

Primjena kelirajućeg agensa u ekstrakciji pektina iz otpadne biomase crvenog luka

Pokec, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:316294>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-06**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Lucija Pokec

769/PI

**PRIMJENA KELIRAJUĆEG
AGENSA U EKSTRAKCIJI
PEKTINA IZ OTPADNE BIOMASE
CRVENOG LUKA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Sustainable Production of Bioethanol and Biochemicals from Agricultural Waste Lignocellulosic Raw Materials“ pod mentorstvom dr. sc. Draženke Komes, red. prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć asistentice Aleksandre Vojvodić Cebin, dipl. ing.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

PRIMJENA KELIRAJUĆEG AGENSA U EKSTRAKCIJI PEKTINA IZ OTPADNE BIOMASE CRVENOG LUKA

Lucija Pokec, 769/PI

Sažetak: Agroindustrijski otpad smatra se vrijednom sekundarnom sirovinom za razne industrijske procese i izdvajanje različitih funkcionalnih sastojaka zbog velike dostupnosti i zanimljivog kemijskog sastava pri čemu istovremeno dolazi do smanjenja ekološkog opterećenja i troškova. Cilj ovog rada bio je istražiti primjenu kelirajućeg agensa (EDTA) te utjecaj ekstrakcijskih parametara na prinos i sastav pektina iz otpadne biomase crvenog luka. U svrhu karakterizacije pektinskih izolata i ostataka nakon ekstrakcije razvijena je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). HPLC metodom određeno je 7 neutralnih šećera i 2 uronske kiseline, pri čemu strukturni ugljikohidrati zauzimaju većinu ugljikohidratne frakcije. Najveći prinos pektinskih tvari dobiven je u uzorku koji je ekstrahiran pri povišenoj temperaturi i povišenoj pH-vrijednosti otapala. Svi pektinski izolati imali su dominantan udjel galakturonske kiseline, stoga je najzastupljeniji tip pektina homogalakturonan, dok je u ostacima nakon ekstrakcije dominirala glukoza. U radu su prikazane i bilance za karakteristične pektinske monosaharide (galakturonska kiselina, ramnoza, galaktoza i arabinoza). Ukupnom iskorištenju galakturonske kiseline pogoduju povišena temperatura i niže pH-vrijednosti, dok izdvajanju ramnoze, galaktoze i arabinoze pogoduju niža temperatura i niži pH. S obzirom na ukupno iskorištenje prikazana su i relativna iskorištenja pojedinih monosaharida unutar pektinske frakcije te frakcije ostatka.

Ključne riječi: agroindustrijski otpad, ekstrakcija, galakturonska kiselina, HPLC, pektinske tvari

Rad sadrži: 54 stranice, 10 slika, 3 tablice, 60 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: *Aleksandra Vojvodić Cebin, dipl. ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. *Božidar Šantek*
2. Prof. dr.sc. *Draženka Komes*
3. Izv. prof. dr. sc. *Ksenija Marković*
4. Izv. prof. dr. sc. *Tonči Rezić* (zamjena)

Datum obrane: 27. rujan 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

APPLICATION OF THE CHELATING AGENTS IN THE EXTRACTION OF PECTIN FROM ONION BIOMASS WASTE

Lucija Pokec, 769/PI

Abstract: Agroindustrial waste is considered to be a valuable secondary raw material for various industrial processes and the separation of various functional constituents due to its high availability and an interesting chemical composition, while simultaneously reducing environmental burden and costs. The aim of this paper was to investigate the use of a chelating agent (EDTA) and the influence of extraction parameters on the yield and composition of pectin from onion biomass waste. For the purpose of characterisation of pectin isolates and of residues after extraction, a characteristic method of high performance liquid chromatography (HPLC) was developed. The HPLC method determines 7 neutral sugars and 2 uronic acids, whereby the structural carbohydrates occupy most of the carbohydrate fraction. The highest yield of pectin substances was obtained in the sample extracted at elevated temperature and elevated pH of solvent. All pectin isolates had a dominant share of galacturonic acid, hence the most common type of pectin is homogalacturonan, whereas in the residues after extraction dominated glucose. This paper also presents balances for characteristic pectin monosaccharides (galacturonic acid, rhamnose, galactose and arabinose). Total utilization of galacturonic acid is favoured by elevated temperature and lower pH, whereas rhamnose, galactose and arabinose favor lower temperature and lower pH. Considering total utilization, the relative utilization of certain monosaccharides within the pectin fraction and residues fraction is also shown.

Key words: agroindustrial waste, extraction, galacturonic acid, HPLC, pectic substances

Thesis contains: 54 pages, 10 figures, 3 tables, 60 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Draženka Komes, Full Professor*

Technical support and assistance: *Aleksandra Vojvodić Cebin, BSc.*

Reviewers:

1. PhD. *Božidar Šantek*, Full Professor
2. PhD. *Draženka Komes*, Full Professor
3. PhD. *Ksenija Marković*, Associate Professor
4. PhD. *Tonči Rezić*, Associate Professor (substitute)

Thesis defended: 27 September 2017

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. VALORIZACIJA OTPADNE BIOMASE POVRĆA	2
2.2. OTPADNA BIOMASA CRVENOG LUKA.....	4
2.2.1. Otpadna biomasa crvenog luka kao izvor različitih aktivnih sastojaka	5
2.3. PEKTIN U BILJNIM STANIČNIM STIJENKAMA.....	7
2.3.1. Kemijska struktura pektina.....	8
2.3.1.1. Homogalakturonan (HG)	9
2.3.1.2. Ramnogalakturonan-I (RG-I).....	10
2.3.1.3. Ramnogalakturonan-II (RG-II)	10
2.3.1.4. Ksilogalakturonan (XGA) i apiogalakturonan (APA).....	11
2.4. METODE EKSTRAKCIJE PEKTINA	12
2.4.1. Kiselinska ekstrakcija pektina	12
2.4.2. Primjena kelirajućeg agensa u ekstrakciji pektina	14
2.5. PRIMJENA PEKTINA.....	15
2.5.1. Primjena pektina u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.....	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
3.1. MATERIJAL	17
3.1.1. Biljna sirovina	17
3.1.2. Kemikalije	17
3.1.2.1. Izdvajanje etanolno-ekstraktibilnih tvari.....	17
3.1.2.2. Izdvajanje pektinskih tvari	17
3.1.2.3. Određivanje monomernog sastava izdvojenih pektinskih tvari.....	18
3.1.3. Uređaji i oprema	19
3.1.3.1. Izdvajanje etanolno-ekstraktibilnih tvari.....	19
3.1.3.2. Izdvajanje pektinskih tvari	19
3.1.3.3. Određivanje monomernog sastava izdvojenih pektinskih tvari.....	20
3.2. METODE RADA	21
3.2.1. Izdvajanje etanolno-ekstraktibilnih tvari	21
3.2.2. Izdvajanje pektinskih tvari	22
3.2.2.1. Ekstrakcija kelirajućim agensom	22
3.2.2.2. Dijaliza pektinskih tvari	24
3.2.2.3. Uparavanje i liofilizacija	25
3.2.3. Određivanje monomernog sastava izdvojenih pektinskih tvari	26
3.2.3.1. Potpuna kiselinska hidroliza	26
3.2.3.2. Derivatizacija monosaharida 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on (PMP) reagensom.....	29

3.2.3.3. Analiza PMP derivata monosaharida primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	32
4.1. ANALIZA MONOSAHARIDNOG SASTAVA STRUKTURNIH POLISAHARIDA LJUSKE CRVENOG LUKA	33
4.2. ANALIZA PRINOSA PEKTINSKIH FRAKCIJA	35
4.3. MONOSAHARIDNI SASTAV PEKTINSKIH FRAKCIJA IZ LJUSKE CRVENOG LUKA TE OSTATKA NAKON EKSTRAKCIJE ISTIH	37
4.4. ANALIZA BILANCI PEKTINSKIH MONOSAHARIDA - GALAKTURONSKE KISELINE, RAMNOZE, ARABINOZE I GALAKTOZE	43
5. ZAKLJUČCI	48
6. LITERATURA	49

1. UVOD

Velika količina agroindustrijskog otpada proizvodi se svake godine tijekom industrijske proizvodnje i prerade poljoprivrednih sirovina (Mussato i sur., 2012), pri čemu se nastali otpad koristi kao stočna hrana, kompost ili se alternativno uklanja procesom spaljivanja (Salak i sur., 2013). Međutim, sve nastale otpadne biomase zbog svog sastava nisu pogodne za navedene svrhe te njihovo nepravilno gospodarenje doprinosi klimatskim promjenama, onečišćenju tla i vode te zagađenju zraka (Arancon i sur., 2013). Osim što uzrokuje ekološke probleme, spomenuti otpad predstavlja i ekonomske gubitke. No, zahvaljujući vrlo zanimljivom kemijskom sastavu, agroindustrijski otpad smatra se vrijednom sekundarnom sirovinom za druge industrijske procese. Agroindustrijski otpad uglavnom se sastoji od šećera, bjelančevina, mineralnih tvari i prehrambenih vlakana, kao spojeva od industrijskog interesa (Mussato i sur., 2012).

Ugljikohidrati su glavna skupina organskih spojeva u biljkama, pri čemu zauzimaju oko 90 % suhe tvari voća i povrća (Wrolstad, 2012). Bilo da su sastavni dio hrane ili dio terapijskog lijeka, ugljikohidrati su neophodni za opstanak čovječanstva. Biljne stanične stijenke sastoje se od složenih polisaharida, uključujući celulozu, hemicelulozu i pektin, u različitim udjelima, a isti su uglavnom odgovorni za teksturalne karakteristike voća i povrća. Stanične stijenke voća, povrća i žitarica glavni su izvor prehrambenih vlakana u prehrani većine ljudi, stoga su biljne stanične stijenke važne za ljudsko zdravlje (Smith i Melton, 2012). Pektin se u prehrambenoj industriji primarno koristi kao sredstvo za želiranje, stabilizator, emulgator, sredstvo za ugušćivanje (Thakur i sur., 1997), ali ima primjenu i u medicini te kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Pektin s kationima može tvoriti komplekse i tako utjecati na apsorpciju mineralnih tvari (Wrolstad, 2012). Poznati su i drugi učinci pektina na ljudsko zdravlje, kao što su snižavanje tlaka i kolesterola (Thakur i sur., 1997). U novije vrijeme, istraživanja su usmjerena i na proizvodnju pektinskih oligosaharida s prebiotičkim svojstvima, koji se proizvode kiselinskom i/ili enzimskom hidrolizom pektina (Gullón i sur., 2013). Zbog svega navedenog, istražuju se novi, alternativni, izvori bogati pektinom, čijim ponovnim iskorištavanjem se mogu dobiti novi proizvodi s dodanom vrijednošću te s istaknutim funkcionalnim i nutritivnim karakteristikama.

U skladu s navedenim, cilj ovog rada je istražiti primjenu kelirajućeg agensa (EDTA) u ekstrakciji pektinskih tvari te odrediti prinos i sastav pektinskih tvari iz otpadne biomase crvenog luka. Karakterizacijom pektinskih izolata dobit će se rezultati koji će omogućiti uvid u potencijalnu primjenu izdvojenog polisaharida.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. VALORIZACIJA OTPADNE BIOMASE POVRĆA

Klimatske promjene, energetska kriza, nestašica resursa i onečišćenje okoliša glavna su pitanja s kojima će se čovječanstvo suočavati u budućnosti. Održivi razvoj postao je prioritet za kreatore svjetske politike iz razloga što se utjecaj čovječanstva na okoliš u posljednjem stoljeću značajno ubrzao zbog stalnog rasta populacije koji istovremeno prati snažno smanjenje prirodnih resursa. Traženje alternativnih i više održivih načina života općenito je dužnost koja se mora prenijeti na buduće generacije, a jedna od tih važnih poruka odnosi se i na otpad (Arancon i sur., 2013). U doba paradoksa, oko 15 % stanovništva u zemljama u razvoju gladuje, dok se sve veći broj zemalja bavi prekomjernom potrošnjom hrane, bolestima vezanima uz hranu i povećanom proizvodnjom prehrambenog otpada. Prehrambeni otpad uzrokuje zabrinutost širom svijeta, budući da značajna količina hrane završava kao otpad duž hranidbenog lanca (Mirabella i sur., 2014). To ne predstavlja samo problem resursa, već i ekološki i ekonomski problem. Zabrinutosti povezane uz prehrambeni otpad znanstvenoj zajednici poznate su od 1990-ih godina. Proizvodnja prehrambenog otpada pokriva cijeli „životni“ ciklus hrane: od poljoprivredne faze i industrijske proizvodnje i prerade do maloprodaje te kućanstva. U 2006. godini ukupni gubitak hrane tj. proizvedeni prehrambeni otpad iznosio je 89 milijuna tona. Do 42 % prehrambenog otpada proizvode kućanstva, 39 % gubitaka javlja se u prehrambenoj industriji, 14 % gubitaka odnosi se na sektor hrane (restorani, ugostiteljstvo), dok je 5 % izgubljeno u distribucijskom lancu. Do 2020. godine očekuje se porast gubitaka hrane do oko 126 milijuna tona, ukoliko se ne provedu određene preventivne mjere. Velika količina otpada koju proizvodi prehrambena industrija, osim što predstavlja veliki gubitak vrijednih materijala, također uzrokuje i ozbiljne probleme u upravljanju otpadom, kako s ekonomske, tako i s ekološke točke gledišta (Mirabella i sur., 2014), stoga agroindustrijski otpad predstavlja najobilniji obnovljivi izvor na Zemlji.

Agroindustrijski otpad predstavljaju ostaci koji sadrže visoki udjel organskih tvari te koji nastaju tijekom industrijske prerade poljoprivrednih proizvoda. Agroindustrijski otpad dobiven tijekom poljoprivrednih aktivnosti generira se iz dana u dana u velikim količinama u tekućem i čvrstom stanju (González-Sáiz i sur., 2008) i uključuje materijale kao što su slama, stabljike, lišće, ljuske, kore, sjemenke, pulpa (Mussato i sur., 2012), koštice i drugi neiskorišteni dijelovi biljnog materijala (Galanakis, 2012). Većina nastalog agroindustrijskog

otpada koristi se kao hrana za životinje, kompost ili se alternativno uklanja procesom spaljivanja (Salak i sur., 2013). Međutim, takav otpad obično ima zanimljiv kemijski sastav koji je bogat ugljikohidratima, prvenstveno prehrambenim vlaknima, zatim mineralnim tvarima, bjelančevinama, antioksidansima, polifenolima, pigmentima te brojnim drugim mikronutrijentima koji povoljno utječu na ljudsko zdravlje, zbog čega se ne bi trebao smatrati otpadom, već vrijednom sekundarnom sirovinom za druge industrijske procese. S ekonomskog i ekološkog stajališta, postoji veliki interes za ponovnu upotrebu agroindustrijskog otpada, upravo zbog njegove dostupnosti i kemijskog sastava bogatog spojevima koji se mogu koristiti u drugim procesima. Ponovna upotreba s ekonomskog stajališta temelji se na činjenici da je takav otpad jeftin ili besplatan te se može koristiti kao sirovina za proizvodnju drugih spojeva s dodanom vrijednošću, pri čemu se očekuje i smanjenje troškova same proizvodnje. S ekološkog aspekta, postoji zabrinutost jer većina agroindustrijskog otpada sadrži spojeve toksičnog potencijala, koji mogu uzrokovati zagađenje prilikom ispuštanja takvog otpada u okoliš (Mussato i sur., 2012). Samo iskorištenje različitih organskih ostataka u poljoprivredi ovisi o nekoliko čimbenika, uključujući karakteristike samog otpada poput hranjivih tvari ili sadržaja teških metala, energetske vrijednosti, mirise koji nastaju generiranjem otpada, dostupnost otpada, troškove prijevoza i upotrebu u poljoprivredi (Westerman i Bicudo, 2005). U skladu s navedenim, iskorištavanjem agroindustrijskog otpada rješava se problem velike količine nezbrinutog otpada, tj. smanjuje se ekološko opterećenje, a istovremeno se proizvode različiti korisni aktivni sastojci koji se mogu iskoristiti u različite svrhe te različiti proizvodi s dodanom vrijednošću, kao što su biogoriva, kemikalije, enzimi i slično (Chapla i sur., 2010).

2.2. OTPADNA BIOMASA CRVENOG LUKA

Crveni luk (*Allium cepa* L.), iz obitelji *Liliaceae*, biljna je vrsta od velike ekonomske važnosti, široko rasprostranjena širom cijelog svijeta. Smatra se da luk originalno potječe iz centralne Azije (Benítez i sur., 2012). Zahvaljujući njegovim nutritivnim i medicinskim vrijednostima, svjetska proizvodnja luka povećana je za najmanje 25 % u proteklih 10 godina, s trenutnom proizvodnjom od oko 83 milijuna tona, što luk čini drugim najvažnijim hortikulturnim usjevom u svijetu, nakon rajčice. (Choi i sur., 2015). U posljednje vrijeme došlo je do povećane potražnje obrađenog luka što je posljedično dovelo i do povećane proizvodnje otpada ljuske crvenog luka (Slika 1) (Benítez i sur., 2011a).



