

# Karakterizacija pektina izoliranog iz kore naranče

---

**Mahaček, Klaudija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:806587>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-09**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

**Klaudija Mahaček**  
0058219097

**Karakterizacija pektina izoliranog iz kore naranče**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Analitička kemija

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino

**Zagreb, 2024.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

## Karakterizacija pektina izoliranog iz kore naranče

Klaudija Mahaček, 0058219097

**Sažetak:** Pektin je biljni polisaharid koji zbog svojih gelirajućih i stabilizirajućih svojstava nalazi široku primjenu u prehrambenoj industriji, a u novije vrijeme na važnosti dobiva i u medicini te farmaceutskoj industriji. U velikoj se mjeri ekstrahira iz biootpada industrije za preradu voća. U okviru ovog rada istražen je utjecaj octene i klorovodične kiseline na parametre kvalitete pektina ekstrahiranog iz kore naranče. Ekstrakcija je provedena konvencionalnom metodom refluksiranja u vremenu od 3 h pri 80 °C. UV/Vis spektrofotometrijom i titrimetrijskim metodama određen je sadržaj galakturonske kiseline, ekvivalentna težina, sadržaj metoksi skupina, uronske kiseline te stupanj esterifikacije. Također su određeni parametri boje pektinskih uzoraka. Rezultati su pokazali da je veći prinos (2,25 %), stupanj esterifikacije (78,26 %) kao i veći udio galakturonske kiseline (96,10 %) dobiven ekstrakcijom 0,1 mol L<sup>-1</sup> klorovodičnom kiselinom. S obzirom na navedeno može se zaključiti da klorovodična kiselina veće jakosti u usporedbi sa octenom kiselinom utječe na efikasnije cijepanje jedinica galakturonske kiseline u pektinu što dovodi i do prirasta određivanih parametara.

**Ključne riječi:** pektin, ekstrakcija kiselinama, galakturonska kiselina, parametri kvalitete

**Rad sadrži:** 27 stranica, 8 slika, 4 tablica, 30 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino

**Datum obrane:** 16. rujan 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study of Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry  
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

Title of the undergraduate thesis

Klaudija Mahaček, 0058219097

**Abstract:** Pectin is a plant polysaccharide that is widely used in the food industry due to its gelling and stabilizing properties and has recently become increasingly important in medicine and the pharmaceutical industry. It is mainly obtained from the fruit bio-waste processing industry. In this work, the influence of acetic and hydrochloric acid on the quality parameters of pectin extracted from orange peels was investigated. The extraction was carried out using the standard reflux method for 3 hours at 80 °C. The content of galacturonic acid, the equivalent weight, the content of methoxy groups, the uronic acid and the degree of esterification were determined using UV/Vis spectrophotometry and titrimetric methods. The color parameters of the pectin samples were also determined. The results showed that a higher yield (2.25 %), a higher degree of esterification (78.26 %) and a higher proportion of galacturonic acid (96.10 %) were achieved by extraction with 0.1 mol L<sup>-1</sup> hydrochloric acid. As already mentioned, it can be concluded that hydrochloric acid, as a stronger acid than acetic acid, has an influence on the efficient cleavage of galacturonic acid into pectin, which leads to an increase in the parameters determined.

**Keywords:** pectin, acid extraction, galacturonic acid, quality parameters

**Thesis contains:** 27 pages, 8 figures, 4 tables, 30 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Antonela Ninčević Grassino, Ph.D, Associate Professor

**Thesis defended:** September 16, 2024

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. KORA NARANČE .....	2
2.2. PEKTIN .....	3
2.3. EKSTRAKCIJA REFLUKSIRANJEM.....	4
2.4. KARAKTERIZACIJA PEKTINA ANALITIČKIM METODAMA .....	5
2.4.1. UV/VIS SPEKTROFOTOMETRIJA.....	5
2.4.2. KISELINSKO - BAZNE TITRACIJE .....	5
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>8</b>
3.1. MATERIJAL .....	8
3.1.1. KEMIKALIJE.....	8
3.1.2. PRIBOR .....	8
3.1.3. APARATURA .....	9
3.2. METODE .....	9
3.2.1. EKSTRAKCIJA PEKTINA IZ UZORAKA KORE NARANČE REFLUKSIRANJEM .....	9
3.2.2. PRINOS PEKTINA .....	10
3.2.3. ODREĐIVANJE PARAMETARA BOJE PEKTINA .....	10

3.2.4. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE GALAKTURONSKE KISELINE.....	11
3.2.5. ODREĐIVANJE EKVIVALENTNE TEŽINE, SADRŽAJA METOKSI SKUPINA, SADRŽAJA URONSKIH KISELINA I STUPNJA ESTERIFIKACIJE U UZORCIMA PEKTINA .....	14
3.3. STATISTIČKA ANALIZA .....	15
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>16</b>
4.1. PRINOS PEKTINA.....	16
4.2. BOJA PEKTINA .....	17
4.3. SADRŽAJ GALAKTURONSKE KISELINE U UZORCIMA PEKTINA.....	18
4.4. EKVIVALENTNA TEŽINA, SADRŽAJ METOKSI SKUPINA, URONSKE KISELINE I STUPANJ ESTERIFIKACIJE.....	19
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>21</b>
<b>6. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>22</b>

## 1. UVOD

Pektin pripada polisaharidima bogatim galakturonskom kiselinom (sačinjava oko 70% pektina) u kojem su jedinice galakturonske kiseline s varijabilnim brojem metil-esterificiranih karboksilnih skupina međusobno povezane  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama.

Sadržan je u staničnim stijenkama biljaka koje okružuju rastuće i stanice u diobi, u staničnim stijenkama mekih dijelova biljke, srednjoj lameli, ksilemu i vlaknastim stanicama u drvenastom tkivu (Mohnen, 2008.). Laka dostupnost, niske cijene proizvodnje i netoksična svojstva omogućuju korištenje pektina u brojne svrhe. Nalazi široku primjenu u prehrambenoj industriji kao zgušnjivač, stabilizator i emulgator te u farmaceutskoj industriji za smanjenje razine kolesterola i glukoze u krvi, gastrointestinalnih poremećaja i u terapijama za liječenje karcinoma. Također se može koristiti i u pripremi jestivih filmova i premaza ili kao zamjena za papir. Zbog svega navedenog prisutna je potreba za istraživanjem novih ili modificiranjem postojećih sirovina sa svrhom dobivanja pektina željenih svojstava i kvalitete. U velikoj se mjeri ekstrahira iz biootpada industrije za preradu voća (Chandel i sur., 2022).

Najčešći izvori pektina za komercijalnu upotrebu su citrusi i jabuke, a u ovom istraživanju kao sirovina korištena je kora naranče kao jedan od nusproizvoda citrusa nakon prerade. Cilj ovog rada bio je ekstrahirati pektin iz kore naranče uporabom dviju različitih kiselina, octene i klorovodične, i usporediti njihov utjecaj na parametre kvalitete pektina.

Provedeno istraživanje obuhvaćalo je slijedeće korake:

- ekstrakciju uzoraka kore naranče refluksiranjem, filtraciju ekstrakta te izolaciju i pročišćavanje pektina
- spektrofotometrijsko određivanje sadržaja galakturonske kiseline u pektinu
- određivanje boje pektina
- određivanje ekvivalentne težine, metoksidnog sadržaja, stupnja esterifikacije i sadržaja anhidronskih kiselina u pektinu primjenom kiselinsko-baznih titracija

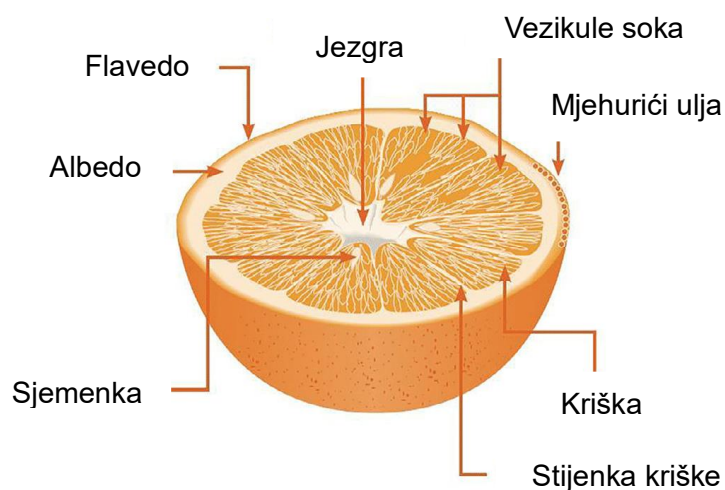
U teorijskom dijelu rada opisane su pojedine analitičke metode korištene pri karakterizaciji pektina, metode ekstrakcije, kao i struktura i primjena pektina te kemijski sastav kore naranče.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KORA NARANČE

