Whatman No. 1 filter papirom, pomoću vakuuma, te se ispiru smjesom vode i etanola (1:4 (v/v)). U svrhu lakšeg izdvajanja precipitata, pred kraj filtracije može se koristiti i centrifuga (SL8 R s HIGHConic III s Fixed Angle rotorom, Thermo scientific; SAD; 10', 20 °C, 9000 o/min) kako bi se uklonilo što više otapala. Dobiveni talog pektinskih precipitata resuspendira se u najmanjem volumenu potrebnom za njegovo potpuno otapanje, što ovisi o korištenim uvjetima ekstrakcije i prinosu pektina (50 - 100 mL). Pritom treba paziti da otopina ne bude previskozna. Otopljeni pektin dijalizira se uz demineraliziranu vodu kako je prethodno opisano (poglavlje 3.2.4.1). Nakon dijalize, s obzirom da se volumen dijalizata uveća uslijed ulaska vode unutar tubularne membrane, pektinski ekstrakt se upari na roacijskom vakuum uparivaču (Heidolph; Njemačka) pri najviše 50 °C i tlaku 100 mbar, radi uštede vremena liofilizacije. Upareni ekstrakt suši se liofilizacijom (FreeZone 1, Labconco; SAD).

Isprani talog ljuske crvenog luka nakon ekstrakcije pektina suši se izmjenom otapala. U tu svrhu, talog se ispiri 2 puta s 40 mL 96 %-nog etanola i zatim s 40 mL acetona. Pritom je važno dobro resuspendirati uzorak u odgovarajućem otapalu. S obzirom da se radi o lako hlapivim i zapaljivim otapalima, cjelokupni postupak potrebno je izvoditi u digestoru. Nakon zadnjeg ispiranja, talog se prebaci u plitku posudu velike ishlapne površine (u što tanjem sloju), prekrije se staničevinom te ostavi u digestoru dok sav aceton ne ishlapi.

Tablica 25 prikazuje uvjete ekstrakcije pektina iz ljuske crvenog luka tijekom postupka optimizacije iste. Za svaki set eksperimentalnih uvjeta, ekstrakcija je provedena u duplikatu.

Prinos pektina iz ljuske crvenog luka te prinos ostatka nakon ekstrakcije određeni su gravimetrijski nakon liofilizacije pektinskih ekstrakata i sušenja ostatka nakon ekstrakcije izmjenom otapala. Prinosi su izraženi kao maseni udjel u suhoj tvari sekundarne biljne sirovine (% s.tv.) te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

Tablica 25. Parametri optimizacije ekstrakcije pektina iz ljuske crvenog luka kelirajućim sredstvom

Otopalo	Parametri ekstrakcije			Oznaka eksperimenta	Uzorak/oznaka
	Temperatura (°C)	Trajanje (h)	Ponovljena ekstrakcija		
50 mM Na-Ac pufer pH 4,6 + 100 mM EDTA	25	2	2 puta	A-25	pektin/ A-25_P ostatak/ A-25_R
	90	2	2 puta	A-90	pektin/ A-90_P ostatak/ A-90_R
50 mM Na-Ph pufer pH 7,0 + 100 mM EDTA	25	2	2 puta	P-25	pektin/ P-25_P ostatak/ P-25_R
	90	2	2 puta	P-90	pektin/ P-90_P ostatak/ P-90_R

### 3.2.5.3 Ponovljeno frakcioniranje polisaharida pulpe šećerne repe

Ponovljeno frakcioniranje polisaharida pulpe šećerne repe provedeno je prema protokolima razvijenima u laboratoriju Paroi Végétale et Polysaccharides Pariétaux Francuskog nacionalnog instituta za istraživanja u poljoprivredi (INRA, Centar Angers-Nantes, BIA).

#### 3.2.5.3.1 Izdvajanje pektinskih frakcija

U ponovljenom frakcioniranju polisaharida pulpe šećerne repe, pektinske frakcije izdvojene su sukcesivnim ekstrakcijama alkoholno-netopljivog ostataka amonijevim oksalatom pri 2 pH vrijednosti: 4,6 i 3,0.

##### *Ekstrakcija amonijevim oksalatom pri pH 4,6*

Otopalo za ekstrakciju pripravljeno je kao 0,25 %-tna otopina amonijske oksalata kojoj je pH vrijednost podešana na 4,6 dodavanjem 0,2 M otopine oksalne kiseline, uz praćenje na pH-metru (FiveEasy™ FE20, Mettler Toledo, Švicarska).

Pomiješa se 12 g suhog uzorka (AIR) s 480 mL otopala (1:40 w/v) u laboratorijskoj staklenoj boci (500 mL, Duran, Njemačka) te se smjesa zagrijava pri 40 °C tijekom 30 min uz miješanje na magnetnoj miješalici, kako bi se suhi materijal rehidrirao. Nakon toga, smjesa se zagrijava pri 85 °C u vodenoj kupelji dodatnih 30 min, uz redovito miješanje, ručno. Smjesa se nakon toga ohladi do ~40 °C te se filtrira preko najlonske tkanine (11 µm) i lijevkastog filtera od sinteriranog stakla (deklarirana oznaka poroziteta G3). Talog s filtera kvantitativno se prenese ponovno u laboratorijsku bocu te se ponovi ekstrakcija pri 85 °C, uz izmjenu da je dodano manje otopala nego u prvoj ekstrakciji, 360 mL (1:30 w/v), s obzirom da je materijal u ponovljenoj ekstrakciji vlažan. Ovaj postupak ponovi se ukupno 2 puta. Filtrati nakon svake ekstrakcije združe se u jedinstveni pektinski ekstrakt, a talog nakon trostuke ekstrakcije ispere

se s 3 x 360 mL demineralizirane vode. Ispiranje pektina iz taloga potrebno je provoditi sve dok je kontrola na prisutnost galakturonske kiseline (određuje se analizom prema MHDP metodi kako je opisano u poglavlju 3.2.3.5.5) pozitivna, i/ili dok se ne ukloni sav amonijev oksalat iz uzorka. S obzirom na prvo navedeno, u 2. i 3. ispiranju nije bilo značajne koncentracije galakturonske kiseline te je samo filtrat 1. ispiranja združen s pektinskim ekstraktom, međutim, 3 ispiranja su bila potrebna za uklanjanje rezidualnog amonijskog oksalata. Ukupni pektinski ekstrakt upari se do ~100 mL na rotacijskom vakuum uparivaču (R-200, Büchi, Njemačka) pri 40 °C te se istome precizno izmjeri volumen pomoću menzure. Pektin iz ekstrakta kvantitativno se precipitira dodatkom četverostrukog volumena 96 %-tnog hladnog etanola, uz stalno miješanje, a pektinski precipitat u etanolu ostavi se preko noći pri 4 °C, kako bi se maksimalno potaknula precipitacija. Pektinski precipitat izdvoji se filtracijom pomoću najlonske tkanine (11 µm) i sinter lijevka (G4) te se ispiru ponovnim resuspendiranjem u 400 mL vodene otopine etanola otopine 1:4 (v/v) na magnetnoj miješalici. S obzirom na moguću otežanu filtraciju, precipitat se može izdvojiti i centrifugiranjem (3K30 - rotor 12150, Sigma; Njemačka) pri 8000 o/min i 4 °C tijekom 15 min. Ispiranje pektina provodi se ukupno 3 puta. Talog ispranog pektina otopi se u približno 25 mL demineralizirane vode na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi te se otopina postavi na dijalizu u Cellu Sep T2 (nominalna MWCO (*engl.* molecular weight cut-off) 6000 - 8000 Da; 7,96 mL/cm) dijalizacijske membrane (Membrane Filtration Products Inc.; SAD) kako je prethodno opisano (poglavljje 3.2.4.1). Dijaliza se provodi uz demineraliziranu vodu te izmjenu ukupnog volumena permeata (5 L) svakih 2-3 h do uspostave inicijalne vodljivosti izmjerene u čistoj demineraliziranoj vodi. Dijalizirana otopina pektina kvantitativno se prenese u tikvicu s okruglim dnom, zamrzne se i osuši liofilizacijom (LYO GT2 Basic, SRK System Technik; Njemačka).

Ekstrahirani materijal sušen je izmjenom otpala. U tu svrhu temeljito je ispran s 2 x 200 mL 96 %-tnog EtOH te 1 x 200 mL acetona (dobro resuspendirati materijal u otapalu te ga odvojiti filtracijom), a potom je prebačen u staklenu posudu velike ishlapne površine i ostavljen u digestoru (prekriti staničevinom) kako bi sav aceton ishlapio. Ekstrakcija amonijskim oksalatom pri pH 4,6 provedena je u triplikatu.

#### *Ekstrakcija amonijskim oksalatom pri pH 3,0*

Otapalo za ekstrakciju pripremljeno je kao 0,25 %-tna otopina amonijskog oksalata kojoj je pH vrijednost podešena na 3,0 dodavanjem 0,2 M otopine oksalne kiseline, uz praćenje na pH-metru.

Ekstrakcija amonijskim oksalatom pri pH 3,0 provedena je analogno prethodno opisanoj ekstrakciji pri pH 4,6.

### Izračun rezultata:

Prinosi pektina određeni su gravimetrijski iz razlike mase prije i nakon sušenja liofilizacijom, a izraženi su kao udjeli u suhoj tvari (% s.tv.) sekundarne biljne sirovine, uzimajući u obzir gubitak mase ekstrakcijom 70 %-tnim etanolom (priprema AIR uzorka), kao i gubitak mase ekstrakcijom pektina pri pH 4,6 (u slučaju prinosa pektina ekstrahiranog pri pH 3,0). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

#### *3.2.5.3.2 Izdvajanje hemiceluloznih frakcija*

##### *Ekstrakcija litijevim-kloridom - dimetilsulfoksidom (LiCl -DMSO)*

Ekstrakcija LiCl-DMSO (litijev klorid-dimetilsulfoksid) provedena je prema radu Ray i suradnika (2014).

Kao otapalo u ekstrakciji korištena je 8,4 %-tna otopina LiCl u DMSO, a pripremljena je dodavanjem 84 g LiCl u prethodno izmjerenih 1000 mL DMSO (u staklenoj tamnoj boci) uz intenzivno miješanje na magnetskoj miješalici do potpunog otapanja (preko noći).

Pomiješa se 5 g suhog uzorka (depektinizirani materijal) s 1000 mL LiCl-DMSO otapala (1:200 w/v) te se smjesa stavi u kupelj zagrijanu pri 100 °C. Ekstrakcija se provodi tijekom 5 h uz konstantno miješanje pomoću magnetske miješalice i pod strujom N<sub>2</sub> koja se dovodi na površinu tekućine. Nakon ekstrakcije, ekstrakt se izdvaja filtracijom na sinter lijevku (deklariranog poroziteta G4, Pyrex®; Ujedinjeno Kraljevstvo). Talog na filteru ispire se s 50 mL svježeg DMSO, a filtrat od ispiranja združuje se s izvornim filtratom (ekstraktom). Ekstrakt hemiceluloze uparava se u digestoru pomoću rotacijskog vakuum uparivača (R-200, Büchi, Njemačka), pri 70 °C, dok se ne dobije gusta smjesa s kristaliziranim LiCl-om. Uparenom ekstraktu dodaje se 200 mL demineralizirane vode, precizno se izmjeri ukupni volumen, smjesa se prebaci u staklenu bocu odgovarajućeg volumena te se doda četverostruki volumen hladnog 96 %-tnog etanola uz miješanje. Precipitacija se odvija pri 4 °C (u hladnjaku/hladnoj sobi) tijekom 3 h. Nakon toga, smjesa se filtrira ili centrifugira (6-16 KS, Sigma; Njemačka; 8000 o/min, 15 min, 4 °C), a talog se ispire s ukupno 500 mL vodene otopine etanola (1:4 (v/v)), u nekoliko obroka). Nakon ispiranja, talog hemiceluloze se ostavi u digestoru kako bi etanol ishlapio. Zatim se talog otopi u malom volumenu demineralizirane vode (20-30 mL) te se postavi na dijalizu uz demineraliziranu vodu, kako je prethodno opisano (v. poglavlje 3.2.4.1). Dijalizirana otopina hemiceluloze suši se liofilizacijom (LYO GT2 Basic, SRK System Technik; Njemačka).

Inicijalni filtrat/supernatant nakon precipitacije (etanolna otopina) te filtrat/supernatant od ispiranja precipitata združuju se i uparavaju do malog volumena, a zatim i dijaliziraju uz



demineraliziranu vodu kao i kod pripreme drugih polisaharidnih frakcija. Dijalizirana otopina suši se liofilizacijom (LYO GT2 Basic, SRK System Technik; Njemačka).

Talog nakon LiCl-DMSO ekstrakcije suši se izmjenom otapala. U tu svrhu ispiru se s 2 x 100 mL 96 %-tnog EtOH i 1 x 100 mL acetona (važno je dobro resuspendirati talog u otapalu) i nakon svakog ispiranja izdvaja filtracijom, a nakon ispiranja acetoma suši se u digestoru u staklenoj posudi velike ishlapne površine (dok sav aceton ne ishlapi). Po potrebi se nakon sušenja materijal dodatno homogenizira u tarioniku s tučkom.

#### *Frakcioniranje hemicelulozne frakcije ionskom izmjenom*

Ionska izmjena provedena je pomoću DEAE (*engl.* diethylaminoethyl) -Sepharose Fast Flow slabog anionskog izmjenjivača (GE Healthcare Life Sciences; Ujedinjeno Kraljevstvo).

Anionskom smolom puni se preparativna kolona XK26/20 za nisko ili srednjetlačnu kromatografiju (GE Healthcare Life Sciences; Ujedinjeno Kraljevstvo) na način da se prvo izmjeri radni volumen kolone, a zatim i jednak volumen (zapravo nešto veći, toliko da je sloj smole u mirovanju zadovoljava radni volumen kolone) anionske smole. Smola se zatim dobro ispere demineraliziranom vodom (s otprilike 500 mL vode, u nekoliko obroka, te se potom kondicionira na radni pufer (25 mM natrij-acetatni pufer, pH 4,5) ispiranjem u puferu (2 x 100 mL) i degazira pomoću vakuuma (suspencija u puferu). Degazirana smola pažljivo se ulije u vertikalno postavljenu kolonu i ostavi preko noći da se smola dobro slegne uslijed djelovanja gravitacije. Kad se dobije ravnomjeran i kompaktan sloj smole u koloni, spoji se izlaz kolone na peristaltičku pumpu (Minipuls 3 s yellow-blue kanalićima; Gilson; Ujedinjeno Kraljevstvo) te se pod malim potokom izvuče suvišak pufera na vrhu kolone (paziti da smola ne ostane suha). Zatim se pažljivo postavi klip - namjesti se do linije sloja smole te se kolona čvrsto zatvori. Kolona se spoji na peristaltičku pumpu tako da pumpa dovodi mobilnu fazu na vrh kolone.

Uzorak hemiceluloze (najviše 200 mg) otopi se u koncentraciji približno 10 mg/mL te se nanese na kolonu pri protoku 1,5 mL/min. U isto vrijeme se skuplja efluent na dnu kolone u menzuru. Nakon nanošenja uzorka, kolona se eluira puferom (25 mM natrij-acetatni pufer, pH 4,5) s najmanje 2-2,5 volumena kolone (približno 160 - 200 mL) protokom 1,5 mL/min. Pritom treba paziti da je eluent (pufer) prethodno degaziran kako se u sustavu ne bi pojavljivali mjehurići plina, odnosno kako bi protok kroz kolonu bio jednoličan. Sakupljena neutralna frakcija hemiceluloze u efluentu uparava se do malog volumena pomoću rotacijskog vakuum uparivača (R-200, Büchi; Njemačka) te suši liofilizacijom (LYO GT2 Basic, SRK System Technik; Njemačka). Kisela frakcija hemiceluloze, vezana na ionskom izmjenjivaču, eluira se 1 M otopinom natrijeva klorida (NaCl) u puferu (otopinu prethodno degazirati) s najmanje 6

volumena kolone (približno 480 mL) pri protoku 1,5 mL/min. Sakupljeni efluent kisele frakcije uparava se do malog volumena, dijalizira se uz demineraliziranu vodu te se suši liofilizacijom.

#### *Alkalne ekstrakcije*

Alkalne ekstrakcije provode se na ekstrahiranom ostatku nakon LiCl-DMSO ekstrakcije.

Za ekstrakciju se koristi 2,0 g suhog usitnjenog uzorka koji se miješa s otapalom (1 M KOH ili 4 M KOH, oba s dodatkom 20 mM NaBH<sub>4</sub>) u omjeru 1:400 (w/v) u laboratorijskoj boci ili Erlenmeyer tikvici od 2 L. Prvo se provodi ekstrakcija s 1 M KOH, a zatim i s 4 M KOH. Ekstrakcija 1 M KOH + 20 mM NaBH<sub>4</sub> provodi se tijekom 17 h pri sobnoj temperaturi, uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici. Nakon ekstrakcije, smjesa se filtrira preko najlonske tkanine (11 µm) i sinter lijevka (G4). Izdvojeni filtrat/ekstrakt neutralizira se dodatkom ledene octene kiseline do pH 6,0, uz hlađenje u smjesi vode i leda i uz praćenje promjene pH vrijednosti na pH metru (FiveEasy™ EF20, Mettler Toledo, Švicarska). Neutralizaciju je potrebno izvoditi polako zbog nastanka pjene. Ostatak nakon filtracije ponovno se ekstrahira prema opisanome, ali u trajanju od 1 h. Izdvojeni ekstrakt neutralizira se octenom kiselinom, kako je opisano, a oba neutralizirana ekstrakta se združe i uparavaju pomoću rotacijskog vakuum uparivača (R-200, Büchi, Njemačka) do volumena ~100 mL. Ekstrahirani materijal nakon ponovljene ekstrakcije resuspendira se u 4 M KOH s dodatkom 20 mM NaBH<sub>4</sub>, u omjeru 1:400 (w/v), te se ponovi ekstrakcija u trajanju 17 h i pri sobnoj temperaturi. Ekstrakt se izdvoji filtracijom i zatim se neutralizira octenom kiselinom. Ekstrahirani materijal još jednom se ekstrahira istim otapalom (4 M KOH + 20 mM NaBH<sub>4</sub>) u trajanju 1 h, a ekstrakt nakon ponovljene ekstrakcije također se neutralizira i združi s izvornim 4 M KOH ekstraktom, a potom i upari na rotacijskom vakuum uparivaču do ~400 mL. Upareni ekstrakti (1 M i 4 M) dijaliziraju se uz demineraliziranu vodu (dijalizat znatno povećava volumen tijekom dijalize pa je potrebno ostaviti dovoljno prostora u membrani) te se suše liofilizacijom (LYO GT2 Basic, SRK System Technik; Njemačka). Ostatak nakon uzastopnih alkalnih ekstrakcija ispiru se s 2 x 100 mL 0,1 M octene kiseline i također se suši liofilizacijom. Tablica 26 prikazuje popis frakcija izdvojenih u ponovljenom frakcioniranju polisaharida pulpe šećerne repe.

#### Izračun rezultata:

Prinosi hemiceluloznih frakcija određeni su gravimetrijski iz razlike ulaznih i izlaznih masa tijekom sušenja liofilizacijom, a izraženi su kao udjeli u suhoj tvari (% s.tv.) sekundarne biljne sirovine, uzimajući u obzir gubitak mase ekstrakcijom 70 %-tnim etanolom (priprema AIR uzorka) te sve prethodne evidentirane gubitke mase, tj. sve ekstrakcijske korake koji su

prethodili. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

Tablica 26. Frakcije izdvojene u ponovljenom postupku frakcioniranja polisaharida pulpe šećerne repe.

	Otopalo	Oznaka uzorka	Opis
Pektinske frakcije	AO*, pH 4,6	P1	Precipitirani pektin
	AO, pH 3,0	P2	Precipitirani pektin
Hemicelulozne frakcije	LiCl-DMSO	H1	Precipitirana hemiceluloza
	LiCl-DMSO-EtOH	H1_EtOHs	Hemiceluloza u filtratu nakon etanolne precipitacije
	1 M KOH + 20 mM NaBH <sub>4</sub>	H2	Hemiceluloza dobivena liofilizacijom
	4 M KOH + 20 mM NaBH <sub>4</sub>	H3	Hemiceluloza dobivena liofilizacijom
Ostatak		C	Ostatak nakon provedenih ekstrakcija

\*AO - amonijev oksalat (0,25 % (w/v))

### 3.2.6 Parcijalna hidroliza izdvojenih polisaharidnih frakcija

#### 3.2.6.1 Enzimska hidroliza ksilana do ksilooligosaharida

Parcijalna enzimska hidroliza do oligosaharida provedena je na topljivim i netopljivim hemiceluloznim podfrakcijama izdvojenima iz ljuske oraha (WS) i mahune graška (PP). Pritom je korišten enzim *endo*-1,4- $\beta$ -ksilanaza iz *Neocallimastix patriciarum* (Megazyme; Irska), aktivnosti 10 000 U/mL (jedinica U definirana je kao količina enzima potrebna za otpuštanje 1  $\mu$ mol ekvivalenata reducirajućeg šećera ksiloze po minuti iz arabinoksilana iz pšenice (5 mg/mL) u 100 mM fosfatnom puferu pri pH 6,0). Navedeni enzim nasumično hidrolizira  $\beta$ -(1,4) glikozidnu vezu kojim su međusobno povezane jedinice ksiloze u molekuli ksilana, oslobađajući tako ksilooligosaharide. Uzorci topljivog i netopljivog ksilana ljuske oraha i mahune graška otopljeni su (resuspendirani) u 100 mM natrij-fosfatnom puferu pH 6,0 u koncentraciji koja odgovara 10 mg/mL ksilana (ukupne ksiloze - anhidro oblik) u svakom uzorku (stvarna količina svakog uzorka bila je različita s obzirom na različit udjel ukupne ksiloze u pojedinom uzorku). Količina ksilanaze za hidrolizu izračunata je na temelju koncentracije ukupne ksiloze u reakcijskoj smjesi te pretpostavljenom vremenu hidrolize od 1 h, potrebnom za teorijsku potpunu razgradnju ksilana, što je predstavljalo aktivnost od 0,13

U/mg ksilana u uzorku, odnosno koncentraciju enzima 1xE. Također su upotrijebljene i deseterostruko (10xE) i stostruko veća (100xE) koncentracija enzima, što je odgovaralo aktivnostima od 1,3 U/mg ksilana u uzorku, odnosno 13 U/mg ksilana u uzorku. Hidroliza je provedena pri 40 °C u termobloku s miješanjem (Eppendorf Thermomixer® C, Eppendorf; Njemačka) te su izuzimani uzorci hidrolizata u određenim vremenskim razmacima, u kojima su kvalitativno i kvantitativno određeni ksilooligosaharidi. Tablica 27 sažeto prikazuje parametre enzimske hidrolize.

Tablica 27. Parametri enzimske hidrolize (*endo*-1,4- $\beta$ -ksilanazom) netopljive (ntH) i topljive (tH) hemiceluloze iz ljuske oraha i mahune graška, izdvojenih pri optimalnim uvjetima ekstrakcije ksilana.

Ljuska oraha - tH i nH	Koncentracija supstrata													10 mg/mL*							
	Temperatura hidrolize																	40 °C			
	Koncentracija enzima		1xE (0,13 U/mgS**)				10xE (1,3 U/mgS**)				100xE (13 U/mgS**)										
	Vrijeme hidrolize		10'	1h	24h	1h	3h	6h	24h	10'	30'	45'	1h	24h							
Mahuna graška - tH i nH	Koncentracija supstrata													10 mg/mL*							
	Temperatura hidrolize																	40 °C			
	Koncentracija enzima		1xE (0,13 U/mgS**)				10xE (1,3 U/mgS**)				100xE (13 U/mgS**)										
	Vrijeme hidrolize		10'	1h	24h	1h	3h	6h	24h	10'	1h	24h									

\* koncentracija ukupne ksiloze u uzorku ksilana

\*\*S-supstrat - ukupna ksiloza

Izdvojeni alikvoti hidrolizata (200  $\mu$ L) uronjeni su u kipuću vodu (100 °C) te ostavljeni da ključaju tijekom 5 min kako bi se toplinski denaturirali enzimi, a time i zaustavila hidroliza. Ohlađeni hidrolizati čuvani su pri -20 °C do analize.

### 3.2.6.2 Enzimska hidroliza pektina do oligogalakturonida

Pektinski oligosaharidi (POS) u obliku oligogalakturonida (OGaU) dobiveni su hidrolizom pektina iz pulpe šećerne repe (SBP), ljuske crvenog luka (OP) i ljuske kakaovog zrna (CBH) prema modificiranoj metodi Babbar i suradnika (2016a). Hidroliza pektina iz ljuske kakaovog zrna i ljuske crvenog luka provedena je pomoću enzima *endo*-poligalakturonaze M2 (ePG-M2) iz *Aspergillus aculeatus* (EC 3.2.1.15, Megazyme; Irska), aktivnosti 650 U/mL, koji hidrolizira  $\alpha$ -(1,4)-glikozidne veze između jedinica galakturonske kiseline u molekuli pektina. Za hidrolizu pektina iz pulpe šećerne repe do oligogalakturonida korišten je enzimski koktel Viscozyme® L (Sigma-Aldrich; Njemačka), aktivnosti 4135 U/mL.

Analogno hidrolizi ksilana, otopine pektina pripremljene su kao otopine 10 mg/mL galakturonana (ukupne galakturonske kiseline u uzorku - anhidro oblik), a stvarna odvaga pektinskih frakcija ovisila je o udjelu galakturonske kiseline u uzorcima. Uzorci pektina otopljeni su u odgovarajućem volumenu 100 mM natrij-acetatnog pufera pH 5,5. Količina enzima za hidrolizu izračunata je s obzirom na udjel galakturonana u uzorku, specificiranu aktivnost enzima te pretpostavljeno trajanje reakcije od 1 h, potrebno za teorijsku potpunu razgradnju supstrata. Tako definirana količina enzima označena je 1xE, što je odgovaralo 0,87 U/mg galakturonana u uzorku. U optimizaciji hidrolize korištene su i deset puta te sto puta veće količine enzima, odnosno 10xE i 100xE, što je odgovaralo aktivnostima enzima od 8,7 U/mg galakturonana u uzorku te 87 U/mg galakturonana u uzorku. Hidroliza je provedena pri 40 °C u termobloku s miješanjem (Eppendorf Thermomixer® C, Eppendorf; Njemačka) te su izuzimani uzorci hidrolizata u određenim vremenskim razmacima, u kojima su kvalitativno i kvantitativno određeni oligogalakturonidi. Tablica 28 sažeto prikazuje parametre hidrolize.

Tablica 28. Parametri enzimske hidrolize (*endo*-poligalakturonazom ili Viscozyme enzimskim preparatom) pektinskih frakcija izdvojenih iz pulpe šećerne repe, ljuske kakaovog zrna i ljuske crvenog luka pri optimalnim uvjetima ekstrakcije.

Pulpa šećerne repe (pektinska frakcija)	Koncentracija supstrata		10 mg/mL*												
	Temperatura hidrolize		40 °C												
	Koncentracija enzima		10xE (8,7 U/mgS**)												
	Vrijeme hidrolize		10'	30'			1h			6h			24h		
	Enzim		Viscozyme enzimski koktel												
Ljuska crvenog luka (pektinska frakcija)	Koncentracija supstrata		10 mg/mL*												
	Temperatura hidrolize		40 °C												
	Koncentracija enzima		1xE (0,87 U/mgS**)				10xE (8,7U/mgS**)				100xE (87 U/mgS**)				
	Vrijeme hidrolize		10'	1h	6h	24h	10'	1h	6h	24h	10'	1h	6h	24h	
	Enzim		enzim ePG-M2												
Ljuska kakaovog zrna (pektinska frakcija)	Koncentracija supstrata		10 mg/mL*												
	Temperatura hidrolize		40 °C												
	Koncentracija enzima		1xE (0,87 U/mgS**)				10xE (8,7 U/mgS**)				100xE (87 U/mgS**)				
	Vrijeme hidrolize		10'	1h	6h	24h	10'	1h	6h	24h	10'	1h	6h	24h	
	Enzim		enzim ePG-M2												

\* koncentracija ukupne galakturonske kiseline u uzorku pektina

\*\*S-supstrat - ukupna galakturonska kiselina

Izdvojeni alikvoti hidrolizata (200  $\mu$ L) uronjeni su u kipuću vodu (100 °C) te ostavljeni da ključaju tijekom 5 min kako bi se toplinski denaturirali enzimi, a time i zaustavila hidroliza. Ohlađeni hidrolizati čuvani su pri -20 °C do analiza.

### 3.2.6.3 Karakterizacija hidrolizata ksilana i pektina tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC-PDA)

Određivanje ksilooligosaharida i oligogalakturonida omogućeno je primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC-PDA) uz prethodnu PMP derivatizaciju, prema metodi razvijenoj u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, kako je opisano u poglavlju 3.2.3.5.6.

S obzirom na komercijalno dostupne standarde (Megazyme; Irska), od ksilooligosaharida (XOS) određeni su: ksiloza (X1), ksilobioza (X2), ksilotrioza (X3), ksilotetraoza (X4), ksilopentaoza (X5) i ksiloheksaoza (X6), s time da ksiloza i ksilobioza ne pripadaju kategoriji oligosaharida u klasičnom smislu (X1 je monosaharid, a X2 disaharid), međutim, kao produkti hidrolize ksilana, u ovom kontekstu uvršteni su u ksilooligosaharide.

Od oligogalakturonida (OGaU) određeni su: galakturonska kiselina (GA1) (monohidrat, Sigma Aldrich; Njemačka), digalakturonska kiselina (GA2), trigalakturonska kiselina (GA3) i tetragalakturonska kiselina (GA4) (ChemCruz<sup>®</sup>, Santa Cruz Biotechnology; SAD). Kao i za X1 i X2, GA1 i GA2 također su smatrani oligogalakturonidima za potrebe ovoga istraživanja.

Pomiješa se 100  $\mu$ L alikvota hidrolizata ksilana i pektina (nakon inaktivacije enzima) s internim standardom fukozom (0,4 mg/mL) u omjeru 1:1 (v/v) (konačna koncentracija fukoze iznosi 0,2 mg/mL) te se otopina dobro promiješa na vorteksu i derivatizira PMP reagensom, kako je opisano u poglavlju 3.2.3.5.6.1. PMP derivati oligosaharida analizirani su prema razvijenoj (optimalni uvjeti) HPLC-PDA metodi, kako je prethodno opisano (poglavlje 3.2.3.5.6.3).

#### Izračun rezultata:

Zajedno s uzorcima hidrolizata, derivatiziraju se i standardi XOS i OGaU, koncentracije 0,2 mg/mL (svakog analita), u koje se dodaje fukoza kao interni standard (konačna koncentracija internog standarda također 0,2 mg/mL). Identifikacija PMP-derivata provodi se usporedbom retencijskih vremena pikova u uzorku s pikovima na kromatogramu smjese standarada. Kvantifikacija identificiranih pikova provodi se internim standardom, primjenom formule kako je opisano u poglavlju 3.2.3.4.

Nakon kvantifikacije svakog od XOS, izračunat je relativni udjel pojedinog oligomera u odnosu na ukupno određene XOS (%), za svaku koncentraciju enzima. Osim toga, izračunat je i stupanj konverzije ksilana (%) na način da su prvo izračunate ekvivalentne mase ksiloze za svaki

oligomer koristeći faktore 1,000 za X1, 1,064 za X2, 1,087 za X3, 1,099 za X4, 1,106 za X5 i 1,111 za X6 (navedeni faktori dobiveni su kao  $n_{Xyl} * M_{Xyl} / M_{XOS}$  gdje n predstavlja broj jedinica ksiloze (Xyl) u određenom XOS, a M molarnu masu; faktori se množe s koncentracijom pojedinog XOS u uzorku hidrolizata kako bi se izračunala ekvivalentna masa ksiloze). Nakon toga, ekvivalentne mase ksiloze svih XOS se zbroje te se pomnože polimerizacijskim faktorom za pentoze (0,88) kako bi se izračunala ekvivalentna masa ksilana (anhidro oblik ukupne ksiloze) čijom hidrolizom su nastali XOS. Stupanj konverzije ksilana u uzorku izračuna se kao omjer ekvivalentne mase ksilana te ukupne mase ksilana (ukupne ksiloze - inhidro oblik) u uzorku.

Analogno izračunu i prikazu rezultata za XOS, relativni udjel pojedinih OGAU izračunat je nakon kvantifikacije istih s obzirom na interni standard. Stupanj konverzije galakturonana u uzorku (%) izračunat je na način da su prvo izračunate ekvivalentne mase galakturonske kiseline za svaki oligomer koristeći faktore 1,00 za GA1, 1,05 za GA2, 1,07 za GA3 te 1,08 za GA4 (navedeni faktori dobiveni su kao  $n_{GalUA} * M_{GalUA} / M_{OGAU}$  gdje n predstavlja broj jedinica galakturonske kiseline (GalUA) u određenom OGAU, a M molarnu masu; faktori se množe s koncentracijom pojedinog OGAU u uzorku hidrolizata kako bi se izračunala ekvivalentna masa galakturonske kiseline). Nakon toga, ekvivalentne mase galakturonske kiseline svih OGAU se zbroje te pomnože polimerizacijskim faktorom 0,907 kako bi se izračunala ekvivalentna masa galakturonana čijom hidrolizom su nastali OGAU. Stupanj konverzije galakturonana u uzorku izračuna se kao omjer ekvivalentne mase galakturonana te ukupne mase galakturonana (ukupne galakturonske kiseline - anhidro oblik) u uzorku.

Analiza hidrolizata ksilana i pektina provedena je u duplikatu, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

### **3.2.7 Evaluacija prebiotičkih svojstava monokulturom *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BLC1**

Za određivanje jednog od aspekata prebiotičkog učinka hidrolizata ksilana i pektina (stimulacija rasta probiotičkih vrsta) korištena je probiotička bakterija *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BLC1, dobivena u liofiliziranom obliku ( $1,5 * 10^{11}$  CFU/g) iz mliječne industrije Dukat, Lactalis grupe (Zagreb, Hrvatska). Tijekom uzgoja iste u anaerobnim uvjetima, uspostavljena je krivulja rasta kako bi se odredili uvjeti u kojim se postiže eksponencijalna faza rasta, što će se primijeniti na kasnije eksperimente.

Probiotička bakterija *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BLC1, uzgajana je u MRS (engl. Man, Rogosa and Sharpe broth) kompletnoj tekućoj hranjivoj podlozi (MRS Broth with Tween

80, Biolife; Italija), uz dodatak L-cisteina (min. 98 %, Acros Organics™, Thermo Fisher Scientific; SAD) u koncentraciji 0,5 mg/mL podloge, u anaerobnim uvjetima pri 37 °C tijekom 24 h. Koncentracija bakterija u tekućoj hranjivoj podlozi po završetku uzgoja iznosila je 10<sup>8</sup> CFU/mL. Kako bi dobile pojedinačne kolonije na krutoj hranjivoj podlozi, pripremljena su adekvatna razrjeđenja bakterijske suspenzije u PBS puferu. Alikvot 100 µL 10<sup>-5</sup> i 10<sup>-6</sup> razrjeđenja suspendiran je u 2 mL top agara koji je izliven u Petrijevu zdjelicu u kojoj se nalazila MRS kruta hranjiva podloga (MRS Agar with Tween 80, Biolife; Italija, 25 mL podloge; podloga je pripremljena sukladno uputi na pakiranju, uz dodatak L-cisteina (min. 98 %, Acros Organics™, Thermo Fisher Scientific; SAD) u koncentraciji 0,5 mg/mL podloge). Nakon što se stvrdnuo top agar, na vrh je postavljena podloga (25 mL) sastavom jednaka kao na dnu Petrijeve zdjelice (MRS Agar). Nakon 48 h uzgoja na čvrstoj podlozi, izdvojena je 1 od poraslih bakterijskih kolonija, suspendirana je u 14 mL tekuće MRS hranjive podloge te je ponovno uzgajana u anaerobnim uvjetima pri 37 °C tijekom 24 h. Tako dobivena suspenzija korištena je kao inokulum za procjenu prebiotičkih učinaka hidrolizata ksilana i pektina. U tu svrhu, naciyepljeno je 10 µL prethodno uzgojenog bakterijskog inokuluma u MRS tekuću hranjivu podlogu s dodatkom cisteina u koju su prethodno dodani hidrolizati ksilana ili pektina u definiranim koncentracijama, u ukupnom volumenu 1,5 mL. Nakon 24 h uzgoja (anaerobno, 37 °C, 24 h), alikvot 100 µL (10<sup>-5</sup> ili 10<sup>-6</sup> razrjeđenje) naciyepljen je u 2 mL top agara te izliven na čvrstu hranjivu podlogu (MRS + top agar + MRS), kako je prethodno opisano. Po završetku anaerobnog uzgoja pri 37 °C tijekom 48 h, broj poraslih bakterijskih kolonija određen je metodom brojanja ploče (*engl.* plate count). Uspješnost rasta bakterijske monokulture *B. animalis ssp. lactis* BLC 1 određena je kao relativna vrijednost (%) u odnosu na broj poraslih bakterijskih kolonija na kontrolnoj ploči (uzgoj bez dodatka hidrolizata).

Uzgoj *B. animalis ssp. lactis* BLC1 za svaku od definiranih koncentracija ukupno određenih produkata hidrolize u hidrolizatima ksilana i pektina proveden je u duplikatu, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti relativne brojnosti (% preživljenja) s pripadajućom standardnom devijacijom.

### **3.2.8 Primjena pektinskih frakcija u razvoju funkcionalnih dozirnih oblika**

#### **3.2.8.1 Priprema jestivog filma i mikroinkapsuliranih čestica**

U izradi jestivog filma korišten je pektin pulpe šećerne repe ekstrahiran primjenom razrijeđene klorovodične kiseline (HCl) pri pH 1,5, kako je opisano u poglavlju 3.2.4.1, dok je u izradi inkapsuliranih čestica korišten pektin ljuske crvenog luka izdvojen ekstrakcijom kelirajućim



sredstvom, pri optimiranim uvjetima (ekstrakcija acetatnim puferom pH 4,6 pri 90 °C - A-90), kako je opisano u poglavlju 3.2.5.2.2.

Za pripremu obaju dozirnih oblika kao tekući medij korišten je ekstrakt ružmarina pripremljen ekstrakcijom 20 g suhih listića ružmarina s 500 mL demineralizirane vode pri 80 °C tijekom 30 min. Bistri ekstrakt izdvojen je filtracijom.

Jestivi film pektina pulpe šećerne repe pripremljen je metodom izlijevanja u kalup (*engl.* casting method) pri čemu je kao kalup korištena staklena Petrijeva zdjelica unutarnjeg promjera 11,7 cm. U ekstraktu ružmarina (20 mL) potpuno se otopi pektin u koncentraciji 4 % (w/v) te se dobivena otopina izlije u Petrijevu zdjelicu. Otopina se suši na zraku pri sobnoj temperaturi, pri čemu se formira film na dnu Petrijeve zdjelice koji se zatim odvoji od kalupa te se do daljnjih analiza čuva između slojeva masnog papira u eksikatoru.

Inkapsulacija ekstrakta ružmarina provedena je tehnikom ionskog geliranja. U tu svrhu, pripremi se 2 %-tna (w/v) otopina pektina u ekstraktu ružmarina, koja se ukapava principom kap-po-kap iz šprice s tankom iglom u 3 %-tnu (w/v) otopinu kalcijeva klorida (CaCl<sub>2</sub>), također u ekstraktu ružmarina. Prilikom ukapavanja, otopina soli se miješa (na magnetskoj mješalici) kako bi se lakše formirale čestice sferičnog oblika. Inkapsulacija se provodi pri sobnoj temperaturi. Formirane čestice inkapsulata isperu se ekstraktom i čuvaju se u ekstraktu do daljnjih analiza.

#### 3.2.8.2 Karakterizacija pripremljenih funkcionalnih dozirnih oblika

Jestivi film te čestice inkapsulata karakterizirani su s obzirom na udjel ukupnih polifenola, udjel ukupnih hidroksicimernih kiselina te antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom. Također je, prema istim navedenim parametrima, praćeno je otpuštanje polifenolnih spojeva iz obaju dozirnih oblika u simuliranoj gastičnoj otopini (*engl.* - simulated gastric fluid - SGF; otopi se 2 g natrijeva klorida (NaCl) i 7 mL koncentrirane klorovodične kiseline (HCl) u demineraliziranoj vodi u tikvici od 1 L; pH pripremljene otopine iznosi 1,2).

Za određivanje ukupnih polifenola, hidroksicimernih kiselina i antioksidacijskog kapaciteta uzeto je 5 g filma, odnosno 0,5 g čestica. Uzorak filma u potpunosti se otopi u 30 mL demineralizirane vode te se otopina koristi kao uzorak za navedene analize. Čestice inkapsulata (poznate mase) resuspendiraju se u 2 %-tnoj otopini (w/v) natrijeva citrata te se intenzivno miješaju do potpunog otapanja, a otopina se koristi kao uzorak za prethodno navedene analize. Ukupni polifenoli te antioksidacijski kapacitet ABTS metodom određeni su kako je prethodno opisano (poglavlja 3.2.2.3.1 i 3.2.2.3.4). Ukupne hidroksicimernne kiseline određene su prema

predložku metode preuzete iz Poljske farmakopeje (6. izd. 2005), kako je opisano u radu Matkowski i suradnika (2008).

U svrhu praćenja otpuštanja polifenolnih spojeva, 0,5 g uzorka filma i ~0,6 g čestica inkapsulata (ovisno o masi pojedine čestice), resuspendirano je u 30 mL SGF otopine na magnetskoj mješalici te su izuzimani alikvoti 2 mL u pravilnim vremenskim razmacima do ukupno 2 h, koliko iznosi pretpostavljeno zadržavanje u želucu. Izuzeti volumen alikvota nadomješteni su jednakim volumenom SGF otopine.

Priprema uzorka za analizu bioaktivnih sastojaka te praćenje opuštanja istih provedena je prema radu Belščak-Cvitanović i suradnika (2016).

### **3.2.9 Statistička obrada rezultata**

Statistička obrada rezultata provedena je metodom analize varijance (ONE-WAY ANOVA) uz razinu značajnosti ( $\alpha$ -vrijednost) 0,05 te Tukey *post-hoc* test. U statističkoj obradi rezultata korišten je statistički program SPSS 17.0 (IBM; SAD).

*Rezultati i rasprava*

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovome radu analizirano je 5 agro-industrijskih ostataka: pulpa šećerne repe (SBP), ljuska oraha (WS), ljuska kakaovog zrna (CBH), ljuska luka (OP) i mahuna graška (PP). Isti su odabrani prema kriterijima važnosti za konditorsku industriju - nusproizvodi proizvodnje osnovnih konditorskih sirovina, šećera i kakaove mase, te konditorskih dodataka (jezgrasto voće), kao i široko zastupljenih namirnica u prehrani općenito (luk, grašak), a za čije nusproizvode ne postoji velik broj istraživanja ponovne primjene u prehrane svrhe. Navedeni biljni materijali razmatrani su kao vrijedne sekundarne sirovine - nekonvencionalni izvori makro- i mikrosastojaka koji se ponovno mogu primijeniti u prehrani ljudi, u skladu s inovativnim načinima valorizacije i dodavanjem vrijednosti nusproizvodima prehrane industrije. Sirovinama je određen osnovni makrokomponentni sastav, s posebnim osvrtom na ugljikohidratnu frakciju, odnosno udjele topljivih i netopljivih vlakana, jednostavnih šećera i lignina. Potpunom kiselinskom hidrolizom strukturnih polisaharida omogućen je uvid u monosaharidni sastav sirovina, na temelju kojeg se zaključilo o zastupljenosti pojedinih strukturnih polisaharida u staničnim stijenkama pojedine sirovine. Sukladno rezultatima, sirovine su podijeljene u sirovine bogate pektinom i sirovine bogate ksilanom te su razvijena 2 različita pristupa izdvajanja polisaharida stanične stijenke, jedan u svrhu izdvajanja pektina, a drugi u svrhu izdvajanja hemiceluloze - ksilana. Optimizacijom ova 2 pristupa omogućeno je maksimalno iskorištenje sirovine u smislu izdvajanja željene polisaharidne frakcije. Pročišćene frakcije polisaharida (pektina i ksilana) poslužile su kao supstrat za proizvodnju ksilooligosaharida i pektinskih oligosaharida, primjenom odgovarajućih enzima. Važnost i dodana vrijednost navedenih oligosaharida je u potencijalnim prebiotičkim svojstvima te se isti mogu koristiti u daljnjoj proizvodnji novih funkcionalnih prehranbenih proizvoda, napose funkcionalnih konditorskih proizvoda kao preferabilnih dozirnih oblika novih prebiotika. Osim ugljikohidratne frakcije, u sirovinama je određen i udjel najznačajnijih bioaktivnih spojeva - polifenola i metilksantina, koji se također mogu koristiti kao funkcionalni sastojci. Rezultati ovog istraživanja te njihov značaj i detaljno pojašnjenje navedeni su u sljedećim poglavljima.

### 4.1 Analiza osnovnog makrokomponentnog sastava

Sekundarne biljne sirovine u svim eksperimentima i analizama korištene su u suhom usitnjenom obliku. Tablica 29 prikazuje način pripreme te osnovne karakteristike korištenih sekundarnih biljnih sirovina.

Tablica 29. Karakteristike sekundarnih biljnih sirovina korištenih u istraživanju.

Vrsta sekundarne biljne sirovine	Priprema sekundarne biljne sirovine		Udjel otpada u odnosu na primarnu sirovinu (%)	Udjel suhe tvari nakon stabilizacije uzoraka (%)	Raspodjela veličine čestica nakon finalizacije uzorka ( $\mu\text{m}$ )		
	Stabilizacija	Finalizacija			d(0,1)	d(0,5)	d(0,9)
Pulpa šećerne repe (SBP)	Industrijski (suhi oblik)	usitnjavanje i prosijavanje (450 $\mu\text{m}$ )	~50 <sup>a</sup> (mokre mase)	91,70 $\pm$ 0,05	70,2	392,4	798,3
Ljuska oraha (WS)	Prirodno suhi nusproizvod		~47	91,67 $\pm$ 0,07	35,6	278,2	786,6
Ljuska kakaovog zrna (CBH)	Prirodno suhi nusproizvod		12-20 <sup>b</sup>	91,11 $\pm$ 0,01	53,5	333,7	676,4
Ljuska crvenog luka (OP)	Sušenje pri 50 °C		~10 <sup>c</sup>	89,26 $\pm$ 0,05	85,5	343,3	683,1
Mahuna graška (PP)	Sušenje pri 50 °C		~52	89,11 $\pm$ 0,30	83,5	344,3	820,0

<sup>a</sup> Ralet i suradnici (2009)

<sup>b</sup> Fowler (2009); Okiyama i suradnici (2018)

<sup>c</sup> Waldron (2001); FAO (2018a)

Vidljivo je (Tablica 29) da istraživane sekundarne sirovine čine značajan dio primarnog proizvoda, u rasponu 10-50 % (w/w). Za WS i PP, podaci su dobiveni eksperimentalno budući da su ove sirovine pripremljene u laboratorijskim uvjetima, dok su za SBP, CBH i OP prikazani literaturni podaci. OP je udjelom u primarnom proizvodu najmanje zastupljen agro-industrijski ostatak, međutim, važno je naglasiti da prikazani podatak može biti značajno drugačiji (veći) jer i sastav ovog otpadnog biljnog materijala značajno može varirati (s obzirom na udjele pojedinih neiskoristivih dijelova glavice luka, specifično kvaliteti primarne sirovine i načinu primarne obrade). Prikazani podatak dobiven je kombinacijom FAO podataka za proizvodnju suhih glavica luka u 2001. godini u Europskoj uniji te dostupnog literaturnog podatka o količini otpadne biomase luka u Europskoj uniji objavljenog u istoj godini. SBP, CBH i PP su udjelom u primarnom proizvodu najzastupljeniji agro-industrijski ostaci (približno 50 % mase). Ipak, u procjeni potencijalne važnosti i iskoristivosti pojedinog agro-industrijskog ostatka, na razini količine, osim zastupljenosti u primarnom proizvodu, veliku ulogu čini i sam opeg proizvodnje primarnog proizvoda te njegova dostupnost s istog mjesta. Tako, iako su OP i CHB na prvi pogled količinski manje zastupljeni nusproizvodi, globalna važnost luka i kakaovog zrna te dostupnost ovih materijala u industrijskim razmjerima čini ih potencijalno važnim sekundarnim sirovinama.

Sušenjem sirovina postignut je željeni udjel suhe tvari od približno 90 %, što je bila osnova za mikrobiološku stabilnost sirovina u uvjetima dužeg čuvanja. Sukladno tome, sirovine koje nisu bile prirodno suhe, sušene su pri 50 °C do uspostavljanja željenog udjela suhe tvari (približno 24 - 48 h).

Analiza veličine čestica u prosijanoj frakciji (sito 450  $\mu\text{m}$ ) nakon usitnjavanja pokazala je relativno jednoliku raspodjelu veličine čestica u svim uzorcima, s  $d(0,1)$  vrijednosti približno 35 - 85  $\mu\text{m}$ ,  $d(0,5)$  vrijednosti približno 280-390  $\mu\text{m}$  i  $d(0,9)$  vrijednosti približno 675 - 820  $\mu\text{m}$ . Vrijednost  $d(0,1)$  predstavlja promjer čestice od kojeg 10 % svih čestica uzorka ima manji promjer;  $d(0,5)$  promjer čestice od kojeg 50 % svih čestica uzorka ima veći promjer i 50 % svih čestica uzorka ima manji promjer, te  $d(0,9)$  promjer čestice od kojeg 90 % svih čestica uzorka ima manji promjer. Relativno ravnomjerna raspodjela veličine čestica u svim sirovinama omogućila je pretpostavku da je prijenos mase uvjetovan veličinom čestica, u daljnjim ekstrakcijskim postupcima, bio jednak za sve sirovine.

Osnovni makrokomponentni sastav sekundarnih biljnih sirovina (Tablica 30) određen je primjenom AOAC metoda. Izravno su određeni udjeli lipida, proteina i mineralnog ostatka, dok je udjel ugljikohidratne frakcije određen kao razlika do 100 % mase suhe tvari svake sirovine.

Tablica 30. Prosječan makrokomponentni sastav korištenih sekundarnih biljnih sirovina (SBP - pulpa šećerne repe, WS - ljuska oraha, CBH - ljuska kakaovog zrna, OP - ljuska crvenog luka, PP - mahuna graška).

<b>Sekundarna biljna sirovina</b>	<b>Lipidna frakcija (% u s.tv.)</b>	<b>Proteinska frakcija (% u s.tv.)</b>	<b>Frakcija mineralnog ostatka (% u s.tv.)</b>	<b>Ugljikohidratna frakcija (% u s.tv.)</b>
SBP	0,37 ± 0,01	9,15 ± 0,41	4,67 ± 0,02	85,82 ± 0,08
WS	0,61 ± 0,00	1,29 ± 0,20	1,02 ± 0,00	97,08 ± 0,19
CBH	2,50 ± 0,01	18,15 ± 0,11	9,10 ± 0,06	70,25 ± 0,05
OP	0,91 ± 0,01	6,24 ± 0,11	9,35 ± 0,09	83,50 ± 0,01
PP	0,70 ± 0,01	14,66 ± 0,07	6,30 ± 0,25	78,35 ± 0,18

Analiza makrokomponentnog sastava pokazala je dominantnost ugljikohidratne frakcije, uz niske udjele masti i proteina, što je karakteristika biljnih agro-industrijskih ostataka (Mirabella i sur., 2014). Udjel lipida za sve sirovine, osim CBH, bio je gotovo neznačajan, manji od 1 % s.tv., i stoga sirovine nisu odmašćivane za potrebe daljnjih eksperimenata i nekih analiza. CBH je sadržavala nešto veći udjel lipida, 2,5 % s.tv., ali i ova vrijednost se može smatrati zanemarivom. Također, CBH je sadržavala i najveći udjel proteina, 18,15 % s.tv., međutim, isti se nalaze većinom vezani s oksidiranim polifenolima te je korištenje ove sirovine u proizvodnji proteinskih izolata zanemarivo (Okiyama i sur., 2017). Najveći udjeli mineralnog ostatka, približno 9 % s.tv., određeni su u CBH i OP. U WS je određen daleko najmanji i gotovo zanemariv udjel lipida, proteina i mineralnog ostatka, u ovom kontekstu neugljikohidratnih komponenata, što je u skladu sa mikrostrukturom ove sirovine, sastavljenom od sklereidnih stanica u kojima dominiraju zadebljale sekundarne stanične stijenke bogate polisaharidima i ligninom. Sukladno tome, u ovoj sekundarnoj sirovini indirektno je određen i najveći udjel ugljikohidratne frakcije. Ugljikohidratna frakcija dominantno je bila zastupljena i u ostalim sirovinama, u rasponu približno 70-85 % s.tv. Imajući na umu da su korištene sekundarne biljne sirovine vrlo različite s obzirom na vrstu biljnih tkiva i organa koji ih čine, može se pretpostaviti da se ugljikohidratna frakcija ne odnosi isključivo na polisaharide, već i lignin, sukladno zastupljenosti i strukturi sekundarnih tkiva u sirovini. Rezultati udjela lipida, proteina i mineralnog ostatka sukladni su dostupnim literaturnim podacima prikazanim za svaku sekundarnu sirovinu, kako je navedeno u poglavlju 2.3.2. Manje razlike očekivane su s obzirom na prirodne razlike između varijeteta, klimatskih uvjeta ili agronomske prakse, kao i načina čuvanja primarnih sirovine. S obzirom na veliku zastupljenost, iskorištavanje ugljikohidratnih frakcija osigurava i maksimalno iskorištavanje samih sekundarnih sirovina.

## 4.2 Analiza ekstraktibilne suhe tvari

### 4.2.1 Ekstrakcijski prinos

Prvi korak u daljnjoj analizi ugljikohidratne frakcije bilo je izdvajanje ekstraktibilne suhe tvari. Ovom predradnjom osigurava se prvenstveno uklanjanje jednostavnih šećera koji mogu biti prisutni u značajnom udjelu te lažno povećavati prinos glukoze (najčešće) tijekom analize monomernog stastava strukturnih polisaharida. Ekstrakcija je provedena na 2 načina, prema NREL protokolu, uzastopnim vodenim i etanolnim ekstrakcijama u aparaturi po Soxhletu, te modificiranom metodom pripreme alkoholno-netopljivog ostatka (referentna metoda 725-LA2-MO-2004-300 laboratorija Paroi Végétale et Polysaccharides Pariétaux Francuskog nacionalnog instituta za istraživanja u poljoprivredi (INRA, Centar Angers-Nantes, BIA)) ekstrakcijom 70 %-tnim etanolom. Ekstrakcija prema drugom postupku pokazala se puno praktičnijom i bržom u pripremi većih količina uzoraka, te kao metoda koja manje utječe na uzorak. Naime, u Soxhlet ekstrakciji vruće otapalo, konkretno voda, može ekstrahirati i dio pektina, te smanjiti prinose istoga u daljnjem postupku selektivnog izdvajanja. Jednako tako, toplina može utjecati i na karakteristike vlakana u sirovini (Guillon i sur., 2000). Također, materijal u celuloznim čahurama može značajno nabubriti uslijed vezanja vode, što lako dovodi do pucanja razmočenih čahura te otežava izdvajanje materijala nakon ekstrakcije, moguća je i kontaminacija uzroka djelićima celulozne čahure. Navedeni nedostaci Soxhlet ekstrakcije bili su najizraženiji za SBP.

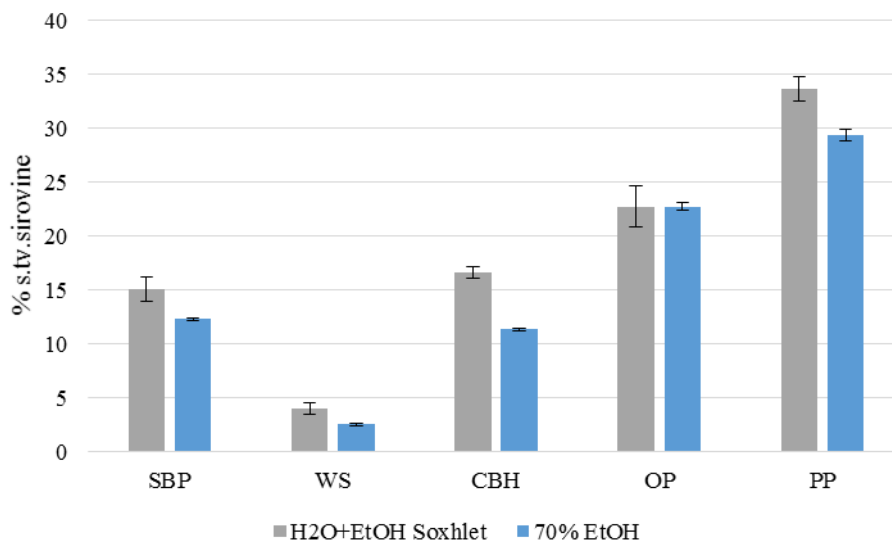
Kao alternativa dugotrajnoj i nepraktičnoj Soxhlet ekstrakciji, istražena je primjena uzastopne ekstrakcije 70 %-tnim etanolom. Evaluacijski kriterij pritom odnosio se na ekstrakcijski prinos, odnosno udjel suhe tvari u ekstraktu (ekstraktibilne suhe tvari sirovine) te udjel slobodnih šećera u suhoj tvari ekstrakta.

Ekstrakcija 70 %-tnim etanolom provedena je kao uzastopna trostruka ekstrakcija temeljem preliminarnih eksperimenata u kojima se pokazalo da je u četvrtom ekstraktu udjel mjerenih topljivih šećera bio ispod limita kvantifikacije te se time smatralo da se trostrukom uzastopnom ekstrakcijom postiže maksimalno iscrpljenje materijala s obzirom na jednostavne šećere.

Slika 24 prikazuje prinos suhe tvari ekstrakta kao udjel ekstraktibilne mase u suhoj tvari sekundarne biljne sirovine. Rezultati pokazuju da su uzastopnim Soxhlet ekstrakcijama vodom i etanolom dobiveni nešto veći ekstrakcijski prinosi te se razlika u rasponu od 1,5 % (WS) do 5,3 % (CBH) može pripisati mogućoj koekstrakciji vodeno-topljivog pektina, kako je ranije navedeno. Koekstrakcija pektina je nepoželjna te predstavlja svojevrsni gubitak ciljane polisaharidne frakcije. Neovisno o načinu ekstrakcije, značajni ekstrakcijski prinosi ostvareni



su za sve sirovine osim WS, a najveći, u prosjeku 30 % s.tv. sekundarne biljne sirovine, za PP. Suhu tvar ekstrakta čine niskomolekulski spojevi topljivi u polarnim otapalima, među kojima jednostavni šećeri, mineralne tvari, topljivi proteini, sekundarni biljni metaboliti (polifenoli, pigmenti), organske kiseline i sl.



Slika 24. Udjeli ekstraktibilne suhe tvari sekundarnih biljnih sirovina dobivene različitim metodama ekstrakcije.

#### 4.2.2 Jednostavni šećeri

Kao što je prethodno spomenuto, ekstrakcija sekundarnih sirovina provedena je prvenstveno u svrhu uklanjanja jednostavnih šećera. U dobivenim vodenim, etanolnim i vodeno-etanolnim (70 %) ekstraktima određeni su udjeli šećera fruktoze, glukoze i saharoze (Tablica 31). Iz rezultata je vidljivo da su obje metode ekstrakcije bile podjednako učinkovite u ekstrakciji jednostavnih šećera iz sekundarnih biljnih sirovina, čime se potvrđuje pretpostavka da su razlike u ekstrakcijskom prinosu (Slika 24) posljedica koekstrakcije najvjerojatnije pektina. Utjecaj povišene temperature u Soxhlet ekstrakciji također se odrazio i na profil jednostavnih šećera. Naime, veći prinos saharoze u 70 %-tnom etanolnom SBP ekstraktu upućuje na toplinsku razgradnju saharoze tijekom Soxhlet ekstrakcije, a u prilog tome govori i gotovo ekvimolaran porast fruktoze i glukoze u Soxhlet ekstraktima. Jednako tako, veći prinos fruktoze u Soxhlet ekstrakciji OP može indicirati toplinsku degradaciju fruktooligosaharida, prirodno prisutnih oligomera i polimera fruktoze koji mogu biti značajno zastupljeni u otpadnoj biomasi luka (Benítez i sur., 2012). CBH i WS sadržavali su neznatne udjele jednostavnih šećera te za ove sirovine nije nužno provoditi prethodnu ekstrakciju. Najviše saharoze određeno je,

očekivano, u SBP, a vrijednost od 6,7 % udjela u suhoj tvari odnosi se na rezidualnu saharozu u repinom rezancu nakon postupka ekstrakcije šećera.

Tablica 31. Udjeli fruktoze, glukoze i saharoze (% s.tv. sekundarne biljne sirovine) u odabranim sekundarnim biljnim sirovinama (SBP - pulpa šećerne repe, WS - ljuska oraha, CBH - ljuska kakaovog zrna, OP - ljuska crvenog luka, PP - mahuna graška).

<i>Određeno u etanolnom i vodenom ekstraktu dobivenima uzastopnim Soxhlet ekstrakcijama</i>				
Sekundarna sirovina	Šećeri (% s.tv. sekundarne biljne sirovine)			
	Fruktoza	Glukoza	Saharoza	Ukupno
SBP	2,26 ± 0,13	3,33 ± 0,01	3,05 ± 0,09	8,63 ± 0,03
WS	1,17 ± 0,03	-	0,14 ± 0,01	1,31 ± 0,05
CBH	0,18 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,17 ± 0,06	0,58 ± 0,03
OP	5,07 ± 0,12	2,72 ± 0,02	1,43 ± 0,10	9,22 ± 0,20
PP	2,26 ± 0,13	3,33 ± 0,01	3,05 ± 0,09	8,63 ± 0,03
<i>Određeno u 70%-tnom etanolnom ekstraktu dobivenom uzastopnim ekstrakcijama</i>				
Sekundarna sirovina	Šećeri (% s.tv. sekundarne biljne sirovine)			
	Fruktoza	Glukoza	Saharoza	Ukupno
SBP	0,16 ± 0,04	0,20 ± 0,01	6,37 ± 0,43	6,73 ± 0,40
WS	0,21 ± 0,04	-	-	0,21 ± 0,04
CBH	0,11 ± 0,01	-	-	0,11 ± 0,01
OP	2,60 ± 0,08	3,05 ± 0,12	1,60 ± 0,17	7,25 ± 0,16
PP	1,42 ± 0,03	5,25 ± 0,19	3,24 ± 0,05	9,91 ± 0,27

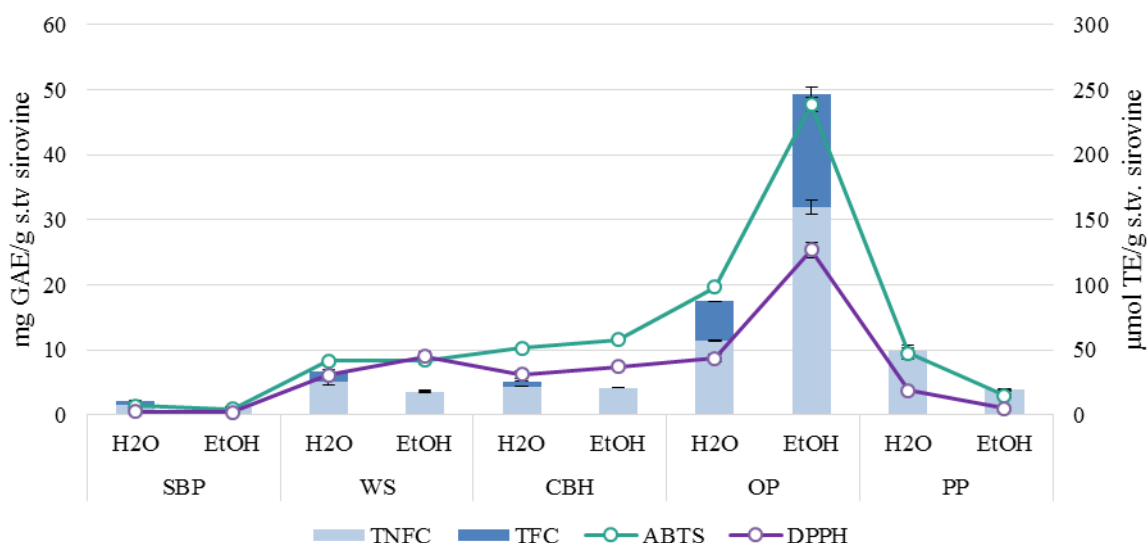
Jednostavni šećeri činili su približno 55 % suhe tvari 70 %-tnog etanolnog ekstrakta SBP, približno 1/3 u ekstraktima OP i PP, te najmanje za WS i CBH (8,3 % s.tv. ekstrakta te manje od 1 % s.tv. ekstrakta). Ostatak suhe tvari ekstrakta činile su otopljene anorganske tvari, proteini, sekundarni biljni metaboliti te drugi neodređeni nestrukturani ugljikohidrati.

#### 4.2.3 Bioaktivni spojevi

Iako je primarna svrha ekstrakcije bila uklanjanje jednostavnih šećera, ova tehnika vrlo je pogodna i za ekstrakciju bioaktivnih spojeva, polifenola i metilksantina (Galanakis, 2015). Ukupni i pojedinačni bioaktivni spojevi te antioksidacijski kapacitet određeni su u vodenim i etanolnim ekstraktima dobivenima Soxhlet ekstrakcijom. Slika 25 prikazuje rezultate određivanja udjela ukupnih polifenola i flavonoida te pripadajući antioksidacijski kapacitet vodenih i etanolnih Soxhlet ekstrakata, određen dvjema metodama - ABTS i DPPH.

Kao polifenolima najbogatija sirovina istaknula se OP, i to posebice etanolni ekstrakt (49,3 mg GAE/ g s.tv.). Etanolni ekstrakti drugih sirovina bili su uglavnom manjeg udjela polifenola

budući da je etanolna Soxhlet ekstrakcija uslijedila nakon vodene, kojom je ekstrahirana najveći dio polifenola. Ipak, kod OP se pokazalo da je etanol bio prikladnije otapalo za ekstrakciju najvećeg udjela ukupnih polifenola.



Slika 25. Udjeli ukupnih polifenolnih spojeva (ukupnih neflavonoida (TNFC - *engl.* total non-flavonoid content) i ukupnih flavonoida (TFC - *engl.* total flavonoid content)) (mg GAE/g s.tv. sirovine) te antioksidacijski kapacitet određen ABTS i DPPH metodama (µmol TE/g s.tv. sirovine) u vodenim i etanolnim ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina. GAE (*engl.* gallic acid equivalents) - ekvivalenti galne kiseline; TE (*engl.* Trolox equivalents) - ekvivalenti Trolox-a.

U istoj sirovini istaknuo se i udjel ukupnih flavonoida, koji su činili približno 1/3 ukupnih polifenola u etanolnom ekstraktu. U ostalim sirovinama, flavonoidi su činili znatno manji udjel ukupnih polifenola ili gotovo nisu bili prisutni (PP). Antioksidacijski kapacitet blisko je pratio udjele ukupnih polifenola i flavonoida, uz iznimke etanolnih ekstrakata WS i CBH, gdje je određen jednak ili viši antioksidacijski potencijal u odnosu na vodeni ekstrakt, uz niži udjel ukupnih polifenola. Međutim, ova odstupanja mogu se pripisati mogućim interferencijama same metode s drugim otopljenim tvarima u ekstraktu te nisu od velikog značaja. Postignute visoke korelacije ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijskog kapaciteta (Tablica 33) ukazuju na dobru povezanost ovih parametara, unatoč manjim odstupanjima.

U svrhu identifikacije pojedinačnih polifenolnih spojeva i metilksanitna, provedena je HPLC analiza vodenih i etanolnih Soxhlet ekstrakata sekundarnih biljnih sirovina (Tablica 32).

Tablica 32. Udjeli ( $\mu\text{g/g}$  s.tv. sirovine) pojedinačnih polifenolnih spojeva i metilksantina izdvojenih vodenim i etanolnim Soxhlet ekstrakcijama.