Slika 1. Ljuska crvenog luka (Anonymous 1)

Zbog toga, više od 500 000 tona otpada ljuske crvenog luka odbacuje se svake godine unutar Europske unije, ponajviše u Velikoj Britaniji, Španjolskoj i Nizozemskoj (Roldán i sur., 2008), gdje je postao ekološki problem (Choi i sur., 2015). Glavni otpad ljuske crvenog luka uključuje crveno-smeđu vanjsku pokožicu, dio unutarnjih listova (odmah uz pokožicu) te vrh i korjenčić glavice, koji se izdvajaju tijekom industrijskog ljuštenja. U otpadnu biomasu spada i luk koji nije dovoljno velik za komercijalnu upotrebu te malformirane, oštećene ili oboljele lukovice. Stoga postoji opravdana zabrinutost zbog proizvodnje velikih količina industrijskog otpada ljuske crvenog luka, kao i za njihovo odlaganje. Zbog svoje snažne arome, otpad ljuske crvenog luka nije prikladan za upotrebu kao krmivo za životinje, a zbog brzog razvoja fitopatogena kao što je *Sclerotium cepivorum* (bijela trulež) nije pogodan za upotrebu kao

organsko gnojivo (Salak i sur., 2013). Prema tome, moguće rješenje moglo bi biti korištenje otpada ljuske crvenog luka kao izvora različitih sastojaka hrane, budući da je luk bogat s nekoliko skupina biljnih spojeva kao što su prehrambena vlakna, fruktooligosaharidi, flavonoidi i alkenil cistein sulfoksidi, koji imaju zapažene pozitivne učinke na zdravlje ljudi. Upravo zbog toga potrebno je proučiti sastav industrijskog otpada luka (Benítez i sur., 2011a). Sastav luka je varijabilan te ovisi o sorti, stupnju dozrijevanja, okolišu, agronomskim uvjetima i vremenu skladištenja. Voda čini većinu (80-95 %) svježe mase luka. 65 % ili više suhe tvari luka može biti u obliku nestrukturnih ugljikohidrata koji uključuju glukozu, fruktozu, saharozu, fruktane i fruktooligosaharide. Luk također sadrži značajan udjel prehrambenih vlakana i dobar omjer topljivih i netopljivih prehrambenih vlakana, koji se mogu povezati s različitim metaboličkim i fiziološkim učincima. Osim toga, luk je poznat po svom flavonoidnom sadržaju, što značajno pridonosi njegovoj prehrambenoj potrošnji u mnogim zemljama. Dvije flavonoidne podgrupe prisutne u luku su antocijanini, koji nekim sortama daju crvenu/ljubičastu boju, i flavonoli, kao što su kvercetin i njegovi derivati, koji imaju ulogu u proizvodnji žute i smeđe boje mnogih drugih sorti. Mnogi flavonoidi su pokazali antioksidacijsku aktivnost, odnosno sposobnost uklanjanja slobodnih radikala, koji imaju ulogu u prevenciji koronarnih srčanih bolesti te antikancerogenu aktivnost (Benítez i sur., 2011a).

2.2.1. Otpadna biomasa crvenog luka kao izvor različitih aktivnih sastojaka

Crveni luk svestrano je povrće, koje se može konzumirati svježe ili u obliku prerađenih proizvoda. U novije vrijeme, mnoga istraživanja usmjerena su na korisna i medicinska svojstva luka, a njihovi rezultati upućuju na pozitivne učinke ove biljke u prevenciji kardiovaskularnih bolesti zbog njezinog antidijabetičkog, antihipertenzivnog efekta te zbog drugih bioloških aktivnosti poput antimikrobnih, antimutagenih, antikancerogenih, antioksidacijskih, imunomodulatornih i prebiotičkih svojstava (Benítez i sur., 2012).

Crveni luk jedan je od glavnih izvora raznih biološki aktivnih komponenti, kao što su fenolne kiseline, flavonoidi, alkenil cistein sulfoksidi, fruktooligosaharidi, fruktani i prehrambena vlakna. U ljusci luka, koja se uobičajeno smatra agroindustrijskim otpadom, pronađene su velike količine flavonoida kvercetina te kvercetin glikozida (više od 80 % ukupnog sadržaja flavonoida u luku), koji djeluju kao antioksidansi. Kvercetin pripada važnoj skupini prirodnih spojeva koji se široko koriste za liječenje raznih bolesti kao što su rak prostate, dojke, jajnika, debelog crijeva i bubrega (Choi i sur., 2015). Također, ovi spojevi imaju zaštitni učinak na stanice jetre te pokazuju antistresna i antiinfekcijska svojstva te utječu na jačanje imuniteta.

Istraživanja su pokazala da ljuska crvenog luka sadrži veći udjel antioksidanasa te veću antioksidacijsku aktivnost od drugih vrsta luka (Singh i sur., 2009). Udjel fenolnih spojeva i flavonoida smanjuje se od vanjskih prema unutarnjim dijelovima luka. Luk se pokazao i dobrim izvorom prehrambenih vlakana. Prehrambena vlakna mogu se klasificirati kao topljiva i netopljiva. U netopljiva prehrambena vlakna ubrajaju se celuloza i hemiceluloza, dok pektin spada u topljiva prehrambena vlakna. Poznato je da su vlakna važna za pravilno funkcioniranje gastrointestinalnog sustava te za sprječavanje različitih bolesti (Wrolstad, 2012) kao što su dijabetes, pretilost, ateroskleroza te bolesti krvožilnog sustava (Benítez i sur., 2011b). Topljiva prehrambena vlakna, poput pektina, imaju veći kapacitet zadržavanja vode u odnosu na netopljiva prehrambena vlakna, zbog čega se topljiva prehrambena vlakna prilikom procesa probave otapaju tvoreći viskoznu masu nalik gelu. Taj proces rezultira odgađanjem pražnjenja hrane iz gastrointestinalnog trakta te stvaranjem osjećaja sitosti i usporavanjem probave, čime se regulira vrijednost šećera u krvi te je bolja apsorpcija hranjivih tvari. Jaime i suradnici (2002) dokazali su da se udjel prehrambenih vlakana povećava od unutarnjih prema vanjskim dijelovima luka, odnosno da je najveći udjel prehrambenih vlakana prisutan u vanjskoj pokožici luka. Omjer topljivih i netopljivih prehrambenih vlakana bitan je s nutritivnog, ali i s tehnološkog stajališta. S obzirom na različite omjere, razlikuje se i potencijal primjene prehrambenih vlakana u prehrambenoj industriji. Povoljan omjer topljivih i netopljivih prehrambenih vlakana u namirnicama iznosi 1:3. Za razliku od ostalog povrća, ljuska luka sadrži dobar omjer topljivih i netopljivih vlakana (Jaime i sur., 2002). U prehrambenoj industriji, vlakna se koriste kako bi se poboljšala viskoznost, tekstura, senzorska svojstva, za produljenje roka trajanja proizvoda ili kao zamjena za šećer i masti u namirnicama (Yangilar, 2013). Sukladno navedenom, otpadna biomasa crvenog luka predstavlja značajan i zanimljiv izvor različitih funkcionalnih sastojaka, čija konzumacija ima blagotvoran učinak na zdravlje ljudi.

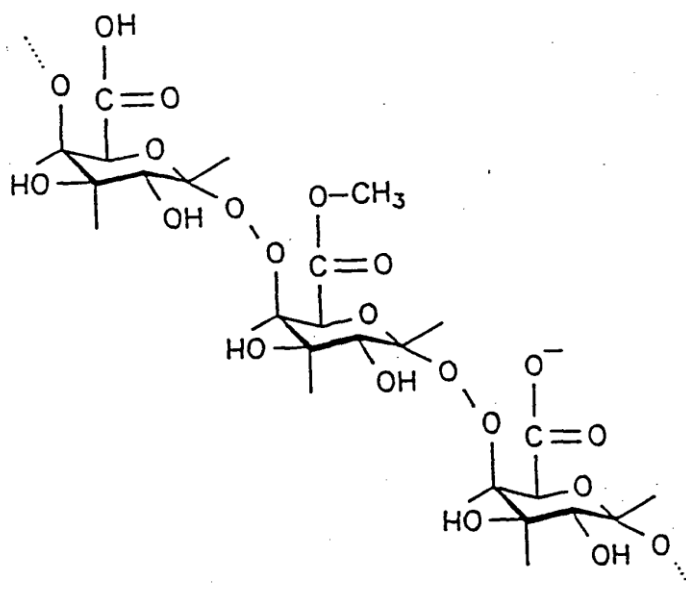
2.3. PEKTIN U BILJNIM STANIČNIM STIJENKAMA

Biljna stanična stijenka složena je makromolekularna struktura koja okružuje i štiti biljne stanice. Omogućuje cirkulaciju vode, mineralnih tvari i drugih esencijalnih mikronutrijenata, dok istovremeno sprječava prolaz štetnih tvari do biljne stanice. Biljne stanične stijenke sastoje se od ugljikohidrata, bjelančevina, aromatskih i alifatskih spojeva, koji su esencijalni za pravilan rast i razvoj biljke. Biljna stanična stijenka sastoji se od 3 različita sloja: središnje lamele, primarne stanične stijenke i sekundarne stanične stijenke. Ugljikohidratne komponente čine oko 90 % suhe tvari primarnih staničnih stijenki biljaka, čiji se polisaharidi mogu klasificirati u tri glavne skupine: celulozu, hemicelulozu i pektin (Caffal i Mohnen, 2009).

Pektinske tvari su skupina složenih polisaharida koji se nalaze u staničnim stijenkama viših biljaka, gdje djeluju kao hidratizirajuće sredstvo i „cementni“ materijal za celuloznu mrežu. Imaju važnu ulogu u životu biljaka jer služe kao strukturni i funkcionalni elementi staničnih stijenki, koje doživljavaju brze promjene elastičnosti i kapaciteta vezanja vode tijekom razvoja biljaka (Levaj, 2012). Pektinske tvari obično se proizvode tijekom inicijalne faze rasta primarne stanične stijenke biljaka, pri čemu čine oko jednu trećinu suhe tvari stanične stijenke većine voća i povrća. Iznimku čine stanične stijenke biljaka iz obitelji *Gramineae* (trave), koje mogu sadržavati pektinske tvari u vrlo malim udjelima. Većina biljaka sadrži pektinske tvari u međustaničnom sloju između primarnih staničnih stijenki susjednih stanica. Najveća koncentracija pektinskih tvari u staničnoj stijenci nalazi se u središnjoj lameli, s postupnim smanjenjem koncentracije od primarne stanične stijenke prema plazminoj membrani. Pektinske tvari, u relativno velikim količinama, nalaze se u mekim biljnim tkivima, a doprinose čvrstoći i strukturi biljnog tkiva (Atmodjo i sur., 2013) kao dio primarne stanične stijenke i kao glavna komponentna središnje lamele. Pektin utječe i na različita svojstva stanične stijenke kao što su poroznost, ionska i pH ravnoteža, a važan je i za transport iona u staničnoj stijenci (Van Buren, 1991). Snaga biljne stanične stijenke ovisi o orijentaciji, mehaničkim svojstvima i vezama između pektinskih tvari i celuloznih vlakana. Neke pektinske molekule glikozidnim su vezama vezane na ksiloglukanske lance koji se kovalentno mogu vezati na celulozu (Thakur i sur., 1997). Pektinske tvari u primarnoj staničnoj stijenci imaju relativno veći udjel oligosaharidnih lanaca na okosnici, a bočni lanci mnogo su dulji od bočnih lanaca pektinskih tvari središnje lamele. U središnjoj lameli neki pektinski lanci mogu biti povezani preko kalcijevih iona (Ca^{2+}) (Hyodo i sur., 2013).

2.3.1. Kemijska struktura pektina

Francuski kemičar, farmaceut i stručnjak za ekstrakciju aktivnih sastojaka iz biljaka Henri Braconnot prvi je, 1825. godine, izolirao i opisao heteropolisaharid s gelirajućim svojstvima kojeg je nazvao pektin. Samo ime pektina potječe od grčke riječi "pektos" (πηκτός), što u prijevodu znači „želiran“, „ukrućen“ (Leclere i sur., 2013). Kemijska struktura pektinskih tvari desetljećima je bila predmet mnogih znanstvenih istraživanja. Strukturu pektina važno je poznavati zbog razumijevanja njegove uloge u rastu i razvoju biljaka, rastu i strukturi stanica, dozrijevanju voća i preradi hrane. Poput većine drugih polisaharida, pektinske tvari su polimolekularne i polidisperzne, tj. heterogene su s obzirom na kemijsku strukturu i molekularnu masu. Pektinske tvari su, po svojoj strukturi i funkcionalnosti, najkompleksniji polisaharidi u prirodi (Yapo i sur., 2011). Pektini su prisutni kao strukturni polisaharidi u središnjoj lameli i primarnoj staničnoj stijenci viših biljaka. Uobičajena su komponenta ljudske prehrane, bilo kao aditivi u nekim prehrambenim proizvodima ili kao sastojci sirovina koje se koriste za proizvodnju prehrambenih proizvoda (Thibault i Ralet, 2003). Karakteristična jedinica za izgradnju strukture pektinskih tvari je D-galakturnska kiselina, povezana α -(1 \rightarrow 4) glikozidnim vezama u polisaharidni lanac (Slika 2).



Slika 2. Ponavljajući segment pektinske molekule (Thakur i sur., 1997)

Odavno je poznato da pektini sadrže različite udjele neutralnih šećera, posebice arabinoze i galaktoze, s manjim udjelima ramnoze, ksiloze i glukoze, i često su blisko povezani s drugim

O-2 i O-3 atomu. Vjeruje se da se linearni homogalakturonani sintetiziraju kao visoko metil-esterificirani oblici (do 100 % metiliranih galakturonskih jedinica) unutar stanica u Golgijevom tijelu, odakle se transportiraju na vezikule stanične stijenke (Ridley i sur., 2001), gdje se zatim deesterificiraju (esterske grupe se lako uklanjaju djelovanjem tkivnih enzima ili enzima iz plijesni i kvasaca) (May, 1997; Yapo i sur., 2011). Linearni homogalakturonan pokazuje dobra svojstva želiranja bez obzira s kojim je skupinama (metil ili acetil skupine) esterificiran. Ako je više od 50 % galakturonskih jedinica esterificirano s metilnim skupinama, riječ je o visoko metil-esterificiranom homogalakturonanu, u suprotnom radi se o nisko metil-esterificiranom homogalakturonanu. Nisko metil-esterificirani homogalakturonani uglavnom su lokalizirani u središnjoj lameli i na rubovima staničnih stijenki biljaka, dok se visoko metil-esterificirani homogalakturonani protežu kroz cijelu staničnu stijenku biljaka. Linearni homogalakturonani su glavni strukturni elementi pektina te predstavljaju približno 55-70 % ukupne količine pektina (Yapo i sur., 2011).

2.3.1.2. Ramnogalakturonan-I (RG-I)

Ramnogalakturonan-I (RG-I) je, za razliku od homopolimenog homogalakturonana, heteropolimer, te njegova struktura sadrži α -(1→4) glikozidnom vezom naizmjenično povezane jedinice D-galakturonske kiseline i L-ramnoze. Jedinice L-ramnoze najčešće su djelomično supstituirane arabinozom i galaktozom, pri čemu RG-I može imati duge bočne lance arabinana i galaktana (Ovodov, 2009). RG-I čini oko 20-35 % pektina, što ukazuje na njegovu smanjenu prisutnost u odnosu na linearne homogalakturonane (Leclere i sur., 2013). Ramnogalakturonan-I utječe na elastičnost i fleksibilnost staničnih stijenki biljaka (Yapo i sur., 2011).

2.3.1.3. Ramnogalakturonan-II (RG-II)

Ramnogalakturonan-II (RG-II) je pektinski heteropolimer najkompleksnije strukture i čini oko 10 % pektina (Atmodjo i sur., 2013). Glavnu okosnicu ramnogalakturonana-II čine D-galakturonske jedinice međusobno povezane α -(1→4) glikozidnom vezom, s bočnim ograncima koji se mogu sastojati od 12 različitih šećera i sadržavati najmanje 22 različita tipa glikozidnih veza (Leclere i sur., 2013). S takvom kompleksnom strukturom, RG-II je neophodan za rast i razvoj biljaka. Čak i manje modifikacije strukture imaju štetni učinak na rast biljaka, uključujući „patuljasti rast“ biljaka (Atmodjo i sur., 2013). Rezultati raznih istraživanja pokazuju da se ramnogalakturonani-II često javljaju kao dimeri (zahvaljujući boratnom ionu), što znači da su dvije molekule ramnogalakturonana-II međusobno povezane.

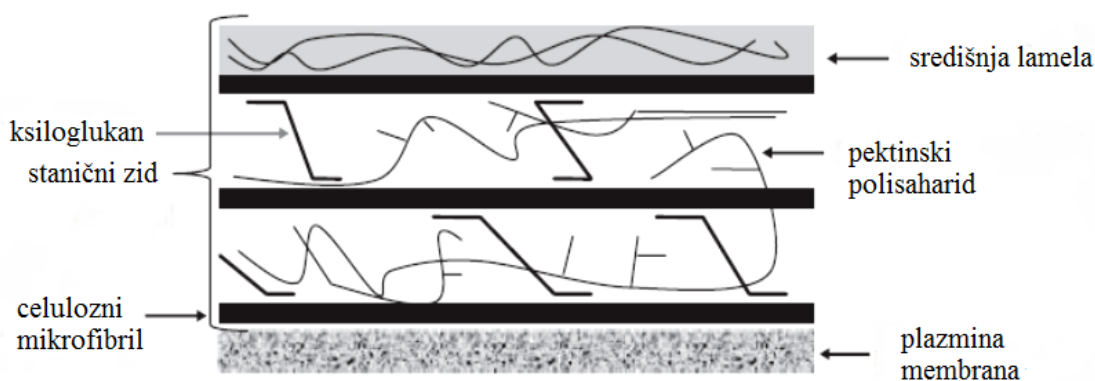
Takva dimerizacija neophodna je za integritet biljne stanične stijenke (Leclere i sur., 2013). Osim toga, rezultati mnogih istraživanja pokazuju da se ramnogalakturonan-II većinom nalazi u primarnoj staničnoj stijenci biljaka i u dijelovima stanične stijenke koji se nalaze blizu plazmine membrane. Značajno mali ili gotovo nikakav udjel može biti detektiran i u središnjoj lameli (O'Neill i sur., 2004).