Citrusi, iz roda *Citrus L.* i porodice *Rutaceae*, pripadaju voću uvelike konzumiranom među potrošačima diljem svijeta zbog karakterističnosti okusa, arome i privlačnih boja. Bogat su izvor mnogih fitokemikalija poput vitamina A, C i E, flavonoida (hesperidin), fenola (kumarin, fenolna kiselina), karotenoida (likopen, lutein,  $\beta$ -karoten), pektina, eteričnih ulja (d-limonen), organskih kiselina (limunska, jabučna kiselina) te limonoida (limonin, normilin), koje daju citrusima antioksidativno, antikarcinogeno i protuupalno djelovanje te doprinose usporavanju starenja kod ljudi (Sharma i sur., 2019; Zou i sur., 2016). Uzgoj naranči, kao i njihova prerada u porastu je iz godine u godinu. Organizacija za hranu i poljoprivredu (*engl.* Food and Agriculture Organization, FOA) Ujedinjenih naroda je 2018. procijenila svjetsku proizvodnju naranče na 75,54 milijuna tona, od čega je nakon prerade dobiveno 15,1 milijuna tona kore naranče (Ayala i sur., 2021).

Perikarp naranče dijeli se na epikarp, unutarnji i vanjski mezokarp i endokarp. Albedo (unutarnji mezokarp) i flavedo (vanjski mezokarp i epikarp) zajedno tvore koru (slika 1), a prema literaturnim navodima sadržava oko 23 % šećera, 22 % celuloze, 25 % pektina i 11 % hemiceluloze (Adeniyi i sur., 2022; Ayala i sur., 2021). Svi prethodno spomenuti podaci kori naranče pridaju status izvora bogatog spojevima od interesa u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, što ujedno doprinosi smanjenju neadekvatnog odlaganja ove vrste biootpada.



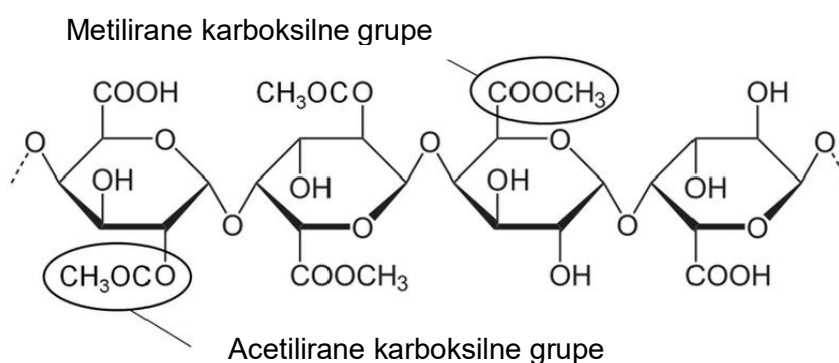
**Slika 1.** Prikaz strukturnog sastava naranče (Adeniyi i sur., 2022)



## 2.2. PEKTIN

Pektin je kompleksan heteropolisaharid čiju primarnu strukturu čini homogalakturnanska okosnica sačinjena od linearnih lanaca  $\alpha$ -D-galakturnanske kiseline povezanih  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama. Ramnogalakturnan-II predstavlja najkompleksniji dio strukture pektina, a riječ je o homogalakturnanu supstituiranom s oko 8 ili više bočnih lanaca sastavljenih od neutralnih šećera poput ramnoze, ksiloze, arabinoze, galaktoze i čini oko 10 % strukture pektina. Ramnogalakturnan-I sačinjava 20 - 35 % pektina, a okosnica mu se sastoji od jedinica galakturnanske kiseline i L- ramnoze povezanih  $\beta$ -1,2 i  $\beta$ -1,4 vezama, dok se bočni lanci najčešće sastoje od arabinoze i galaktoze (Mohnen, 2008).

Sinteza pektina u stanicama odvija se u Golgijevom tijelu, a obuhvaća polimerizaciju (u cis dijelu Golgijeva aparata), esterifikaciju te supstituciju s bočnim lancima (u trans dijelu Golgijeva aparata), nakon čega se pektin Golgijevim vezikulama izlučuje u staničnu stijenku. Esterifikacija metilnim skupinama odvija se na C-6 položaju, a acetilnim skupinama na O-2 i O-3 položaju lanca poligalakturnanske kiseline (slika 2).



**Slika 2.** Shema molekule pektina s mogućim metiliranim i aetiliranim skupinama (Schmidt i sur., 2015)

Pektin se prema stupnju esterifikacije dijeli u dvije skupine: visoko metil-esterificirani (*engl.* high-methoxyl, HE) ukoliko je stupanj esterifikacije (*engl.* degree of esterification, DE) iznad 50 %, te nisko metil-esterificirani pektin (*engl.* low-methoxyl, LE) u kojem je DE < 50 %. Stupanj esterifikacije smanjuje se porastom zrelosti pomoću enzima pektin metil esteraze, koja kao produkte reakcije daje slobodne, negativno nabijene karboksilne skupine i metanol. Za pripremu želea i slatkiša obično se koristi HE pektin koji formira gel u pH području ispod 3,5, dok se LE pektin primjerice dodaje ekstraktima soje, dijetnim i mliječnim proizvodima te formira gel u širem pH području (2,0 - 6,0) u prisutnosti kalcijevih ili drugih viševalentnih kationa (Chandel i sur., 2022; Freitas i sur., 2021). Osim citrusa i

jabuke, kao najčešćih sirovina za proizvodnju komercijalnog pektina, proveden je čitav niz istraživanja usmjerenih prema korištenju i drugih izvora poput rajčice, bundeve, suncokreta, lubenice, marakuje, banane ili čak mrkve (Robledo i Vazquez, 2020). Pored već spomenutih primjena pektina u uvodu ovog rada, u novijim istraživanjima pokazao se prikladnim i za primjenu u tkivnom inženjerstvu, genskoj terapiji te u dizajniranju biosenzora gdje su hidrogelovi pektina korišteni za imobilizaciju enzima (Roman-Benn i sur., 2023).

### 2.3. EKSTRAKCIJA REFLUKSIRANJEM

Ekstrakcija refluksiranjem ili grijanje u povrat pripada klasičnim metodama korištenih za ekstrakciju krutina. Aparatura za provedbu refluksiranja sastoji se od vodene kupelji, tikvice s okruglim dnom, povratnog hladila i magnetne miješalice (slika 3). Otapalo i kruti uzorak postavljaju se u tikvicu s okruglim dnom te se željena komponenta ekstrahira zagrijavanjem otapala. Pare otapala u povratnom hladilu kondenziraju te se vraćaju u reakcijsku smjesu. Nakon ovakve vrste ekstrakcije potrebno je provesti filtraciju dobivenih ekstrakata.



**Slika 3.** Aparatura za refluksiranje (vlastita fotografija)

## 2.4. KARAKTERIZACIJA PEKTINA ANALITIČKIM METODAMA

### 2.4.1. UV/Vis spektrofotometrija

UV/Vis spektrofotometrija analitička je metoda temeljena na mjerenju apsorpcije elektromagnetskog zračenja u području valnih duljina 200 - 400 nm (područje ultraljubičastog zračenja, UV zračenje) te nadalje 400 - 800 nm (područje vidljive svjetlosti, Vis). Ovom metodom moguće je dobiti informacije i o kvalitativnom i o kvantitativnom sastavu otopine, iako se najčešće koristi za određivanje koncentracije, odnosno kvantitativnu analizu.