Bioaktivni spojevi ( $\mu\text{g/g}$ s. tv.)	Pulpa šećerne repe		Ljuska oraha		Ljuska kakaovog zrna		Ljuska crvenog luka		Mahuna graška	
	H <sub>2</sub> O	EtOH	H <sub>2</sub> O	EtOH	H <sub>2</sub> O	EtOH	H <sub>2</sub> O	EtOH	H <sub>2</sub> O	EtOH
<b>Fenolne kiseline</b>										
<i>Kafeinska kiselina</i>	-	-	21,9±0,3	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klorogenska kiselina</i>	-	-	-	-	93,6±0,1	-	-	-	-	-
<i>Ferulinska kiselina</i>	3,8±0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p-kumarinska kiselina</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	8,9±0,4	-
$\Sigma$ derivata hidroksicimetne kiseline	-	-	25,3±8,4	-	-	-	98,8±4,7	-	-	-
<i>Elaginska kiselina</i>	-	-	248,7±15,6	351,4±11,6	-	-	-	-	-	-
<i>Galna kiselina</i>	23,6±0,2	-	100,4±15,5	-	242,9±1,9	125,7±5,8	-	-	-	-
<i>Protokatehinska kiselina</i>	-	-	104,8±10,7	17,4±2,9	170,6±5,9	76,9±9,9	2493,2±41,0	1279,0±39,0	50,1±0,0	14,3±0,7
<i>Vanilinska kiselina</i>	1,9±0,1	-	-	-	-	-	-	-	2,6±0,7	-
$\Sigma$ derivata hidroksibenzojeve kiseline	-	-	55,6±2,2	-	-	-	-	-	13,8±0,4	-
<b>Flavonoidi</b>										
<i>Kvercetin</i>	-	-	-	-	-	-	-	552,7±17,1	-	8,44±1,8
$\Sigma$ derivata kvercetina	-	-	-	-	-	-	2382,5±99,5	5734,6±366,2	123,6±6,6	-
$\Sigma$ derivata luteolina	-	-	-	-	-	-	171,0±17,6	48,4±3,1	-	-
<b>Metilksantini</b>										
<i>Kafein</i>	-	-	-	-	536,8±11,5	245,1±39,4	-	-	-	-
<i>Teobromin</i>	-	-	-	-	5187,9±108,2	1791,7±100,5	-	-	-	-
<b>UKUPNO (<math>\mu\text{g/g}</math> s.tv.)</b>	<b>29,4</b>		<b>925,5</b>		<b>8471,2</b>		<b>12760,1</b>		<b>221,7</b>	

Najmanji i gotovo neznan udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva, isključivo fenolnih kiselina, određen je u vodenom ekstraktu SBP, dok u etanolnom ekstraktu isti nisu određeni. Ekstrakti ljuske oraha i mahune graška sadržavali su također dominantno fenolne kiseline, i to iz skupine hidroksibenzojevih kiselina, a udjel istih je bio veći u WS. Vodenom ekstrakcijom ekstrahirana je većina navedenih spojeva, osim u slučaju elaginske kiseline iz WS, koja je u većem udjelu ekstrahirana etanolom. WS je ujedno i sirovina najbogatija elaginskom kiselinom (ukupno 600,1  $\mu\text{g/g}$  s.tv. sirovine), a ista je činila približno 65 % pojedinačno određenih fenolnih kiselina. Općenito, plod oraha vrlo je bogat elaginskom kiselinom te jedan od osnovnih prehrambenih izvora iste, uz bobičasto voće. Elaginska kiselina povezuje se s brojnim pozitivnim zdravstvenim učincima, kako je opisano u radu Landete (2011). U CBH su određene klorogenska, galna i protokateinska kiselina ukupnog udjela približno 709,7  $\mu\text{g/g}$  s.tv. sirovine, od kojih je najzastupljenija bila galna kiselina, s udjelom približno 370  $\mu\text{g/g}$  s.tv. sirovine, odnosno oko 52 % ukupnih fenolnih kiselina. Od ostalih bioaktivnih spojeva zastupljeniji su bili metilksantini, najviše teobromin (približno 7,0 mg/g s.tv. sirovine), a zatim i kafein (približno 780  $\mu\text{g/g}$  s.tv. sirovine). Zastupljenost metilksantina u CBH rezultat je njihove migracije iz jezgri u ljusku kakaovog zrna tijekom fermentacije (Panak-Balentić i sur., 2018). Udjel teobromina u skladu je s literaturnim navodima od 0,9 % s.tv. (Fowler, 2009). CBH je jedina od istraživanih sirovina sadržavala metilksantine. Najzastupljeniji polifenolni spojevi u OP bili su flavonoidi - kvercetin i njegovi derivati (najvjerojatnije glikozidi), a od fenolnih kiselina gotovo isključivo protokatehinska kiselina. Udjel ukupnih kvercetina i derivata iznosio je približno 8,7 mg/g s.tv. sirovine, a protokatehinske kiseline približno 3,8 mg/g s.tv. sirovine. Znatno veći udjel kvercetina i derivata ekstrahirani su etanolom (približno 73 % ukupno ekstrahiranih). Također, derivati kvercetina bili su puno zastupljeniji u odnosu na kvercetin-aglikon, koji je određen jedino u etanolnom ekstraktu (~ 8,7 % ukupnih kvercetina i derivata). Kvercetin-glikozidi najdominantniji su flavonoli u luku (Benítez i sur., 2012), pogotovo u unutarnjim ljuskama, dok je u vanjskim povećan udjel kvercetin-aglikona (Downes i sur., 2009). Relativno nizak udjel kvercetin-aglikona u otpadnoj biomasi luka korištenoj u ovome radu može se povezati s povećanim udjelom protokatehinske kiseline; naime, protokatehinska kiselina u luku nastaje autooksidacijom kvercetin-aglikona (Takahama i Hirota, 2000).

Korištene sekundarne biljne sirovine pokazale su se kao bogat izvor polifenola i metilksantina, a najviše WS kao izvor elaginske kiseline, CBH kao izvor galne kiseline i teobromina te OP kao izvor derivata kvercetina i protokatehinske kiseline. SBP i PP nisu sadržavale značajne udjele određivanih slobodnih polifenolnih spojeva. Navedeni spojevi pokazali su različitu

ekstraktibilnost s obzirom na primijenjeno otapalo te se preporuča primjena višestrukih ekstrakcija vodeno-alkoholnim otapalima.

Ukupni udjeli pojedinačno određenih polifenolnih spojeva također su visoko korelirali ( $R^2 = 0,8 - 0,86$ ) s drugim metodama određivanja udjela polifenolnih spojeva te njihovog antioksidacijskog kapaciteta (Tablica 33).

Tablica 33. Koeficijenti korelacije ( $R^2$ ) za rezultate udjela ukupnih polifenola (TPC - *engl.* total polyphenols content), ukupnih flavonoida (TFC - *engl.* total flavonoid content), antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS i DPPH metodama te ukupnih pojedinačno određenih polifenolnih spojeva i metilksantina HPLC metodom.

	TPC	TFC	ABTS	DPPH	HPLC
TPC	1,0000	0,9907	0,9775	0,9097	0,8080
TFC		1,0000	0,9619	0,9016	0,7999
ABTS			1,0000	0,9669	0,8904
DPPH				1,0000	0,8637
HPLC					1,0000

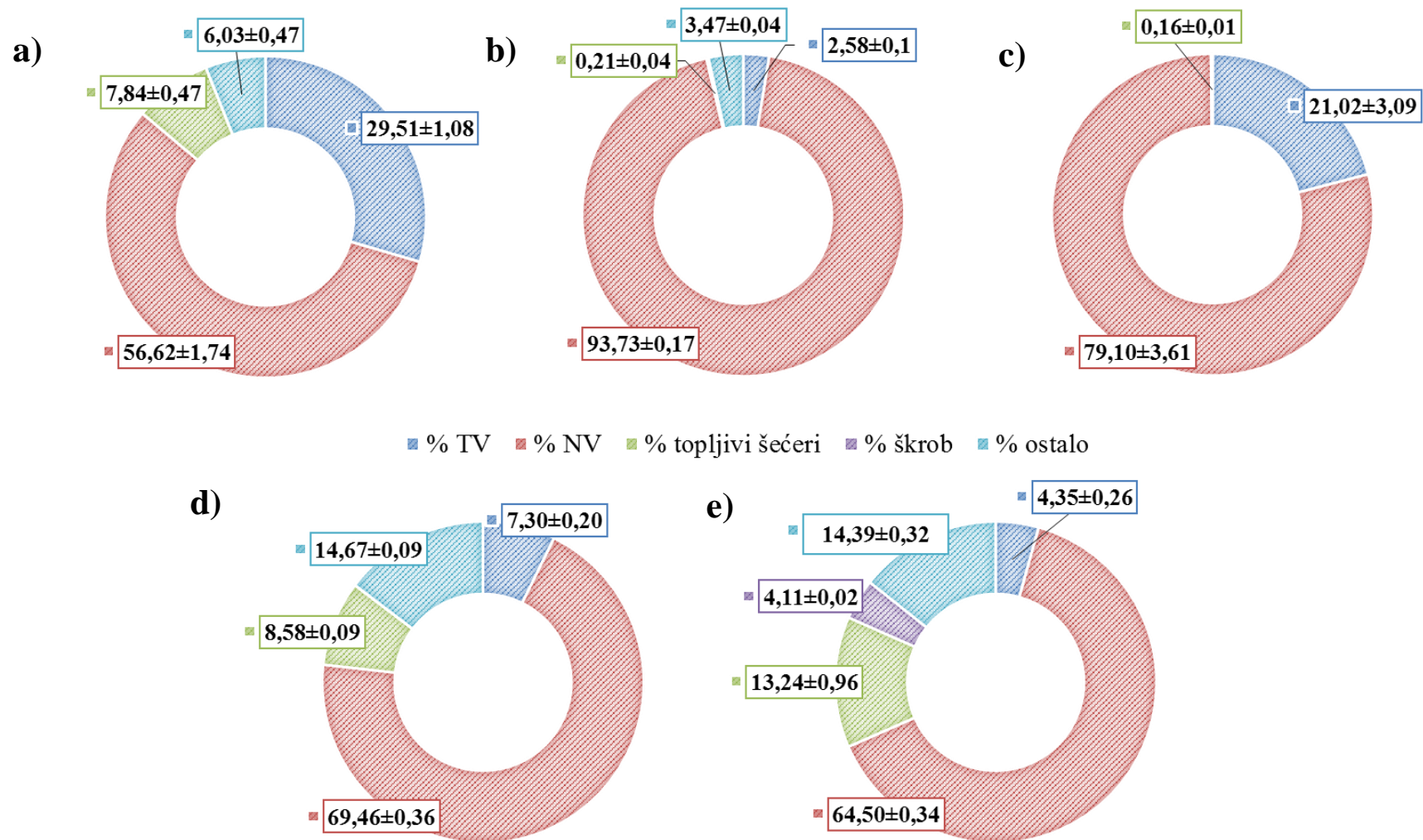
### 4.3 Analiza ugljikohidratne frakcije

Ugljikohidratna frakcija predstavljala je ciljenu makrokomponentu istraživanih sekundarnih biljnih sirovina. Analiza iste obuhvaćala je određivanje nestrukturnih i strukturnih ugljikohidrata. Nestrukturani ugljikohidrati obuhvaćaju šećerne alkohole, monosaharide, disaharide, izvorno prisutne oligosaharide i škrob (Raessler i sur., 2010). Osim monosaharida i disaharida, određenih u ekstraktibilnoj suhoj tvari, u korištenim sirovinama izravno je određen još i škrob, dok je udjel izvorno prisutnih oligosaharida procijenjen nakon analize strukturnih polisaharida iz razlike udjela pojedinih ugljikohidratnih komponenata.

Strukturni ugljikohidrati prvotno su određeni kao topljiva i netopljiva vlakna te topljivi i netopljivi polisaharidi nakon korekcije za udjel lignina. Nakon potpune kiselinske hidrolize, kvantifikacijom oslobođenih monomera također je određen udjel i sastav strukturnih polisaharida.

#### 4.3.1 Udjeli strukturnih polisaharida

Slika 26 prikazuje raspodjelu udjela nestrukturnih i strukturnih ugljikohidrata u ukupnoj ugljikohidratnoj frakciji sekundarnih biljnih sirovina (Tablica 30). Općenito, netopljiva vlakna bila su najzastupljiva ugljikohidratna komponenta u svim sirovinama, a najveći udjel određen je u WS (93,7 % ugljikohidratne frakcije, tj. 91 % suhe tvari sirovine).



Slika 26. Udjeli pojedinih ugljikohidratnih komponenata (% ugljikohidratne frakcije) u ugljikohidratnoj frakciji (a) pulpe šećerne repe, (b) ljuske oraha, (c) ljuske kakaovog zrna, (d) ljuske crvenog luka i (e) mahune graška; TV - topljiva vlakna, NV - netopljiva vlakna.

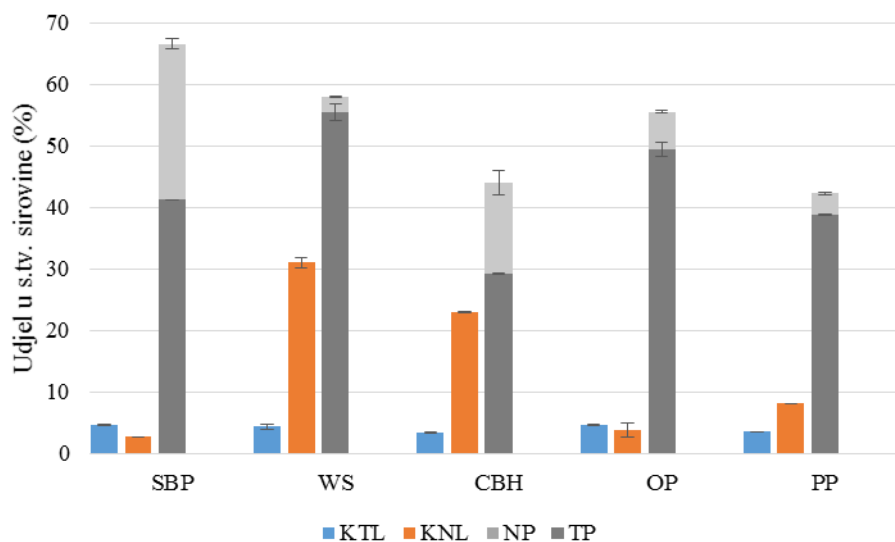
Najmanji relativni i apsolutni udjel netopljivih vlakana određen je u SBP (u ugljikohidratnoj frakciji 56,6 % i u suhoj tvari ~ 49 %). Najviše topljivih vlakana određeno je u ugljikohidratnim frakcijama SBP i CBH, 29,5 % i 21,2 %, odnosno približno 25 % i 15 % u suhoj tvari svake sirovine. U ugljikohidratnim frakcijama ostalih sirovina, topljiva vlakana bila su značajno manje zastupljena, 2,6-7,3 %, odnosno 2,5-6,0 % u suhoj tvari WS, OP i PP. Relativni omjer netopljivih i topljivih vlakana za pojedine sirovine iznosio je približno 2:1 (SBP), 36:1 (WS), 3,5:1 (CBH), 9,5:1 (OP) i 14,5:1 (PP). Općenito, omjer netopljivih i topljivih vlakana značajno može utjecati na strukturu i organoleptička svojstva proizvoda u koji se dodaju biljna vlakna (Esteban i sur., 1998). Općenito je prihvaćeno da izvori vlakana prikladni za primjenu u prehrambenim proizvodima imaju omjer netopljivih i topljivih vlakana približno 2:1 (Jaime i sur., 2002). U tom kontekstu, SBP i CBH mogu se razmatrati za izravnu primjenu kao izvori prehrambenih vlakana. Nestrukturani ugljikohidrati značajno su bili zastupljeni u OP i PP, pri čemu su se u OP gotovo 2/3 odnosile na neidentificirane komponente koje se mogu pripisati prisutnosti fruktooligosaharida kojima ova sirovina obiluje, dok je kod PP određen i škrob (3,2 % s.tv. sirovine), a također i značajan udjel neidentificiranih ugljikohidratnih komponentata.

Nakon potpune kiselinske hidrolize alkoholno-netopljivog ostatka (ostatak nakon trostruke ekstrakcije 70 %-tnim etanolom), određeni su udjeli u kiselini netopljivog lignina (KNL) i u kiselini topljivog lignina (KTL). Lignin se prilikom analize vlakana kvantificira u obliku netopljivih vlakana te je stoga potrebna korekcija njihovog udjela za udjel lignina kako bi se dobio podatak o udjelu netopljivih polisaharida (NP) (Slika 27). Udjel topljivih polisaharida (TP) istovjetan je udjelu topljivih vlakana. Iz rezultata je vidljivo da WS i CBH sadrže značajan udjel KNL, 31 % s.tv. u WS te 23 % s.tv. u CBH. Dobiveni podaci u skladu su s prethodno objavljenim podacima u dostupnoj literaturi (navedeno u poglavlju 2.3.2), uz manje razlike koje se mogu pripisati izvornim razlikama biljnih materijala, ali i metodama određivanja lignina. OP i SBP sadržavale su najmanji udjel KNL, ali i ukupnog lignina, 2,7 i 3,8 % s.tv. sirovine, odnosno 7,4 i 8,5 % s.tv. sirovine. PP je sadržavala nešto veći udjel KNL, 8,1 % s.tv. sirovine; međutim, i dalje znatno manje nego WS i CBH. KTL je u svim sirovinama iznosio približno 4 % s.tv. (3,3 % (CBH) - 4,7 % (OP)).

Korigirane vrijednosti netopljivih vlakana za udjel ukupnog (KNL + KTL) lignina daju stvarne vrijednosti udjela netopljivih strukturnih polisaharida, a u kombinaciji s udjelom topljivih polisaharida (topljivih vlakana), dobivaju se podaci stvarnog udjela ukupnih strukturnih polisaharida (Slika 27). Najveći udjel istih (66,6 % s.tv. sirovine) sadrži SBP, od čega gotovo 2/3 se odnosi na NP, a nešto više od 1/3 na TP. Najmanji udjel ukupnih strukturnih polisaharida (42,3 % s.tv. sirovine) sadrži PP, koji se uglavnom odnose na netopljive polisaharide (38,9 %



s.tv. sirovine). Gotovo jednak udjel ukupnih strukturnih polisaharida određen je u CBH (44,0 % s.tv. sirovine), a omjer NP i TP iznosi je 2:1, kao i kod SBP. Najveći udjel NP (55,5 % s.tv. sirovine) određen je u WS. OP također sadrži značajan udjel NP, gotovo 50 % s.tv. sirovine te vrlo nizak udjel TP. Dobiveni podaci ukazuju na različite strukture staničnih stijenki korištenih sekundarnih biljnih sirovina što će se odraziti na daljnje postupke izdvajanja pojedinih strukturnih polisaharida.



Slika 27. Udjeli u kiselini topljivog lignina (KTL), u kiselini netopljivog lignina (KNL), netopljivih polisaharida (NP) i topljivih polisaharida u analiziranim sekundarnim biljnim sirovinama.

#### 4.3.2 Monomerni sastav strukturnih polisaharida

Određivanje monomernog sastava najčešće je prvi korak karakterizacije polisaharida biljne stanične stijenke. Pritom, prethodno je nužno provesti potpunu hidrolizu polisaharida, za koju se mogu koristiti enzimski i kemijski postupci (Raessler, 2011). Enzimski postupci zahtijevaju primjenu više različitih enzima, a zbog njihove visoke specifičnosti te blagih hidrolitičkih uvjeta ne nastaju degradativni produkti tijekom hidrolize. S druge strane, kemijski postupci u pravilu podrazumijevaju primjenu kiselina, čije je hidrolitičko djelovanje nespecifično. Upravo zbog toga, primjena kiselinske hidrolize puno je robusnija i raširenija, budući da nespecifičnost omogućuje bržu i jeftiniju hidrolizu (Raessler, 2011), ali uz neizbježno nastajanje manje količine degradativnih produkata hidrolize koji mogu biti izvor kvantitativnih odstupanja ukoliko se hidroliza pažljivo ne optimira. Najčešće se kiselinska hidroliza provodi u dva koraka: u prvom koraku s koncentriranom kiselinom, čime se osigurava solubilizacija visokoorganiziranih i otpornih polisaharida, poput kristalinične celuloze, a zatim se, u drugom

koraku, provodi hidroliza razrijeđenom kiselinom i pri povišenoj temperaturi, što je dovoljno za hidrolizu topljivih polisaharida i oligosaharida.

Nakon potpune hidrolize, u tekućem hidrolizatu nalaze se monosaharidi koji se mogu odrediti različitim instrumentalnim metodama. Kod analize složenih smjesa monosaharida, kakvi su i hidrolizati biljnih polisaharida, glavni problem predstavlja kromatografska separacija koja može biti otežana uslijed sličnosti pojedinih izomernih oblika molekula šećera, dok nedostatak kromofora ili fluorofora u molekulama ograničava izravnu detekciju. Najčešće korištene instrumentalne tehnike za analizu monosaharida su tekućinska i plinska kromatografija, pri čemu kod tekućinske kromatografije analiza monosaharida može biti izravna i posredna, dok kod plinske kromatografije isključivo posredna, odnosno nakon derivatizacije monosaharida.

U ovome radu korištene su 3 metode određivanja monomernog sastava, od kojih 2 metode tekućinske kromatografije: tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC) i tankoslojna kromatografija visoke učinkovitosti (HPTLC), dok je metoda plinske kromatografije (GC, 3. korištena instrumentalna metoda) poslužila kao referentna metoda.

#### 4.3.2.1 Razvoj metoda

##### 4.3.2.1.1 Tankoslojna kromatografija visoke učinkovitosti (HPTLC)

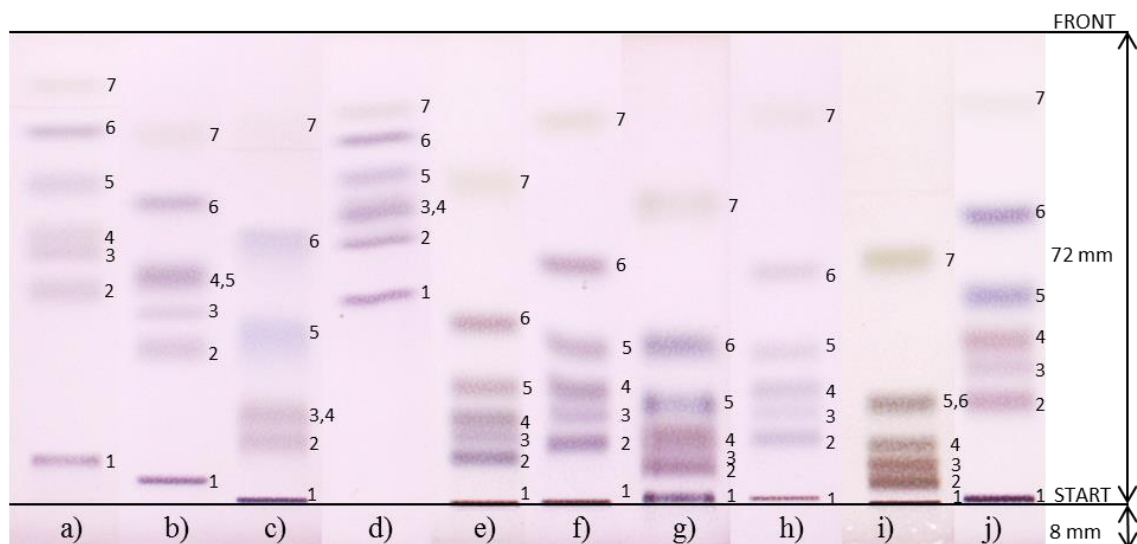
HPTLC je suvremena inačica tankoslojne kromatografije (TLC) te predstavlja instrumentaliziranu kvantitativnu metodu u kojoj se koriste nosači veličine čestica 5  $\mu\text{m}$  (12-20  $\mu\text{m}$  u klasičnoj TLC), što omogućuje bržu i efikasniju separaciju (Sherma, 2000), uz zadržane prednosti klasične TLC tehnike kao što su jednostavnost, brzina i efikasnost metode, niska cijena analize, jednostavno održavanje opreme, kao i mogućnost istovremene analize nekoliko uzoraka te ponovljenih (različitih) detekcija istog kromatograma (Sherma, 2000; Maloney, 2003; Li i sur., 2013).

Prvi izbor stacionarne faze u HPTLC analizi ugljikohidrata su silika-gel nosači, a u svrhu poboljšanja rezolucije, površina istih može se modificirati primjenom pufera (boratnih ili fosfatnih) (Prošek i sur., 1991). Mobilne faze mogu biti različite te se primjenjuju smjese vode, acetonitrila, alkohola (metanola, etanola, 1-propanola, 2-propanola, 1-butanola), acetona, octene kiseline, etil acetata i piridina, kao otapala koja uspješno razdvajaju šećere (Maloney, 2003). U separaciji mono-, di- i nekih trisaharida često se koristi smjesa acetonitrila i vode (85:15 v/v). Mobilne faze također se mogu impregnirati (kao i stacionarne) u svrhu poboljšanja separacije (Maloney, 2003). S obzirom da šećeri apsorbiraju jedino UV zračenje vrlo niskih valnih duljina, u detekciji se najčešće koriste postkromatografske derivatizacijske metode kako bi se postigla zadovoljavajuća vidljivost razdvojenih analita. Pritom se mogu koristiti različiti

reagensi, od kojih u analizi šećera najčešće difenilamin-anilin-fosforna kiselina (DAP reagens) (Li i sur., 2013). Vizualizacija nakon derivatizacije navedenim reagensom provodi se zagrijavanjem pri visokoj temperaturi. Kvantifikacija šećera na derivatiziranim razvijenim HPLTC pločama provodi se pomoću denzitometra ili digitalnim video skenerima, odnosno obradom digitalne fotografije razvijene HPTLC ploče (Prošek i sur., 1991).

U ovome radu istražena je mogućnost primjene HPTLC metode za analizu monomernog sastava hidrolizata sekundarnih biljnih sirovina. Prilikom razvijanja metode optimiran je sastav mobilne faze (otapala za razvijanje) te priprema stacionarne faze u smislu prethodne impregnacije natrijevim dihidrogen fosfatom ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Utjecaj navedenih parametara praćen je kroz uspješnost separacije 7 monomernih konstituenata biljnih polisaharida - galakturonske kiseline, galaktoze, glukoze, manoze, arabinoze, ksiloze i ramnoze (Slika 28).

Iz kromatograma dobivenih tijekom optimizacije separacije vidljivo je da povećanje relativnog udjela ukupne organske komponente mobilne faze povećava zadržavanje analita (kromatogrami b i c u odnosu na kromatogram a), s time da relativno povećanje udjela etil acetata i 1-propanola najviše pridonosi jačem zadržavanju analita (kromatogram c). Dodatak mravlje kiseline značajno je smanjio retenciju i rezoluciju analita (kromatogram d). Impregnacija stacionarne faze otopinom  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  značajno je utjecala na separaciju analiziranih monomera, povećala je njihovo zadržavanje na stacionarnoj fazi, a također je poboljšala rezoluciju između pojedinih monomera, posebno glukoze i manoze, što se još više istaknulo nakon 3 uzastopna razvijanja HPTLC ploče (kromatogram f). Promjena pH otopine soli za impregnaciju nije imala jasnu tendenciju utjecaja na analite (kromatogrami g, h, i), dok se utjecaj molarnosti impregnacijske otopine očituje u jačem zadržavanju analita pri višim koncentracijama. Kao optimalni uvjeti separacije odabrani su: impregnacija HPTLC ploče 0,5 M otopinom  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH podešenog na 5,0, te trostruko razvijanje ploče mobilnom fazom sastava  $\text{AcN}:\text{H}_2\text{O}:\text{EtOAc}:1\text{-PrOH}$  17:3:4:4 (v/v/v/v) (Slika 28, kromatogram h). Ovi uvjeti rezultirali su vrlo sličnim kromatogramom kao i pri impregnaciji bez prethodnog podešavanja pH impregnacijske otopine, međutim, zbog bolje reproducibilnosti metode, odlučeno je da se pH impregnacijske otopine podesi na 5,0.

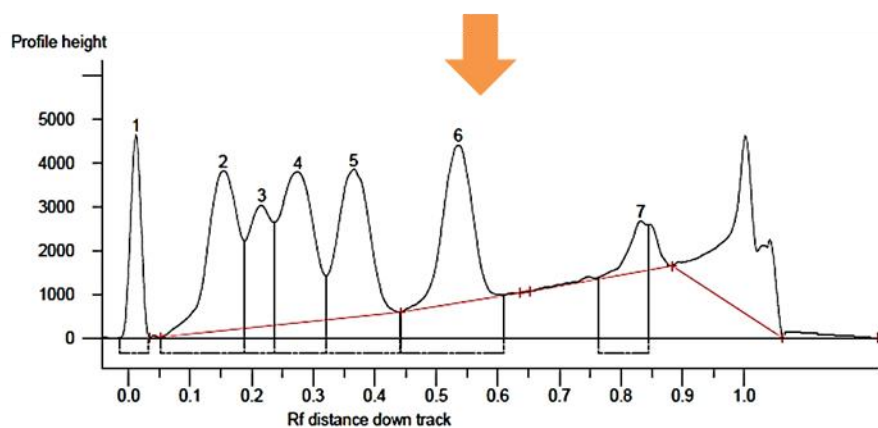
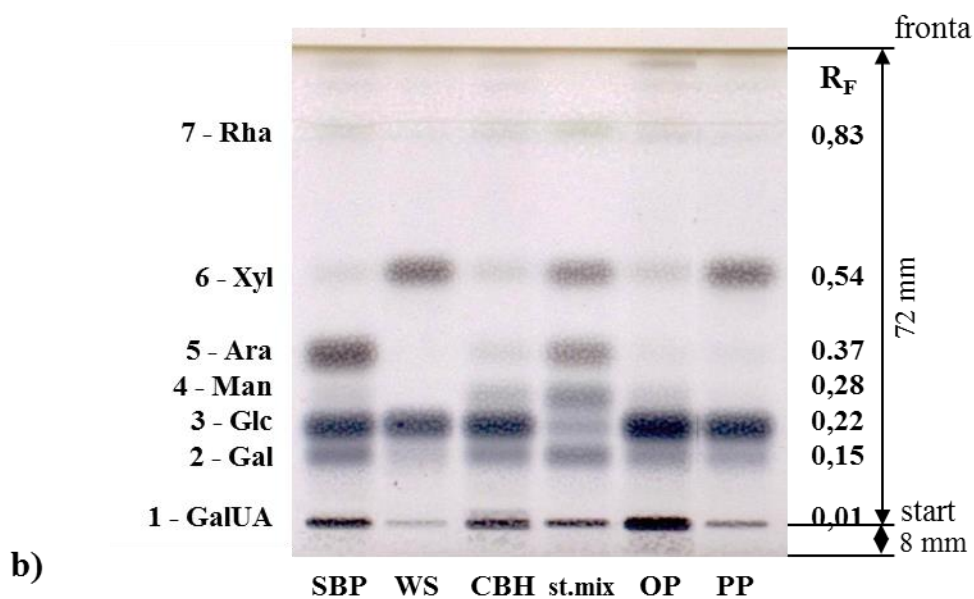


	Mobilna faza	Omjer otapala (v/v/v/v)	Razvijanje ploče	Impregnacija
a)	AcN:H <sub>2</sub> O:EtOAc:1-PrOH	17:3:4:4	3x	-
b)	AcN:H <sub>2</sub> O:EtOAc:1-PrOH	17:1:6:6	3x	-
c)	AcN:H <sub>2</sub> O:EtOAc:1-PrOH	18:3:6:6	3x	-
d)	AcN:H <sub>2</sub> O:EtOAc:1-PrOH:HCOOH	17:3:4:4:1	3x	-
e)	AcN:H <sub>2</sub> O:EtOAc:1-PrOH	17:3:4:4	2x	0.5M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , *
f)	AcN:H <sub>2</sub> O:EtOAc:1-PrOH	17:3:4:4	3x	0.5M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , *
g)	AcN:H <sub>2</sub> O:EtOAc:1-PrOH	17:3:4:4	3x	0.5M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH=3.0
h)	AcN:H <sub>2</sub> O:EtOAc:1-PrOH	17:3:4:4	3x	0.5M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH=5.0
i)	AcN:H <sub>2</sub> O:EtOAc:1-PrOH	17:3:4:4	3x	0.5M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH=7.0
j)	AcN:H <sub>2</sub> O:EtOAc:1-PrOH	17:3:4:4	3x	0.3M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH=5.0

\*pH nije podešen

Slika 28. Prikaz utjecaja različitog sastava mobilne faze na razdvajanje ispitivanih monosaharida primjenom HPTLC metode. AcN - acetonitril, EtOAc - etil acetat, 1-PrOH - 1-propanol, HCOOH - mravlja kiselina, 1 - galakturonska kiselina, 2 - galaktoza, 3 - glukoza, 4 - manoza, 5 - arabinoza, 6 - ksiloza, 7 - ramnoza.

Primjenom razvijene HPTLC metode analizirani su hidrolizati sekundarnih biljnih sirovina; detekcija je izvršena nakon postkromatografske derivatizacije DAP reagensom te kratke aktivacije ploče zagrijavanjem pri visokoj temperaturi, dok je kvantifikacija omogućena obradom digitalne fotografije razvijene HPTLC ploče. Slika 29 prikazuje derivatiziranu ploču nakon analize hidrolizata sekundarnih biljnih sirovina te primjer kromatograma dobivenog obradom digitalne fotografije derivatizirane ploče.



Slika 29. Kvalitativna analiza monomernog sastava sekundarnih biljnih sirovina primjenom optimalnih parametara HPTLC metode, a) primjer derivatizirane ploče, b) primjer kromatograma smjese standarda (nanos 10  $\mu$ L uzorka koncentracije 0,1 mg/mL) dobivenog računalnom obradom digitalne fotografije derivatizirane HPTLC ploče. SBP - pulpa šećerne repe, WS - ljuska oraha, CBH - ljuska kakaovog zrna, OP - ljuska crvenog luka, PP - mahuna graška, GalUA - galakturonska kiselina, Gal - galaktoza, Glc - glukoza, Man - manoza, Ara - arabinoza, Xyl - ksiloza, Rha - ramnoza.

Prednost ovakve analize je u tome što se za relativno kratko vrijeme može dobiti kvalitativna slika monomernog sastava, istovremeno za više uzoraka. Kako je vidljivo (Slika 29a) glukoza je bila dominantan monomer u svim uzorcima, a uz glukozu su u SBP značajno bili zastupljeni šećeri arabinoza, galakturonska kiselina i galaktoza, u WS ksiloza, u OP galakturonska kiselina, dok u CBH galakturonska kiselina, galaktoza i manoza. Rezultati kvalitativne analize upućuju na značajnu zastupljenost pektina u SBP, OP i CBH, s time da je u SBP pektinska frakcija bogata arabinanima, dok u CBH i OP galaktanima, te značajnu zastupljenost ksilana i/ili ksiloglukana u WS i PP.

#### 4.3.2.1.2 Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC-PDA)

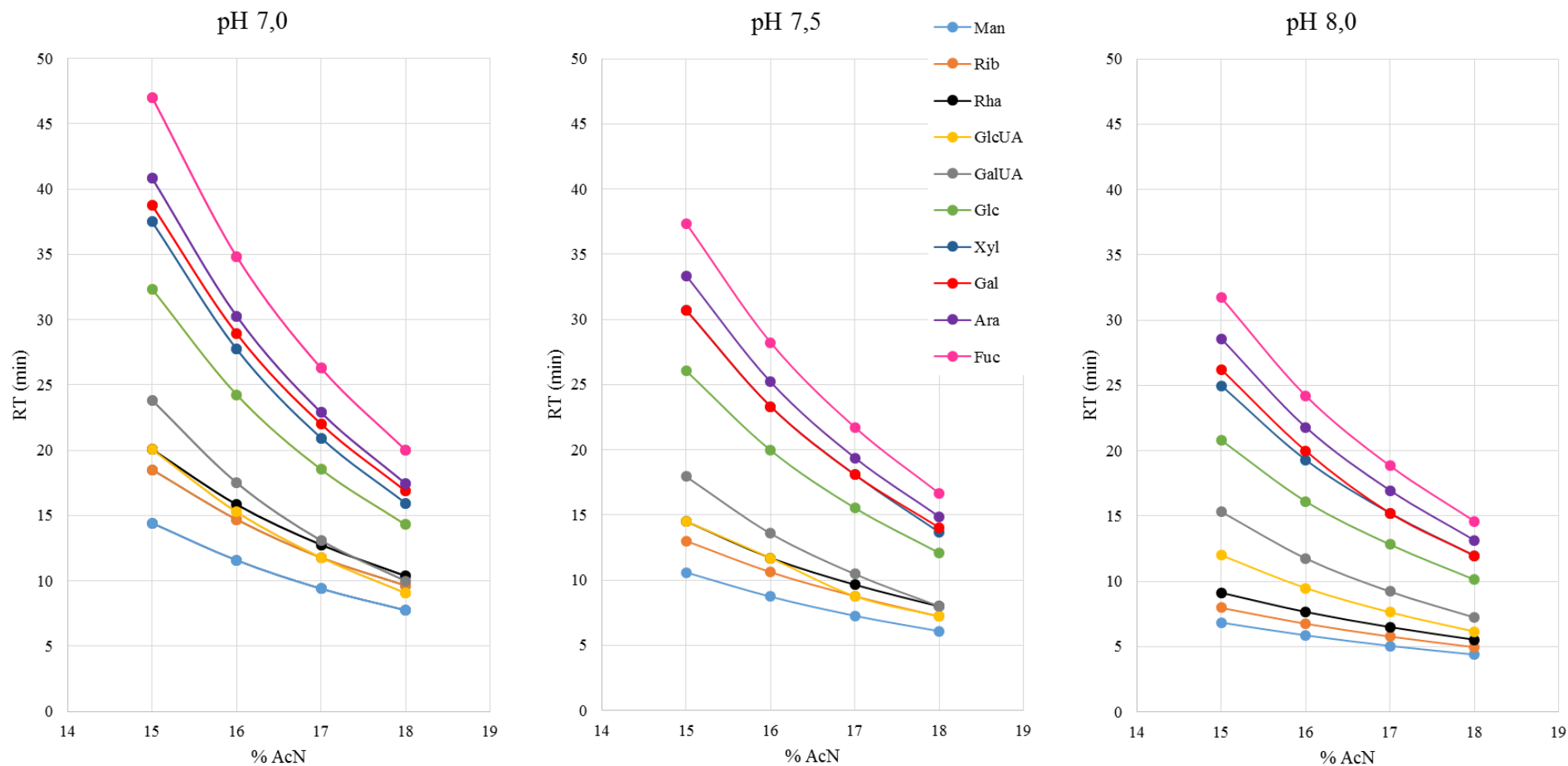
Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (*engl.* high performance liquid chromatography - HPLC) danas je vrlo često korištena analitička tehnika zbog svoje visoke selektivnosti i preciznosti. Intenzivna primjena u analizi ugljikohidrata započinja 1980-ih godina (Honda i sur., 2003) te je do danas razvijena u različitim mehanizmima separacije, kombinacijama specijaliziranih stacionarnih i različitih mobilnih faza te načina detekcije, bilo u izravnoj ili posrednoj analizi, kako bi zadovoljila zahtjeve analize šećera iz različitih supstrata. Izravna analiza nepromijenjenih molekula šećera često zahtijeva specijaliziranu kromatografsku opremu (kolone i detektore), a takve analize u nekim slučajevima imaju smanjenu osjetljivost te viši limit detekcije, a također ne pružaju mogućnost precizne optimizacije separacije s obzirom na specifičan način rada detektora (primjerice, refrakcijski detektor ne podržava gradijentnu eluciju). Kako bi se nadišli problemi vezani uz izravnu analizu šećera, molekule se podvrgavaju derivatizaciji. Derivatizacija uzrokuje promjenu svojstava molekule šećera uslijed čega je omogućena poboljšana kromatografska separacija (primjerice, promjenom naboja molekule) ili drugačiji način detekcije (primjerice, omogućena UV ili VIS detekcija nakon derivatizacije aromatskim spojevima koji služe kao kromofori molekule-derivata) (Shen i Perreault, 1998; Lamari, 2003). Derivatizacija omogućava razvoj visokoselektivnih, preciznih i visokoosjetljivih metoda u analizi ugljikohidrata, a podrazumijeva tzv. „označavanje“ šećera, prikladnim reagensom pri određenim uvjetima ili pak strukturnom promjenu izvornog oblika molekule. Derivatizacija se može provesti prije, za vrijeme ili nakon kromatografske separacije (ali svakako prije detekcije), pa se tako razlikuju pretkolonska (*engl.* pre-column), in-line i postkolonska (*engl.* post-column) derivatizacija. Od navedenih je danas najraširenija pretkolonska derivatizacija, za koju su razvijeni brojni postupci. Mehanizmi derivatizacije šećera za HPLC analize su brojni, među kojima se ističe skupina derivatizacijskih reakcija na reducirajućem kraju molekule šećera zbog brojnosti razvijenih derivatizirajućih reagensa i rasprostranjenosti primjene (Harvey, 2011).

3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on (PMP) jedan se od najpopularnijih reagensa za pretkolonsku derivatizaciju šećera za HPLC analizu. Postupak je prvi puta razvijen 1989. (Honda i sur., 1989) kao alternativa tadašnjim postupcima. Nastajanje PMP derivata šećera podrazumijeva reakciju aktivne metilenske skupine pirazolonskog prstena molekule reagensa s aldehidnom skupinom molekule šećera (reducirajući kraj), pri čemu nastaje *bis*-PMP derivat (Honda i sur., 2003). Prema izvornome radu, optimalni prinosi reakcije postignuti su primjenom 0,3 M otopine NaOH, kao lužnatog reakcijskog medija, 0,5 M otopine PMP reagensa, temperature reakcije 70

°C i trajanja od 30 min (Honda i sur., 1989). Ovi uvjeti uglavnom su zadržani i u modificiranim verzijama metode objavljenima od drugih autora. Adicija dvije PMP molekule odvija se postupno te je za potpunu reakciju uvijek potrebno dodati reagens u suvišku. Uglavnom je priznato da molarni omjer 10:1 osigurava potpunu reakciju (Zhang i sur., 2011). S analitičkog stajališta, najvažnija karakteristika PMP derivata je njihova snažna apsorpcija pri 245 nm (Honda i sur., 1989). Kromatografsko (HPLC) razdvajanje PMP derivata provodi se kromatografijom obrnutih faza na C18 stacionarnim fazama, uz UV detekciju. Stoga je jedna od osnovnih prednosti ove metode relativno nizak trošak analize uslijed korištenja relativno standardne HPLC konfiguracije, uz povećanu osjetljivost metode te mogućnost precizne optimizacije razdvajanja složenih smjesa monosaharida.

U ovome radu, prilikom optimizacije HPLC-PDA metode za analizu PMP-derivata šećera, ispitan je utjecaj sastava i pH vrijednosti mobilne faze na zadržavanje 8 monosaharida (manozna (Man), ribozna (Rib), ramnoza (Rha), glukoza (Glc), ksiloza (Xyl), galaktoza (Gal), arabinoza (Ara), fukoza (Fuc)) te 2 uronske kiseline (galakturonska kiselina (GalUA) i glukuronska kiselina (GlcUA)) (Slika 30). Prva faza optimizacije osmišljena je s obzirom na promjenu 3 pH vrijednosti vodene komponente mobilne faze (fosfatni pufer) te 4 različita udjela organskog dijela mobilne faze (acetonitrila, AcN). Njihovom kombinacijom kreirane su zasebne izokratne metode prema kojima je analizirana derivatizirana smjesa navedenih 10 monosaharida. Iz prikaza ovisnosti retencijskog vremena (RT) o udjelu acetonitrila u mobilnoj fazi za svaku od 3 pH vrijednosti vodene komponente mobilne faze (Slika 30).

Retencije svih monomera smanjivale su se povećanjem pH mobilne faze, kao i povećanjem udjela AcN u istoj. Pritom se rezolucija između pojedinih pikova, kao i sam oblik pikova također mijenjao. Ovi rezultati (kraće vrijeme zadržavanja povećanjem pH i/ili udjela acetonitrila) u skladu su s prethodnim istraživanjima (Dai i sur., 2010; Li i sur., 2013). Najveća promjena retencija bila je vidljiva kod uronskih kiselina (GlcUA i GalUA) te je više ovisila o promjeni udjela acetonitrila nego o promjeni pH. S druge strane, redoslijed eluacije neutralnih šećera ostao je nepromijenjen (Man<Rib<Rha<Glc<Xyl<Gal<Ara<Fuc) i njihove retencije su se relativno sporije mijenjale u usporedbi s retencijama uronskih kiselina.



Slika 30. Optimizacija HPLC-PDA metode za određivanje monomernog sastava polisaharida - utjecaj promjene vremena retencije (*engl.* retention time - RT) PMP-derivata monosaharida u ovisnosti o udjelu acetonitrila (% AcN) u mobilnoj fazi kod triju pH vrijednosti vodene komponente mobilne faze. Man - PMP-manoza; Rib - PMP-riboza; Rha - PMP-ramnoza; GlcUA - PMP-glukuronska kiselina; GalUA - PMP-galakturonska kiselina; Glc - PMP-glukoza; Xyl - PMP-ksiloza; Gal - PMP-galaktoza; Ara - PMP-arabinoza; Fuc - PMP-fukoza.



Mehanizam separacije PMP derivata monosaharida kromatografijom obrnutih faza nije do sada u potpunosti objašnjen. Međutim, iz rezultata (Slika 30) je vidljivo da se radi o ionizirajućim molekulama kod kojih je ravnoteža ionizacije vrlo osjetljiva na relativno blage promjene pH vrijednosti mobilne faze. Ionizacija molekule PMP derivata potječe od keto-enolne tautomerizacije u pirazolonskom prstenu molekule, koja se događa pri višim pH vrijednostima, odnosno od disocijacije nastale enolne skupine. Pošto stupanj tautomerizacije ovisi o pH, i ionizacija molekule također ovisi o pH (Honda, 2003). Ionizacijom enolne skupine molekula dobiva negativni naboj te je manje hidrofobnog karaktera, što uvjetuje bržu eluaciju s nepolarne stacionarne faze. Hidrofoban karakter molekule potječe od pirazolonskog prstena supstituiranog fenilnim i metilnim ostatkom (koji naglašavaju hidrofobnost) te se kod smanjene ionizacije ostvaruje jača interakcija s nepolarnom stacionarnom fazom, tj. PMP derivat sporije eluira. Također, primijećeno je da dužim zadržavanjem na koloni pikovi analita su postajali širi, što ukazuje na mogućnost sekundarnih interakcija do kojih dolazi prilikom eluacije analita s relativno smanjenim stupnjem ionizacije.

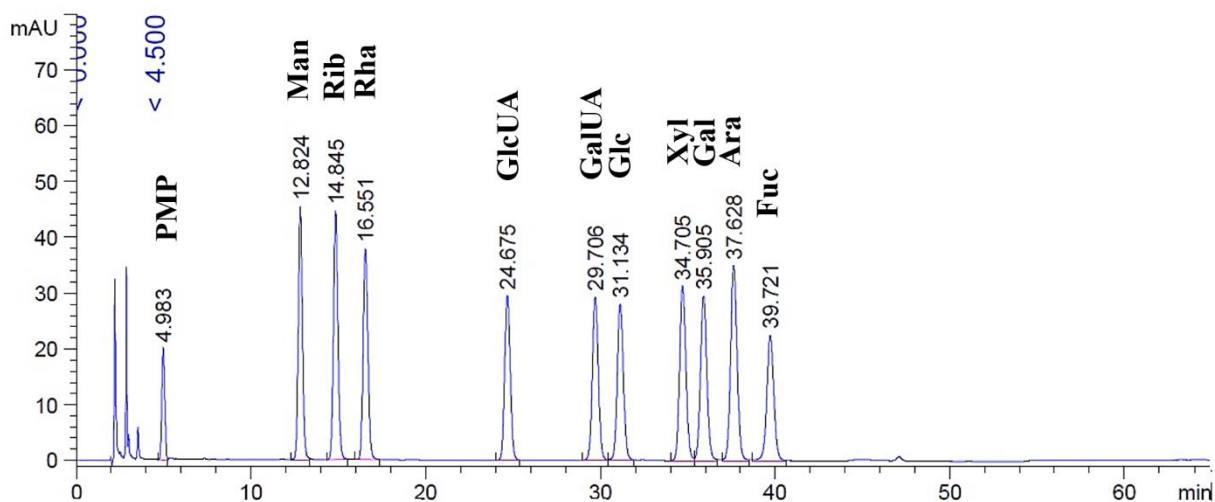
Najpovoljnija separacija PMP derivata analiziranih monosaharida postignuta je pri pH vrijednosti pufera (vodene komponente mobilne faze) 8,0 i uz volumni udjel acetonitrila u mobilnoj fazi od 15 %. Ujedno se pH vrijednost 8,0 pokazala kao najstabilniji sustav s obzirom na promjenu udjela AcN budući da su svi derivati zadržali redosljed eluacije, što nije bio slučaj pri pH 7,0 i pH 7,5. Iz rezultata (Slika 30) također je vidljivo da su rubni uvjeti za optimizaciju dobro odabrani, tj. daljnje povećavanje pH iznad 8,0 nije potrebno, budući da bi rezultiralo još manjom retencijom analita i mogućom koeluacijom ksiloze i galaktoze, a također nije ni izvedivo (više od 8,2) zbog kapaciteta fosfatnog pufera. Jednako tako, smanjenje pH ispod 7,0 rezultiralo bi jačim efektom širenja pikova prema baznoj liniji i njihovim narušenim oblikom i simetijom te predugim trajanjem metode. Udjel AcN veći od 18 % rezultirao bi jače izraženom koeluacijom uslijed smanjene retencije, dok kod udjela manjeg od 15 % značajno se povećava retencija čime se gubi na rezoluciji i obliku pikova. Uspostavom izokratnih metoda za definirane rubne uvjete, vidljivo je kako izokratna elucija nije pogodna za optimalnu separaciju i rezoluciju pikova, te je potrebno definirati gradijent udjela acetonitrila pri zadanoj optimalnoj pH vrijednosti pufera (pH 8,0).

Daljnja optimizacija uključivala je podešavanje gradijentne eluacije te koncentracije pufera. Tablica 34 prikazuje postignute optimalne uvjete separacije analiziranih PMP derivata monosaharida.

Tablica 34. Optimalni parametric HPLC-PDA metode za analizu smjese PMP derivata 8 neutralnih šećera i 2 uronske kiseline.

Parametri metode	
Mobilna faza	A - 100 mM Na-fosfatni pufer, pH 8,0 B - acetonitril
Stacionarna faza	Zorbax Extend C18, 4,6 x 250, 5 $\mu$ m
Elucija	gradijentno 0. min - 12 % B 35. min - 17 % B 40. min - 17 % B
Gradijent	41. min - 20 % B 50. min - 20 % B 41. min - 12 % B 65. min - 12 % B
Protok	1 mL/min
Temperatura kolone	25 °C
Detekcija	PDA, 245 nm
Volumen injektiranja	10 $\mu$ L
Temperatura autosamplera	5 °C
Trajanje metode	65 min

Slika 31 prikazuje kromatogram smjese standarada prema optimiranoj HPLC-PDA metodi za analizu PMP derivata neutralnih šećera i uronskih kiselina.



Slika 31. Kromatogram smjese PMP derivata monosaharida dobiven HPLC-PDA analizom pri optimalnim uvjetima (PMP - suvišak PMP reagensa, Man - PMP-manoza, Rib - PMP-riboza, Rha - PMP-ramnoza, GlcUA - PMP-glukuronska kiselina, GalUA - PMP-galakturonska kiselina, Glc - PMP-glukoza, Xyl - PMP-ksiloza, Gal - PMP-galaktoza, Ara - PMP-arabinoza, Fuc - PMP-fukoza).

#### 4.3.2.2 Usporedba s referentnom metodom (GC-FID)

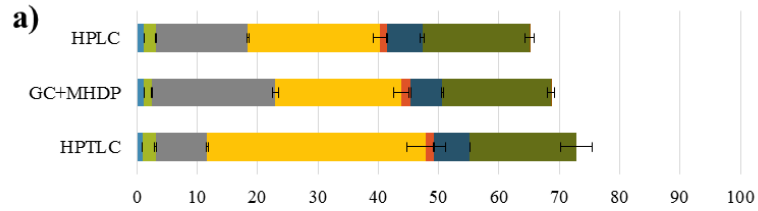
Šećeri nisu prirodno hlapivi spojevi te ih je za analizu primjenom plinske kromatografije potrebno prevesti u odgovarajuće hlapive derivate (Ruiz-Matute, 2011). Primjena plinske kromatografije u analizi šećera, u smislu kvantitativne analize smjese neutralnih i amino šećera, počela je 1960-ih godina, relativno kasno u odnosu na ostale spojeve, prvenstveno zbog poteškoća u dobivanju hlapivih derivata (Fox i sur., 2000).

Derivatizacija šećera u alditol acetate podrazumijeva derivatizaciju hidroksilnih skupina molekule, jedna je od prvih derivatizacijskih metoda za GC analizu šećera te je danas najčešće primjenjivana derivatizacijska metoda za GC analizu šećera. Nakon prethodne potpune hidrolize polisaharida, derivatizacija monomera provodi se u 2 osnovna koraka: redukciji i acetilaciji. Redukcijom karbonilne skupine šećera nastaje odgovarajuća molekula polihidroksi alkohola (alditola), a acetilacijom hidroksilnih skupina odgovarajuća molekula hlapivog alditol acetata.

Metoda je izabrana kao referentna s obzirom da se vrlo često koristi u analizama monosaharidnog sastava te za istu postoji daleko veći broj referentnih podataka nego za PMP-HPLC-PDA ili HPTLC metode.

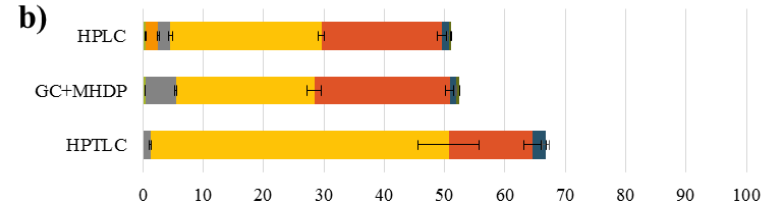
Slika 32 prikazuje udjele identificiranih monomera u suhoj tvari pojedine sekundarne sirovine, određene pomoću 4 različite metode. Udjeli su određeni optimiranim HPTLC i PMP-HPLC-PDA metodama te GC-FID metodom (neutralni šećeri) u kombinaciji s kolorimetrijskom *m*-hidroksidifenil metodom (MHDP) za određivanje uronskih kiselina.

Iz rezultata je vidljivo da HPTLC metoda pokazuje najveća odstupanja u odnosu na referentnu metodu i to najviše u udjelima galakturonske kiseline i glukoze, a zatim i ksiloze, u uzorcima gdje je ista značajno zastupljena (WS i PP). Udjeli galakturonske kiseline određeni HPTLC metodom manji su nego u slučaju referentne MHDP metode, jednako kao i za udjele ksiloze u WS i PP, dok je udjel glukoze značajno veći. Odstupanja se mogu objasniti nepreciznošću odabranog načina kvantifikacije HPTLC ploče, kao i limitacijom same metode. Naime, zbog utjecaja longitudinalne difuzije nanosa (*engl.* band), pojedini analiti nisu se vidjeli kao zasebno separirani pikovi ako su bliskog retencijskog faktora ( $R_f$ ) (primjerice, galaktoza, glukoza i manoza, Slika 29). Nadalje, osjetljivost HPTLC metode za glukozu bila je najniža u odnosu na druge monomere, a odziv metode (površina pika glukoze) slijedio je polinomnu funkciju 2. reda (kvadratna jednadžba). Za takve baždarnе krivulje, promjena površine pika u odnosu na promjenu koncentracije znatno je manja nego kod linearnih krivulja, što može biti izvor pogreške u kvantifikaciji, naročito pri višim koncentracijama.



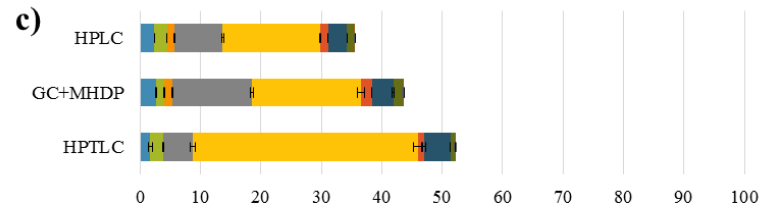
	HPTLC	GC+MHDP	HPLC
■ Man	0,88	1,19 <sup>a</sup>	1,16 <sup>a</sup>
■ Rha	2,20 <sup>a</sup>	1,26	1,97 <sup>a</sup>
■ GlcUA	0,00	0,00	0,00
■ GalUA	8,59	20,52	15,29
■ Glc	36,27	20,85 <sup>a</sup>	21,85 <sup>a</sup>
■ Xyl	1,20 <sup>a</sup>	1,57	1,21 <sup>a</sup>
■ Gal	6,05 <sup>a</sup>	5,24	5,82 <sup>a</sup>
■ Ara	17,65 <sup>a</sup>	17,95 <sup>a</sup>	17,76 <sup>a</sup>
■ Fuc	0,00	0,18 <sup>a</sup>	0,15 <sup>a</sup>

Udjel u s.tv. sirovine (%)



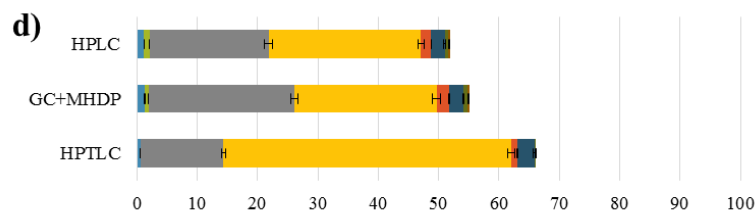
	HPTLC	GC+MHDP	HPLC
■ Man	0,00	0,00	0,00
■ Rha	0,00	0,41	0,46
■ GlcUA	0,00	0,00	2,10
■ GalUA	1,24	5,07	1,96
■ Glc	49,47	22,97 <sup>a</sup>	25,09 <sup>a</sup>
■ Xyl	13,81	22,39 <sup>a</sup>	19,96 <sup>a</sup>
■ Gal	2,26	1,08 <sup>a</sup>	1,16 <sup>a</sup>
■ Ara	0,00	0,54	0,39
■ Fuc	0,00	0,00	0,00

Udjel u s.tv. sirovine (%)



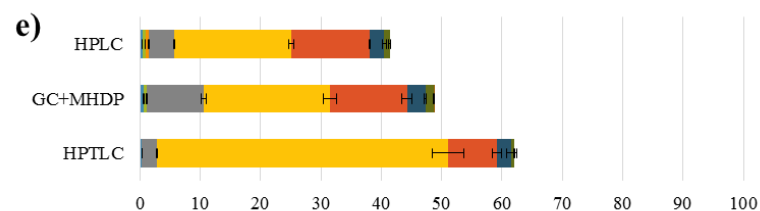
	HPTLC	GC+MHDP	HPLC
■ Man	1,69	2,69 <sup>a</sup>	2,40 <sup>a</sup>
■ Rha	2,14 <sup>a</sup>	1,33	2,07 <sup>a</sup>
■ GlcUA	0,00	1,33 <sup>a</sup>	1,23 <sup>a</sup>
■ GalUA	4,85	13,21	7,95
■ Glc	37,25	17,99	16,13
■ Xyl	1,13 <sup>a</sup>	1,80	1,34 <sup>a</sup>
■ Gal	4,27	3,54	3,10
■ Ara	0,87	1,62	1,22
■ Fuc	0,00	0,18	0,16

Udjel u s.tv. sirovine (%)



	HPTLC	GC+MHDP	HPLC
Man	0,59	1,33	1,21
Rha	0,00	0,58	0,86
GlcUA	0,00	0,00	0,00
GalUA	13,74	24,16	19,74
Glc	47,64	23,60	25,30
Xyl	1,08	2,06	1,64
Gal	2,83	2,37 <sup>a</sup>	2,29 <sup>a</sup>
Ara	0,28	0,76	0,61
Fuc	0,00	0,25 <sup>a</sup>	0,24 <sup>a</sup>

Udjel u s.tv. sirovine (%)



	HPTLC	GC+MHDP	HPLC
Man	0,34 <sup>a</sup>	0,64 <sup>b</sup>	0,40 <sup>a</sup>
Rha	0,00	0,49 <sup>a</sup>	0,52 <sup>a</sup>
GlcUA	0,00	0,00	0,58
GalUA	2,48	9,49	4,24
Glc	48,24	20,92 <sup>a</sup>	19,41 <sup>a</sup>
Xyl	8,06	12,71 <sup>a</sup>	12,92 <sup>a</sup>
Gal	2,43 <sup>a</sup>	3,06 <sup>a</sup>	2,43 <sup>a</sup>
Ara	0,49	1,39	0,88
Fuc	0,00	0,13	0,00

Udjel s.tv. u sirovine (%)

Slika 32. Usporedba monomernog sastava ukupnih strukturnih polisaharida (a) pulpe šećerne repe, (b) ljuske oraha, (c) ljuske kakaovog zrna, (d) ljuske crvenog luka i (e) mahune graška, određenog pomoću 4 metode. Rezultati u istome redu koji nisu statistički značajno različiti ( $p > 0,05$ ;  $n=3$ ) označeni su istim slovom. Man - manoz (manan), Rha - ramnoza (ramnan), GlcUA - glukuronska kiselina (glukuronan), GalUA - galakturonska kiselina (galakturonan), Glc - glukoza (glukan), Xyl - ksiloza (ksilan), Gal - galaktoza (galaktan), Ara - arabinoza (arabinan), Fuc - fukoza (fukan).

Također, zbog velike zastupljenosti glukoze u uzorcima, hidrolizate je bilo potrebno značajno razrijediti, a potom se eventualna pogreška kvantifikacije višestruko umnožila u konačnom izračunu udjela glukoze. S druge strane, smanjeni udjel galakturonske kiseline može se objasniti nemogućnošću precizne kvantifikacije uslijed niskog  $R_f$  za ovaj spoj. Naime, budući da je GalUA pokazala iznimno visoku retenciju na HPTLC ploči (gotovo da nije migrirala), postoji mogućnost za dio GalUA nije bio zahvaćen prilikom programske obrade digitalne fotografije HPTLC ploče, što se u konačnici odrazilo kao smanjeni udjel GalUA u odnosu na referentnu metodu. Iz navedenog se može zaključiti da je razvijena HPTLC metoda pogodna za kvalitativnu analizu monomernog sastava polisaharida sekundarnih biljnih sirovina, dok u kvantitativnom smislu ista je pogodna samo za semikvantitativnu procjenu. Razvijena HPTLC metoda pokazala se netočnom u kvantifikaciji dominantno zastupljenih monomera (Glc i Xyl), zbog karaktera odziva metode, te u kvantifikaciji galakturonske kiseline, čega je uzrok nemogućnost separacije GalUA na HPTLC ploči uslijed njezine impregnacije.

PMP-HPLC-PDA metoda pokazala je vrlo dobro slaganje rezultata s referentnom GC metodom, što se odnosi na rezultate udjela neutralnih šećera. Za udjele uronskih kiselina primijećeno je odstupanje rezultata na način da je HPLC metodom određen manji udjel uronskih kiselina, ali razlika u odnosu na referentnu metodu nije bila tako izražena kao u slučaju HPTLC metode. Ovo odstupanje može se pripisati različitoj specifičnosti dviju analiza. Naime, s obzirom da se GC metodom ne mogu analizirati uronske kiseline, kao referentna metoda uzeta je kolorimetrijska reakcija s *m*-hidroksidifenilom (MHDP), također često korištena metoda za analizu uronskih kiselina. U navedenoj reakciji, reagens je vrlo specifičan za uronske kiseline, a derivati razvijaju ružičasto-crveno obojenje. Ipak, ako uzorak ne sadrži značajan udjel uronskih kiselina, interferencija neutralnih šećera, u smislu povećanja intenziteta obojenja uslijed posmeđivanja u reakciji s vrućom kiselinom, može narušiti točnost metode (Filisetti-Cozzi i Carpita, 1991). U slučaju ovdje analiziranih sekundarnih biljnih sirovina, odstupanje od vrijednosti referentne metode raslo je sa smanjenjem udjela uronskih kiselina u uzorku (najbolja podudarnost rezultata, 82 %, određena je u uzorku OP, a najlošija u uzorku WS (39 %)), što podržava gore navedenu mogućnost izvora pogreške. Nadalje, MHDP metodom glukuronska kiselina određena je samo u CBH, dok HPLC metodom i u WS i PP. Mali udjeli te prisutnost interferencija neutralnih šećera razlog su nepreciznosti prilikom određivanja udjela GlcUA MHDP metodom, budući da se u toj metodi GlcUA ne određuje zasebno već iz razlike udjela ukupnih uronskih kiselina i udjela GalUA. Prilikom HPLC analize, GlcUA se izdvaja kao zasebni analit i stoga se ovaj podatak može uzeti kao mjerodavan. S obzirom na navedeno, razvijena PMP-HPLC-PDA metoda može se smatrati prioritarnijom metodom u odnosu na

GC+MHDP metodu, kojom je omogućeno precizno određivanje udjela pojedinih monomera koji sačinjavaju strukturne polisaharide biljnih staničnih stijenki istraživanih sirovina. Pritom, veliku prednost čini mogućnost istovremene analize neutralnih šećera i uronskih kiselina. Također, derivatizacijski postupak dobivanja PMP derivata, u odnosu na pripremu alditol acetata, jednostavniji je i kraći, dok se od instrumentacije koristi relativno standardna HPLC oprema, uključujući i široko rasprostranjene C18 kolone.

Prema rezultatima PMP-HPLC-PDA analize, u svim uzorcima dominira Glc, u rasponu približno 20-25 % s.tv. sirovine, s iznimkom CBH gdje je najmanje zastupljena (~ 16 % s.tv.). Od ostalih monomera u SBP su dominantno zastupljeni Ara i GlcUA, s približno 18 % i 15 % udjela u suhoj tvari sirovine, a također je značajno zastupljena i Gal (6 %). U WS i PP značajno je zastupljena Xyl, s udjelima približno 20 % i 13 % s.tv. sirovine. U OP se isticao udjel GalUA (~ 20 % s.tv.), a također i u CBH (~ 8 % s.tv.), uz ostale, gotovo podjednako zastupljene (~ 1,5-3 %) monomere. Dobiveni rezultati potvrdili su kvalitativnu HPTLC analizu te ukazuju na značajnu zastupljenost pektinskih polimera u SBP, OP i CBH te ksilana u WS i PP. S obzirom da se radi o heterogenoj skupini polisaharida u oba slučaja, iz monomernog sastava, tj. zastupljenosti drugih vezanih monomera, osim GalUA u slučaju pektina te Xyl u slučaju ksilana, može se zaključiti da je sastav ovih polisaharida, a tim i njihove karakteristike, različit te svojstven pojedinoj sekundarnoj sirovini. Na osnovu dobivenih rezultata, sekundarne biljne sirovine podijeljene su u sirovine bogate pektinom (SBP, CBH i OP) i sirovine bogate ksilanom (WS i PP), a sukladno tome su promatrane u kontekstu izdvajanja pektina i proizvodnje pektinskih oligosaharida (POS), odnosno izdvajanja ksilana i proizvodnje ksilo oligosaharida (XOS).

Ukupni udjel svih monomera sukladan je udjelu ukupnih strukturnih polisaharida u s.tv. sekundarne sirovine (Slika 27): za SBP 65,2 % u odnosu na 66,6 % s.tv. sirovine, za WS 52,8 % u odnosu na 58,0 % s.tv. sirovine, za CBH 35,6 % u odnosu na 44,0 % s.tv. sirovine, za OP 51,8 u odnosu na 55,6 % s.tv. sirovine i za PP 40,7 u odnosu na 42,3 % s.tv. sirovine. Udjeli ukupnih strukturnih polisaharida su ipak nešto viši, što se uglavnom odnosi na prisutnost neugljikohidratnih komponenata polisaharida (acetilnih i metilnih skupina, vezanih proteina, iona metala i sl.). Neugljikohidratne komponente u ovom kontekstu obrađene su kasnije u tekstu (poglavlje 4.3.3).