2.3.1.4. Ksilogalakturonan (XGA) i apiogalakturonan (APA)

Ksilogalakturonani (XGA) su homogalakturonani, supstituirani na O-3 atomu s D-ksilozom. Ksilogalakturonani su najčešće rasprostranjeni u tkivima reproduktivnih organa biljaka, stoga mogu imati specijalizirane funkcije u tim tkivima. Međutim, identificirani su i u tkivima nereproduktivnih organa (korijenje, stabljike i listovi) različitih biljaka (Yapo i sur., 2011).

Apiogalakturonani (APA) su homogalakturonani, supstituirani na O-2 ili O-3 atomu s D-apiofuranozom (Mohnen, 2008).

Općenito se vjeruje da su pektinski polisaharidi (HG, RG-I i RG-II) međusobno kovalentno povezani, pri čemu tvore makromolekularni pektinski kompleks (Yapo i sur., 2011). Postoje i indicije da su pektinski polisaharidi kovalentno povezani i s drugim tipovima polisaharida, uključujući ksiloglukane i ksilane (hemiceluloze ksiloglukanskog tipa) (Mohnen, 2008), čijom kombinacijom se stvara mreža koja čini staničnu stijenku biljaka (Leclere i sur., 2013). S obzirom na navedenu kompleksnost strukture pektinskih polisaharida i njihovih interakcija s drugim strukturnim polisaharidima u biljnoj staničnoj stijenci (Slika 4), vidljivo je da izdvajanje same pektinske frakcije iz biljnih sirovina predstavlja određen problem, ali i izazov.



Slika 4. Prikaz biljne (voćne) primarne stanične stijenke (Smith i Melton, 2012)

2.4. METODE EKSTRAKCIJE PEKTINA

Ekstrakcija pektinskih tvari jest višestupanjski fizikalno-kemijski proces u kojem se hidroliza i ekstrakcija pektinskih molekula iz biljnih tkiva odvija pod utjecajem različitih čimbenika, koji također utječu i na njihovu topljivost. Pektini ekstrahirani u različitim uvjetima i iz različitih sirovina razlikuju se ne samo prema stupnju esterifikacije, već i prema udjelu neutralnih šećera i galakturonske kiseline, kao i prema molekularnoj masi (Dominiak i sur., 2014). Sirovine koje se najčešće koriste za proizvodnju pektina su kore citrusa, mesnati usitnjeni dijelovi jabuke i breskve te nusproizvodi proizvodnje drugog voća (Pagán i sur., 2001). Mnogi drugi poljoprivredni nusproizvodi (sekundarne biljne sirovine), poput šećerne repe, ljuske soje, ostataka suncokretovih sjemenki, ljuske kakaova ploda, kore banane, kore manga i ljuske luka, istraženi su kao potencijalni izvori pektina (Gnanasambandam i Proctor, 1999). Međutim, nijedan od navedenih nusproizvoda ne zadovoljava industrijske zahtjeve, koji uključuju mogućnost ostvarivanja visokih prinosa pektina, dobivanja kvalitetnih gelova te funkcionalnost (Vriesmann i sur., 2011).

Pektin je jedna od najkompleksnijih makromolekula u prirodi. Pektinske tvari u biljnim staničnim stijenkama tvore kompleksnu mrežu i ulaze u interakcije s drugim komponentama stanične stijenke, što otežava njihovo izdvajanje. Metode za ekstrakciju pektinskih tvari iz biljnih materijala mogu uključivati primjenu razrijeđenih otopina soli, kelirajućih agenasa (poput etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA), cikloheksandiamintetraoctene kiseline (CDTA) i natrijevog heksametafosfata) te ekstrakciju pomoću lužina i vrućih razrijeđenih kiselina. Široko korištena metoda za izdvajanje pektinskih tvari iz biljnih materijala je kiselinska ekstrakcija (Babbar i sur., 2016b), a u posljednje vrijeme često se istražuje i tehnika ekstrakcije pomoću enzima.

2.4.1. Kiselinska ekstrakcija pektina

Mnoge znanstvene studije ukazuju na to da se kiselinske ekstrakcije široko koriste za izdvajanje pektinskih tvari. Kod takvih ekstrakcija pH-vrijednosti obično su u rasponu od 0,6-4,5, temperatura u rasponu od 70-90 °C, a vrijeme ekstrakcije u rasponu od 1-5 h. Očekivano je da neki ekstrakcijski čimbenici, kao što su priroda kiseline, pH-vrijednost, temperatura, vrijeme ekstrakcije, omjer kruto/tekuće i drugi, utječu na djelotvornost same ekstrakcije. Od svih navedenih ekstrakcijskih čimbenika, najveći utjecaj na djelotvornost ekstrakcije imaju temperatura, pH-vrijednost i vrijeme ekstrakcije (Lv i sur., 2013) te se navedeni čimbenici moraju optimizirati, kako bi se osigurali dobri prinosi materijala koji također imaju dobru sposobnost želiranja te visok stupanj metilacije (Thibault i Ralet, 2003).

Učestalo korištena metoda kiselinske ekstrakcije obuhvaća primjenu visoke temperature i niže pH-vrijednosti jer primjena tih uvjeta utječe na povećanje topljivosti pektina. Najčešće korištena sredstva za zakiseljavanje vode su dušična (HNO_3), klorovodična (HCl) i sumporna kiselina (H_2SO_4), a osim spomenutih, mogu se koristiti i organske kiseline poput limunske kiseline, dok se u posljednje vrijeme istražuje i primjena jabučne, mliječne, oksalne i vinske kiseline (Srivastava i Malviya, 2011). Primjenom tih kiselina postiže se pH-vrijednost otopine između 1,5-2,5, pri čemu dolazi do djelomične depolimerizacije pektinskih lanaca i drugih polimera prisutnih u biljnim staničnim stijenkama. Niska pH-vrijednost utječe na kidanje veza u pektinu biljnog tkiva, pri čemu dolazi do njegovog oslobađanja u tekuću fazu. Osim toga, lanci neutralnih šećera također mogu biti djelomično degradirani. Otopina u kojoj se nalaze pektinske tvari (pektinski ekstrakt) odvaja se filtracijom od krutih dijelova preostalog biljnog tkiva. Obično se pektinski ekstrakt filtrira dok je vruć, kako bi mu se smanjila viskoznost, jer će, u suprotnom, doći do usporavanja (ili potpunog onemogućavanja) filtracije te do posljedičnog gubitka pektinskih tvari. Za daljnje pročišćavanje i izdvajanje pektina iz vodene otopine najčešće se koristi precipitacija i ispiranje s alkoholom (Dominiak i sur., 2014). Netopljivost u etilnom alkoholu poznato je svojstvo pektina i temelj je u postupcima ekstrakcije iz biljnog tkiva i postupcima dobivanja pektina u komercijalne svrhe (Levaj, 2012). Etanol i izopropanol glavni su alkoholi koji se koriste za precipitaciju. Omjer korištenog alkohola i vodene otopine kreće se u omjeru 1:1 do 1:5 v/v (Yapo i sur., 2007b). Glavni nedostatak kiselinske ekstrakcije jest generiranje velike količine kiselih otpadnih materijala koji zahtijevaju dodatno tretiranje prije bacanja, kako ne bi došlo do zagađenja okoliša. Također, primjena oštrih uvjeta kiselinske ekstrakcije uzrokuje potpunu depolimerizaciju i deesterifikaciju pektinskih lanaca (Dominiak i sur., 2014).

2.4.2. Primjena kelirajućeg agensa u ekstrakciji pektina

Obično se pretpostavlja da su nativni pektini umreženi kalcijevim ionima u biljnim staničnim stijenkama (Renard i Thibault, 1993), točnije u središnjoj lameli. Dugi niz godina raspravljalo se jesu li ionske veze stabilizirane kalcijevim ionima dovoljne za zadržavanje pektina u biljnim staničnim stijenkama ili su važnije druge vrste povezivanja, poput kovalentnih veza (Jarvis, 1982). Kalcijevi ioni uključeni su u mnoge biljne mehanizme, kao što su stabilizacija strukture stanične stijenke i kontrola aktivnosti enzima stanične stijenke. Spomenuti mehanizmi omogućeni su zahvaljujući čvrstoj vezi između kalcijevih iona i pektinskih tvari u biljnim staničnim stijenkama (Demarty i sur., 1984).

Pektinski polisaharidi, ovisno o stupnju esterifikacije, stvaraju dva tipa gela u biljnim staničnim stijenkama. Niskoesterificirani pektini tvore kalcijev gel, za što im je potrebna prisutnost kalcijevih iona, dok viskoesterificirani pektini tvore kiselinski gel, za čiju im je tvorbu potreban kiseli medij i dehidrirajuće sredstvo, kao što je npr. saharoza. Kalcijev gel je normalan tip gela u staničnoj stijenci (Levaj, 2012). Dva nerazgranata, neesterificirana homogalakturonanska lanca povezuju se nekovalentno pomoću kalcijevih iona. Homogalakturonanski lanci relativno su kruti pa njihovo povezivanje preko kalcijevog iona omogućuje lakše poravnanje lanaca, što posljedično olakšava vezanje sljedećeg kalcijevog iona, zatim opet homogalakturonskog lanca, i tako u nizu (Munarin i sur., 2012). Homogalakturonski lanci u tako stvorenom gel-stanju imaju oblik uzvojnice (spirale). Spiralni lanci nisu omotani jedan oko drugoga, nego se drže nekovalentim vezama. Moguća je prisutnost dvije ili tri galakturonske jedinice u jednom „zavoju“. Kada kalcija ima malo, vežu se dva lanca, a kada ga ima više, nastaje agregat čija veličina ovisi o količini kalcija, ali do određene granice (kada više kalcija dalje ne pridonosi čvršćoj vezi). Kristalografija X-zrakama ukazuje da su približno 4 lanca povezana preko iona kalcija, stvarajući nakupinu, tj. agregat (Levaj, 2012). U biljnim tkivima, oko 90 % kalcija je vezano ili se nalazi u netopljivom obliku. 50 do 70 % kalcija vezano je u obliku u kojem je lako zamijenjen molarnim koncentracijama natrijevog klorida (NaCl). Takvo istiskivanje kalcija rezultira umjerenim gubitkom čvrstoće biljnog tkiva, ali najdramatičnije smanjenje kohezije odvija se kada se čvrsto vezani kalcij ukloni kelirajućim agensima. Odavno je poznata upotreba kelirajućih agenasa za uklanjanje kalcijevih iona te posljedično povećanje topljivosti pektinskih tvari. Amonijev oksalat prvi je kelirajući agens koji se primijenio u tu svrhu, ali u posljednje se vrijeme više koriste EDTA, CDTA i natrijev heksametafosfat. Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) je kelirajući ligand koji ima visok afinitet stvaranja kompleksa s ionima metala. EDTA je visoko stabilna molekula, patentirana 1935. u

Njemačkoj. Kad se EDTA primijeni na biljno tkivo, ona veže ione kalcija u kompleks, čime se kohezivnost izrazito smanjuje, a potencijalno se povećava ekstraktibilnost pektinskih tvari iz biljnog tkiva (Van Buren, 1991).

2.5. PRIMJENA PEKTINA

Pektini su oduvijek bili prirodni sastojci hrane i upotreba pektina dopuštena je u svim zemljama svijeta. Ekstrahirani pektin koristi se kao sastojak funkcionalne hrane širom svijeta. Godišnja potrošnja pektina procjenjuje se na oko 45 milijuna kilograma (Willats i sur., 2006). Pektin se u brojnim namirnicama koristi kao sredstvo za želiranje, emulgator, stabilizator, sredstvo za ugušćivanje (Thakur i sur., 1997) i povećanje volumena (Anonymous 2). Posljednjih godina, pektin se koristio kao zamjena za mast u mesnim proizvodima (Galanakis, 2012) ili zamjena za šećer u niskokaloričnim proizvodima. Nadalje, pektin se može koristiti i u proizvodnji različitih specijalnih proizvoda, uključujući jestive i biorazgradive filmove, ljepila, supstituente papira, pjene i plastifikatore, modifikatore površine za medicinske proizvode te materijale za biomedicinsku implantaciju (Mohnen, 2008). Multifunkcionalnost pektina potječe od prirode njegovih molekula, u kojima postoje polarne i nepolarne regije, a koje omogućuju pektinu da se ugradi u različite sustave hrane. Trenutačno, glavni izvori pektina za komercijalnu proizvodnju su kore citrusa (limun, limeta, naranča) te usitnjeni mesnati dijelovi jabuka (Thakur i sur., 1997), a najčešće se na tržištu pojavljuje u obliku bijelog praha.

2.5.1. Primjena pektina u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji

Najvažnije fizikalno-kemijsko svojstvo pektina, koje ga čini važnom komponentom hrane i farmaceutskih proizvoda, je njegova sposobnost tvorbe gela. Dobra topljivost pektina preduvjet je za proces želiranja. Topljivost pektina u vodenim medijima ovisi o nekoliko parametara, pri čemu su najvažniji temperatura, pH-vrijednost te ionska jakost. Sposobnost pektina da tvori gelove ovisi o veličini molekule pektina te o stupnju esterifikacije pa zbog varijacije tih parametara sposobnost tvorbe gela nije uvijek ista. Pektin se kao sredstvo za želiranje koristi u proizvodnji voćnih marmelada, želea, džemova i sličnih proizvoda. Pektini se sve više koriste i kao stabilizatori u kiselim mliječnim sustavima, uključujući kiselo mlijeko i mješavine voćnog soka i mlijeka. U takvim sustavima, pektini reagiraju s kazeinima mlijeka i sprječavaju koagulaciju pri kiseloj pH-vrijednosti, jer u protivnom, u odsutnosti stabilizatora, mliječni sustavi pokazuju visoku viskoznost (Thibault i Ralet, 2003).

Pektin ima primjenu i u farmaceutskoj industriji. Pokazalo se da pozitivno utječe na razinu kolesterola u krvi. Osim toga, djeluje i kao prirodni preventivni sastojak protiv otrovanja toksičnim kationima, tako što uklanja živu (Hg) i olovo (Pb) iz gastrointestinalnog i dišnog sustava. Kada se pektin injektira intravenozno, skraćuje vrijeme koagulacije krvi te tako pomaže u kontroli lokalnih krvarenja (Thakur i sur., 1997).

U novije vrijeme postoji sve veći interes za identifikacijom, proizvodnjom, pročišćavanjem, procjenom i komercijalizacijom novih prebiotika s poboljšanim svojstvima. Kemijska i/ili enzimaska hidroliza pektina dovodi do proizvodnje pektinskih oligosaharida (Gullón i sur., 2013). Pektinski oligosaharidi (POS) su neprobavljivi oligosaharidi koji korisno utječu na domaćina selektivnim stimuliranjem rasta i/ili aktivnosti jednog ili ograničenog broja bakterija (npr. bifidobakterija i laktobacila), a istovremeno smanjuju broj patogenih bakterija (npr. klostridija i *Bacteroides* bakterija) u gastrointestinalnom sustavu (Holck i sur., 2014; Gullón i sur., 2013; Babbar i sur., 2016a). POS pokazuju i mnoge pozitivne zdravstvene učinke, poput smanjenja razine glukoze u krvi, poboljšanja apsorpcije mineralnih tvari, smanjenja učestalosti pojave raka debelog crijeva i modulacije imunološkog sustava. POS se također mogu koristiti kao aktivni sastojci u proizvodnji funkcionalnih prehrambenih proizvoda. Istraživanja su pokazala da POS posjeduju antioksidacijsku aktivnost i imaju značajan učinak u snižavanju razina kolesterola i triglicerida u krvi (Babbar i sur., 2016a).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Biljna sirovina

U ovome radu, kao izvor pektina korištena je otpadna biomasa (ljuska) crvenog luka. Ista je sakupljena iz kantine Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.

Ljuska crvenog luka predstavlja nusproizvod primarne obrade, tj. čišćenja glavice crvenog luka, što podrazumijeva uklanjanje crveno-smeđe vanjske pokožice, kao i dijela unutarnjih listova (odmah uz pokožicu) te vrha i korjenčića glavice, odnosno svih dijelova koji nisu namijenjeni konzumaciji. Ovako pripremljen biljni materijal sušen je u laboratorijskom sušioniku pri 50 °C, kako bi se mikrobiološki stabilizirao u uvjetima duljeg čuvanja. U tu svrhu, uzorak je sušen do udjela vlage od približno 10 %. Osušena sirovina usitnjena je pomoću mlina za kavu. Prosijavanjem kroz sito veličine pora 450 µm sakupljena je frakcija fino usitnjenih čestica s definiranom raspodjelom njihove veličine. Ovako pripremljena sirovina korištena je u radu pod nazivom ljuska crvenog luka (oznaka prema engl. izrazu *onion peel* (OP)). Sirovina je do korištenja čuvana u papirnatoj vreći na suhom i tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi.

3.1.2. Kemikalije

Sve kemikalije korištene u ovome radu bile su p.a. ili HPLC čistoće, osim ako nije drugačije navedeno.