Mjerenje apsorbancije vrši se spektrofotometrom, uređajem čiji su osnovni dijelovi izvor svjetlosti, monokromator za odabir željene valne duljine, držač uzorka (kiveta), detektor i procesor signala. Za određivanje nepoznate koncentracije analita u otopini potrebna je kalibracija poznatim koncentracijama analita u istom otapalu kao i u otopinama uzorka nepoznate koncentracije te konstrukcija baždarnog pravca koji prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji.

Temeljno načelo apsorpcijske spektroskopije koje prikazuje odnos između apsorpcije i koncentracije jest Lambert-Beerova zakona [1] koji glasi:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad [1]$$

pri čemu  $A$  označava apsorbanciju,  $\varepsilon$  molarni apsorpcijski koeficijent ( $\text{mol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ),  $c$  koncentraciju otopine ( $\text{mol L}^{-1}$ ) te  $b$  debljinu sloja otopine (cm). Iz jednadžbe zakona vidljiv je linearan odnos koncentracije i apsorbancije.

### 2.4.2. Kiselinsko - bazne titracije

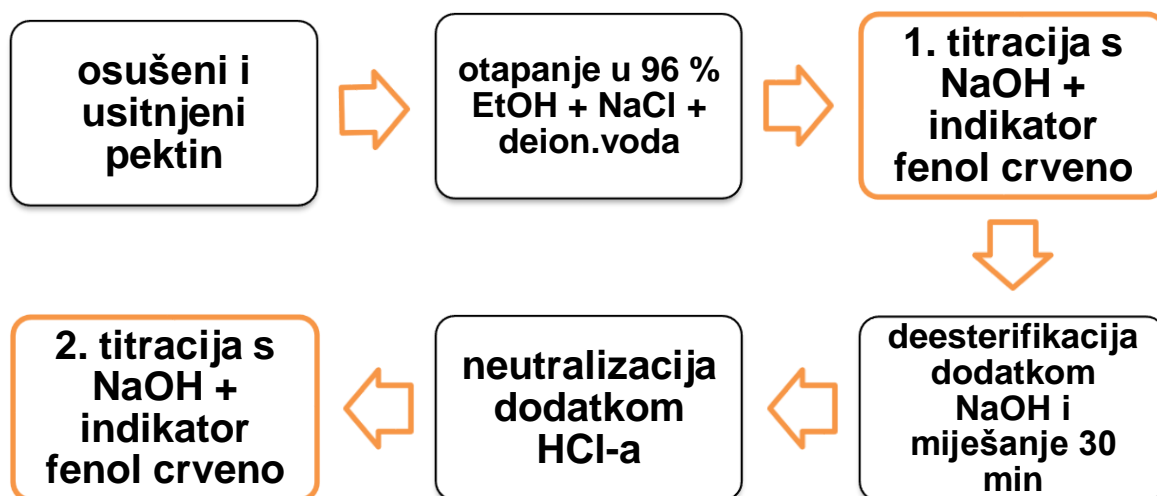
Kiselinsko-bazne titracije svrstavaju se u volumetrijske analitičke metode korištene u biomedicinskim znanostima i analitičkoj kemiji za kvantitativno određivanje analita u otopini (Pierre, 2019). Volumetrijske titracije općenito mjere utrošak volumena reagensa potrebnog za potpuno reakciju s analitom. Postupak se provodi tako da se iz birete dodaje titrant (reagens) u otopinu uzorka do završetka reakcije između analita i titranta. Za uočavanje promjena, tj. kraja reakcije u otopinu koja se titrira dodaju se indikatori. Količina analita u uzorku izračunava se iz podataka o volumenu otopine uzorka te volumenu i koncentraciji reagensa (standardne otopine) potrošenog u reakciji sa analitom.

Kiselinsko - bazne titracije temelje se na reakcijama između kiselina i baza. Kada se baza titrira standardnom otopinom jake kiseline riječ je o acidimetriji, dok se pojam

alkalimetrija odnosi na titraciju kiseline standardnom otopinom jake baze. Prethodno opisana vrsta titracija pronašla je primjenu u karakterizaciji pektina jer omogućuje istovremeno određivanje sadržaja metoksi skupina, uronskih kiselina, ekvivalentne težine te stupnja esterifikacije (Ninčević Grassino i sur., 2018).

Stupanj esterifikacije definira se kao postotak karboksilnih skupina D-galakturonske kiseline koje su prošle proces esterifikacije, odnosno koje su metil-esterificirane. Neki od faktora koji utječu na stupanj esterifikacije su zrelost ploda koji služi kao izvor pektina i vrijeme ekstrakcije. Pretvorbom pektina u protopektin tijekom zriobe, u kiselim uvjetima i pri povišenim temperaturama, dolazi do povećanja sadržaja šećera i mekšanja ploda što rezultira smanjenjem stupnja esterifikacije (Roman-Benn i sur., 2023). Sadržaj metoksi skupina označava molarnu količinu metilnog alkohol u 100 mL galakturonske kiseline i važan je čimbenik kod određivanja uvjeta u kojima pektin formira gelove. Sadržaj ukupnih uronskih kiselina (AUA) ukazuje na čistoću ekstrahiranog pektina i vrijednost ne bi trebala biti niža od 65 % za primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Hossain i sur., 2024).

Najčešći postupak titracije za karakterizaciju pektina gore navedenim parametrima shematski je prikazan na slici 4 te podrazumijeva potpuno otapanje pektina u otopini s 96 % etanolom (5 mL), natrijevim kloridom (1 g) te deioniziranom vodom (100 mL). Zatim se pristupa prvoj titraciji otopine s  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  natrijevim hidroksidom uz korištenje fenol crvenog kao indikatora. U titriranu otopinu dodaje se  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  otopina natrijeva hidroksida kako bi se pektin deesterificirao te se otopina miješa 30 minuta. Za neutralizaciju natrijeva hidroksida dodaje se  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  klorovodična kiselina, nakon čega slijedi druga titracija  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  natrijevim hidroksidom do promjene boje. Kao nedostaci ove analitičke metode izdvajaju se zahtjev za visokom čistoćom pektina i nerazlikovanje D-galakturonske kiseline od ostalih prisutnih uronskih kiselina u pektinu (Ninčević Grassino i sur., 2018).



**Slika 4.** Shematski prikaz postupka kiselinско - bazne titracije za karakterizaciju pektina  
(vlastita shema)

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. MATERIJAL**

Kao materijal u ovom istraživanju korištena je kora zrele naranče kupljene u supermarketu. Do provedbe istraživanja, nasjeckana kora bila je zamrznuta, a na početku eksperimenta odmrznuta je i dodatno usitnjena električnim mlincem za kavu (Tefal S. A. S., Francuska).

##### **3.1.1. Kemikalije**

- Aceton (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Citrusni pektin (Thermo Scientific, Waltham, SAD)
- Etanol (96 %) (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Galakturonska kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Jabučni pektin (Sigma-Aldrich, Hong Kong, Kina)
- Karbazol (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- Klorovodična kiselina (Kefo, Zagreb, Hrvatska)
- Metil crveno (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Natrijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Sumporna kiselina (Kefo, Zagreb, Hrvatska)
- Octena kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

##### **3.1.2. Pribor**

- Automatske pipete (100  $\mu$ L - 5 mL)
- Bireta po Schelbachu
- Erlenmeyerove tikvice (250 - 1000 mL)
- Filter papir
- Kapaljka
- Lađice za vaganje
- Magnetići
- Odmjerne tikvice (25, 100 i 1000 mL)
- Pinceta
- Plastične i staklene kivete
- Plastične i staklene laboratorijske čaše (150 - 600 mL)
- Plastični i stakleni ljevci
- Plastične i staklene menzure (50, 100 i 500 mL)

- Propipeta
- Stakleni štapić
- Špatula
- Tarionik s tučkom
- Tikvice s okruglim dnom (500 mL)
- Trbušaste pipete (2, 5 i 10 mL)
- Žlice