#### 4.3.2.3 Validacija PMP-HPLC-PDA metode

Razvijena PMP-HPLC-PDA metoda validirana je s obzirom na linearnost, limit detekcije i kvantifikacije, ponovljivost, preciznost i točnost.

#### 4.3.2.3.1 Linearnost

Tablica 35 prikazuje jednadžbe linearnih krivulja s pripadajućim koeficijentima determinacije ( $R^2$ ), dobivene prilikom analize uzoraka standarada u koncentracijskom rasponu kako je navedeno.

Primjenom razvijene HPLC-PDA metode, određen je visoki stupanj linearnosti između površine pikova i definiranog raspona relativnih koncentracija za svaki analit (PMP-derivat monosaharida), potvrđeno vrijednošću  $R^2$  vrlo blizu 1 (idealna linearnost). Također, može se primijetiti da su nagibi pravaca vrlo slični za sve analite, što znači da je i dobivena osjetljivost, tj. odziv za svaki analit vrlo slična, uz iznimku uronskih kiselina koje imaju najmanju osjetljivost te pentoznih šećera, ksiloze i arabinoze, koji su imali najveći odziv. Ovakav rezultat vjerojatno je posljedica strukturne sličnosti svih analita te mehanizma nastanka PMP derivata u kojem se 2 molekule reagensa vežu za molekulu šećera tvoreći i strukturno međusobno slične derivate.

Tablica 35. Parametri linearnosti razvijene HPLC-PDA metode za analizu PMP-derivata monosaharida

Monosaharid	Jednadžba linearne krivulje	Koeficijent determinacije ( $R^2$ )	Koncentracijski raspon ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>Manoza</b>	$y = 0,9037x + 0,0031$	0,9999	10 - 400 (0,025 - 1)*
<b>Ramnoza</b>	$y = 0,8679x + 0,0005$	0,9999	10 - 400 (0,025 - 1)*
<b>Glukuronska kiselina</b>	$y = 0,8068x - 0,0015$	0,9996	10 - 400 (0,025 - 1)*
<b>Galakturonska kiselina</b>	$y = 0,8275x - 0,0009$	0,9996	10 - 400 (0,025 - 1)*
<b>Glukoza</b>	$y = 0,8535x - 0,0031$	0,9998	10 - 400 (0,025 - 1)*
<b>Ksiloza</b>	$y = 1,0185x - 0,0029$	0,9998	10 - 400 (0,025 - 1)*
<b>Galaktoza</b>	$y = 0,9861x - 0,0065$	0,9998	10 - 400 (0,025 - 1)*
<b>Arabinoza</b>	$y = 1,1865x - 0,0049$	0,9998	10 - 400 (0,025 - 1)*
<b>Fukoza</b>	$y = 0,873x - 0,0095$	0,9995	10 - 400 (0,025 - 1)*

\*relativne koncentracije u odnosu na interni standard, ribozu.

#### 4.3.2.3.2 Limit detekcije i limit kvantifikacije

Tablica 36 prikazuje limite detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) analiziranih PMP-derivata monosaharida prema razvijenoj HPLC-PDA metodi.



Najniži LOD i LOQ određeni su za rano eluirajuće šećere, manozu i ramnozu (najniži za ramnozu, LOD 1,17  $\mu\text{g/mL}$  i LOQ 3,55  $\mu\text{g/mL}$ ), a porastom retencijskog vremena (sukladno redosljedju monomera, Tablica 36), u pravilu su se povećavali i LOD i LOQ, što je u skladu s promjenom oblika kasno eluirajućih pikova koji su bili više prošireni u bazi te ih se prema zadanim derivatizacijskim parametrima metode moglo detektirati pri relativno višim koncentracijama. Za GlcUA određeni su najviši LOD i LOQ (6,05  $\mu\text{g/mL}$  i 18,32  $\mu\text{g/mL}$ ).

Tablica 36. Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ) analiziranih PMP-derivata monosaharida za razvijenu HPLC-PDA metodu.

<b>Monosaharid</b>	<b>LOD (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>LOQ (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
<b>Manoza</b>	1,65	5,01
<b>Ramnoza</b>	1,17	3,55
<b>Glukuronska kiselina</b>	6,05	18,32
<b>Galakturonska kiselina</b>	3,04	9,21
<b>Glukoza</b>	3,79	11,47
<b>Ksiloz</b>	2,78	8,43
<b>Galaktoza</b>	4,52	13,71
<b>Arabinoza</b>	3,85	11,67
<b>Fukoza</b>	4,83	14,64

#### 4.3.2.3.3 Ponovljivost i preciznost

Tablica 37 prikazuje preciznost metode određenu kao ponovljivost i intermedijarna preciznost. Analize su provedene tijekom 3 dana i na 3 zasebna uzorka od kojih je svaki analiziran 5 puta uzastopno svaki dan. Ponovljivost je određena za 5 uzastopnih analiza ( $n=5$ ), a prikazani raspon vrijednosti relativne standardne devijacije (% RSD) za retencijsko vrijeme (RT) i površinu pikova (A) (min-max) odnosi se na ukupno 9 dobivenih vrijednosti (3 različita uzorka i 3 različita dana) uzastopnih dnevnih analiza. Za određivanje intermedijarne preciznosti, u obzir je uzeto 15 analiza ( $n=15$ ) provedenih za svaki uzorak tijekom 3 dana. S obzirom da je metoda najosjetljivija na promjene sastava i pH mobilne faze, svaki dan je drugi analitičar pripremao svježju mobilnu fazu prema zadanom postupku pripreme. Raspon prikazanih vrijednosti % RSD

(min-max) odnosi se na 3 različita uzorka analizana prema istom principu. Relativne vrijednosti % RSD za RT i A određene su u odnosu na RT i A internog standarda, riboze, u svakoj analizi.

Tablica 37. Preciznost razvijene HPLC-PDA metode izražena kao relativna standardna devijacija (% RSD) retencijskog vremena (RT) i površine pikova (A) PMP-derivata monosaharida.

		Preciznost metode (% RSD)			
		Ponovljivost ( <i>engl. intraday precision</i> )		Intermedijarna preciznost ( <i>engl. interday precision</i> )	
		RT	A	RT	A
<b>Man</b>	Apsolutne vrijednosti	0,06 - 0,22	0,09 - 0,36	2,72 - 2,91	2,72 - 3,10
	Relativne vrijednosti	0,01 - 0,03	0,02 - 0,32	0,11 - 0,13	0,18 - 1,63
<b>Rib</b>	Apsolutne vrijednosti	0,07 - 0,21	0,07 - 0,45	2,84 - 3,02	3,02 - 4,26
	Relativne vrijednosti	-	-	-	-
<b>Rha</b>	Apsolutne vrijednosti	0,09 - 0,36	0,09 - 0,55	2,58 - 2,76	3,33 - 3,81
	Relativne vrijednosti	0,01 - 0,03	0,09 - 0,55	0,26 - 0,26	0,34 - 0,97
<b>Glc UA</b>	Apsolutne vrijednosti	0,09 - 0,31	0,04 - 0,50	0,69 - 0,89	3,50 - 4,04
	Relativne vrijednosti	0,02 - 0,22	0,02 - 0,44	2,10 - 2,17	0,32 - 0,66
<b>Gal UA</b>	Apsolutne vrijednosti	0,08 - 0,43	0,11 - 1,05	0,30 - 0,45	2,66 - 4,70
	Relativne vrijednosti	0,02 - 0,31	0,08 - 0,88	2,54 - 2,60	0,45 - 1,04
<b>Glc</b>	Apsolutne vrijednosti	0,08 - 0,19	0,06 - 1,32	0,85 - 1,00	3,23 - 4,54
	Relativne vrijednosti	0,02 - 0,25	0,08 - 0,93	1,97 - 2,01	0,58 - 0,68
<b>Xyl</b>	Apsolutne vrijednosti	0,07 - 0,22	0,06 - 0,73	0,66 - 0,80	2,57 - 4,73
	Relativne vrijednosti	0,02 - 0,26	0,04 - 0,32	2,16 - 2,22	0,48 - 0,68
<b>Gal</b>	Apsolutne vrijednosti	0,07 - 0,15	0,02 - 1,15	0,38 - 0,51	1,60 - 5,82
	Relativne vrijednosti	0,02 - 0,26	0,04 - 0,72	2,45 - 2,50	1,23 - 1,65
<b>Ara</b>	Apsolutne vrijednosti	0,07 - 0,15	0,04 - 1,00	0,35 - 0,47	2,84 - 5,39
	Relativne vrijednosti	0,03 - 0,25	0,14 - 0,59	2,49 - 2,54	0,79 - 1,25
<b>Fuc</b>	Apsolutne vrijednosti	0,06 - 0,16	0,03 - 1,27	0,35 - 0,48	2,58 - 6,09
	Relativne vrijednosti	0,03 - 0,25	0,14 - 0,85	2,48 - 2,53	0,50 - 1,91

Ponovljivost metode, s obzirom na retencijsko vrijeme i površinu pikova, bila je vrlo visoka za sve analite i sve analizirane uzorke, s relativnom standardnom devijacijom manjom od 1 % u gotovo svim mjerenjima, a isto se očitivalo i za apsolutne i relativne vrijednosti RT i A. Vrijednosti % RSD za intermedijarnu preciznost RT i A veće su nego za ponovljivost, kod A uglavnom vidljivo za apsolutne vrijednosti, dok kod RT i za apsolutne i za relativne vrijednosti, ovisno o redoslijedu elucije analita. Kod ranije eluirajućih pikova (manoze, riboze i ramnoze) % RSD veći je za apsolutna nego relativna retencijska vremena, što ukazuje na veću promjenu

apsolutne retencije, dok relativna retencija pikova ostaje gotovo ista. Kod kasnije eluirajućih pikova je % RSD za apsolutne vrijednosti retencije manji nego za relativne što ukazuje na veću promjenu u rezoluciji pikova u odnosu na interni standard nego kod ranije eluirajućih pikova. Razlog tome najvjerojatnije su male varijacije u pripremi mobilne faze (svježja mobilna faza pripremljena je svaki dan analize prema zadanom postupku), kao i u promjenama sastava mobilne faze tijekom dnevnih analiza. Promjena apsolutne retencije očitovala se kod svih pikova, uključujući i pik internog standarda. Blago povećanje % RSD za apsolutne, ali i relativne vrijednosti A može se objasniti, osim varijacijama sastava mobilne faze, i stabilnošću PMP derivata. Budući da je reakcija derivatizacije reverzibilna (iako se pomak ravnoteže u drugu stranu ne odvija istim mehanizmom), u uvjetima dužeg čuvanja derivatiziranih uzoraka bez suviška PMP reagensa dolazi do gubitka analita (derivata). Ovaj učinak osim o vremenu ovisi i o temperaturi čuvanja uzorka te je izraženiji pri relativno povišenoj temperaturi. Za potrebe validacije metode, svi uzorci kontinuirano su čuvani pri 5 °C (u termostatisanom autosampleru), što je bilo dovoljno da ostanu stabilni za potrebe analize (najveći RSD = 6 %). Blaži porast % RSD za relativne vrijednosti A naglašava prednost primjene internog standarda. S obzirom da je uspješnost HPLC-PDA analize izravno ovisna o uspješnosti PMP derivatizacije, ponovljivost i intermedijarna preciznost također su određene i za metodu u kombinaciji s derivatizacijskim postupkom (Tablica 38). Pritom, ponovljivost je određena s obzirom na ukupno 15 analiza (po 5 analiza za 3 uzorka) u jednom danu, a raspon vrijednosti % RSD (min-max) odnosi se na 3 dana provedenih analiza. Intermedijarna preciznost derivatizacije određena je uzimajući u obzir ukupan broj analiza za sve uzorke i tijekom 3 dana (n=45). Vrijednosti % RSD za ponovljivost retencijskih vremena i dalje su bili manje od 1 %, što je bilo i očekivano, dok su iste za površine pikova ipak nešto veće, ali nisu prelazile približno 6,5 % za apsolutne vrijednosti, odnosno približno 3,5 % za relativne vrijednosti. Ovakav rezultat ukazuje na važnost primjene internog standarda u svrhu postizanja preciznijih rezultata. Vrijednosti % RSD za intermedijarnu preciznost pokazale su jednaku tendenciju kao i kod intermedijarne preciznosti same HPLC metode, odnosno ukazuju na to da derivatizacija nema utjecaj na retenciju, već ista ovisi o parametrima analize, točnije, o promjeni sastava i pH mobilne faze. Relativne vrijednosti % RSD za A nešto su veće u odnosu na iste za intermedijarnu preciznost same HPLC metode, što pak ukazuje na utjecaj derivatizacijskog postupka. Svi dobiveni rezultati za ocjenu ukupne preciznosti metode u kombinaciji s derivatizacijskim postupkom su zadovoljavajući.

Tablica 38. Preciznost PMP derivatizacije izražena kao relativna standardna devijacija (% RSD) retencijskog vremena (RT) i površine pikova (A) analiziranih PMP-derivata monosaharida.

		Preciznost derivatizacije (% RSD)			
		Ponovljivost (intraday precision)		Intermedijarna preciznost (interday precision)	
		RT	A	RT	A
<b>Man</b>	Apsolutne vrijednosti	0,25 - 0,36	1,93 - 3,66	2,73	3,72
	Relativne vrijednosti	0,02 - 0,02	0,78 - 3,16	0,12	2,14
<b>Rib</b>	Apsolutne vrijednosti	0,24 - 0,35	1,29 - 1,91	2,85	3,71
	Relativne vrijednosti	-	-	-	-
<b>Rha</b>	Apsolutne vrijednosti	0,25 - 0,36	1,66 - 2,70	2,59	3,99
	Relativne vrijednosti	0,02 - 0,03	1,66 - 2,70	0,26	1,17
<b>Glc UA</b>	Apsolutne vrijednosti	0,24 - 0,37	2,51 - 3,66	0,80	4,69
	Relativne vrijednosti	0,03 - 0,15	1,98 - 2,74	2,08	2,24
<b>Gal UA</b>	Apsolutne vrijednosti	0,28 - 0,34	1,86 - 3,40	0,44	4,46
	Relativne vrijednosti	0,03 - 0,22	1,55 - 2,42	2,51	1,87
<b>Glc</b>	Apsolutne vrijednosti	0,20 - 0,30	2,93 - 3,19	0,92	4,65
	Relativne vrijednosti	0,03 - 0,14	1,35 - 1,86	1,94	1,63
<b>Xyl</b>	Apsolutne vrijednosti	0,19 - 0,28	1,10 - 3,29	0,73	3,73
	Relativne vrijednosti	0,08 - 0,15	1,26 - 2,42	2,13	1,81
<b>Gal</b>	Apsolutne vrijednosti	0,19 - 0,29	1,38 - 4,11	0,48	3,88
	Relativne vrijednosti	0,04 - 0,15	0,36 - 3,13	2,41	1,94
<b>Ara</b>	Apsolutne vrijednosti	0,19 - 0,28	1,35 - 3,32	0,44	4,08
	Relativne vrijednosti	0,05 - 0,15	0,52 - 2,32	2,45	1,51
<b>Fuc</b>	Apsolutne vrijednosti	0,19 - 0,28	2,71 - 6,69	0,45	5,59
	Relativne vrijednosti	0,05 - 0,15	3,44 - 6,04	2,44	4,52

#### 4.3.2.3.4 Točnost

Tablica 39 prikazuje relativni omjer (%) određenih vrijednosti koncentracije pojedinih PMP derivata monosaharida u uzorku CBH s namjerno dodanim poznatim koncentracijama monosaharida, u odnosu na teorijski izračunate vrijednosti koncentracija istih.

Tablica 39. Točnost razvijene HPLC-PDA metode za analizu PMP-derivata monosaharida.

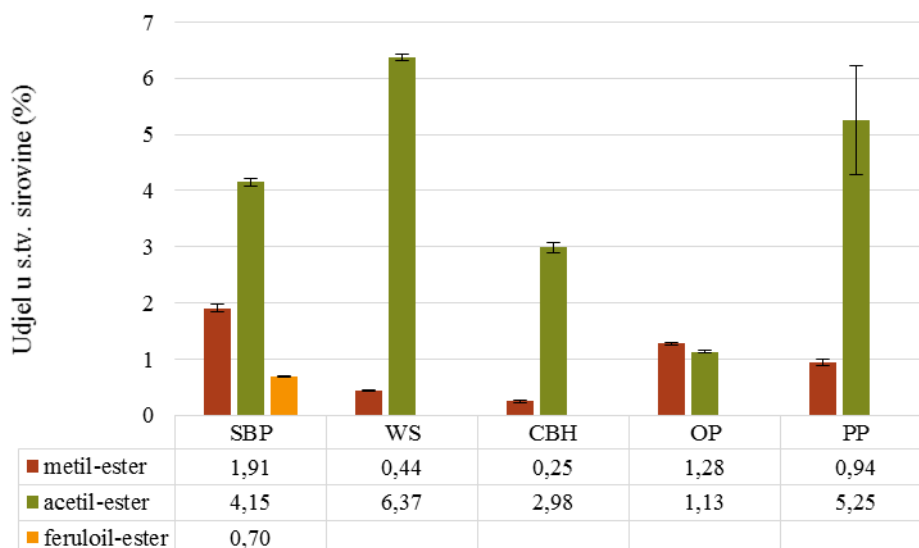
Monosaharid	Točnost za 25 i 100* $\mu\text{g/mL}$ (%)	RSD (%)	Točnost za 50 i 200 $\mu\text{g/mL}$ (%)	RSD (%)	Točnost za 75 i 300 $\mu\text{g/mL}$ (%)	RSD (%)
Manoza	102,06	1,13	106,44	0,24	104,95	0,28
Ramnoza	101,66	1,29	107,40	0,25	109,61	0,43
Glukuronska kiselina	99,15	0,17	104,42	1,01	103,57	0,95
Galakturonska kiselina	103,99	0,89	107,64	0,70	107,34	0,76
Glukoza	99,40	0,00	103,30	0,33	100,97	0,29
Ksilozna	105,51	1,09	107,15	0,08	104,19	0,29
Galaktoza	99,95	2,44	101,43	0,01	100,53	0,47
Arabinoza	101,32	1,62	108,92	0,10	108,73	0,41
Fukoza	94,76	1,72	104,23	2,69	103,56	0,94

\*za svaku od 3 razine dodane koncentracije monosaharida, viša koncentracija (100, 200 i 300  $\mu\text{g/mL}$ ) se odnosi na glukozu i galakturonsku kiselinu kao dominantno zastupljene monomere u hidrolizatima AIR, dok se niža koncentracija (25, 50 i 75  $\mu\text{g/mL}$ ) odnosi na ostale monomere.

Točnost metode za najniže dodane koncentracije iznosila je približno 95-106 % za sve PMP derivate, s RSD mjerenja manjim od 2,5 %; za srednje dodane koncentracije 101 - 109 %, s RSD mjerenja manjim od 2,7 % te za najviše dodane koncentracije 101 - 110 %, s RSD mjerenja manjim od 1 %. Točnost metode pokazala se neovisnom o dodavanoj koncentraciji monomera. Ovakav rezultat potvrđuje zadovoljavajuću točnost metode uz pogrešku izračunate vrijednosti 5-10 %. Dobiveni rezultati točnosti metode u skladu su s prethodno objavljenim rezultatima za slične postupke derivatizacije PMP reagensom te HPLC analize dobivenih monomera (Lv i sur., 2009; Dai i sur., 2010).

#### 4.3.3 Neugljikohidratne komponente polisaharida

Kao neugljikohidratne komponente polisaharida određene su vezane funkcionalne skupine koje imaju veliku ulogu u nativnoj strukturi i povezivanju s ostalim komponentama matiksa stanične stijenke: metilna, acetilna i feruloilna skupina. Slika 33 prikazuje udjele navedenih skupina u suhoj tvari pojedine sekundarne biljne sirovine.

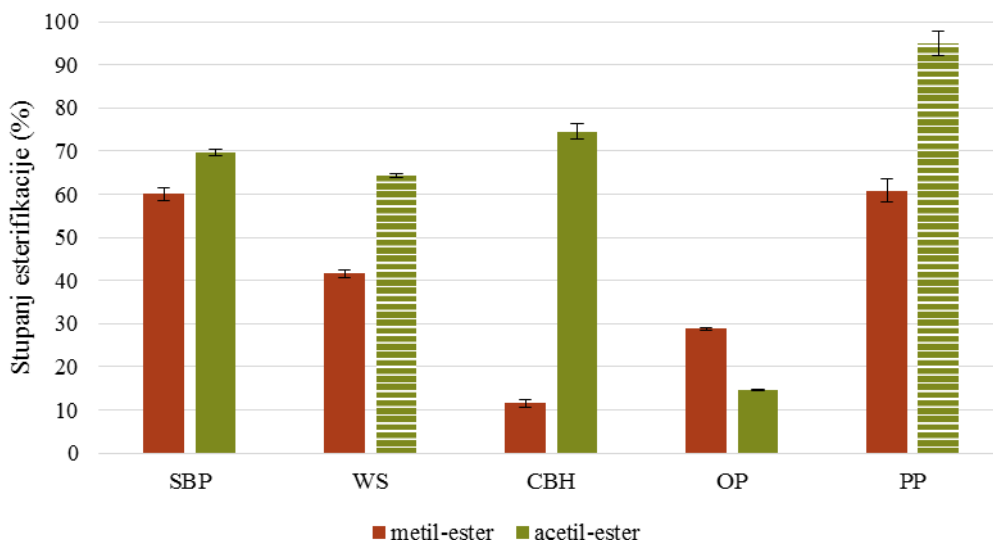


Slika 33. Maseni udjeli (%) metil, acetil i feruloil estera u suhoj stvari sekundarnih biljnih sirovina (SBP - pulpa šećerne repe, WS - ljuska oraha, CBH - ljuska kakaovog zrna, OP - ljuska crvenog luka, PP - mahuna graška).

Funkcionalne skupine sastavni su dio polisaharida te ako se pribroje ukupnom udjelu monomera iskazuju udjel ukupnih strukturnih polisaharida. Prema tome, u SBP isti čine 72,0 % s.tv. sirovine, u WS 57,9 %, u CBH 38,8 %, u OP 54,3 % i u PP 47,6 %. Naravno, uz pretpostavku da se sve određene skupine nalaze vezane na polisaharidima. U usporedbi s rezultatima ukupnih strukturnih polisaharida dobivenih korekcijom udjela vlakana za lignin (Slika 27), vidljivo je zadovoljavajuće slaganje rezultata. Najveći udjel ukupnih vezanih funkcionalnih skupina određen je u SBP (6,75 % s.tv. sirovine), WS (6,81 % s.tv. sirovine) i PP (6,19 % s.tv. sirovine), što se pretežno odnosilo na acetilnu skupinu. Acetiliranost se uglavnom karakteristika hemiceluloznih polisaharida, međutim, i pektin može biti značajno (iako rijetko) acetiliran, što je slučaj kod SBP (Berlowska i sur., 2018). Metilna skupina bila je najzastupljenija u SBP, što se može povezati sa značajnom metiliranošću SBP pektina. Ova sirovina je također bila jedina u kojoj je određena vezana ferulinska kiselina, u udjelu 0,70 % s.tv. sirovine, što je u skladu s literaturnim podacima (Micard i sur., 1996). Prema ovim podacima, SBP se također može smatrati bogatim izvorom polifenola, suprotno rezultatima analize ekstraktibilne suhe tvari (Tablica 32), međutim, isti se nalaze u vezanom obliku i stoga se nisu mogli ekstrahirati 70 %-tnim etanolom.

Iz ovih rezultata teško je i zapravo nemoguće znati koji dio acetiliranosti i/ili metiliranosti se odnosi na hemicelulozne, a koji na pektinske polisaharide, međutim, ako se uzme u obzir relativna zastupljenost istih (pretpostavljena s obzirom na monomerni sastav), može se pretpostaviti da je ukupni pektin (ukupni homogalakturonan) SBP visokometiliran (60,1 %) i

visokoacetiliran (69,7 %), ukupni pektin CBH niskometiliran (11,6 %) i visokoacetiliran (74,6 %), dok ukupni pektin OP niskometiliran (28,8 %) i niskoacetiliran (14,7 %). Ukupni pektini WS i PP također su niskometilirani, a ukupni ksilan u ovim sirovinama je visokoacetiliran u svom nativnom obliku (64,2 % za WS i 94,97 % za PP) (Slika 34).



Slika 34. Prosječne teorijske vrijednosti stupnja metilacije (% DM) i stupnja acetilacije (% DA) ukupnog galakturonana (puni stupići) i ksilana (isertani stupići) u analiziranim sekundarnim biljnim sirovinama.

#### 4.4 Inicijalni postupak frakcioniranja strukturalnih polisaharida

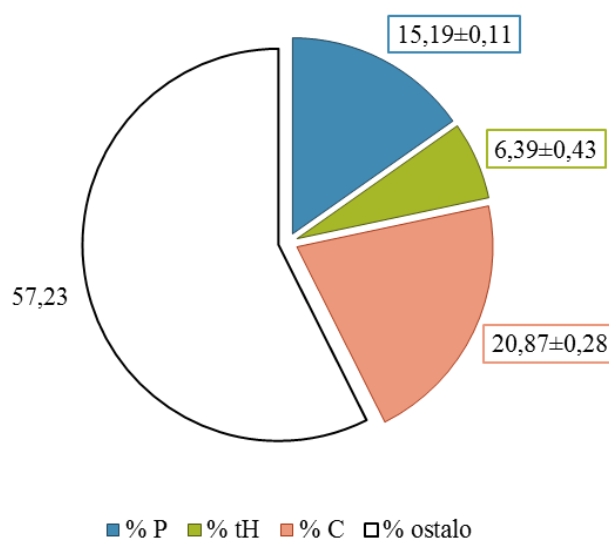
Inicijalni postupak frakcioniranja osmišljen je kao zajednički postupak frakcioniranja polisaharida stanične stijenke u kojem su sve sirovine bile podvrgnute jednakom tretmanu s jedinom razlikom u delignifikacijskom koraku (razlika u ukupnoj količini dodanih reagensa, sukladno udjelima lignina u sekundarnim sirovinama). Ovim postupkom izdvojene su frakcije pektina (P), topljive (tH) i netopljive (ntH) hemiceluloze i celuloznog ostatka (C). Pektinska frakcija izdvojena je tretmanom razrijeđenom kiselinom iz alkoholno-netopljivog ostatka (ostatak nakon ekstrakcije 70 %-tnim EtOH). Depektinizirane sirovine podvrgnute su delignifikaciji, a ukupna hemicelulozna frakcija izdvojena je alkalnom ekstrakcijom iz delignificiranih sirovina. Neutralizacijom i dijalizom hemiceluloznog ekstrakta izdvojile su se 2 podfrakcije, topljiva i netopljiva hemiceluloza. Izdvajanje dijela netopljive hemiceluloze tijekom neutralizacije alkalnog ekstrakta opisano je još u radu O'Dwyer-a (1926), a kasnije i drugih istraživača (Gaillard, 1965; Zhang, 2016). Ova frakcija u literaturi se može naći i pod nazivom hemiceluloza A. Topljivi dio hemiceluloze izdvaja se alkoholnom precipitacijom neutraliziranog alkalnog ekstrakta (hemiceluloza B). S obzirom da su oznake "A" i "B" u literaturi ipak rijetke, a također i način izdvajanja ovih podfrakcija u ovome radu razlikovao se

od izvorno opisanih postupaka, zadržani su nazivi netopljiva i topljiva hemiceluloza. Razlika u topljivosti nastaje kao posljedica promjene sastava i strukture polisaharida tijekom postupka ekstrakcije. Time i udjel pojedinih podfrakcija ovisi o sirovini te je ova pojava, za opisani postupak frakcioniranja, primijećena isključivo kod WS i PP. Hemiceluloze ostalih sirovina označene su kao topljiva hemiceluloza (tH) zbog sljedivosti oznaka u cijelome radu. Frakcija celuloznog ostatka izdvojena je kao ostatak nakon alkalne ekstrakcije.

Svrha frakcioniranja polisaharida stanične stijenke bila je izdvajanje pročišćenih frakcija biljnih polisaharida - pektina iz SBP, CBH i OP te ksilana iz WS i PP, koji će se kasnije upotrijebiti kao supstrat za proizvodnju pektinskih oligosaharida i ksilooligosaharida.

#### 4.4.1 Polisaharidne frakcije pulpe šećerne repe

Slika 35 prikazuje prinose pojedinih izdvojenih frakcija primijenjenim inicijalnim postupkom frakcioniranja strukturnih polisaharida SBP, izraženih na suhu tvar sirovine. Dobiven je značajan prinos pektinske frakcije (15,2 % s.tv. sirovine), dok je prinos hemicelulozne frakcije bio relativno nizak (6,4 % s.tv. sirovine). Prinos frakcije celuloznog ostatka iznosio je 20,9 % s.tv. sirovine.

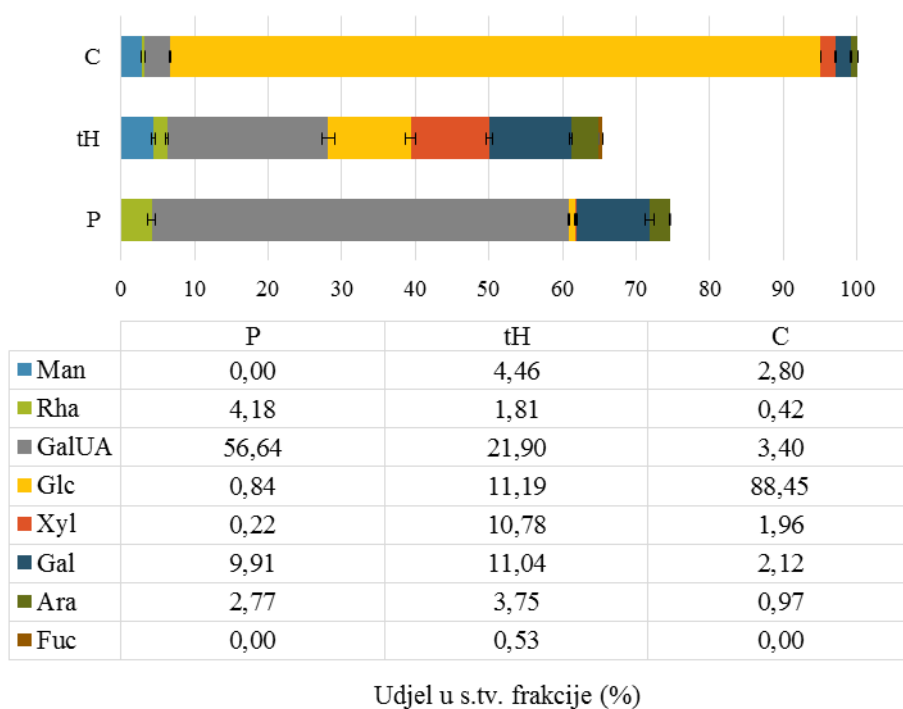


Slika 35. Prinosi frakcija pektina (P), topljive hemiceluloze (tH), i celuloze (C), izdvojenih iz pulpe šećerne repe inicijalnim postupkom frakcioniranja polisaharida stanične stijenke.

Ostvareni prinosi pojedinih frakcija u skladu su s visokim udjelima galakturonske kiseline i celuloze, kao i relativno niskim udjelima karakteristično hemiceluloznih monomera. Analiza monomernog sastava izdvojenih frakcija (Slika 36) pokazala je najveću zastupljenost GalUA u pektinskoj frakciji (56,6 % s.tv. pektinske frakcije), s dominantno prisutnim galaktanima (9,9



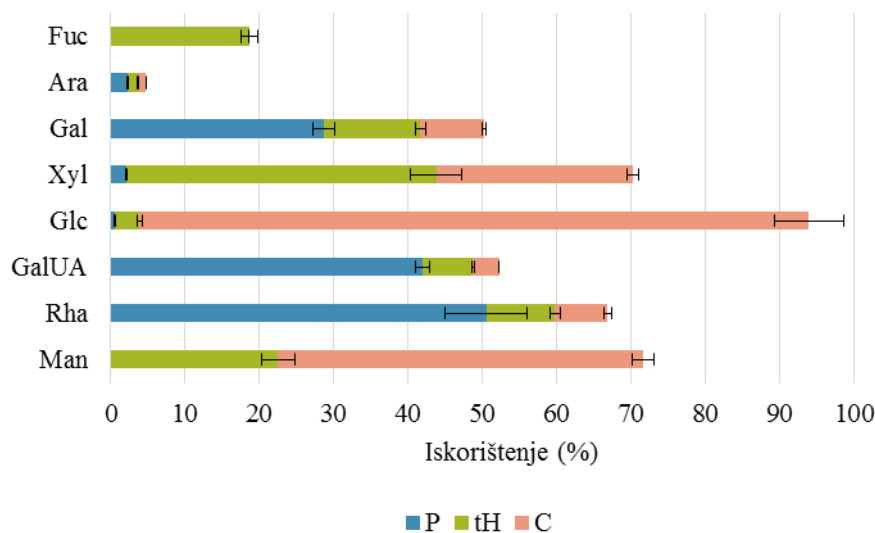
% s.tv. frakcije) kao bočnim lancima RG-I regije, dok je zastupljenost arabinana bila vrlo niska. Hemicelulozna frakcija bila je prilično heterogenog sastava, sa značajnim udjelom rezidualnog pektina (udjel GalUA iznosio je 21,9 % s.tv. hemicelulozne frakcije), također s potencijalno razgranatim regijama bogatima galaktanima (iako se Gal može naći i kao sastavni dio hemiceluloznih polimera, ali na temelju ovih rezultata nije moguće odrediti u kojem udjelu). Od hemiceluloznih polimera, u ovoj frakciji na temelju monomernog sastava pretpostavljena je prisutnost dominantno ksiloglukana i manana/glukomanana te arabinogalaktana. Celulozna frakcija očekivano je u svom sastavu sadržavala pretežito glukozu te gotovo teorijski prinos polisaharida (ukupan zbroj svih određenih monomera), što govori o visokom stupnju čistoće ove frakcije. Udjel neceluloznih primjesa iznosio je približno 12 % te se odnosio na rezidualne pektinske i hemicelulozne polimere.



Slika 36. Monomerni sastav frakcija pektina (P), topljive hemiceluloze (tH), i celuloze (C), izdvojenih iz pulpe šećerne repe inicijalnim postupkom fracioniranja polisaharida stanične stijenke. Man - manoz, Rha - ramnoza, GalUA - galakturonska kiselina, Glc - glukoz, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinoza, Fuc - fukoza.

Zbroj prinosa izdvojenih frakcija iz SBP iznosio je 42,5 % s.tv. sirovine što, u odnosu na izračunati teorijski udjel strukturnih polisaharida od 66,6 % s.tv., ukazuje na određeni stupanj gubitaka tijekom postupka fracioniranja. Kombiniranjem rezultata prinosa izdvojenih polisaharidnih frakcija, monomernog sastava istih te početnog monomernog sastava SBP, uspostavljene su bilance pojedinih monomera (Slika 37). Iz rezultata bilanci vidljivi su gubici

gotovo svih monomera, a najviše Ara (~ 95 %). S obzirom na značajnu zastupljenost ukupnog arabinana u SBP (~ 18 % s.tv. sirovine), može se zaključiti da raskorak prinosa izdvojenih polisaharidnih frakcija i teorijskog udjela strukturnih polisaharida se najviše odnosi upravo na gubitak arabinana.



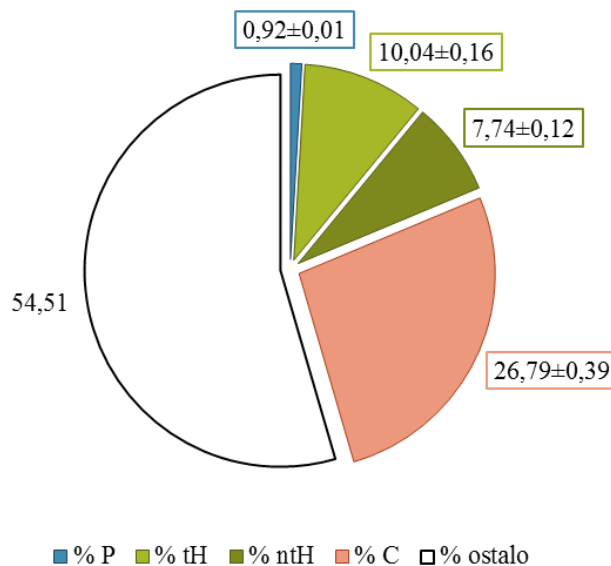
Slika 37. Bilanca monomera određenih u sastavu strukturnih polisaharida pulpe šećerne repe, izražena kao iskorištenje (%) pojedinog monomera u frakcijama izdvojenima inicijalnim postupkom frakcioniranja polisaharida stanične stijenke (P - pektinska frakcija, tH - topljiva hemicelulozna frakcija, C - celulozna frakcija) u odnosu na početni udjel monomera u sirovini. Man - manoz, Rha - ramnoza, GalUA - galakturonska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinosa, Fuc - fukoza.

Gubici arabinana najvjerojatnije su se dogodili tijekom ekstrakcije pektina budući da su isti izrazito osjetljivi na niske pH vrijednosti pri kojima hidroliziraju u manje fragmente koji se ne mogu precipitirati dodatkom etanola (Levigne i sur., 2002a). S obzirom na značenje SBP kao sirovine bogate pektinom, važan pokazatelj uspješnosti postupka frakcioniranja bila je i bilanca GalUA. Tijekom postupka frakcioniranja polisaharida, prinos ukupnog galakturonana iznosio je približno 52 %, od čega približno 80 % u pektinskoj frakciji. Najmanji gubici ostvareni su za glukoza (~ 6 %).

#### 4.4.2 Polisaharidne frakcije ljuske oraha

Slika 38 prikazuje prinose pojedinih izdvojenih frakcija primijenjenim inicijalnim postupkom frakcioniranja polisaharida stanične stijenke WS, izraženih na suhu tvar sirovine. Dobiven je značajan prinos hemiceluloznih polisaharida (ukupno 17,8 % s.tv. sirovine), kao i celulozne frakcije (26,8 % s.tv. sirovine), dok je pektinska frakcija izdvojena s gotovo neznatnim

prinosom (< 1 % s.tv. sirovine). Hemicelulozna frakcija gotovo podjednako se izdvojila u obliku topljive i netopljive podfrakcije (56 : 44 u korist topljive hemiceluloze).

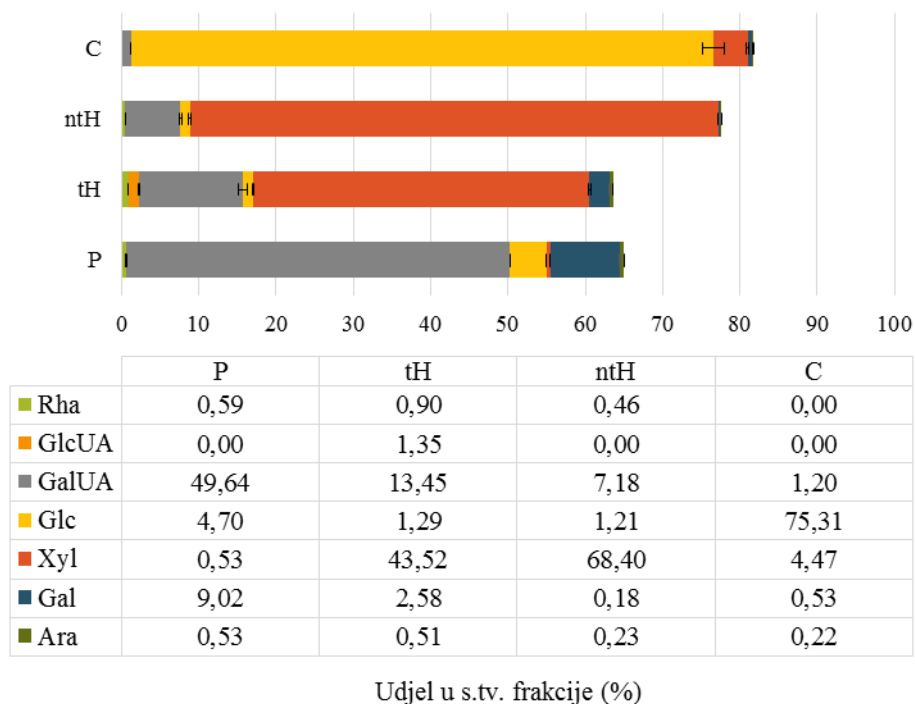


Slika 38. Prinosi frakcija pektina (P), topljive hemiceluloze (tH), netopljive hemiceluloze (ntH) i celuloze (C), izdvojenih iz ljuske oraha inicijalnim postupkom frakcioniranja polisaharida stanične stijenke.

Slika 39 prikazuje monomerni sastav polisaharidnih frakcija izdvojenih iz WS. U pektinskoj frakciji karakteristično je najzastupljenija bila GalUA, a od neutralnih šećera galaktoza (Gal). U topljivoj i netopljivoj hemiceluloznoj podfrakciji najzastupljenija je bila ksiloza (Xyl) s 68,4 % i 87,9 % relativnog udjela svih monomera. Uz Xyl, u hemiceluloznim frakcijama, pogotovo tH, značajno zastupljen je bio i rezidualni pektin (GalUA i Gal). Podfrakcija ntH izdvojena je kao frakcija visoke čistoće u smislu ugljikohidratnog (polisaharidnog) prinosa (prinos svih određenih monomera iznosio je 77,6 % s.tv. frakcije).

Celulozna frakcija također je imala visok ugljikohidratni prinos, a u sastavu dominantno glukozu (~ 92 % relativnog udjela svih monomera). Xyl je činila glavninu ostalih monomera celulozne frakcije, što se odnosi na rezidualni ksilan.

Kao i kod SBP, zbroj prinosa izdvojenih frakcija (45,5 % s.tv. sirovine) bio je manji nego teorijski udjel strukturnih polisaharida (58,0 % s.tv. sirovine), što ukazuje na gubitke tijekom postupka frakcioniranja.

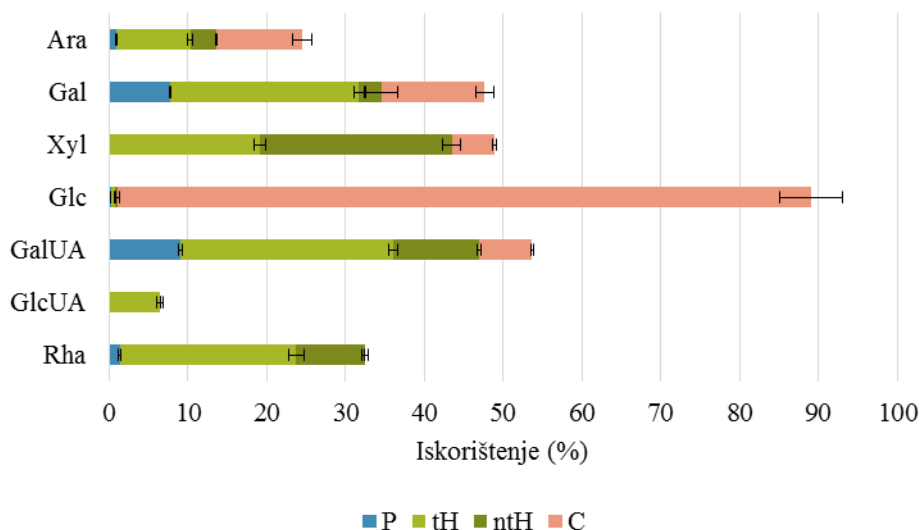


Slika 39. Monomerni sastav frakcija pektina (P), topljive hemiceluloze (tH), netopljive hemiceluloze (ntH) i celuloze (C), izdvojenih iz ljuske oraha inicijalnim postupkom frakcioniranja polisaharida stanične stijenke. Rha - ramnoza, GlcUA - glukuronska kiselina, GalUA - galakturonska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinoza.

Gubici pojedinih monomera vidljivi su iz bilanci (Slika 40), uspostavljenih uzimajući u obzir udjele izdvojenih frakcija, monomerni sastav istih te početni monomerni sastav WS. S obzirom na zastupljenost te važnost u smislu potencijala ponovnog iskorištavanja, najvažniji pokazatelj uspješnosti postupka frakcioniranja bila je bilanca Xyl. Provedenim postupkom frakcioniranja ukupno je izdvojeno malo manje od polovice inicijalno prisutnog ksilana u sirovini, pritom 19,1 % u podfrakciji tH, 24,3 % u podfrakciji ntH te 5,3 % u kao rezidualni ksilan u C frakciji. Potencijalni razlozi gubitka ksilana su njegova degradacija tijekom delignifikacije (oksidativno djelovanje) ili alkalne ekstrakcije ( $\beta$ -eliminacija u lužnatom mediju) usijed kojih nastaju manji fragmenti ksilana koji se ne mogu precipitirati dodatkom etanola te se posljedično izgube u supernatantu nakon izdvajanja precipitata hemiceluloze.

Najmanji gubici ostvareni su za Glc. Gubici pektinskih monomera (GalUA, Rha, Gal i Ara), iako značajni, nisu od velike važnosti s obzirom na relativno nisku zastupljenost istih u izvornoj sirovini.

Dobiveni rezultati ukazuju na potrebu za optimizacijom postupka ekstrakcije ksilana iz WS u smislu smanjenja gubitaka ksilana tijekom izdvajanja.

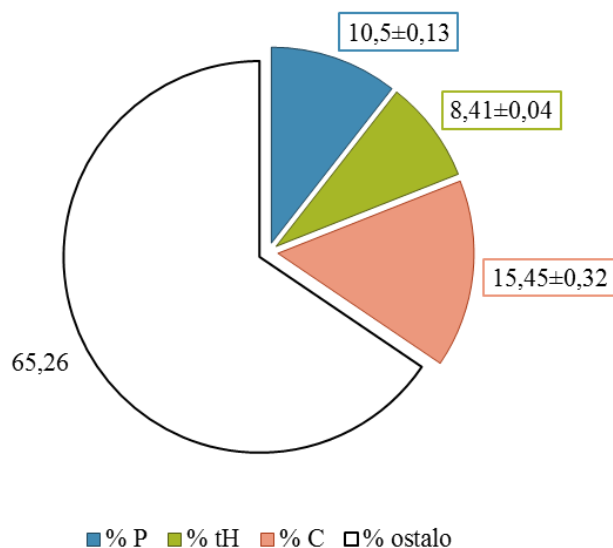


Slika 40. Bilanca monomera određenih u sastavu strukturnih polisaharida ljuske oraha, izražena kao iskorištenje (%) pojedinog monomera u frakcijama izdvojenima inicijalnim postupkom fracioniranja polisaharida stanične stijenke (tH - topljiva hemicelulozna frakcija, ntH - netopljiva hemicelulozna frakcija, C - celulozna frakcija) u odnosu na početni udjel monomera u sirovini. Rha - ramnoza, GlcUA - glukuronska kiselina, GalUA - galakturonska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinoza.

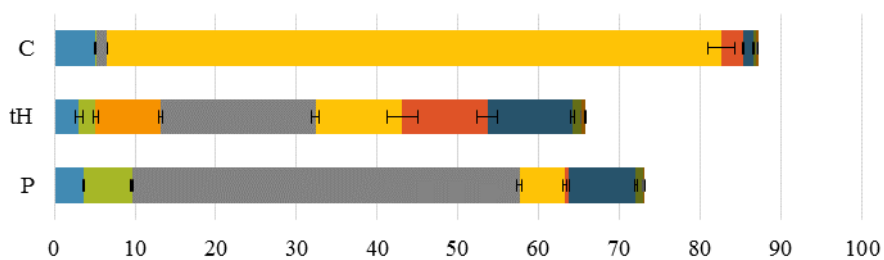
#### 4.4.3 Polisaharidne frakcije ljuske kakaovog zrna

Slika 41 prikazuje prinose pojedinih izdvojenih frakcija primijenjenim inicijalnim postupkom fracioniranja polisaharida stanične stijenke CBH, izraženih na suhu tvar sirovine. S obzirom da je ovoj sirovini određeno razmjerno malo ukupnih strukturnih polisaharida u odnosu na druge sirovine (osim PP), dobiveni prinosi pektinske (10,5 % s.tv. sirovine), hemicelulozne (8,4 % s.tv. sirovine) i celulozne (15,5 % s.tv. sirovine) frakcije mogu se smatrati značajnima.

Monomerni sastav (Slika 42) izdvojenih frakcija pokazao je karakteristično dominantnu zastupljenost GalUA u pektinskoj frakciji te prisutnost galaktana u RG-I regiji. Uz pektin, u ovoj frakciji je koekstrahiran i dio vodeno topljivog glukomanana. Hemicelulozna frakcija pokazala je prisutost ksiloglukana, glukuronoksilana i manana/glukomanana te rezidualnog pektina, također potencijalno sa značajnom udjelom bočnih lanaca galaktana, iako podrijetlo galaktana može biti i od hemiceluloznih polimera. U celuloznoj frakciji najzastupljenija je bila Glc (87,3 % relativnog udjela svih monomera), što se uglavnom odnosilo na celulozu, ali i jedan dio rezidualnih ksiloglukana i/ili glukomanana. Celulozna frakcija ostvarila je i najviši ugljikohidratni prinos (zbroj svih monomera) od 87,1 % s.tv. frakcije.



Slika 41. Prinosi frakcija pektina (P), topljive hemiceluloze (tH) i celuloze (C), izdvojenih iz ljuske kakaovog zrna inicijalnim postupkom frakcioniranja polisaharida stanične stijenke.



	P	tH	C
Man	3,62	3,06	5,08
Rha	6,04	2,04	0,12
GlcUA	0,00	8,09	0,00
GalUA	47,92	19,16	1,37
Glc	5,63	10,76	76,05
Xyl	0,54	10,50	2,67
Gal	8,27	10,55	1,24
Ara	0,86	1,07	0,42
Fuc	0,22	0,55	0,19

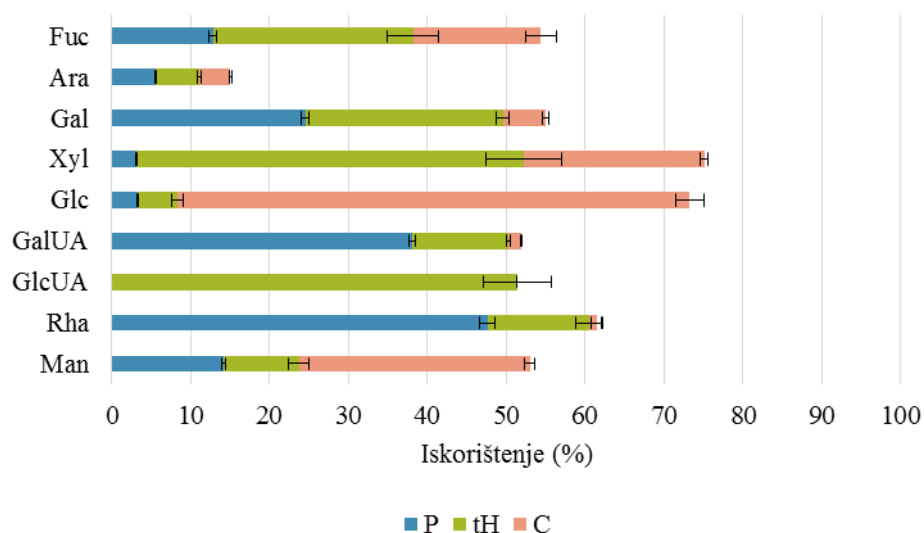
Udjel u s.tv. frakcije (%)

Slika 42. Monomerni sastav frakcija pektina (P), topljive hemiceluloze (tH) i celuloze (C), izdvojenih iz ljuske kakaovog zrna inicijalnim postupkom frakcioniranja polisaharida stanične stijenke. Man - manoz, Rha - ramnoza, GlcUA - glukuronska kiselina, GalUA - galakturonska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinoza, Fuc - fukoza.

Kao i kod prethodne dvije sirovine, postoji odstupanje između udjela ukupno izdvojenih frakcija (~ 34 % s.tv. sirovine) te teorijskog udjela strukturnih polisaharida (44,0 %), a gubici

uslijed provedenog postupka frakcioniranja vidljivi su kroz bilance pojedinih monomera (Slika 43). S obzirom da je CBH karakterizirana kao pektinom bogata sirovina, najvažnije bilance bile su za GalUA, Rha, Ara i Gal. Kao i kod SBP, bilanca Ara pokazala je značajne gubitke arabinana (~ 85 %), zbog niske pH vrijednosti otapala (pH 1,5) korištene u ekstrakciji pektina, međutim, gubitak arabinana ne smatra se značajnim za iskoristivost pektina ove sirovine s obzirom da je arabinan općenito malo zastupljen u CBH (1,2 % s.tv. sirovine). Puno značajniji, u smislu iskoristivosti sirovine, je gubitak galakturonana (GalUA), koji iznosi približno 48 %. Primijenjenim postupkom frakcioniranja, u pektinskoj frakciji izdvojeno je 38,1 % izvorno prisutnog galakturonana u sirovini. Ukupno iskorištenje galaktana i ramnana bilo je vrlo slično, a u pektinskoj frakciji izdvojeno je 47,6 % te 24,5 % istih.

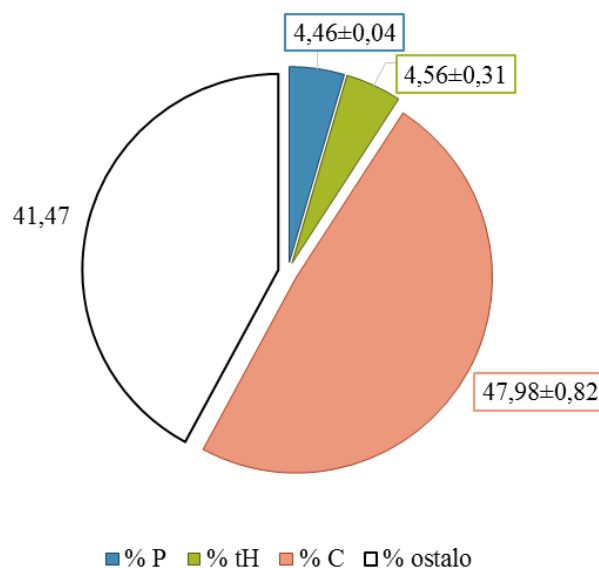
Dobiveni rezultati ukazuju na potrebu za optimizacijom ekstrakcije pektina u smislu smanjenja gubitaka galakturonana te povećanja njegove ekstraktibilnosti u pektinskoj frakciji.



Slika 43. Bilanca monomera određenih u sastavu strukturnih polisaharida ljuske kakaovog zrna, izražena kao iskorištenje (%) pojedinog monomera u frakcijama izdvojenima inicijalnim postupkom frakcioniranja polisaharida stanične stijenke (P - pektinska frakcija, tH - topljiva hemicelulozna frakcija, C - celulozna frakcija) u odnosu na početni udjel monomera u sirovini. Man - manoz, Rha - ramnoza, GlcUA - glukuronska kiselina, GalUA - galakturonska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinoza, Fuc - fukoza.

#### 4.4.4 Polisaharidne frakcije ljuske crvenog luka

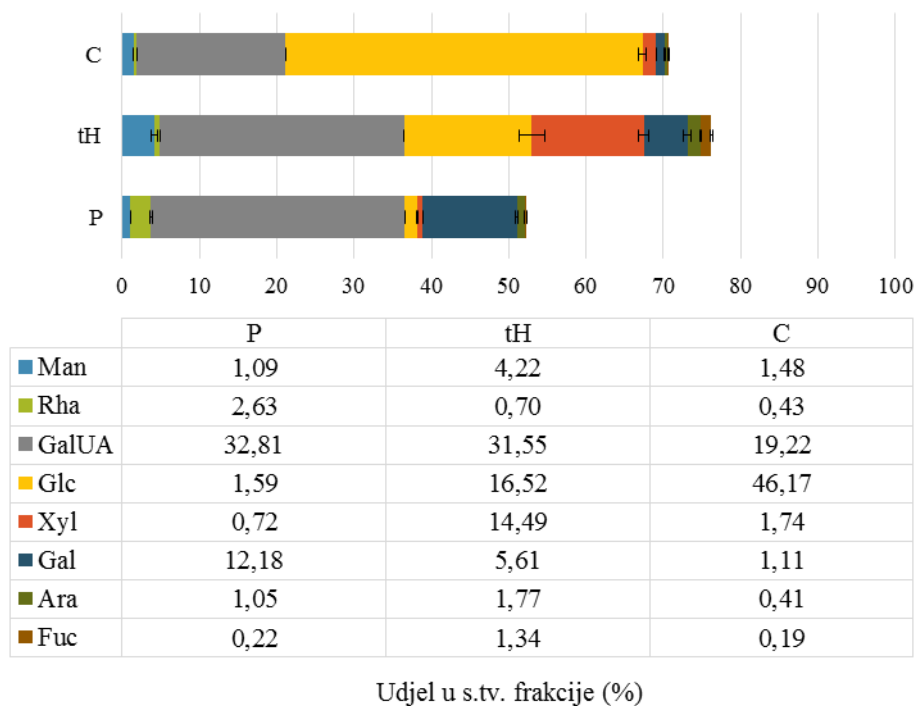
Slika 44 prikazuje prinose pojedinih izdvojenih frakcija primijenjenim inicijalnim postupkom frakcioniranja polisaharida stanične stijenke OP, izraženih na suhu tvar sirovine.



Slika 44. Prinosi frakcija pektina (P), topljive hemiceluloze (tH) i celuloze (C), izdvojenih iz ljuske crvenog luka inicijalnim postupkom frakcioniranja polisaharida stanične stijenske.

Najveći udjel odnosio se na celuloznu frakciju (48,0 % s.tv. sirovine), dok su udjeli pektinske i hemicelulozne frakcije bili relativno mali (4,5 % s.tv. sirovine za P i 4,6 % s.tv. sirovine za tH). Monomerni sastav (Slika 45) pokazao je vrlo visoku zastupljenost GalUA u svim frakcijama. U pektinskoj frakciji je to očekivano, dok zastupljenost u ostalim frakcijama ukazuje na rezistentnost galakturonana na primijenjene ekstrakcijske uvjete. Ova rezistentnost proizlazi iz vezanosti galakturonana kalcijevim ionima, uslijed čega je praktički netopljiv (osim malog dijela, kako je ovdje i prikazano). Iz tog razloga, za OP je određen visoki udjel netopljivih vlakana (Slika 26), dok je monomerni sastav pokazao da je udjel pektina (GalUA) u ovoj sirovini značajan (Slika 45), a pektin se konvencionalno kategorizira kao topljivo vlakno. Od ostalih karakteristika monomernog sastava izdvojenih frakcija, u pektinskoj frakciji je uz GalUA značajno bila prisutna Gal; monomerni sastav hemicelulozne frakcije (uz rezidualni pektin - GalUA + Gal) indicirao je prisutnost ksiloglukana, glukuronoksilana te manana/glukomanana, dok je u celuloznoj frakciji očekivano bila dominantna Glc, s niskom zastupljenošću rezidualnih ksiloglukana i manana/glukomanana (uz relativno visoku zastupljenost rezidualnog galakturonana).

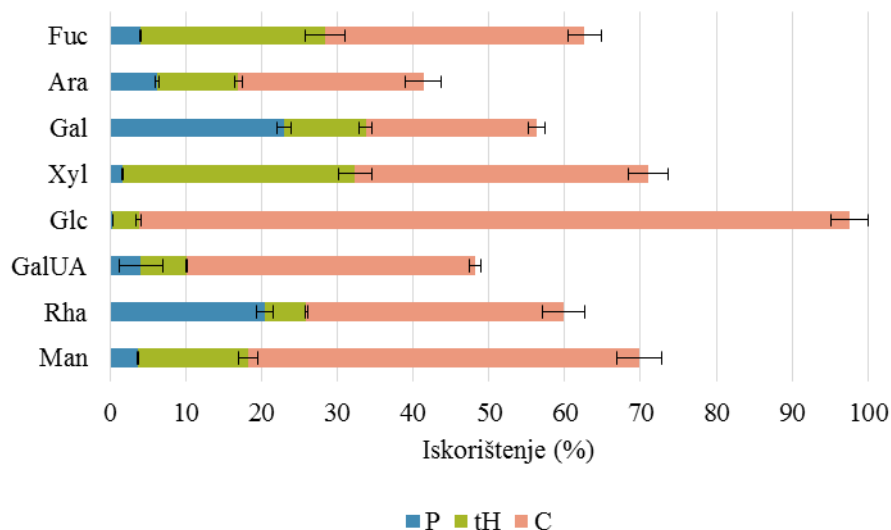




Slika 45. Monomerni sastav frakcija pektina (P), topljive hemiceluloze (tH) i celuloze (C), izdvojenih iz ljuske crvenog luka inicijalnim postupkom fracioniranja polisaharida stanične stijenke. Man - manoz, Rha - ramnoza, GalUA - galakturonska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinoza, Fuc - fukoza.

Iako je zbroj udjela izdvojenih frakcija bio blizak udjelu strukturnih polisaharida u ovoj sirovini, bilance pojedinih monomera (Slika 46) pokazale su gubitke, što ukazuje na to da u izdvojenim frakcijama se osim polisaharida nalaze i duge koprecipitirane komponente u većem udjelu nego u ostalim sirovinama. S obzirom na zastupljenost u izvornoj sirovini i potencijal iskorištenja u obliku oligogalakturonida (OGaU) kao oblika pektinskih oligosaharida, najznačajnija je bila, dakako, bilanca GalUA. Iz rezultata je vidljivo da je najveći dio GalUA izdvojen u netopljivom obliku u celuloznoj frakciji (79,2 % ukupno izdvojenog galakturonana, tj. približno 38 % početnog udjela GalUA u OP). Svega približno 4 % početnog udjela GalUA u OP izdvojeno je u pektinskoj frakciji.

Dobiveni rezultati ukazuju na potrebu optimizacije ekstrakcije pektina (GalUA) iz OP u smislu smanjenja gubitaka galakturonana te povećanja ekstraktibilnosti u pektinskoj frakciji.



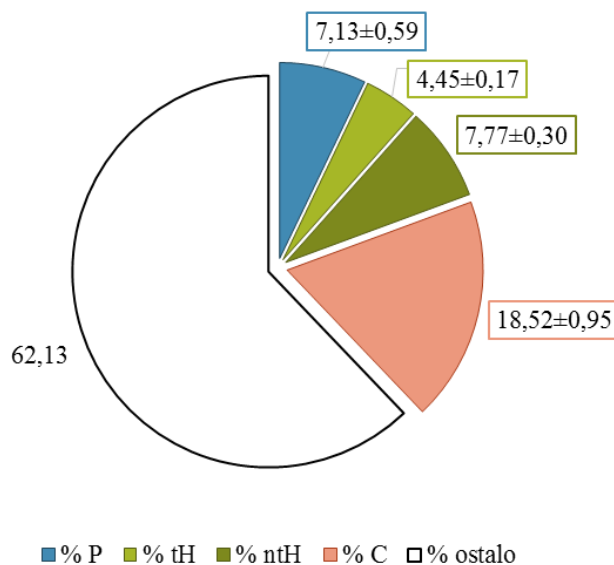
Slika 46. Bilanca monomera određenih u sastavu strukturnih polisaharida ljuske crvenog luka, izražena kao iskorištenje (%) pojedinog monomera u frakcijama izdvojenima inicijalnim postupkom frakcioniranja polisaharida stanične stijenke (P - pektinska frakcija, tH - topljiva hemicelulozna frakcija, C - celulozna frakcija) u odnosu na početni udjel monomera u sirovini. Man - manozna, Rha - ramnoza, GalUA - galakturonska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinosa, Fuc - fukoza.

#### 4.4.5 Polisaharidne frakcije mahune graška

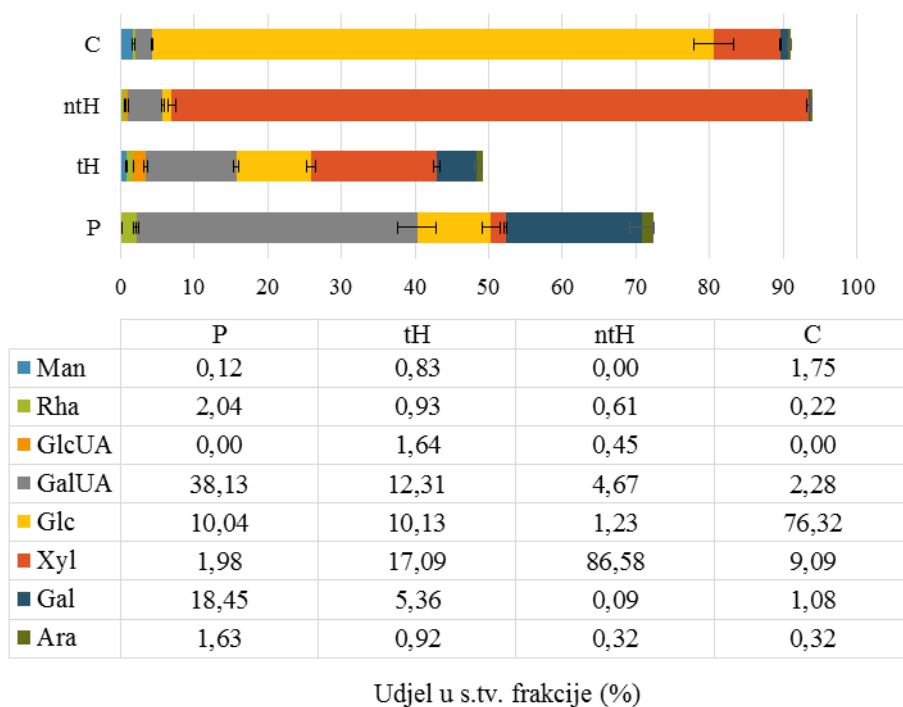
Slika 47 prikazuje prinose pojedinih izdvojenih frakcija primijenjenim inicijalnim postupkom frakcioniranja polisaharida stanične stijenke PP, izraženih na suhu tvar sirovine.

Kao i kod CBH, s obzirom na relativno nisku zastupljenost ukupnih strukturnih polisaharida općenito (u odnosu na druge sirovine), dobiveni prinosi izdvojenih polisaharidnih frakcija mogu se smatrati značajnima. Prinos pektinske frakcije iznosio je 7,13 % s.tv. sirovine, ukupne hemicelulozne frakcije 12,2 % s.tv. sirovine te celulozne frakcije 18,5 % s.tv. sirovine. Hemicelulozna frakcija izdvojena je u korist netopljive podfrakcije (~ 64 % ukupno izdvojene hemicelulozne frakcije).

Monomerni sastav (Slika 48) pektinske frakcije pokazao je karakteristično dominantnu zastupljenost GalUA, a zatim i galaktanom bogate RG-I regije. Također, primijećena je nešto viša zastupljenost Glc, što se može pripisati prisutnosti škroba koji se nije mogao izdvojiti tijekom ekstrakcije 70 %-tnim etanolom te je koprecipitirao u pektinskoj frakciji. Monomerni sastav tH indicira prisutnost smjese ksilana i ksiloglukana te rezidualnog pektina (GalUA + Gal). Ugljikohidratni prinos ove frakcije bio je relativno nizak (~ 50 % s.tv. frakcije), a može se objasniti prisutnošću preostalog lignina, čvrsto vezanog za hemicelulozne polimere. Podfrakcija ntH pokazala je vrlo visoku homogenost, gotovo isključivo je bila sastavljena od ksilana (uz malu prisutnost rezidualnih galakturonana i ksiloglukana), a također i vrlo visok



Slika 47. Prinosi frakcija pektina (P), topljive hemiceluloze (tH), netopljive hemiceluloze (ntH) i celuloze (C), izdvojenih iz mahune graška inicijalnim postupkom frakcioniranja polisaharida stanične stijenke.