3.1.2.1. Izdvajanje etanolno-ekstraktibilnih tvari

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

3.1.2.2. Izdvajanje pektinskih tvari

- Aceton, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Fisher Chemical (Loughborough, UK)
- Etanol (96 %), Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)
- Etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol dihidrat (Komersijalni naziv: Kompleksal III - EDTA * 2 H₂O * 2 Na), T.T.T. d.o.o. (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Fosforna kiselina, 85 %, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

- Natrijev acetat (bezvodni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid u zrnima, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Octena kiselina, J.T. Baker (Pennsylvania, SAD)

3.1.2.3. *Određivanje monomernog sastava izdvojenih pektinskih tvari*

Potpuna kiselinska hidroliza

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

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

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

Analiza PMP derivata monosaharida tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

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

3.1.3. Uređaji i oprema

3.1.3.1. Izdvajanje etanolno-ekstraktibilnih tvari

- Aparatura za vakuum filtraciju (boca sisaljka, Büchnerov lijevak, filter papir Whatman No.1, vodena vakuum sisaljka, brtve)
- Laboratorijsko posuđe: laboratorijske boce (1000 mL, Duran), špatula, žlica, staklena menzura, plastična posudica
- Tehnička vaga, AND GF 3000 EC (Massachusetts, SAD)

3.1.3.2. Izdvajanje pektinskih tvari

Ekstrakcija pektinskih tvari

- Analitička vaga, Mettler Toledo (Zürich, Švicarska)
- Aparatura za vakuum filtraciju (boca sisaljka, Büchnerov lijevak, filter papir Whatman No.1, vodena vakuum sisaljka, brtve)
- Laboratorijska centrifuga SL8 R s HIGHConic III Fixed Angle rotorom, Thermo scientific (Massachusetts, SAD)
- Laboratorijska vodena kupelj, Termomedicinski aparati „Bodalec“ TKS-1 (Dugo selo, Hrvatska)
- Laboratorijsko posuđe: laboratorijske boce (250 mL i 1000 mL, Duran), staklene čaše (150 mL), staklene menzure, magnetići, kapaljke, laboratorijska žlica, odmjerna tikvica (1 L), tarionik
- Magnetska mješalica Wise Stir SM HS-6, Wisd (Werthrim, Njemačka)
- pH-metar s elektrodom, Mettler Toledo (Zürich, Švicarska)
- Tehnička vaga, AND GF 3000 EC (Massachusetts, SAD)
- Vortex V-1 plus, Biosan (Riga, Latvija)

Dijaliza

- Laboratorijsko posuđe: plastične čaše (5 L), staklene čaše (250 ml), staklena menzura (25 mL), teflonski magnetići
- Magnetska mješalica Wise Stir SM HS-6, Wisd (Werthrim, Njemačka)
- Membrana za dijalizu, Cellu Sep, nominal MWCO 6000-8000 Da; 7,96 mL/cm (Membrane Filtration Products, Inc.; Teksas, SAD)
- Prijenosni konduktometar Cond 330i, WTW (Bavaria, Njemačka)

Uparavanje i liofilizacija

- Laboratorijski zamrzivač
- Laboratorijsko posuđe: tikvice za uparavanje (500 mL), Falcon epruvete (50 mL), kapaljke, staklene i plastične Petrijeve zdjelice, parafilm
- Liofilizator, FreeZone 1, Labconco (Kansas City, MO, SAD)
- Rotacijski vakuum uparivač, Heidolph (Njemačka)

3.1.3.3. Određivanje monomernog sastava izdvojenih pektinskih tvari

Potpuna kiselinska hidroliza

- Analitička vaga, Mettler Toledo (Zürich, Švicarska)
- Laboratorijsko posuđe: staklene epruvete (12 mL) s navojnim PP čepovima s brtvom, pinceta, staklene čaše, špatulice, stakleni štapići
- Uljna kupelj s miješanjem HBR 4 Digital, IKA (Staufen, Njemačka)
- Univerzalne pH indikator trakice (0-14), LLG Labware (Meckenheim, Njemačka)
- Vortex V-1 plus, Biosan (Riga, Latvia)
- Automatska pipeta 2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL, Gilson (Wisconsin, SAD)
- Stolna laboratorijska centrifuga za Eppendorf epruvete od 1,5 i 2 mL

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

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

Analiza PMP derivata monosaharida tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

- HPLC kolona-Zorbax Extend-C18 Analytical 4,6x250 mm 5-micron, Agilent Technologies (SAD)

- HPLC viala s pripadajućim navojnim čepovima sa septom, Agilent Technologies (SAD)
- Mikrofilteri od regenerirane celuloze (RC), veličine pora 0,2 μm , promjera 15 mm, Phenomenex (SAD)
- Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s PDA („Photo Diode Array“) detekcijom- Agilent 1200 Series, Agilent Technologies (SAD)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Izdvajanje etanolno-ekstraktibilnih tvari

Ovim postupkom sirovina se priprema za daljnje ekstrakcijske korake i analizu početnog materijala. Cilj postupka je ukloniti prvenstveno jednostavne, topljive šećere poput monosaharida, disaharida i nativno prisutnih oligosaharida, koji bi mogli interferirati u analizama monomernog sastava. Ekstrakcijom materijala s mješavinom etanola i vode, osim šećera, izdvajaju se i druge hidrofilne komponente male molekulske mase iz biljnog matriksa.

Postupak rada:

Kao otapalo u ekstrakciji koristi se 70 %-tni etanol, koji se prethodno pripremi u odgovarajućem volumenu miješanjem demineralizirane vode i 96 %-tnog etanola. Uzorak se miješa s pripremljenim otapalom u omjeru 1:10 (u ovome radu korišteno je 50 g uzorka te 500 mL otapala, pomiješanih u laboratorijskoj boci od 1 L). Ekstrakcija se vrši pri sobnoj temperaturi, miješanjem sadržaja tijekom 30 minuta. Po završetku ekstrakcije, smjesa se filtrira preko Büchnerovog lijevka pomoću vakuuma. Zaostali talog ekstrahiranog materijala na filteru kvantitativno se prenosi u laboratorijsku bocu i ponovno se ekstrahira prema prethodno opisanom postupku (ukupno se materijal ekstrahira 3 puta). Ekstrahirani kolač se po završetku 3. ekstrakcije suši izmjenom otapala. U tu svrhu, talog se 2 puta ispiri s 350 mL 96 %-tnog etanola i zatim s 200 mL acetona, pri čemu je važno dobro resuspendirati uzorak u odgovarajućem otapalu, a između svakog ispiranja uzorak se odvaja vakuum filtracijom. 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 plastičnu posudu, prekrije staničevinom te ostavi u digestoru dok sav aceton ne ishlapi. Osušeni uzorak dodatno se homogenizira u tarioniku prije sljedećeg koraka, tj. izdvajanja pektinskih tvari. Dobiveni uzorak predstavlja tzv. alkoholno-netopivi ostatak (engl. *alcohol insoluble residue* - AIR).

Izračun rezultata:

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

U ovome radu korišten je prethodno dobiven podatak (navedeno u poglavlju „Rezultati i rasprava“) za udjel etanolno-ekstraktibilnih tvari prema gore opisanom postupku.

3.2.2. Izdvajanje pektinskih tvari

3.2.2.1. Ekstrakcija kelirajućim agensom

Ekstrakcija pektina kelirajućim agensom provedena je prema modificiranom postupku Renardove i Thibaulta (1993).

Priprema 50 mM acetatnog pufera pH 4,6:

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

Priprema 50 mM fosfatnog pufera pH 7,0:

Za pripremu 1 L 50 mM fosfatnog pufera pH 7,0 precizno se odvaži 3,22 g natrijevog dihidrogenfosfat dihidrata i 4,33 g dinatrijevog hidrogenfosfata koji se otope u približno 900 mL demineralizirane vode. Otopini se izmjeri pH pomoću pH-metra, a isti se po potrebi podesi na željenu vrijednost dodavanjem male količine koncentrirane otopine fosfatne kiseline ili natrijevog hidroksida. Konačni volumen pripremljenog pufera podesi se u odmjernoj tikvici (1 L).

Postupak rada:

Ekstrakcija pektina iz ljuske crvenog luka pomoću kelirajućeg agensa provedena je pri dvije različite pH-vrijednosti otapala i pri dvije temperature. U ekstrakciji je korišteno 2 g uzorka alkoholno-netopivog ostatka ljuske crvenog luka, koji se važe 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 dodaje 50 mL otapala s kelirajućim agensom (omjer uzorak:otapalo iznosio je 1:25 w/v). Kao kelirajući agens u ovome radu korištena je etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA, dinatrijeva sol, dihidrat), koja je otopljena u acetatnom ili fosfatnom puferu u koncentraciji 100 mM (pri računanju mase EDTA uračunate su korekcije za vodu (dihidrat) i natrijeve ione (dinatrijeva sol)). Ekstrakcija pri povišenoj temperaturi je provedena pri 90 °C u začepjenim bocama (kako bi se spriječilo isparavanje otapala) uz periodično ručno miješanje smjese okretanjem boce; odnosno u poklopljenim čašicama na magnetskoj mješalici pri sobnoj temperaturi. Trajanje ekstrakcije u oba slučaja iznosilo je 2 h. Nakon isteka vremena, sadržaj boca/čašica kvantitativno se filtrira na Büchnerovom lijevku pomoću vakuuma preko običnog grubog filter papira, a talog na filteru ispiru se s 25 mL odgovarajućeg pufera (bez EDTA). Isprani talog kvantitativno se prenosi natrag u bocu/čašicu te se ekstrakcija ponavlja tijekom sljedeća 2 h prema opisanom postupku.

Dobiveni pektinski ekstrakti (filtrati) nakon 1. i 2. ekstrakcije kvantitativno se združe, precizno se izmjeri konačni volumen te se istome doda 4 puta veći volumen 96 %-tnog etanola (etanol je potrebno polako dodavati uz istovremeno miješanje otopine). Smjesa se ostavi stajati u hladnjaku na 4 °C tijekom noći, kako bi se inducirala maksimalna precipitacija pektinskih tvari. Dobiveni precipitati kvantitativno se filtriraju na Büchnerovom lijevku (Whatman No. 1) pomoću vakuuma te se ispiru smjesom etanola i vode (4:1 v/v). U svrhu lakšeg izdvajanja precipitata, pred kraj filtracije može se koristiti i centrifuga (10 min, 20 °C, 9000 rpm) kako bi se uklonilo što više smjese etanol-voda. 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). Pri tome treba uzeti u obzir da otopina ne bude previskozna. Ponovnim otapanjem pektinskih precipitata, isti se pripremaju za dijalizu. Isprani talog ljuske crvenog luka nakon ekstrakcije pektina suši se izmjenom otapala. U tu svrhu, talog se kvantitativno prenese u Falcon epruvete od 50 mL te se 2 puta ispiru s 40 mL 96 %-tnog etanola i zatim s 40 mL acetona. Pri tome je važno dobro resuspendirati uzorak u odgovarajućem otapalu, a između svakog ispiranja uzorak se odvaja

centrifugiranjem u Falcon epruvetama od 50 mL. S obzirom da se radi o lako hlapivim i zapaljivim otapalima, cjelokupni postupak potrebno je izvoditi u digestoru. Nakon zadnjeg ispiranja, talog se ostavi u Falcon epruveti, prekrije staničevinom te ostavi u digestoru dok sav aceton ne ishlapi.

Ekstrakcija pektina iz ljuske crvenog luka provedena je u duplikatu prema eksperimentima kako je sumirano u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz promjenjivih i nepromjenjivih parametara primijenjene ekstrakcije pektina iz ljuske crvenog luka

Parametri ekstrakcije				Oznaka eksperimenta	Uzorak/oznaka
Otapalo	Temperatura (°C)	Trajanje (h)	Ponovljena ekstrakcija		
50 mM Na-acetatni 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-fosfatni 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

3.2.2.2. Dijaliza pektinskih tvari

Dijaliza je membranski proces u kojem otopljene tvari male molekulske mase difundiraju kroz polupropusnu membranu iz područja veće koncentracije u područje manje koncentracije dok se ne postigne ravnoteža. Dijaliza resuspendiranih pektinskih precipitata provodi se kako bi se uklonile neugljikohidratne primjese male molekulske mase, poput eventualno koprecipitiranih soli pufera i EDTA, kao i zaostalog etanola nakon precipitacije, od velikih polimernih lanaca pektina. Pročišćavanje uzoraka dijalizom nužno je kako bi se precizno gravimetrijski mogli odrediti prinosi pektina.

Postupak rada:

Dijaliza uzoraka provedena je u tubularnim dijalizacijskim membranama pomoću demineralizirane vode. Duljina tubularne dijalizacijske membrane određuje se s obzirom na dimenzije iste (7,96 mL/cm) te ukupni volumen koji se treba dijalizirati. Također, potrebno je uračunati i prostor za zatvaranje membrane s donje i gornje strane, kao i prostor za dodatni

ulazak vode u membranu tijekom dijalize (budući da dijaliza nije jednosmjernan proces). U dijalizi dobivenih pektinskih precipitata, duljina tubularnih membrana nije prelazila 18 cm (zbog prostornih ograničenja tijekom same dijalize), a ako je volumen premašivao dimenzije membrane, uzorak je raspodijeljen u više membrana (dvije). Membrane se nakon rezanja na odgovarajuće dimenzije peru i razdvajaju s unutrašnje strane s vrućom vodom, a zatim i demineraliziranom vodom te se s jedne strane zatvaraju čvrstim čvorom. Prethodno pripremljeni uzorci resuspendiranih pektinskih precipitata kvantitativno se prenose s minimalnom količinom demineralizirane vode u pripremljene dijalizacijske membrane koje se zatvore na drugom kraju odgovarajućim zatvaračima. Membrane s uzorkom uranjaju se cijelim volumenom u plastične laboratorijske čaše od 5 L ispunjene demineraliziranom vodom kojoj je prethodno izmjerena vodljivost pomoću konduktometra. Uspješnost dijalize također se prati konduktometrijski, dok se ne postigne početna izmjerena vodljivost, što označava završenu dijalizu. Kako bi se dijaliza provodila odgovarajućom brzinom, izvanmembransku tekućinu (dijalizat) potrebno je izmjenjivati u određenim vremenskim intervalima (svakih nekoliko sati), kako bi se kontinuirano uspostavljao koncentracijski gradijent otopljenih tvari kao pogonska sila dijalize. Dijaliza uzoraka trajala je najmanje 72 h.

3.2.2.3. Uparavanje i liofilizacija

Postupak rada:

Tijekom dijalize inicijalni se volumen otopljenog pektina poveća za preko 100 % te je dijalizirane otopine potrebno upariti prije liofilizacije. Nakon završetka dijalize, dijalizirani otopljeni pektin kvantitativno se prebaci u tikvicu s okruglim dnom te se svaki uzorak uparava pomoću rotacijskog vakuum uparivača pri temperaturi od najviše 50 °C i tlaku od 100 mbara. Upareni pektin (volumena 30-40 mL) zatim se centrifugira, kako bi se izdvojile eventualno istaložene nečistoće (u Falcon epruvetama od 50 mL). Supernatant se izlije u prethodno izvagane staklene Petrijeve zdjelice. Zaostali talog u Falcon epruveti ispere se s malom količinom demineralizirane vode (kako bi se otopljeni pektin kvantitativno prenio u Petrijeve zdjelice), a supernatant se združi s matičnim supernatantom u Petrijevoj zdjelici (homogenizirati laganom rotacijom na ravnoj podlozi). Petrijeve zdjelice prekriju se plastičnim poklopcima s izbušenim rupicama koji se pričvrste pomoću parafilma te se stavljaju u laboratorijski zamrzivač na – 80 °C tijekom noći.

Smrznuti uzorci suše se u liofilizatoru tijekom najmanje 36 h. Osušeni uzorci usitnjavaju se u mlinu za kavu u svrhu homogenizacije.

Izračun rezultata:

Prinos liofiliziranog pektina određuje se gravimetrijski iz poznate mase prazne Petrijeve zdjelice, mase iste nakon sušenja pektina, početne mase alkoholno-netopivog uzorka te udjela etanolno-ekstraktibilnih tvari, prema izrazima (1) i (2):

$$\text{prinos pektina (\%)} = (m_2 - m_1) / \text{mekv1} * 100 \quad (1)$$

$$\text{mekv1} = m_3 / (1 - (\% \text{ etanolno-ekstraktibilnih tvari})/100) \quad (2)$$

Pri čemu je:

m_1 - masa prazne Petrijeve zdjelice (g)

m_2 - masa Petrijeve zdjelice sa suhim uzorkom (g)

m_3 - masa alkoholno-netopivog uzorka korištenog u ekstrakciji (g)

mekv1 - ekvivalentna masa originalnog uzorka

Analogno su izračunati i prinosi ostatka nakon ekstrakcije, prema izrazu (3):

$$\text{prinos ostatka (\%)} = (m_5 - m_4) / \text{mekv1} * 100 \quad (3)$$

Pri čemu je:

m_4 - masa prazne Falcon epruvete (g)

m_5 - masa Falcon epruvete sa suhim ostatkom (g)

Rezultati prinosa pektina i ostataka nakon ekstrakcije prikazani su kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom, izražene kao % suhe mase originalnog uzorka.

3.2.3. Određivanje monomernog sastava izdvojenih pektinskih tvari

3.2.3.1. Potpuna kiselinska hidroliza

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

Postupak rada:

A) Hidroliza topljivih polisaharida (bez predhidrolize)

U staklene epruvete precizno se odvažuje 10 ± 1 mg pektinskog izolata (ili nekog drugog topljivog polisaharida) na način da uzorak ne zaostaje na stijenkama epruvete. Uzorak se otopi u 1,3 mL demineralizirane vode laganim protresanjem epruvete. Zatim se doda 0,5 mL internog standarda – riboze (konc. 2,4 mg/mL) te 1,2 mL 2,5 M H_2SO_4 (ukupni volumen 3 mL). Uzorci se ručno promiješaju laganim protresanjem epruveta ili rotacijom pri najmanjoj brzini na vorteksu i stave se u uljnu kupelj zagrijanu na 100 °C gdje se provodi hidroliza tijekom 2 h i 6 h. Nakon završene hidrolize uzorci u epruветama se ohlade u hladnoj vodenoj kupelji ili smjesi vode i leda.