### 3.1.3. Aparatura

- Analitička vaga (JOBST, Samobor, Hrvatska)
- Kolorimetar CM-3500d (Konica Minolta Sensing, Inc. Osaka, Japan)
- Magnetska miješalica (Kefo, Zagreb, Hrvatska)
- Mlinac za kavu (Tefal S. A. S., Francuska)
- Sustav za vakuum i mikrofiltraciju Rocker 300-LF30 (Rocker Scientific Co. Ltd, New Taipei City, Tajvan)
- Tehnička vaga (Mikrotehna, Zagreb, Hrvatska)
- UV/Vis Spektrofotometar (Perkin Elmer, Lambada 1, Massachusetts, SAD)
- Vortex

## 3.2. METODE

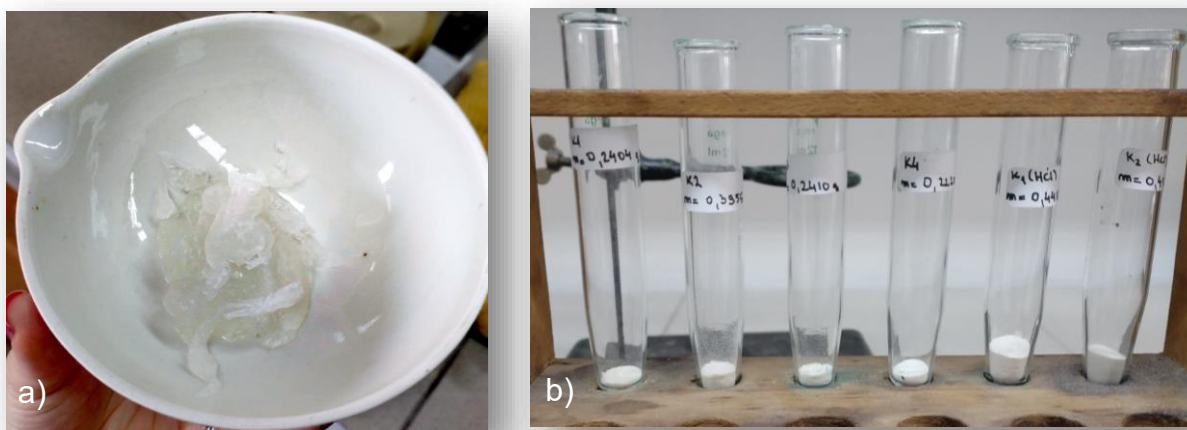
U ovom radu provedene su slijedeće metode:

- Ekstrakcija kore naranče refluksiranjem i izolacija pektina
- Određivanje  $L$ ,  $a$  i  $b$  parametara boje pektina
- Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja galakturonske kiseline u uzorcima izoliranog pektina
- Kiselinsko - bazne titracije

### 3.2.1. Ekstrakcija pektina iz uzoraka kore naranče refluksiranjem

Odvagani uzorci usitnjene kore naranče od 20 g stavljani su u tikvice s okruglim dnom volumena 500 mL. Kao otapalo uzorcima je dodano po 400 mL  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  octene, odnosno po 400 mL  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  klorovodične kiseline te su tikvice postavljene u aparaturu za refluksiranje (slika 3) u vremenu od 3 h pri  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon refluksiranja uzorci se hlade na sobnoj temperaturi te najprije filtriraju preko gaze, a zatim preko običnog filter papira. Kako bi se uklonili interferenti, otopine su dodatno filtrirane pomoću vakuum filtra (Rocker Scientific Co. Ltd, New Taipei City, Tajvan) i prenesene u Erlenmeyerove tikvice od 1000

mL. Koagulacija filtrata postignuta je dodatkom 800 mL etanola (96 %) i miješanjem na magnetnoj miješalici u trajanju od 3 h. Dobivena suspenzija filtrira se preko običnog filter papira na kojem zaostaje pektin koji se ispiru acetonom i etanolom (96 %) s ciljem pročišćavanja. Pektin se, u želatinastoj formi, špatulom prenese u porculanske posude i suši na zraku pri sobnoj temperaturi. Osušeni uzorci pektina zatim se usitnjavaju u tarioniku s tučkom, važu na analitičkoj vagi i prenose u staklene kivete u kojima se čuvaju do daljnje provedbe analize (slika 5).



**Slika 5.** a) pektin dobiven nakon ekstrakcije i koagulacije etanolom i b) osušeni i usitnjeni pektin (vlastita fotografija)

### 3.2.2. Prinos pektina

Prinos pektina ( $\eta$ ) računa se kao omjer mase usitnjenog i osušenog pektina izvagane na analitičkoj vagi (JOBST, Samobor, Hrvatska) i početne mase uzorka kore naranče [2]:

$$\eta (\text{pektin}) = \frac{m (\text{pektin})}{m (\text{uzorak})} \cdot 100 \quad [2]$$

### 3.2.3. Određivanje parametara boje pektina

Uzorcima pektina određuju se parametri boje korištenjem kolorimetra CM-3500d čiji se rad temelji na trodimenzionalnom prostoru boja CIE  $L^*a^*b^*$ , koji objektivno vrednuje boje i najbliži je vizualnoj percepciji. Kolorimetrom se mjere Hunterovi parametri, odnosno  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti.



Vrijednost  $L^*$  (*engl.* lightness) predstavlja svjetlinu, pri čemu više  $L^*$  vrijednosti ukazuju na slabije, svjetlije obojenje, a niže na tamniju obojenost uzorka. Parametar  $a^*$  predstavlja odnos crvene i zelene, dok  $b^*$  parametar označava odnos žute i plave komponente boje prema idućim značenjima:

- $-a^*$  označava zelenu,  $+a^*$  vrijednost crvenu boju
- $-b^*$  označava plavu,  $+b^*$  vrijednost označava žutu boju

Nakon izmjerenih prethodno opisanih parametara, računa se ukupna kolorimetrijska razlika ( $\Delta E$ ) među uzorcima prema izrazu [3] u odnosu na jabučni i citrusni pektin, koji su u ovom istraživanju korišteni kao standard, odnosno referentni uzorak [formule 4, 5 i 6].

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad [3]$$

$$\Delta L^* = L_{\text{uzorak}} - L_{\text{standard}} \quad [4]$$

$$\Delta a^* = a_{\text{uzorak}} - a_{\text{standard}} \quad [5]$$

$$\Delta b^* = b_{\text{uzorak}} - b_{\text{standard}} \quad [6]$$

Odstupanje boje ispitivanog od referentnog uzorka tumači se prema slijedećim kriterijima:

- $-\Delta L$ : uzorak je tamniji od standarda
- $+\Delta L$ : uzorak je svjetliji od standarda
- $-\Delta a$ : uzorak je zeleniji od standarda
- $+\Delta a$ : uzorak je crveniji od standarda
- $-\Delta b$ : uzorak je plavlji od standarda
- $+\Delta b$ : uzorak je žući od standarda

### 3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje galakturonske kiseline u uzorcima pektina

Princip spektrofotometrijskog mjerenja opisan je u poglavlju 2.4.1., a postupak određivanja udjela galakturonske kiseline sastojao se od pripreme standardnih otopina galakturonske kiseline pomoću kojih se izrađuje baždarni pravac na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancije, pripreme uzoraka za mjerenje apsorbancije i u konačnici izračuna nepoznate masene koncentracije galakturonske kiseline u uzorcima pektina.