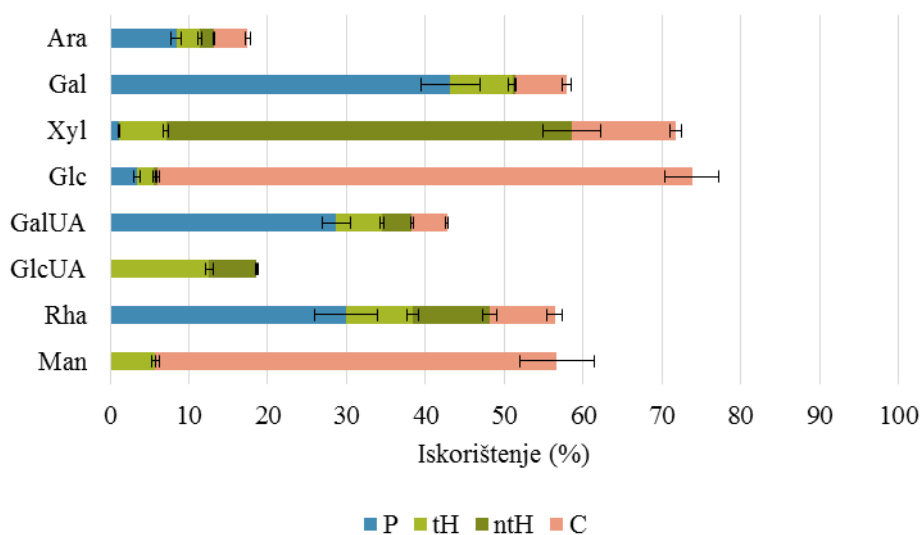


Slika 48. Monomerni sastav frakcija pektina (P), topljive hemiceluloze (tH), netopljive hemiceluloze (ntH) i celuloze (C), izdvojenih iz mahune graška inicijalnim postupkom frakcioniranja polisaharida stanične stijenke. Man - manozna, Rha - ramnoza, GlcUA - glukuronska kiselina, GalUA - galakturonska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinoza.

polisaharidni prinos (94,0 % s.tv. frakcije). U celuloznoj frakciji također je ostvaren visok polisaharidni prinos (91,1 % s.tv. frakcije), s relativnim udjelom Glc od 83,8 %. Necelulozne

primjese činili su rezidualni polisaharidi, uglavnom ksilan/ksiloglukan, manan/glukomanan te rezidualni pektin.

Rezultati bilanci pojedinih monomera (Slika 49), od kojih je najvažnija bilanca Xyl, pokazali su određene gubitke istih tijekom postupka frakcioniranja, ali općenito i najveće iskorištenje ciljanog monomera (u ovom slučaju Xyl) u odnosu na ostale sirovine. Ukupno iskorištenje Xyl tijekom postupka frakcioniranja iznosilo je 71,8 %, od čega je glavina izdvojena (51,4 % početnog udjela Xyl u PP) u obliku netopljive hemicelulozne podfrakcije. Relativno mali udjel (6 % početnog udjela Xyl u PP) izdvojen je u tH, najvjerojatnije u obliku ksiloglukana, dok je u C frakciji preostalo 13,3 % početnog udjela Xyl u PP. Bilanca glukoze također je pokazala visoko iskorištenje ovog monomera (73,8 % početnog udjela Glc u PP), uz manje gubitke koji se vjerojatnije odnose na gubitke ksiloglukana i glukomanana nego na degradaciju same celuloze tijekom postupka frakcioniranja.



Slika 49. Bilanca monomera određenih u sastavu strukturnih polisaharida mahune graška, izražena kao iskorištenje (%) pojedinog monomera u frakcijama izdvojenima inicijalnim postupkom frakcioniranja stanične stijenke (P - pektinska frakcija, tH - topljiva hemicelulozna frakcija, Hns - netopljiva hemicelulozna frakcija, C - celulozna frakcija) u odnosu na početni udjel monomera u sirovini. Man - manoza, Rha - ramnoza, GlcUA - glukuronska kiselina, GalUA - galakturonska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinoza.

Iako je ostvareno relativno visoko iskorištenje Xyl, dobiveni rezultati ukazuju da je potencijalno moguće ostvariti i veće prinose Xyl u jednoj frakciji (ntH) i to smanjenjem gubitaka (promjenom uvjeta delignifikacije i/ili alkalne ekstrakcije) i/ili udjela rezidualnog ksilana.

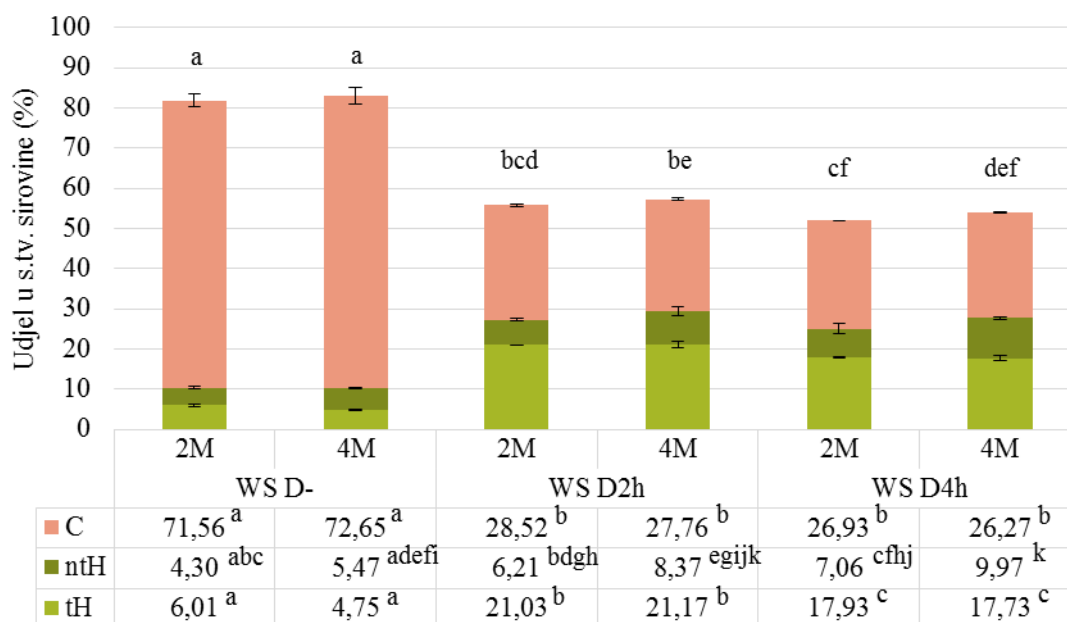
#### 4.5 Optimizacija izdvajanja ksilana iz ljuske oraha i mahune graška

Bilance Xyl uspostavljene nakon inicijalnog postupka frakcioniranja, ukazale su na potrebu za optimizacijom ekstrakcije ksilana u svrhu smanjenja njegova gubitaka te povećanja ekstraktibilnosti u jednoj od hemiceluloznih podfrakcija. S obzirom da su delignifikacija i alkalna ekstrakcija ključne u izdvajanju hemiceluloze iz matriksa stanične stijenke, upravo su ti koraci optimirani, dok je prethodna priprema materijala (izdvajanje ekstraktibilnih tvari i pektina) zadržana kao u inicijalnom postupku frakcioniranja. Negativan utjecaj delignifikacije potencijalno se može očitovati kroz kiselinsku hidrolizu hemiceluloznih polimera, uslijed kiselog delignifikacijskog medija (dodatak octane kiseline), te kroz oksidativnu degradaciju istih, usijed oksidativnog djelovanja klorova dioksida. Iako se Wiseova delignifikacija povezuje sa selektivnom solubilizacijom lignina, uz nisku solubilizaciju (gubitke) hemiceluloze (Rabetafika i sur., 2014; Nan i sur., 2018), degradativni učinci ovog postupka vidljivi su na celuloznim uzorcima (Hubbel i Ragauskas, 2010; Kumar i sur., 2013) te se ne može isključiti takav utjecaj, u određenoj mjeri, i na hemicelulozne polimere. Stoga, u delignifikacijskom koraku optimirano je vrijeme delignifikacije te ukupna količina dodanih reagensa. Delignifikacija je trajala duže i s više ukupno dodanih reagenasa u slučaju WS (u odnosu na delignifikacijske uvjete u inicijalnom postupku frakcioniranja) zbog značajno većeg udjela lignina u ovoj sirovini. Utjecaj delignifikacije istražen je i postavljanjem kontrolnih uzoraka iz kojih je hemiceluloza izdvojena alkalnom ekstrakcijom bez prethodne delignifikacije.

Alkalna ekstrakcija optimirana je s obzirom na molarnost otopine lužine. Pritom je korišten dodatak natrijeva borohidrida ( $\text{NaBH}_4$ ) kao reducensa koji sprječava  $\beta$ -eliminacijsku reakciju kojom se odcjepljuju monomeri s reducirajućeg kraja molekule. Ovakav degradativni učinak lužine poznat je pod nazivom “peeling effect”, a sprječava se redukcijom karbonilne skupine reducirajućeg kraja u hidroksidnu skupinu (Wang i sur., 2015b). Kao efektivna doza korištena je koncentracija  $\text{NaBH}_4$  od 20 mM. S obzirom na dodatak  $\text{NaBH}_4$ , neutralizacija alkalnog ekstrakta provedena je octenom kiselinom (koja uništava suvišak  $\text{NaBH}_4$ ), a zbog bolje topljivosti soli kalijeva acetata u otopini etanola (prilikom precipitacije hemiceluloze iz neutralnog ekstrakta), u samoj alkalnoj ekstrakciji korištena je otopina kalijeva hidroksida (KOH) umjesto natrijeva hidroksida (NaOH) (ekstrakcijski učinak obje lužine je, prema literaturi, jednak (Lawther i sur., 1996)). Ovime je smanjena mogućnost koprecipitacije soli s hemicelulozom, a time je olakšana i kasnija dijaliza uzoraka.

#### 4.5.1 Prinos i sastav izdvojenih frakcija

Slika 50 prikazuje prinose izdvojenih polisaharidnih frakcija iz WS za promjenjive parametre tijekom optimizacije ekstrakcije ksilana.

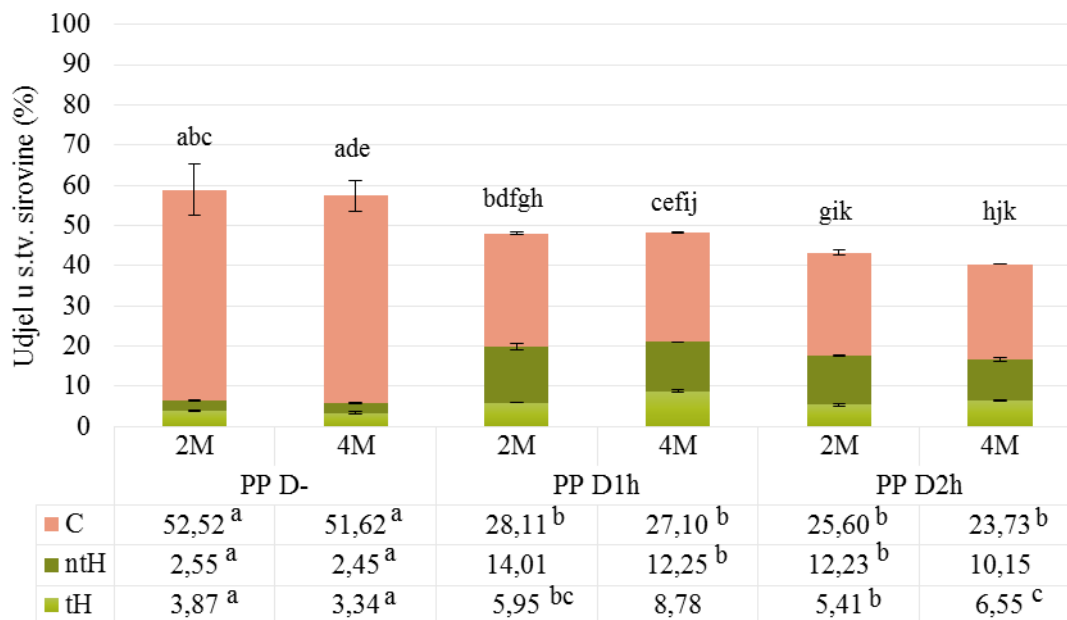


Slika 50. Prinosi izdvojenih polisaharidnih frakcija ljuske oraha (tH - topljiva hemiceluloza, ntH - netopljiva hemiceluloza, C - celulozni ostatak) za promjenjive parametre optimizacije ekstrakcije ksilana (D- - nedelignificirani uzorak, D2h - uzorak delignificiran 2h, D4h - uzorak delignificiran 4h, 2M i 4M – molarnost KOH). Vrijednosti u istome redu među kojima ne postoji statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ;  $n=2$ ) označene su istim slovom.

Iz rezultata je vidljivo da je ukupni prinos izdvojenih frakcija bio značajno različit za nedelignificirane i delignificirane uzorke, što je i rezultat udjela neuklonjenog lignina u celuloznoj frakciji nedelignificiranih uzoraka. Utjecaj delignifikacije bio je značajan i za ekstraktibilnost ksilana u hemiceluloznim podfrakcijama. Prinos ukupnih hemiceluloznih podfrakcija za nedelignificirane uzorke iznosio je približno 10 % s.tv. sirovine, dok za delignificirane uzorke je bio gotovo trostruko veći (najviše 29,5 % s.tv. sirovine, uzorak D2h 4M). U nedelignificiranim uzorcima izdvojena hemiceluloza gotovo je ravnomjerno bila raspodijeljena u topljivoj i netopljivoj podfrakciji, dok je kod delignificiranih uzoraka udjel tH je bio približno 2-3 puta veći od ntH, tj. delignifikacija je pogodovala ekstrakciji ksilana pretežno u topljivom obliku. Uvjeti delignifikacije te molarnost KOH nisu značajnije utjecali na prinos hemiceluloznih podfrakcija, a također i na ukupan prinos izdvojenih frakcija, što indicira da se većina lignina može uspješno ukloniti i primjenom blažih delignifikacijskih uvjeta. U odnosu na inicijalni postupak frakcioniranja, promjenom ekstrakcijskih uvjeta

postignuto je gotovo dvostruko povećanje prinosa tH, dok se prinos ntH nije značajno promijenio.

Slika 51 prikazuje prinose izdvojenih polisaharidnih frakcija iz PP za promjenjive parametre tijekom optimizacije ekstrakcije ksilana.



Slika 51. Prinosi izdvojenih polisaharidnih frakcija mahune graška (tH - topljiva hemiceluloza, ntH - netopljiva hemiceluloza, C - celulozni ostatak) za promjenjive parametre optimizacije ekstrakcije ksilana (D- - nedelignificirani uzorak, D2h - uzorak delignificiran 2h, D4h - uzorak delignificiran 4h, 2M i 4M – molarnost KOH). Vrijednosti u istome redu među kojima ne postoji statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ;  $n=2$ ) označene su istim slovom.

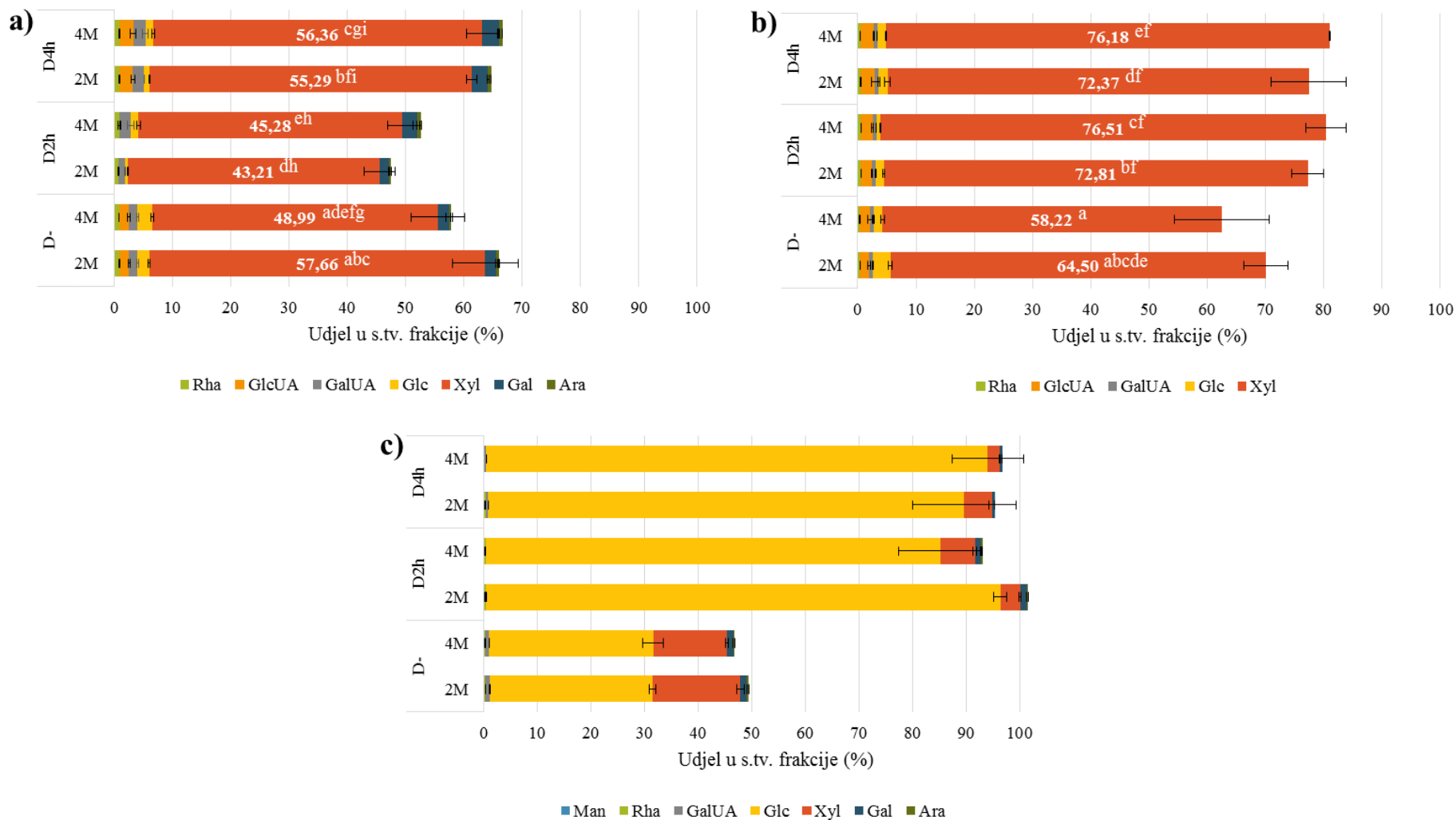
Kao i kod WS, delignifikacija je značajno utjecala na ukupni prinos izdvojenih frakcija, kao i na prinose hemiceluloznih podfrakcija. Iz nedelignificiranih uzoraka u hemiceluloznoj frakciji izdvojeno je približno tek 5-6 % s.tv. sirovine, a nakon delignifikacije, ukupni prinos hemiceluloznih podfrakcija bio je 3-4 puta veći (najviše 21,0 % s.tv. sirovine, uzorak D1h 4M). Povećana ekstraktibilnost hemiceluloze odrazila se i u topljivoj i netopljivoj podfrakciji, a pritom je porastao udjel ntH u ukupno izdvojenoj hemicelulozi. Promjena delignifikacijskih uvjeta odrazila se na ukupan prinos izdvojenih frakcija na način da je ostvaren manji prinos za jače delignifikacijske uvjete, što se najvjerojatnije odnosi na bolje uklanjanje lignina (budući da je ukupan prinos vrlo blizak ukupnom udjelu strukturnih polisaharida). Također je i prinos hemiceluloznih podfrakcija bio nešto niži za jače delignifikacijske uvjete, što može indicirati određeni stupanj degradacije hemiceluloznih polimera. Molarnost KOH nije imala značajan utjecaj na prinos ukupno izdvojenih i hemiceluloznih frakcija; međutim, vidljive su male

promjene u korist udjela tH u ukupno izdvojenim hemiceluloznim podfrakcijama primjenom lužine veće koncentracije.

Analiza monomernog sastava polisaharidnih frakcija izdvojenih iz WS tijekom postupka optimizacije ekstrakcije ksilana (Slika 52) pokazala je dominantnost Xyl u obje hemicelulozne podfrakcije. Za tH, relativni udjel Xyl za sve uzorke iznosio je 85,5 - 90,9 % ukupno određenih monomera, a između različito delignificiranih parova uzoraka, najuočljivije su razlike s obzirom na ukupan polisaharidni prinos (zbroj udjela svih monomera). Tako, blaži delignifikacijski uvjeti rezultirali su najnižim polisaharidnim prinosom (47,5 - 52,6 % s.tv. frakcije), što je u korelaciji s potencijalno većim udjelom preostalog lignina u ovoj podfrakciji uslijed, uvjetno rečeno, nepotpune delignifikacije. Osim prisutnosti ksilana, monomerni sastav indicira i prisutnost manjeg udjela rezidualnog pektina (s razgranatim regijama bogatima galaktanom), ali i prisutnost malog udjela ksiloglukana. Molarnost KOH nije značajnije utjecala na monomerni sastav uzorka, ali je vidljiv blagi utjecaj na ukupan polisaharidni prinos pojedinih uzoraka, što se može objasniti promjenama u ekstraktibilnosti hemicelulozno-ligninskih kompleksa, budući da se jedan dio lignina također može ekstrahirati u lužini. Za ntH uzorke u prosjeku su ostvareni veći ukupni polisaharidni prinosi, što je u skladu sa smanjenim udjelom lignina u ovoj podfrakciji, neovisno o delignifikacijskim uvjetima. Relativni udjel Xyl u ovim uzorcima bio je vrlo visok (gotovo homogena podfrakcija, relativni udjel Xyl 91,6 - 95,2 % s.tv. frakcije), a od ostalih polisaharida (osim ksilana) indicirana je vrlo mala prisutnost rezidualnog galakturonana i ksiloglukana. C frakcije delignificiranih uzoraka ostvarile su vrlo visoke polisaharidne prinose (prinos ukupnih monomera u frakciji), od najmanje 93 % s.tv. frakcije, uz relativno male udjele rezidualnog ksilana (najviše 7 % relativnog udjela svih monomera) te se ove frakcije mogu smatrati WS celulozom visoke čistoće. Kod C frakcija iz nedelignificiranih uzoraka vidljiva je prisutnost značajnog udjela neekstrahiranog ksilana (29,4 - 33,2 % relativnog udjela svih monomera) te neugljikohidratnih komponentata (~ 50 % s.tv. frakcije), prvenstveno lignina.

U usporedbi s monomernim sastavom frakcija izdvojenih inicijalnim postupkom fracioniranja, najveća razlika vidljiva je u udjelima GalUA, što se odnosi na drugačije analitičke metode, odnosno, monomerni sastav za inicijalni postupak fracioniranja određen je primjenom GC-FID (neutralni šećeri) i MHDP (uronske kiseline) metoda, dok za postupak optimizacije ekstrakcije ksilana primjenom optimirane PMP-HPLC-PDA metode.





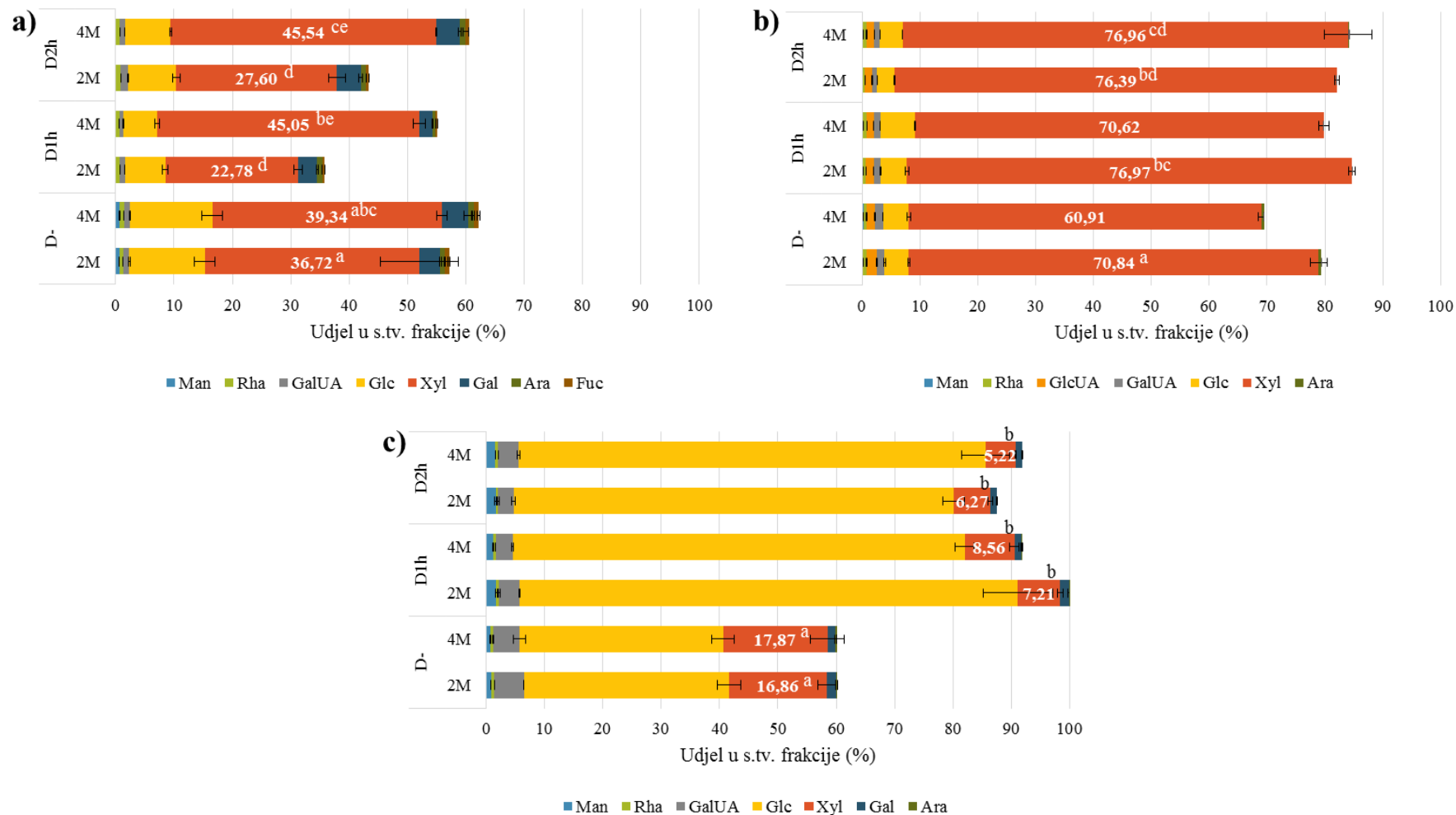
Slika 52. Monomerni sastav polisaharidnih frakcija (a - topljiva hemiceluloza, b - netopljiva hemiceluloza, c - celulozni ostatak) ljuske oraha izdvojenih tijekom postupka optimizacije ekstrakcije ksilana (D- - nedelignificirani uzorak, D2h - uzorak delignificiran 2h, D4h - uzorak delignificiran 4h, 2M i 4M – molarnost KOH). Rha - ramnoza, GlcUA - glukuronska kiselina, GalUA - galakturonska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinoza. Vrijednosti udjela Xyl među kojima ne postoji statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ;  $n=3$ ) označene su istim slovom.

Analiza monomernog sastava izdvojenih frakcija tijekom postupka optimizacije ekstrakcije ksilana provedena je i za PP frakcije (Slika 53). Kao i kod WS, monomerni sastav tH podfrakcija za sve uzorke pokazao je relativno niske ukupne polisaharidne prinose, u skladu s promjenom strukture lignina primijenjenim kemijskim postupcima te pretpostavljenim povećanim udjelom hemiceluloza-lignin kompleksa u ovoj podfrakciji. Pritom, moguć je efekt dodatne degradacije/solubilizacije lignina prilikom ekstrakcije lužinom veće koncentracije te su posljedično ovi uzorci imali veći prinos ukupnih polisahrida u frakciji uslijed smanjenog udjela hemiceluloza-lignin kompleksa. U odnosu na WS tH podfrakcije, vidljiva je veća zastupljenost Glc što indicira i potencijalno veću zastupljenost ksiloglukana, uz ksilan, što se pripisuje nativnim razlikama sastava hemiceluloze ovih dviju sirovina. Također, vidljiva je prisutnost rezidualnog pektina s rezgranatim regijama bogatima galaktanom.

Kao i kod WS, u ntH podfrakcijama određeni su veći ukupni polisaharidni prinosi te veći relativni udjeli Xyl (87,7 - 93,1 % s.tv. frakcije) te je indiciran nešto veći udjel ksiloglukana nego u ntH WS, što se pripisuje nativnim razlikama dviju sirovina.

C frakcije su pokazale su vrlo visoku polisaharidnu čistoću (najmanje 87,5 % s.tv. frakcije) za delignificirane uzorke, s dominantnom glukozom (84,4 - 87,2 % relativnog udjela svih monomera) te primjesma rezidualnog ksilana/ksiloglukana, ali i pektina čvrsto povezanog s celulozom. Za C frakcije nedelignificiranih uzorka, kao i kod WS, karakterističan je bio relativno nizak polisaharidni prinos (~ 60 % s.tv. frakcije) te povećan udjel neekstrahiranog ksilana (~ 30 % relativnog udjela svih monomera).

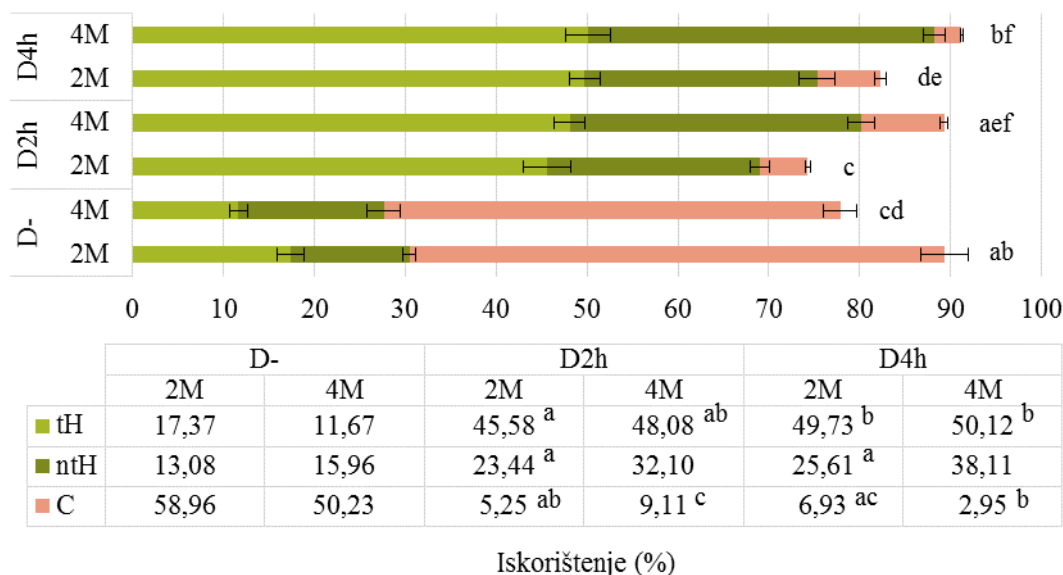
U usporedbi s frakcijama izdvojenima inicijalnim postupkom fracioniranja, vidljiva je razlika najviše u udjelima GalUA, što se objašnjava različitostima u analitičkom pristupu.



Slika 53. Monomerni sastav polisaharidnih frakcija mahune graška (a - topljiva hemiceluloza, b - netopljiva hemiceluloza, c - celulozni ostatak) izdvojenih tijekom postupka optimizacije ekstrakcije ksilana (D- - neddelignificirani uzorak, D2h - uzorak delignificiran 2h, D4h - uzorak delignificiran 4h, 2M i 4M – molarnost KOH). Man - manoz, Rha - ramnoza, GlcUA - glukuronska kiselina, GalUA - galakturonska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinoza, Fuc - fukoza. Vrijednosti udjela Xyl među kojima ne postoji statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ;  $n=3$ ) označene su istim slovom.

#### 4.5.2 *Bilance ksiloze*

Na temelju rezultata prinosa izdvojenih polisaharidnih frakcija tijekom postupka optimizacije ekstrakcije ksilana iz WS i PP, rezultata njihovog monomernog sastava te početnog monomernog sastava ovih sekundarnih sirovina, izrađene su bilance pojedinih monomera (Slika 54 i Slika 55) u svrhu određivanja uspješnosti ekstrakcijskog postupka.



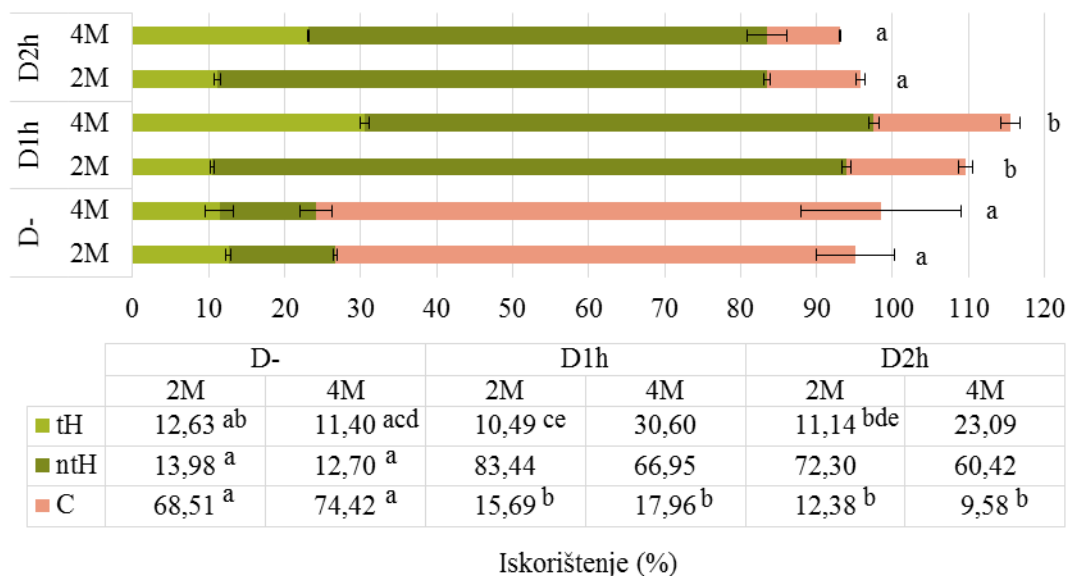
Slika 54. Bilance ksiloze za promjenjive parametre optimizacije ekstrakcije ksilana iz ljuske oraha, prikazane kao iskorištenje (%) ksiloze u pojedinoj frakciji (tH - topljiva hemiceluloza, ntH - netopljiva hemiceluloza, C - celulozni ostatak) u odnosu na početni udjel ksiloze u sirovini (D- - neddelignificirani uzorak, D2h - uzorak delignificiran 2 h, D4h - uzorak delignificiran 4 h, 2M i 4M – molarlost KOH). Vrijednosti u istome redu među kojima ne postoji statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ;  $n=6$ ) označeni su istim slovom.

Iz rezultata bilance ksiloze za WS (Slika 54) vidljivo je vrlo visoko ukupno iskorištenje Xyl za sve uzorke (74,3 - 91,2 % početnog udjela Xyl u WS). Ipak, prisutne su određene razlike između uzorka koje se značajnije mogu pripisati varijabilnosti udjela vlage u pojedinim podfrakcijama (uslijed kojih su prinosi nekih frakcija bili nešto veći), radije nego stvarnom utjecaju uvjeta delignifikacije ili alkalne ekstrakcije. Uzrok gubitaka Xyl može biti u degradativnom učinku lužine (u manjem opsegu) ili pak gubitku nativno prisutnih oligomernih ili kratkih polimernih lanaca ksilana koji se ne mogu precipitirati dodatkom etanola te se posljedično izgube u filtratu nakon izdvajanja etanolom precipitirane hemiceluloze. Prisutnost razgranatih hemiceluloznih polimera relativno niske molekulske mase (hemiceluloza C, u skladu s prethodno navedenim oznakama „A“ i „B“ za netopljivu i topljivu hemiceluloznu podfrakciju, poglavlje 4.4) koji zaostaju u etanolnom filtratu nakon precipitacije topljive hemiceluloze, opisana je u ranijim

istraživanjima (Verwimp i sur., 2007). U slučaju da su gubici nastali tijekom postupka ekstrakcije, evidentnije je potencijalno jače degradativno djelovanje alkalne ekstrakcije nego delignifikacijskih uvjeta, budući da su se gubici dogodili i kod nedelignificiranih uzoraka. Ipak, za očekivati je da degradativni učinak lužine znatno smanjen dodatkom reducensa  $\text{NaBH}_4$ . Tijekom optimizacije, delignifikacija je imala ključnu ulogu u ekstraktibilnosti ksilana, što je vidljivo iz podatka da je tek približno 30 % početnog udjela Xyl moguće izdvojiti alkalnom ekstrakcijom bez prethodne delignifikacije. Nakon delignifikacije, postignuto je vrlo visoko iskorištenje Xyl u hemiceluloznim podfrakcijama (69,0 - 88,2 % početnog udjela Xyl u WS). Pritom, uvjeti delignifikacije nisu imali značajan utjecaj, dok se vidljiv utjecaj koncentracije lužine u korist (veće iskorištenje) 4 M KOH ne može racionalno pripisati stvarnom utjecaju, već najvjerojatnije manjim varijacijama u udjelu vlage u ntH podfrakcijama. Uvjeti izdvajanja koji pogoduju najvišem iskorištenju ksilana su: delignifikacija tijekom 4 h uz ukupno dodane 2,4 g natrijeva klorita ( $\text{NaClO}_2$ )/g uzorka i 2,4 mL octene kiseline ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )/g uzorka u 4 jednaka obroka (na početku te svakih 60 min), nakon koje slijedi alkalna ekstrakcija primjenom 4 M KOH tijekom 4 h. Primjenom navedenih parametara postiže se iskorištenje Xyl, kao ukupno izdvojene hemiceluloze, od 88,2 % početnog udjela Xyl u WS (što je jednako 17,6 % s.tv. izvorne sirovine), gotovo podjednako u topljivoj i netopljivoj podfrakciji (57:43 u korist tH). Skraćivanjem vremena delignifikacije te količine dodanih reaktanata za dvostruko, postiže se također visoko iskorištenje Xyl u hemiceluloznim podfrakcijama (80,2 % početnog udjela Xyl u WS, odnosno 16,0 % s.tv. izvorne sirovine), a pritom je ostvarena ušteda vremena i kemikalija koja potencijalno nadilazi smanjeno iskorištenje Xyl. Stoga, ovi parametri (delignifikacija tijekom 2 h uz dodatak ukupno 1,2 g natrijeva klorita ( $\text{NaClO}_2$ )/g uzorka i 1,2 mL octene kiseline ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )/g uzorka u 2 jednaka obroka (na početku i nakon 60 min)) mogu se smatrati optimalnima za izdvajanje ksilana iz WS.

U usporedbi s inicijalnim postupkom fracioniranja polisaharida stanične stijenke (Slika 40), optimizacijom uvjeta ekstrakcije (Slika 54) postignuto je dvostuko povećanje iskorištenja Xyl u hemiceluloznim podfrakcijama, uz nešto veće povećanje iskorištenja u tH podfrakciji u odnosu na ntH. Pritom, razlogom povećanja iskorištenja u najvećoj mjeri smatra se sprječavanje “peeling” efekta tijekom alkalne ekstrakcije, dodatkom reducensa  $\text{NaBH}_4$ .

Slika 55 prikazuje bilance ksiloze za frakcije izdvojene tijekom optimizacije ekstrakcije ksiloze iz PP. Iz rezultata je vidljivo da su postignuta vrlo visoka iskorištenja za sve uzorke, od najmanje 93,1 % početnog udjela Xyl u PP (uzorak D2h 4M). Vrlo mali gubici najvjerojatnije su posljedica gubitka nativno prisutnih fragmenata relativno male molekulske mase, ali i mogućeg, doduše slabog, degradativnog djelovanja lužine.



Slika 55. Bilance ksiloze za promjenjive parametre optimizacije ekstrakcije ksilana iz mahune graška, prikazane kao iskorištenje (%) ksiloze u pojedinoj frakciji (tH - topljiva hemiceluloza, ntH - netopljiva hemiceluloza, C - celulozni ostatak) u odnosu na inicijalni udjel ksiloze u sirovini (D- - nedelignificirani uzorak, D1h - uzorak delignificiran 1 h, D2h - uzorak delignificiran 2 h, 2M i 4M – molarlost KOH). Vrijednosti u istome redu među kojima ne postoji statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ;  $n=6$ ) označeni su istim slovom.

Kao i kod WS, delignifikacija je imala ključan utjecaj na ekstraktibilnost ksilana, a u nedostatku iste, pri zadanim uvjetima alkalne hidrolize, bilo je moguće izdvojiti tek približno 25 % početnog udjela Xyl, u obliku topljive i netopljive podfrakcije podjednako. Delignifikacijom je povećano ukupno iskorištenje Xyl u hemiceluloznim podfrakcijama od najmanje 3 puta. Pritom, promjena delignifikacijskih uvjeta nije imala značajan utjecaj. Postignuto iskorištenje veće od 100 % (D1h uzorci) može se pripisati malim varijacijama udjela vlage u uzorcima, odnosno, moguće je da svi uzorci, iako su pripremani u jednakim uvjetima, nisu na kraju pripreme sadržavali jednak udjel vlage, što se očitovalo kao blago povišenje prinosa pojedinih uzoraka, a zbog bliskosti teorijskom i maksimalnom iskorištenju, i kao iskorištenje Xyl veće od 100 %. Kao uvjeti izdvajanja (delignifikacija i alkalna ekstrakcija) koji pogoduju najvišem iskorištenju ksilana iz PP definiraju se: delignifikacija tijekom 2 h uz dodatak ukupno 1,2 g  $\text{NaClO}_2$  /g uzorka i 1,2 mL  $\text{CH}_3\text{COOH}$ /g uzorka u 2 jednaka obroka (na početku i nakon 60 min), te zatim alkalna ekstrakcija 2 M KOH tijekom 4 h. Primjenom ovih parametara postignuto je iskorištenje Xyl u hemiceluloznim podfrakcijama od 83,4 % početnog udjela Xyl u PP (10,8 % s.tv. izvorne sirovine), od čega dominantno u ntH podfrakciji (86,7 % izdvojenog ksilana u hemiceluloznih podfrakcijama). Pretpostavlja se da dvostruko smanjenje trajanja i količine

dodanih reaktanata tijekom delignifikacije (za iste uvjete alkalne ekstrakcije) rezultira vrlo sličnim iskorištenjem (na temelju ovih rezultata nije moguće kvantificirati koliko), što nudi prednost uštede vremena i kemikalija. Stoga, delignifikacija u trajanju 1 h (dodano 0,6 g NaClO<sub>2</sub> i 0,6 mL CH<sub>3</sub>COOH; jednokratno) te alkalna ekstrakcija 2 M KOH u trajanju 4 h mogu se smatrati optimalnim uvjetima izdvajanja ksilana iz PP. Utjecaj koncentracije KOH vidljiv je u promjenama udjela topljive i netopljive podfrakcije na način da KOH niže koncentracije pogoduje izdvajanju ksilana u ntH. S obzirom da pri odabranim optimalnim uvjetima ekstrakcije u tH se izdvaja tek približno 10 % ukupno prisutne Xyl u PP, od čega značajan dio otpada na ksiloglukan (s obzirom na monomerni sastav, Slika 53), ntH se može smatrati značajnom podfrakcijom u kojoj se izdvaja ksilan iz PP te je u tom slučaju u optimalnim uvjetima ekstrakcije postignuto iskorištenje od 72,3 % početnog udjela Xyl u PP, odnosno 9,3 % s.tv. izvorne sirovine.

U usporedbi s inicijalnim postupkom frakcioniranja polisaharida stanične stijenke PP (Slika 49), postignuto je apsolutno povećanje iskorištenja Xyl u hemiceluloznim podfrakcijama za 26 %, od čega najviše u podfrakciji ntH (~ 80 % vrijednosti apsolutnog povećanja iskorištenja). S obzirom da je udjel rezidualnog ksilana gotovo jednak za inicijalno frakcioniranje i optimalne uvjete ekstrakcije, povećanje iskorištenja Xyl pripisuje se sprječavanju “peeling” efekta dodatkom reducensa NaBH<sub>4</sub> tijekom alkalne ekstrakcije.

#### **4.5.3 Strukturne karakteristike izdvojenih hemiceluloznih podfrakcija**

Profil glikozidnih veza određen je u hemiceluloznim podfrakcijama WS i PP izdvojenima u inicijalnom postupku frakcioniranja polisaharida stanične stijenke. S obzirom na sličnosti monomernog sastava, kvalitativne strukturne karakteristike mogu se prenijeti i na podfrakcije izdvojene optimiranim postupcima ekstrakcije.

Tablica 40 prikazuje relativnu zastupljenost pojedinih identificiranih glikozidnih veza. Iz rezultata je vidljiva vrlo visoka relativna zastupljenost  $\beta$ -(1,4) glikozidne veze između D-Xylp jedinica u svim uzorcima, a napose ntH, s djelomičnom supstitucijom na O-2 i/ili O-3 pozicijama, što potvrđuje da je dominantan hemicelulozni polisherid u ovim podfrakcijama (i sirovinama) glukuronoksilan (4-O-metil-glukuronoksilan) i/ili arabinoglukuronoksilan. Stupanj supstitucije izrazito je nizak, naročito za ntH, dok za tH ipak nešto viši, što potencijalno ukazuje na povezanost strukturnih karakteristika ksilana i topljivosti istoga. Danas je poznato da topljivost ksilana ovisi o supstituiranosti ksilanske okosnice različitim glikozilnim jedinicama, donosno raspodjeli istih, ali i o prisutnosti acetilnih skupina te mogućih veza s ligninom ili unakrsnih povezivanja polimera preko fenolnih kiselina. Također, raspodjela inter-

i intramolekulskih vodikovih veza koje su native ili nastale tijekom postupka izdvajanja, sušenja ili čuvanja, mogu utjecati na topljivost ksilana (Ebringerová i sur., 2005).

Tablica 40. Profil glikozidnih veza u podfrakcijama netopljivih (ntH) i topljivih (tH) hemiceluloza izdvojenih iz ljuske oraha (WS) i mahune graška (PP).

Glikozidna veza	Strukturna jedinica	Relativni udjel			
		WS_ntH	WS_tH	PP_ntH	PP_tH
Araf t	Araf-(1→	0.5	1.5	0.3	2.0
2,3,5-Araf	→2,3,5)-Araf-(1→	-	1.0	-	2.7
<b>Ukupne veze arabinoze</b>		<b>0.5</b>	<b>2.5</b>	<b>0.3</b>	<b>4.7</b>
Xylp t	Xylp-(1→	0.8	1.3	0.8	6.3
4-Xylp	→4)-Xylp-(1→				
+	+	96.1	87.6	96.8	56.7
2-Xylp	→2)-Xylp-(1→				
2,4-Xylp	→2,4)-Xylp-(1→	1.8	3.9	1.3	1.8
3,4-Xylp	→3,4)-Xylp-(1→	0.6	0.9	0.7	0.4
2,3,4-Xylp	→2,3,4)-Xylp-(1→	0.1	0.4	-	1.5
<b>Ukupne veze ksiloze</b>		<b>99.4</b>	<b>94.1</b>	<b>99.6</b>	<b>66.7</b>
4-Glcp	→4)-Glcp-(1→	0.1	0.9	<0.1	10.9
4,6-Glcp	→4,6)-Glcp-(1→	-	0.8	-	11.6
<b>Ukupne veze glukoze</b>		<b>0.1</b>	<b>1.7</b>	<b>0.1</b>	<b>22.5</b>
Galp t	Galp-(1→	-	0.6	-	3.6
6-Galp	→6)-Galp-(1→	-	0.3	-	0.9
3,6-Galp	→3,6)-Galp-(1→	-	0.2	-	0.5
<b>Ukupne veze galaktoze</b>		<b>-</b>	<b>1.1</b>	<b>-</b>	<b>5.0</b>
2,4-Rhaf	→2,4)-Rhaf-(1→	-	0.6	-	1.1
<b>Ukupne veze ramnoze</b>		<b>-</b>	<b>0.6</b>	<b>-</b>	<b>1.1</b>

S obzirom da alkalna ekstrakcija, neovisno o prisutnosti NaBH<sub>4</sub>, uzrokuje gotovo kvantitativno odcjepljivanje acetilnih skupina, isto je moglo značajno pridonijeti netopljivosti velikog dijela hemiceluloze (Ren i Sun, 2010). Također, visok stupanj polimerizacije te niska supstituiranost okosnice polimera značajno pridonose netopljivosti istoga (Kabel i sur., 2007). U skladu s navedenim, analiza glikozidnih veza netopljivih podfrakcija zaista jest pokazala da su iste karakterizirane dugačkim nesupstituiranim regijama, dok u tH ipak nešto višu zastupljenost bočnih jedinica, ali i povezanost s potencijalno galaktanima bogatim pektinom, što je moglo rezultirati promjenom topljivosti. Povećana supstituiranost tH podfrakcija primarno je vidljiva za O-2 (WS\_tH) te O-2/O-3 pozicije (PP\_tH), a također se može primijetiti povećana supstitucija nereducirajućim L-Araf jedinicama (L-Araft). Osim glukuronoksilana, u tH podfrakciji PP vidljiva je prisutnost i ksiloglukana (relativnog udjela ~ 30 % svih glikozidnih



veza) kroz prisutnost *O*-4-vezanih i *O*-6-razgranatih D-Glcp jedinica te nereducirajućih D-Xylp jedinica u znatno većem udjelu nego u ostalim uzorcima.

Potvrda strukture ksilana u WS i PP u obliku glukuronoksilana (4-*O*-metil-glukuronoksilana) i/ili arabinoglukuronoksilana nametnula je i potrebu za praćenjem bilance glukuronske kiseline. Promatrajući molarne omjere GlcUA i Xyl u početnom monomernom sastavu WS i PP (Slika 32; ilustrativno, s obzirom da rezultati nisu izraženi kao molarni već maseni udjeli), za WS je određen molarni omjer 12:1 - 13:1 (Xyl:GlcUA), što je blisko omjeru 10:1, karakterističnom za glukuronoksilane tvrdih drva (Ebringerová i sur., 2005). Za PP je puno nezahvalnije odrediti ovaj omjer s obzirom da se ukupno određeni ksilan u ovoj sirovini jednim dijelom odnosi i na ksiloglukan. S obzirom na karakteristike ksilana iz WS i PP, očekivani su veći udjeli GlcUA u monomernom sastavu izdvojenih podfrakcija, naročito tH, međutim, bilanca GlcUA za optimalne uvjete ekstrakcije (D4h 4M za WS i D2h 2M za PP, rezultati nisu zasebno prikazani) pokazala je iskorištenje od približno 30 % početnog udjela GlcUA u WS i približno 23 % početnog udjela GlcUA u PP. Ovakvi rezultati ukazuju na značajne gubitke GlcUA, hidrolizom u lužnatom mediju. Ebringerová i suradnici (2005) navode da alkalna ekstrakcija dovodi do gubitka acetilnih skupina, ali i uronskih kiselina, te da omjer Xyl:GlcUA značajno može ovisiti o načinu izdvajanja ksilana. S druge strane, razlozi vidljivog “gubitka” mogu biti i analitičke prirode. Naime, istraživanja pokazuju da je glikozidna veza između Me-GlcUA (metilirane jedinice glukuronske kiseline) i ksilanske okosnice jača nego između ksilopiranozilnih ostataka same okosnice, što može dovesti do nepotpune hidrolize te određenog stupnja pogreške u kasnijoj analizi monomernog sastava (De Ruiter i sur., 1992; Tenkanen i sur., 1995). Osim toga, korištenje neodgovarajućeg standarda (GlcUA umjesto Me-GlcUA), također može dovesti do netočne kvantifikacije i smanjenog stvarnog prinosa Me-GlcUA za 30 % (Chong i sur. 2013). Nedavno su Lorenz i suradnici (2016) pokazali da definiranje jedinstvene metode za potpunu kiselinsku hidrolizu svih biljnih materijala nije moguće s obzirom na vrlo različitu zastupljenost glikozidnih veza različite podložnosti hidrolizi pri klasičnim hidrolitičkim uvjetima. U istome radu, predhidrolitički korak inkubiranja biljnog materijala u jakoj kiselini značajno je povećao prinos Me-GlcUA. U ovome radu slični su uvjeti ostvareni tijekom početne analize monomernog sastava sirovina te u analizi nH, s obzirom da se radilo o netopljivim uzorcima, dok za tH uzorke predhidroliza nije bila provedena. U skladu s time, nepotpuno oslobađanje GlcUA (Me-GlcUA) tijekom hidrolize tH može biti uzrok niskog iskorištenja vidljivog u bilanci GlcUA. Također, s obzirom na nedostatak standarda Me-GlcUA, kromatografsko ponašanje ovog analita nije poznato te postoji mogućnost da primijenjenom PMP-HPLC-PDA metodom određen samo dio nemetilirane GlcUA. Na kromatogramima su vidljivi

neidentificirani pikovi koji eluiraju u blizini GlcUA te je potrebno dodatno istražiti odnose li se isti potencijalno na Me-GlcUA i/ili (Me-)GlcUA-Xyl dimere.

#### 4.6 Optimizacija izdvajanja pektina iz pulpe šećerne repe, ljuske kakaovog zrna i ljuske crvenog luka

##### 4.6.1 Predtretman ultrazvukom visokog intenziteta

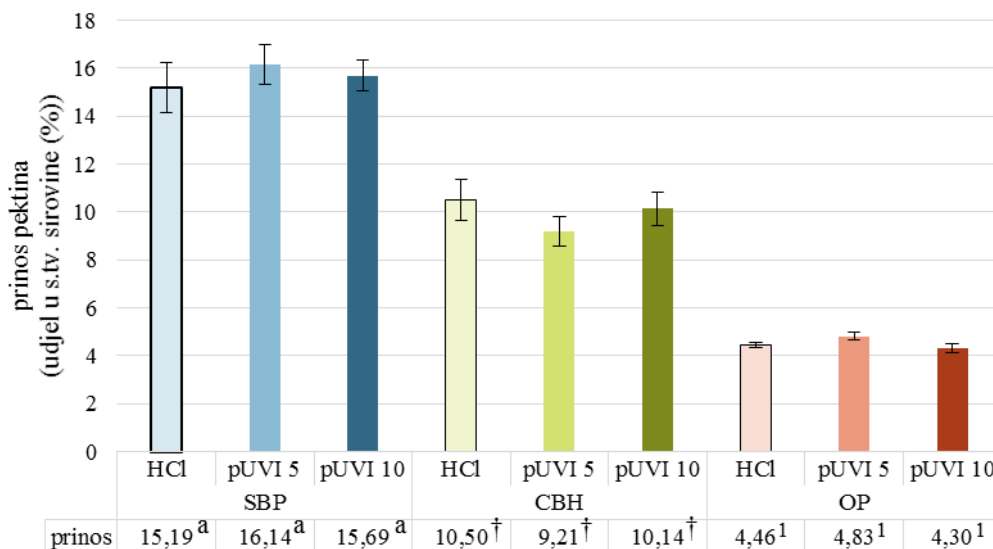
U ovome radu ultrazvuk visokog intenziteta (UVI) korišten je kao predtretman, tj. nadopuna konvencionalnoj ekstrakciji pektina razrijeđenom kiselinom pri visokoj temperaturi. Tablica 41 prikazuje parametre predtretmana UVI.

Tablica 41. Parametri predtretmana ultrazvukom visokog intenziteta.

Oznaka predtretmana	Uzorci	Medij	Trajanje predtretmana (min)	Početna prosječna temperatura (°C)	Konačna prosječna temperatura (°C)	Amplituda (%)	Prosječan intenzitet (W/cm <sup>2</sup> )	Prosječna gustoća snage (W/cm <sup>3</sup> )
UVI_5'	SBP, CBH, OP	H <sub>2</sub> O (razrijeđena otopina HCl, pH 1,5)	5	23	48	100	117,8	0,35
UVI_10'			10	23	57,5	100	81,3	0,24

Prinos pektinskih frakcija (Slika 56) iz SBP, CBH i OP, dobivenih primjenom predtretmana UVI u kombinaciji s konvencionalnom ekstrakcijom, određen je gravimetrijski. Iz rezultata je vidljivo da primjenom predtretmana UVI nije došlo do značajne promjene prinosa pektinskih frakcija iz SBP, CBH i OP. Općenito, primjena ultrazvuka u ekstrakciji mnogih spojeva iz različitih biljnih izvora dobro je istražena, međutim, mehanizmi njegovog djelovanja i danas nisu u potpunosti razjašnjeni te se uglavnom proučavaju učinci ultrazvuka (Chemat i sur., 2017). Učinci povećane ekstrakcijske učinkovitosti uglavnom se pripisuju kavitacijskom fenomenu, odnosno imploziji kavitacijskih mjehurića na površini čvrste tvari i učincima koji proizlaze iz istoga, kao što su ljuškanje površine, erozija, fragmentacija, sonoporacija, sonokapilarni efekt te mikroturbulencije (Chemat i sur., 2017). Navedeni mehanizmi rezultiraju povećanom narušenosti organizacije stanične stijenke te posljedičnom povećanom dostupnosti unutrašnjih struktura uslijed kojih se iste lakše otpuštaju u medij otapala, što rezultira uspješnijom ekstrakcijom (Xu i sur., 2014). Primjena UVI u ekstrakciji biljnih polisaharida detaljno je prikazana u preglednom radu Ebringerová-e i Hromádková-e (2010), a za pektine iz komercijalnih izvora, poput komine jabuke, navodi se povećanje prinosa primjenom ultrazvuka. I za druge konvencionalne izvore pektina, pr. koru grejpa, određeno je povećanje prinosa

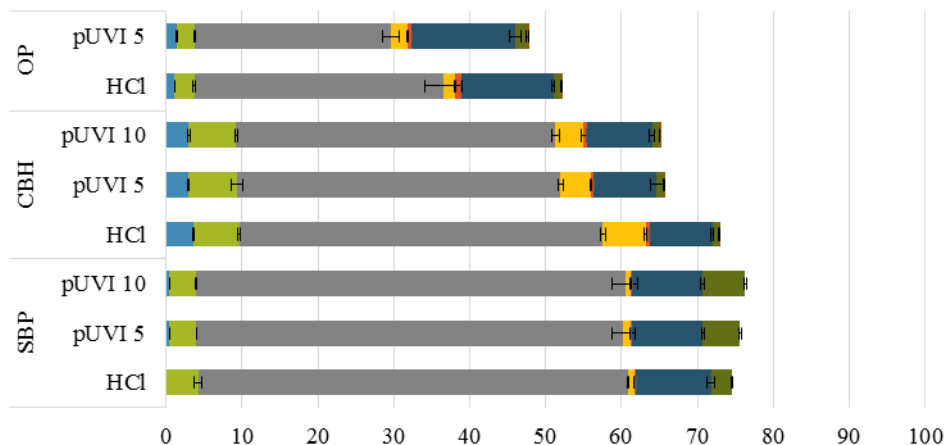
pektina u ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom, uz redukciju vremena i temperature ekstrakcije (Wang i sur., 2015a).



Slika 56. Usporedba prinosa (udjel u s.tv. sirovine (%)) pektinskih frakcija pulpe šećerne repe (SBP), ljuske kakaovog zrna (CBH) i ljuske crvenog luka (OP) izdvojenih primjenom konvencionalne metode (HCl) te iste uz predtretman ultrazvukom visokog intenziteta (UVI) tijekom 5 i 10 minuta. Vrijednosti među kojima ne postoji statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ;  $n=2$ ) označene su na jednak način (SBP - slovo; CBH - znak, OP - broj).

Korištenje UVI u ovome radu, kao predtretmana konvencionalnoj ekstrakciji, provedeno je kako bi se potencijalno povećala poroznost stanične stijenke te narušila visoka organizacija iste, što bi moglo dovesti do povećanja ekstrakcije učinkovitosti. S obzirom da je izostao željeni učinak, može se pretpostaviti da je ekstraktibilnost pektina iz ovih sirovina uglavnom povezana s primjenom otapala te da povećana fizička dostupnost manje pridonosi ekstraktibilnosti pri zadanim uvjetima. U usporedbi s drugim istraživanjima (Xu i sur., 2014; Wang i sur., 2015), u ovome radu korišteno je značajno kraće vrijeme te niža temperatura predtretmana, što je također potencijalni razlog nepostizanja željenog povećanja prinosa pektina, jednako kao i različitost samih pektinskih sirovina.

Slika 57 prikazuje monomerni profil za UVI ekstrahirane pektine iz SBP, CBH i OP u usporedbi s konvencionalno ekstrahiranim pektinima (pomoću razrijeđene kiseline (HCl), u inicijalnom postupku fracioniranja polisaharida stanične stijenke).



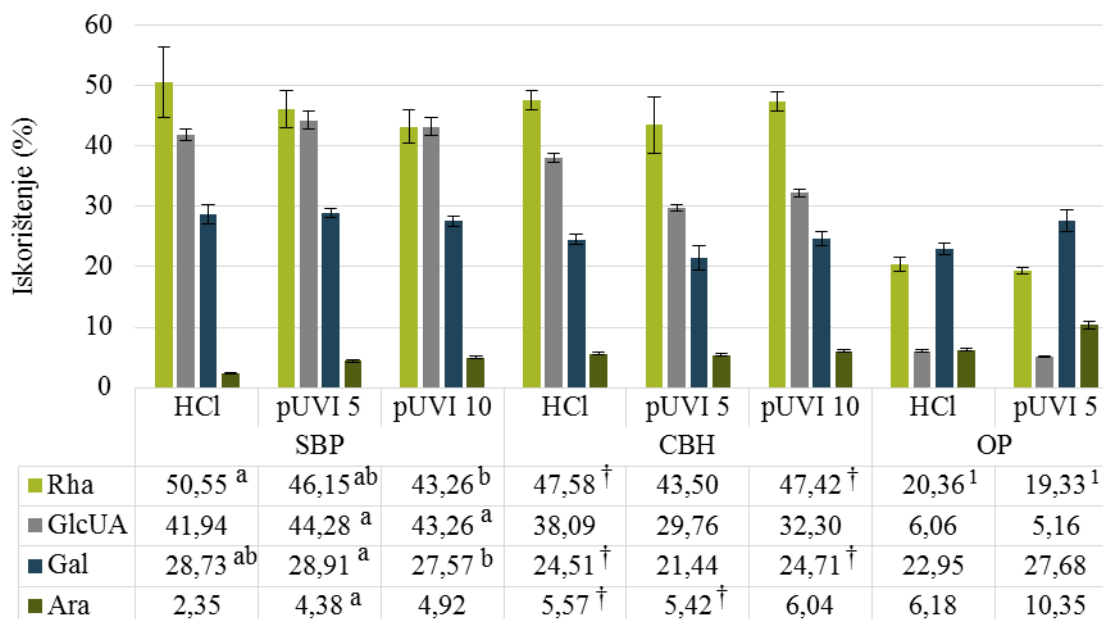
	SBP			CBH			OP	
	HCl	pUVI 5	pUVI 10	HCl	pUVI 5	pUVI 10	HCl	pUVI 5
■ Man	0,00	0,41 <sup>a</sup>	0,43 <sup>a</sup>	3,62	2,97 <sup>†</sup>	2,95 <sup>†</sup>	1,09	1,46
■ Rha	4,18 <sup>a</sup>	3,59 <sup>ab</sup>	3,47 <sup>b</sup>	6,04 <sup>†</sup>	6,29 <sup>†</sup>	6,23 <sup>†</sup>	2,63	2,31
■ Gal UA	56,64 <sup>a</sup>	56,26 <sup>a</sup>	56,56 <sup>a</sup>	47,92	42,69 <sup>†</sup>	42,10 <sup>†</sup>	32,81	25,84
■ Glc	0,84 <sup>a</sup>	0,88 <sup>a</sup>	0,80 <sup>a</sup>	5,63	3,98 <sup>†</sup>	3,71 <sup>†</sup>	1,59	2,19
■ Xyl	0,22 <sup>a</sup>	0,20 <sup>a</sup>	0,19 <sup>a</sup>	0,54	0,42 <sup>†</sup>	0,40 <sup>†</sup>	0,72	0,60
■ Gal	9,91 <sup>a</sup>	9,38 <sup>a</sup>	9,21 <sup>a</sup>	8,27 <sup>†</sup>	8,25 <sup>†</sup>	8,64 <sup>†</sup>	12,18 <sup>1</sup>	13,59 <sup>1</sup>
■ Ara	2,77	4,87	5,63	0,86	0,96 <sup>†</sup>	0,97 <sup>†</sup>	1,05	1,62
■ Fuc	0,00	0,00	0,00	0,22 <sup>†</sup>	0,21 <sup>†</sup>	0,21 <sup>†</sup>	0,22 <sup>1</sup>	0,23 <sup>1</sup>

Udjel u s.tv. frakcije (%)

Slika 57. Usporedba monomernog sastava pektinskih frakcija (udjel u s.tv. frakcije (%) pulpe šećerne repe (SBP), ljuske kakaovog zrna (CBH) i ljuske crvenog luka (OP) izdvojenih primjenom konvencionalne metode (HCl) te iste uz predtretman ultrazvukom visokog intenziteta (UVI) tijekom 5 i 10 minuta. Man - manozna, Rha - ramnoza, GalUA - galakturonska kiselina, Glc - glukoza, Gal - galaktoza, Ara - arabinozna, Fuc - fukoza. Vrijednosti među kojima ne postoji statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ;  $n=3$ ) označene su na jednak način (SBP - slovo; CBH - znak, OP - broj).

Iz rezultata je vidljivo da nisu postignute veće razlike u monomernom sastavu izdvojenih pektina, osim nešto većeg udjela arabinana (ali i dalje vrlo malog s obzirom na početni udjel arabinana u sirovini) za UVI ekstrahirane pektine iz SBP, te niže ostvarene prinose GalUA u UVI ekstrahiranim pektinima CBH i OP. Smanjenje prinosa GalUA može se objasniti potencijalno degradativnim učinkom UVI (fragmentacija molekule). UVI ( $\geq 10 \text{ W/cm}^2$ ) dokazano mijenja molekularna svojstva nekih polisaharida (Zhang i sur., 2013) te se smanjeni degradativni učinci očekuju kod primjene ultrazvuka niskog ili srednjeg intenziteta ( $1 - 8 \text{ W/cm}^2$ ) (Wang i sur., 2015).

Slika 58 prikazuje iskorištenje pojedinih monomera karakterističnih u sastavu pektina (GalUA, Rha, Ara, Gal) izračunato u odnosu na početni udjel istih u pojedinoj sirovini, kao i prinose pektinskih frakcija.

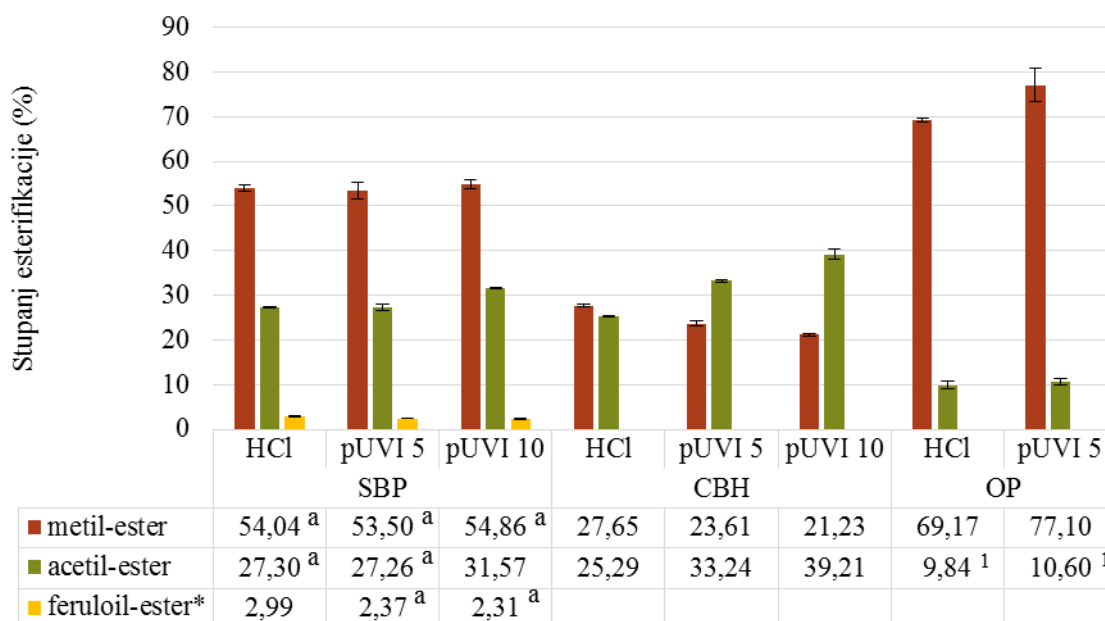


Slika 58. Usporedba iskorištenja (%) ramnoze (Rha), galakturonske kiseline (GlcUA), galaktoze (Gal) i arabinose (Ara) u pektinskim frakcijama pulpe šećerne repe (SBP), ljske kakaovog zrna (CBH) i ljske crvenog luka (OP) izdvojenima primjenom konvencionalne metode (HCl) te istom uz predtretman ultrazvukom visokog intenziteta (UVI) tijekom 5 i 10 minuta. Vrijednosti u istome redu među kojima ne postoji statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ;  $n=6$ ) označene su na jednak način (SBP - slovo; CBH - znak, OP - broj).