B) Hidroliza netopljivih polisaharida (s predhidrolizom)

Hidroliza s predhidrolizom provodi se na uzorcima etanolno-netopivog ostatka te na uzorcima ostataka nakon ekstrakcije pektina. Svrha predhidrolize je narušavanje visoko uređene strukture netopljivih polisaharida te njihova solvatacija, kako bi bili podložni hidrolitičkom utjecaju razrijeđene kiseline pri povišenoj temperaturi.

U staklene epruvete pažljivo se odvažuje 10 ± 1 mg (pročišćenih frakcija, tj. svi uzorci ostataka nakon hidrolize), odnosno 25 ± 2 mg (za netopljive kompleksne uzorke, tj. etanolno-netopivi ostatak) polisaharidnog uzorka, pazeći da uzorak ne ostaje po stijenkama epruvete. Zatim se pažljivo dodaje 250 μ L 72 %-tne v/v (13 M) sumporne kiseline (također pazeći da kiselina ne ostaje po stijenci epruvete) te se uzorak inkubira pri sobnoj temperaturi tijekom 30 min uz polagano miješanje staklenim štapićem, kojim se osigurava potpuni kontakt uzorka i jake kiseline. Nakon završene predhidrolize, kiselina se razrijeđuje dodatkom 2,25 mL demineralizirane vode te 0,5 mL pripremljenog internog standarda riboze, koncentracije 2,4 mg/mL. Uzorci se vorteksiraju (tek onda se izvade stakleni štapići), začepi i stave u uljnu kupelj zagrijanu na 100 °C. Hidroliza pri povišenoj temperaturi, nakon predhidrolize, provodi se tijekom 2h.

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

Zajedno s uzorcima (bilo topljivih, bilo netopljivih polisaharida) hidrolizira se i smjesa standarada, kako bi se uračunali eventualni gubici monosaharida pod utjecajem visoke

temperature i kiselog medija. Uzorak standarada za hidrolizu priprema se u staklenoj epruveti pipetiranjem 0,5 mL otopine standarada (koji se očekuju u uzorku) koncentracije približno 1 mg/mL za svaki standard (točna koncentracija mora biti poznata); zatim se dodaje 0,4 mL 2,5 M sumporne kiseline i 0,1 mL demineralizirane vode. Pripremljeni uzorak homogenizira se laganom rotacijom na vorteksu i stavi se u uljnu kupelj zagrijanu na 100 °C, tijekom cijelog predviđenog trajanja hidrolize. Važno je napomenuti kako se otopine standarada ne podvrgavaju predhidrolizi.

C) Neutralizacija kiselih hidrolizata

Ohlađeni uzorci kiselih hidrolizata homogeniziraju se vorteksiranjem te centrifugiraju, kako bi se istaložile nehidrolizirane komponente. Za neutralizaciju se uzima 1 mL bistrog supernatanta u Eppendorf epruvete (2 mL), a ostatak kiselog hidrolizata može se čuvati na -20 °C. Neutralizacija se provodi dodatkom praškastog kalcijevog karbonata, čija količina se izračuna iz stehiometrijskih odnosa reakcije neutralizacije (za alikvot 1 mL i koncentraciju kiseline približno 1 M, količina CaCO_3 iznosi 0,11 g, odnosno dodaje se približno 0,13 g CaCO_3). Dodavanjem CaCO_3 dolazi do stvaranja teško topive soli kalcijevog sulfata (CaSO_4), zbog kojeg smjesa poprima bijelu boju, ali i veću viskoznost, te oslobađanja plinovitog ugljikovog dioksida (CO_2), zbog čega se uzorak pjenuše, te je stoga CaCO_3 potrebno dodavati postupno. Nakon što se doda predviđena količina CaCO_3 , uzorak se centrifugira, a supernatantu se mjeri pH, koji po završetku neutralizacije iznosi 6-7 (provjerava se pH indikatorskim trakicama). Ostatak neutralnog hidrolizata se izdvaja i čuva na -20 °C za potrebe daljnjih analiza.

Hidroliza svih uzoraka provedena je u triplikatu.

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

Derivatizacija monosaharida dobivenih potpunom kiselinskom hidrolizom, kao i standarda, provedena je prema postupku Suna i suradnika (2014), uz manje modifikacije.

Postupak rada:

U Eppendorf epruvete od 2 mL pipetira se 50 μ L uzorka neutraliziranog hidrolizata (ili otopine standarda) te se doda 50 μ L 0,6 M otopine natrijevog hidroksida (NaOH) i dobro se izmiješa na vorteksu. Odmah zatim doda se 100 μ L 0,5 M metanolne otopine PMP reagensa, epruveta se dobro začepi, ponovno se dobro homogenizira na vorteksu te uroni u vodenu kupelj zagrijanu na 70 ± 2 °C. Derivatizacija se provodi tijekom 60 minuta pri navedenoj temperaturi uz ponovno vorteksiranje derivatizacijske smjese nakon 20 i 40 minuta. Po isteku vremena, epruvete s uzorcima ohlade se u hladnoj vodenoj kupelji, a reakcijska smjesa neutralizira se dodatkom 100 μ L 0,3 M otopine klorovodične kiseline (HCl) i dobro se izmiješa pomoću vorteksa. Smjesa se nadopuni demineraliziranom vodom do ukupnog volumena od 1 mL (dodati 700 μ L) te se provjeri pH dobivene otopine, koji treba biti u blago kiselom do neutralnom području (pH 4-6).

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

3.2.3.3. Analiza PMP derivata monosaharida primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

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

Postupak rada:

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

Izračun rezultata:

Kvantifikacija identificiranih pikova provedena je primjenom internog standarda (riboze), s obzirom da se postupak pripreme uzoraka sastoji od nekoliko koraka, uključujući hidrolizu, derivatizaciju i neutralizaciju, od kojih svaki može biti izvor kvantitativnih gubitaka (npr. uspješnost derivatizacije).

Prvo se obradom kromatograma standarada (standardi očekivanih monosaharida u poznatoj koncentraciji, među kojima se nalazi i interni standard, a koji su podvrgnuti hidrolizi zajedno s uzorcima) izračunaju faktori odziva (*Response Factors* - RF) svakog derivata monosaharida u odnosu na interni standard, prema izrazu (4).

$$RF = (A_{IS} * c_x) / (A_x * c_{IS}) \quad (4)$$

Pri čemu je:

A_{IS} - površina pika internog standarda

c_{IS} - koncentracija (masa) internog standarda

A_x - površina pika analita (standarda)

c_x - koncentracija (masa) analita (standarda)

Kad se uspostave faktori odziva, ista formula primjenjuje se i za izračun koncentracije (mase) analita u uzorku, pri čemu su poznate površine pikova internog standarda i analita (očita se iz izvješća analize uzorka), koncentracija (masa) internog standarda te faktor odziva za analit u odnosu na dati interni standard.

Nakon što se izračunaju mase pojedinih monosaharida u uzorku, iste se množe s faktorima polimerizacije (0,9 za heksoze; 0,88 za pentoze; 0,907 za uronske kiseline i 0,89 za deoksi šećere), budući da se monosaharidi u uzorcima izvorno nalaze u polimernom obliku. Na taj način dobiva se masa homopolimernog oblika za svaki monosaharid. Udjel istoga (%) u uzorku (izdvojenoj polisaharidnoj frakciji) izračuna se s obzirom na odvagu uzorka prije hidrolize.

Rezultati monosaharidnog sastava polisaharidnih uzoraka prikazani su kao srednje vrijednosti njihovih udjela (%) u odgovarajućoj frakciji, s pripadajućom standardnom devijacijom.

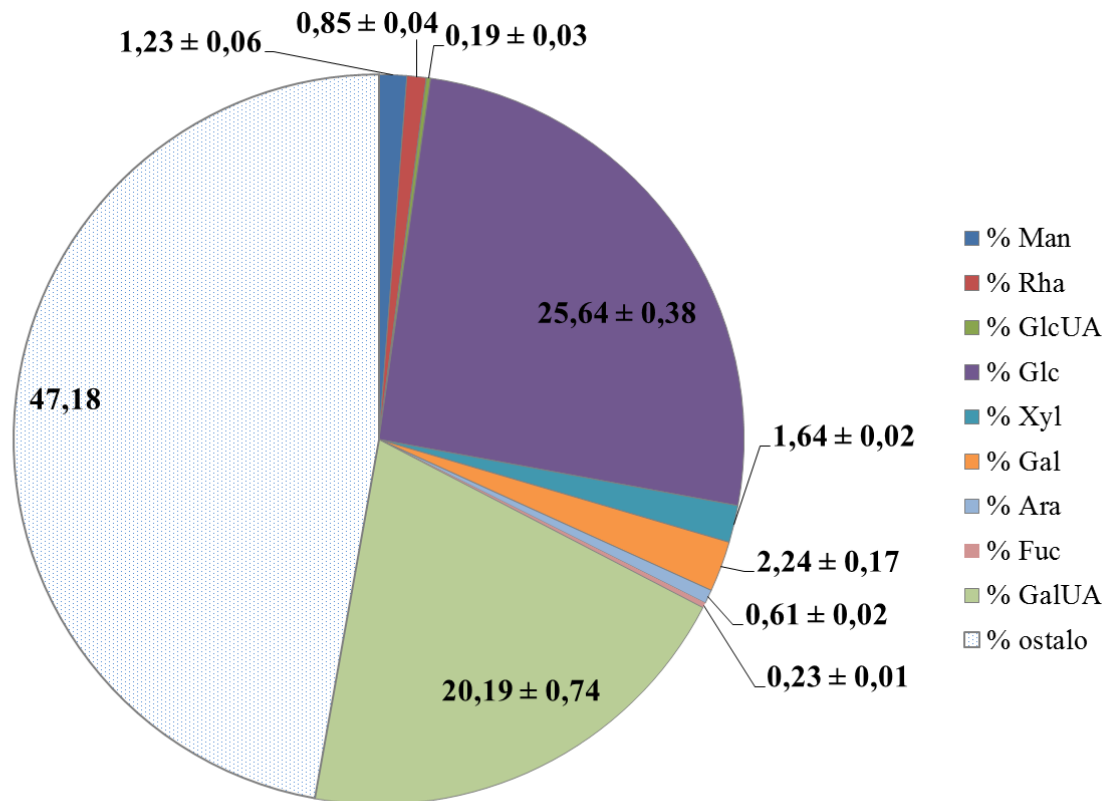
Također, izračunate su bilance (% ukupnog iskorištenja) najzastupljenijih monosaharida usporedbom inicijalnog udjela odgovarajućeg monosaharida u originalnom uzorku s udjelima istog u izdvojenim polisaharidnim frakcijama (pektin i ostatak nakon ekstrakcije) i prinosima odgovarajućih frakcija.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Otpadna biomasa crvenog luka predstavlja nusproizvod primarne obrade, tj. čišćenja glavice crvenog luka. Konvencionalni načini zbrinjavanja agroindustrijskog otpada ne nude odgovarajuće rješenje za otpadnu biomasu crvenog luka, budući da se ista ne može koristiti kao krmivo za životinje, zbog intenzivnog mirisa i okusa, niti se može upotrijebiti kao organsko gnojivo, zbog podložnosti razvoju patogenih bakterija. Također, ova otpadna biomasa nije pogodna niti za sagorijevanje, zbog niske kalorijske vrijednosti i visokog udjela vode (Salak i sur., 2013). S obzirom na dostupnu količinu, nisku cijenu, obnovljivu prirodu te zanimljiv kemijski sastav, otpadna biomasa crvenog luka, kao i otpadni materijal drugih biljnih sirovina, danas se intenzivno istražuje kao vrijedna sekundarna sirovina u postupcima iskorištavanja agroindustrijskog otpada. Otpadna biomasa crvenog luka predstavlja dobar i potencijalno komercijalno isplativ izvor različitih prehrambenih komponenata, posebice strukturnog ugljikohidrata-pektina, prehrambenih vlakana, nestrukturnih ugljikohidrata (npr. fruktana i fruktooligosaharida), ali i funkcionalnih spojeva, poput flavonoida (Benítez i sur., 2011a). Pektin iz ove sirovine može se tradicionalno primjenjivati u prehrambenoj industriji, ali također i kao funkcionalni dodatak prehrambenim proizvodima. Pritom, fokus istraživanja usmjeren je na pektinske oligosaharide, koji se iz pektina dobivaju djelomičnom kiselinskom i enzimskom hidrolizom, a funkcionalni potencijal istih očituje se u prebiotičkom djelovanju. U skladu s navedenim, cilj ovog rada bio je istražiti primjenu kelirajućeg agensa (EDTA) te utjecaj ekstrakcijskih parametara na prinos i sastav pektina iz otpadne biomase crvenog luka. Primjena kelirajućeg agensa, naspram konvencionalnih metoda ekstrakcije pektina, poput ekstrakcije vrućom vodom ili razrijeđenom kiselinom, opravdana je dostupnim literaturnim podacima koji ukazuju na stabilizaciju pektina u staničnim stijenkama kalcijevim ionima (Ca^{2+}). Kelirajući agensi, poput EDTA, vežu ione metala i time potencijalno povećavaju ekstraktibilnost pektina iz biljne sirovine. Prinosi pektina s obzirom na promjenjive ekstrakcijske uvjete određeni su gravimetrijski, dok je detaljan sastav istih određen primjenom HPLC-PDA metode s prethodnom PMP derivatizacijom, koja je u tu svrhu razvijena u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4.1. ANALIZA MONOSAHARIDNOG SASTAVA STRUKTURNIH POLISAHARIDA LJUSKE CRVENOG LUKA

Analiza monosaharidnog sastava jedna je od najvažnijih metoda za određivanje potencijala ugljikohidratne frakcije neke biljne sirovine, kojom se može odrediti približan udjel određene polisaharidne komponente od interesa, a time i razviti adekvatna strategija za njezino izdvajanje. U ovome radu analiza monosaharidnog sastava originalne sirovine provedena je na alkoholno-netopljivom ostatku ljuske crvenog luka, dobivenom nakon trostruke ekstrakcije 70 %-tnim etanolom. Uzorak je podvrgnut potpunoj kiselinskoj hidrolizi uz predhidrolizu, a oslobođeni monomeri analizirani su primjenom HPLC-PDA metode uz prethodnu PMP derivatizaciju. S obzirom da se analiziraju monomeri, prilikom analize strukturnih polisaharida nužno je prethodno ukloniti izvorno prisutne jednostavne šećere (monosaharide, disaharide, oligosaharide), kao i nestrukturane polisaharide (primjerice škrob), kako oni ne bi interferirali u interpretaciji rezultata, odnosno kako ne bi lažno povećavali prinos određenih monomera (najčešće glukoze). Korištena HPLC-PDA metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje monosaharidnih konstituenata u obliku PMP derivata razvijena je u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda PBF-a. Metodom je moguće identificirati prisutnost 10 monosaharida, od kojih 8 neutralnih šećera (manoza, riboza, ramnoza, glukoza, ksiloza, galaktoza, arabinoza, fukoza) te 2 uronske kiseline (glukuronska i galakturonska kiselina), dok se kvantitativno može odrediti 9 monosaharida, budući da se riboza koristi kao interni standard. Monosaharidni sastav strukturnih polisaharida ljuske crvenog luka prikazan je na Slici 5.