### 3.2.4.1. Priprema standardnih otopina galakturonske kiseline i izrada baždarnog dijagrama

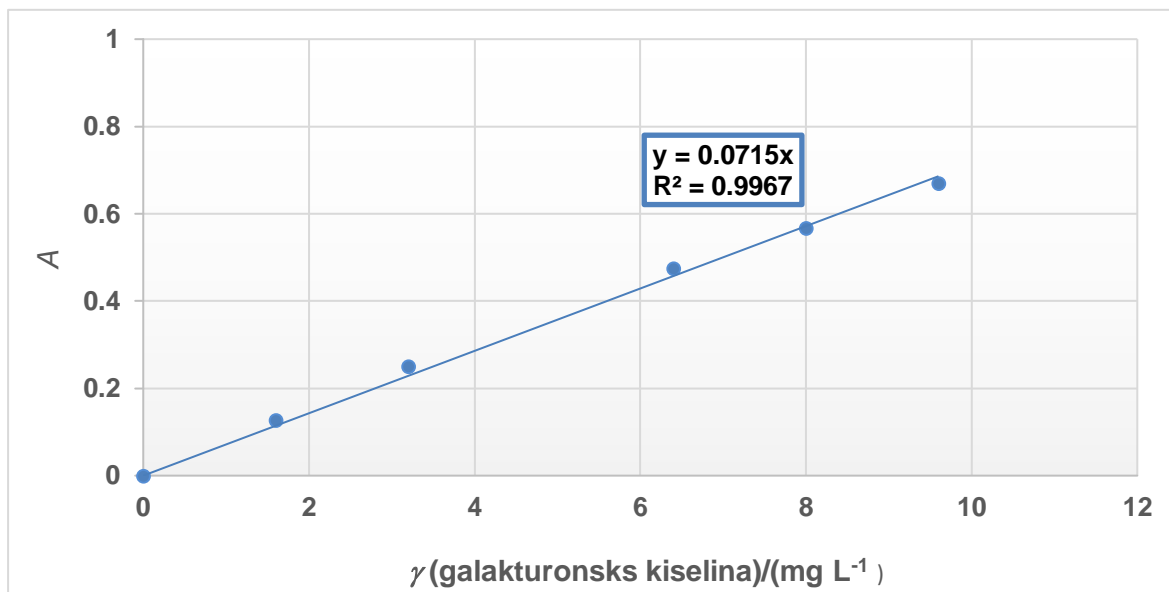
Odvagano je 120,5 mg galakturonske kiseline, kvantitativno prenešeno u odmjernu tikvicu od 1000 mL, nakon čega je dodano 10 mL 0,05 mol L<sup>-1</sup> otopine natrijeva hidroksida, nadopunjeno s destiliranom vodom do oznake i ostavljeno stajati preko noći.

Iz pripremljene ishodne otopine galakturonske kiseline priređene su pojedinačne standardne otopine masenih koncentracija 1,6; 3,2; 6,4; 8,0; 9,6 i 13,0 mg L<sup>-1</sup> u odmjernim tikvicama od 100 mL, nadopunjavanjem s destiliranom vodom.

Točno 2 mL pojedine otopine standarda otpipetirano je u odmjerne tikvice od 25 mL, a potom je dodano 1 ml 0,1 % (w/v) karbazola i 12 ml koncentrirane sumporne kiseline uz konstantno miješanje. Nakon dodatka kiseline, otopina je ostavljena 15 min na sobnoj temperaturi, kako bi došlo do razvitka ružičastog obojenja, a potom je nastalom kompleksu izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 525 nm. Slijepa proba je pripremljena tako da je umjesto 2 mL standarda i 1 karbazola, upotrijebljeno 2 mL destilirane vode, odnosno 1 mL 96 % etanola. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija i pripadajućih masenih koncentracija pojedinačnih standardnih otopina galakturonske kiseline (tablica 1) izrađen je baždarni dijagram (slika 6).

**Tablica 1.** Masene koncentracije standardnih otopina galakturonske kiseline i pripadajuće izmjerene vrijednosti apsorbancije mjerene pri valnoj duljini od 525 nm

$\gamma$ (galakturonska kiselina)/(mg L <sup>-1</sup> )	$\bar{A} \pm SD$
0,0	0,000 $\pm$ 0,000
1,6	0,126 $\pm$ 0,003
3,2	0,249 $\pm$ 0,417
6,4	0,474 $\pm$ 0,004
8,0	0,566 $\pm$ 0,032
9,6	0,670 $\pm$ 0,0382
13,0	0,894 $\pm$ 0,0007



**Slika 6.** Baždarni dijagram galakturonske kiseline

### 3.2.4.2. Priprema uzoraka za spektrofotometrijsko mjerenje

Odvagano je 100 mg uzorka i otopljeno u 100 mL 0,05 mol L<sup>-1</sup> otopine natrijeva hidroksida. Otopina je ostavljena 30 minuta na sobnoj temperaturi kako bi došlo do deesterifikacije pektina. Točno 2 mL deesterificirane otopine razrijeđeno je s destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL. Potom je otpipetirano 3 mL razrijeđene otopine, dodano 1 mL karbazola i 12 mL koncentrirane sumporne kiseline uz konstanto miješanje do razvitka ružičastog obojenja (slika 7). Nakon 15 min priređenim uzorcima izmjerena je apsorbancija na valnoj duljini od 525 nm.



**Slika 7.** Uzorci pripremljeni za mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini od 525 nm (vlastita fotografija)

### 3.2.4.3. Određivanje nepoznate koncentracije galakturonske kiseline u uzorcima

Nepoznate masene koncentracije ( $\text{mg L}^{-1}$ ) galakturonske kiseline u otopinama pektina određuju se iz prethodno izrađenog baždarnog dijagrama (slika 6), a potom su dobivene vrijednosti pretvorene u g galakturonske kiseline na 100 g uzorka, uzevši u obzir odvagu, volumen otopine pektina i razrijeđenje.

### 3.2.5. Određivanje ekvivalentne težine, sadržaja metoksi skupina, sadržaja uronskih kiselina i stupnja esterifikacije u uzorcima pektina

- **Ekvivalentna težina (EW)**

Odvažuje se 0,25 g pektina u Erlenmeyerovu tikvicu od 250 mL, doda se 5 mL etanola (96 %), 1 g NaCl i 100 mL prokuhane destilirane vode. Zbog nedostatka uzorka u ispitivanju korišteno je 0,187 g pektina izoliranog pomoću klorovodične kiseline. Otopina se promiješa te doda indikator metil crveno (crvena boja otopine). Ovako priređena otopina se titrira sa  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  otopinom NaOH do promjene boje (iz crvene u žutu). Ekvivalentna težina (*engl.* equivalent weight, EW) računa se iz izraza [7]:

$$EW = \frac{m(\text{uzorka})}{V_1(\text{NaOH}) \cdot c(\text{NaOH})} \quad [7]$$

- **Metoksilni ostatak (MeO)**

Prethodnoj otopini dobivenoj nakon titracije (određivanje ekvivalentne težine) doda se 25 mL  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  otopine NaOH. Miješa se snažno na magnetskoj mješalici tijekom 30 min, pri čemu dolazi do pretvorbe žute boje otopine u crvenu. Slijedi titracija s otopinom NaOH koncentracije  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  uz indikator metil crveno do pojave žute boje otopine. MeO sadržaj izračuna se iz formule [8]:

$$w(\text{MeO}) = \frac{V_2(\text{NaOH}) \cdot c(\text{NaOH}) \cdot 31}{m(\text{uzorak})} \cdot 100 \quad [8]$$

- **Određivanje sadržaja uronske kiseline (AUA)**

Sadržaj ukupnih uronskih kiselina računa se iz formula [9] i [10]:

$$Z = \frac{m(\text{uzorak})}{V_1(\text{NaOH}) \cdot c_1(\text{NaOH}) + V_2(\text{NaOH}) \cdot c_2(\text{NaOH})} \quad [9]$$

$$AUA = \frac{176 \cdot 100}{z} \quad [10]$$

Za izračun z vrijednosti koriste se volumeni natrijeva hidroksida utrošenog za 1. titraciju kod određivanja ekvivalentne težine (oznaka  $V_1$  u formuli [9] ), odnosno za 2. titraciju kod određivanja sadržaja metoksi skupina (oznaka  $V_2$ ).

- **Stupanj esterifikacije (DE)**

Stupanj esterifikacije računa se prema izrazu [11]:

$$DE = \frac{176 \cdot \text{MeO} (\%) \cdot 100}{31 \cdot \text{AUA} (\%)} \quad [11]$$

Za izračun se koriste prethodno dobivene vrijednosti Meo i AUA izračunate prema formulama [8] i [10].