Iz rezultata je vidljivo da primjenom predtretmana UVI nije postignuto značajnije povećanje iskorištenja pektinskih monosaharida.

Također, nije postignuta značajnija promjena stupnja esterifikacije promatranih pektina (Slika 59), čime se može zaključiti za primjena UVI (prema uvjetima kako su navedeni, Tablica 41), kao predtretmana konvencionalnoj ekstrakciji pektina iz SBP, CBH i OP, nije utjecala na prinos i sastav izdvojenih pektinskih frakcija.

Pektinske frakcije iz SBP bile su karakterizirane visokim ukupnim stupnjem esterifikacije (83,1 - 88,7 %), uz stupanj metilacije približno 54 % te relativno visok stupanj acetilacije (~ 30 %). Pektini CBH također su bili karakterizirani relativno visokim stupnjem acetilacije (25,3 - 39,2 %) koji je ipak bio viši kod UVI ekstrahiranih pektina. Uz navedeno, izdvojeni pektini CBH bili su niskometilirani. Uzorci pektina iz OP bili su karakterizirani najnižim stupnjem acetilacije od svih analiziranih uzoraka (~ 10 %), ali i najvišim stupnjem metilacije (69,1 - 77,1 %).



\*izraženo s obzirom na udjel ukupnog arabinana i galaktana

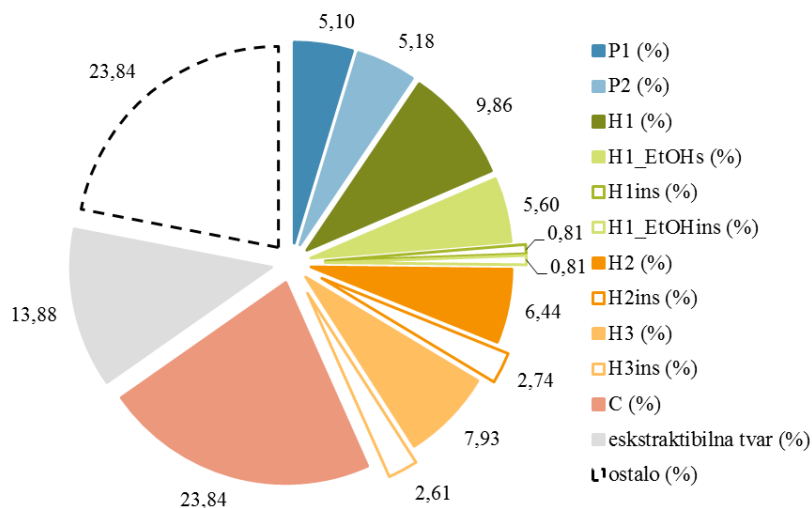
Slika 59. Usporedba stupnja metilacije, acetilacije i feruloilacije pektina izdvojenih iz pulpe šećerne repe (SBP), ljuske kakaovog zrna (CBH) i ljuske crvenog luka (OP) primjenom konvencionalne metode (HCl) te iste uz predtretman ultrazvukom visokog intenziteta (UVI) tijekom 5 i 10 minuta. Vrijednosti u istome redu među kojima ne postoji statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ;  $n=3$ ) označene su na jednak način (SBP - slovo; CBH - znak, OP - broj).

#### 4.6.2 Ponovljeno frakcioniranje polisaharida pulpe šećerne repe

S obzirom da primjena UVI predtretmana nije rezultirala povećanjem prinosa pektina u odnosu na konvencionalnu metodu, a degradacija arabinana SBP i dalje se ostala značajno prisutna, ponovljeno je frakcioniranje polisaharida stanične stijenke SBP u uvjetima koji pogoduju očuvanju arabinana. U prvom redu to se odnosilo na promjenu pH ekstrakcijskog otapala. U ponovljenom frakcioniranju korišten je amonijev oksalat (AO) pri 2 pH vrijednosti: 4,6 u prvoj ekstrakciji i 3,0 u drugoj ekstrakciji. Nakon toga, uslijedila je ekstrakcija hemiceluloze litijev klorid-dimetilsulfoksid (LiCl-DMSO) sustavom otapala, a zatim i kalijevim hidroksidom (KOH) u 2 koncentracije: 1 M u prvoj ekstrakciji i 4 M u drugoj ekstrakciji. Nakon svakog koraka izdvojene su topljive, ali u manjoj mjeri i netpljive (*engl.* insolubles - ins) polisaharidne frakcije.

## 4.6.2.1 Prinosi frakcija i monomerni sastav

Slika 60 prikazuje prinose frakcija izdvojenih prema ponovljenom postupku frakcioniranja polisaharida stanične stijenke SBP. S obzirom na veći broj ekstrakcijskih koraka, izdvojeno je više frakcija nego u inicijalnom postupku frakcioniranja. Frakcije P1 i P2 označavaju pektinske frakcije izdvojene AO pri pH 4,6 (P1) i pH 3,0 (P2). Frakcije H1, H2 i H3 odnose se na hemicelulozne frakcije, i to H1 na frakciju izvojenu LiCl-DMSO ekstrakcijom, s podfrakcijom H1\_EtOHs koja se odnosi na frakciju topljivu u etanolnoj otopini (EtOH:H<sub>2</sub>O = 4:1 (v/v)) nakon precipitacije H1 hemiceluloze. H2 i H3 frakcije izdvojene su alkalnim ekstrakcijama s 1 M KOH (H2) i 4 M KOH (H3), u oba slučaja uz dodatak 20 mM NaBH<sub>4</sub>. Frakcija C istovjetna je onoj u inicijalnom postupku frakcioniranja, tj. odnosi se na ostatak nakon ukupno provedenih ekstrakcija pektina i hemiceluloze. U ponovljenom postupku frakcioniranja polisaharida SBP nije provedena delignifikacija.

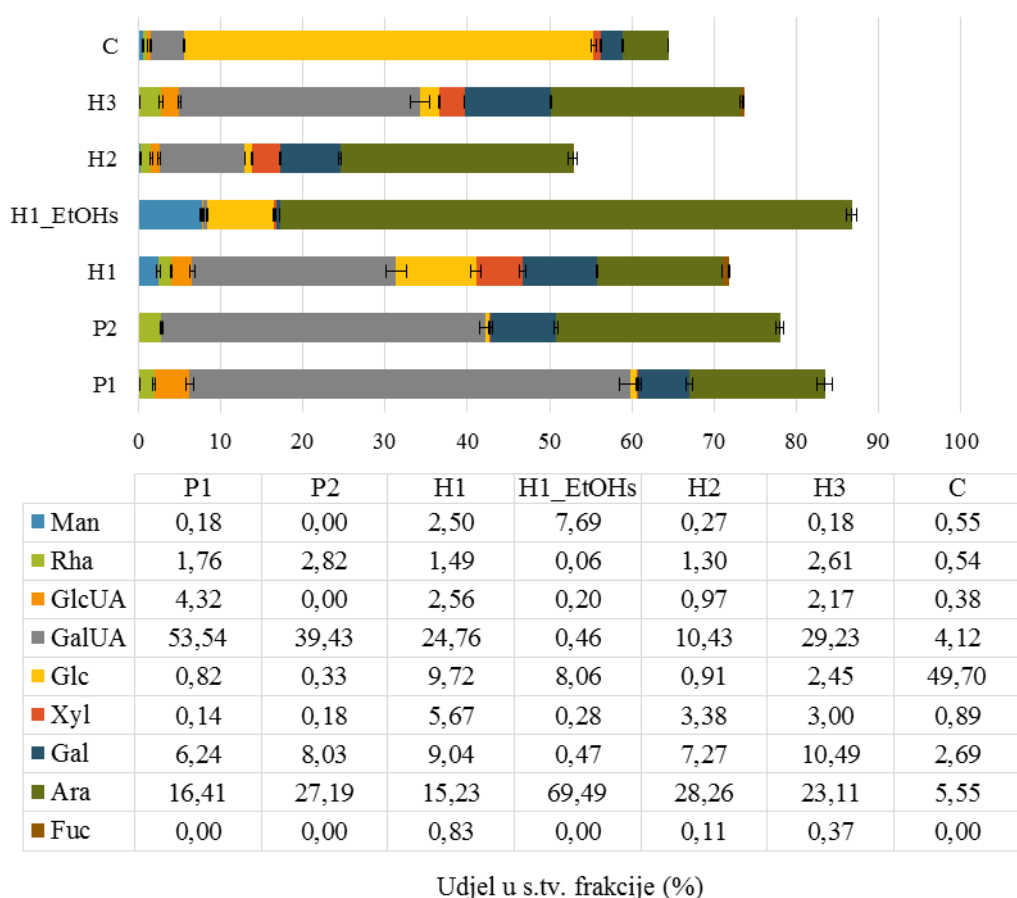


Slika 60. Prinosi frakcija (udjel u s.tv. SBP (%)) izdvojenih novim postupkom frakcioniranja polisaharida pulpe šećerne repe (P1 i P2 - pektinske frakcije; H1, H2, H3 - hemicelulozne frakcije; H1\_EtOHs - hemicelulozna frakcija topljiva u smjesi etanola i vode 4:1 (v/v), C - celulozna frakcija; ins - netopljive frakcije hemiceluloze).

Iz rezultata je vidljivo da je novim postupkom frakcioniranja izdvojeno približno 67 % s.tv. sirovine, što je vrlo blisko teorijskoj vrijednosti udjela strukturnih polisaharida te indicira značajno manji stupanj degradacije polisaharida nego u inicijalnom postupku frakcioniranja. U pektinskim frakcijama (P1 i P2) izdvojeno je ukupno 10,3 % s.tv., što je značajno manje u odnosu na inicijalno izdvojenih 15,2 %. Prinos C frakcije u oba postupka bio je vrlo sličan (~ 20 % s.tv.), a prinos ukupne hemicelulozne frakcije u ponovljenom postupku bio je veći (36,8 %), od

čega se jedan dio vjerojatno odnosi na rezidualni pektin, s obzirom na smanjene prinose pektinskih frakcija.

Slika 61 prikazuje monomerni sastav frakcija izdvojenih novim postupkom frakcioniranja polisaharida SBP. Za pektinske frakcije P1 i P2 vidljiv je karakterističan monomerni profil s dominantnom GalUA, ali i većim udjelom Ara u odnosu na inicijalni postupak frakcioniranja (u P2 frakciji čak 27,2 %, tj. približno 1/3 svih određenih monomera). U H1 frakciji preostao je značajan udjel rezidualnog pektina bogatog arabinanima i galaktanima, a od hemiceluloznih polimera indicirana je prisutnost ksiloglukana te manana/glukomanana.

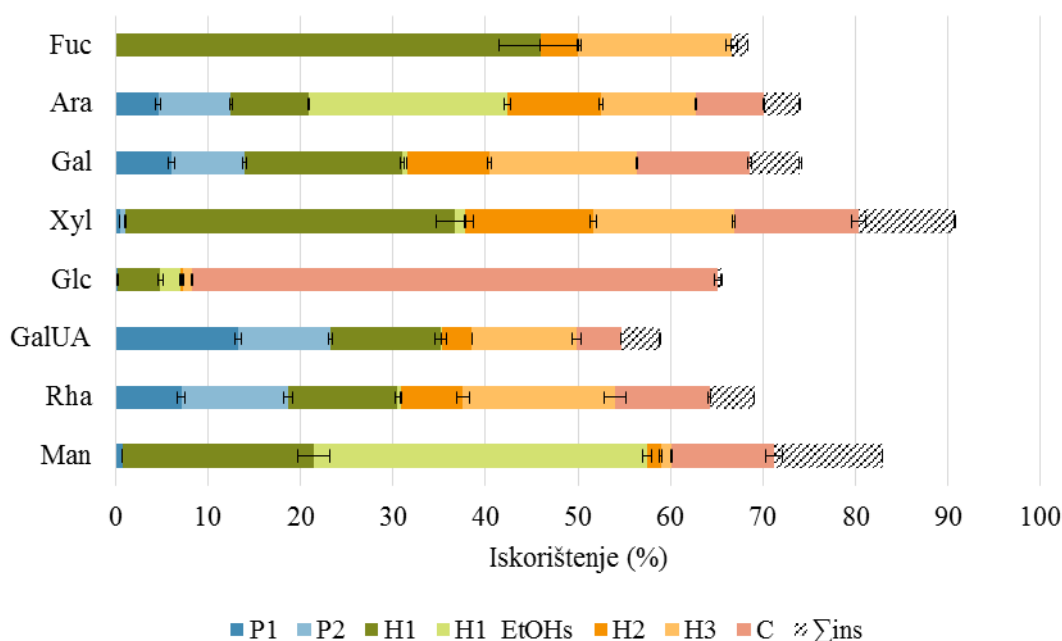


Slika 61. Monomerni sastav (udjel u s.tv. frakcije (%)) frakcija izdvojenih novim postupkom frakcioniranja polisaharida pulpe šećerne repe (P1 i P2 - pektinske frakcije; H1, H2, H3 - hemicelulozne frakcije; H1\_EtOHs - hemicelulozna frakcija topljiva u smjesi etanola i vode 4:1 (v/v), C - celulozna frakcija). Man - manozna, Rha - ramnoza, GlcUA - glukuronska kiselina, GalUA - galakturonska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinoza, Fuc - fukoza.

Posebno je zanimljiva H1\_EtOHs podfrakcija koja se gotovo u potpunosti odnosi na topljivi arabinan (~ 80 % svih određenih monomera), uz manji udjel koekstrahiranog glukomanana.



S obzirom da je arabinan ekstrahirani s hemiceluloznom frakcijom, ne može se točno reći radi li se o arabinanu koji potječe od rezidualnog pektina ili slobodnom arabinanu kao zasebnom hemiceluloznom polisaharidu. U literaturi se arabinogalaktani mogu naći u kategoriji hemiceluloznih frakcija, međutim, ako se uzme u obzir da se se ukupni pektin teško može ekstrahirati u jednoj frakciji, te ovisno o nativnoj strukturi unutar stanične stijenke se ekstrahira pri različitim uvjetima (čistom vodom (vrućom ili sobne temperature), kelatorima, vrućim razrijeđenim kiselinama, hladnim blago lužantim otopinama), mogu se očekivati značajni udjeli rezidualnog pektina u hemiceluloznih frakcijama (ovisno o uvjetima prethodne ekstrakcije pektina). U H2 i H3 frakcijama vidljiv je značajan udjel rezidualnog pektina (galakturonana), također s naglašenim udjelima galaktana/arabinogalaktana/arabinana. U C frakciji karakteristično je bila dominantna Glc, uz prisutnost rezidualnog pektina.



Slika 62. Bilanca pojedinih monomera za postupak novog fracioniranja polisaharida pulpe šećerne repe, izražena kao iskorištenje (%) u svakoj od izdvojenih polisaharidnih frakcija (P1 i P2 - pektinske frakcije; H1, H2, H3 - hemicelulozne frakcije; H1\_EtOHs - hemicelulozna frakcija topljiva u smjesi etanola i vode 4:1 (v/v), C - celulozna frakcija ; ins - netopljive frakcije hemiceluloze) u odnosu na njihov početni udjel u sirovini. Man - manozna, Rha - ramnoza, GlcUA - glukuronska kiselina, GalUA - galakturonska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinosa, Fuc - fukoza.

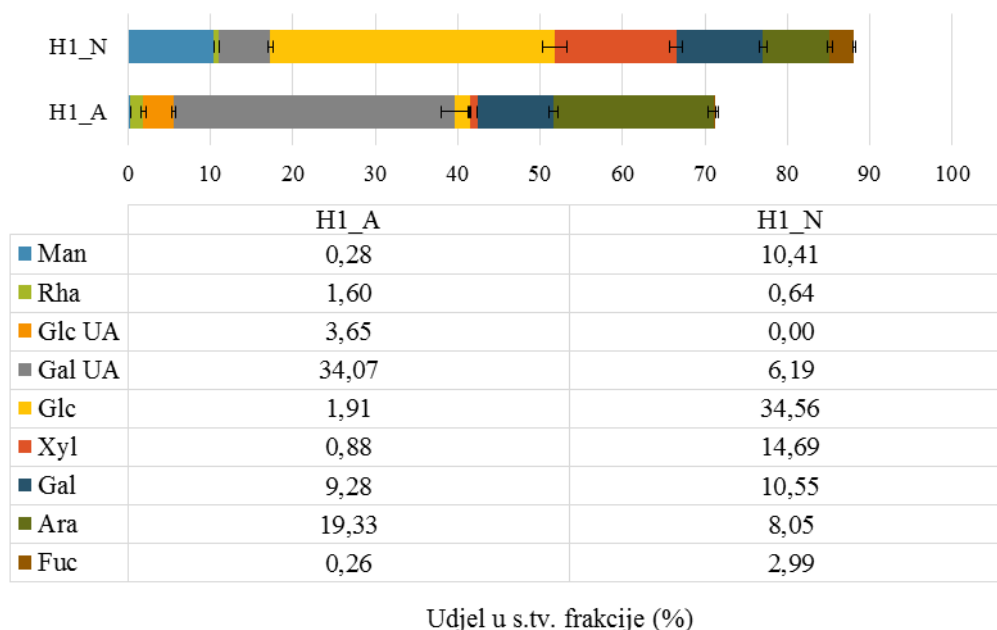
Iako je arabinan znatno više očuvan nego u inicijalnom postupku fracioniranja (Slika 62), u pektinskim frakcijama izdvojeno je ukupno tek 12,5 % početnog udjela Ara. Može se zaključiti da udjel arabinana vezanog za kelator-ekstraktibilne pektine nije naročito značajan te se veća količina arabinana ne može izdvojiti klasičnim metodama ekstrakcije pektina. Bilanca GalUA

pokazala je blago povećanje iskorištenja GalUA u odnosu na bilancu pri inicijalnom frakcioniranju (58,9 % u odnosu na 52,2 %) što indicira da su određeni gubici GalUA prisutni i za promijenjene uvjetie frakcioniranja. Pri ukupnim zadanim ekstrakcijskim uvjetima nije bilo moguće postići ekstraktibilnost galakturonana veću od 50-60 % početnog udjela GalUA u SBP. Pritom, u ponovljenom frakcioniranju u pektinskim frakcijama izdvojeno je tek 23,3 % početnog udjela GalUA u SBP te se stoga konvencionalna HCl ekstrakcija pektina, provedena u inicijalnom postupku frakcioniranja polisaharida SBP, smatra preferabilnom za postizanje maksimalne iskoristivosti galakturonana iz SBP u jednoj frakciji. S druge strane, za postizanje maksimalne iskoristivosti arabinana, nužno je izbjegavati ekstrakcije pri niskim pH, a ekstraktibilnost je favorizirana u alkalnim otapalima te općenito u otapalima koja se konvencionalno koriste u ekstrakciji hemiceluloze.

H1 frakcija izdvojena je LiCl-DMSO ekstrakcijom kako bi se sačuvale strukturne karakteristike hemiceluloze SBP. Naime, alkalna ekstrakcija učinkovito solubilizira hemicelulozu putem narušavanja vodikovih veza između hemiceluloze i celuloze (Renard i Ginies, 2009), ali se istovremeno izgube alkalno-osjetljivi supstituenti te unakrsne veze između polimera, a time i vrijedne informacije o strukturi. Učinak ekstrakcije pomoću DMSO vidljiv je kroz bubrenje hemiceluloze te narušavanje vodikovih veza, uslijed čega hemicelulozni polisaharidi postaju dostupni otapalu, dok dodatak LiCl sprječava ponovno formiranje vodikovih veza kako bi isti mogli ostati solvativirani (Petruš i sur., 1995). Primjena LiCl-DMSO ekstrakcije pokazala se uspješnom u zadržavanju strukturnih karakteristika hemiceluloze iz različitih supstrata, poput jabuke (Ray i sur., 2014) te rajčice i mrkve (Broxterman i sur., 2018).

U ovome radu, zbog relativno visokog udjela rezidualnog pektina, H1 frakcija dodatno je frakcionirana afinitetnom kromatografijom na ionskom izmjenjivaču, pri čemu su dobivene neutralna (N) i kisela (A) podfrakcija. Kisela podfrakcija se vezala na koloni (s obzirom da pektinske molekule nose negativan naboj) te se eluirala dodatkom NaCl u mobilnoj fazi (isoljavanje), dok se neutralna podfrakcija odmah eluirala (budući da se nije vezala na koloni). Izdvojenim podfrakcijama određen je monomerni sastav (Slika 63). Iz rezultata je vidljivo da sastav kisele podfrakcije odgovara pektinu s relativno bogato razgranatim RG-I regijama. Također, indicirana je i relativno mala zastupljenost hemiceluloznih polimera koji nose negativan naboj, tj. u svom sastavu sadrže uronske kiseline (GlcUA). Neutralna podfrakcija, prema monomernom sastavu, sastavljena je dominantno od manana/glukomana i ksiloglukana, a također sadrži i fukozilirane polimere. U istoj je i dalje vidljiva prisutnost rezidualnog pektina, snažno vezanog uz hemicelulozne polimere, ali treba uzeti u obzir da GalUA, Ara i Gal mogu biti i sastavni dio hemiceluloze te se ne može sa sigurnošću, temeljem prikazanih rezultata,

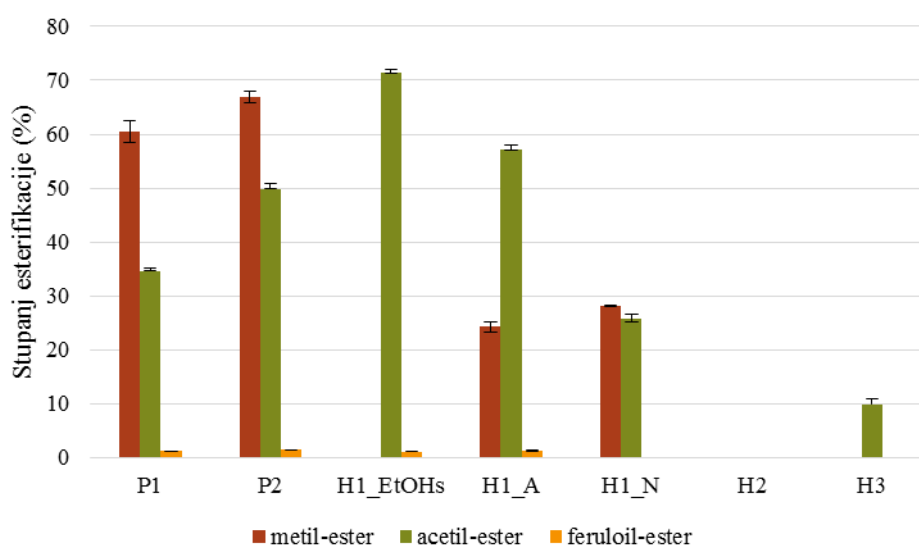
zaključiti koliki je udjel rezidualnog pektina u neutralnoj podfrakciji. Izdvojena kisela podfrakcija priklonjena je pektinskim frakcijama P1 i P2 u daljnjim analizama, dok je neutralna podfrakcija priklonjena hemiceluloznim frakcijama.



Slika 63. Monomerni sastav kisele (H1\_A) i neutralne (H1\_N) podfrakcije, dobivenih nakon frakcioniranja H1 frakcije izdvojne novim postupkom frakcioniranja polisaharida stanične stijenke pulpe šećerne repe. Man - manoz, Rha - ramnoza, GlcUA - glukuronska kiselina, GalUA - galakturonska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinosa, Fuc - fukoza.

Slika 64 prkazuje udjel neugljikohidratnih vezanih komponenata (metilne i acetilne skupine te vezane ferulinske kiseline) u pektinskim i hemiceluloznim frakcijama izdvojenima novim postupkom frakcioniranja polisaharida stanične stijenke SBP. Izdvojene pektinske frakcije P1 i P2 pokazale su visok stupanj metiliranosti i acetiliranosti, naročito frakcija P2. Esterificiranost je zadržana i u A podfrakciji H1 frakcije, što se pretežito odnosilo na acetiliranost. Ovakva neobično visoka acetiliranost u odnosu na druge pektinske frakcije može biti razlogom drugačijih fizikalno-kemijskih svojstava ove pektinske frakcije, a time i različite ekstraktibilnosti. U svim pektinskim frakcijama stupanj metilacije i acetilacije određen je s obzirom na ukupni galakturonan u uzorcima (dominantan monomer i nositelj metilnih i acetilnih skupina u molekuli pektina). Zastupljenost ferulinske kiseline veže se uz prisutnost arabinana/arabinogalaktana (Ralet i sur., 1994; Oosterveld i sur., 1996) te se, prema tome, mogla očekivati u svim izdvojenim frakcijama. Ipak, saponificirajući učinak alkalnog medija (KOH) doveo je do značajnih gubitaka vezane ferulinske kiseline, ali i metilnih i acetilnih skupina. Stupanj feruloilacije izražen je s obzirom na ukupni galaktan i arabinan u pojedinoj

frakciji (Slika 64) te je iznosio 1,0 - 1,4 %. Bilanca ferulinske kiseline (rezultati nisu zasebno prikazani) pokazala je iskorištenje ferulinske kiseline od svega približno 30 % u frakcijama u kojima je određena, od čega se polovica odnosila na H1\_EtOHs podfrakciju. Može se zaključiti da je većina (gotovo 2/3) ukupno vezane ferulinske kiseline pripadala arabinanima/arabinogalaktanima izdvojenima u alkalnim frakcijama (H2 i H3). Ako se uzme u obzir je H1\_EtOHs podfrakcija sadržavala relativno značajno veći udjel vezane ferulinske kiseline u odnosu na P1 i P2 frakcije, može se zaključiti kako ferulinska kiselina ima izrazito važnu ulogu u strukturnom povezivanju pektinskih polisaharida s drugim polisaharidima stanične stijenke SBP, smanjujući im pritom ekstraktibilnost, što je vidljivo kroz značajnu zastupljenost rezidualnog arabinana čak i nakon ekstrakcije 1 M KOH.



Slika 64. Stupanj metilacije, acetilacije i feruloilacije pektinskih i hemiceluloznih frakcija pulpe šećerne repe izdvojenih novim postupkom fracioniranja. (P1 i P2 - pektinske frakcije; H1\_EtOHs - hemicelulozna frakcija topljiva u smjesi etanola i vode 4:1 (v/v); H1\_A i H1\_N - kisela i neutralna podfrakcija LiCl-DMSO ekstrahirane hemicelulozne frakcije (H1); H2 i H3 - KOH ekstrahirane hemicelulozne frakcije).

Vezana ferulinska kiselina pridonosi povezivanju pektinskih polimera putem oksidativnog unakrsnog povezivanja, što je potvrđeno prisutnošću dehidrodimera ferulinske kiseline, kao i mogućnošću unakrsnog povezivanja SBP pektina *in vitro* oksidacijom vezanih feruloilnih skupina (Ralet i sur., 2009). Iz prikazanih rezultata može se zaključiti kako ukupan pektin SBP čine frakcije različitih fizikalno-kemijskih karakteristika te se ne može očekivati ekstrakcija ukupnog pektina primjenom jedinstvenih ekstrakcijskih parametara.

U alkalno-ekstrahiranim frakcijama (H2 i H3) očekivano nisu određene vezane funkcionalne skupine (s obzirom na pretpostavljenu kvantitativnu saponifikaciju istih u alkalnom mediju), ali iznenađujuće je određena prisutnost acetilnih skupina u H3 frakciji, acetilnih skupina koje

su ostale netaknute čak i tijekom tretmana 4 M KOH. Ovakav rezultat upućuje na postojanje lokalnih puferirajućih ili neutralizirajućih učinaka drugih prisutnih funkcionalnih skupina koje su umanjile saponifikacijsko djelovanje lužine. Stupanj acetilacije H3 frakcije izražen je s obzirom na udjel ukupnog galakturonana, glukana i ksilana, budući da acetiliranost može biti karakteristika i pektinskih i hemiceluloznih polisaharida.

Prisutnost acetilnih skupina u H1\_EtOHs i H1\_N podfrakcijama povezana je s prisutnošću glukomanana u H1\_EtOHs, dok je u H1\_N podfrakciji izražena na ukupni galakturonan, glukana, ksilan i manan iz razloga kako je prethodno objašnjeno za H3 frakciju.

#### 4.6.2.2 Strukturne karakteristike pektinskih i hemiceluloznih frakcija

Analizom glikozidnih veza pektinskih frakcija izdvojenih u novom postupku frakcioniranja polisaharida SBP dobiven je uvid u strukturne karakteristike istih. Profil glikozidnih veza uspoređen je s uzorkom pektina izdvojenim u inicijalnom postupku frakcioniranja (Tablica 42).

Tablica 42. Profil glikozidnih veza u pektinskim frakcijama izdvojenima tijekom novog postupka frakcioniranja polisaharida pulpe šećerne repe (SBP\_P1, SBP\_P2 i SBP\_H1\_A) u usporedbi s pektinom izdvojenim u inicijalnom postupku frakcioniranja (SBP\_P<sub>HCl</sub>).

Glikozidna veza	Strukturna jedinica	Relativni udjel (%)			
		SBP_P1	SBP_P2	SBP_H1_A	SBP_P <sub>HCl</sub>
Rhap t	Rhap-(1→	0,7	0,2	-	-
2-Rhap +	→2)-Rhap-(1→ +	1,9	1,7	6,5	24,0
4-Rhap	→4)-Rhap-(1→				
2,4-Rhap	→2,4)-Rhap-(1→	1,4	2,2	5,4	15,4
<b>Ukupne veze ramnana</b>		<b>4,0</b>	<b>4,1</b>	<b>12,0</b>	<b>39,4</b>
Araf t	Araf-(1→	40,9	35,8	19,3	14,0
2-Araf	→2)-Araf-(1→	0,2	-	0,8	-
3-Araf	→3)-Ara-(1→	0,6	0,6	3,3	0,8
5-Araf	→5)-Araf-(1→	27,4	29,3	30,7	7,1
2,5-Araf	→2,5)-Araf-(1→	0,6	0,7	1,6	0,6
3,5-Araf	→3,5)-Araf-(1→	17,9	21,3	13,7	1,6
<b>Ukupne veze arabinana</b>		<b>87,5</b>	<b>87,7</b>	<b>69,3</b>	<b>24,1</b>
Galp t	Galp-(1→	1,7	2,0	5,6	16,5
3-Galp	→3)-Galp-(1→	0,9	0,6	1,8	1,9
4-Galp	→4)-Galp-(1→	3,5	4,2	7,8	8,8
6-Galp	→6)-Galp-(1→	0,8	0,8	2,8	7,6
3,6-Galp	→3,6)-Galp-(1→	1,6	0,7	0,7	1,7
<b>Ukupne veze galaktana</b>		<b>8,4</b>	<b>8,1</b>	<b>18,7</b>	<b>36,5</b>

Relativni udjeli zastupljenih veza iskazani su s obzirom na neutralnu frakciju pektina (Rha, Ara i Gal) budući da se primijenjenom metodom ne mogu odrediti uronske kiseline. Iz rezultata je vidljivo da su frakcije P1 i P2 pokazale međusobno najsličnija strukturalna svojstva karakterizirana dominantnim bočnim lancima arabinana/arabinogalaktana, odnosno relativno visokom zastupljenošću RG-I regije. U P1 frakciji 35 % ukupno prisutnog ramnana bilo je razgranato (pozicija O-2), dok je raspoređenost bočnih lanaca u P2 frakciji bila nešto veća, odnosno relativna zastupljenost razgranatog ramnana u odnosu na ukupni iznosila je približno 54 %. Porast udjela glikozidnih veza ukupnog ramnana za frakcije H1\_A i P<sub>HCl</sub> sukladan je smanjenju relativnog udjela arabinana u istima. Pritom, udjel razgranatih jedinica (2,4-Rhap) iznosio je približno 40-45 % relativnog udjela u odnosu na ukupni ramnan. Ukupna arabinanska frakcija bila je najzastupljenija u P1 i P2 frakcijama (87,5 i 87,7 % svih glikozidnih veza neutralne frakcije pektina), sukladno i najvišem relativnom udjelu Ara u neutralnoj frakciji ovih pektina, pri čemu je  $\alpha$ -(1,5) bila dominantna glikozidna veza, ukazujući na dominantnu prisutnost homoarabinana, uglavnom razgranatih na poziciji O-3. U obje frakcije, P1 i P2, zastupljenost razgranatih jedinica (2,5-Araf i 3,5-Araf) u okosnici arabinana iznosila je približno 40 % (40,3 za P1 i 42,9 za P2). Iz relativno visokog udjela nereducirajućih (terminalnih) Araf ostataka (Araft) može se zaključiti da su na mjestima razgranjenja bile dominantne pojedinačne molekule Araft umjesto kratkih arabinanskih oligomera. U H1\_A podfrakciji, udjel veza arabinana bio je nešto niži (69,3 % ukupnih glikozidnih veza neutralne frakcije H1\_A pektina) s nešto drugačijom strukturom. Udjel razgranatih jedinica bio je manji nego u P1 i P2 frakcijama (~ 33 %) uz relativno povećanje udjela razgranjenja na poziciji O-2. Isto je bilo praćeno smanjenim udjelom Araft jedinica kao i relativno većim udjelom  $\alpha$ -(1,3) vezanih Araf jedinica, što potencijalno indicira veću zastupljenost kratkih Ara oligomera kao bočnih lanaca homoarabinana u ovome uzorku. U P<sub>HCl</sub> uzorku pektina određen je daleko najmanji relativni udjel arabinanskih glikozidnih veza (24,1 % udjela svih glikozidnih veza neutralne frakcije P<sub>HCl</sub> pektina) što je u skladu s visokim stupnjem degradacije arabinana uzrokovanog hidrolizom pri niskom pH. S obzirom da se radi o degradiranom arabinanu, nije relevantno uspoređivati strukturu istoga s pektinskim frakcijama izdvojenima na način koji je pogodovao maksimalnom očuvanju izvorne strukture arabinana. Analiza glikozidnih veza ukupnog galaktana potvrdila je zastupljenost arabinogalaktana tipa II (AG-II), općenito složene strukture, ali s karakterističnim  $\beta$ -(1,3) linearno povezanim Galp jedinicama s bočnim lancima vezanima na pozicijama O-6, pri čemu se isti odnose na kratke oligomere  $\beta$ -(1,6) vezanih Galp koji pak mogu nositi Araft ili dalje supstituirane Araf jedinice (Yapo, 2011b). Dakako, jedan dio Araft jedinica ili  $\alpha$ -(1,2)/(1,3) vezanih Araf jedinica može se očekivati u sastavu AG-II.

Prisutnost AG-II vidljiva je u svim uzorcima pektina. Razgranatost  $\beta$ -(1,3) vezanih Galp iznosila je 36,0 % te 42,2 % za P1 i P2, te čak 72 % za H1\_A. U H1\_A također je vidljivo i relativno povećanje nereducirajućih (terminalnih) Galp jedinica (Galpt) u odnosu na P1 i P2. U P<sub>HCl</sub> je stupanj razgranatosti iznosio približno 50 %, a vidljiv je povećan relativni udjel  $\beta$ -(1,6) vezanih Galp što indicira značajniju prisutnost oligomernih bočnih lanaca nego u drugim uzorcima. Osim AG-II, jedan dio ukupnog galaktana odnosi se na linearni homogalaktan ( $\beta$ -(1,4) vezane Galp). Relativni udjel istoga (u odnosu na ukupne glikozidne veze galaktana) u analiziranim uzorcima različito ekstrahiranih SBP pektina iznosio je 41,7 %, 51,9 %, 41,7 % te 24,1 % za P1, P2, H1\_A i P<sub>HCl</sub>.

S obzirom na molarne udjele pojedinih monomera izračunati su približni omjeri osnovnih blok-kopolimera, a temeljem rezultata relativnog udjela glikozidnih veza, izdvojeni su rezultati ukupnog razgranjenja pektinske molekule (Tablica 43). Udjeli RG-I i HG određeni su kao relativni molarni udjeli ukupno određenih monomera u pojedinoj frakciji. Iz rezultata je vidljivo da su se analizirani uzorci pektina razlikovali s obzirom na relativne udjele RG-I i HG, pri čemu su P1 i P<sub>HCl</sub> bili kakterizirani dominirajućim HG blok-kopolimerom (~ 60 - 65 %), dok P2 i H1\_A s dominirajućim RG-I blok-kopolimerom (~ 55-60 %).

Tablica 43. Karakteristike pektina izdvojenih tijekom novog postupka frakcioniranja polisaharida stanične stijenke pulpe šećerne repe (SBP\_P1, SBP\_P2 i SBP\_H1\_A), u usporedbi s pektinom izdvojenim inicijalnim postupkom frakcioniranja (SBP\_P<sub>HCl</sub>), s obzirom na udjel osnovnih blok-kopolimera te stupanj razgranjenja molekule.

		Relativni udjel (%)			
		SBP_P1	SBP_P2	SBP_H1_A	SBP_P <sub>HCl</sub>
<b>RG-I* (%)</b>		38,4	58,5	53,5	31,7
<b>HG (%)</b>		60,1	40,8	39,5	66,8
<b>DB** (%)</b>	<b>ramnan</b>	1,4 (43,1)	2,2 (55,8)	5,4 (45,5)	15,4 (39,1)
	<b>arabinan</b>	18,5 (40,3)	22,0 (42,9)	15,3 (33,3)	2,2 (23,4)
	<b>galaktan</b>	1,6 (63,5)	0,7 (55,3)	0,7 (28,6)	1,7 (46,8)
	<b>UKUPNO</b>	21,5	24,8	21,5	19,2
<b>Omjer terminalnih i razgranatih jedinica</b>		2,00	1,53	1,6	1,2

\*Izračunato prema izrazu predloženom u radu Yapo (2011b) te se odnosi na relativni molarni udjel

\*\*DB - stupanj razgranjenja (*engl.* degree of branching)

Razlika do 100 % ukupnog udjela (najviše 7 % - uzorak H1\_A, za ostale uzorke najviše 1,5 %) odnosi se na prisutnost drugih monomera osim Rha, Ara i Gal, koji mogu biti sastavni dio dugih pektinskih blok-kopolimera (pr. RG-II) ili pak koekstrahiranih drugih polisaharida.

Zastupljenost RG-I u P1 i P2 frakcijama najviše se odnosila na arabinan, tj. bočne lance, kao i kod H1\_A, dok kod P<sub>HCl</sub> na arabinogalaktan II te okosnicu RG-I, tj. ponavljajući GalUA-Rha disaharid. Ukupno razgranjenje molekule (zbroj udjela svih određenih razgranatih jedinica) bilo je podjednako za sve uzorke (u prosjeku 20-25 %), međutim, isto se odnosilo na razgranatost arabinana za P1, P2 i H1\_A uzorke te razgranatost RG-I okosnice u slučaju uzorka P<sub>HCl</sub>. U zagradama su navedene relativne vrijednosti stupnja razgranjenja (supstitucije) izračunate kao zastupljenost razgranatih jedinica u odnosu na glavnu okosnicu ( $\alpha$ -(1,2) za ramnan,  $\alpha$ -(1,5) za arabinan,  $\beta$ -(1,3) za galaktan), tj. zbroj nerazgranatih i razgranatih jedinica u okosnici. Vidljivo je da se relativno povećanje/smanjenje stupnja razgranjenja ukupnog ramnana, arabinana i galaktana zapravo više odnosi na povećanje relativnog udjela navedenih frakcija u neutralnom dijelu analiziranih pektina nego na stvarno povećanje razgranatosti same okosnice ili pak kombinaciju navedenog. Omjer terminalnih i razgranatih jedinica u idealnom slučaju bi trebao biti 1, odnosno svakoj razgranatoj jedinici trebala bi odgovarati jedna terminalna jedinica na kraju razgranjenja (bočnog lanca), međutim, određeni omjeri za analizirane frakcije su veći. S obzirom da se za P1, P2 i H1\_A frakcije terminalni krajevi dominantno odnose na Araft, može se zaključiti o prisutnosti oligomernih arabinana u smjesi s arabinanom vezanim na RG-I blok-kopolimer pektina, koprecipitiranih u pektinskoj frakciji (Beldman i sur., 1997). U tom slučaju, udjel takvih fragmenata bio bi najveći u P1 frakciji. Jednako tako, u određenoj (manjoj) mjeri moguć je i kvantitativni gubitak pojedinih veza uslijed nepotpune hidrolize ili nepotpune permetilacije u postupku pripreme PMAAs (permetiliranih alditol acetata) za analizu glikozidnih veza. Kako je ranije navedeno, zbog značajne degradacije arabinana tijekom pripreme P<sub>HCl</sub> uzorka, usporedba s drugim pektinskim uzorcima nije od velikog značenja.

Tablica 44 prikazuje profil glikozidnih veza hemiceluloznih frakcija izdvojenih u novom postupku fracioniranja polisaharida stanične stijenke SBP. Vrijednosti su izražene kao relativni molarni udjeli identificiranih glikozidnih veza. Podfrakcija H1\_EtOHs navedena je u hemiceluloznim frakcijama budući da je izdvojena nakon ekstrakcije pektina, tj. tijekom ekstrakcije H1 frakcije. Profil glikozidnih veza H1\_EtOHs pokazuje da je arabinan slične strukture kao u P1 i P2 frakcijama, sastavljen dominantno od  $\alpha$ -(1,5) okosnice koja je supstituirana na poziciji O-3 (36 %). Zastupljenost supstitucije na O-2 poziciji vrlo je mala, kao i zastupljenost  $\alpha$ -(1,2) i  $\alpha$ -(1,3) vezanih oligomernih lanaca (bočni lanci u molekuli arabinana). Dominantno prisutne jedinice na mjestima razgranjenja molekule su nereducirajuće (terminalne) Araf jedinice (Araft). Uz arabinan, u ovoj frakciji prisutan je i galaktomanan, što je potvrđeno prisutnošću  $\beta$ -(1,4) vezanih Glcp i Manp, te se iste nalaze u ekvimolarnom udjelu.



Omjer terminalnih i razgranatih jedinica arabinana (~ 1,4) indicira postojanje oligomernih arabinana u smjesi (Beldman i sur., 1997).

Tablica 44. Profil glikozidnih veza u hemiceluloznim frakcijama izdvojenima tijekom novog postupka frakcioniranja polisaharida stanične stijenke pulpe šećerne repe (SBP\_H1\_EtOHs, SBP\_H1\_N, SBP\_H2 i SBP\_H3).

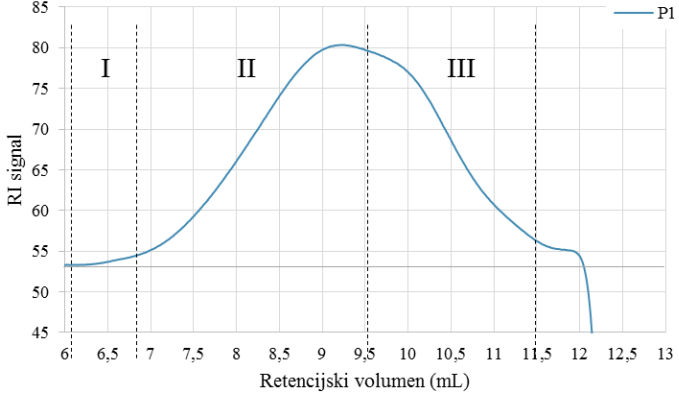
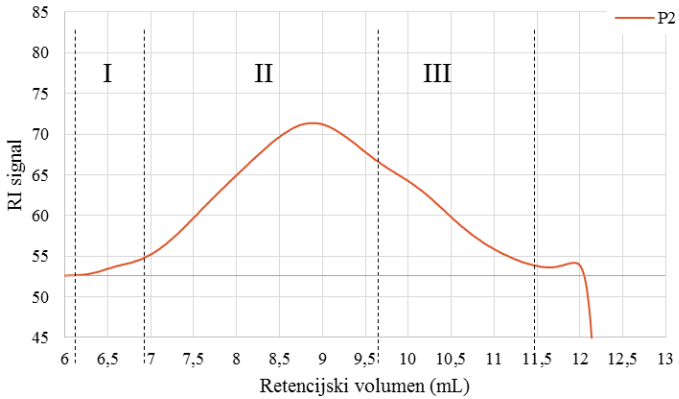
Glikozidna veza	Strukturna jedinica	Relativni udjel (%)			
		SPB_H1_EtOHs	SBP_H1_N	SBP_H2	SBP_H3
2-Rhap + 4-Rhap	→2)-Rhap-(1→ + →4)-Rhap-(1→	-	0,4	1,4	4,9
2,4-Rhap	→2,4)-Rhap-(1→	-	0,3	1,2	3,8
<b>Ukupne veze ramnana</b>		<b>-</b>	<b>0,6</b>	<b>2,7</b>	<b>8,6</b>
Araf t	Araf-(1→	30,3	3,7	30,5	20,5
2-Araf	→2)-Araf-(1→	0,1	-	0,5	-
3-Araf	→3)-Ara-(1→	0,8	0,1	1,0	0,9
5-Araf	→5)-Araf-(1→	36,6	2,0	33,6	28,5
2,5-Araf	→2,5)-Araf-(1→	0,6	-	1,1	1,1
3,5-Araf	→3,5)-Araf-(1→	21,3	1,7	18,0	18,6
<b>Ukupne veze arabinana</b>		<b>89,7</b>	<b>7,6</b>	<b>84,6</b>	<b>69,6</b>
Galp t	Galp-(1→	0,1	5,1	1,1	3,1
3-Galp	→3)-Galp-(1→	-	4,6	0,5	0,9
4-Galp	→4)-Galp-(1→	-	-	3,3	5,4
6-Galp	→6)-Galp-(1→	-	0,4	0,5	1,0
3,6-Galp	→3,6)-Galp-(1→	-	-	0,6	0,2
2,4-Galp	→2,4)-Galp-(1→	0,2	-	-	-
<b>Ukuone veze galaktana</b>		<b>0,3</b>	<b>10,1</b>	<b>6,0</b>	<b>10,7</b>
4-Manp	→4)-Manp-(1→	6,0	10,9	-	-
4,6-Manp	→4,6)-Manp-(1→	<0,1	-	-	-
<b>Ukupne veze manana</b>		<b>6,0</b>	<b>10,9</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
4-Glcp	→4)-Glcp-(1→	3,9	23,6	0,4	1,3
4,6-Glcp	→4,6)-Glcp-(1→	<0,1	27,0	0,1	2,2
<b>Ukupne veze glukana</b>		<b>4,0</b>	<b>52,2</b>	<b>0,5</b>	<b>3,5</b>
Xylp t	Xylp-(1→	-	11,0	-	1,6
4-Xylp + 2-Xylp	→4)-Xylp-(1→ + →2)-Xylp-(1→	-	4,8	6,3	5,7
<b>Ukupne veze ksilana</b>		<b>-</b>	<b>15,8</b>	<b>6,3</b>	<b>7,3</b>
Fucp t	Fucp-(1→	-	2,8	-	0,4
<b>Ukupne veze fukana</b>		<b>-</b>	<b>2,8</b>	<b>-</b>	<b>0,4</b>

H1\_N podfrakcija sadržavala je značajno manje arabinana (udjel glikozidnih veza arabinana iznosio je 7,6 % udjela svih glikozidnih veza). Dominantan je bio udjel glikozidnih veza

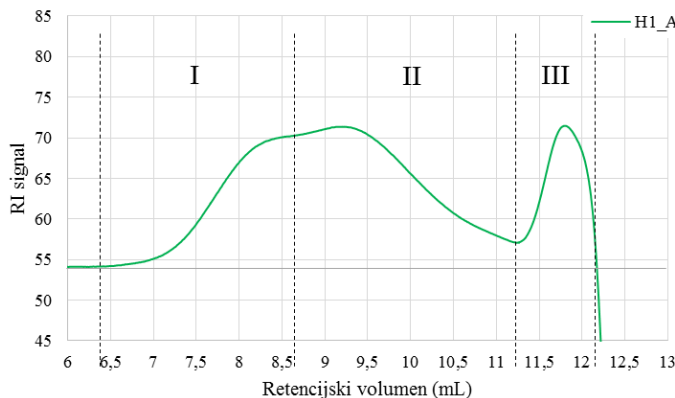
glukana (52,2 % udjela svih glikozidnih veza). S obzirom da je prisutan značajan udjel  $\beta$ -(1,4) vezanih Man<sub>p</sub> jedinica (10,9 % udjela svih glikozidnih veza), može se zaključiti o prisutnosti glukomanana i/ili galaktoglukomanana, ako se uzme u obzir i relativno povećan udjel Gal<sub>p</sub>t jedinica. Uz (galakto)glukomanan, osnovni polisaharid H1\_N podfrakcije je ksiloglukan, potencijalno fukozilirani. Na temelju ovdje iznesenih podataka nije moguće zaključiti koji dio glukanskih veza se odnosi na ksiloglukan, a koji na druge polisaharide (primjerice, (galakto)glukomanan). Također je prisutan i manji udjel ksilana (udjel 4-Xyl<sub>p</sub> iznosi 4,8 % udjela svih glikozidnih veza), odnosno glukuronoksilana, s obzirom da je u monomernom sastavu prisutna GlcUA. U H2 i H3 frakcijama nisu određene glikozidne veze manana, a i udjel glukanskih glikozidnih veza te Xyl<sub>p</sub>t bio je relativno nizak te se može zaključiti o smanjenom, rezidualnom udjelu manana/(galakto)glukomanana i ksiloglukana u ovim uzorcima. U odnosu na druge uzorke, relativno je povećan udjel ksilana. Može se zaključiti da se glavina hemiceluloznih polimera SBP dobro ekstrahira u LiCl-DMSO sustavu otapala. Ksilani se ipak nešto teže ekstrahiraju te više zaostaju u alkalnim frakcijama. Dominantna frakcija u H2 i H3 frakcijama je preostali arabinan, s dominantnom strukturom  $\alpha$ -(1,5) vezanih Ara<sub>f</sub> jedinica supstituiranih uglavnom na poziciji O-3 (34,1 % za H2 i 38,6 % za H3) i to Ara<sub>f</sub>t jedinicama. Omjer terminalnih i rezgranatih jedinica arabinana za H2 iznosio je približno 1,6, dok za H3 približno 1,0, što ukazuje da su terminalne Ara<sub>f</sub>t jedinice u H2 frakciji bile uključene i u sastav drugih prisutnih polisaharida u ovoj frakciji, naravno, u relativno manjem udjelu s obzirom na ukupnu relativno nisku zastupljenost drugih polisaharida, a također je indicirana prisutnost frakcije arabinana nevezane na pektin, u smjesi oligomernih oblika, pri čemu se onda relativno povećava udjel terminalnih jedinica. Za frakciju H3 može se pretpostaviti da se ukupni arabinan nalazi uglavnom vezan za RG-I domenu pektina, što je sukladno i relativnom povećanju udjela glikozidnih veza supstituiranog ramnana. Galaktan u obje frakcije bio je manje zastupljen, udjela približno 6-10 % svih glikozidnih veza za obje frakcije, te je bio prisutan podjednako u formi linearnog homogalaktana (~ 55 % udjela glikozidnih veza galaktana za H2 i ~ 50 % za H3) i AG-II.

HPSEC (*engl.* high performance size-exclusion chromatography) analizom frakcija izdvojenih novim postupkom frakcioniranja polisaharida stanične stijenke SBP, u kombinaciji s viskozimetrijom te difrakcijom laserskih zraka, dobiven je uvid u hidrodinamičke karakteristike izdvojenih frakcija, a prikazani su izdvojeni rezultati profila signala RI detektora (*engl.* refractive index), kao i odgovarajući podaci molekulske mase i stupnja polidisperznosti za pektinske (Tablica 45) i hemicelulozne (Tablica 46) frakcije.

Tablica 45. HPSEC (*engl.* high performance size-exclusion chromatography) profil i parametri molekulskih masa pektinskih frakcija izdvojenih novim postupkom frakcioniranja polisaharida pulpe šećerne repe.

		Relativni RI (% ukupnog signala)	Mn (Da)	Mw (Da)	Faktor polidisperzije	Unutarnja viskoznost (dL/g)	
<b>SBP_P1</b>		<b>ukupni profil</b>	100,0	184 253	323 087	1,753	3,0556
	<b>populacije</b>	<b>I</b>	0,2	7,02*10 <sup>6</sup>	7,74*10 <sup>6</sup>	1,103	6,6979
		<b>II</b>	56,5	266 913	410 618	1,538	4,3470
		<b>III</b>	43,3	177 672	118 965	1,014	1,1664
<b>SBP_P2</b>		<b>ukupni profil</b>	100,0	294 202	611 595	2,079	2,7934
	<b>populacije</b>	<b>I</b>	1,0	7,05*10 <sup>6</sup>	7,84*10 <sup>6</sup>	1,112	4,3213
		<b>II</b>	71,2	379 796	638 395	1,681	3,3997
		<b>III</b>	27,8	160 593	167 076	1,040	1,0538

Tablica 45. HPSEC (*engl.* high performance size-exclusion chromatography) profil i parametri molekulskih masa pektinskih frakcija izdvojenih novim postupkom frakcioniranja polisaharida pulpe šećerne repe - nastavak.

		Relativni RI (% ukupnog signala)	Mn (Da)	Mw (Da)	Faktor polidisperzije	Unutarnja viskoznost (dL/g)	
<b>SBP_H1N_A</b>		<b>ukupni profil</b>	100,0	217 565	661 902	3,042	1,4531
	<b>populacije</b>	<b>I</b>	32,2	1,20*10 <sup>6</sup>	1,41*10 <sup>6</sup>	1,171	2,0350
		<b>II</b>	49,7	366 354	391 870	1,070	1,5190
		<b>III</b>	18,1	60 042	80 838	1,346	0,2102

Općenito, s obzirom da su polimeri smjese molekula različite veličine i mase, karakteristike veličine/mase molekula opisuju se statistički kao distribucija molekulske mase u nekom uzorku. Veličina  $M_n$  definira se kao srednja brojčana molekulska masa (*engl.* number average molecular weight) te je pokazatelj prosječne ukupne molekulske mase svih polimernih molekula. Veličina  $M_w$  (srednja masena molekulska masa, *engl.* mass average molecular weight) uzima u obzir doprinos molekulske mase pojedine molekule, tj. veća molekulska masa više doprinosi srednjoj molekulskoj masi od manje. Omjer  $M_w/M_n$  rezultira veličinom koja se naziva polidisperzijski indeks (faktor polidisperzije, *engl.* polydispersion index, PDI), a odnosi se na mjeru heterogenosti sustava. Pritom, dva polimera mogu imati isti  $M_n$ , ali različito zastupljene  $M_w$  što će odraziti na homogenost sustava, odnosno, sustav s više zastupljenih lanaca približno jednake molekulske mase će biti relativno homogeniji od sustava u kojem je zastupljeno jako puno lanaca različitih molekulskih masa ili su razlike molekulskih masa jako velike. Homogeni polimerni sustavi imaju PDI blizak 1 (u idealnom slučaju 1, kada su  $M_w$  i  $M_n$  veličine jednake, odnosno sve molekule polimera su jednake molekulske mase). Relativno heterogeni polimerni sustavi karakterizirani su porastom PDI.

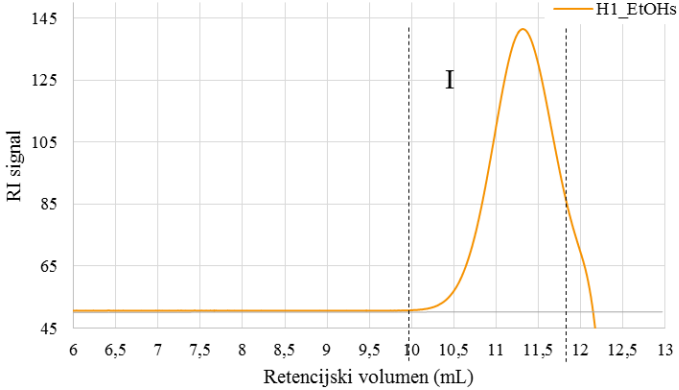
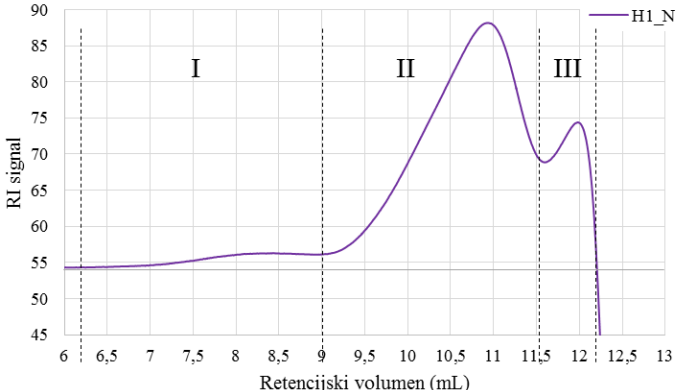
Profil RI signala pektinskih frakcija pokazao je različitost raspodjele molekulskih masa; pritom su veće molekule eluirale ranije, a manje kasnije. Naime, prema mehanizmu ekskluzije molekula prema hidrodinamičkom volumenu (veličini, masi), veće molekule imaju manju mogućnost prodora u unutrašnjost pora čestica punila te se lakše i brže eluiraju s kolone, dok se manje čestice duže zadržavaju u porama, odnosno eluiraju kasnije. U sve 3 pektinske frakcije vidljive su 3 različite populacije (I, II i III), karakteristične s obzirom na uzorak, tj. nisu prethodno definirane u smislu točno određenog volumena eluacije. S obzirom na postojanje više populacija, bilo je očekivano da je PDI ukupnog profila relativno velik. U P1 i P2 frakcijama populacija I najvjerojatnije se odnosi na aglomerate pektinskih molekula (s obzirom da se radi o vrlo malom udjelu molekula relativno velike molekulske mase. Naime, pektini su općenito vrlo higroskopni te brzo vežu vodu na površni čestica što može otežati prodiranje otapala u unutrašnjost i potpuno otapanje pektina (Einhorn-Stoll, 2017). U svrhu suzbijanja nastanka aglomerata molekula pektina, u otopine pektinskih frakcija prije HPSEC analize dodana je mala količina LiOH, tj. pažljivo je podešen pH otopine prema relativno lužnatom, što pogoduje potpunoj solvataciji molekula (Gaborieau i Castignolles, 2010). Ipak, iz rezultata je vidljivo da je mala količina molekula ipak ostala u aglomeriranom obliku (0,2 % za P1 i 1,0 % za P2, Tablica 45). Prisustvo aglomerata (P1 i P2 frakcije) dodatno je naglasilo polidisperznost ukupnog profila ovih pektinskih frakcija. S druge strane, populacije II i III mogu se smatrati reprezentativnima za P1 i P2 frakcije. Populacija II u oba slučaja bila je karakterizirana nešto

višim PDI (1,538 za P1 i 1,681 za P2) te većom razlikom u  $M_w$  vrijednostima (nego  $M_n$ ) između navedenih uzoraka (~ 410 kDa za P1 te ~ 640 kDa za P2). Populacije III obaju uzoraka bile su relativno homogene (PDI 1,014 za P1 te 1,040 za P2) i slične za oba uzorka, raspona vrijednosti  $M_n$  i  $M_w$  približno 110-160 kDa. Populaciju I H1\_A uzorka također je karakterizirala relativna homogenost s obzirom na vrijednost PDI (1,171) te relativno visoka molekulska masa, približno 1400 kDa ( $M_w$ ). Populacija II bila je karakterizirana niskim PDI (1,070) te prosječnom molekulskom masom 390 kDa ( $M_w$ ). Za razliku od P1 i P2 frakcija, u H1\_A vidljiva je prisutnost populacije relativno male molekulske mase (~ 80 kDa ( $M_w$ )), što potencijalno može odgovarati prisutnosti slobodnih oligomernih ili kraćih polimernih arabinana (ili frgmenata galakturonana) u uzorku. Za sva tri pektinska uzorka karakteristično je smanjenje unutarnje viskoznosti koje prati smanjenje srednje molekulske mase pojedine populacije. Usporedbom uzoraka, najveća razlika vidljiva je za H1\_A u odnosu na P1 i P2, gdje je određena puno niža unutarnja viskoznost za populaciju relativno visoke vrijednosti  $M_w$ , što može ukazivati na drugačije konformacijske karakteristike pektinskih molekula u H1\_A uzorku.

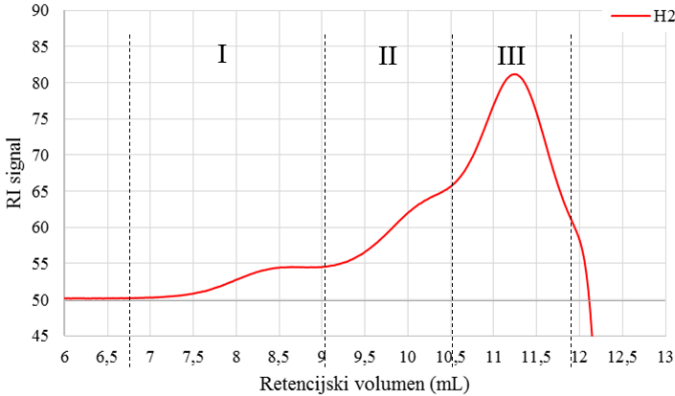
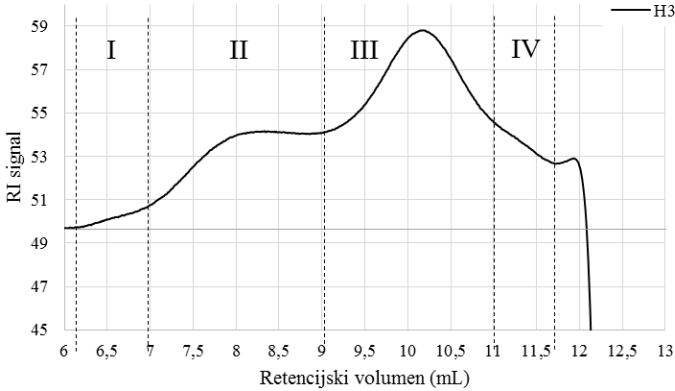
Iz rezultata monomernog sastava, analize glikozidnih veza, te HPSEC profila, može se zaključiti da su P1 i P2 SBP pektini relativno slični te značajno različiti od H1\_A, što je i uvjetovalo različitu ekstraktibilnost istih.

Tablica 46 prikazuje HPSEC profil hemiceluloznih frakcija te odgovarajuće vrijednosti molekulske mase i polidisperznosti pojedinih frakcija. U podfrakciji H1\_EtOH vidljiva je samo jedna populacija, relativno niske polidisperznosti (1,049) i srednje molekulske mase ( $M_w$ ), svega približno 5,5 kDa. Može se zaključiti da se slobodni izdvojeni arabinan iz SBP nalazi u obliku smjese oligomera i/ili kratkih polimera. S obzirom na prisutnost glukomanana u ovoj frakciji, može se zaključiti da je isti također prisutan u obliku oligomera. U H1\_N podfrakciji određene su 3 populacije; dominantna populacija (~ 80 % udjela) pokazala je relativno visoku polidisperznost (1,800) te molekulsku masu ( $M_w$ ) približno 54 kDa. Prisutna je bila i populacija relativno niske molekulske mase (~ 8,5 kDa) koja odgovara oligomernim ili kratkim polimernim molekulama. Najmanje je bila zastupljena (4,7 % udjela) populacija relativno velike molekulske mase (~ 1800 kDa). Ukupni profili H2 i H3 frakcija, s obzirom na prisutnost više populacija, pokazali su relativno visoke vrijednosti PDI ukupnog profila, naročito frakcija H3 (66,563). U H3 frakciji određeno je najviše populacija (4), a pritom su sve bile relativno velike molekulske mase, reda veličine  $10^5 - 10^7$  Da. Vrijednost PDI za za sve frakcije bila je relativno niska u odnosu na druge uzorke (1,000-1,298). S druge strane, u frakciji H2 najzastupljenija (63,7 % udjela) je bila populacija relativno male molekulske mase (~ 19 kDa), također relativno niske PDI vrijednosti (1,144).

Tablica 46. HPSEC (*engl.* high performance size exclusion chromatography) profil i parametri molekulskih masa hemiceluloznih frakcija izdvojenih novim postupkom frakcioniranja polisaharida pulpe šećerne repe.

		Relativni RI (% ukupnog signala)	Mn (Da)	Mw (Da)	Faktor polidisperzije (PDI)	Unutarnja viskoznost (dL/g)		
<b>SBP_H1_EtOHs</b>		<b>ukupni profil</b>	100,0	5 164	5 417	1,049	0,1198	
		<b>populacije</b>	<b>I</b>	100,0	5 164	5 417	1,049	0,1198
<b>SBP_H1_N</b>		<b>ukupni profil</b>	100,0	23 419	122 544	5,229	0,5121	
		<b>populacije</b>	<b>I</b>	4,7	1,28*10 <sup>6</sup>	1,77*10 <sup>6</sup>	1,384	2,3307
			<b>II</b>	80,0	29 999	53 999	1,800	0,4924
			<b>III</b>	15,4	7 097	8 676	1,222	0,089

Tablica 46. HPSEC (*engl.* high performance size exclusion chromatography) profil i parametri molekulskih masa hemiceluloznih frakcija izdvojenih novim postupkom frakcioniranja polisaharida pulpe šećerne repe - nastavak.

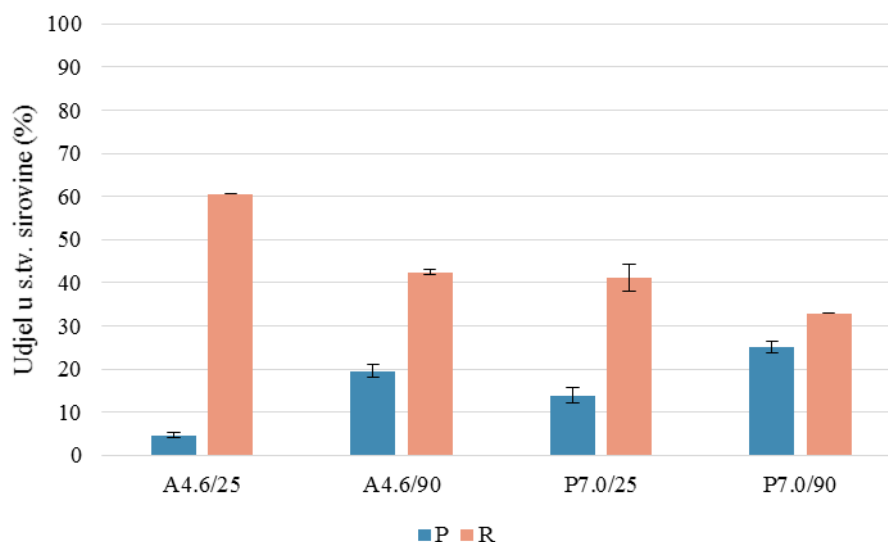
		Relativni RI (% ukupnog signala)	Mn (Da)	Mw (Da)	Faktor polidisperzije (PDI)	Unutarnja viskoznost (dL/g)	
<b>SBP_H2</b>		<b>ukupni profil</b>	100,0	108 586	293 382	2,702	0,9147
	<b>populacije</b>	<b>I</b>	9,6	1,12*10 <sup>6</sup>	1,56*10 <sup>6</sup>	1,400	1,1195
		<b>II</b>	26,7	107 173	161 989	1,511	0,4986
		<b>III</b>	63,7	18 832	21 594	1,144	0,1186
<b>SBP_H3</b>		<b>ukupni profil</b>	100,0	13 312	885 746	66,563	1,5018
	<b>populacije</b>	<b>I</b>	1,3	2,05*10 <sup>7</sup>	2,44*10 <sup>7</sup>	1,190	2,0704
		<b>II</b>	28,9	2,66*10 <sup>6</sup>	3,28*10 <sup>6</sup>	1,234	1,2394
		<b>III</b>	58,4	337 416	437 959	1,298	0,5781
		<b>IV</b>	11,5	304 140	305 612	1,005	0,9790



#### 4.6.3 Primjena kelatora u ekstrakciji pektina iz ljuske crvenog luka

S obzirom na male prinose pektinske frakcije OP prilikom ekstrakcije razrijeđenom kiselinom (HCl), kao i nisko iskorištenje GalUA u istoj, provedena je optimizacija ekstrakcijskih uvjeta. U tom kontekstu istražena je primjena kelirajućeg sredstva etilendiaminotetraoctene kiseline (EDTA) pri 2 pH vrijednosti (4,6 i 7,0) i 2 temperature ekstrakcije (sobna - 25 °C i 90 °C).