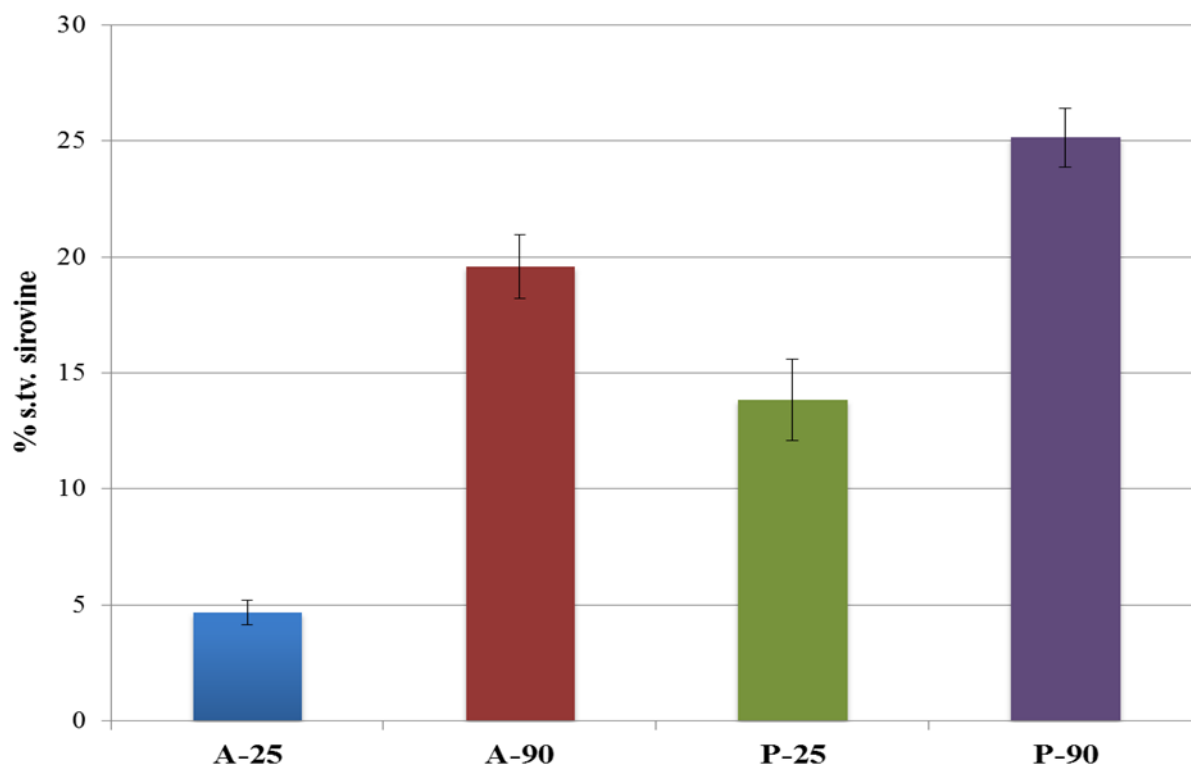
Slika 5. Prikaz monosaharidnog sastava originalnog uzorka ljuske crvenog luka (Man - manoza, Rha - ramnoza, GlcUA - glukuronska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinoza, Fuc - fukoza, GalUA - galakturonska kiselina)

U sastavu strukturnih polisaharida ljuske crvenog luka određeni su svi monosaharidi koji se i mogu odrediti razvijenom HPLC metodom, dakle 7 neutralnih šećera i 2 uronske kiseline. Ukupni udjel strukturnih ugljikohidrata u sirovini iznosi 52,8 %, dok ostatak do 100 % suhe tvari zauzimaju ostale komponente poput bjelančevina, mineralnih tvari, masti, jednostavnih šećera te različiti spojevi male molekulske mase. U sastavu strukturne ugljikohidratne frakcije ljuske crvenog luka dominira glukoza, odnosno ukupni glukan s udjelom od 25,6 %, koji se može približno izjednačiti s udjelom celuloze u ovom biljnom materijalu. Sljedeći monomer po zastupljenosti je galakturonska kiselina, s udjelom od 20,2 % u suhoj tvari sirovine. S obzirom da je galakturonska kiselina glavni konstituent strukturnog polimera pektina, ovaj podatak ukazuje na visoku zastupljenost pektina u ljusci crvenog luka, čiji udjel, kada se pribroje i ostali najčešće zastupljeni pektinski konstituenti (ramnoza, galaktoza, arabinoza) iznosi približno $\frac{1}{4}$ suhe tvari sirovine. Dobiveni rezultati monosaharidnog sastava ljuske crvenog luka u ovome radu u skladu su s dostupnom literaturom, u kojoj udjel glukoze u

ljusci luka, koja je strukturno slična pektinskoj sirovini upotrijebljenoj u ovom istraživanju, iznosi 26,1 %, dok udjel galakturonske kiseline iznosi 19,3 % (Babbar i sur., 2016b).

4.2. ANALIZA PRINOSA PEKTINSKIH FRAKCIJA

Priprema sirovine ljuske crvenog luka za izdvajanje pektina započela je ekstrakcijom 70 %-tnim etanolom, čime je izdvojeno 22,75 % suhe tvari sirovine koju su činile hidrofilne komponente male molekulske mase ekstraktibilne u otopini visokog udjela etanola. Iz tako pripremljene sirovine izdvojen je pektin pomoću kelirajućeg agensa etilendiaminotetraoctene kiseline (EDTA) pri dvije različite temperature (25 °C i 90 °C) i dvije različite pH-vrijednosti otapala (4,5 i 7,0). Udjel izdvojenih pektina s obzirom na originalnu sirovinu dobiven je gravimetrijski, a rezultati su prikazani na Slici 6.



Slika 6. Prinos pektinskih tvari (%) iz ljuske crvenog luka u odnosu na suhu tvar (s.tv.) početne sirovine

Na sam prinos pektina značajno utječe primijenjena ekstrakcijska metoda, pri čemu su najvažniji parametri temperatura ekstrakcije, pH-vrijednost otapala i vrijeme ekstrakcije (Yapo i sur., 2007a). Izdvajanje pektina iz biljne sirovine konvencionalno se provodi primjenom kiseline ekstrakcije pri nižim pH-vrijednostima otapala (pH 1-3) i na visokim temperaturama (70-90 °C) (Munarini i sur., 2012). Kalapathy i Proctor (2001) u svojem

istraživanju naveli su da je najvažniji čimbenik za izdvajanje pektinskih tvari jačina kiseline, tj. pH-vrijednost otapala. Primjenom nižih temperatura i kraćeg vremena ekstrakcije dobili su niže prinose pektina, dok produljenje vremena ekstrakcije i povećanje temperature nije značajno utjecalo na prinos pektina. Ukoliko se primjenjuje dulje vrijeme ekstrakcije, potrebno je sniziti temperaturu, kako ne bi došlo do potpune degradacije pektinskih tvari, a kod smanjenja ekstrakcijskog vremena poželjno je povećati temperaturu u svrhu povećanja prinosa pektina. Niže pH-vrijednosti otapala pomažu lomljenju veza kojima je pektin vezan u biljnoj sirovini, ali istovremeno daljnje snižavanje pH-vrijednosti može dovesti do oštećenja neutralnih bočnih lanaca i do potpune degradacije pektinske molekule. Babbar i suradnici (2016b) istraživali su utjecaj različitih ekstrakcijskih čimbenika na prinos pektinskih tvari iz ljuske luka. Istraživali su ekstrakciju pektinskih tvari pomoću enzima, pomoću dušične kiseline (0,4 % w/v) te ekstrakciju primjenom dva kelirajuća sredstva - amonijevog oksalata (0,5 % w/v) i natrijevog heksametafosfata (2 % w/v). Primjenom dušične kiseline pri pH 1,4 i temperaturi od 48 °C tijekom 8 h dobili su prinos pektinskih tvari od 4,1 %, a enzimska ekstrakcija nije bila uspješnija od kiselinske ekstrakcije, budući da je primjena enzima te provođenje ekstrakcije pri pH 4,8 i temperaturi od 80 °C u trajanju od 8 h dovelo do niskog prinosa pektinskih tvari od svega 2,3 %. S obzirom na rezultate dosadašnjih istraživanja, neučinkovite ekstrakcije pektinskih polisaharida primjenom kiseline i enzima sugeriraju da su neke pektinske tvari u ljusci luka čvrsto vezane unutar stanične stijenke, vjerojatno preko kalcijevih iona. Zato se u novije vrijeme istražuje primjena kelirajućih agenasa (poput EDTA), koji uklanjaju kalcijeve ione iz kompleksa kalcij-pektin, bez oštećenja homogalakuronskih lanaca (Munarini i sur., 2012).

S obzirom na navedeno, u ovom radu ispitivao se utjecaj promjenjivih uvjeta ekstrakcije (pH otapala i temperatura ekstrakcije) na prinos pektina iz ljuske crvenog luka. Iz dobivenih rezultata (Slika 6) vidljivo je da primjena više temperature ekstrakcije te više pH-vrijednosti otapala utječu na dobivanje većih prinosa pektinskih tvari. Najveći prinos pektinskih tvari (25,14 %) dobiven je ekstrakcijom pri 90 °C i pH 7,0, dok je najniži prinos pektina (4,67 %) iz ljuske crvenog luka ostvaren ekstrakcijom pri 25 °C i pH 4,5. Rezultati također pokazuju da viša pH-vrijednost u kombinaciji s nižom temperaturom ekstrakcije doprinosi povećanju prinosa pektina (za razliku od primjene iste temperature u kombinaciji s nižom pH-vrijednosti otapala), što upućuje na zaključak da pH otapala ima značajniji utjecaj na ekstraktibilnost pektina od temperature ekstrakcije.

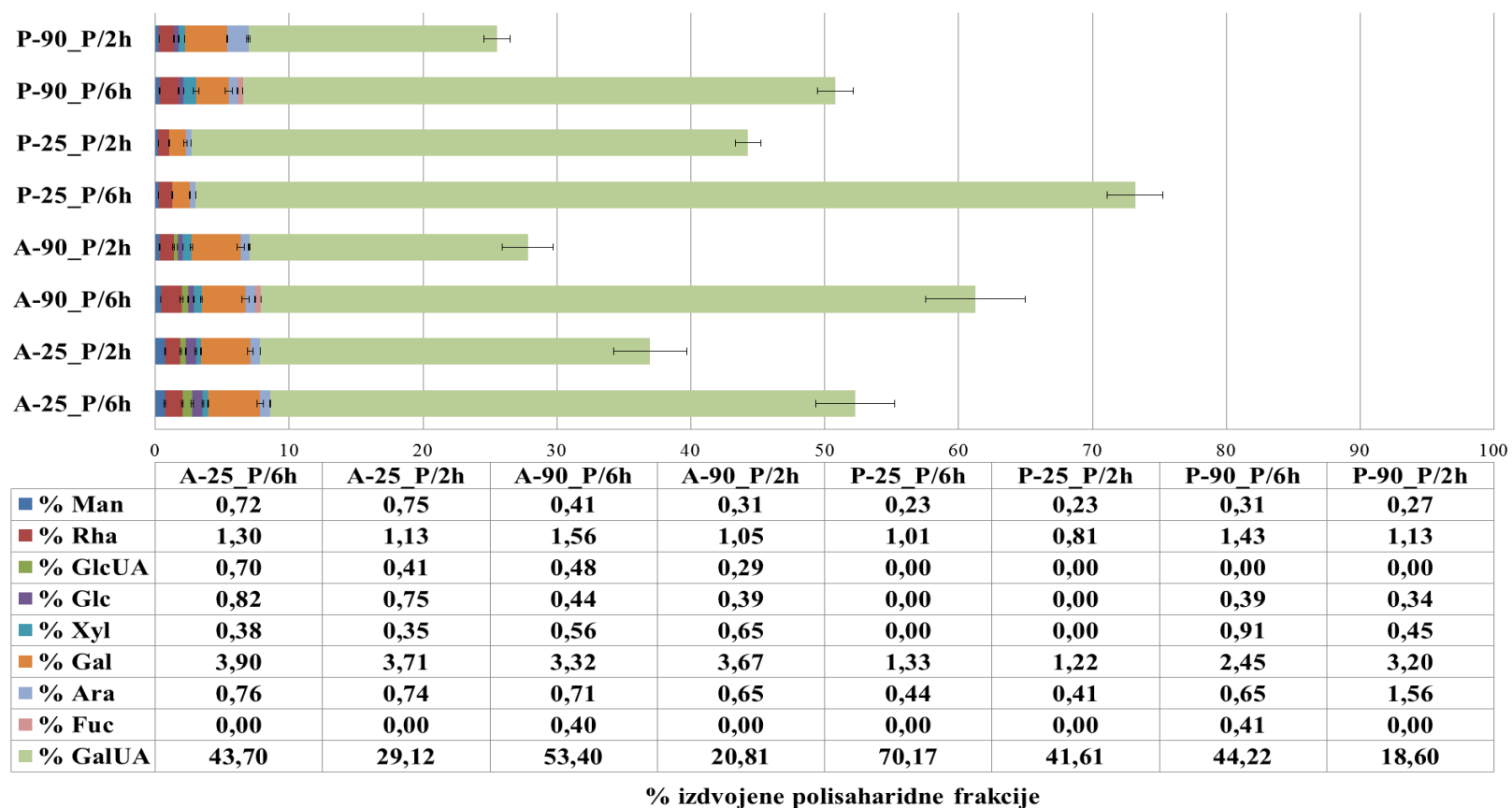
Babbar i suradnici (2016b) istraživali su i utjecaj kelirajućih sredstava na prinose pektina prilikom njegovog izdvajanja. Pri temperaturama od 95 °C, pH 4,8 i vremenu trajanja

ekstrakcije od 30 minuta dobiveni su prinosi pektinskih tvari iz ljuske luka od 22,2 % (0,5 % amonijev oksalat, w/v) i 22,0 % (2 % natrijev heksametafosfat, w/v). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem potvrdili su pretpostavku autora da je većina pektinskih tvari unutar stanične stijenke povezana preko kalcijevih iona. U ovom radu, primjenom EDTA pri 90 °C, pH 7,0 i vremenu trajanja ekstrakcije od 2 h, dobiven je prinos pektina iz ljuske crvenog luka od 25,14 %. Rezultati dobiveni u ovome radu u skladu su s rezultatima istraživanja u kojem su korištena druga kelirajuća sredstva poput amonijevog oksalata i natrijevog heksametafosfata (Babbar i sur., 2016b).

4.3. MONOSAHARIDNI SASTAV PEKTINSKIH FRAKCIJA IZ LJUSKE CRVENOG LUKA TE OSTATKA NAKON EKSTRAKCIJE ISTIH

Detaljna analiza izdvojenih pektinskih tvari iz ljuske crvenog luka te ostatka nakon ekstrakcije omogućena je nakon potpune kiselinske hidrolize polisaharida, PMP derivatizacijom dobivenih monosaharida te analizom PMP derivata već spomenutom razvijenom HPLC metodom. Maseni udjeli identificiranih monosaharida u uzorku za izdvojene pektinske frakcije prikazani su na Slici 7.

Pektin je heterogeni polisaharid koji se sastoji od više različitih monosaharidnih jedinica zastupljenih u različitim udjelima, ovisno o biljnom izvoru te metodi ekstrakcije (Round i sur., 2010). Najzastupljenija monosaharidna komponenta pektina je galakturonska kiselina, s prosječnim udjelom od približno 65 % (Joye i Luzio, 2000) te se pektin često definira upravo kao polimer galakturonske kiseline. Od ostalih monosaharida u molekuli pektina u različitim udjelima (također ovisno o biljnom izvoru te postupku ekstrakcije) najviše su zastupljeni galaktoza i ramnoza, kao dio razgranatih ramnogalakturonanskih regija (Thibault i sur., 1993). Pektinski uzorci hidrolizirani su prema protokolu za topljive polisaharide kako je opisano u poglavlju „Metode rada“. Potpuna kiselinska hidroliza analitički je postupak koji se koristi kako bi se heteropolimerni pektin razdvojio na sastavne komponente - monosaharide. Korištenje kiseline (H_2SO_4) pod utjecajem visoke temperature (100 °C) potpomaže cijepanje glikozidnih veza, pri čemu se prisutni monosaharidi izdvajaju iz pektina.



Slika 7. Kvalitativni i kvantitativni prikaz udjela monosaharida u pektinskim frakcijama ljuske crvenog luka (Man - manoza, Rha - ramnoza, GlcUA - glukuronska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinoza, Fuc - fukoza, GalUA - galakturonska kiselina)

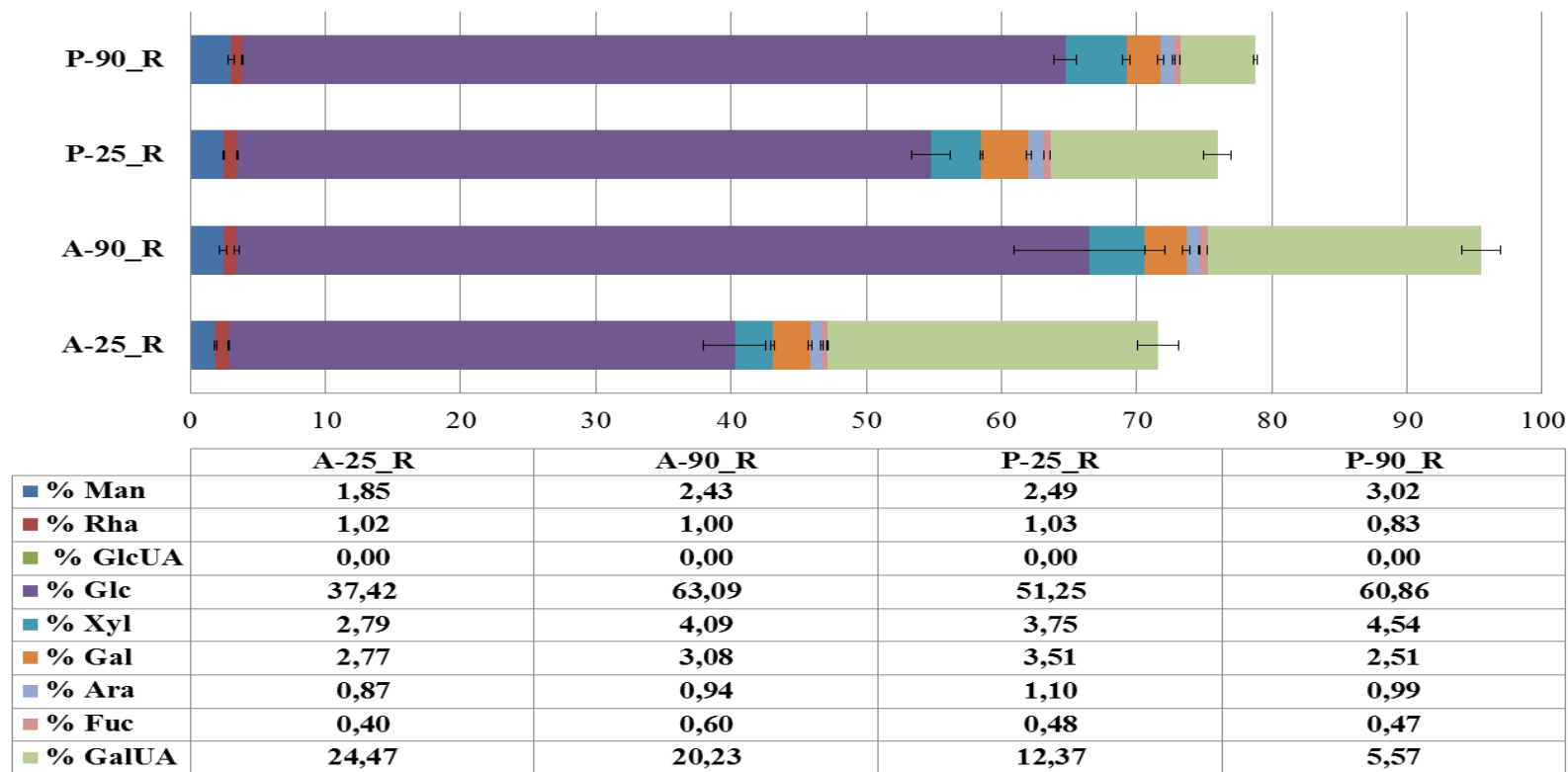
Garna i suradnici (2004) u svojem su radu istraživali utjecaj kemijske hidrolize, odnosno utjecaj različitih parametara hidrolize (poput vrste i koncentracije kiseline, temperature, vremena trajanja hidrolize) na oslobađanje i degradaciju pektinskih monosaharida. Za kiselinsku hidrolizu pektina autori su koristili 1 M H₂SO₄ na 100 °C u trajanju reakcije od 10 h. Rezultati dobiveni nakon kiselinske hidrolize pokazali su da se oslobađanje svih monosaharida ne odvija istom brzinom, pri čemu je arabinoza bio prvi monosaharid koji se hidrolizirao. Autori su pratili koncentracije oslobođenih šećera sve do postizanja maksimalne vrijednosti, nakon čega je došlo do smanjenja, odnosno degradacije oslobođenih monosaharida. Maksimalne koncentracije dobivene su nakon 1 h hidrolize za arabinozu, nakon 2 h za glukozu, nakon 3 h za galaktozu i nakon 5 h za ramnozu. Kao razlog duljeg vremena oslobađanja u slučaju ramnoze, autori navode jaku vezu između spomenutog monosaharida i galakturonske kiseline. U ovom radu, potpuna kiselinska hidroliza provodila se također s 1 M H₂SO₄ na 100 °C, ali u vremenima od 2 i 6 h. Dvosatna kiselinska hidroliza provodila se kako bi se iz ekstrahiranog uzorka ljuske crvenog luka izdvojili monosaharidi koji su osjetljivi na djelovanje povišene temperature u kiselom mediju te koji će se, pri tim uvjetima, kroz dulje vrijeme izlaganja, degradirati. Kiselinska hidroliza od 6 h provodila se kako bi se izdvojili ostali monosaharidi koji se teže otpuštaju iz pektina, poput ramnoze koja se nalazi u polimernom obliku s galakturonskom kiselinom.