### 3.3. STATISTIČKA ANALIZA

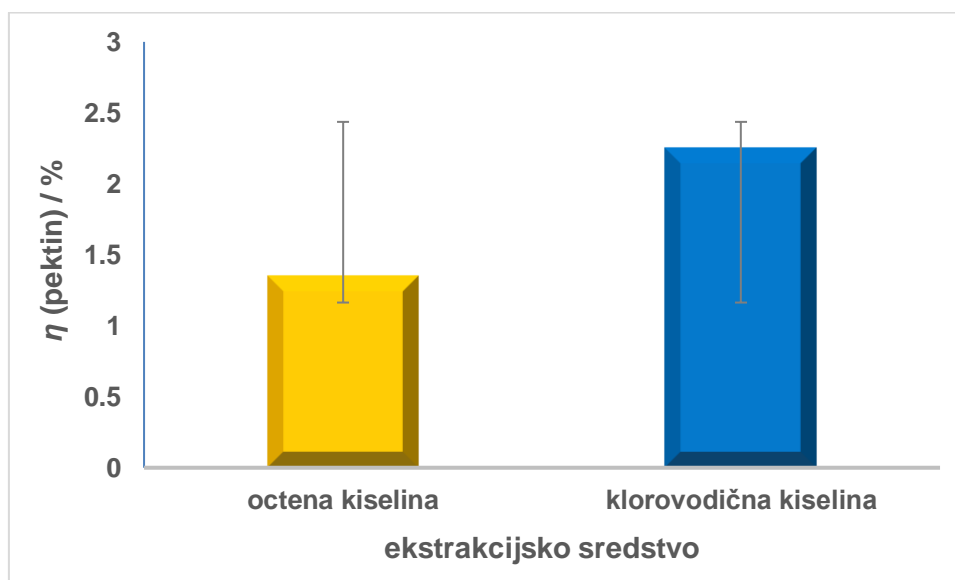
Za statističku analizu podataka korišten je program Microsoft Excel 2020. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti triju paralelnih mjerenja ( $n = 3$ ) uz pripadajuće standardne devijacije (SD).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. PRINOS PEKTINA

Prinos izoliranog pektina ovisi o izvoru pektina, metodi i uvjetima ekstrakcije, vrsti i koncentraciji ekstraktanta te količini etanola korištenog za taloženje i pročišćavanje (Twinomuhwezi i sur., 2023; Leong i sur., 2015 ). Budući da su u ovom istraživanju izvor pektina, metoda i uvjeti ekstrakcije (vrijeme i temperatura) bili jednaki za oba uzorka, faktor koji utječe na prinos je ekstrakcijsko otapalo.

U priloženom grafu (slika 8) prikazani su ostvareni prinosi pektina ekstrahiranog korištenjem dviju različitih kiselina. U slučaju octene kiseline ostvaren je prinos od 1,35 %, a kod ekstrakcije klorovodičnom kiselinom 2,25 %.



**Slika 8.** Prinosi pektina dobivenog ekstrakcijom octenom i klorovodičnom kiselinom

Rezultati uspoređeni među uzorcima u skladu su s očekivanjima da će viši prinos biti postignut ekstrakcijom jakim anorganskim nego li slabom organskom kiselinom. Twinomuhwezi i suradnici (2023) u svom istraživanju postigli su prosječan prinos pektina izoliranog iz kore naranče u iznosu od 14,08 % dodatkom klorovodične kiseline (pH = 1,27). Duwee i suradnici (2022) istraživali su utjecaj organskih i anorganskih kiselina na prinos pektina iz kore naranče i jednake prinose postigli ekstrakcijom limunskom i dušičnom kiselinom (3,82 %), a zatim octenom (1,95 %). Najslabiji rezultat dobiven je ekstrakcijom klorovodičnom (1,57 %) što su objasnili činjenicom da zbog svoje jakosti dovodi do djelomične hidrolize pektina i nemogućnosti taloženja. Ninčević Grassino i suradnici (2020)

ekstrakcijom pektina refluksiranjem (3 h) iz kore rajčice postižu prinos pektina od 7,9 % korištenjem dušične kiseline kao ekstraktanta, dok najveći prinos (9,2 %) postižu primjenom ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom u trajanju od 45 min. Sve navedeno potvrđuje da vrsta i uvjeti ekstrakcije, otapalo te izvor pektina doista utječu na prinos. Iako je u ovom istraživanju nešto slabiji prinos pektina ostvaren korištenjem octene kiseline, ipak bi trebala imati prednost u daljnjim istraživanjima pred klorovodičnom zbog manje toksičnosti i škodljivosti prema okolišu.

#### 4.2. BOJA PEKTINA

Mjerenje parametara boje pektina važnost pronalazi u činjenici da upravo boja izoliranog pektina utječe na izgled finalnog proizvoda koji ga sadrži u svom sastavu. Poželjniji su svjetliji, odnosno što manje obojeni pektini zbog manjeg utjecaja na boju konačnog proizvoda (Leong i sur., 2016).

U Tablici 2 prikazani su rezultati mjerenja parametara boje kolorimetrom po CIE  $L$ ,  $a$  i  $b$  sistemu kako je opisano u poglavlju 3.2.3.

Rezultati pokazuju da je uzorak pektina dobiven ekstrakcijom s octenom kiselinom svjetliji u odnosu na oba standarda, dok je pektin ekstrahiran klorovodičnom kiselinom svjetliji u odnosu na jabučni, a tamniji u odnosu na citrusni pektin. Nadalje, negativne  $\Delta a$  te  $\Delta b$  vrijednosti u slučaju obje vrste uzoraka ukazuju na zeleniju i izraženije plavljaju obojenost naspram referentnih uzoraka. Ukoliko se uspoređuju uzorci međusobno, pektin ekstrahiran octenom nešto je svjetliji ( $L = 81,62$ ) i ima nižu  $a$  vrijednost ( $a = 0,57$ ) od onog ekstrahiranog klorovodičnom ( $L = 78,13$  i  $a = 3,12$ ) pa bi zbog navedenog bio u većoj prednosti za primjenu u prehrambenoj industriji. Višu  $a$  vrijednost pektina u uzorku 2 (tablica 2) moguće je obrazložiti činjenicom da je tijekom ekstrakcije, provođene u istim uvjetima vremena i temperature s obje kiseline, klorovodična kao jaka anorganska kiselina koekstrahirala fenole ili druge topive pigmente, kako u svom radu navode Ninčević Grassino i suradnici (2016). Ukupna kolorimetrijska razlika ( $\Delta E$ ) u odnosu na jabučni pektin veća je u slučaju uzorka 1 (octena kiselina), dok je u odnosu na citrusni pektin ta vrijednost u slučaju oba uzorka podjednaka (za octenu 15,28; za klorovodičnu 15,81).

**Tablica 2.** Parametri boje uzoraka pektina ekstrahiranih octenom i klorovodičnom kiselinom

PARAMETRI BOJE	JABUČNI PEKTIN	CITRUSNI PEKTIN	UZORAK 1 (OCTENA)	UZORAK 2 (KLOROVODIČNA)
<i>L</i>	70,86	80,35	81,62 ± 2,74	78,13 ± 4,41
<i>a</i>	6,56	3,6	0,57 ± 0,38	3,12 ± 0,66
<i>b</i>	19,33	26,21	11,29 ± 2,24	10,57 ± 1,86
$\Delta L$ (J)	/	/	10,76 ± 2,74	7,27 ± 4,41
$\Delta a$ (J)	/	/	-5,99 ± 0,38	-3,45 ± 0,66
$\Delta b$ (J)	/	/	-8,04 ± 2,14	-8,77 ± 1,86
$\Delta E$ (J)	/	/	14,71 ± 3,21	11,91 ± 4,21
$\Delta L$ (C)	/	/	1,27 ± 2,74	-2,22 ± 4,41
$\Delta a$ (C)	/	/	-3,03 ± 0,38	-0,49 ± 0,66
$\Delta b$ (C)	/	/	-14,92 ± 2,24	-15,65 ± 1,86
$\Delta E$ (C)	/	/	15,28 ± 2,52	15,81 ± 1,22

**J** - vrijednosti izračunate u odnosu na jabučni pektin, **C** - vrijednosti izračunate u odnosu na citrusni pektin

#### 4.3. SADRŽAJ GALAKTURONSKE KISELINE U UZORCIMA PEKTINA

Nepoznate vrijednosti masenih koncentracija ukupne galakturonske kiseline u izoliranim uzorcima pektina određene su iz regresijskog pravca (slika 6), a potom su dobivene vrijednosti pretvorene u g galakturonske kiseline na 100 g uzorka (tablica 3).