Pektin se u staničnoj stijenci može naći stabiliziran (usidren) kalcijevim ionima, te je njegova ekstrakcija moguća uz prethodno uklanjanje isith, najčešće primjenom kelatora koji imaju vrlo visoki afinitet za vezanje iona metala. Kombinacijom navedenih uvjeta (pH i temperatura) provedene su 4 ekstrakcije, za svaku pH vrijednost otapala pri 2 navedene temperature. Slika 65 prikazuje prinos pektinskih frakcija (P) te frakcija ostatka nakon ekstrakcije (R).



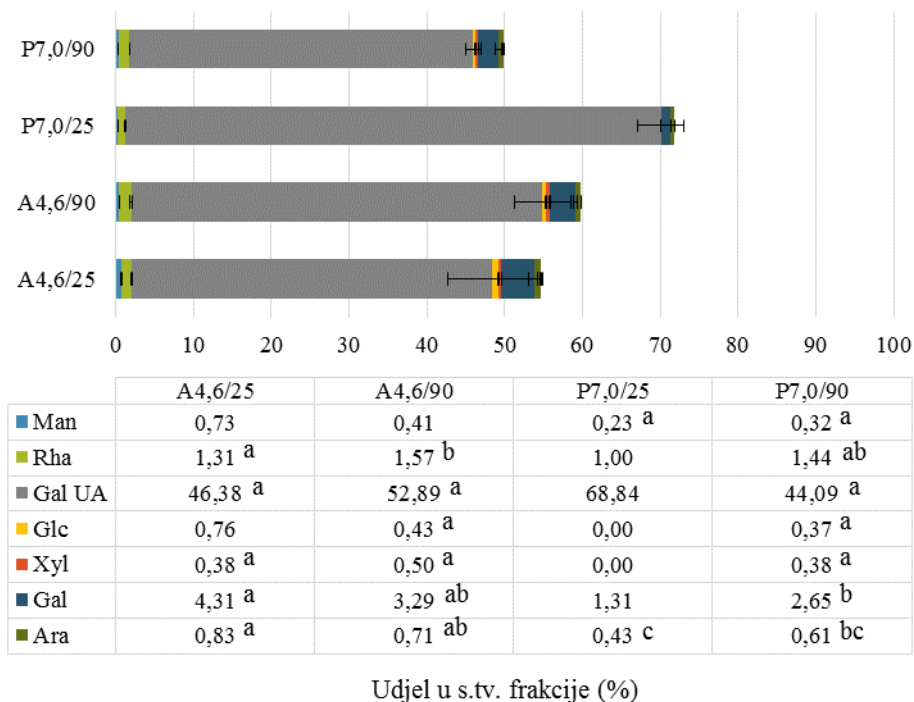
Slika 65. Prinosi (udjel u s.tv. sirovine (%)) pektina (P) i ostataka (R) izdvojenih iz ljuske crvenog luka primjenom kelirajućeg sredstva (EDTA) u ovisnosti o pH otopine i temperaturi (A – acetatni puffer, P – fosfatni puffer, 4,6 i 7,0 – pH vrijednosti, 25 i 90 – temperature).

Iz rezultata je vidljivo da se primjenom više temperature ekstrakcije te više pH vrijednosti otapala postiže veći prinos pektinske frakcije. Pritom je promjena temperature za istu pH vrijednost otapala značajnije povećala prinos nego promjena pH otapala za istu temperaturu ekstrakcije. Najviši prinos P frakcije ostvaren je za primijenjene uvjete pH otapala 7,0 (fosfatni puffer - P) i temperaturu ekstrakcije 90 °C (25,1 %), a najmanji za pH otapala 4,6 (acetatni puffer - A) i temperaturu ekstrakcije 25 °C (4,67 %). Veći prinosi za više pH vrijednosti otapala mogu se objasniti općenitim utjecajem pH na disocijaciju EDTA, pri čemu više pH vrijednosti pogoduju pomicanju ravnoteže u smjeru nastanka tetravalentnog aniona koji ima visoki afinitet za vezanje kationa metala. Utjecaj temperature može se objasniti poboljšanim prijenosom mase

iz čvrste u tekuću fazu pri povišenoj temperaturi otapala, kao i mogućem djelovanju topline (energije) na razaranje interakcija pektinskih molekula s drugim sastavnim dijelovima stanične stijenke, što povećava ekstraktibilnost istih. Rezultati istraživanja ekstraktibilnosti pektina otpadne mase (ljuske) luka ostvareni u ovome radu, sukladni su radovima Babbar i suradnika (2015 i 2016a) u kojima je također određena relativno niska ekstraktibilnost pektina primjenom razrijeđene mineralne kiseline te povećanje prinosa pektinske frakcije primjenom kelirajućih sredstava amonijeva oksalata i natrijeva heksametafosfata (ostvareni prinos za pH otapala 4,4 i temperaturu ekstrakcije 95 °C iznosio je 22 %).

Ako se promatra ukupan prinos P i R frakcije, vidljivi su nešto niži prinosi za ekstrakciju otapalom pH 7,0, što može biti sukladno degradativnom utjecaju povišene pH vrijednosti na integritet pektinskih polisaharida (Voragen i sur., 1995). Ipak, zbog moguće koprecipitacije EDTA kao i otežane potpune dijalize istoga (Renard i Thibault, 1993), prinos P i R frakcija u ovome slučaju promatrat će se kao indiktivan parametar uspješnosti ekstrakcije, dok će se o stvarnoj uspješnosti ekstrakcije zaključiti na temelju bilance iskorištenja ciljanih monomera.

Slika 66 prikazuje monomerni sastav P frakcija izdvojenih prilikom optimizacije ekstrakcije pektina iz OP. Svi pektinski uzorci bili su karakterističnog monomernog profila s dominantnom GalUA, a od bočnih lanaca vidljiva je prisutnost galaktana. Polisaharidni prinos (zbroj svih monomera) varirao je između približno 50 - 72 % s.tv. frakcije, s najvećom razlikom između P7,0/25 i P7,0/90 uzoraka. S obzirom da ukupni polisaharidni prinos ukazuje na značajnu prisutnost neugljikohidratnih komponenata, što se može odnositi na prisustvo esterski vezanih skupina, koekstrahiranih neugljikohidratnih komponenata ili pak koprecipitiranog EDTA preostalog nakon dijalize, međusobno su uspoređivani relativni udjeli pojedinih monomera. U tom kontekstu, pektinski uzorci pokazuju puno veću sličnost, ali i dalje uz iznimku uzorka P7,0/25, koji se odlikovao značajno većim relativnim udjelom GalUA (čak ~96 % u odnosu na ~85-89 % za ostale uzorke) te smanjenim relativnim udjelima Rha i Gal. Promatrajući monomerni sastav svih OP pektina, može se zaključiti da se pretežno radi o homogalakturonanu.

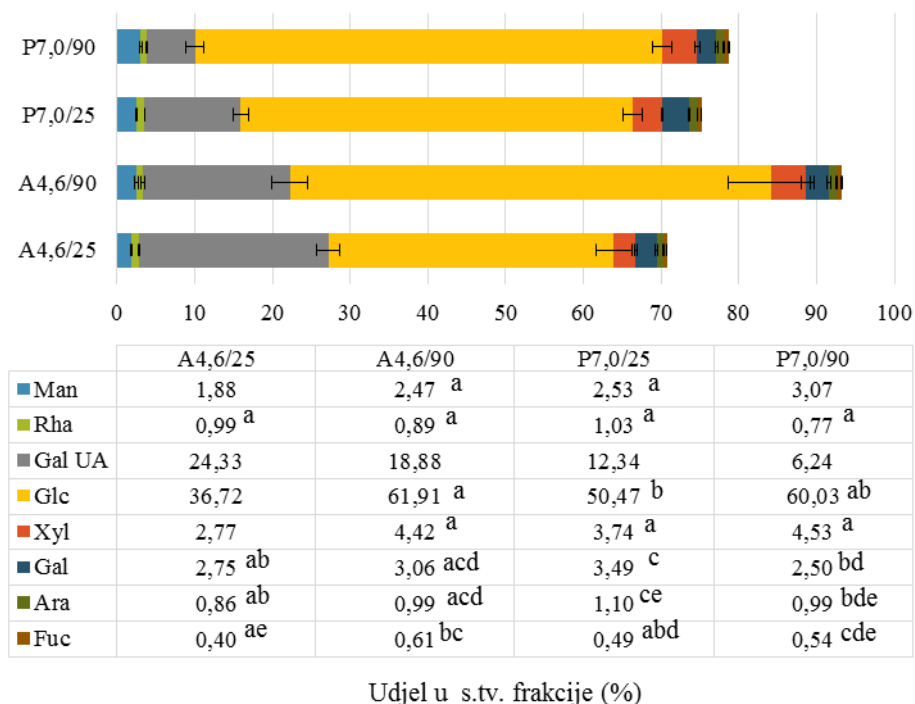


Slika 66. Monomerni (udjel u s.tv. frakcije (%)) sastav pektina izdvojenih iz ljuske crvenog luka primjenom kelirajućeg sredstva (EDTA) u ovisnosti o pH otopine i temperaturi ekstrakcije (A – acetatni puffer, P – fosfatni puffer, 4,6 i 7,0 – pH vrijednosti, 25 i 90 – temperature). Vrijednosti u istome redu među kojima ne postoji statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ;  $n=3$ ) označene su istim slovom.

Za razliku od drugih uzoraka pektina analiziranih u ovome radu, potpuna kiselinska hidroliza uzoraka prije derivatizacije i HPLC analize (za potrebe analize monomernog sastava), provedna tijekom 2 h, rezultirala je vrlo niskim prinosima GalUA (rezultati nisu zasebno prikazani). Stoga je trajanje kiselinske hidrolize produljeno na 6 h, što je rezultiralo povećanjem prinosa za 58-137 % početne vrijednosti, ovisno o uzorku. Kako je prethodno navedeno, za slučaj mogućeg nepotpunog oslobađanja GlcUA tijekom hidrolize ksilana (poglavlje 4.5.3), kompleksni heteropolisaharidi sadrže glikozidne veze različite stabilnosti u uvjetima kiselinske hidrolize. Budući da je za potpunu kiselinsku hidrolizu kiselinom-ekstraktibilnog pektina OP bila dovoljna dvosatna hidroliza, dok za kelator-ekstraktibilni pektin hidroliza u trajanju 6 h, može se pretpostaviti da velik utjecaj na hidrolizu homogalakturonana imaju i inter- i intramolekulske interakcije koje mogu smanjiti izloženost pojedinih dijelova molekule hidrolitičkom djelovanju. Istraživanje utjecaja različitih vrsta mineralnih kiselina, njihovih koncentracija te vremena hidrolize pri 100 °C na potpunu hidrolizu pektina jabuke pokazalo je značajan utjecaj navedenih parametara te postizanje maksimuma prinosa GalUA u hidrolizi 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (kako je korišteno i u ovome radu) nakon 6 h (Garna i sur. 2006). Na temelju

navedenoga može se zaljučiti da je potreban zaseban pristup analizi monomernog sastava s obzirom na sirovinu, odnosno sastav stanične stijenke iste.

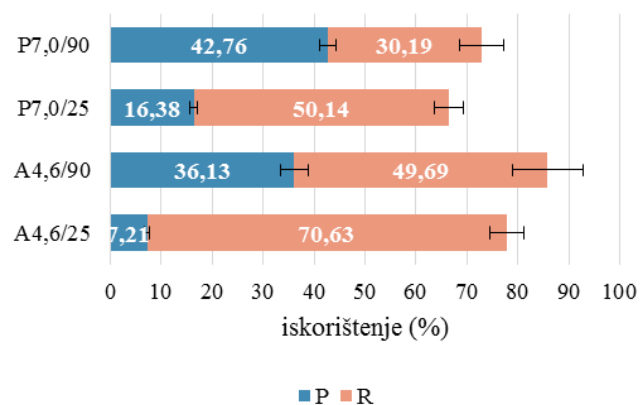
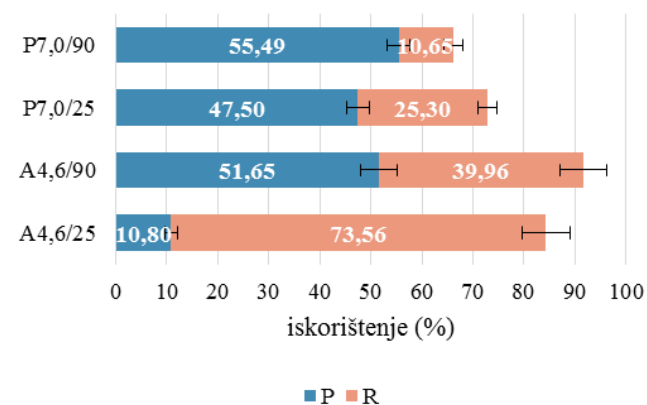
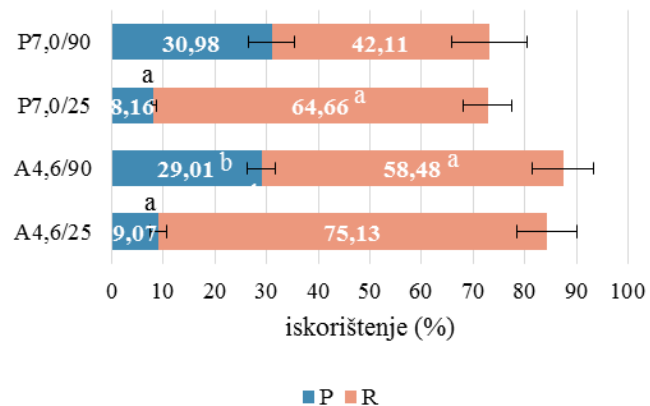
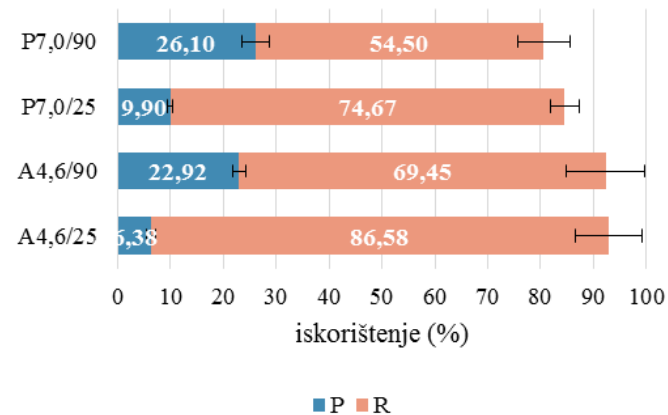
Slika 67 prikazuje monomerni sastav R frakcija nakon ekstrakcije pektina iz OP pomoću EDTA. Iz rezultata se može vidjeti smanjenje zastupljenosti rezidualnog galakturonana s obzirom na povećanje temperature ekstrakcije te pH ekstrakcijskog otapala. Najveći udjel istoga određen u uzorku A4,6/25 (34,4 % relativnog udjela GalUA), a najmanji u uzorku P7,0/90 (7,9 % relativnog udjela GalUA).



Slika 67. Monomerni sastav (udjel u s.tv. frakcije (%)) ostataka nakon ekstrakcije pektina iz ljuske crvenog luka primjenom kelirajućeg sredstva (EDTA) u ovisnosti o pH otopine i temperaturi ekstrakcije (A – acetatni puffer, P – fosfatni puffer, 4,6 i 7,0 – pH vrijednosti, 25 i 90 – temperature). Vrijednosti u istome redu među kojima ne postoji statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ;  $n=3$ ) označeni su istim slovom.

Ukupan polisaharidni prinos R frakcija općenito je veći nego za P frakcije, međutim i dalje relativno nejednolik za sve uzorke, što ukazuje na različitu zastupljenost neugljikohidratnih komponenata u pojedinoj R frakciji, te može biti rezultat različite zastupljenosti neugljikohidratnih neekstrahiranih makrokomponentata, esterski vezanih skupina ili zaostalog EDTA nakon ispiranja frakcije. Osim rezidualnog pektina, u monomernom sastavu ovih frakcija zastupljeni su hemicelulozi karakteristični monomeri poput Man, Xyl i Glc, koji ukazuju na prisutnost manana/glukomanana i ksiloglukana, međutim, općenito u vrlo malom udjelu te, naravno, celuloze kao dominantnog polisaharida stanične stijenke OP, uz pektin.

Kombinacijom rezultata prinosa P i R frakcija, njihovog monomernog sastava te početnog monomernog sastava OP, definirane su bilance GalUA, Gal, Ara i Rha (karakterističnih monomera pektina) (Slika 68). Primjenom EDTA postignuta su veća ukupna iskorištenja svih monomera za sve eksperimentalne uvjete (u prosjeku 80 - 90 %) u odnosu na ista ostvarena prilikom inicijalnog postupka fracioniranja (ekstrakcija pektina razrijeđenom kiselinom (HCl)). Također, relativno veća ukupna iskorištenja postignuta su za ekstrakciju pri pH 4,6, što se može objasniti mogućim degradativnim utjecajem pri ekstrakciji otapalom povišenog pH (pH 7,0), kako je navedeno ranije. Općenito se može primijetiti da promjena ekstrakcijskih uvjeta nije toliko značajno utjecala na ukupno iskorištenje pojedinog monomera, koliko na ekstraktibilnost istoga u P frakciji. Pritom je posebno značajan utjecaj pH za ekstrakciju pri sobnoj temperaturi (u bilancama Rha i GalUA), kao i temperature za ekstrakcije pri pH 4,6 i 7,0 (osim za bilancu GalUA, gdje je vidljiv puno manji utjecaj temperature za ekstrakciju pri pH 7,0). Kombiniranjem uvjeta pH i temperature ekstrakcije, postignuta je ekstraktibilnost ukupnog galakturonana od približno 50 % (~ 10 % s.tv. OP) u P frakciji. Za donje granične uvjete ekstrakcije (početni uvjeti, niski pH i temperatura) ostvareno je najniže iskorištenje GalUA (~ 9 % početnog udjela GalUA u OP), a navedeno povećanje do približno 50 % može se ostvariti povećanjem temperature ekstrakcije uz istu pH vrijednost otapala, ili povećanjem pH vrijednosti uz istu temperaturu ekstrakcije (u odnosu na početne uvjete). Pritom, povećanje temperature je poželjnije s obzirom da je ostvareno nešto veće iskorištenje GalUA u P frakciji (51,7 % početnog udjela GalUA u OP), kao i ukupno iskorištenje GalUA (91,6 % početnog udjela GalUA u OP) te optimalnim uvjetima ekstrakcije galakturonana iz OP u kontekstu ovoga rada mogu se smatrati ekstrakcija acetatnim puferom pH 4,6, uz dodatak 100 mM EDTA, pri 90 °C. S obzirom da je navedeno iskorištenje ostvareno nakon ponovljene ekstrakcije, smatra se da daljnje povećanje vremena ekstrakcije neće značajno utjecati na povećanje iskorištenja GalUA u P frakciji. Ekstrakcija pri povišenoj pH vrijednosti otapala, iako ostvaruje gotovo jednaka iskorištenja GalUA u P frakciji, ne preporučuje se zbog mogućeg ukupnog degradativnog utjecaja na strukturu molekula pektina. U tu svrhu daljnjih mogućnosti postizanja većih iskorištenja GalUA u P frakciji, može se u istražiti primjena različitih kiselih pufera, te kelirajućih agenasa u različitim koncentracijama.

**Rha****GalUA****Gal****Ara**

Slika 68. Bilanca pektinskih monomera za postupak optimizacije izdvajanja pektina iz ljuske crvenog luka pomoću kelirajućeg sredstva EDTA, izražena kao iskorištenje (%) u izdvojenim frakcija u odnosu na početni udjel pojedinog monomera u sirovini (P - pektinska frakcije, R - frakcija ostatka nakon ekstrakcije). Vrijednosti za pojedine serije (P ili R) među kojima ne postoji statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ,  $n=6$ ), označene su istim slovom.

## 4.7 Analiza parcijalne hidrolize ksilana i pektina te prebiotičkih svojstava dobivenih hidrolizata

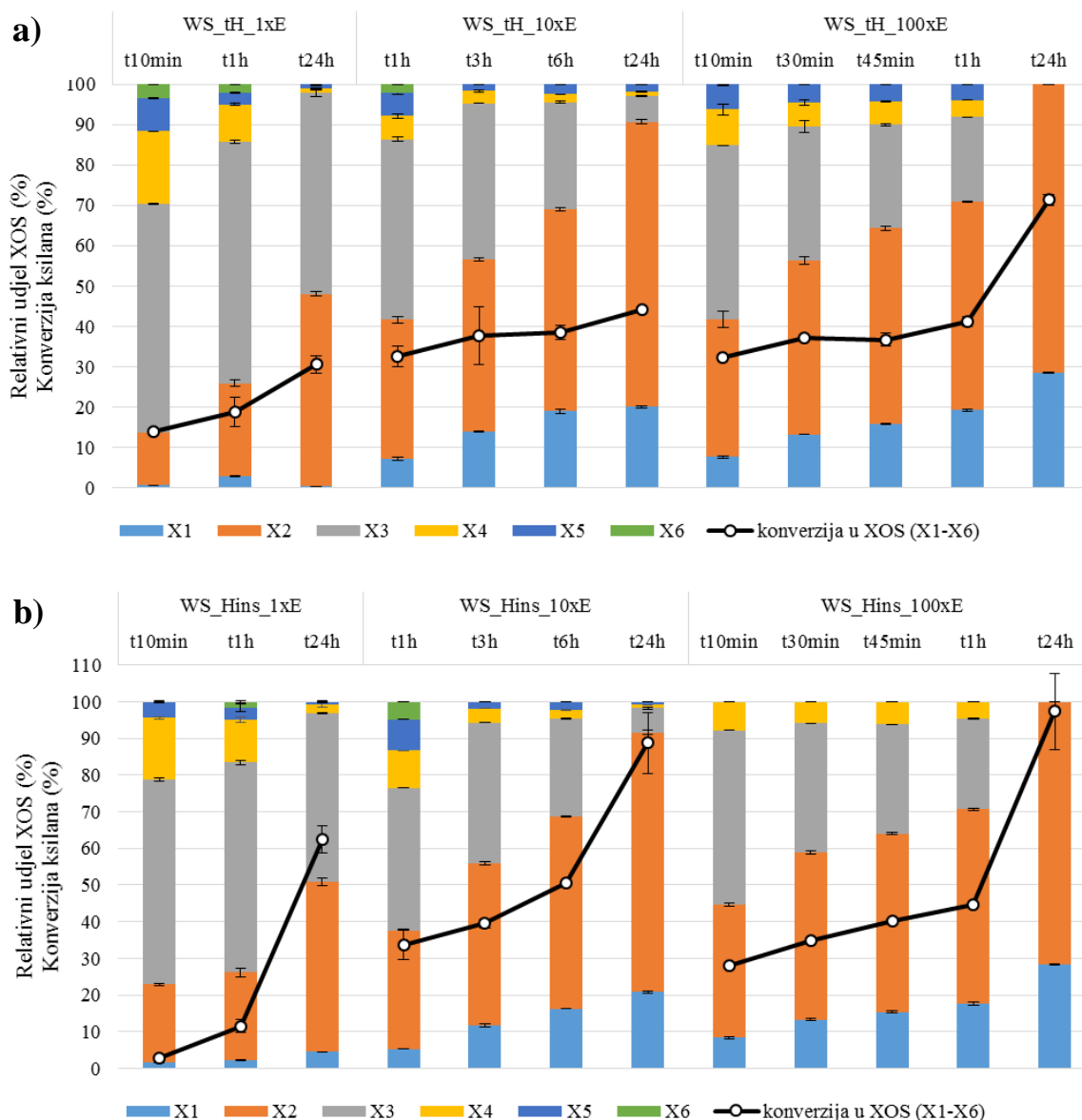
### 4.7.1 Profil ksilooligosaharida u hidrolizatima ksilana

Parcijalna hidroliza ksilana izdvojenih iz WS i PP pri optimalnim uvjetima (D2h 4M ekstrakciji za WS i D1h 2M ekstrakciji za PP) provedena je u svrhu proizvodnje ksilooligosaharida (XOS) s potencijalnim prebiotičkim svojstvima. Hidroliza je provedena komercijalno dostupnim enzimom *endo*- $\beta$ -(1,4)-ksilanazom, zasebno na netopljivim (ntH) i topljivim (tH) ksilanskim podfrakcijama.

S obzirom na dostupne standarde, XOS su kvalitativno i kvantitativno određeni kao linearni oligomeri stupnja polimerizacije (DP) 1-6, tj. kao ksiloza (X1), ksilobioza (X2), ksilotrioza (X3), ksilotetraoza (X4), ksilopentaoza (X5) i ksiloheksaoza (X6). Iako po definiciji nisu oligomeri, X1 i X2 su u ovom kontekstu ubrojani u XOS zbog lakšeg prikaza i rasprave rezultata.

Slika 69 prikazuje profil XOS za različita vremena hidrolize ntH i tH podfrakcija WS te različite koncentracije enzima *endo*-ksilanaze. Kako je prikazano, ukupna konverzija ksilana (prikazana tamnom linijom) povećavala se sukladno povećanju vremena hidrolize te primijenjene koncentracije enzima, odnosno, za dulje vrijeme hidrolize i veću koncentraciju ksilanaze određena je veća ukupna konverzija ksilana. Za oba uzorka WS ksilana najveća ukupna konverzija postignuta je nakon 24 h hidrolize. Nadalje, u slučaju tH, najveće postignute konverzije bile su manje nego za Hins pri istim uvjetima; konkretno, za koncentracije enzima 1xE i 10xE razlika je bila dvostruka (30,6 % za tH u odnosu na 62,5 % za ntH za 1xE 24 h hidrolizu te 44,2 % za tH u odnosu na 88,8 % za ntH za 10xE 24 h hidrolizu), dok za 100xE koncentraciju enzima razlika konverzije ipak je bila nešto manja (71,4 % za tH u odnosu na 97,4 % za ntH). Smanjena konverzija ksilana u XOS za tH u korelaciji je s različitim strukturnim karakteristikama ove podfrakcije. Naime, ksilan tH relativno je više razgranat u usporedbi s ntH, što je smanjilo mogućnost djelovanja ksilanaze, specifične za linearni nesupstituirani ksilan. Također, moguće interakcije s ostalim ko-ekstrahiranim polisaharidima i rezidualnim otopljenim ligninom također su mogle značajno utjecati na dostupnost supstrata. Kako je prethodno navedeno u analizi monomernog sastava, tH podfrakcija sadrži visok udjel neugljikohidratnih komponenata, najvjerojatnije koekstrahiranog lignina, te se pretpostavlja da je djelomična rekalcitrancija tH posljedica prisutnosti ksilan-lignin kompleksa. Razlika do 100 % konverzije ksilana za oba uzorka odnosi se na nehidrolizirane fragmente koji potencijalno mogu biti razgranati oligomeri ili oligomeri DP > 6 (posebice za kraće trajanje hidrolize, kao i

niže koncentracije enzima) za koje nije bilo mogućnosti odgovarajuće detekcije, niti kvantifikacije.



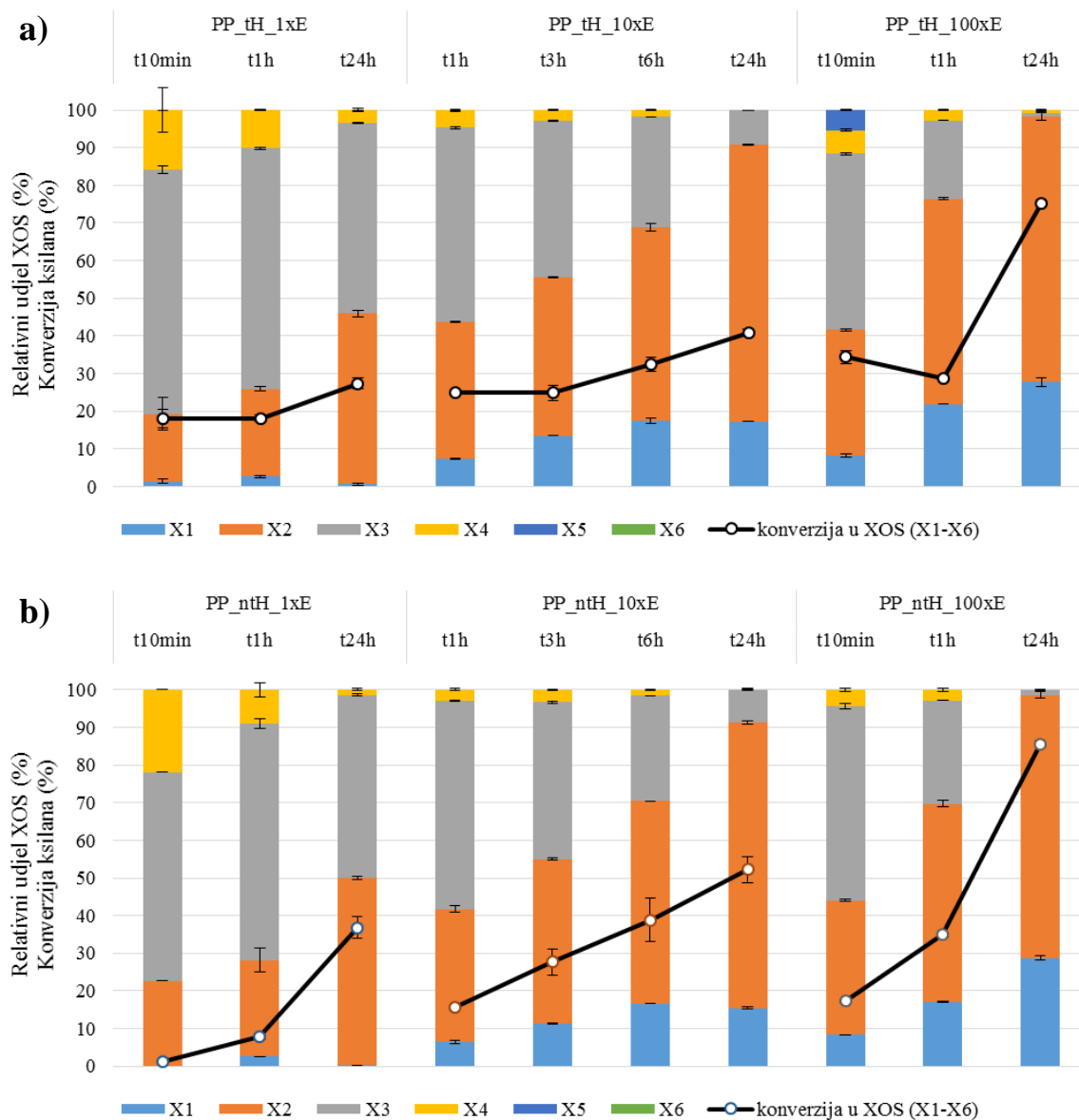
Slika 69. Profil ksiloooligosaharida (XOS) te stupanj konverzije a) topljivog (tH) i b) netopljivog (ntH) ksilana, izdvojenih iz ljuske oraha (WS) pri optimalnim uvjetima, primjenom enzima *endo*-ksilanaze. X1 - ksiloza, X2 - ksilobioza, X3 - ksilotrijoza, X4 - ksilotetraoza, X5 - ksilopentaoza, X6 - ksiloheksaoza.

Promatrajući profil XOS (prikazan obojanim stupićima, Slika 69), promjene sastava, tj. udjela pojedinih mjerenih XOS za različite hidrolitičke uvjete bile su vrlo slične za oba uzorka, tj. za svaku primijenjenu koncentraciju enzima relativni udjel X1 i X2 se povećavao, dok su se relativni udjeli X3, X4, X5 i X6 smanjivali sukladno produljenju trajanja hidrolize. Nadalje, X1, X2 i X3 općenito su bili dominantni XOS oblici, dok X4 i X5 manje zastupljeni, a X6 najčešće nije bio zastupljen. U prosjeku, 15 % relativnog udjela svih određenih XOS odnosilo



se na XOS DP 4-6, za tH uzorak, a u slučaju ntH 10-15 % za iste XOS oblike (s iznimkom 1xE 24 h hidrolize gdje je udjel istih bio nešto veći, približno 30 % za tH i 20-25 % za ntH). Profil XOS, kao i ukupna konverzija ksilana, za 24 h hidrolizu primjenom koncentracije enzima 100xE može se smatrati krajnjim produktom hidrolize ksilana WS *endo*-ksilanazom. Pri navedenim uvjetima XOS su se sastojali isključivo od X1 i X2 u omjeru 30:70. Budući da je ukupna konverzija pri istim uvjetima iznosila više od 90 %, može se zaključiti da je ksilan u tH i ntH podfrakcijama bio u konačnici potpuno dostupan za hidrolizu, pokazujući da gore navedene supstitucije ipak nisu u potpunosti onemogućile djelovanje enzima *endo*-ksilanaze.

Slika 70 prikazuje profil XOS za različita vremena hidrolize ntH i tH podfrakcija PP te različite koncentracije enzima *endo*-ksilanaze. I za PP ksilanske podfrakcije (tH i ntH) ukupna konverzija ksilana u XOS rasla je sukladno produljenju vremena hidrolize te većoj primijenjenoj koncentraciji enzima. Najviše vrijednosti ukupne konverzije ksilana postignute su za hidrolize 100xE 24 h (75,3 % za tH i 85,4 % za ntH). Za tH uzorak, stvarna konverzija (za sve eksperimentalne uvjete) bila je veća, ako se uzme u obzir da su prikazani rezultati izračunati na temelju ukupnog ksilana (ukupne Xyl u tH frakciji, anhidro oblika) u uzorku, dio kojeg se odnosi na ksiloglukan (koji nije podložan hidrolizi *endo*-ksilanazom te ne generira XOS). Kao i za WS uzorke, hidroliza ksilana za oba PP uzorka bila je vrlo slična. U usporedbi s WS\_ntH uzorkom, vidljivo je da je konverzija PP\_ntH ksilana bila sporija, što se potencijalno može objasniti težom dostupnošću supstrata s obzirom da su čestice PP\_ntH bile relativno velike (primjetljivo golim okom) u odnosu na WS\_ntH. Profil XOS za PP uzorke ksilana bio je vrlo sličan kao kod WS uzoraka, potvrđujući međusobne strukturne sličnosti supstrata (kako je određeno i analizom glikozidnih veza). Određeni XOS u PP uzorcima sastojali su se od oligomera do najviše DP4, uz iznimku 10 min hidrolize PP\_tH, gdje je određena i prisutnost ksilopentaoze (X5). Ksilotetraoza (X4) je značajnije bila zastupljena jedino u početnim uvjetima hidrolize (10 min 1xE), s relativnim udjelima približno 16 % (tH) i 22 % (ntH), povezano s relativno niskim (najnižim) ukupnim konverzijama ksilana. Za povećane koncentracije enzima (10xE i 100xE) X4 je relativno bila zastupljena s najviše 6,3 % u oba uzorka. Kao i u slučaju WS ksilana, produljena hidroliza za pojedinu koncentraciju enzima rezultirala je povećanjem relativnog udjela X1 i X2, dok se relativni udjel X3 i X4 smanjivao. Općenito, X2 i X3, pojedinačno ili zajedno, bili su dominantni oblici XOS u hidrolizatima PP ksilana. Najviši udjel X1 ostvaren je za 24 h 100xE hidrolizu (27,3 % relativnog udjela za tH i 28,8 % za ntH), kao i prilikom hidrolize WS uzoraka.



Slika 70. Profil ksiloooligosaharida (XOS) te stupanj konverzije a) topljivog (tH) i b) netopljivog (ntH) ksilana, izdvojenih iz mahune graška (PP) pri optimalnim uvjetima, primjenom enzima *endo*-ksilanaze. X1 - ksiloza, X2 - ksilibioza, X3 - ksilotrioza, X4 - ksilotetraza, X5 - ksilopentaoza, X6 - ksiloheksaoza.

Profil XOS pri maksimalnim uvjetima hidrolize (24 h 100xE) bio je gotovo istovjetan profilima dobivenima u hidrolizi WS ksilana pri istim uvjetima, sastojeći se gotovo isključivo od X1 i X2, u omjeru 30:70, praćeno vrlo visokom ukupnom konverzijom ksilana. S obzirom da je nevedeni omjer određen u hidrolizi svih uzoraka ksilana pri maksimalnim uvjetima hidrolize, takav sastav XOS može se smatrati finalnim produktom hidrolize analiziranih ksilana primjenom enzima *endo*-ksilanaze, što navodi na daljnji zaključak da ukupna konverzija ksilana pri navedenim uvjetima zapravo predstavlja udjel nesupstituiranog (i lako hidrolizirajućeg) ksilana u WS i PP ksilanskim podfrakcijama.

Komercijalni pripravci XOS sastoje se od smjese XOS različitih DP, uglavnom ksilobioze i ksilotrioze (Gullón i sur., 2008). Sa stajališta funkcionalnosti, prebiotičke učinke u smislu poticanja rasta i metaboličke aktivnosti bifidobakterija iskazuju XOS nižih DP (2-4) (Moura i sur., 2007; Singh i sur., 2015; Ho i sur., 2018). U tom kontekstu, rezultati hidrolize WS i PP ksilana mogu se promatrati kroz ostvarivanje najvišeg prinosa X2, X3 i X4. Isti je, za pojedine primijenjene koncentracije enzima u hidrolizi WS ksilana, ostvaren nakon 24 h hidrolize. U slučaju ntH, konverzije ksilana iznosile su 59,3 %, 70,4 % i 71,0 % za 1xE, 10xE i 100xE koncentracije enzima, pri čemu se svaki prinos odnosi na drugačiji X2:X3:X4 omjer. S porastom koncentracije *endo*-ksilanaze, omjer je pomaknut od gotovo jednakog udjela X2 i X3 (48,5:49,0 za 1xE) do zastupljenosti isključivo X2 (za 100xE). Istovremeno je određen općenito vrlo nizak udjel X4 za ova 3 eksperimentalna uvjeta (najviše 2 % relativnog djela u X2+X3+X4). Učinak porasta koncentracije enzima na konverziju ksilana u X2+X3+X4 vidljiv je do koncentracije enzima 10xE (tj. najveća razlika određena je za 1xE i 10xE koncentracije), s kojom se postiže svojevrsni plato nakon kojeg se konverzija u navedene produkte nije značajnije mijenjala porastom koncentracije enzima. U slučaju tH (WS), najviša konverzija u X2+X3+X4 određena je za 24 h 100xE hidrolizu koja se zapravo odnosila isključivo na konverziju ksilana u X2 (51,9 %), kao i u slučaju ntH pri istim uvjetima. Promatrajući kraće hidrolize ovog supstrata (za sve 3 koncentraciju enzima), može se primijetiti da je konverzija u X2+X3+X4 bila relativno jednolika, u prosjeku se odnosila na 1/3 ksilana (27,7 - 35 %), osim 24 h 1xE hidrolize u kojoj je konverzija bila veća od navedenog prosjeka. Kao i za WS\_ntH, podjednak omjer X2:X3 (47,9:51,2) te ujedno i najviši prinos X3, određen je za 24h 1xE hidrolizu, a sličan rezultat ostvaren je i za 3 h 10xE hidrolizu (X2:X3 = 51,1:46,2, 14,8 % konverzija ksilana u X3).

U slučaju PP ksilana, najviša konverzija u XOS X2+X3+X4 određena je za 24 h 100xE hidrolizu za oba uzorka (62,0 % za ntH i 55,4 % za tH), pri čemu se hidrolizat sastoji dominantno od X2 (najmanje 97,7 % relativnog udjela u X2+X3+X4). Kako je prethodno određeno za WS uzorke, najviši udjel X3 u hidrolizatima postignut je za 24 h 1xE hidrolize (za oba uzorka, 18,1 % za ntH i 14,0 % za tH).

I netopljiva i topljiva podfrakcija iz obje sirovine (WS i PP), tj. ukupno ekstrahirani ksilan iz istih, podložan je razgradnji enzimom *endo*-ksilanazom te u svrhu proizvodnje XOS nije nužno ove podfrakcije razdvajati i hidrolizirati zasebno. Kombinirajući rezultate konverzija ksilana i profila XOS za ntH i tH frakciju zajedno, izračunato je da se najviše 72 % početnog udjela Xyl u WS se može prevesti u XOS produkte, primjenom hidrolize u uvjetima 24 h 100xE, od kojih se 73 % odnosi na X2, a ostatak na X1. Dakle, najviša konverzija ksilana u X2 iznosi približno

53 % početnog udjela Xyl u WS. Ako se hidrolizom želi postići maksimalan udjel X3, primijenjena koncentracija enzima treba biti smanjena (1xE), što rezultira konverzijom od 43,1 % početnog udjela Xyl u WS, od čega 47,3 % u obliku X3 te 46,4 % X2. Za PP vrijede jednaki hidrolitički uvjeti, odnosno, primjenom hidrolize pri uvjetima 24 h 100xE postiže se najviša konverzija ukupnog ksilana u PP (79,1 % početnog udjela Xyl u PP), od čega 74 % u obliku X2. Najviša konverzija u X3 postiže se hidrolizom pri uvjetima 24 h 1xE te iznosi 16,6 % početnog udjela Xyl u PP, što je praćeno jednakom konverzijom u X2, dok konverzija u ostale određene oblike XOS iznosi tek 0,7 % početnog udjela Xyl u PP. Hidrolizati svih uzoraka neizbježno su sadržavali X1, čija koncentracija je proporcionalno rasla porastu ukupne konverzije u željene XOS produkte.

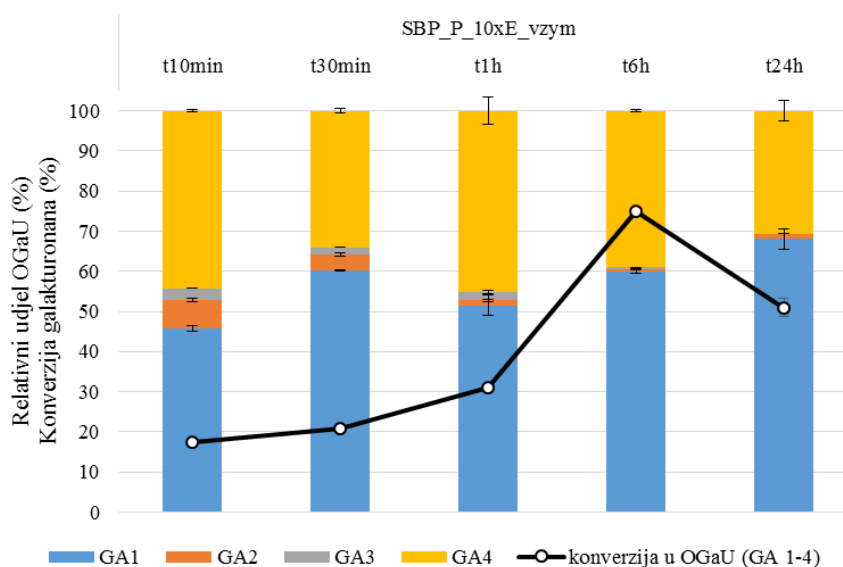
Imajući na umu da potvrda prebiotičkih svojstava XOS općenito, kao i doprinosa pojedinih oblika, zahtjeva daljnja istraživanja, izbor jedinstvenih optimalnih uvjeta hidrolize ksilana WS i PP, sa stajališta samo prinosa, nije moguć. Stoga, odabrano je više uvjeta koji pogoduju postizanju najviše koncentracije pojedinih potencijalno prebiotičkih oblika, kao što su X2 i X3. S obzirom da je zastupljenost DP > 3 općenito relativno niska, nisu razmatrani uvjeti koji pogoduju postizanju maksimalnog prinosa ovih XOS jer bi i ukupno iskorištenje supstrata u tom slučaju bilo vrlo nisko. Drugim riječima, hidrolizom WS i PP ksilana pomoću *endo*-ksilanaze nije bilo moguće ostvariti visoko iskorištenje XOS DP > 3. Nadalje, s obzirom da su za pojedine uzorke ksilana ostvarene približno jednake vrijednosti iskorištenja, kao i profil XOS, kombinacijom različitih vremena hidrolize i koncentracije enzima, izbor optimalnih uvjeta, osim o prebiotičkim svojstvima hidrolizata, ovisit će i o kompromisu između učinkovitosti i ekonomičnosti postupka hidrolize.

#### **4.7.2 Profil pektinskih oligosaharida u hidrolizatima pektina**

Parcijalna hidroliza pektina izdvojenih iz SBP, CBH i OP pri optimalnim uvjetima provedena je u svrhu proizvodnje pektinskih oligosaharida (POS), konkretno oligogalakturonida (OGaU), s potencijalnim prebiotičkim svojstvima. Hidroliza je provedena komercijalno dostupnim enzimom *endo*-poligalakturonazom M2 te komercijalno dostupnim enzimskim koktelom Viscozyme. S obzirom na ostvaren najveći prinos GalUA, tj. iskorištenje iste u izdvojenoj pektinskoj frakciji, za hidrolizu su korišteni pektini izdvojeni prema konvencionalnom postupku (u inicijalnom postupku frakcioniranja polisaharida staničnih stijenki, ekstrakcija razrijeđenom HCl) iz SBP i CBH, dok je u slučaju OP korišten pektin izdvojen ekstrakcijom s EDTA (uzorak A4,6/90). S obzirom na dostupne standarde, moguće je bilo kvalitativno i kvantitativno odrediti linearne oligomere galakturonske kiseline, DP 1-4, tj. galakturonsku

kiselinu (GA1), digalakturonsku kiselinu (GA2), trigalakturonsku kiselinu (GA3) i tetragalakturonsku kiselinu (GA4). Kao i kod XOS, GA1 i GA2, iako po definiciji ne pripadaju oligomerima, u kontekstu ovoga rada uvršteni su u OGaU radi lakšeg prikaza i rasprave rezultata.

Slika 71 prikazuje stupanj konverzije galakturonana (tamna linija) te profil POS (OGaU) (stupići u boji) za SBP pektin. Istraživana je primjena enzimskog koktela Viscozyme s obzirom da su hidrolize s ePG rezultirale vrlo niskim iskorištenjima galakturonana (rezultati nisu zasebno prikazani). Pritom je istražena samo jedna koncentracija enzimskog koktela (10xE). Nemogućnost hidrolize SBP pektina s ePG potencijalno je uvjetovana relativno visokim stupnjem esterifikacije supstrata (Slika 59). Naime, ePG, ovisno o mikrobnom producentu, mogu iskazivati različitu toleranciju na prisutnost metilnih i/ili acetilnih skupina (Bonnin i sur., 2014). S obzirom na ovdje dobivene rezultate vrlo niske ukupne konverzije galakturonana, može se zaključiti da primijenjena ePG-M2 ima nisku toleranciju na esterifikaciju galakturonana metilnom/acetilnom skupinom. Općenito je prihvaćeno da ePG u konvencionalnom smislu ne hidrolizira esterificirani galakturonan (Voragen i sur., 2001, Tucker i Seymour, 2002).



Slika 71. Profil oligogalakturonida te stupanj konverzije pektina iz pulpe šećerne repe (SBP), izdvojenog prema konvencionalnom postupku, primjenom Viscozyme (Vzym) enzimskog koktela. GA1 - galakturonska kiselina, GA2 - digalakturonska kiselina, GA3 - trigalakturonska kiselina, GA4 - tetragalakturonska kiselina.

Primjenom Viscozyme enzimskog koktela ipak je postignuta određena konverzija galakturonana. Isto može ukazivati na prisutnost poligalakturonazne aktivnosti s većom tolerancijom na metil-/acetyl-esterifikaciju supstrata ili pak kombinaciju deesterifikacijske

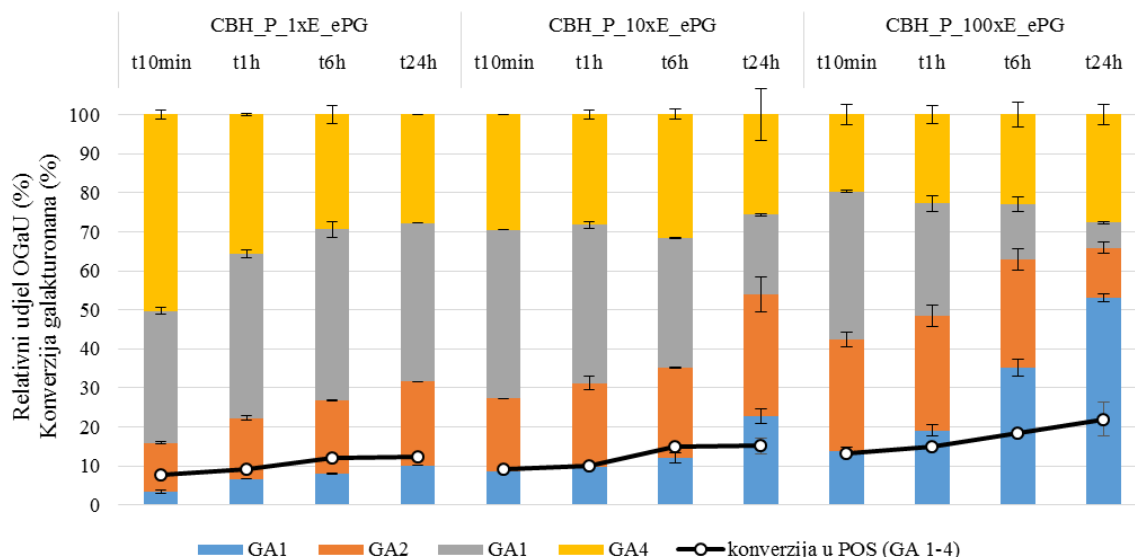
enzimske aktivnosti i galakturonazne aktivnosti (*endo-* i/ili *egzo-* (s obzirom na povećan udjel monomera)).

Ukupna konverzija galakturonana rasla je s produljenjem trajanja hidrolize. Niže vrijednosti ukupne konverzije galakturonana za 24 h hidrolizu (u odnosu na prethodnu točku mjerenja, 6 h) nisu bile očekivane te se najvjerojatnije radi o određenom stupnju analitičke pogreške, odnosno, može se pretpostaviti da ukupna konverzija galakturonana za 24 h hidrolizu iznosi najmanje jednako kao i nakon 6 h hidrolize. Pošto se određeni stupanj kvantifikacijske pogreške može odnositi i na vrijednost konverzije nakon 6 h hidrolize, može se pretpostaviti da je najveća konverzija galakturonana u OGaU u ovome uzorku iznosila približno 50-70 %. Razlika do 100 % odnosi se na prisutnost nehidroliziranih dijelova galakturonana, u obliku oligomera DP > 4, ili pak metil- ili acetil-estera oligomera (različitih DP), koji nisu mogli biti određeni uslijed nedostatka standarada. Dominantni oblici OGaU bili su GA1 i GA4, dok su ostali mjereni oblici bili relativno malo zastupljeni (najviše ~10 % relativnog udjela, za 10 min hidrolizu) te nakon 1 h reakcije se više gotovo i nisu mogli detektirati. Relativni udjel GA1 pokazivao je blagi trend rasta za produljeno trajanje hidrolize, dok se relativni udjel GA4 smanjivao. Pri uvjetima maksimalne konverzije galakturonana, omjer GA1 i GA4 iznosio je približno 60:40 - 70:30, u korist GA1. A obzirom da se prebiotička aktivnost GA1 ne očekuje, uspješnost hidrolize može se izraziti s obzirom na maksimalan prinos GA4. U tom kontekstu moguće je ostvariti najviše iskorištenje početnog udjela GalUA u SBP od približno 10 % (9,5 - 12,6 %, u obliku GA4), za hidrolizu pektina enzimskim koktelom Viscozyme u trajanju najmanje 6 h. S obzirom da nije mjerena specifična aktivnost enzima u odnosu na supstrat, te uz mogućnost da galakturonazna aktivnost Viscozyme-a iskazuje relativnu toleranciju na esterski vezane skupine na galakturonanu, ne može se isključiti mogućnost postojanja metil-/acetil- esterificiranih oligomera. S obzirom na nedostatak odgovarajućih standarada, nije moguće sa sigurnošću predvidjeti kromatografsko ponašanje istih, kao i niti općenito mogućnost nastanka PMP derivata. Iz analize OGaU i XOS moglo se opaziti da je elucija PMP-oligomera u odnosu na PMP-monomere drugačija te ovisi o DP. Budući da metilne i acetilne skupine relativno malo pridonose ukupnoj masi molekule, a u samoj derivatizaciji sudjeluje nereducirajući kraj molekule (esterifikacija je ograničena najčešće na *O*-2 i *O*-3 pozicije), postojanje istovremeno esterificiranih i neesterificiranih PMP-derivata čini se mogućim te postoji mogućnost koelucije metiliranih/acetiliranih oligomerima s neesterificiranima. U svakom slučaju, potrebne su dodatne analize sastava produkata hidrolize u budućim istraživanjima, kao i analize specifične aktivnosti enzimskog koktela Viscozyme s obzirom na deesterifikacijsku i galakturonaznu aktivnost. Mogućnost povećanja ukupne konverzije galakturonana, kao i

promjene profila OGaU enzimskom ili kemijskom deesterifikacijom koja prethodi hidrolizi ePG, također će se razmatrati u budućim istraživanjima.

Osim galakturonana, značajan udjel ugljikohidratne frakcije SBP odnosi se na ukupni arabinan te je isti važno spomenuti u kontekstu POS, s obzirom da se arabinooligosaharidi (AOS) također navode kao potencijalni prebiotici podrijetlom iz pektina. Arabinan se u SBP nalazi u vezanom (na RG-I regije pektina) i slobodnom obliku te je u ovome radu određeno da se najmanje približno 20 % arabinana nalazi u slobodnom obliku, iako se pretpostavlja da je stvarni udjel slobodnog arabinana u ovoj sirovini i veći. Pritom se pod „slobodnim“ smatra nevezanost za pektinske blok-kopolimere (RG-I) u klasičnom smislu kao bočnih lanaca, već najvjerojatnije putem ferulinske kiseline ili drugim interakcijama (pritom, ne nužno isključivo na pektinske molekule, već i druge polisaharide stanične stijenke). Izdvojena frakcija slobodnog arabinana iznosila je 4,6 % s.tv. SBP te se odonosila na spomenutih 20 % početnog udjela Ara u SBP. S obzirom da je ova frakcija bila topljiva u smjesi etanola i vode (4:1 v/v), pretpostavljena je relativno niska molekulska masa, tj. oligomerni karakter (ili polimeri nižeg DP), što je HPSEC analiza i potvrdila. Izdvojena frakcija može poslužiti kao supstrat za daljnju konverziju do arabinooligosaharida nižeg DP ili se pak može istražiti potencijalno prebiotičko djelovanje frakcije kao takve. S obzirom na značajnu zastupljenost razgranjenja na poziciji O-3 (Tablica 44) te značajan udjel terminalnih krajeva, u slučaju hidrolize ove frakcije može se očekivati relativno visoka zastupljenost monomerne arabinoze (najmanje 20-30 %). Pritom je potencijalno važno istražiti djelotvornost *endo*-arabinaze, samostalno ili u kombinaciji s arabinozidazom, kao i mogućnost nastanka te potencijalna funkcionalna svojstva razgranatih AOS.

Slika 72 prikazuje konverzije galakturonana (tamna linija) te profili OGaU (stupići u boji) za različito vrijeme hidrolize CBH pektina te različite primijenjene koncentracije enzima ePG. Ukupna konverzija galakturonana bila je relativno niska, uz blagu tendenciju rasta s produljenim vremenom hidrolize, kao i većom primijenjenom koncentracijom enzima, ali najviše do 22 % (24 h 100xE). Kao i u slučaju hidrolize SBP pektina, razlika do 100 % konverzije odnosi se na nehidrolizirane dijelove molekule, potencijalno zbog esterifikacije, kao i nedetektirane metil- i/ili acetil-esterificirane oligomere različitog DP.



Slika 72. Profil oligogalakturonida (OGaU) te stupanj konverzije pektina iz ljuske kakaovog zrna (CBH), izdvojenoga prema konvencionalnom postupku, primjenom *endo*-poligalakturonaze (ePG). GA1 - galakturonska kiselina, GA2 - digalakturonska kiselina, GA3 - trigalakturonska kiselina, GA4 - tetrakalakturonska kiselina.

Najveća promjena ukupne konverzije, s obzirom na vrijeme hidrolize, vidljiva je za koncentraciju enzima 100xE, dok se za 1xE i 10xE ukupna konverzija može smatrati približno konstantnom tijekom 24 h hidrolize. Promjena profila OGaU također se najviše očitovala za koncentraciju 100xE. Produljenjem hidrolize vidljiv je porast relativnog udjela GA1 do maksimalne vrijednosti nešto više od 50 %. Relativni udjel GA2 i GA3 istovremeno se smanjivao, dok je relativni udjel GA4 ostao gotovo nepromijenjen (20-25 % relativnog udjela). Za koncentraciju enzima 1xE promjena profila OGaU najviše je bila uočljiva kroz smanjenje relativnog udjela GA4, međutim, nakon 6 h hidrolize postignut je svojevrsni plato te je relativni udjel GA4 iznosio približno 30 %. Za koncentraciju 10xE, promjena profila OGaU očitovala se kroz relativni porast zastupljenosti GA1 i GA2 te smanjenje udjela GA3, dok je udjel GA4 bio relativno konstantan (25-30 %).

Promatrajući konverziju galakturonana u GA2+GA3+GA4, kao potencijalno prebiotičkih oligomera, može se vidjeti da se najviša konverzija galakturonana postiže nakon najmanje 6 h hidrolize u slučaju primijenjenih koncentracija enzima 1xE i 10xE, dok za 100xE koncentraciju enzima već nakon 10 min hidrolize. Za navedene parametre ukupna konverzija galakturonana u uzorku pektin iznosi približno 11-13 %, što se odnosi na tek 4,2-5,0 % početnog udjela GalUA u CBH. Dobiveno iskorištenje galakturonana CBH u OGaU ne može se smatrati značajnim te je potrebno optimirati hidrolizu pektinske frakcije CBH u OGaU. Kao i u slučaju pektina SBP,

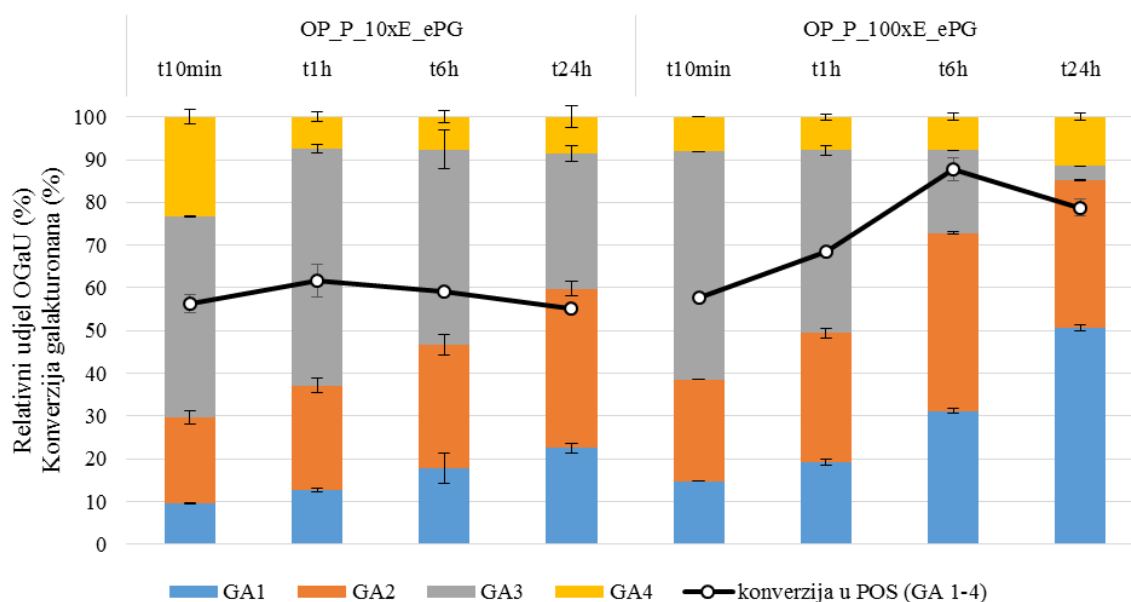


u tu svrhu u budućim istraživanjima istražiti će se mogućnosti prethodne enzimske ili kemijske deesterifikacije kako bi supstrat postao dostupniji za enzimsku aktivnost ePG-M2.

Slika 73 prikazuje konverzije galakturonana (tamna linija) te profili OGaU (stupići u boji) za različito vrijeme hidrolize OP pektina te različite primijenjene koncentracije enzima ePG. Kako je ranije navedeno, korištena pektinska frakcija izdvojena je postupkom ekstrakcije kelirajućim sredstvom (EDTA) pri optimalnim uvjetima (A4,6/90). Ostvarena ukupna konverzija galakturonana bila je relativno nepromijenjena (~55-60 %) za sva vremena hidrolize, u slučaju primijenjene koncentracije enzima 10xE, te je relativno visoko iskorištenje postignuto već nakon 10 min reakcije. Kao i za prethodne pektinske uzorke (SBP\_P i CBH\_P), razlika do 100 % ukupne konverzije galakturonana odnosi se na nehidrolizirane fragmente uslijed njihove esterificiranosti, a time i relativne nedostupnosti za korišteni enzim, kao i na metil-esterificirane oligomere različitog DP, koji nisu mogli biti detektirani zbog nedostatka standarda. S obzirom da je vidljiva promjena profila OGaU, može se zaključiti da se ista odnosi na daljnju hidrolizu prvotno nastalih hidrolitičkih produkata. Tako je s produljenjem trajanja hidrolize vidljiv porast relativnog udjela GA1 i GA2 za približno 10-15 % u odnosu na početne udjele (~10 % za GA1 i ~20 % za GA2, udjel GA3 kontinuirano smanjivao (s ~50 % relativnog udjela do ~30 %), dok je udjel GA4 bio najveći u početnom vremenu hidrolize (~25 % relativnog udjela) te je smanjen na približno 10 % relativnog udjela nakon 1 h hidrolize, nakon čega je ostao konstantan i u maksimalnom vremenu hidrolize. Ukupna konverzija galakturonana za primijenjenu koncentraciju enzima 100xE rasla je s početnih približno 60 % (10 min) do maksimalnih 80-90 %, što je postignuto već nakon 6 h hidrolize. Profil OGaU za 100xE koncentraciju enzima u početnom vremenu hidrolize bio je vrlo sličan dobivenome za uvjete 10 min 10xE, a daljnjim produljenjem hidrolize najznačajnije se očitovala promjena relativnog udjela GA1 i GA3 i to gotovo inverzna (s početnih ~15 % do ~50 % udjela u konačnom vremenu hidrolize). Relativni udjel GA2 tek je blago rastao (do najviše ~35 % relativnog udjela), dok je udjel GA4 ostao relativno nepromijenjen (~10 % relativnog udjela).

Uzimajući u obzir konverziju galakturonana u GA2+GA3+GA4 (s obzirom da se za GA1 ne očekuju prebiotički učinci), najviše iskorištenje odnosi se na hidrolize do najviše 6 h te iznosi 50-60 %, što predstavlja iskorištenje ukupnog galakturonana u sirovini od približno 26-32 %. Najviše iskorištenje u ovom kontekstu (31,7 % početnog udjela GalUA u OP) ostvareno je za 6 h 100xE hidrolizu, s dominantnim udjelom GA2 (60 % svih mjerenih OGaU), a ukoliko je poželjno proizvesti OGaU viših DP, preferira se hidroliza najdulje 1 h te smanjenje koncentracije enzima 10 puta (najviša konverzija galakturonana u GA3+GA4 (u uzorku pektina) iznosila je 28,1 %, postignuto za 1 h 10xE hidrolizu, s dominantnim udjelom GA3

(63,8 %)). Iskorištenje početnog udjela galakturonana OP od približno 1/3, u obliku OGaU, može se smatrati značajnim. Dobiveni rezultati nadilaze iskorištenje ukupne galakturonske kiseline otpadne biomase luka (21,3 %) u istraživanju Babbar i suradnika (2016a).



Slika 73. Profil oligogalakturonida (OGaU) te stupanj konverzije pektina iz ljuske crvenog luka (OP), izdvojenoga ekstrakcijom kelirajućim sredstvom pri optimalnim uvjetima, primjenom enzima *endo*-poligalakturonaze (ePG). GA1 - galakturonska kiselina, GA2 - digalakturonska kiselina, GA3 - trigalakturonska kiselina, GA4 - tetrakalakturonska kiselina.

#### 4.7.3 Prebiotička svojstva hidrolizata ksilana i pektina

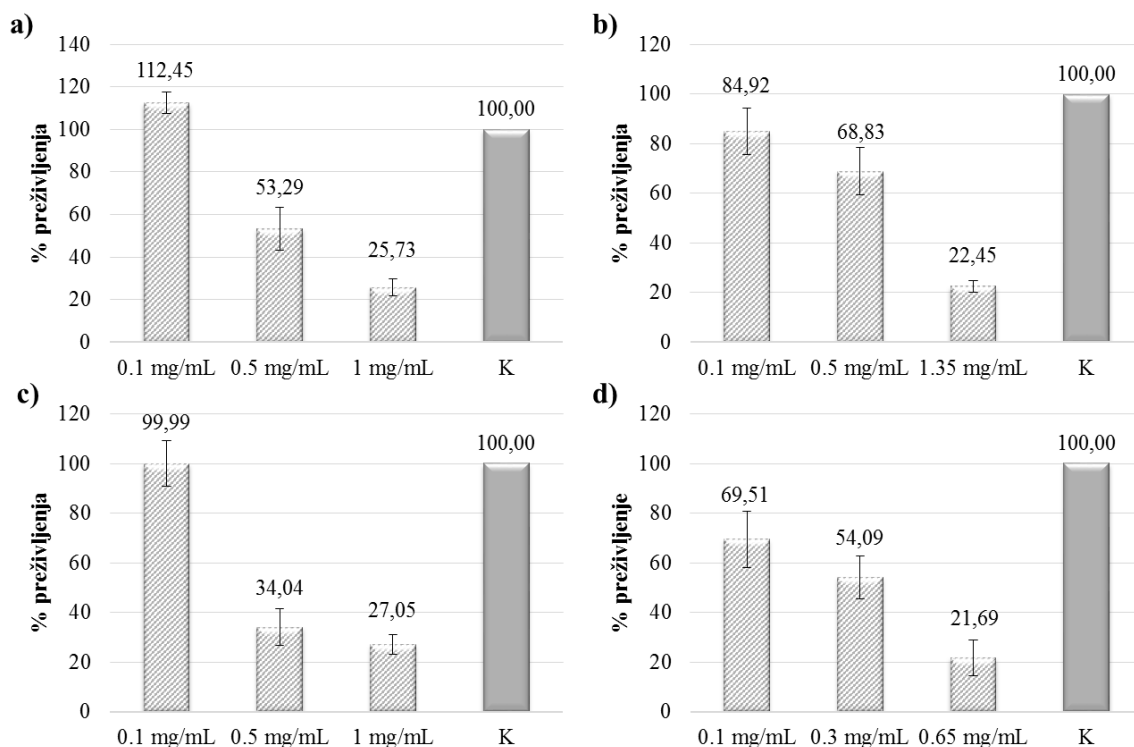
U svrhu određivanja prebiotičkog potencijala dobivenih hidrolizata ksilana iz WS i PP te hidrolizata pektina iz SBP, CBH i OP, korištena je čista kultura bakterije *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BLC1, a evaluacija je provedena praćenjem porasta bakterijskih kolonija na hranjivoj podlozi sa ili bez dodatka hidrolizata koji sadrže oligosaharide, uz očekivanu stimulaciju rasta, odnosno povećanje brojnosti bakterijskih kolonija.