Prema Slici 7 vidljivo je da je vrijeme hidrolize imalo najviše utjecaja na prinos galakturonske kiseline, dok prinosi ukupnih neutralnih šećera nisu puno ovisili o vremenu hidrolize. Male varijacije udjela pojedinih neutralnih šećera za iste uzorke mogu se jednim dijelom pripisati određenom stupnju analitičke pogreške, s obzirom da se općenito radi o vrlo malim udjelima. Ipak, nešto veći stupanj degradacije primijećen je kod pentoznog monosaharida arabinoze (uzorak P-90_P), što je u skladu s manjom strukturnom otpornošću istog u odnosu na heksoze pri produljenom izlaganju povišenoj temperaturi u kiselom mediju. Jednako tako, može se primijetiti da je prinos nekih neutralnih šećera, poput ramnoze, veći nakon duže hidrolize, što je u skladu s većom hidrolitičkom otpornošću nekih tipova glikozidnih veza.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti o važnosti optimizacije trajanja potpune kiselinske hidrolize prilikom analize monosaharidnog sastava nekog polisaharidnog uzorka u svrhu dobivanja relevantnih podataka o udjelima pojedinih monomera, na kojima se onda temelji i precizno uspostavljanje bilance monomera od interesa.

Točan monosaharidni sastav izdvojenih pektinskih uzorka iz ljuske crvenog luka prikazan je na uzorcima hidroliziranim tijekom 6 h (Slika 7), uz malu iznimku uzorka P-90_P, kod kojeg su kao relevantni udjeli za arabinozu i galaktozu uzeti oni nakon dvosatne hidrolize. Sve

pektinske frakcije ljuske crvenog luka imaju karakterističan monosaharidni sastav, pri čemu je galakturonska kiselina zastupljena u najvećem udjelu. Kao što je vidljivo na Slici 7, monosaharidni sastav pektinskih frakcija ljuske crvenog luka razlikuje se s obzirom na različite uvjete ekstrakcije pektina. Udjel galakturonske kiseline u analiziranim uzorcima varira od 43,7 % (uzorak A-25_P, slika 7) do 70,2 % (uzorak A-90_P, slika 7), dok neutralna frakcija čini približno 7 % (ili manje) u svakom uzorku. Udjel ramnogalakturonana je relativno nizak, s obzirom na niske udjele ramnoze kako u osnovnoj sirovini, tako i u izdvojenim pektinskim frakcijama, te je ista (ramnogalakturonan I) pretežito supstituirana galaktanima (galaktoza je sljedeći pektinski konstituent po zastupljenosti u ovoj sirovini, iza galakturonske kiseline), međutim, također u relativno niskom udjelu. Uzimajući u obzir dominantnost galakturonske kiseline u kombinaciji s relativno niskim udjelima ramnoze, arabinoze i galaktoze, kao ostalih najzastupljenijih monosaharida u pektinskoj molekuli općenito, može se zaključiti da se pektin ljuske crvenog luka nalazi pretežno u obliku homogalakturonana. Slične rezultate navode i Jaime i suradnici (2002). U neutralnim frakcijama su, osim uobičajeno prisutnih pektinskih monosaharida (ramnoze, galaktoze i arabinoze), prisutne i druge komponente (prisutnost i udjel razlikuju se s obzirom na ekstrakcijske uvjete), koje mogu biti dio ramnogalakturonana II (u tom slučaju zastupljenog u vrlo malom udjelu) ili su pak sastavni dijelovi nekih drugih topljivih polisaharida, koji su se koekstrahirali pri primijenjenim uvjetima. Uvidom u monosaharidni sastav nije moguće utvrditi koja od ovih mogućnosti je istinita. U svakom slučaju, njihov udjel je vrlo nizak. Osim u pektinskim frakcijama, monosaharidni profil određen je i u ostacima nakon ekstrakcije pektinskih tvari (Slika 8), kako bi se utvrdila prisutnost rezidualnog pektina u toj frakciji, a time i definirali uvjeti za što uspješniju ekstrakciju pektina iz ljuske crvenog luka. Ostaci nakon ekstrakcije hidrolizirani su pomoću razrijeđene sumporne kiseline tijekom 2 h uz prethodnu predhidrolizu sumpornom kiselinom visoke koncentracije, kako je opisano u poglavlju „Metode rada“.



% izdvojene polisaharidne frakcije

Slika 8. Kvalitativni i kvantitativni prikaz udjela monosaharidnih jedinica u ostacima nakon ekstrakcije

(Man - manoz, Rha - ramnoza, GlcUA - glukuronska kiselina, Glc - glukoza, Xyl - ksiloza, Gal - galaktoza, Ara - arabinoza, Fuc - fukoza, GalUA - galakturonska kiselina)

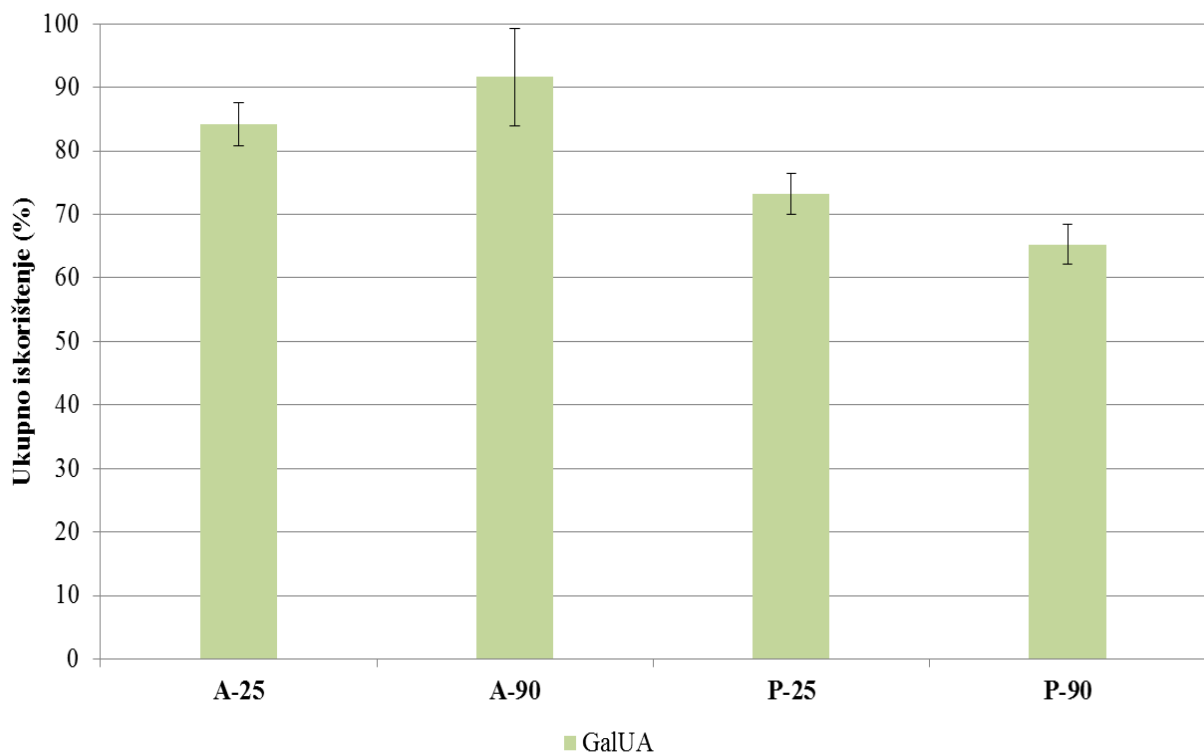
Iz grafičkog prikaza na Slici 8 vidljivo je da su frakcije ostataka nakon ekstrakcije heterogenog sastava u kojem dominira glukoza, što upućuje na dominantnu zastupljenost celuloze. Najveći udjel glukoze (63,09 %) detektiran je u uzorku ostatka koji je bio ekstrahiran pri 90 °C i pH 4,5, dok je najmanji udjel glukoze (37,42 %) detektiran u uzorku koji je ekstrahiran pri 25 °C i pH od 4,5.

Osim celuloze, u ovoj frakciji zastupljeni su i monosaharidi karakteristični za hemicelulozu, poput ksiloze i manoze, ali i dio ukupne glukoze. Rezultati potvrđuju relativnu selektivnost postupka ekstrakcije kelirajućim agensima, budući da se glavna hemiceluloznih polisaharida te celuloza izdvajaju u ostatku nakon ekstrakcije pektinskih tvari. U uzorcima ostataka prisutna je i galakturonska kiselina, što upućuje na prisutnost rezidualnog pektina, čiji udjel ovisi o primijenjenim uvjetima ekstrakcije. Najveći udjel galakturonske kiseline (24,47 %) određen je u ostatku nakon ekstrakcije pri 25 °C i pH 4,5, dok je najmanji udjel od 5,57 % određen u uzorku ostatka koji je ekstrahiran s EDTA pri 90 °C i pH 7,0. Osim galakturonske kiseline, u ostacima nakon ekstrakcije određeni su i neutralni pektinski monosaharidi (ramnoza, galaktoza i arabinoza) koji ukazuju na rezidualne ramnogalakturonanske regije. Primjena niže pH-vrijednosti ekstrakcije utjecala je na povećanje udjela rezidualnog pektina u frakciji ostataka, što može ukazivati na bolju ekstrakcijsku učinkovitost kelirajućeg agensa pri višoj pH-vrijednosti otapala, međutim, potrebno je uspostaviti bilance pektinskih monomera za pouzdan zaključak.

Iz rezultata prikazanih na Slikama 7 i 8 vidljivo je da sve polisaharidne frakcije koje su analizirane u ovome radu nisu 100 % čiste u smislu ugljikohidratnog (monomernog) sastava, odnosno, u istima postoji manji ili veći udjel neugljikohidratnih komponenti, bilo da se radi o funkcionalnim skupinama vezanima za polisaharide (poput acetata, metila ili fenolnih kiselina), vezanim ionima ili nekim drugim makromolekulama (npr. proteinima).

4.4. ANALIZA BILANCI PEKTINSKIH MONOSAHARIDA - GALAKTURONSKE KISELINE, RAMNOZE, ARABINOZE I GALAKTOZE

Bilance pojedinih pektinskih monomera izračunate su s obzirom na udjele istih u izdvojenim pektinskim frakcijama i ostacima nakon ekstrakcije u kombinaciji s prinosima samih polisaharidnih frakcija. Bilance su prikazane kao % ukupnog iskorištenja u odnosu na inicijalni udjel promatranog monosaharida u ljusci crvenog luka, odnosno kao relativna iskorištenja pojedinog monomera unutar pektinske frakcije te frakcije ostatka u odnosu na ukupno iskorištenje. Bilance su uspostavljene za galakturonsku kiselinu, kao dominantnu pektinsku komponentu, a s obzirom na visoki udjel iste u originalnoj sirovini i najvažnijeg pokazatelja uspješnosti ispitivanih ekstrakcijskih uvjeta. Bilanca galakturonske kiseline prikazana je na Slici 9 (kao ukupno iskorištenje) dok je raspodjela iste u izdvojenim frakcijama prikazana u Tablici 2.



Slika 9. Prikaz ukupnog iskorištenja galakturonske kiseline (GalUA) za različite uvjete ekstrakcije pektinskih tvari iz ljuske crvenog luka

Ukupna iskorištenja galakturonske kiseline ovise o primijenjenim uvjetima ekstrakcije te su vrlo visoka u slučaju niže pH-vrijednosti otapala, približno 84 % inicijalnog udjela galakturonske kiseline za ekstrakciju pri sobnoj temperaturi te približno 92 % u slučaju ekstrakcije pri povišenoj temperaturi, što je ujedno i najviše dobiveno ukupno iskorištenje u ovom radu. Primjenom više pH-vrijednosti prilikom ekstrakcije kelirajućim agensom ukupna iskorištenja su nešto niža te iznose približno 72 % pri 25 °C i približno 65 % pri 90 °C. Ostatak do 100 % iskorištenja predstavlja stvarni gubitak galakturonske kiseline prilikom ekstrakcije. Gubitak može nastati zbog degradacije pektinske molekule uslijed oštrih ekstrakcijskih uvjeta, pri čemu se formiraju manji fragmenti galakturonana, koji se kasnije ne mogu precipitirati dodatkom etanola, ili su, ako se i precipitiraju, uklonjeni tijekom dijalize. Druga mogućnost je gubitak frakcije pektinskih molekula manje molekulske mase koje su nativno prisutne u biljnom materijalu, ali se nisu izdvojile zbog gore navedenih razloga (nemogućnost precipitacije ili dijaliza).

Jedno svojstvo koje je specifično za pektin je njegova degradacija u neutralnom do blago lužnatom mediju, za razliku od njegove relativne stabilnosti u kiselim uvjetima (May, 1990). Pektin je sklon degradaciji u manje kiselim uvjetima (pH 5 ili viši) i pri višim temperaturama (May, 1997). Rezultati ovog istraživanja, prikazani na Slici 9, pokazuju da prisutnost kiselog medija (pH 4,5) dovodi do većeg ukupnog iskorištenja galakturonske kiseline, dok ekstrakcija u neutralnom mediju (pH 7,0) smanjuje ukupno iskorištenje galakturonske kiseline (odnosno, provođenjem ekstrakcije u neutralnom mediju zamijećen je veći gubitak galakturonske kiseline, nastao uslijed degradacije pektina).