Rezultati prikazani u tablici 3 pokazuju visoke udjele galakturonske kiseline u slučaju oba uzorka, za uzorak 1 (octena kiselina) maseni udio iznosi 75,48 % te 96,10 % za uzorak 2 (klorovodična kiselina). Oba uzorka zadovoljavaju kriterij prema kojemu bi sadržaj galakturonske kiseline trebao biti veći od 65 % (FAO, 2009) za primjenu pektina kao prehrambeng aditiva. Pektini izolirani u intezivno kiselim uvjetima, poput ekstrakcije klorovodičnom kiselinom, općenito su bogati galakturonskom kiselinom što je posljedica hidrolize neutralnih šećera prisutnih u ramnogalakturonskim dijelovima pektina. Veze između galakturonskih jedinica stabilnije su i otpornije na kiselinsku hidrolizu u odnosu na veze između ramnoze i galakturonske kiseline i na veze između neutralnih šećera (Vakilian i sur., 2023). Yapo (2009) je istražio utjecaj ekstraktanta na prinos i parametre kvalitete pektina izoliranog iz marakuje te je pokazao kako pektin izoliran limunskom kiselinom



sadrži 64,9 %, dok onaj ekstrahiran sumpornom kiselinom 77,3 % galakturonske kiseline. Pektin s visokim udjelima galakturonske kiseline (68,52 - 93,64 %) ekstrahiraju i Zanella i Taranto (2015) iz sušene kore naranče, dok rezultat vrlo sličan ovom istraživanju za ekstrakciju pektina octenom kiselinom iz jabuke dobivaju Luo i suradnici (2019) u iznosu od 75,90 %.

**Tablica 3.** Maseni udio galakturonske kiseline u uzorcima pektina dobivenim ekstrakcijom octenom i klorovodičnom kiselinom.

	$\bar{A} \pm SD$	$w$ (galakturonska kiselina) / % $\pm SD$
<b>Uzorak1 (OCTENA)</b>	0,206 $\pm$ 0,005	75,48 $\pm$ 1,874
<b>Uzorak 2 (KLOROVODIČNA)</b>	0,258 $\pm$ 0,011	96,10 $\pm$ 4,031

#### 4.4. EKVIVALENTNA TEŽINA, SADRŽAJ METOKSI SKUPINA, URONSKE KISELINE I STUPANJ ESTERIFIKACIJE

Ekvivalentna težina, sadržaj metoksi skupina, uronske kiseline te stupanj esterifikacije određeni su kiselinsko - baznim titracijama opisanim u poglavljima 2.4.2. i 3.2.5., a služe kao parametri određivanja kvalitete pektinskih uzoraka.

**Tablica 4.** Rezultati određivanja parametara karakterizacije pektina.

	$EW / (g \text{ mol}^{-1})$	$w$ (MeO) / %	$w$ (AUA) / %	$w$ (DE) / %
<b>Uzorak 1 (OCTENA)</b>	4166,67 $\pm$ 0,00	0,744 $\pm$ 0,00	18,3 $\pm$ 0,00	23,08 $\pm$ 0,00
<b>Uzorak 2 (KLOROVODIČNA)</b>	468,44 $\pm$ 17,44	6,63 $\pm$ 0,25	48,06 $\pm$ 1,25	78,26 $\pm$ 0,88

Ekvivalentna težina (EW) odnosi se na skupine galakturonske kiseline u pektinskim lancima koje nisu esterificirane. Ekstrakcijom klorovodičnom kiselinom dobivena vrijednost ekvivalentne težine iznosi 468,44 g mol<sup>-1</sup> (tablica 4) i čak je oko 9 puta manja nego kod ekstrakcije octenom (4166,67 g mol<sup>-1</sup>), što dovodi do zaključka da otapalo značajno utječe na rezultate. Maulani i suradnici (2024) u svom radu navode kako jaka kiselina, poput klorovodične, dovodi do polimerizacije i elongacije pektinskih lanaca čime se smanjuje udio slobodnih kiselina. Utjecaj jake anorganske kiseline vidljiv je i u istraživanju Kute i suradnika (2019) koji su korištenjem dušične kiseline postigli vrijednost od 381 mg mL<sup>-1</sup>. Baraiya i

suradnici (2023) ekstrakcijom pektina iz kore naranče deioniziranom vodom i pri sobnoj temperaturi postižu EW od 10 000 g mol<sup>-1</sup>. Niže vrijednosti dobivene su ekstrakcijom pektina iz pomela (987 mg mol<sup>-1</sup>) i jabuke (803,67 mg mol<sup>-1</sup>) klorovodičnom kiselinom (Rahman i sur., 2023). Visoke vrijednosti EW u uzorcima izoliranim octenom kiselinom sugeriraju da pektin ima dobra svojstva formiranja gela zbog puno neesterificirane galakturonske kiseline koja omogućuje visokoznost i vezanje vode (Baraiya i sur., 2023), iako je vrijednost iznad IPPA (2002) propisanih standarda (600 - 800 mg).

Sadržaj metoksi skupina (MeO) ili stupanj metilacije također ukazuje na sposobnost formiranja gelova. Pektin se prema sadržaju metoksi skupina dijeli na visoko metoksi (Meo > 7,12 %) i nisko metoksi pektin (2,5 - 7,12 %), čime se osigurava korištenje pektina željene teksture i kvalitete u različitim proizvodima (Rahman i sur., 2023; Mamiru i Gonfa 2023). Iz rezultata (tablica 4) je vidljivo da se oba uzorka pektina svrstavaju u nisko-metoksi pektin. Twinomuhwezi i suradnici (2023) izolacijom iz limuna, naranče i tangerine postižu MeO u postotku od 11,49, 14,94 te 12,02 % . U istraživanju Ukiwe i Alinnor (2011) korištenje organskih kiselina (limunske, octene i oksalne) za izolaciju pektina iz ananasa rezultira sadržajem metoksi skupina u rasponu 2,80 - 3,89 %, dok upotrebom anorganskih varira u rasponu 2,40 - 5,60 %.

Kako je već napomenuto u poglavlju 2.4.2. sadržaj ukupnih uronskih kiselina (AUA), kao pokazatelja čistoće pektina, ne bi smio biti niži od 65 %. Iz rezultata u tablici 4 očito je da uzorci ne zadovoljavaju postavljene standarde (18,3% za octenu, 48,06 % za klorovodičnu kiselinu).

Stupanj esterifikacije (DE) postignut u ovom istraživanju za pektin izoliran octenom kiselinom iznosi 23,08 % i svrstava se u nisko esterificirani pektin koji za formiranje gela zahtijeva prisutnost dvovalentnih kationa (poglavlje 2.2.). U slučaju klorovodične kiseline postignut je stupanj esterifikacije od 78,26 %, čime se svrstava u visoko esterificirani pektin (DE > 50 %). Slične iznose (75,58 % - 77,56 %) dobivaju i Kamal i suradnici (2021) ekstrakcijom pektina iz kore naranče upotrebom klorovodične kiseline kao ekstraktanta za postizanje različitih pH vrijednosti. Azad i suradnici (2014) istraživali su utjecaj stupnja zrelosti limuna i vrste ekstrakcije na prinos, AUA, MeO i stupanj esterifikacije te utvrdili da se vrijednosti prethodno navedenih parametara snižavaju starenjem ploda, dok se sadržaj šećera povećava. Od provedenih metoda, najveći prinos (13,13 %) postignut je ekstrakcijom destiliranom vodom pri 100 °C u trajanju od 1 h. Sveukupni rezultati također su pokazali da, s obzirom na stupanj zrelosti, ekstrakcija pektina iz nezrelog limuna u odnosu na zreli i prezreli daje najviši prinos, ima visok sadržaj metoksi skupina (10,25 %), uronskih kiselina (73,22 %) i visok stupanj esterifikacije (79,51 %).