Različiti sojevi bakterije *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* danas se učestalo koriste kao probiotici u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Bottaccini i sur., 2011; Milani i sur., 2013; Bunesova i sur., 2017). Izvorno se najčešće mogu naći u gastrointestinalnom traktu životinja (pilića, zečeva/kunića, svinja i pasa), međutim, neki sojevi su i humanog podrijetla (Bunesova i sur., 2017). Podvrsta *B. animalis* ssp. *lactis* opisana je prvi puta 1997. godine kao kisikotolerantni izolat iz jogurta te je tada bila smatrana zasebnom vrstom (*Bifidobacterium lactis*) roda *Bifidobacterium*. Daljnjim taksonomskim analizama, ova bakterija ipak je reklasificirana kao podvrsta vrste *B. animalis* (podvrsta *lactis*) (Bunesova i sur., 2017).

Kod bifidobakterija općenito, pa tako i *B. animalis* ssp. *lactis*, u prosjeku 8 % bakterijskog genoma kodira ukupni metabolizam ugljikohidrata, što potencijalno objašnjava mogućnost ovog bakterijskog roda za korištenje različitih izvora ugljika (McLaughlin i sur., 2015), osobito u odnosu na laktobacile (*Lactobacillus* sp.), također priznate probiotičke vrste. Sposobnost rasta neke probiotičke bakterije na neprobavljivim oligosaharidima (ksilooligosaharidima ili drugima) kao izvoru ugljika, ovisi o postojanju adekvatnog enzimskog sustava potrebnog za potpunu razgradnju oligosaharida, kao i o transportnim sustavima za monomere i/ili oligomere. Kako navode Petrova i Petrov (2017), kombinacijom proteomičkih i transkriptomičkih tehnika, otkriveno je da probiotički soj *B. animalis* ssp. *lactis* BB-12 za metabolizam XOS koristi ABC (*engl.* ATP-binding cassette) transportni sustav kojim veže XOS na površinu stanice te ga potom transportira u njezinu unutrašnjost. Oligosaharidi se zatim unutar stanice razgrađuju do ksiloze djelovanjem ksilanaza i ksilozidaza. Postojanje ovog mehanizma primijećeno je i kod soja *B. animalis* ssp. *lactis* B1-04 prilikom rasta na XOS. Transport i hidroliza XOS i arabinoksilooligosaharida (AXOS) povezani su s XOS-induciranim ABC transportnim sustavom i putativnima  $\beta$ -ksilozidazom (GH 43) i dvijema arabinofuranozidazama (GH 43), pri čemu je transportni sustav preferencijalan za DP 3-4. Komparativna istraživanja genoma različitih sojeva *B. animalis* ssp. *lactis* pokazala su da su isti u bliskoj svezi te izogenične prirode (Bunesova i sur., 2017). Probiotički soj *B. animalis* ssp. *lactis* BLC1 pokazao je podudarnost genoma s *B. animalis* ssp. *lactis* BB-12 99,84-99,9 % (Bottaccini i sur., 2011; Milani i sur., 2013) te se može zaključiti da je metabolizam XOS za navedene sojeve gotovo identičan, odnosno da soj *B. animalis* ssp. *lactis* BLC1 posjeduje odgovarajući transportni i enzimski sustav za rast na XOS kao izvoru ugljika. Stoga, ovaj bakterijski soj, uz važnosti kao komercijalnog probiotika, odgovarajući je odabir za evaluaciju prebiotičkih svojstava XOS. Podaci o metabolizmu oligogalakturonida i/ili drugih pektinskih oligosaharida probiotičkim sojem *B. animalis* ssp. *lactis* BLC1 nisu pronađeni u dostupnoj literaturi.

U svrhu određivanja prebiotičkih svojstava istih primjenom čiste kulture *B. animalis* ssp. *lactis* BLC1, izvore XOS činili su hidrolizati topljivog i netopljivog ksilana ljske oraha i mahune graška dobiveni nakon 24 h hidrolize *endo*-ksilanazom koncentracije 100xE (v. poglavlje 3.2.6.1). Ispitivane ukupne koncentracije hidrolitičkih produkata iznosile su 0,1, 0,5 i 1,0 odnosno 1,35 mg/mL (hidrolizat netopljivog ksilana). Hidrolitičkim produktima, u ovom kontekstu, smatraju se svi određeni produkti hidrolize pri navedenim hidrolitičkim uvjetima, odnosno monomerni, dimerni te oligomerni oblici do DP 6. Slika 74 prikazuje relativnu brojnost (% preživljenja) bakterijskih kolonija *B. animalis* ssp. *lactis* BLC1 poraslih uz dodatak definirane koncentracije hidrolitičkih produkata (u obliku hidrolizata) topljivih i netopljivih

ksilana ljske oraha i mahune graška, u odnosu na kontrolni uzgoj (bez dodatka hidrolizata ksilana).



Slika 74. Relativna brojnost (% preživljenja) bakterijskih kolonija *B. animalis* ssp. *lactis* BLC1 na hidrolizatima topljivog ksilana ljske oraha (a), netopljivog ksilana ljske oraha (b), topljivog ksilana mahune graška (c) i netopljivog ksilana mahune graška (d), pripremljenima u različitim koncentracijama ukupnih hidrolitičkih produkata, u odnosu na kontrolni uzorak (K).

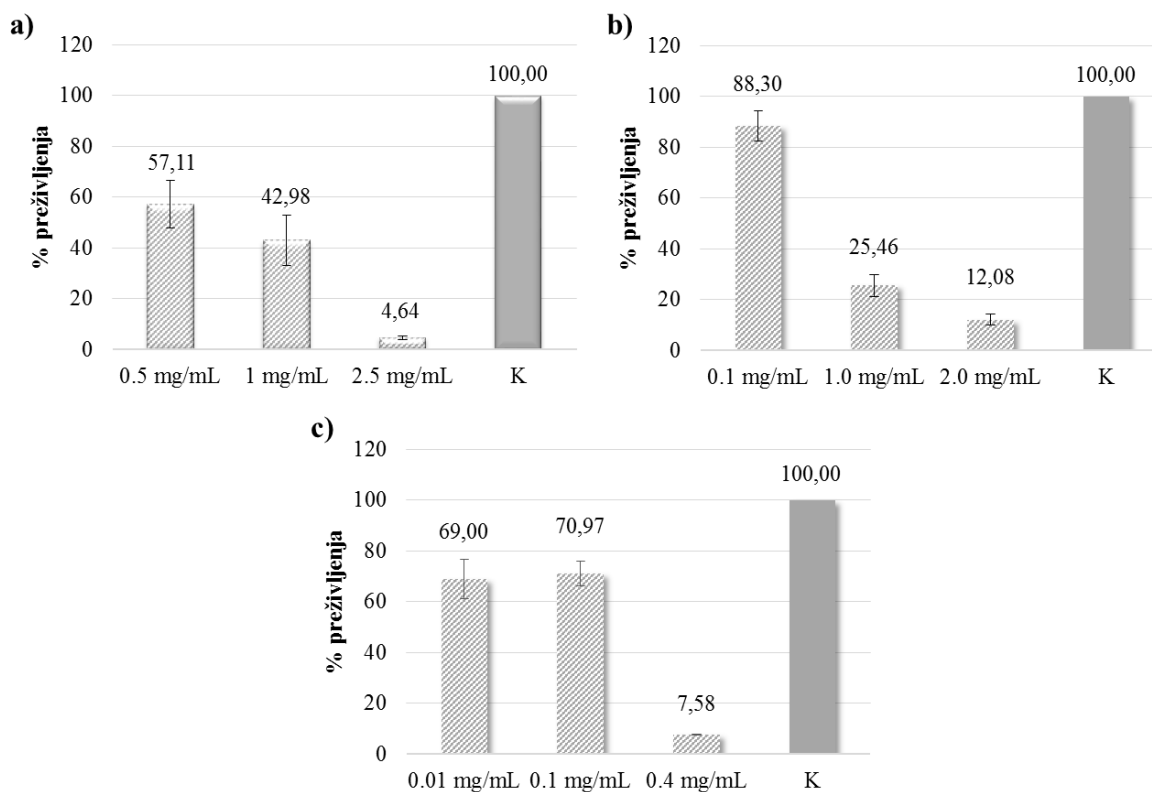
Iz rezultata je vidljivo da je porast bakterijskih kolonija bio manji u odnosu na kontrolni uzgoj u gotovo svim eksperimentima s dodatkom hidrolizata ksilana, izuzev najnižih koncentracija hidrolitičkih produkata topljivih ksilana (Slika 74 a i c). S obzirom da korištena bakterija može koristiti XOS kao izvor ugljika, kako je prethodno objašnjeno, očekivao se rast, uz dodatak hidrolizata ksilana, najmanje kao u kontrolnom uzgoju. Prema ovdje prikazanim rezultatima, vidljivo je potencijalno inhibirajuće djelovanje neke od komponenata hidrolizata, naročito pri višim koncentracijama ukupnih hidrolitičkih produkata, budući da je relativni porast bakterijskih kolonija uz dodatak hidrolizata bio manji nego kontrolni uzgoj. Primjenom nižih koncentracija hidrolizata paralelno je razrijeđena i komponenta koja djeluje inhibicijski te je tada bio primijećen porast kolonija blizak kontrolnom uzgoju. Dobiveno povećanje relativne brojnosti od 12 % za uzgoj uz dodatak hidrolizata topljivog ksilana WS u koncentraciji 0,1 mg/mL (Slika 74 a), može se pripisati analitičkoj pogrešci budući da isto nije primijećeno za druge uzorke hidrolizata ksilana (s obzirom na vrlo sličan profil XOS u svim uzorcima

hidrolizata, učinak stimulacije rasta bio bi očekivan i za druge uzorke hidrolizata). Vidljiva inhibicija rasta bakterije prilikom uzgoja s dodatkom hidrolizata potencijalno se odnosi na inhibicijsko djelovanje samog supstrata, iako, u okviru ovoga rada, isto se nije moglo potvrditi. Ova pretpostavka donesena je na temelju relativno visoke čistoće ksilanskih frakcija (frakcije su pročišćene dijalizom te su visokog udjela ksiloze, Slika 52 i Slika 53) korištenih u pripremi hidrolizata, a sama hidroliza provedena je pri blagim uvjetima te je stoga mogućnost postojanja degradativnih produkata iz postupka izdvajanja ksilana ili njegove hidroliza minimalna.

S druge strane, u laboratorijskim uvjetima uzgoj bifidobakterija je zahtjevan i težak, prvenstveno zbog različitih potreba određenih sojeva za hranjivima u mediju te potrebnih anaerobnih uvjeta (Modesto, 2017). Stoga, iako se ovi rezultati (Slika 74) čine indikativnima za inhibicijski učinak neke od komponenata hidrolizata, mogući su i drugi eksperimentalni utjecaji koji do kraja nisu mogli biti razjašnjeni u kontekstu ovoga rada.

U svakom slučaju, ovi rezultati su vrlo zanimljivi te svjedoče o složenosti i zahtjevnosti ovakvih istraživanja, a time i upućuju na potrebu za istima u smislu definiranja eventualnih inhibicijskih učinaka, daljnjeg pročišćavanja hidrolizata, primjene drugih koncentracija hidrolitičkih produkata, kao i općenito pripreme hranjive podloge i ostvarenja pogodnih uvjeta rasta probiotičke bakterije. Dobiveni rezultati, u kombinaciji s prethodno objavljenim literaturnim podacima, čine vrijednu podlogu budućim istraživanjima prebiotičkih svojstava XOS za čistu kulturu *B. animalis* ssp. *lactis* BLC1.

U svrhu određivanja prebiotičkih svojstava pektinskih oligosaharida - oligogalakturonida korišteni su hidrolizati pektina pulpe šećerne repe, ljuske crvenog luka i ljuske kakaovog zrna, dobiveni nakon 24 h hidrolize *endo*-poligalakturonazom (za pektine CBH i OP), odnosno enzimskim koktelom Viscozyme (za pektin SBP), u koncentraciji 100xE (v. poglavlje 3.2.6.2), tj. za hidrolitičke produkte maksimalnih uvjeta enzimske hidrolize. Hidrolitičkim produktima, u ovom kontekstu, smatraju se svi određeni produkti hidrolize pri navedenim uvjetima, odnosno mono-, di-, tri- i tetragalakturonska kiselina. Slika 75 prikazuje relativnu brojnost bakterijskih kolonija *B. animalis* ssp. *lactis* BLC1 poraslih uz dodatak definirane koncentracije hidrolitičkih produkata (hidrolizata) pektina pulpe šećerne repe, ljuske crvenog luka i ljuske kakaovog zrna, u odnosu na kontrolni uzgoj (bez dodatka hidrolizata pektina).



Slika 75. Relativna brojnost (% preživljenja) bakterijskih kolonija *B. animalis* ssp. *lactis* BLC1 na hidrolizatima pektina pulpe šećerne repe (a), ljuske crvenog luka (b) i ljuske kakaovog zrna (c), pripremljenima u različitim koncentracijama ukupnih hidrolitičkih produkata, u odnosu na kontrolni uzorak (K).

Kao i kod hidrolizata ksilana, vidljivo je da je porast bakterijskih kolonija u svim eksperimentima s dodatkom hidrolizata pektina bio manji nego u kontrolnom uzgoju. što također ukazuje na potencijalno inhibirajuće djelovanje neke od komponenata prisutnih u pektinskim hidrolizatima, kako je prethodno objašnjeno. S obzirom na puno veću kompleksnost izvornog supstrata (pektina) te relativno niža ostvarena iskorištenja hidrolize u GA 1-4, velik dio hidrolizata ostao je neidentificiran, a time se povećava neizvjesnost u smislu postojanja inhibirajuće komponente ili više njih. Kao i u slučaju hidrolizata ksilana, potrebna su daljnja istraživanja u svrhu potvrde utjecaja hidrolizata pektina na prebiotički učinak monokulture *B. animalis* ssp. *lactis* BLC1.

Osim *B. animalis* ssp. *lactis* i druge bifidobakterije imaju sposobnost rasta na XOS kao izvoru ugljika, među kojima različiti sojevi *B. breve*, *B. adolescentis* i *B. bifidum* (Petrova i Petrov, 2017). S obzirom da se bifidobakterije puno intenzivnije istražuju u ove svrhe, podaci za laktobacile i dalje su limitirani te se navode samo 2 vrste (soja) koje mogu rasti na XOS: *L. brevis* NCDC 01 i *L. rossiae* DSM 15814<sup>T</sup> (Petrova i Petrov, 2017).

#### **4.7.4 Karakteristike funkcionalnih dozirnih oblika pripremljenih s pektinskim frakcijama iz pulpe šećerne repe i ljuske crvenog luka**

Pektinski izolati korišteni u formiranju funkcionalnih dozirnih oblika izdvojeni su iz pulpe šećerne repe, primjenom ekstrakcije razrijeđenom klorovodičnom kiselinom (HCl, pH 1,5, 90 °C, 2h) te ljuske crvenog luka, ekstrakcijom kelirajućim sredstvom (EDTA, 100 mM) pri optimalnim uvjetima (acetatni puffer pH 4,6, 90 °C, 2h, ponovljena ekstrakcija). Pektin pulpe šećerne repe korišten je za dobivanje jestivog filma obogaćenog ekstraktom ružmarina, metodom izlivanja, dok je pektin ljuske crvenog luka korišten kao nosač u inkapsulaciji ekstrakta ružmarina metodom ionskog geliranja.

Jestivi film može se definirati kao tanki zaštitni sloj materijala koji se može konzumirati, a koji osigurava barijeru prema plinovima i vodenoj pari (Galić, 2009). Za razliku od tradicionalnih pakirnih materijala, prednosti jestivih filmova su njihova sigurnost konzumacije, niski troškovi, smanjena uporaba otpadnih ambalažnih materijala, što doprinosi zaštiti okoliša, uz poboljšanje senzorskih, mehaničkih i nutritivnih svojstava hrane te roka trajnosti, kao i pružanje odgovarajuće zaštite pojedinačnim manjim porcijama hrane (Galić, 2009).

Proizvodnja jestivih filmova uključuje primjenu najmanje jedne komponente koja može formirati neprekidni kohezivni matriks, što je karakteristika polimernih materijala, najčešće hidrokoloida (polisaharidi i proteini), lipida (voskovi i masne kiseline) ili njihovih kombinacija, tzv. kompozita (Guilbert i sur., 1996). Od ostalih materijala, u izradi jestivih filmova koriste se plastifikatori, aditivi (prehrambene kakvoće) te funkcionalni aditivi (antioksidansi, antimikrobne tvari, nutrijenti, nutraceutici, arome, boje) (Galić, 2009; Salgado i sur., 2015). U novije vrijeme sve intenzivnije se istražuje upravo primjena različitih funkcionalnih dodataka, sukladno tendencijama obogaćivanja prehrambenih proizvoda sastojcima koji imaju potencijal poboljšati zdravlje konzumenta. U tu svrhu se za obogaćivanje filmova najviše koriste različiti polifenolni ekstrakti, zbog izraženih antioksidacijskih i/ili antimikrobnih svojstva, što također doprinosi očuvanju samih filmova, tj. komponenata hrane koje film okružuje (primjerice od enzimske oksidacije, oksidacije kisikom, mikrobiološke kontaminacije) (Salgado i sur., 2015; Karača i sur., 2019).

Inkapsulacija je tehnika “pakiranja” krutina i kapljevine (tekućina i plinova) u zatvorene kapsule vrlo malih dimenzija, koje mogu otpustiti svoj sadržaj kontroliranom brzinom u određenim uvjetima (Desai i Park, 2005). Glavna svrha inkapsulacije je zaštita inkapsuliranog sadržaja (tvari) od negativnih okolišnih utjecaja, a u prehrambene svrhe se, osim navedenog, inkapsulacija koristi i za (i) smanjenje evaporacije ili prijenosa inkapsuliranog sadržaja u okolinu, (ii) promjene fizikalnih karakteristika izvornog materijala te lakše upravljanje istim,

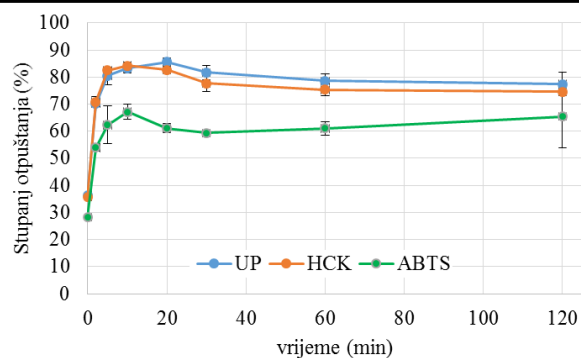
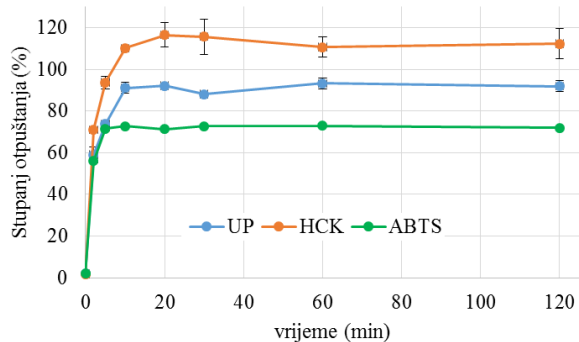
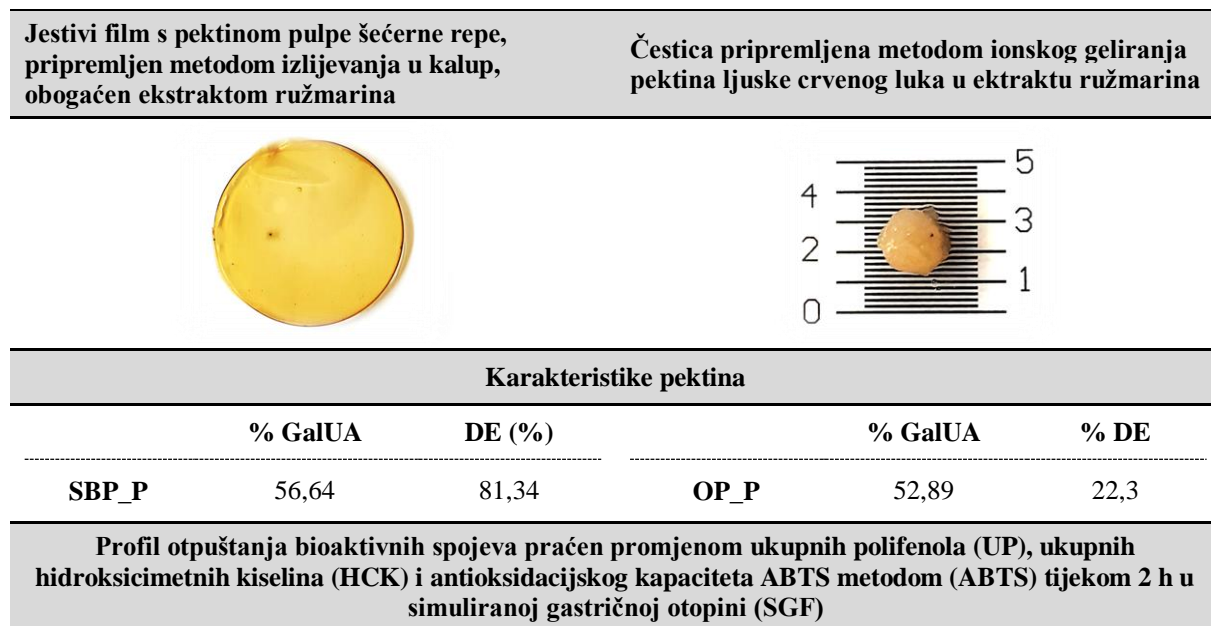
(iii) postizanje specifičnog otpuštanja inkapsuliranog sadržaja tijekom duljeg vremena ili s vremenskim odmakom, (iv) maskiranje neželjenih okusa ili arome inkapsuliranog sadržaja, (v) razrjeđivanje istoga kada je poželjna dostupnost u niskoj koncentraciji, uz homogenu distribuciju te (vi) razdvajanje komponenata smjese koje bi međusobno lako reagirale (Desai i Park, 2005). Inkapsulacijom, ovisno o parametrima pripreme, mogu se proizvesti čestice raspona veličine od submikronskih do milimetarskih dimenzija te različitih morfoloških karakteristika. Inkapsulacija se može postići primjenom različitih tehnika, kao što su sušenje raspršivanjem, hlađenje raspršivanjem, ekstruzija, koacervacija, liofilizacija, kokristalizacija, inkluzijska kompleksacija, pomoću liposoma, emulzija i sl. (Fang i Bhandari, 2010), a kao nosači koriste se različiti hidrogel-biopolimeri, najčešće polisaharidi i proteini. Metoda ionskog geliranja jedna je od najčešće korištenih inkapsulacijskih tehnika te uključuje ekstruziju (istiskivanje) otopine nosača (polimera), u kojoj se aktivni spoj nalazi otopljen ili dispergiran, kroz uzak otvor, u sredstvo za raspršivanje faza (gelirajući medij) u kojem formirane kapljice otopine nosača i aktivnog sastojka prelaze u sferične čestice gela (Poncelet, 2006).

Zbog osjetljivosti polifenolnih spojeva na uvjete proizvodnje i čuvanja različitih funkcionalnih proizvoda koji ih sadrže, kao i uvjete u probavnom sustavu nakon konzumacije, inkapsulacija se danas intenzivno istražuje kao mehanizam za očuvanje funkcionalnosti, odnosno postizanje relativno visokih potrebnih koncentracija bioaktivnih spojeva *in vivo* (Fang i Bhandari, 2010). Pektin je prirodni polimer, siguran za konzumaciju, koji lako formira gel-strukturu različitim mehanizmima (intramolekulskim neionskim i ionskim interakcijama), pri definiranim uvjetima, te je pogodan za korištenje kao nosač ili komponenta kompozita nosača dozirnih oblika bioaktivnih spojeva kao što su jestivi filmovi i inkapsulati.

Tablica 47 prikazuje karakteristike dobivenih dozirnih oblika jestivog filma i čestica pripremljenih u ekstraktu ružmarina. Jestivi film izrađen s visukoesterificiranim pektinom pulpe šećerne repe pokazao je zadovoljavajuća mehanička, teksturalna i senzorska svojstva (podaci nisu prikazani). Profil otpuštanja bioaktivnih spojeva tijekom 2 h inkubacije u simuliranoj gastričnoj otopini (SGF) pri 37 °C, evaluiran praćenjem ukupnih polifenola, ukupnih hidroksicimetnih kiselina i antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom, pokazao je relativno slabo zadržavanje bioaktivnih sastojaka u pektinskom matriksu, budući da je nakon 10 min postignuto potpuno otpuštanje bioaktivnih komponenata iz obogaćenog jestivog film u tekući medij SGF-a. Ovi rezultati upućuju na postojanje slabih interakcija bioaktivnih molekula i molekula polisaharida.



Tablica 47. Primjena frakcija pektina pulpe šećerne repe i ljuske crvenog luka te ekstrakta ružmarina u formiranju funkcionalnih dozirnih oblika - obogaćenog jestivog filma te čestica inkapsuliranog ekstrakta.



Čestice pripremljene metodom ionskog geliranja, uz niskoesterificirani pektin ljuske crvenog luka kao nosač, bile su pravilnog sferičnog oblika i mekane teksture, a profil otpuštanja bioaktivnih spojeva pokazao je slabo zadržavanje istih u matriksu nosača budući da je već nakon 5 min primijećeno gotovo potpuno otpuštanje u tekući medij SGF-a. Kao i za jestivi film, ovi rezultati upućuju na postojanje slabih interakcija bioaktivnih komponenata i polisaharida, kao i na veliku poroznost trodimenzionalne mreže nosača.

Ovdje navedeni rezultati pokazuju mogućnost i potencijal primjene frakcija pektina iz različitih sekundarnih biljnih sirovina u pripremi funkcionalnih dozirnih oblika te ukazuju na postojanje mnoštva parametara koji mogu utjecati na konačan ishod. U tom kontekstu, važno je obratiti pozornost na karakteristike samih pektinskih izolata, koji ovise o nativnom obliku u staničnoj stijenci pojedine sirovine te načinu izdvajanja, budući da je za pripremu filma prikladniji bio viskoesterificirani pektin, kakav je izdvojen iz pulpe šećerne repe, dok za pripremu čestica

niskoesterificirani pektin, kakav je izdvojen iz ljuske crvenog luka. Naime, čestice pripremljene pektinom pulpe šećerne repe te jestivi film pripremljen pektinom ljuske crvenog luka nisu pokazivali odgovarajuća fizikalno-mehanička svojstva navedenih dozirnih oblika te se dalje nisu razmatrali u kontekstu određivanja bioaktivnih parametara, a, sukladno tome, rezultati nisu prikazani. Različitim metodama se karakteristike ovih pektina, poput stupnja esterifikacije ili udjela galakturonske kiseline, mogu izmijeniti kako bi se ostvarile strukture željenih (pogodnijih) svojstava za odgovarajuće načine pripreme i konačna svojstva dozirnih oblika. Također, pektin se može kombinirati s drugim biopolimerima u različitim omjerima u svrhu kreiranja kompozirnih nosača poboljšanih svojstva.

Zbog opsežnosti ovakvih istraživanja, u kontekstu ovog rada nije bilo mogućnosti nastaviti započete eksperimente, međutim, dobiveni rezultati i spoznaje kroz ukupan rad na ovoj disertaciji poslužit će kao izvrsna podloga u budućim istraživanjima.

***Zaključci***

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedenog istraživanja izvedeni su sljedeći zaključci:

1. U sastavu svih sekundarnih biljnih sirovina dominira ugljikohidratna frakcija, čiji udjel i sastav ovise o vrsti sirovine. SBP je sadržavala najviše ukupnih strukturnih polisaharida (66,6 % s.tv.) i najveći udjel topljivih polisaharida (25,3 % s.tv.); WS je sadržavala 58,0 % s.tv. ukupnih polisaharida, gotovo u cijelosti netopljivih; udjel ukupnih polisaharida u CBH iznosio je 44,0 %, sa značajnim udjelom topljivih polisaharida (14,8 % s.tv.); ukupni polisaharidi u OP bili su zastupljeni s 55,6 % s.tv., pretežno u netopljivom obliku; PP je sadržavala najmanji udjel ukupnih polisaharida (42,3 % s.tv.), gotovo u potpunosti netopljivih. Osim stukturnih polisaharida, WS i CBH sadržavale su i značajan udjel lignina (35,5 % s.tv. u WS i 26,3 % s.tv. u CBH).
2. Analizirane sekundarne biljne sirovine, izuzev PP, pokazale su se kao bogati izvori polifenola, a CBH i metilksantina. U SBP određen je značajan udjel ferulinske kiseline (0,68 % s.tv.), u WS elaginske kiseline (0,06 % s.tv.), u CBH galne kiseline (0,04 % s.tv.), u OP kvercetina i njegovih derivata (0,87 % s.tv.) te protokatehinske kiseline (0,38 % s.tv.). U CBH određeni su udjeli metilksantina teobromina (0,7 % s.tv.) i kafeina (0,08 % s.tv.).

Za ekstrakciju navedenih spojeva do iscrpljenja potrebno je provesti višestruke ekstrakcije otopinama visokog udjela etanola te ekstrakciju lužnatim otapalom u slučaju vezanih fenolnih kiselina.

3. U svrhu određivanja monomernog sastava polisaharida, razvijena je metoda tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC-PDA) s prethodnom derivatizacijom 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on reagensom (PMP) te se ista pokazala prioritonom u odnosu na druge korištene metode (HPTLC, GC-FID + MHDP). Metoda je prikladna za kvalitativnu i kvantitativnu istovremenu analizu neutralnih šećera (glukoze, manoze, galaktoze, arabinoze, ksiloze, ramnoze, fukoze) i uronskih kiselina (glukuronske i galakturonske kiseline) uzoraka koji ne sadrže ribozu. Metoda je pokazala zadovoljavajuće značajke prema svim validiranim parametrima.
4. Prema rezultatima analize monomernog sastava primjenom razvijene PMP-HPLC-PDA metode, sekundarne biljne sirovine podijeljene su na sirovine bogate pektinom (SBP, CBH, OP), sukladno visokim udjelima ukupne galakturonske kiseline - galakturonana (SBP - 15,3 % s.tv., CBH - 8,0 % s.tv., OP - 19,7 % s.tv.) i ukupne arabinoze - arabinana

(SBP - 17,8 % s.tv.) te sirovine bogate ksilanom (WS i PP), sukladno visokim udjelima ukupne ksiloze - ksilana (WS - 22,0 % s.tv., PP - 12,9 % s.tv.).

5. S obzirom na relativno niska iskorištenja galakturonana, arabinana i ksilana u pektinskim (P) i hemiceluloznim (H) frakcijama, ostvarena inicijalnim postupkom fracioniranja polisaharida (SBP - 42,0 % galakturonana i 2,4 % arabinana u P frakciji, uz stvarni gubitak istih od 47,8 % i 95,2 %; CBH - 38,9 % galakturonana u P frakciji, uz stvarni gubitak od 48,1 %; OP - 4,0 %, galakturonana u P frakciji, uz stvarni gubitak od 51,8 %; WS - 43,5 % ksilana u ukupnoj H frakciji, uz stvarni gubitak od 51,2 % i PP - 57,4 % u ukupnoj H frakciji, uz stvarni gubitak od 28,2 %), provedena je optimizacija ekstrakcije pektina (galakturonana (iz SBP, CBH i OP) i arabinana (iz SBP)) te hemiceluloze (ksilana iz WS i PP).
6. Ekstraktibilnost ksilana (iz WS i PP) u lužnatom otapalu značajno je poboljšana primjenom delignifikacije te je moguće postići iskorištenje ukupne ksiloze u sirovini, u ukupnoj hemiceluloznoj frakciji, u rasponu 69,0-97,6 %, za razliku od 24,1-30,5 % koliko se postiže ako se alkalna ekstrakcija provodi bez prethodne delignifikacije. Stvarni gubici ksilana smanjeni su dodatkom reducensa (natrijeva borohidrida) u alkalnoj ekstrakciji.
7. Optimalni uvjeti izdvajanja ksilana iz ljuske oraha (WS) i mahune graška (PP) su:
  - a) WS - delignifikacija tijekom 2 h uz primjenu ukupno 1,2 g/g<sub>uzorka</sub> natrijeva klorita i 1,2 mL/g<sub>uzorka</sub> octene kiseline te alkalna ekstrakcija 4 M otopinom kalijeva hidroksida, uz dodatak 20 mM natrijeva borohidrida, tijekom 4 h.  
Postignuto iskorištenje iznosilo je 80,2 % početnog udjela ksilana u WS (maseni omjer netopljivog i topljivog ksilana iznosio je 40:60).
  - b) PP - delignifikacija tijekom 1 h uz primjenu ukupno 0,6 g/g<sub>uzorka</sub> natrijeva klorita i 0,6 mL/g<sub>uzorka</sub> octene kiseline te alkalna ekstrakcija 2 M otopinom kalijeva hidroksida, uz dodatak 20 mM natrijeva borohidrida, tijekom 4 h.  
Postignuto iskorištenje ksilana iznosilo je najviše 93,9 % početnog udjela ksilana u PP (omjer netopljivog i topljivog ksilana iznosio je 89:11).Ksilan iz WS i PP izdvojen je u dvije podfrakcije - topljivoj i netopljivoj, koje dominantno čini (arabino)glukuronoksilan.
8. Optimizacija izdvajanja pektina iz SBP, CBH i OP primjenom ultrazvuka visokog intenziteta nije rezultirala povećanjem iskorištenja galakturonana i arabinana u P frakciji, u odnosu na inicijalni postupak izdvajanja.

Primjena kelirajućeg sredstva, amonijeva oksalata, u optimizaciji ekstrakcije pektina iz SBP, rezultirala je smanjenim iskorištenjem galakturonana (23,3 % ukupnog galakturonana u SBP), u odnosu na inicijalni postupak izdvajanja.

Primjena kelirajućeg sredstva, etilendiaminotetraoctene kiseline (EDTA), značajno je povećala iskorištenje galakturonana u P frakciji ljuske crvenog luka.

9. Optimizacija izdvajanja arabinana iz SBP pokazala je prisutnost istoga u slobodnom (nevezanom) obliku te vezanog na ramnogalakturonan I blok-kopolimerne regije pektina, kao i različitu povezanost istoga putem diferulinskih mostova s drugim strukturama u staničnoj stijenci. Kao dio slobodne podfrakcije, izdvojen je oligomerni (ili niži polimerni) arabinan u udjelu 5,6 % s.tv. SBP (21,5 % ukupnog arabinana u SBP).

10. Optimalni uvjeti izdvajanja pektina iz pulpe šećerne repe (SBP), ljuske kakaovog zrna (CBH) i ljuske crvenog luka (OP) su:

a) SBP - ekstrakcija vrućom razrijeđenom klorovodičnom kiselinom (pH 1,5, 1:25 w/v) pri 90 °C i tijekom 2 h.

Postignuto iskorištenje galakturonana iznosilo je 42 % početnog udjela galakturonana u SBP.

Ekstrakciju u svrhu najvišeg iskorištenja arabinana potrebno je provoditi u lužnatim medijima, neovisno o postizanju visokog iskorištenja galakturonana budući da potrebna niska pH vrijednost otapala (pH < 2) u tu svrhu gotovo potpuno hidrolizira arabinan.

b) CBH - ekstrakcija vrućom razrijeđenom klorovodičnom kiselinom (pH 1,5, 1:25 w/v) pri 90 °C tijekom 2 h.

Postignuto iskorištenje galakturonana iznosilo je 38,9 % početnog udjela galakturonana u CBH.

c) OP - ekstrakcija u 50 mM acetatnom puferu pH 4,6, uz dodatak 100 mM EDTA, pri 90 °C i tijekom 2 h. (ekstrakcija kako je navedeno provodi se ukupno 2 puta).

Postignuto iskorištenje galakturonana iznosilo je 51,7 % početnog udjela galakturonana u OP.

11. Enzimaska hidroliza topljivih i netopljivih ksilana WS i PP komercijalnim enzimom *endo*- $\beta$ -(1,4)-ksilanazom pokazala je visoku razgradivost supstrata te sličnu dinamiku hidrolize i profil XOS. Nešto niže vrijednosti konverzije topljivih ksilana u skladu su sa smanjenom dostupnošću supstrata uslijed povećane supstitucije i prisutnosti vezanog lignina. Najviše vrijednosti konverzije postignute su primijenjenom koncentracijom

enzima od 13 U/mg ukupnog ksilana u uzorku, tijekom 24 h (97,4 % i 71,4 % za netopljivi i topljivi ksilan WS te 84,4 % i 75,3 % za netopljivi i topljivi ksilan PP), rezultirajući ksilozom i ksilobiozom u omjeru 30:70, što se može smatrati konačnim produktima hidrolize navedenim enzimom, a navedeni parametri uvjetima maksimalne hidrolize.

12. S obzirom na potencijalne prebiotičke učinke, uspješnost hidrolize promatrana je kroz postizanje najviših prinosa ksilobioze (X2), ksilotrioze (X3) i ksilotetraoze (X4). Uzimajući u obzir iskoristivost ukupnog ksilana iz WS, primjenom uvjeta maksimalne hidrolize (13 U/mg ukupnog ksilana u uzorku, 24 h) ostvaruje se najviši prinos X2, koji iznosi 52,6 % početnog udjela ksilana u WS. Za najviši prinos X3, uvjeti hidrolize prodrzumijevaju primjenu 100 puta niže koncentracije enzima (0,13 U/mg ukupnog ksilana u uzorku), također tijekom 24 h, a prinos X3 iznosio je 20,4 % početnog udjela ksilana u WS (istovremeno se u hidrolizatu nalazi i jednak udjel X2). Za najvišu iskoristivost netopljivog ksilana iz PP u X2, X3 i X4 vrijede jednaki hidrolitički uvjeti kao i kod WS, a pritom najviši prinos X2 iznosio je 50,7 % početnog udjela ksilana u PP, a najviši prinos X3 15,1 % početnog udjela ksilana u PP (uz ekvivalentan udjel X2 u hidrolizatu). Značajnije iskorištenje ksilana u obliku X4 veže se uz kratko vrijeme hidrolize te općenito nizak stupanj konverzije ksilana i stoga se jedino X2 i X3 mogu smatrati relevantnim XOS produktima hidrolize *endo*-ksilanazom.
13. Hidroliza pektina (homogalakturonana) SBP, CBH i OP pomoću komercijalnog enzima *endo*-poligalakturonaze M2 značajno je ovisila o zastupljenosti esterski vezanih metilnih i acetilnih skupina te se korišteni enzim može smatrati nisko tolerantnim na prisutnost istih. U slučaju CBH, najviši prinos oligomera galakturonske kiseline (di-, tri- i tetra-) iznosio je tek 4,2-5,0 % početnog udjela galakturonana (ostvareno nakon najmanje 6 h hidrolize koncentracijama enzima 0,87 i 8,7 U/mg ukupnog galakturonana u uzorku ili 10 min hidrolize koncentracijom enzima 87 U/mg ukupnog galakturonana u uzorku). Za OP, prinos oligomera galakturonske kiseline najviše je iznosio 31,8 % početnog udjela galakturonana u OP (za hidrolizu koncentracijom enzima 87 U/mg ukupnog galakturonana u uzorku, tijekom 24 h), od čega se 60 % odnosilo na digalakturonsku kiselinu. Najviši prinos trigalakturonske kiseline ostvaren je hidrolizom koncentracijom enzima 8,7 U/mg ukupnog galakturonana u uzorku, tijekom najviše 1 h, te je iznosio 17,9 % početnog udjela galaturonana u OP (ukupno iskorištenje galakturonana u oligomere (di-, tri-, tetramer) iznosilo je 28,1 % početnog udjela galaturonana u OP). Iskoristivost supstrata u smislu nastajanja značajnog udjela

tetraglakturonske kiseline nije bilo moguće postići. Pektin SBP nije bio razgradiv primijenjenom *endo*-poligalakturonazom.

14. Primjenom enzimskog koktela Viscozyme značajno je povećana konverzija pektina SBP u oligogalakturonide (približno 50-75 % galakturonana u pektinskoj frakciji, odnosno 21-37,5 % galakturonana u sirovini), primarno galakturonsku kiselinu i tetragalakturonsku kiselinu. Pri najvišim postignutim konverzijama galakturonana, udjel tetragalakturonske kiseline iznosio je 30-40 % relativnog udjela oligogalakturonida, odnosno prinos istoga iznosio je 9,5-12,6 % početnog udjela galakturonana u SBP.
15. Odabir najpovoljnijih uvjeta parcijalne hidrolize ovisi ne samo o najvišoj postignutoj konverziji galakturonana ili ksilana, već i o potvrđenim prebiotičkim svojstvima pojedinih oligomera te mogućim sinergističkim učincima, a također i o ekonomičnosti postupka.
16. Istraživane sekundarne biljne sirovine pokazale su se kao vrijedni izvori potencijalno funkcionalnih sastojaka - novih prebiotičkih kandidata, ksilooligosaharida i oligogalakturonida, te polifenola, u čijem postupku izdvajanja zaostaju dodatne iskoristive komponente - otopljeni lignin te pročišćena celuloza, što otvara nove mogućnosti potpune biorafinerije ovih materijala.



*Literatura*

## 6. LITERATURA

- Aachary, A. A. i Prapulla, S. G. (2009). Value addition to corncob: Production and characterization of xylo-oligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154. *Bioresource Technology* 100, 991–995.
- Aachary, A. A. i Prapulla, S. G. (2011) Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: Microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10, 1-16.
- Adetunji, L. R., Adekunle, A., Orsat, V., i Raghavan, V. (2017) Advances in the pectin production process using novel extraction techniques: A review. *Food Hydrocolloids* 62, 239-250.
- Afoakwa, E. O. (2010) *Chocolate Science and Technology*. Wiley-Blackwell, New Jersey, str. 4.
- Ahlgren, P. A. i Goring, D. A., I. (1971) Removal of wood components during chlorite delignification of black spruce. *Canadian Journal of Chemistry* 49, 1272-1275.
- Ahmed, A. E. R. i Labavitch, M. (1977) A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *Journal of Food Biochemistry* 1, 361-365.
- Akpinar, O., Erdogan, K., Bakir, U. i Yilmaz, L. (2010) Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. *LWT - Food Science and Technology* 43, 119-125.
- Akpinar, O., Erdogan, K. i Bostanci, S. (2009) Enzymatic production of xylooligosaccharide from selected agricultural wastes. *Food and Bioprocess Processing* 87, 145-151.
- Al-Tamimi, M. A. H. M., Palframan, R. J., Cooper, J. M., Gibson, G. R. i Rastall, R. A. (2006) *In vitro* fermentation of sugar beet arabinan and arabinooligosaccharides by the human gut microflora. *Journal of Applied Microbiology* 100, 407-414.
- Altun, T. i Pehlivan, E. (2012) Removal of Cr(VI) from aqueous solutions by modified walnut shells. *Food Chemistry* 132, 693-700.
- Alvarez, C., Gonzáles, A., Negro, M. J., Ballesteros, I., Oliva, J. M. i Sáez, F. (2017) Optimized use of hemicellulose within a biorefinery for processing high value-added xylooligosaccharides. *Industrial Crops and Products* 99, 41-48.
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., Arés, I. i Aránzazu Martínez, M. (2016) Prebiotics and probiotics: An assessment of their safety and health benefits. U: *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. Bioactive Foods in Health Promotion*, (Watson, R. R. i Preedy, V. R., ured.), Academic Press, London, str. 3-23.
- Anonymous 1 (2018) Nomenklatura roda *Beta* sp.  
<<http://www.plantnames.unimelb.edu.au/Sorting/Beta.html>>. Pristupljeno 14. prosinca 2018.

Anonymous 2 (2018) Nordic sugar.

<[https://www.nordicsugar.com/fileadmin/Nordic\\_Sugar/Brochures\\_factsheet\\_policies\\_news/Download\\_center/Fibrex\\_brochures/Klinisk\\_rapport\\_nov\\_2012\\_high\\_sida\\_foer\\_sida.pdf](https://www.nordicsugar.com/fileadmin/Nordic_Sugar/Brochures_factsheet_policies_news/Download_center/Fibrex_brochures/Klinisk_rapport_nov_2012_high_sida_foer_sida.pdf)>. Pristupljeno 14. prosinca 2018.

Anonymous 3 (2018) Sklereide-kamene stanice.

<<https://mikrosvijet.wordpress.com/2011/09/09/sklereide-kamene-stanice/>>. Pristupljeno 15. studenoga 2018.

Anonymous 4 (2018) Definition and classification of commodities: Pulses and derived

products. <<http://www.fao.org/es/faodef/fdef04e.htm>>. Pristupljeno 25. studenoga 2018.

Anonymous 5 (2018) Žetva graška.

<[http://www.bilje.hr/POLJOPRIVREDA/AgBase\\_2/HTM/grasak.htm](http://www.bilje.hr/POLJOPRIVREDA/AgBase_2/HTM/grasak.htm). Pristupljeno 25. studenoga 2018>. Pristupljeno 17. prosinca 2018.

Anumula, K., R. i Taylor, P. B. (1992) A comprehensive procedure for preparation of partially methylated alditol acetates from glycoprotein carbohydrates. *Analytical Biochemistry* 203, 101-108.

Arancon, R. A. D., Lin C. S. K., Chan, K., M., Kwan, T. H. i Luque, R. (2018) Advances on waste valorization: New horizons for a more sustainable society. *Energy Science & Engineering* 1, 53-71.

Ayrilmis, N., Kaymakci, A. i Ozdemir, F. (2013) Physical, mechanical, and thermal properties of polypropylene composites filled with walnut shell flour. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 19, 908-914.

Ayyappan, P., Abirami, A., Anbu vahini, N. A., Kumaran, P. S. T., Naresh, M., Malathi, D. i Antony, U. (2016) Physicochemical properties of cookies enriched with xylooligosaccharides. *Food Science and Technology International* 22, 420-428.

Azizah, A. H., Ruslawati, N. M. i Swee, T. (1999), Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. *Food Chemistry* 64, 199–202.

Babbar, N., Baldassarre, S., Maesen, M., Prandi, B., Dejonghe, W., Sforza, S., i Elst, K. (2016a) Enzymatic production of pectic oligosaccharides from onion skins. *Carbohydrate Polymers* 146, 245-252.

Babbar, N., Dejonghe, W., Gatti, M., Sforza, S. i Elst, K. (2016b) Pectic oligosaccharides from agricultural by-products: production, characterization and health benefits. *Critical Reviews in Biotechnology* 36, 594-606.

Babbar, N., Dejonghe, W., Sforza, S. i Elst, K. (2017) Enzymatic pectic oligosaccharides (POS) production from sugar beet pulp using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology* 54, 3707-3715.

Babbar, N., Oberoi, H. S. i Sandhu, S. K. (2015) Therapeutic and nutraceutical potential of bioactive compounds extracted from fruit residues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55, 319-337.

- Baiano, A. (2007) Potential use of bioactive compounds from waste in the pharmaceutical industry. U: *Utilisation of Bioactive Compounds from Agricultural and Food Waste*, (Vuong, Q. V., ured.), CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, str. 383-402.
- Baldassare, S., Babbar, N., Van Roy, S., Dejonghe, W., Maesen, M., Sforza, S. i Elst, K. (2018) Continuous production of pectic oligosaccharides from onion skins with an enzyme membrane reactor. *Food Chemistry* 30, 101-110.
- Barreteau, H., Delattre, C. i Michaud, P. (2006) Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. *Food Technology and Biotechnology* 44, 323-333.
- BCFN (2012). Food waste: causes, impacts and proposals. Parma, Barilla center for food and nutrition. <https://www.barillacfn.com/m/publications/food-waste-causes-impact-proposals.pdf>. Pristupljeno 30. listopada 2018.
- Beausang, C., Hall, C. i Toma, L. (2017) Food waste and losses in primary production: Qualitative insights from horticulture. *Resources, Conservation & Recycling* 126, 177-185.
- Beldman, G., Schols, H. A., Pitson, S. M., Searle-van Leeuwen, S., M., J. F. i Voragen, A. G. J. (1997) Arabinans and arabinan degrading enzymes. U: *Advances in Macromolecular Carbohydrate Research*, Vol. 1, (Sturgeon, R. J., ured.), Jai Press Inc., Greenwich, CO, str. 1-64.
- Belghith Fendri, L., Chaari, F. Maaloul, M., Kallel, K., Abdelkafi, L., Ellouz Chaabouni, S. i Ghribi-Aydi, D. (2016b) Wheat bread enrichment by pea and broad bean pods fibers: Effect on dough rheology and bread quality. *LWT - Food Science and Technology* 73, 584-591.
- Belghith-Fendri, L., Chaari, F., Jeddou, K. B., Kallel, F., Bouaziz, F., Boisset Helbert, C., Abdelkefi-Mesrati, L., Ellouz-Chaabouni, S. i Ghribi-Aydi, D. (2018) Identification of polysaccharides extracted from pea pod byproducts and evaluation of their biological and functional properties. *International Journal of Biological Macromolecules* 116, 947-954.
- Belghith-Fendri, L., Chaari, F., Kallel, F., Zouari-Ellouzi, S., Ghorbel, R., Besbes, S., Ellouz-Chaabouni, S. i Ghribi-Aydi, D. (2016a) Pea and broad bean pods as a natural source of dietary fiber: The impact on texture and sensory properties of cake. *Journal of Food Science* 81, C2360-C2366.
- Belščak-Cvitanović, A., Bušić, A., Barišić, L., Vrsaljko, D., Karlović, S., Špoljarić, I. Vojvodić, A., Mršić, G. i Komes, D. (2016) Emulsion templated microencapsulation of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols and  $\beta$ -carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin. *Food Hydrocolloids* 57, 139-152.
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., Komes, D. (2018) Overview of polyphenols and their properties. U: *Polyphenols: Properties, Recovery and Applications*, (Galanakis, C., ured.), Woodhead Publishing, Sawston, str. 3-44.
- Belščak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Manojlović, V., Komes, D., Juranović Cindrić, I., Nedović, V., Bugarski, B. (2011) Encapsulation of polyphenolic antioxidants from

- medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Research International* 44, 1094-1101.
- BeMiller, J. N. (2018) Oligosaccharides. U: *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*, 3. izd., Woodhead Publishing/AACC International, Kidlington Oxford, UK, str. 49-74.
- Benítez, V., Mollá, E., Martín-Cabrejas, M. A., Aguilera, Y., López-Andréu, F. J., Cools, K., Terry, L. A. i Esteban, R. M. (2011) Characterization of industrial onion wastes (*Allium cepa* L.): Dietary fibre and bioactive compounds. *Plant Foods for Human Nutrition* 66, 48-57.
- Benítez, V., Mollá, E., Martín-Cabrejas, M. A., Aguilera, Y., López-Andréu, F. J. i Esteban, R. M. (2012) Onion products - source of healthy compounds. Nova Science Publishers, Inc.: New York.
- Benkeblia, N. (2013) Fructooligosaccharides and fructan analysis in plants and food crops. *Journal of Chromatography A* 1313, 54 - 61.
- Berlowska, J., Binczarski, M., Dziugan, P., Wilkowska, A., Kregiel, D. i Witonska, I. (2018) Sugar beet pulp as a source of valuable biotechnological products. U: *Handbook of Food Biorefineries*, Vol. 14. *Advances in Biotechnology for Food Engineering*, (Holban, M. i Mihai, A., ured.), Academic Press, Cambridge, MA, str. 359-392.
- Bigliardi, B. i Galati, F. (2013) Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology* 31, 118-129.
- Blakeney, A. B., Rarris, P. J., Henry, R. J. i Stone, B. A. (1983) A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research* 113, 291-299.
- Blumenkrantz, N. i Asboe-Hansen, G. (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54, 484-489.
- Bogue, J., Collins, O. i Troy, A. J. (2016) Market analysis and concept development of functional foods. U: *Developing New Functional Food and Nutraceutical Products*, (Debasis Bagchi, D. i Nair, S., ured.), Academic Press, London, str. 29-45.
- Bonnin, E., Garnier, C. i Ralet, M. C. (2014) Pectin-modifying enzymes and pectin-derived materials: Applications and impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 519-532.
- Bonvehí, J. S. i Benería, M. A. (1998) Composition of dietary fibre in cocoa husk. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 207, 105-109.
- Bottaccini, F., Dal Bello, F., Turrone, F., Milani, C., Duranti, S., Foron, E., Viappiani, A., Strati, F., Mora, D., van Sinderen, D. i Ventura, M. (2011) Complete genome sequence of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1. *Journal of Bacteriology* 193, 6387-6388.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. i Berset, C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 28, 25-30.
- Bräutigam, K., Jorissen, J. i Priefer, C. (2014). The extent of food waste generation across EU-27: Different calculation methods and the reliability of their results. *Waste Management Resources* 32, 683-694.

- Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56, 317–333.
- Broughton, N. W., Dalton, C. C., Jones, G. C. i Williams, E. L. (1995) Adding value to sugar beet pulp. *International Sugar Journal* 97, 57–60.
- Broxterman, S., van Erven, G. i Schols, H. A. (2018) The solubility of primary plant cell wall polysaccharides in LiCl-DMSO. *Carbohydrate Polymers* 15, 332-340.
- Bunesova, V., Killer, J., Javurkova, B., Vlkova, E., Tejnecky, V., Musilova, S. i Rada, V. (2017) Diversity of the subspecies *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *Anaerobe* 44, 40-47.
- Caffall, K. H. i Mohnen, D. (2009) The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* 344, 1879-1900.
- Carmona-Cabello, M., Garcia, I- L., Leiva-Candia, D. i Dorado, M. P. (2018) Valorization of food waste based on its composition through the concept of biorefinery. *Curent Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 14, 67-79.
- Carpita, N. C. i 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. *The Plant Journal* 3, 1-30.
- Carpita, N., Ralph, J. i McCann, M. (2015) The cell wall. U: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, 2. izd., (Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L., ured.), John Wiley & Sons, Chichester, str. 45 - 110.
- Carvalho, A. F. A., Neto, P. O., da Silva, D. F. i Pastore, G. M. (2013) Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Research International* 51, 75-85.
- Castell, A. G., Guenter, W. i Igbasan, F. A. (1996) Nutritive value of peas for nonruminant diets. *Animal Feed Science Technology* 60, 209-227.
- Castillejo, G., Bullo, M., Anguera, A., Escribano, J. i Salas-Salvado, J. (2006) A controlled, randomized, double-blind trial to evaluate the effect of a supplement of cocoa husk that is rich in dietary fiber on colonic transit in constipated pediatric patients. *Pediatrics* 118, 641-648.
- Chandrasekaran, V. S. (2013) Need for valorization of food processing by-products and wastes. U: *Valorization of Food Processing By-Products*. (Chandrasekaran, M., ured.), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, str. 91–108.
- Chang C. Y., Tsai Y. R. i Chang W. H. (1993) Models for the interactions between pectin molecules and other cell-wall constituents in vegetable tissues. *Food Chemistry* 48, 145–57.
- Chapla, D., Pandit, P. i Shah, A. (2012) Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. *Bioresource Technology* 115, 215-221.

- Chassard, C., Goumy, V., Leclerc, M., Del'homme, C. i Bernalier-Donadille, A. (2007) Characterization of the xylan-degrading microbial community from human faeces. *FEMS Microbial Ecology* 61, 121-131.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S. i Abert-Vian, M. (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A Review. *Ultrasonics Sonochemistry* 34, 540-560.
- Chen, H. (2015) Lignocellulose Biorefinery Engineering: Principles and Applications, Woodhead Publishing, Cambridge, str. 11-12.
- Chen, J., Liang, R.-H., Liu, W., Li, T., Liu, C.-M., Wu, S.-S. i Wang, Z.-J. (2013) Pectic-oligosaccharides prepared by dynamic high-pressure microfluidization and their *in vitro* fermentation properties. *Carbohydrate Polymers* 91, 175-182.
- Cherubini, F. i Ulgiati, S. (2010) Crop residues as raw materials for biorefinery systems – A LCA case study. *Applied Energy* 87, 47-57.
- Choi, I. S., Cho, E. J., Moon, J.-H. i Bae, H.-J. (2015) Onion skin waste as a valorization resource for the by-products quercetin and biosugar. *Food Chemistry* 188, 537-542.
- Chong, S.-L., Koutaniemi, S., Virkki, M.-L., Pynnönen, H., Tuomainen, P. i Tenkanen, M. (2013) Quantitation of 4-O-methylglucuronic acid from plant cell wall. *Carbohydrate Polymers* 91, 626-630.
- Chung, B. Y., Iiyama, K. i Han, K.-W. (2003) Compositional characterization of cacao (*Theobroma cacao* L.) hull. *Journal of Applied and Biological Chemistry* 46, 12–16.
- Chung, Y.-C., Hsu, C.-K., Ko, C.-Y. i Chan, Y.-C. (2007) Dietary intake of xylooligosaccharides improves the intestinal microbiota, fecal moisture, and pH value in the elderly. *Nutrition Research* 27, 756-761.
- Collar, C., Rosell, C. M., Muguerza, B. i Moulay, L. (2009) Breadmaking performance and keeping behavior of cocoa-soluble fiber-enriched wheat breads. *Food Science and Technology International* 15, 79-87.
- Courtin, C. M., Swennen, K., Verjans, P. i Delcour, J. A. (2009) Heat and pH stability of prebiotic arabinoxylooligosaccharides, xylooligosaccharides and fructooligosaccharides. *Food Chemistry* 112, 831-837.
- Crittenden, R. G. i Playne, M. J. (1996) Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology* 7, 353-361.
- Crittenden, R., Karppinen, S., Ojanen, S., Tenkanen, M., Fagerstro, R., Mättö, J., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T. i Poutanen, K. (2002) *In vitro* fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 781-789.

- Cummings, J. H. i Roberfroid, M. B., Ferro-Luzzi, A., Gibney, M., Hermansen, K., James, W. P. T., Korver, O., Lairon, D., Pascal, G. i Voragen, A. G. S. (1997) A new look at dietary carbohydrate: Chemistry, physiology and health. *European Journal of Clinical Nutrition* 51, 417-423.
- Currah, L., Cools, K., Terry, L., A., (2012) Onions, shallots and garlic. U: *Crop Post-Harvest: Science and Technology*, Vol. 3. Perishables (Rees, D., Farrel, G. i Orchard, J., ured.). Wiley-Blackwell, Chichester, str. 360-391.
- Dai, J., Wu, Y., Chen, S., Zhu, S., Y., H., Wang, M. i Tang, J. (2010) Sugar compositional determination of polysaccharides from *Dunalliella salina* by modified RP-HPLC method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone. *Carbohydrate Polymers* 82, 629-635.
- Davis, F., Terry, L. A., Chope, G. A. i Faul, C. F. J. (2007) Effect of extraction procedure on measured sugar concentrations in onion (*Allium cepa* L.) bulbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4299-4306.
- De Ruiter, G. A., Schols, H. A., Voragen, A. G. J. i Romboust, F. M. (1992) Carbohydrate analysis of water-soluble uronic acid-containing polysaccharides with high-performance anion-exchange chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis in superior to four other methods. *Analytical Biochemistry* 207, 176-185.
- Desai, K. G. H. i Park H. J. (2005) Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology* 23, 1361-1394.
- Di Gioia, D., Fava, F., Luziatelli, F. i Ruzzi, M. (2011) Vanillin production from agro-industrial wastes. U: *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 6. Environmental Biotechnology and Safety, (Moo-Young, M., ured.), Pergamon, Elsevier, Oxford, str. 661-667.
- Dinand, E., Chanzy, H. i Vignon, M. G. (1996) Parenchymal cell cellulose from sugar beet pulp: Preparation and properties. *Cellulose* 3, 183-188.
- Dongowski, G. (2007) Interactions between dietary fibre-rich preparations and glycoconjugated bile acids *in vitro*. *Food Chemistry* 104, 390-397.
- Dongowski, G. i Anger, H. (1996) Metabolism of pectin in the gastrointestinal tract. U: *Progress in Biotechnology*, Vol. 14. Pectin and Pectinases, (Visser, J. i Voragen, A. G. J., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 659-666.
- Downes, K., Chope, G. A. i Terry, L. A. (2009) Effect of curing at different temperatures on biochemical composition of onion (*Allium cepa* L.) skin from three freshly cured and cold stored UK-grown onion cultivars. *Postharvest Biology and Technology* 54, 80-86.
- Ebringerová, A. i Hienze, T. (2000) Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications* 21, 542-556.



- Ebringerová, A. i Hromádková, Z. (2010) An overview on the application of ultrasound in extraction, separation and purification of plant polysaccharides. *Central European Journal of Chemistry* 8, 243-257.
- Ebringerová, A., Hromádková, Z. i Hienze, T. (2005) Hemicellulose. U: *Advances in Polymer Science*, Vol. 186. Polysaccharides I - Structure, Characterization and Use, (Heinze, T., ured.), Springer, Berlin, str. 1-67.
- EFSA (2014) Scientific Opinion on the modification of the authorisation of a health claim related to cocoa flavanols and maintenance of normal endothelium-dependent vasodilation pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006 following a request in accordance with Article 19 of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 12: 3654, DOI: 10.2903/j.efsa.2014.3654. <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2014.3654>>. Pristupljeno 15. studenoga 2018.
- EFSA (2018) Safety of xylo-oligosaccharides (XOS) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal* 16:5361, DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5361. <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2018.5361>>. Pristupljeno 14. prosinca 2018.
- Einhorn-Stoll, U. (2018) Pectin-water interactions in foods – From powder to gel. *Food Hydrocolloids* 78, 109-119.
- Elliot, M. C. i Weston, G. D. (1993) Biology and physiology of the sugar-beet plant. U: *The Sugar Beet Crop*, (Cooke, D. A. i Scott, J. E.), Chapman & Hall, London, str. 37-66.
- Endress, H. U. i Mattes, F. (2009) Pectin. U: *Fiber Ingredients. Food Applications and Health Benefits*, (Cho, S. S. i Samuel, P., ured.), CRC Press, Boca Raton, FL, str 135-172.
- Englyst, H. N. i Cummings, J. H. (1988) Improved method of measurement of dietary fiber as non-starch polysaccharides in plant foods. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 71, 808-814.
- Esteban, R. M., Mollá, E., Valiente, C., Jaime, L., López-Andréu, F. J. i Martín-Cabrejas, M. A. (1998). Dietary fibre: Chemical and physiological aspects. *Recent Research Developments in Agricultural & Food Chemistry* 2, 293-308.
- EU Science Hub (2018) The European Commission's science and knowledge service. Dietary fibre. <[https://ec.europa.eu/jrc/en/health-knowledge-gateway/promotion-prevention/nutrition/fibre#\\_EU2011](https://ec.europa.eu/jrc/en/health-knowledge-gateway/promotion-prevention/nutrition/fibre#_EU2011)>. Pristupljeno 14. prosinca 2018.
- Fang, Z. i Bhandari, B. (2010) Encapsulation of polyphenols - A review. *Trends in Food Science & Technology* 21, 510-523.
- FAO (2018a) Food and Agriculture Organization of the United Nations. <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Pristupljeno 19. studenoga 2018.
- FAO (2018b) Food and Agriculture Organization of the United Nations. <<http://www.fao.org/pulses-2016/en/>>. Pristupljeno 25. studenoga 2018.

- FAO, IFAD, i WFP (2014) The state of food insecurity in the world 2014. Strengthening the enabling environment for food security and nutrition. FAO, Rim. <<http://www.fao.org/3/a-i4030e.pdf>>. Pristupljeno 30. listopada 2018.
- Filipović, N., DJurić, M. i Gyura, J. (2007) The effect of the type and quantity of sugar-beet fibers on bread characteristics. *Journal of Food Engineering* 78, 1047-1053.
- Filisetti-Cozzi, T. M. i Carpita, N. C. (1991) Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* 197, 157-162.
- Finegold, S. M., Li, Z., Summanen, P. H., Dowes, J., Thames, G., Corbett, K., Dowd, S., Krak, M. i Heber, D. (2014) Xylooligosaccharide increases bifidobacteria but not lactobacilli in human gut microbiota. *Food & Function* 5, 436-445.
- Finkenstadt, V. L. (2014) A review on the complete utilization of the sugarbeet. *Sugar Technology* 16, 339-346.
- Fishman, M. L., Chau, H. K., Cooke, P. H., Yadav, M. P. i A. T. Hotchkiss (2009) Physico-chemical characterization of alkaline soluble polysaccharides from sugar beet pulp. *Food Hydrocolloids* 23, 1554–1562.
- Ford-Lloyd, B. V. i Williams, J. T. (1975) A revision of *Beta* section *Vulgares* (*Chenopodiaceae*), with new light on the origin of cultivated beets. *Botanical Journal of the Linnean Society* 71, 89-102.
- Fowler, M. S. (2009) Cocoa beans: From tree to factory. U: Industrial Chocolate Manufacture and Use, 4. izd., (Beckett, S. T., ured.), Wiley-Blackwell, New Jersey, str. 10-48.
- Fox, A., Kozar, M. P. i Stenberg, P. A. (2000) Carbohydrates. Gas chromatography and gas chromatography - mass spectrometry. U: Encyclopedia of Separation Science, (Wilson, I. D., Adlard, E. R., Cooke, M. Poole, C. F., ured.), Academic Press, Elsevier Science Ltd., str. 2211-2223.
- Fry, S. C. (2001) Plant cell walls. U: Encyclopedia od Life Sciences, Johy Wiley & Sons, Chichester, str. 1-11.
- Gaborieau, M. i Castignolles, P. (2011) Size-exclusion chromatography (SEC) of branched polymers and polysaccharides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399, 1413-1423.
- Gagro M. (1997): Žitarice i zrnate mahunarke, Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb, str. 200 – 206.
- Gaillard, B. D. E. (1965) Comparison of the hemicelluloses from plants belonging to two different plant families. *Phytochemistry* 4, 631-634.
- Gajdoš Kljusurić, J. i Čačić, J. (2014) Changes of young consumers' perception regarding functional food - case of Croatia. *Journal of Hygienic Engineering and Design* 7, 61-65.
- Galanakis, C. M. (2012) Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science and Technology* 26, 68–87.

- Galanakis, C. M. (2015) The universal recovery strategy. U: Food Waste Recovery, (Galanakis, C. M., ured.), Elsevier Academic Press, Cambridge, MA, str. 59-81.
- Galić, K. (2009) Jestiva ambalaža u prehrambenoj industriji. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 4, 23-31. <<https://hrcak.srce.hr/49941>>. Pristupljeno 28. veljače 2019.
- Garg, M. (2015) Nutritional evaluation and utilization of pea pod powder for preparation of jaggery biscuits. *Food Processing & Technology* 6, 1-4.
- Garna, H., Mabon, N., Nott, K., Wathelet, B. i Paquot, M. (2006) Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. *Food Chemistry* 96, 477-484.
- Gibson G. R., Probert H. M., Van Loo J. A. E. i Roberfroid, M. B. (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutritional Research Reviews* 17, 257–259.
- Gibson, G. R. i Roberfroid, M. B. (1995) Dietary modulation of the human colon microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125, 1401–1412.
- Godshall, M. A. (2016) Candies and sweets: Sugar and chocolate confectionery. U: Encyclopedia of Food and Health, (Caballero, B., Finglas, P. M., i Toldrá, F., ured.), Academic Press, Cambridge, MA, str. 621-627.
- Gómez, B., Gullón, B., Remoroza, C., Schols, H. A., Parajó, J. C. i Alonso, J. L. (2014) Purification, characterization, and prebiotic properties of pectic oligosaccharides from orange peel wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 9769-9782.
- Gómez, B., Gullón, B., Yáñez, R., Schols, H. i Alonso, J. L. (2016) Prebiotic potential of pectins and pectic oligosaccharides derived from lemon peel wastes and sugar beet pulp: A comparative evaluation. *Journal of Functional Foods* 20, 108-121.
- Gómez, B., Míguez, B., Yáñez, R., i Alonso, J. L. (2017) Extraction of oligosaccharides with prebiotic properties from agro-industrial wastes. U: Water Extraction of Bioactive Compounds: From Plants to Drug Development, (Dominguez González, H. i González Muñoz, M. J., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 131-161.
- Goñi, I. i Hervert-Hernández, D. (2011) By-products from plant foods are sources of dietary fibre and antioxidants. U: Phytochemicals-Bioactivities and Impact on Health, (Rasooli, I., ured.), IntechOpen, DOI: 10.5772/27923.
- Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B. i Smith, B. (2002) Onions - A global benefit to health. *Phytotherapy Research* 16, 603-615.
- Grosso, G., Stepaniak, U., Topor-Madry, R., Szafraniec, K. i Pajak, A. (2014) Estimated dietary intake and major food sources of polyphenols in the Polish arm of the HAPIEE study. *Nutrition* 30, 1398–1403.

- Guilbert, S., Gontard, N. i Gorris, L. G. M. (1996) Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 29, 10-17.
- Guillon, F., Auffret, A., Robertson, J. A., Thibault, J.-F. i Barry, J.-L. (1998), Relationships between physical characteristics of sugar beet fibre and its fermentability by human faecal flora, *Carbohydrate Polymers* 37, 185-197.
- Guillon, F., Champ, M. i Thibault, J.-F. (2000) Dietary fibre functional properties. U: *Functional Foods. Concepts to Product*, (Gibson, G. R. i Williams, C. M., ured.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, str. 315-364.
- Gullón, B., Gómez, B., Martínez-Sabajanes, M., Yáñez, R., Parajó, J. C. i Alonso, J. L. (2013) Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties. *Trends in Food Science & Technology* 30, 153-161.
- Gullón, B., Gullón P., Sanz, Y., Alonso, J. L. i Parajó, J. C. (2011) Prebiotic potential of a refined product containing pectic oligosaccharides. *LWT-Food Science and Technology* 44, 1687-1696.
- Gullón, P., Moura, P., Esteves, M. P., Girio, F. M., Domínguez, H. i Parajó, J. C. (2008) Assesment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husks by probiotic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 7482-7487.
- Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., van Otterdijk, R. i Meybeck, A. (2011) Global food losses and food waste. Study conducted for the International Congress SAVE FOOD!. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rim.  
<<http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e.pdf>>. Pristupljeno 30. listopada 2018.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence?. *Lancet* 344, 721-724.
- Harland, J. I. (1993) By-products. U: *The Sugar Beet Crop*, (Cooke, D. A. i Scott, R. K., ured.), Chapman & Hall, London, str. 619-648.
- Harvey, D. J. (2011) Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography, electrophoresis and mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 879, 1196-1225.
- Hemmati, F., Jafari, S. M., Kashaninejad, M. i Motlagh, M. B. (2018) Synthesis and characterization of cellulose nanocrystals derived from walnut shell agricultural residues. *International Journal of Biological Macromolecules* 120A, 1261-1224.
- Hernández-Hernández, C., Morales Sillero, A., Hernández-Bolaños, J., Bermúdez Oria, A., Azpeitia Morales, A. i Rodríguez-Gutiérrez, G. (2019) Cocoa bean husk: Industrial source of antioxidant phenolic extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99, 325-333.
- Higashio, H., Hirokane, H., Sato, H., Tokuda, S. i Uragami, A. (2005) Effect of UV irradiation after the harvest on the content of flavonoid in vegetables. *Acta Horticulture* 682, 1007-1012.

- Ho, A. L., Kosik, O., Lovegrove, A., Charalampopoulos, D. i Rastall, R. A. (2018) *In vitro* fermentability of xylo-oligosaccharide and xylo-polysaccharide fractions with different molecular weights by human faecal bacteria. *Carbohydrate Polymers* 179, 50-58.
- Hodges, R. J., Buzby, J. C. i Bennett, B. (2011) Postharvest losses and waste in developed and less developed countries: Opportunities to improve resource use. *Journal of Agricultural Science* 149, 37-45.
- Höfer, R. (2015) Sugar- and starch-based biorefineries. U: *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*, (Pandey, A., Höfer, R., Taherzadeh, M., Nampoothiri, K. M., Larroche, C., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 157-235.
- Holck, J., Hjernø, K., Lorentzen, A., Vignæs, L. K., Hemmingsen, L., Licht T. R., Mikkelsen, J. D. i Meyer, A. S. (2011a) Tailored enzymatic production of oligosaccharides from sugar beet pectin and evidence of differential effects of a single DP chain length difference on human faecal microbiota composition after *in vitro* fermentation. *Process Biochemistry* 46, 1039-1049.
- Holck, J., Lorentzen, A., Vignæs, L. K., Licht, T. R., Mikkelsen, J. D. i Meyer, A. S. (2011b) Feruloylated and nonferuloylated arabino-oligosaccharides from sugar beet pectin selectively stimulate the growth of *Bifidobacterium* spp. in human fecal *in vitro* fermentations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 6511-6519.
- Honda, S., Akao, E., Suzuki, S., Okuda, M., Kakehi, K. i Nakamura, J. (1989) High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strong ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. *Analytical Biochemistry* 180, 351-357.
- Honda, S., Suzuki, S. i Taga, A. (2003) Analysis of carbohydrates as 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives by capillary/microchip electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 30, 1689-1714.
- Hopkins, M. J., Cummings, J. H. i Macfarlane, G. T. (1998) Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources. *Journal of Applied Microbiology* 85, 381-386.
- Hu, J. i Saddler, J. N. (2018) Why does GH10 xylanase have better performance than GH11 xylanase for the deconstruction of pretreated biomass?. *Biomass and Bioenergy* 110, 13-16.
- Hubbell, C. i Ragauskas, A. J. (2010) Effect of acid-chlorite delignification on cellulose degree of polymerization. *Bioresource Technology* 101, 7410-7415.
- ICCO (2018) International Cocoa Organization. <[https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat\\_view/30-related-documents/46-statistics-production.html](https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related-documents/46-statistics-production.html)>. Pristupljeno 19. studenoga 2018.
- ICH (2005) Topic Q2 (R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. International Conference for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, Ženeva.

- <[https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf)>. Pristupljeno 3. studenoga 2018.
- Iwata, E., Hotta, H. i Goto, M. (2009) Wheat bread enrichment by pea and broad bean pods fibers: Effect on dough rheology and bread quality. *Journal of Nutrition Science and Vitaminology* 50, 385-388.
- Jaime, L., Martín-Cabrejas, M. A., Mollá, E., Fernández, A., López-Andréu, F. J. i Esteban, R. M. (2001) Effect of storage on fructan and fructooligosaccharide of onion (*Allium cepa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 982-988.
- Jaime, L., Mollá, E., Fernández, A., Martín-Cabrejas, M. A., López-Andréu, F. J. i Esteban, R. M. (2002) Structural carbohydrate differences and potential source of dietary fiber of onion (*Allium cepa* L.) tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 122-128.
- Jimidar, M. I., Heylen, P. i de Smet, M. (2007) Method validation. U: HPLC Method Development for Pharmaceuticals, Vol. 8, 1. izd., (Ahuja, S. i Rasmussen, H., Ur.), Academic Press, London, str. 441-458.
- Kabel, M. A., van der Borne, H., Vincken, J.-P., Voragen, A. G. J. i Schols, H. A. (2007) Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose. *Carbohydrate Polymers* 69, 94-105.
- Kalia, V. C. i Joshi, A. P. (1995) Conversion of waste biomass (pea-shells) into hydrogen and methane through anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 53, 165-168.
- Kamphuis, H. J. (2009) Production and quality standards of cocoa mass, cocoa butter and cocoa powder. U: Industrial Chocolate Manufacture and Use, 4. izd., (Beckett, S. T., ured.), Wiley-Blackwell, New Jersey, str. 121-141.
- Karača, S., Trifković, K., Bušić, A., Đorđević, V., Belšak-Cvitanović, A., Vojvodić Cebin, A., Bugarški, B. i Komes, D. (2019) The functional potential of immortalé (*Helichrysum italicum*) based edible films reinforced with proteins and hydrogel particles. *LWT - Food Science and Technology* 99, 387-395.
- Karkanis, A., Ntatsi, G., Kontopoulou, C.-K., Pristeri, A., Bilalis, D. i Savvas, D. (2016) Field pea in European cropping systems: Adaptability, biological nitrogen fixation and cultivation practices. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 44, 325-336.
- Kehlet, U., Pagter, M., Aaslyng, M. D. i Raben, A. (2017) Meatballs with 3% and 6% dietary fibre from rye bran or pea fibre - Effects on sensory quality and subjective appetite sensations. *Meat Science* 125, 66-75.
- Kelly, P. (1983) Sugar beet pulp. A review. *Animal Feed Science and Technology* 8, 1-18.
- Khan, T. N., Meldrum, A. i Croser, J. S. (2016) Pea: Overview. U: Encyclopedia of Food Grains, 2. izd., (Wrigley, C., Corke, H., Seetharaman, K. i Faubion, J., ured.), Academic Press/Elsevier Ltd., Cambridge, Kidlington Oxford, str. 324-333.

- Konar, N., Toker, O. S., Oba, S. i Sagdic, O. (2016) Improving functionality of chocolate: A review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. *Trends in Food Science & Technology* 49, 35-44.
- Kotilainen, L., Rajalahti, R., Ragasa, C. i Pehu, E. (2006). Health enhancing foods: Opportunities for strengthening the sector in developing countries. Discussion Paper 30, Svjetska banka, Washington, DC.
- Kramling, T. E. i Singleton, V. L. (1969). An estimate of the nonflavonoid phenols in wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 20, 86–92.
- Kritchevsky, D. (2001) Dietary fibre in health and disease. U: *Advanced Dietary Fibre Technology*, (McCleary, B., i Prosky, L., ured.), Blackwell Science, Oxford, str. 149-161.
- Kühnel, S. Schols, H. A. i Gruppen, H. (2011) Aiming for the complete utilization of sugar-beet pulp: Examination of the effects of mild acid and hydrothermal pretreatment followed by enzymatic digestion. *Biotechnology for Biofuels* 4, 1-14.
- Kumar, R., Hu, F., Hubbel, C. A., Ragauskas i A. J., Wyman, C. E. (2013) Comparison of laboratory delignification methods, their selectivity and impact on physicochemical characteristics of cellulosic biomass. *Bioresource Technology* 130, 372-381.
- Kumar, V. i Longhurst, P. (2018) Recycling food waste into chemical building blocks. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 13, 118-122.
- Lachman, J., Hosnedl, V., Pivec, V. i Orsák, M. (1998) Polyphenols in cereals and their positive and negative role in human and animal nutrition. *Proceedings of Conference Cereals for Human Health and Preventive Nutrition*, Brno, Češka, str. 118-125.
- Lamari, F. N., Kuhn, R. i Karamanos, N. K. (2003) Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometry structure analysis. *Journal of Chromatography B* 793, 15-36.
- Landete, J. M. (2011) Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International* 44, 1150-1160.
- Lange, W., Brandenburg, W. A. i De Bock, T. S. M. (1999) Taxonomy and cultonomy of beet (*Beta vulgaris* L.). *Botanical Journal of the Linnean Society* 130,81-96.
- Larrauri, J. A. (1999) New approaches in the preparation of high dietary fibre powders from fruit by-products. *Trends in Food Science & Technology* 10, 3-8.
- Laufenberg, G., Kunz, B. i Nystroem, M. (2003) Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept; (B) Practical implementations. *Bioresource Technology* 87, 167-198.
- Lawther, J. M., Sun, R. i Banks, W. B. (1996) Effects of extraction conditions and alkali type on yield and composition of wheat straw hemicellulose. *Journal of Applied Polymer Science* 60, 1827-1837.

- Lecain, S., Ng, A., Parker, M. L., Smith, A. C. i Waldron, K. (1999) Modification of cell-wall polymers of onion waste - Part I. Effect of pressure-cooking. *Carbohydrate Polymers* 38, 59-67.
- Lecumberri, E., Mateos, R., Izquierdo-Pulido, M., Rupérez, P., Goya, L. i Bravo, L. (2007) Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry* 104, 948-954.
- Levigne, S., Ralet, M.-C. i Thibault, J.-F. (2002a) Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. *Carbohydrate Polymers* 49, 145-153.
- Levigne, S., Thomas, M., Ralet, M.-C., Quemener, B. i Thibault, J.-F. (2002b) Determination of degrees of methylation and acetylation of pectins using a C18 column and internal standards. *Food Hydrocolloids* 16, 547-550.
- Lewand, K. E. (2012) Onion. U: Handbook of Herbs and Spices, Vol. 1, (Peter, K. V., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 417-429.
- Li, H., Long, C., Zhou, J., Liu, J., Wu, X. i Long, M. (2013). Rapid analysis of mono-saccharides and oligosaccharides in hydrolysates of lignocellulosic biomass by HPLC. *Biotechnology Letters*, 35, 1405-1409.
- Li, Z., Fernie, A. R. i Persson, S. (2016) Transition of primary to secondary cell wall synthesis. *Science Bulletin* 61, 838-846.
- Lin, S.-H., Chou, L.-M., Chien, Y.-W., Chang, J.-S. i Lin, C. (2016) Prebiotic effects of xylooligosaccharides on the improvement of microbiota balance in human subjects. *Gastroenterology Research and Practice*, DOI: 10.1155/2016/5789232.
- Lorenz, D., Erasmy, N., Akil, Y. i Saake, B. (2016) A new method for the quantification of monosaccharides, uronic acids and oligosaccharides in partially hydrolyzed xylans by HPAEC-UV/VIS. *Carbohydrate Polymers* 140, 181-187.
- Lu, F. i Ralph, J. (2010) Lignin. U: Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels, (Sun, R. C., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 169-207.
- Lv, Y., Yang, X., Zhao, Y., Ruan, Y., Yang, Y. i Wang, Z. (2009) Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC with indirect UV detection. *Food Chemistry*, 112, 742-746.
- Mäkeläinen, H., Forssten, S., Saarinen, M., Stowel, J., Rautonen, N. i Ouwehand, A. C. (2010) Xylo-oligosaccharides enhance the growth of bifidobacteria and *Bifidobacterium lactis* in a simulated colon model. *Beneficial Microbes* 1, 81-91.
- Mäkeläinen, H., Juntunen, M. i Hasselwander, O. (2009) Prebiotic potential of xylo-oligosaccharides. U: Prebiotics and Probiotics Science and Technology, (Charalampopoulos, D. i Rastall, R. A., ured.), Springer, Berlin, str. 245-291.



- Maloney, M. D. (2003) Carbohydrates. U: Handbook of Thin-Layer Chromatography, 3. izd., (Sherma, J. i Fried, B., ured.), Marcel Dekker, Inc., New York, str. 445-470.
- Mandalari, G., Palop, C. N., Tuohy, K., Gibson, G. R., Bennet, R. N., Waldron, K. W., Blisignano, G., Narbad, A. i Faulds, C. B. (2007) *In vitro* evaluation of the prebiotic activity of a pectic oligosaccharide-rich extract enzymatically derived from bergamot peel. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 1173-1179.
- Margulis M. A. i Margulis I. M. (2003) Calorimetric method for measurement of acoustic power absorbed in a volume of a liquid. *Ultrasonic Sonochemistry* 10, 343–345.
- Martínez, M. L., Labuckas, D. O., Lamarque, A., L. i Maestri, D. M. (2010) Walnut (*Juglans regia* L.): Genetic resources, chemistry, by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 1959-1967.
- Martínez, M., Gullón, B., Yáñez, R., Alonso, J. L. i Parajó, J. C. (2010b) Kinetic assessment on the autohydrolysis of pectin-rich by-products. *Chemical Engineering Journal* 162, 480-486.
- Martínez, M., Yáñez, R., Alonso, J. L. i Parajó, J. C. (2010a) Chemical production of pectic oligosaccharides from orange peel wastes. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 49, 8470-8476.
- Martínez, P. M., Kabel, M. A., i Gruppen, H. (2016) Delignification outperforms alkaline extraction for xylan fingerprinting of oil palm empty fruit bunch. *Carbohydrate Polymers* 153, 356-363.
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A. i Viuda-Martos, M. (2012) Chemical, technological and *in vitro* antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International* 49, 39-45.
- Martínez-Cervera, S., Salvador, A., Mugerza, B., Moulay, L. i Fiszman, S. M. (2011) Cocoa fibre and its application as a fat replacer in chocolate muffins. *LWT - Food Science and Technology* 44, 729-736.
- Martínez-Sanz, M., Pettolino, F., Flanagan, B., Gidley, M. J. i Gilbert, E. P. (2017) Structure of cellulose microfibrils in mature cotton fibres. *Carbohydrate Polymers* 175, 450-463.
- Martínez-Villaluenga C i Frías, J. (2014) Production and bioactivity of oligosaccharides in plant foods. U: Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity (Moreno F.J., Sanz M. L., ured.), IFT Press, Wiley Blackwell, Chichester, str. 35-54.
- Martirosyan, D. M. i Singh, J. (2015) A new definition of functional food by FFC: What makes a new definition unique? *Functional Foods in Health and Disease* 5, 209-223.
- Mary, G. S., Sugumaran, P., Niveditha, S., Ramalakshmi, B., Ravichandran, P. i Seshadri, S. (2016) Production, characterization and evaluation of biochar from pod (*Pisum sativum*), leaf (*Brassica oleracea*) and peel (*Citrus sinensis*) wastes. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture* 5, 43-53.

- Mason, L., Boyle, T., Fyfe, J., Smith, T. i Cordell, D. (2011) National Food Waste Assessment - Final Report. Institute For Sustainable Futures, University of Technology, Sydney. <<https://www.environment.gov.au/system/files/resources/128a21f0-5f82-4a7d-b49c-ed0d2f6630c7/files/food-waste.pdf>>. Pristupljeno 7. studenoga 2018.
- Mateos-Aparicio, I., Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M.-J., Zapata-Revilla, M.-A. i Tenorio-Sanz, M.-D. (2010) Pea pod, broad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. *LWT-Food Science and Technology* 43, 1467-1470.
- Mateos-Aparicio, I., Redondo-Cuenca, A. i Villanueva-Suárez, M.-J. (2012) Broad bean and pea by-products as sources of fibre-rich ingredients: Potential antioxidant activity measured *in vitro*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92, 697-703.
- Matharu, A. S., De Melo, E. M. i Houghton, J. A. (2016) Opportunity for high value-added chemicals from food supply chain wastes. *Bioresource Technology* 215, 123-130.
- Matkowski, A., P. Tasarz i E. Szypuła (2008) Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*. *Journal of Medicinal Plants Research* 2, 321-330.
- May, C. D. (1990) Industrial Pectins: Sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers* 12, 79-99.
- McCleary, B. V., Cooper, J. M. i Williams, E. L. (1990) Debranched arabinan and its use as fat substitute, *International Patent WO 90/06343*.
- McCleary, B. V., DeVries, J. W., Rader, J. I., Cohen, G., Prosky, L., Mugford, D. C. i Okuma, K. (2012). Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber (CODEX definition) by enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 95, 824-844.
- McCleary, B. V., Gibson, T. S. i Mugford, D. C. (1997) Measurement of total starch in cereal products by amyloglucosidase -  $\alpha$ -amylase method: Collaborative study. *Journal of AOAC International* 80, 571-579.
- McDougall, G. J., Morrison, I. M., Stewart, D. i Hillman, J. R. (1996) Plant cell walls as dietary fibre: Range, structure, processing and function. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70, 133-150.
- McKee, L. H. i Latner, T. A. (2000) Underutilized sources of dietary fiber: A review. *Plant Foods for Human Nutrition* 55, 285-304.
- McLaughlin, H. P., O'Connell Motherway, M., Lakshminarayanan, B., Stanton, C., Paul Ross, R., Brulc, J., Menon, R., O'Toole, P. W. i Van Sinderen, D. (2015) Carbohydrate catabolic diversity of bifidobacteria and lactobacilli of human origin. *International Journal of Food Microbiology* 203, 109-121.
- Megazyme (2018) Total Starch assay procedure (amyloglucosidase/ $\alpha$ -amylase method). <[https://secure.megazyme.com/files/Booklet/K-TSTA\\_DATA.pdf](https://secure.megazyme.com/files/Booklet/K-TSTA_DATA.pdf)>. Pristupljeno 15. listopada 2018.

- Menon, V., Prakash, G. i Rao, M. U. (2010) Value added products from hemicellulose: Biotechnological perspective. *Global Journal of Biotechnology* 1, 36-67.
- Meshitsuka G. i Isogai, A. (1995) Chemical structures of cellulose, hemicelluloses, and lignin. U: *Chemical Modification of Lignocellulosic Materials*, (Hon, D. N.-S., ured.), Marcel Dekker Inc., New York, str. 11-33.
- Micard, V., Renard, C. M. G. C. i Thibault, J.-F. (1996) Enzymatic saccharification of sugar-beet pulp. *Enzyme and Microbial Technology* 19, 162-170.
- Milani, C., Duranti, S., Lugli, G. A., Bottaccini, F., Strati, F., Arioli, S., Foroni, E., Turrone, F., van Sinderen, D. i Ventura, M. (2013) Comparative genomics of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* reveals a strict monophyletic bifidobacterial taxon. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 4304-4315.
- Mirabella, N., Castellani, V. i Sala, S. (2014) Current options for the valorization of food manufacture waste: A review. *Journal of Cleaner Production* 65, 28-41.
- Mitchel, R. S., Lynch, L. J. i Casmir, D. J. (1969) A new method of shelling green peas for processing. *Food Science and Technology* 4, 51-60.
- Modesto, M. (2017) Isolation, cultivation and storage of bifidobacteria. U: *The Bifidobacteria and Related Organisms: Biology, Taxonomy, Applications*, 1. izd., (Mattarelli, P., Biavati, B., Holzappel, W., Wood, B. J. B., ured.), Academic Press, Elsevier Science, London, str. 67-98.
- Mohnen, D. (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 266-277.
- Mollea, C., Chiampo, F. i Conti, R. (2008) Extraction and characterization of pectins from cocoa husks: A preliminary study. *Food Chemistry* 107, 1353-1356.
- Møller, H., Vold, M., Schakenda, V. i Hanssen, O. J. (2012) Mapping method for food loss in the food processing industry - summary report. Oslo, Ostfold research.  
<<https://www.ostfoldforskning.no/media/1161/2712.pdf>>. Pristupljeno 30. listopada 2018.
- Moura, P., Baratam R., Carvalheiro, F., Girio, F., Loureiro-Dias, M. C. i Esteves, M. P. (2007) In vitro fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *LWT-Food Science and Technology* 40, 963-972.
- Moure, A., Gullón, P., Domínguez, H. i Parajó, J. C. (2006) Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry* 41, 1913-1923.
- Müller-Maatsch, J., Bencivenni, M., Caligiani, A., Tedeschi, T., Bruggeman, G., Bosch, M., Petrusan, J., Van Droogenbroeck, V. Elst, K. i Sforza, S. (2016) Pectin content and composition from different food waste streams. *Food Chemistry* 201, 37-45.
- Mumtaz, S., Rehman, S.-U. i Huma, N. (2008) Xylooligosaccharide enriched yoghurt: Physicochemical and sensory evaluation. *Pakistan Journal of Nutrition* 7, 566-569.

- Murugan, K., Chandrasekaran, V. S., Karthikeyan, P., Al-Sohaibani, S. (2013) Current state-of-the-art of food processing by-products. U: Valorization of Food Processing By-Products. (Chandrasekaran, M., ured.), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, str. 35–62.
- Mussatto, S. I. i Mancilha, I. M. (2007). Non-digestible oligosaccharides; A review. *Carbohydrate Polymers*, 68, 587-597.
- Nabarlantz, D., Ebringerová, A. i Montané, D. (2007) Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers* 69, 20-28.
- Naidu, D. S., Hlangothi, S. P. i John, M. J. (2018) Bio-based products from xylan: A review. *Carbohydrate Polymers* 179, 28-41.
- Nan, Y., Jia, L., Yang, M., Xin, D., Qin, Y. i Zhang, J. (2018) Simplified sodium chlorite pretreatment for carbohydrates retention and efficient saccharification of silvergrass. *Bioresource Technology* 261, 223-231.
- Naumovski, N., Randheera, S., Thomas, J., Gergousopoulou, E. i Meller, D. (2017) Bioactive compounds in agricultural and food production waste. U: Utilisation of Bioactive Compounds from Agricultural and Food Waste, (Vuong, Q. V., ured.), CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, str. 1-26.
- Nawirska, A. i Kwaśniewska, M. (2005) Dietary fibre fractions from fruit and vegetable processing waste. *Food Chemistry* 91, 221-225.
- Ng, A., Smith, A. C. i Waldron, K. W. (1998) Effect of tissue type and variety on cell wall chemistry of onion (*Allium cepa* L.). *Food Chemistry* 63, 17-24.
- Nishio, N. i Nakashimada, Y. (2013) Manufacture of biogas and fertilizer from solid food wastes by means of anaerobic digestion. U: Food Industry Wastes: Assessment and Recuperation of Commodities, (Kosseva, M. R. i Webb, C. ured.). Elsevier Inc., Oxford, str. 121–136.
- NN 100/08. Pravilnik o hrani za posebne medicinske potrebe (2008) *Narodne novine* 100, Zagreb.
- NN 126/13. Pravilnik o dodacima prehrani (2013) *Narodne novine* 126, Zagreb.
- NN 39/13a. Zakon o prehrambenim aditivima, aromama i prehrambenim enzimima (2013) *Narodne novine* 39, Zagreb.
- NN 39/13b. Zakon o hrani za posebne prehrambene potrebe (2013) *Narodne novine* 39, Zagreb.
- NN 81/13. Zakon o hrani (2013) *Narodne novine* 81, Zagreb.
- NN 83/10. Pravilnik o hrani bez glutena (20110) *Narodne novine* 83, Zagreb.
- NN 89/08. Pravilnik o hrani namijenjenoj smanjenju tjelesne mase (2008) *Narodne novine* 89, Zagreb.

- O'Dwyer, M. H. (1926) The hemicelluloses. Part IV: The hemicelluloses of beech wood. *Biochemistry Journal* 20, 656-664.
- O'Neill, M. i York, W. (2003) The composition and structure of plant primary cell walls. U: *The Plant Cell Wall*, (Rose, Y. K. C., ured.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, str. 1-54.
- Oddoye, E. Agyente-Badu, C. i Gyedu-Akoto, E. (2013) Cocoa and its by-products: Identification and utilization. U: *Chololate in Health and Nutrition*, (Watson, R. R., Preedy, V. i Zibadi, S., ured.), Humana Press, Totowa, New Jersey, str. 23-37.
- Ohama H., Ikeda H. i Moriyama H. (2006) Health foods and foods with health claims in Japan. *Toxicology* 221, 95-111.
- Okazaki, M., Fujikawa, S. i Matsumoto, N. (1991) Effect of xylooligosaccharides on the growth of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora* 9, 77-86.
- Okiyama, D. C. G., Navarro, S. L. B. i Rodrigues, C. E. C. (2017) Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* 63, 103-112.
- Olano-Martin, E., Gibson, G. R. i Rastall, R. A. (2002) Comparison of the *in vitro* bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology* 93, 505-511.
- Onumpai, C., Kolida, S., Bonnin, E. i Rastall, R. A. (2011) Microbial utilization and selectivity of pectin fractions with various structures. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 5747-5754.
- Ooshima, T., Osaka, Y., Sasaki, H., Osawa, K., Yasuda, H., Matsumura, M., Sobue, S. i Matsumoto, M. (2000) Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract in *in vitro* and animal experiments. *Archives of Oral Biology* 45, 639-645.
- Oosterveld, A., Beldman, G., Schols, H. A. i Voragen, A. G. J. (1996) Arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides extracted from sugar beet pulp. *Carbohydrate Research* 288, 143-153.
- O'Shea, N, Arendt, E. K. i Gallagher, E. (2012) Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 16, 1-10.
- Östergren, K. i sur. (2014) FUSIONS Definitional framework for food waste. Full Report. FP7 projekt Reducing food waste through social innovation. <<https://www.eu-fusions.org/phocadownload/Publications/FUSIONS%20Definitional%20Framework%20for%20Food%20Waste%202014.pdf>>.Pristupljeno 30. listopada 2010.
- Otles, S., Despoudi, S., Bucatariu, C. i Kartal, C. (2015) Food waste management, valorization, and sustainability in the food industry. U: *Food Waste Recovery*, (Galanakis, C. M., ured.), Academic Press/Elsevier Inc., Cambridge, MA, str. 3-23.

- Ough, C. S. i Amerine, M. A. (1988) *Methods for analysis of musts and wine*, 2. izd., John Wiley & Sons, New York.
- Padmore J. M. (1990a). Animal feed - AOAC official method 930.15 - Moisture in animal feed. U: *Official Methods of Analysis*, Vol. 1, 15. izd., (Helrich, K., ured.), AOAC International, Arlington, VA, str. 69-70.
- Padmore J. M. (1990b). Animal feed - AOAC official method 920.39 - Fat (crude) or ether extract in animal feed. U: *Official Methods of Analysis*, Vol. 1, 15. izd., (Helrich, K., ured.), AOAC International, Arlington, VA, str. 79.
- Padmore J. M. (1990c). Animal feed - AOAC official method 976.05 - Protein (crude) in animal feed, automated Kjeldhal method. U: *Official Methods of Analysis*, Vol. 1, 15. izd., (Helrich, K., ured.), AOAC International, Arlington, VA, str. 72.
- Padmore J. M. (1990d). Animal feed - AOAC official method 942.05 - Ash of animal feed. U: *Official Methods of Analysis*, Vol. 1, 15. izd., (Helrich, K., ured.), AOAC International, Arlington, VA, str. 70.
- Panak Balentić, J., Ačkar, Đ., Jokić, S., Jozinović, A., Babić, J., Miličević, B., Šubarić, D. i Pavlović, N. (2018) Cocoa shell: A by-product with great potential for wide application. *Molecules* 23, 1-14.
- Panouillé, M., Ralet, M.-C., Bonnin, E. i Thibault, J.-F. (2007) Recovery and reuse of trimmings and pulps from fruit and vegetable processing. U: *Handbook of Waste Management and Co-Product Recovery in Food Processing*, (Waldron, K., ured.), Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, str. 417-447.
- Parajo, J. C., Garrote, G., Cruz, J. M. i Dominguez, H. (2004) Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. *Food Science and Technology* 15, 115-120.
- Parfitt, J., Barthel, M. i Macnaughton, S. (2010) Food waste within food supply chains: Quantification and potential for change to 2050. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 365, 3065-3081.
- Pedrolli, D. B., Monteiro, A. C., Gomes, E. i Carmona, E. C. (2009) Pectin and pectinases: Production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *The Open Biotechnology Journal* 3, 9-18.
- Peng, F., Peng, P., Xu, F. i Sun, R.-C. (2012) Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology Advances* 30, 879-903.
- Penksza, P., Banka, B., Szilárd, K., Pásztorné Huszár, K., Németh, C., Tóth, A. i Réka, J. (2018) Utilization of xylo-oligosaccharides as prebiotics in yoghurt. *Journal of Hygienic Engineering and Design* 22, 66-71.
- Pérez, S. i Mazeau, K. (2004) Conformations, structures, and morphologies of celluloses. U: *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*, (Dumitriu, S., ured.), Marcel Dekker, New York, str. 41-68.

- Pesta, G. (2006) Anaerobic digestion of organic residues and wastes. U: Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry, (Oreopoulou, V. i Russ, W., ured.), Springer Science+Business Media, New York, str. 53–72.
- Petrova, P. i Petrov, K. (2017) Prebiotic-probiotic relationship: The genetic fundamentals of polysaccharides conversion by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* genera. U: Handbook of Food Bioengineering, Vol. 2. Food Bioconversion, (Grumezescu, A. M. i Holban, A. M., ured.), Academic Press/Elsevier Inc., London, str. 237-278.
- Petruš, L., Gray, D. G. i BeMiller, J. N. (1995). Homogeneous alkylation of cellulose in lithium chloride/dimethyl sulfoxide solvent with dimethyl sodium activation. A proposal for the mechanism of cellulose dissolution in LiCl/Me<sub>2</sub>SO. *Carbohydrate Research* 268, 319-323.
- Pickford, E. F. i Jardine, N. J. (2000) Functional confectionery. U: Functional Foods. Concepts to product, (Gibson, G. R. i Williams, C. M., ured.), Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, str. 259-286.
- Pirayesh, H., Khazaeian, A. i Tabarsa, T. (2012) The potential for using walnut (*Juglans regia* L.) shell as a raw material for wood-based particleboard manufacturing. *Composites: Part B* 43, 3276-3280.
- Poncelet, D. (2006) Microencapsulation: fundamentals, methods and applications. U: Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science, Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on Pure and Applied Surface Chemistry and Nanomaterials for Human Life and Environmental Protection (Blitz, J.P. i Gun'ko, V.M., ured.), Springer, Dordrecht, str. 23-34.
- Prasad, R. B. N. (2003) Walnuts and pecans. U: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, (Caballero, B., Trugo, L. C. i Fingas, P. M., ured.), Academic Press/Elsevier Ltd., Cambridge, MA, str. 6070 - 6079.
- Prošek, M., Pukl, M. i Jamnik, K. (1991). Carbohydrates. U: Handbook of Thin-Layer Chromatography - Chromatographic Science Series, Vol. 55, (Sherma, J. i Fried, B., ured.), Marcel Dekker, Inc., New York, str. 439-462.
- Prosky, L. (2001) What is dietary fibre? A new look at the definition. U: Advanced Dietary Fibre Technology, (McCleary, B., i Prosky, L., ured.), Blackwell Science, Oxford, str. 63-76.
- Qing, Q., Li, H., Kumar, R. i Wyman, C. E. (2013) Xylooligosaccharides production, quantification, and characterization in context of lignocellulosic biomass pretreatment. U: Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals, (Wyman, C. E., ured.), John Wiley & Sons, New Jersey, str. 391-415.
- Rabetafika, H. N., Bchir, B., Blecker, C., Paquot, M. i Wathelet, B. (2014) Comparative study of alkaline extraction process of hemicelluloses from pear pomace. *Biomass and Bioenergy* 61, 254 - 264.

- Raessler, M. (2011) Sample preparation and current application of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants. *Trends in Analytical Chemistry*, 30, 1833-1843.
- Raessler, M., Wissuwa, B., Breul, A., Unger, W. i Grimm, T. (2010). Chromatographic analysis of major nonstructural carbohydrates in several wood species - an analytical approach for higher accuracy of data. *Analytical Methods* 2, 532-538.
- Ralet, M.-C. i Thibault, J.-F. (2009) Hydrodynamic properties of isolated pectin domains: A way to figure out pectin macromolecular structure? U: *Pectins and Pectinases*, (Schols, H. A., Visser, R. G. F. i Voragen, A. G. J., ured.) Wageningen Academic Publishers, Wageningen, str. 35–48.
- Ralet, M.-C., Guillon, F., Renard, C. i Thibault, J.-F. (2009) Sugar beet fiber: Production, characteristics, food applications, and physiological benefits. U: *Fiber Ingredients. Food Applications and Health Benefits*, (Sungsoo Cho, S. i Samuel, P., ured.), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, str. 359-392.
- Ralet, M.-C., Thibault, J.-F., Faulds, C. B. i Williamson, G. (1994) Isolation and purification of feruloylated oligosaccharides from cell walls of sugar-beet pulp. *Carbohydrate Research* 263, 227-241.
- Ray, S., Vigouroux, J., Quémener, B., Bonnin, E. i Lahaye, M. (2014) Novel and diverse fine structures in LiCl-DMSO extracted apple hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers* 108, 46-57.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A, Pannala, A., Yang, M. i Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26, 1231-1237.
- Reisinger, H., Acoleyen, M., O'Connor, C., Hestin, M., Laureysens, I., Morton, G., Dolley, P., Nelen, D. i Vanderreydt, I. (2011). Evolution of (bio-) waste generation/prevention and (bio-) waste prevention indicators. *A project under the Framework contract ENV.G.4/FRA/2008/0112*. Europska komisija, Brisel, Belgija.  
<<https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/6826b226-2d49-40e3-8e3e-31bc1bfb2d3a/language-en>>. Pristupljeno 20. listopada 2018.
- Ren, L.-J. i Sun, R.-C. (2010) Hemicelluloses. U: *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels. Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose*, (Sun, R.-C., ured.), Elsevier, New York, str. 73-129.
- Renard, C. M. G. C. i Thibault, J.-F. (1993) Structure and properties of apple and sugar-beet pectins extracted by chelating agents. *Carbohydrate Research* 244, 99-114.
- Renard, C. M. G. C. i Ginies, C. (2009). Comparison of the cell wall composition for flesh and skin from five different plums. *Food Chemistry* 114, 1042-1049.



- Režek Jambrak, A., Herceg, Z., Šubarić, D., Babić, J., Brnčić, M., Rimac Brnčić, S., Bosiljkov, T., Čvek, D., Tripalo, B. i Gelo, J. (2010). Ultrasound effect on physical properties of corn starch. *Carbohydrate Polymers* 79, 91-100.
- Ribeiro, D., Freitas, M., Silva, A. M.S., Carvalho, F. i Fernandes, E. (2018) Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. *Food and Chemical Toxicology* 120, 681-699.
- Roberfroid, M. (2002) Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive Liver Disease* 34. S105-110.
- Roberfroid, M. (2007) Prebiotics: The concept revisited. *Journal of Nutrition* 137, 830S-837S.
- Roberfroid, M. B. (2000a) Concepts and strategy of functional food science: The European perspective. *American Journal of Clinical Nutrition* 71, S1660-1664.
- Roberfroid, M. B. (2000b) Defining functional foods. U: Functional foods. Concepts to Product, (Gibson, G. R. i Williams, C. M., ured.), Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, str. 9-42.
- Roberfroid, M. i Slavin, J. (2000) Nondigestible oligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40, 461-480.
- Roberts, K. (1989) The plant extracellular matrix. *Current Opinion in Cell Biology* 1, 1020–1027.
- Rodrigues, F. Vinha, A. F., Nunes, M. A. i Oliveira, M. B. P. P. (2007) Potential application of bioactive compounds from agroindustrial waste in the cosmetic industry. U: Utilisation of Bioactive Compounds from Agricultural and Food Waste, (Vuong, Q. V., ured.), CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, str. 358-382.
- Rodríguez, R., Jiménez, A., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R. i Heredia, A. (2006) Diatar fibre from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends in Food Science & Technology* 17, 3-15.
- Rose, P., Whiteman, M., Moore, P. K. and Zhu, Y. Z. (2005). Bioactive S-alk(en)yl-cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: The chemistry of potential therapeutic agents. *Natural Products Reports* 22, 51-368.
- Roy, F., Boye, J. I. i Simpson, B. K. (2010) Bioactive protein and peptide in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International* 43, 432-442.
- Ruiz, H., Rodríguez-Jasso, R. M., Fernandes, B. D., Vicente, A. A. i Teixeira, J. A. (2013) Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 21, 35-51.
- Ruiz-Matute, A. I., Hernández-Hernández, O., Rodríguez-Sánchez, S., Sanz, M. I. i Martínez-Castro, I. (2011) Derivatization of carbohydrates for GC and GC–MS analyses. *Journal of Chromatography B* 879, 1226-1240.

- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M. i Bressollier, P. (2013) An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Science and Technology* 50, 1-16.
- Sako, T., Matsumoto, K. i Tanaka, R. (1999) Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal* 9, 69-80.
- Salgado, P. R., Ortiz, C. M., Musso, Y. S., DI Giorgio, L. i Mauri, N. (2015) Edible films and coatings containing bioactives. *Current Opinion in Food Science* 5, 86-92.
- Samanta, A. K., Jayapal, N., Jayaram, C., Roy, S., Kolte, A. P., Senani, S., i Sridhar, M. (2015) Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 5, 62-71.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. i Jiménez, L. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 454, 287-306.
- Scheller, H. i Ulvskov, P. (2010) Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* 61, 263-289.
- Schieber, A., Stintzing, F. C. i Carle, R. (2001) By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. *Trends in Food Science & Technology* 12, 401-413.
- Schols H. i Voragen A. G. J. (1996) Complex pectins: Structure elucidation using enzymes. U: Pectins and Pectinases, (Visser J. i Voragen A. G. J., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 3-19.
- Sedlmeyer, F. B. (2011) Xylan as by-product of biorefineries: Characteristics and potential use for food applications. *Food Hydrocolloids* 25, 1891-1898.
- Šestan, J. (2016) Utjecaj razmaka sjetve na prinos graška. Diplomski rad, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Rad pohranjen u knjižnici Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d, 31 000 Osijek, Republika Hrvatska.
- Shabir, G. A. (2003) Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A* 987, 57-66.
- Sharma, K., Mahato, N., Nile, S. H., Lee, E. T. i Lee, Y. R. (2016) Economical and environment-friendly approaches for usage of onion (*Allium cepa* L.) wastes. *Food & Function* 10, 3354-3369.
- Shen, X. i Perreault, H. (1998) Characterization of carbohydrates using a combination of derivatization, high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 811, 47-59.
- Sherma, J. (2000) Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis. *Journal of Chromatography A* 880, 129-147.

- Shugang, Z., Jing, W., Hongxia, W., Zhihua, Z. i Xibo, L. (2016) Changes in lignin content and activity of related enzymes in the endocarp during the walnut shell development period. *Horticultural Plant Journal* 2, 141-146.
- Sila, D. N., Van Buggenhout, S., Duvetter, T., Fraeye, I., De Roeck, A., Van Loey, A. i Hendrickx, M. (2009) Pectins in processed fruits and vegetables: Part II - Structure-function relationships. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8, 86-104.
- Singh, R. D., Banerjee, J. i Arora, A. (2015) Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 5, 19-30.
- Singleton, V. L. i Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
- Sinner, M., Puls, J. i Dietrichs, H. (1979) Carbohydrate composition of nut shells and some other agricultural residues. *Starch* 31, 267-269.
- Siró, I., Kápolna E., Kápolna B. i Lugasi A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review. *Appetite* 51, str. 456-466.
- Slimestad, R., Fossen, T. i Vagen, I. M. (2007) Onions: A source of unique dietary flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 1067-1080.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. i Crocker, D. (2008a) Determination of structural carbohydrates and lignin- Laboratory analytical procedure. Technical report NREL/TP-510-42618 <<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42618.pdf>>. Pristupljeno, 26. ožujka, 2014.
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. i Templeton, D. (2008b) Determination of extractives in biomass- Laboratory analytical procedure. Technical report NREL/TP-510-42619. <<https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42619.pdf>>. Pristupljeno, 26. ožujka, 2014.
- Spence, J. T. (2006). Challenges related to the composition of functional foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S4-S6.
- Steed, H. i Macfarlane, S. (2009) Mechanisms of prebiotic impact on health. U: *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, (Charalampopoulos, D. i Rastall, R. A., ured.), Springer, Berlin, str. 135-162.
- Stein, A. J. i Rodríguez-Cerezo, E. (2008) Functional food in the European Union. JRC Scientific and Technical Reports. <<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC43851/jrc43851.pdf>>. Pristupljeno 13. prosinca 2018.
- Stenmarck, A. i sur. (2016) FUSIONS Estimates of European food waste levels. FP7 projekt Reducing food waste through social innovation. <<http://www.fusions.org/phocadownload/Publications/Estimates%20of%20European%20food%20waste%20levels.pdf>>. Pristupljeno 30. listopada 2018.

- Sun, R. i Hughes, S. (1998) Fractional extraction and physico-chemical characterization of hemicelluloses and cellulose from sugar beet pulp. *Carbohydrate Polymers* 36, 293-299.
- Sun, X., Wang, H., Han, X., Chen, S., Zhu, S. i Dai, J. (2014) Fingerprint analysis of polysaccharides from different *Ganoderma* by HPLC combined with chemometrics methods. *Carbohydrate Polymers* 114, 432-439.
- Sunna, A. i Antranikian, G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology* 17, 39–67.
- Takahama, U. i Hirota, S. (2000) Deglucosylation of quercetin glucosides to the aglycone and formation of antifungal agents by peroxidase-dependent oxidation of quercetin on browning of onion scales. *Plant Cell Physiology* 41, 1021-1029.
- Tallon, M. J. (2015) Authorised EU health claim for cocoa flavanols. U: Foods, Nutrients and Food Ingredients with Authorised Health Claims, Vol. 2, (Sadler, M. J., ured.), Woodhead Publishing, Oxford, str. 75-93.
- Tenkanen, M., Hausalo, T., Siika-aho, M., Buchert, J. i Viikari, L. (1995) Use of enzymes in combination with anion exchange chromatography in analysis of carbohydrate composition of kraft pulps. U: Proceedings of the 8th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Vol. 3, Helsinki, str. 189-194.
- Teshika, J. D., Zakariyyah, M., Toorabally, Z., Zengin, G., Rengasamy, K. R. R., Pandian, S. K. i Mahomoodally, F. M. (2018) Traditional and modern uses of onion bulb (*Allium cepa* L.): A systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 4, 1-32.
- Thibault, J.-F. (1979) Automatisation du dosage des substances pectiques par la méthode au méta-hydroxydiphenyl. *LWT - Food Science and Technology* 12, 247-251.
- Thomas, L. H., Forsyth, V. T., Šturcová, A., Kennedy, C. J., May, R., P., Altner, C. M., Apperley, D. C., Wess, T. J. i Jarvis, M. C. (2013) Structure of cellulose microfibrils in primary cell walls from collenchyma. *Plant Physiology* 161, 465-476.
- Tomás Barberán, F. A. (2007) High-value co-products from plant foods: Nutraceuticals, micronutrients and functional ingredients. U: Handbook of Waste Management and Co-Product Recovery in Food Processing, (Waldron, K., ured.), Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, str. 448-469.
- Tomomatsu H. (1994) Health effects of oligosaccharides. *Food Technology* 48, 61-65.
- Trowell, H. C., Southgate, D. A. T., Wolever, T. M. S., Leeds, A. R., Gassull, M., A., i Jenkins, D. J. A. (1976) Dietary fibre redefined. *Lancet* 1, 967.
- Tucker, G. A. i Seymour, G. B. (2002) Modification and degradation of pectin. U: Pectins and Their Manipulation, (Seymour, G. B. i Knox, J. P., ured.), Blackwell Publishing, Oxford, str. 150-173.
- Tutak, M. i Benli, H. (2011) Colour and fastness of fabrics dyed with walnut (*Juglans regia* L.) base natural dyes. *Asian Journal of Chemistry* 23, 566-568.

- Tylewicz, U., Nowacka, M., Martin-Garcia, B., Wiktor, A. i Gómez Caravaca, A. M. (2018) Target sources of polyphenols in different food products and their processing by-products. U: *Polyphenols: Properties, Recovery and Applications*, (Galanakis, C., ured.), Woodhead Publishing, Sawston, str. 135-175.
- Valcheva, R. i Dieleman, L. A. (2016) Prebiotics: Definition and protective mechanisms. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 30, 27-37.
- Van Buren, J. P. (1991) Function of pectin in plant tissue structure and firmness. U: *The Chemistry and Technology of Pectin*, (Walter, R. H., ured.), Academic Press, San Diego, CA, SAD, str. 1-22.
- Van Dyk, J. S., Gama, R., Morrison, D., Swart, S. i Pletschke, B. I. (2013) Food processing waste: Problems, current management and prospects for utilisation of the lignocellulose component through enzyme synergistic degradation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 26, 521-531.
- Vázquez, M. J., Alonso, J. L., Domínguez, H. i Parajó, J. C. (2000) Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Food Science & Technology* 11 387-393.
- Verma, N., Bensal, M. C. i Kumar, V. (2011) Pea peel waste: A lignocellulosic waste and its utility in cellulase production by *Trichoderma reesei* under solid state cultivation. *Bioresources* 6, 1505-1519.
- Verwimp, T., Van Craeyed, V., Courtin, C. M. i Delcour, J. A. (2007) Variability in the structure of rye flour alkali-extracted arabinoxylans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 1985-1992.
- Vincken, J. P., Schols, H. A., Oomen, R. J. F. J., McCann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G. J. i Visser, R. G. F. (2003). If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology* 132, 1781-1789.
- Voragen, A. G. J. (1998) Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends in Food Science & Technology* 9, 238-335.
- Voragen, A. G. J., Pilnik, W., Thibault, J.-F., Axelos, M. A. V. i Renard, M. G. C. (1995) Pectins. U: *Food Polysaccharides and Their Applications*, (Stephen, A. M., ured.), Marcel Dekker Inc., New York, str. 287-339.
- Voragen, A. G., Kabel, M. A., Kortenoeven, L. i Schols, H. A. (2002). *In vitro* fermentability of differently substituted xylo- oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6205-6210.
- Voragen, F., Beldman, G., i Schols, H. (2001) Chemistry and enzymology of pectin. U: *Advanced Dietary Fibre Technology*, (McCleary, B. i Prosky, L., ured.), Blackwell Science, Oxford, str. 379-397.
- Vuong, Q. V. i Atherton, M. (2017) Utilisation of bioactive compounds derived from waste in the food industry. U: *Utilisation of Bioactive Compounds from Agricultural and Food*

- Waste, (Vuong, Q. V., ured.), CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, str. 342-357.
- Wadhawa, M., Kausal, S. i Bakshi, M. P. S. (2006) Nutritive evaluation of vegetable wastes as complete feed for goat bucks. *Small Ruminant Research* 64,279-284.
- Waldron, K. W. (2001) Useful ingredients from onion waste. *Food Science and Technology* 15, 38-41.
- Waldron, K. W. i Faulds, C. B. (2007) Cell Wall Polysaccharides: Composition and Structure. U: Comprehensive Glycoscience. From Chemistry to Systems Biology, Vol. 1. Introduction to Glycoscience; Synthesis of Carbohydrates, (Boons, G.-J., Lee, J. C., Suzuki, A., Taniguchi, N., Voragen, A. G. J., Kamerling, H., ured), Elsevier, Amsterdam, str. 181-201.
- Waldron, K. W., Parr, A. J., Ng, A. i Ralph, J. (1996) Cell-wall esterified phenolic dimers: Identification and quantification by reverse phase HPLC and diode array detection. *Phytochemistry Analysis* 7, 305-312.
- Wang, W., Ma, X., Xu, Y., Cao, Y., Jiang, Y., Ding, T., Ye, X. i Liu, D. (2015a) Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: Optimization and comparison with the conventional method. *Food Chemistry* 178, 106-114.
- Wang, Y. (2009) Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International* 42, 8-12.
- Wang, Y., Azhar, S., Lindström, M. E. i Henriksson, G. (2015b) Stabilization of polysaccharides during alkaline pretreatment of wood combined with enzyme-supported extractions in biorefinery. *Journal of Chemistry and Technology* 35, 91-101.
- Wang, Y., Guo, Q., Goff, H. D. i LaPointe G. (2018) Oligosaccharides: structure, function and application. U: Reference Module in Food Science, (Smithers, G., ured.), Elsevier, Amsterdam, DOI:10.1016/b978-0-08-100596-5.21585-0.
- Winner, C. (1993) History of the crop. U: The Sugar Beet Crop, (Cooke, D. A. i Scott, J. E.), Chapman & Hall, London, str. 1-36.
- Wise, L. E., Murphy, M. i D'Addieco, A. A. (1946) Chlorite holocellulose, its fractionation and dearing on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses. *Paper Trade Journal* 122, 35-43.
- Wu, G. L., Liu, Q. L. i Teixeira da Silva, J. A. (2009) Ultrastructure of pericarp and seed capsule cells in the developing walnut (*Juglans regia* L.) fruit. *South African Journal of Botany* 75, 128-136.
- Wyatt, S. E. i Carpita, N. C. (1993) The plant cytoskeleton-cell-wall continuum. *Trends in Cell Biol.* 3, 413-417.
- Xiao, B.; Sun, X. F. i 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. *Polymer Degradation and Stability* 74, 307-319.

- Xu, Y., Zhang, L., Bailina, Y., Ge, Z., Ding, T., Ye, X. i Liu, D. (2014) Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grapefruit peel. *Journal of Food Engineering* 126, 72-81.
- Yapo, B. M. (2011a) Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins - A new hypothetical model. *Carbohydrate Polymers* 86, 373-385.
- Yapo, B. M. (2011b) Rhamnogalacturonan-I: A structurally puzzling and functionally versatile polysaccharide from plant cell walls and mucilages. *Polymer Reviews*, 51, 391-413.
- Yapo, B. M. i Gnakri, D. (2014) Pectic polysaccharides and their functional properties. U: Polysaccharides. Bioactivity and Biotechnology, (Ramawat, K. G. i Mérillon, J.-M., ured.), Springer, Berlin, str. 1-18.
- Yeung, A. W. K., Mocan, A. i Antanasov, A. G. (2018) Let food be thy medicine and medicine be thy food: A bibliometric analysis of the most cited papers focusing on nutraceuticals and functional foods. *Food Chemistry* 269, 455-465.
- Zeng, H., Xue, Y., Peng, T. i Shao, W. (2007) Properties of xylanolytic enzyme system in bifidobacteria and their effects on the utilization of xylooligosaccharides. *Food Chemistry* 101, 1172-1177.
- Zhang, L., Ye, X., Ding, T., Sun, X., Xu, Y. i Liu, D. (2013) Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure and rheological properties of apple pectin. *Ultrasonic Sonochemistry* 20, 222-231.
- Zhang, W., Johnson, A., M., Barone, J. R. i Renneckar, S. (2016) Reducing the heterogeneity of xylan through processing. *Carbohydrate Polymers* 150, 250-258.
- Zhang, Y., Zhang, P., Wang, Z. i Huang, L. (2011) An innovative derivatization method for simultaneous determination of uronic acids and neutral and amino sugars in coexisting samples by HPLC-ESI-MS/MS2. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 34, 1754-1771.
- Zhao, X. Cheng, K. i Liu, D. (2009) Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82, 815-827.
- Zhong, R. i Ye, Z.-H. (2015) Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. *Plant & Cell Physiology* 56, 195-214.
- Żyżelewicz, D., Nebesny, E., Budryn, G. i Krysiak, W. (2011) Technology and stability of probiotic and prebiotic confectionery products. U: Probiotic and Prebiotic Foods, (Shah, N. P., Gomes da Cruz, A., i Fonseca Faria, J. A., ured.), Nova Science Publishers, New York, str. 295-320.

***Životopis***



Aleksandra Vojvodić Cebin, dipl. ing., rođena je 16. studenoga 1984. godine u Sisku, Republika Hrvatska. Diplomirala je 2010. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, stekavši stručno zvanje diplomiranog inženjera biotehnologije. U srpnju 2011. godine zaposlila se kao znanstvena novakinja u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje i danas radi. Sveučilišni poslijediplomski studij Prehrambena tehnologija upisala je 2012. godine (akad. god. 2011./2012.) na istome fakultetu. Kao suradnica Laboratorija, sudjeluje u izvođenju nastave na preddiplomskim i diplomskim studijima PBF-a, izvođenjem vježbi i seminara na predmetima *Kemija i tehnologija ugljikohidrata i konditorskih proizvoda*, *Kemija i tehnologija uživala*, *Sladila* i *Prehrambene tehnologije namirnica biljnog podrijetla*. Također, sudjeluje u radu sa studentima prilikom izrade završnih, diplomskih i studentskih radova. Osim nastavne aktivnosti, sudjelovala je u provedbi nekoliko međunarodnih, bilateralnih i nacionalnih projekata, kao što su: projekt Hrvatske zaklade za znanost „*Održiva proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina*” (SPECH-LRM 9158; 2014.-2018.), europski FP7 projekt „*Processing Raw materials into Excellent and Sustainable End products while Remaining Fresh*“ (PRESERF, FP7-KBBE-2009-3; 2010.-2014.), projekt Ministarstava znanosti, obrazovanja i sporta „*Stabilnost alkaloida i polifenola u proizvodima biljnoga podrijetla*“ (2008.-2012.) te nekoliko bilateralnih projekata s Kinom, Njemačkom i Srbijom. Trenutno sudjeluje u provedbi projekta Hrvatske zaklade za znanost „*Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina*” (OPB-SLS/SPB-LCF 9717, 2018.-2022.) te bilateralnog hrvatsko-slovenskog projekta „*Razvoj liposoma obloženih pektinom i proteinima kao novih inkapsulacijskih sustava kvercetina dobivenog iz agro-industrijskog otpada*“.

Tijekom izrade doktorskog rada, u svrhu unaprjeđenja stručnih znanja i vještina, 3 mjeseca boravila je u Kemijskom institutu u Ljubljani (ožujak-lipanj 2013.) te 9 mjeseci u Francuskom institutu za istraživanja u poljoprivredi (INRA-BIA) u Nantesu (listopad 2015.- lipanj 2016.). U organizaciji COST Akcije FA 1001 sudjelovala je na 2 međunarodne stručne radionice: 2013. godine u Dublinu („*Designing food structures with health benefits- from concept to commercialisation*“) i 2014. godine u Milanu („*Gastro-intestinal engineering: the role of material properties and microstructure of foods in nutrient release in the gastro-intestinal tract*“).

Njezina istraživačka aktivnost usmjerena je na primjenu različitih tehnika za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz biljnih izvora te određivanje bioaktivnog i nutritivnog profila različitih proizvoda biljnoga podrijetla primjenom spektrofotometrijskih i HPLC analiza. U posljednje

vrijeme posebno je usmjerena na valorizaciju agro-industrijskog otpada, kao inovativnog izvora različitih funkcionalnih sastojaka, posebice na izdvajanje i primjenu biljnih polisaharida u proizvodnji i karakterizaciji fiziološki aktivnih oligosaharida.

Znanstveno-istraživački doprinos Aleksandre Vojvodić Cebin rezultirao je koautorstvom 1 poglavlja u knjizi, 13 izvornih znanstvenih radova indeksiranih u Current Contents, 13 radova objavljenih u zbornicima sa skupova te brojnom sudjelovanjima na međunarodnim kongresima. Aleksandra Vojvodić Cebin članica je organizacijskih odbora nacionalnog stručnog skupa „*Funkcionalna hrana u Hrvatskoj*“ od 2012. godine te nacionalnog natjecanja studenata „*Ecotrophelia Hrvatska*“ od 2014. godine do danas.

### Popis objavljenih radova:

#### Poglavlja u knjizi:

1. Komes, D.; **Vojvodić A.** (2014) Effects of varieties and growing conditions on antioxidant capacity of coffee. U: Processing and Impact on Antioxidants in Beverages (Preedy, V. R., ured.), Academic Press, Elsevier, Oxford, str. 77-85.

#### Izvorni znanstveni radovi objavljeni u CC časopisima (kategorija a1):

1. Karača, S., Trifković, K., Bušić, A., Đorđević, V., Belščak-Cvitanović, A., **Vojvodić Cebin, A.**, Bugarski, B., Komes, D. (2019) The functional potential of immortelle (*Helichrysum italicum*) based edible films reinforced with proteins and hydrogel particles. *LWT - Food Science and Technology*, 99, 387-395
2. Bušić, A., Komes, D., Belščak Cvitanović, A.; **Vojvodić Cebin, A.**, Špoljarić, I., Mršić, G., Miao, S. (2018) The potential of combined emulsification and spray drying techniques for encapsulation of polyphenols from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves. *Food Technology and Biotechnology* 56, 494-505.
3. Bušić, A., Belščak-Cvitanović, A., **Vojvodić Cebin, A.**, Karlović, S., Kovač, V., Špoljarić, I., Mršić, G., Komes, D. (2018) Structuring new alginate network aimed for delivery of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols using ionic gelation and new filler materials. *Food Research International* 111, 244-255.
4. Komes, D., Bušić, A., Belščak-Cvitanović, A., Brnčić, M., Bosiljkov, T., Vojvodić, A., Dujmić, F. (2017) Novel approach to the development of functional goat's milk-based beverages using medicinal plant extracts in combination with high intensity ultrasound treatment. *Food Technology and Biotechnology*, 55, 484-495.

5. Belščak-Cvitanović, A., Bušić, A., Barišić, L., Vrsaljko, D., Karlović, S., Špoljarić, I., **Vojvodić, A.**, Mršić, G., Komes, D. (2016) Emulsion templated microencapsulation of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols and  $\beta$ -carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin. *Food Hydrocolloids* 57,139-152.
6. Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Jurić, S., Bušić, A., **Vojvodić, A.**, Durgo, K. (2016) Consumer acceptability of liquorice root (*Glycyrrhiza glabra* L.) as an alternative sweetener and correlation with its bioactive content and biological activity. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 67, 53-66.
7. **Vojvodić, A.**, Komes, D., Vovk, I., Belščak-Cvitanović, A., Bušić, A. (2016) Compositional evaluation of selected agro-industrial wastes as valuable sources for the recovery of complex carbohydrates. *Food Research International* 89, 565-573.
8. Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Durgo, K., **Vojvodić, A.**, Bušić, A. (2015) Nettle (*Urtica dioica* L.) extracts as functional ingredients for production of chocolates with improved bioactive composition and sensory properties. *Journal of Food Science and Technology* 52, 7723-7734.
9. Komes, D., Bušić, A., **Vojvodić, A.**, Belščak-Cvitanović, A., Hruškar, M. (2015) Antioxidative potential of different coffee substitute brews affected by milk addition. *European Food Research and Technology* 241, 115-125.
10. Bušić, A., **Vojvodić, A.**, Komes, D., Akkermans, C., Belščak-Cvitanović, A., Stolk, M., Hofland, G. (2014) Comparative evaluation of CO<sub>2</sub> drying as an alternative drying technique of basil (*Ocimum basilicum* L.) – the effect on bioactive and sensory properties. *Food Research International* 64, 34-42.
11. Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Ljubičić, I., Durgo, K., Juranović Cindrić, I., Bušić, A., **Vojvodić, A.** (2014) Formulating blackberry leaf mixtures for preparation of infusions with plant derived sources of sweeteners. *Food Chemistry* 151, 385-393.
12. Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Škrabal, S., **Vojvodić, A.**, Bušić, A. (2013) The influence of dried fruits enrichment on sensory properties of bitter and milk chocolates and bioactive content of their extracts affected by different solvents. *LWT - Food Science and Technology* 53, 360-369.
13. Spilimbergo, S., Komes, D., **Vojvodić, A.**, Levaj, B., Ferrentino, G. (2013) High pressure carbon dioxide pasteurization of fresh-cut carrot. *The Journal of Supercritical Fluids* 79, 92-100.

**Izvorni znanstveni radovi objavljeni u drugim časopisima (kategorija a2):**

1. **Vojvodić Cebin, A.**, Petravić Tominac, V., Djaković, S., Srećec, S., Zechner-Krpan, V., Piljac Žegarac, J., Isikhuemhen, O. S. (2018) Polysaccharides and antioxidants from culinary- medicinal white button mushroom, *Agaricus bisporus* (*Agaricomycetes*), waste biomass. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 20, 797-808.
2. Bušić, A., Belščak-Cvitanović, A., Wang, Y., **Vojvodić, A.**, Karlović, S., Špoljarić, I., Mršić, G., Veršec, P., Vučilovski, J., Komes, D. (2016) Application of whey protein isolates and zein for formulation of alginate-based delivery systems encapsulating *Ganoderma lucidum* polyphenols. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 8, 99-106.
3. Drmić, H., **Vojvodić, A.**, Komes, D., Škrabal, S., Bušić, A., Belščak-Cvitanović, A., Miličević, B. (2013) Changes in the content of polyphenols and antioxidant capacity of chocolate liqueurs during three months of storage. *Technologica acta* 6, 1-9.

**Izvorni znanstveni radovi objavljeni u zbornicima skupova (kategorija a3):**

1. Ostrman, M., **Vojvodić Cebin, A.**, Bušić, A., Vrtar, S. & Komes, D. (2018) Development and characterization of edible films based on pectin from sugar beet pulp. *Proceedings of the 9th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists*, (Kovačević Ganić, K., Dragović-Uzelac, V. & Balbino, S., ured.), Croatian Society of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Zagreb, str. 37-42.
2. Ostrman, M., Soldo, M., Bušić, A., **Vojvodić Cebin, A.**, Poklar Ulrih, N. & Komes, D. (2018) Onion peel as a source of pectin and quercetin: extraction, characterization and fabrication of encapsulation systems. *Proceedings of the 9th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists*, (Kovačević Ganić, K., Dragović-Uzelac, V. & Balbino, S., ured.), Croatian Society of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Zagreb, str. 43-49.
3. Belščak-Cvitanović, A., Theismann, E. M., Bušić, A., **Vojvodić, A.**, Keppler, J., Steffen-Heins, A., Komes, D. (2017) Development of protein-polysaccharide complex hydrogel particles encapsulating model polyphenolic antioxidants. *Proceedings of the International Conference 16th Ružička days "Today Science - Tomorrow Industry"*, (Jukić, A., Šubarić, D., ured.), Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Zagreb, Osijek, str. 250-261.

4. Durgo, K., Bušić, A., **Vojvodić, A.**, Belščak-Cvitanović, A., Lisičar, M., Komes, D. (2017) Cytotoxic and prooxidative effect of ginger extract on human laryngeal and lung carcinoma cell lines. *Proceedings of the International Conference 16th Ružička days "Today Science - Tomorrow Industry"*, (Jukić, A., Šubarić, D., ured.), Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Zagreb, Osijek, str. 170-181.
5. Belščak-Cvitanović, A., Barić, T., Kušt, J., Komes, D., Djakovic, S., **Vojvodić, A.**, Bušić, A. (2014) Assessment of encapsulation efficiency of caffeine in alginate hydrogel beads blended with natural biopolymers. *Proceedings of the 8th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists*, (Frece, J., ured.), Hrvatsko društvo prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, Zagreb, str. 279-284.
6. Belščak-Cvitanović, A., Bušić, A., Ljubić, A., **Vojvodić, A.**, Komes, D. (2014) Evaluation of the nutraceutical potential of medicinal plants from the *Lamiaceae* family: HPLC profiling, antioxidant capacity and sensory acceptability. *Proceedings of the 8th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists*, (Frece, J., ured.), Hrvatsko društvo prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, Zagreb, str. 42-47.
7. Bušić, A., **Vojvodić, A.**, Komes D., Akkermans, C., Belščak-Cvitanović, A., Stolk, M., Hofland, G. (2014) Characterization of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) quality attributes affected by freeze drying and CO<sub>2</sub> drying. *Proceedings of the 8th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists* (Frece, J., ured.), Hrvatsko društvo prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, Zagreb, str. 59-64.
8. **Vojvodić, A.**, Komes, D., Jurić, S., Nutrizio, M., Belščak-Cvitanović, A., Bušić, A. (2014) The potential of agro-industrial waste as a source of dietary functional components. *Proceedings of the 8th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists* (Frece, J., ured.), Hrvatsko društvo prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, Zagreb, str. 36-41.
9. Chassaing, A., Komes, D., Bušić, A., Belščak-Cvitanović, A., **Vojvodić, A.** (2014) Preservation of polyphenolic antioxidants from Goji berries (*Lycium barbarum* L.) affected by different drying techniques *Proceedings of the 1st International Conference on Food Properties* (Rahman, M. S., ured.), Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur, str. 600-606.

10. Mihelj, T., Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., **Vojvodić, A.**, Cvrtila, I. (2014) Effect of multiple extractions and water-ethanol ratio on the bioactive composition and antioxidant capacity of Yinzhen tea. *Proceedings of the 1st International Conference on Food Properties* (Rahman, M. S., Ed.), Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur, str. 510-516.
11. Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Juranović Cindrić, I., **Vojvodić, A.**, Komes, D., Franekić, J. (2012) Bioactive compounds content, cytotoxic and antioxidant/prooxidant activity of different cocoa products on human laryngeal carcinoma cell line. *Proceedings of the 6th Central European Congress on Food* (Lević, J., Nedović, V., Ilić, N., Tumbas, V., Kalušević, A., ured.), Univerzitet u Novom Sadu, Naučni institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad, str. 108-113.
12. Ćosić, S., Škrabal, S., Komes, D., Bušić, A., **Vojvodić, A.**, Miličević, B., Belščak-Cvitanović, A., Hečimović, I. (2012) Effect of composition on bioactive profile of chocolate liqueurs. *Proceedings of the 6th Central European Congress on Food* (Lević, J., Nedović, V., Ilić, N., Tumbas, V., Kalušević, A., ured.), Univerzitet u Novom Sadu, Naučni institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad, str. 97-102.
13. Horvat, A., Horžić, D., Karlović, S., Komes, D., **Vojvodić, A.**, Belščak-Cvitanović, A., Hečimović, I., Ježek, D. (2012) Physical and sensory properties of chewing gums prepared with various sweeteners *Proceedings of the 6th Central European Congress on Food* (Lević, J., Nedović, V., Ilić, N., Tumbas, V., Kalušević, A., ured.), Univerzitet u Novom Sadu, Naučni institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad, str. 750-755.