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih u ovome radu, mogu se donijeti slijedeći zaključci:

1. Veći prinos pektina postignut je ekstrakcijom klorovodičnom kiselinom.
2. Pektin ekstrahiran octenom svjetliji je od onog ekstrahiranog klorovodičnom kiselinom.
3. Oba uzorka zadovoljavaju kriterij po pitanju sadržaja galakturonske kiseline (octena 75,48 % i 96,10 %) za primjenu pektina kao prehrambenog aditiva.
4. Oba uzorka pektina svrstavaju se u nisko-metoski pektin.
5. Velike razlike u vrijednostima ekvivalentne težine dovode do zaključka da otapalo značajno utječe na rezultate.
6. Uzorci ne zadovoljavaju postavljene standarde za sadržaj ukupnih uronskih kiselina.
7. Pektin ekstrahiran octenom kiselinom po stupnju esterifikacije (23,08 %) svrstava se u nisko esterificirani, dok se pektin izoliran pomoću klorovodične kiseline kategorizira kao visoko esterificirani (78,26 %).

## 6. POPIS LITERATURE

Adeniyi AG, Abdulkareem SA, Iwuozor KO, Ogunniyi S, Abdulkareem MT, Emenike EC i sur. (2022) Effect of salt impregnation on the properties of orange albedo biochar. *Clean Chem Eng* **3**, 100059. <https://doi.org/10.1016/j.clce.2022.100059>

Ayala JR, Montero G, Coronado MA, García C, Curiel-Alvarez MA, León JA i sur. (2021) Characterization of Orange Peel Waste and Valorization to Obtain Reducing Sugars. *Molecules* **26**, 1348. <https://doi.org/10.3390/molecules26051348>

Azad AKM, Ali MA, Akter MS, Rahman MJ, Ahmed M (2014). Isolation and characterization of pectin extracted from lemon pomace during ripening. *J Food Nutr Sci* **2** 30-35. [10.11648/j.jfns.20140202.12](https://doi.org/10.11648/j.jfns.20140202.12)

Baraiya K, Yadav VK, Choudhary N, Ali D, Raiyani D, Chowdhary VA i sur. (2023) A Comparative Analysis of the Physico-Chemical Properties of Pectin Isolated from the Peels of Seven Different Citrus Fruits. *Gels* **9**, 908. <https://doi.org/10.3390/gels9110908>

Chandel V, Biswas D, Roy S, Vaidya D, Verma A, Gupta A (2022) Current Advancements in Pectin: Extraction, Properties and Multifunctional Applications. *Foods* **11**, 2683. <https://doi.org/10.3390/foods11172683>

Duwee YS, Kiew PL, Yeoh WM (2022) Multi-objective optimization of pectin extraction from orange peel via response surface methodology: yield and degree of esterification. *Food Measure* **16**, 1710-1724. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01305-5>.

Freitas CMP, Coimbra JSR, Souza VGL, Sousa RCS (2021) Structure and Applications of Pectin in Food, Biomedical, and Pharmaceutical Industry: A Review. *Coatings* **11**, 922. <https://doi.org/10.3390/coatings11080922>

Hossain MM, Ara R, Yasmin F, Suchi M, Zzaman W (2024) Microwave and ultrasound assisted extraction techniques with citric acid of pectin from Pomelo (*Citrus maxima*) peel. *Meas Food* **13**, 100135-100135. <https://doi.org/10.1016/j.meafuo.2024.100135>.

IPPA (2002) Facts About Pectin. IPPA - International Pectin Producers' Association, <<http://www.ippa.info/index.htm>>. Pristupljeno 13. kolovoza 2024.

Kamal MM, Kumar J, Mamun MAH, Ahmed MNU, Shishir MRI, Mondal SC (2021) Extraction and characterization of pectin from Citrus sinensis peel. *J Biosyst Eng* **46**, 16-25. <https://doi.org/10.1007/s42853-021-00084-z>

Kute AB, Mohapatra D, Kotwaliwale N, Giri SK, Sawant BP (2020) Characterization of pectin extracted from orange peel powder using microwave-assisted and acid extraction methods. *Agric Res* **9**, 241-248. <https://doi.org/10.1007/s40003-019-00419-5>

Leong CM, Noranizan MA, Kharidah M, Choo WS (2016) Physicochemical properties of pectin extracted from jackfruit and chempedak fruit rinds using various acids. *Int Food Res J* **23**, 973-978. [338495421-oa](https://doi.org/10.1007/s40003-019-00419-5)

Luo J, Xu Y, Fan Y (2019) Upgrading pectin production from apple pomace by acetic acid extraction. *App Biochem Biotechnol* **187**, 1300-1311. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2893-1>

Mamiru D, Gonfa G (2023) Extraction and characterization of pectin from watermelon rind using acetic acid. *Heliyon* **9**. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13525>

Maulani TR, Lioe HN, Arief II, Kusumaningrum HD (2024) Extraction and Physicochemical Characterization of Pectin from Noni (*Morinda citrifolia*) Fruit. *J Kim Valensi* **10**, 11-19. [10.15408/jkv.v10i1.37702](https://doi.org/10.15408/jkv.v10i1.37702)

Mohnen D (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 266-277. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>

Ninčević Grassino A, Brnčić M, Vikić Topić D, Roca S, Dent M, Brnčić SR (2016) Ultrasound assisted extraction and characterization of pectin from tomato waste. *Food Chem* **198**, 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.095>.

Ninčević Grassino A, Barba FJ, Brnčić M, Lorenzo JM, Lucini L, Brnčić SR (2018) Analytical tools used for the identification and quantification of pectin extracted from plant food matrices, wastes and by-products: A review. *Food Chem* **266**, 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.105>.

Ninčević Grassino A, Ostojčić J, Miletić V, Djaković S, Bosiljkov T, Zorić Z i sur. (2020) Application of high hydrostatic pressure and ultrasound-assisted extractions as a novel approach for pectin and polyphenols recovery from tomato peel waste. *Innov Food Sci Emerg Technol* **64**, 102424. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102424>.

Pierre D (2019) Acid-Base Titration. *Undergrad J Math Model* **10**, Article 8. <https://doi.org/10.5038/2326-3652.10.1.4913>

Rahman MS, Khan SS, Ahmed MW, Jony ME, Das PC, Uddin MB (2023) Extraction of pectin from Elephant Apple and Pomelo fruit peels: Valorization of fruit waste towards circular economy. *Food Chem Adv* **3**, 100544. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100544>

Rodríguez Robledo V, Castro Vázquez IL (2020) Pectin - Extraction, Purification, Characterization and Applications - IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85588>  
Pristupljeno 13. kolovoza 2024.

Roman Benn A, Contador CA, Li MW, Lam HM, Ah Hen K, Ulloa PE i sur. (2023) Pectin: An overview of sources, extraction and applications in food products and health. *Food Chem Adv* **2**, 100192. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100192>

Sharma K, Mahato N, Lee Y (2019) Extraction, characterization and biological activity of citrus flavonoids. *Rev Chem Eng* **35**, 265-284. <https://doi.org/10.1515/revce-2017-0027>

Twinomuhwezi H, Godswill AC, Kahunde D (2023) Extraction and characterization of pectin from orange (*Citrus sinensis*), lemon (*Citrus limon*) and tangerine (*Citrus tangerina*). *Am J Phys Sci* **1**, 17-30. <https://doi.org/10.47604/ajps.1049>

Ukiwe LN, Alinnor JI (2011) Extraction of pectin from pineapple (*Ananas comosus*) peel using inorganic/organic acids and aluminum chloride. *Fresh Prod* **5**, 80-83. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:54573732>

Vakilian K, Nateghi L, Javadi A, Navide A. (2023) Optimization of conventional and ultrasound-assisted extraction of pectin from unripe grape pomace: extraction yield, degree of esterification, and galacturonic acid content. *Food Measure* **17**, 5777-5793. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-02085-2>

Yapo BM (2009) Biochemical Characteristics and Gelling Capacity of Pectin from Yellow Passion Fruit Rind as Affected by Acid Extractant Nature. *J Agric Food Chem* **57**, 1572-1578. <https://doi.org/10.1021/jf802969m>

Zanella K, Taranto OP (2015) Influence of the drying operating conditions on the chemical characteristics of the citric acid extracted pectins from 'pera' sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) albedo and flavedo. *J Food Eng* **166**, 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.05.033>.

Zou Z, Xi W, Hu Y, Nie C, Zhou Z (2016) Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food Chem* **196**, 885-896. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.072>

### Izjava o izvornosti

Ja Klaudija Mahaček izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

*Klaudija Mahaček*

---

Vlastoručni potpis