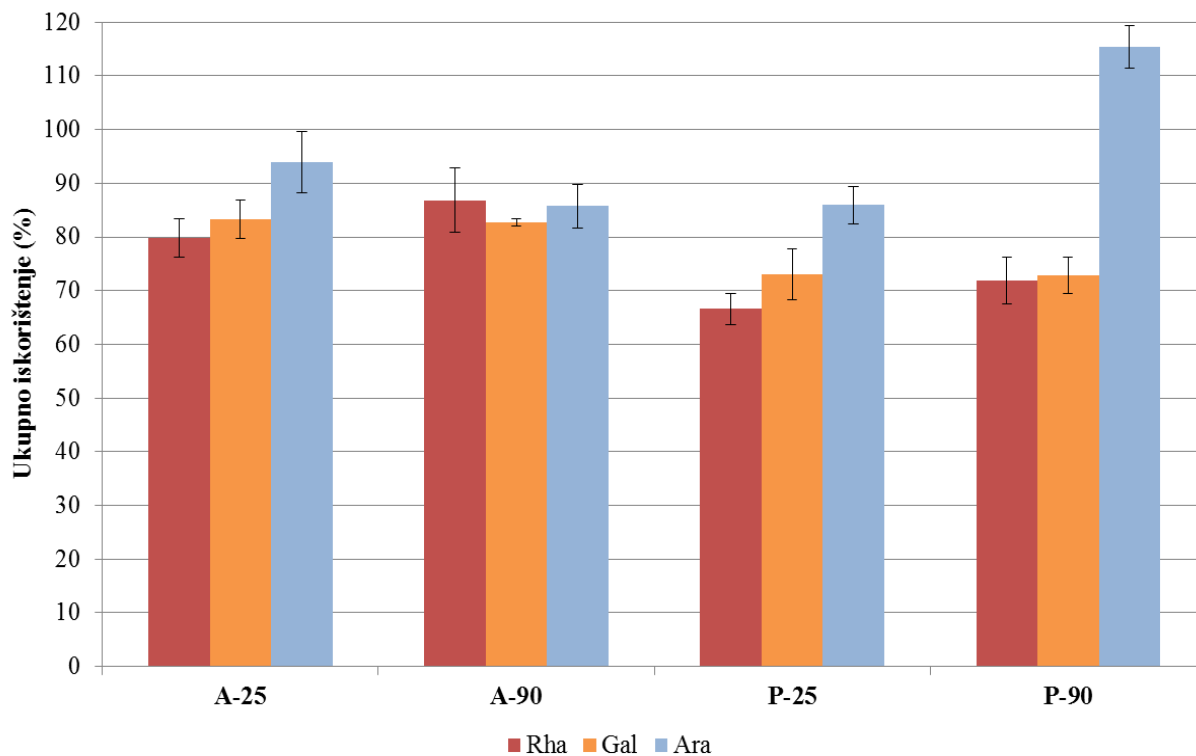
Osim ukupnog iskorištenja, važan pokazatelj ekstrakcijske učinkovitosti je i raspodjela iskorištenja unutar izdvojenih frakcija, odnosno podatak koliko je neke komponente izdvojeno u promatranj frakciji.

Tablica 2. Prikaz relativnih iskorištenja galakturonske kiseline (GalUA) u pektinskoj frakciji (P) te frakciji ostatka nakon ekstrakcije (R)

Uzorak	Relativno iskorištenje GalUA (%)	
	P	R
<i>GalUA / A-25</i>	12,90 ± 2,06	87,10 ± 2,06
<i>GalUA / A-90</i>	56,56 ± 2,49	43,44 ± 2,49
<i>GalUA / P-25</i>	65,66 ± 1,59	34,34 ± 1,59
<i>GalUA / P-90</i>	84,43 ± 2,31	14,25 ± 0,23

Iz Tablice 2 vidljivo je kako više pH-vrijednosti prilikom ekstrakcije kelirajućim agensom, kao i povišena temperatura ekstrakcije, pogoduju većem relativnom iskorištenju galakturonske kiseline u pektinskoj frakciji. Sukladno tome, najmanje rezidualnog pektina dobiveno je u ostatku nakon ekstrakcije pri pH 7,0 i temperaturi 90 °C. Usporedbom s podacima na Slici 5, može se zaključiti da, u ovom radu, najveće iskorištenje galakturonske kiseline u pektinskoj frakciji iznosi približno 50 %. Osim toga, kod ekstrakcije pri nižoj pH-vrijednosti, temperatura je imala puno veći utjecaj, nego kod ekstrakcije pri višoj pH-vrijednosti, budući da je pri 25 °C izdvojeno tek približno 13 % (A-25) inicijalno prisutne galakturonske kiseline iz ljuske crvenog luka u obliku pektinske frakcije, dok pri 90 °C taj postotak iznosi približno 56 % (A-90). Značajan utjecaj pH vidljiv je kod ekstrakcije pri sobnoj temperaturi, gdje je viši pH rezultirao peterostrukim povećanjem relativnog iskorištenja GalUA u pektinskoj frakciji (66 % za uzorak P-25). Kod povišene temperature ekstrakcije, pH otapala s kelirajućim agensom nema veliki utjecaj na iskorištenje galakturonske kiseline u pektinskoj frakciji, međutim, ima značajan utjecaj na ukupno iskorištenje galakturonske kiseline. Tako je najveće iskorištenje galakturonske kiseline u pektinskoj frakciji ostvareno u uzorku P-90 (84 %), a za isti uzorak određen je ujedno i najveći gubitak GalUA prilikom ekstrakcije (Slika 9). Niža pH-vrijednost ekstrakcije pri istoj temperaturi (90 °C) pogodovala je boljem očuvanju strukture pektinske molekule (najmanji gubitak postignut je u uzorku A-90; Slika 9), dok je iskorištenje GalUA u pektinskoj frakciji (84 % za uzorak P-90) samo 8 % niže od maksimalne vrijednosti postignute u ovome radu (92 % za uzorak A-90; Slika 9). Visoki udjel rezidualnog pektina u tom slučaju otvara druge mogućnosti za povećanje iskorištenja, primjerice istraživanjem utjecaja još nižih pH-vrijednosti te drugih kelirajućih agenasa, kao i njihove koncentracije.

Ukupna iskorištenja za neutralne pektinske monosaharide prikazana su na Slici 10.



Slika 10. Ukupna iskorištenja ramnoze (Rha), galaktoze (Gal) i arabinoze (Ara) u odnosu na različite uvjete ekstrakcije pektinskih tvari iz ljuske crvenog luka

Monosaharidi ramnoza, galaktoza i arabinoza inicijalno su prisutne u značajnije manjim udjelima u ljusci luka, u odnosu na galakturonsku kiselinu. Kako se u ovome radu ispitivao utjecaj promjene ekstrakcijskih uvjeta s obzirom na pH-vrijednost otapala i temperaturu, iz rezultata je vidljivo da navedeni parametri utječu na dobivene vrijednosti ukupnih iskorištenja spomenutih monosaharida. Iz Slike 10 vidljivo je da je najveće ukupno iskorištenje ramnoze ostvareno pri pH 4,5 i temperaturi od 90 °C te ono iznosi približno 87 % inicijalnog udjela ramnoze, dok je najveće ukupno iskorištenje galaktoze (približno 83 %) ostvareno ekstrakcijom pri sobnoj temperaturi i pri pH 4,5. U slučaju arabinoze, najveće ukupno iskorištenje ostvareno je ekstrakcijom na 90 °C i pH 7,0 te ono iznosi približno 115 %, no, ukupno iskorištenje koje je veće od 100 % upućuje na analitičku pogrešku. S obzirom na moguću analitičku pogrešku, najveće ukupno iskorištenje (približno 94 %) za arabinozu dobiveno je ekstrakcijom na sobnoj temperaturi i pri pH 4,5. Iz rezultata se može zaključiti da spomenutim monosaharidama najbolje odgovaraju uvjeti ekstrakcije pri sobnoj temperaturi i

pH 4,5 što potvrđuje činjenicu da su pektinske molekule nestabilnije u neutralnom mediju (May, 1990).

Tablica 3. Prikaz relativnih iskorištenja ramnoze (Rha), galaktoze (Gal) i arabinoze (Ara) u pektinskoj frakciji (P) te frakciji ostatka nakon ekstrakcije (R)

Uzorak	Relativno iskorištenje Rha, Gal, Ara (%)	
	P	R
<i>Rha / A-25</i>	9,01 ± 0,71	90,99 ± 0,71
<i>Rha / A-90</i>	48,49 ± 1,92	51,51 ± 1,92
<i>Rha / P-25</i>	24,76 ± 0,91	75,24 ± 0,91
<i>Rha / P-90</i>	58,83 ± 4,40	43,61 ± 1,73
<i>Gal / A-25</i>	9,19 ± 0,01	89,98 ± 1,45
<i>Gal / A-90</i>	35,73 ± 1,46	66,89 ± 4,65
<i>Gal / P-25</i>	10,69 ± 0,69	88,25 ± 1,91
<i>Gal / P-90</i>	49,33 ± 1,74	50,67 ± 1,74
<i>Ara / A-25</i>	5,99 ± 0,32	92,49 ± 2,64
<i>Ara / A-90</i>	22,13 ± 0,54	76,79 ± 1,91
<i>Ara / P-25</i>	11,02 ± 0,00	87,01 ± 3,41
<i>Ara / P-90</i>	55,80 ± 1,69	44,20 ± 1,69

Iz rezultata u Tablici 3 vidljivo je da ekstrakcija pri povišenom pH i povišenoj temperaturi pogoduje većem relativnom iskorištenju ramnoze u pektinskoj frakciji (uzorci A-90 i P-90; Tablica 3). Sukladno tome, najmanje rezidualnog pektina dobiveno je u ostatku nakon ekstrakcije pri pH 7,0 i temperaturi 90 °C, dok je najviše rezidualnog pektina zaostalo u ostatku nakon ekstrakcije pri pH 4,5 i temperaturi 25 °C. Povišeni pH i povišena temperatura također su imali veći utjecaj na dobivanje većih relativnih iskorištenja u slučaju galaktoze i arabinoze te je i tu najmanje rezidualnog pektina zaostalo u ostacima nakon ekstrakcije pri pH 7,0 i temperaturi 90 °C. Ipak s obzirom na dobivene visoke vrijednosti relativnih iskorištenja u ostacima nakon ekstrakcije, za pretpostaviti je da primijenjeni ekstrakcijski uvjeti ne utječu najpovoljnije na izdvajanje spomenutih monosaharida, što otvara mogućnosti za daljnje optimiziranje metode ekstrakcije.

5. ZAKLJUČCI

1. Razvijenom HPLC metodom u sastavu strukturnih polisaharida ljuske crvenog luka određeno je 7 neutralnih šećera (manoz, ramnoza, glukoza, ksiloza, galaktoza, arabinoza, fukoza) te 2 uronske kiseline (glukuronska i galakturonska kiselina).
2. Ukupni udjel strukturnih polisaharida u sirovini iznosi 52,8 %, pri čemu dominira monosaharid glukoza s 25,6 %, a po zastupljenosti slijedi galakturonska kiselina s 20,2 %.
3. Primijenjenom ekstrakcijskom metodom pomoću kelirajućeg agensa (EDTA) najveći prinos pektinskih tvari (25,14 %) dobiven je iz ljuske crvenog luka ekstrahirane pri 90 °C i pH 7,0, dok je najniži prinos pektinskih tvari (4,67 %) dobiven iz ljuske crvenog luka ekstrahirane pri 25 °C i pH 4,5.
4. Svi analizirani pektinski izolati ljuske crvenog luka imaju karakterističan monosaharidni sastav s dominantno zastupljenom galakturonskom kiselinom, iza koje slijede monosaharidi ramnoza, galaktoza i arabinoza.
5. Najzastupljeniji tip pektina je homogalakturonan, dok udjel ramnogalakturonana je relativno nizak te je isti najviše supstituiran galaktanima.
6. U analiziranim ostacima nakon ekstrakcije dominantna monosaharidna komponenta je glukoza koju po udjelu slijede ksiloza i manoz. Analizom je utvrđeno da je prisutna i galakturonska kiselina kao pokazatelj rezidualnog pektina, a određena je i zastupljenost rezidualne ramnogalakturonske regije.
7. Najviše ukupno iskorištenje galakturonske kiseline (približno 92 %) dobiveno je u slučaju ekstrakcije pri povišenoj temperaturi (90 °C) i nižoj pH-vrijednosti otapala (pH 4,5), dok primjena više temperature i više pH-vrijednosti pogoduje većem relativnom iskorištenju galakturonske kiseline.

6. LITERATURA

Anonymous 1 (2014) Owing your onion, <<http://hdclarity.com/2014/04/owning-your-onion/>>. Pristupljeno 21. lipnja 2017.

Anonymous 2, <<https://e-brojevi.udd.hr/440.htm>>. Pristupljeno 21. lipnja 2017.

AOAC (1990) Moisture in animal feed - AOAC method 930.15. *Official methods of analysis of AOAC international*, 15. izd., AOAC International, Arlington, Virginia.

Arancon, R. A. D., Sze Ki Lin, C., Chan, K. M., Kwan, T. H., Luque, R. (2013) Advances on waste valorization: new horizons for a more sustainable society. *Energy Sci. Eng.* **1**, 53-71.

Atmodjo, M. A., Hao, Z., Mohnen, D. (2013) Evolving views of pectin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Bio.* **64**, 747-779.

Babbar, N., Dejonghe, W., Gatti, M., Sforza, S., Kathy, E. (2016a) Pectic oligosaccharides from agricultural by-products: production, characterization and health benefits. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 594-606.

Babbar, N., Van Roy, S., Wijnants, M., Dejonghe, W., Caligiani A., Sforza, S., Elst, K. (2016b) Effect of extraction conditions on the saccharide (neutral and acidic) composition of the crude pectic extract from various agro-industrial residues. *J. Agric. Food Chem.* **64**, 268-276.

Benítez, V., Mollá, E., Martín-Cabrejas, M. A., Aguilera, Y., López-Andréu, F. J., Cools, K., Terry, L. A., Esteban, M. A. (2011a) Characterization of industrial onion wastes (*Allium cepa* L.): dietary fiber and bioactive compounds. *Plant Foods Hum. Nutr.* **66**, 48-57.

Benítez, V., Mollá, E., Martín-Cabrejas, M. A., Aguilera, Y., López-Andréu, F. J., Esteban, M. A. (2011b) Effect of sterilisation on dietary fibre and physicochemical properties of onion by-products. *Food Chem.* **127**, 501-507.

Benítez, V., Mollá, E., Martín-Cabrejas, M. A., Aguilera, Y., López-Andréu, F. J., Esteban, M. A. (2012) *Onion products source of healthy compounds*, Nova Science Publishers, Inc., New York.

Caffal, K. A., Mohnen D. (2009) The structure, function and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **344**, 1879-1990.

- Chapla, D., Divecha, J., Madamwar, D., Shah, A. (2010) Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. *Biochem. Eng. J.* **49**, 361-369.
- Choi, I. S., Cho, E. J., Moon, J. H., Bae, H. J. (2015) Onion skin waste as a valorization resource for the by-products quercetin and biosugar. *Food Chem.* **188**, 537-542.
- Demarty, M., Morvan, C., Thellier, M. (1984) Calcium and the cell wall. *Plant Cell Environ.* **7**, 441-448.
- Dominiak, M. M., Mikkelsen, J. D., Søndergaard, M. K. (2014) A novel perspective on pectin extraction. Technical University of Denmark, Department of Chemical and Biochemical Engineering.
- Englyst, H. N., Cummings, J. H. (1988) Improved method of measurement of dietary fiber as non-starch polysaccharides in plant foods. *J. Assoc. Anal. Chem.* **71**, 808-814.
- Galanakis, C. M. (2012) Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Food Sci. Technol.* **26**, 68-87.
- Garna, H., Mabon, N., Wathelet, B., Paquot, M. (2004) New method for a two-step hydrolysis and chromatographic analysis of pectin neutral sugar chains. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4652-4659.
- Gnanasambandam, R., Proctor, A. (1999) Preparation of soy hull pectin. *Food Chem.* **65**, 461-467.
- González-Sáiz, J. M., Esteban-Díez, I., Rodríguez-Tecedor, S., Pizzaro, C. (2008) Valorization of onion waste and by-products: MCR-ALS applied to reveal the compositional profiles of alcoholic fermentations of onion juice monitored by near-infrared spectroscopy. *Biotechnol. Bioeng.* **101**, 776-787.
- Gullón, B., Gómez, B., Martínez-Sabajanes, M., Yáñez, R., Parajó, J. C., Alonso, J. L. (2013) Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties. *Food Sci. Technol.* **30**, 153-161.
- Holck, J., Hotchkiss, Jr., A. T., Meyer, A. S., Mikkelsen, J. D., Rastall, R. A. (2014) Production and bioactivity of pectic oligosaccharides from fruit and vegetable biomass. U:

Food Oligosaccharides: Production, analysis and bioactivity (Moreno, J. F., Sanz M. L., ured.), JohnWiley & Sons, Ltd., Chicago, str. 76-87.

Hyodo, H., Terao, A., Furukawa, J., Sakamoto, N., Yurimoto, H., Satoh, S., Iwai, H. (2013) Tissue specific localization of pectin–Ca²⁺ cross-linkages and pectin methyl-esterification during fruit ripening in tomato (*Solanum lycopersicum*). *PLoS ONE*. [online] **8**, 1-10, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3827314/>>. Pristupljeno 24. lipnja 2017.

Jaime, L., Mollá, E., Fernández, A., Martín-Cabrejas, M. A., López-Andréu, F. J., Esteban, M. A. (2002) Structural carbohydrate differences and potential source of dietary fiber of onion (*Allium cepa* L.) tissues. *J. Agr. Food Chem.* **50**, 122-128.

Jarvis, M. C. (1982) The proportion of calcium-bond pectin in plant cell walls. *Planta.* **154**, 344-346.

Joye, D.D., Luzio, G. A. (2000) Process for selective extraction of pectins from plant material by differential ph. *Carbohydr. Polym.* **43**, 337-342.

Kalapathy, U., Proctor, A. (2001) Effect of acid extraction and alcohol precipitation conditions on the yield and purity of soy hull pectin. *Food Chem.* **73**, 393-396.

Leclere, L., Van Cutsem, P., Michiels, C. (2013) Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. *Front. Pharmacol.* **128**, 1-8.

Levaj, B. (2012) Osvježavajuća bezalkoholna pića, interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Lv, C., Wang, Y., Wang, L., Li, D., Adhikari, B. (2013) Optimization of production yield and functional properties of pectin extracted from sugar beet pulp. *Carbohydr. Polym.* **95**, 233-240.

May, C. D. (1990) Industrial Pectins: Sources, production and applications. *Carbohydr. Polym.* **12**, 79-99.

May, C. D. (1997) Pectins. U: *Thickening and Gelling Agents for Food* (Imeson, A., ured.), 2. izd., Blackie Academic and Professional, London, str. 230-261.

Mirabella, N., Castellani, V., Sala, S. (2014) Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *J. Clean. Prod.* **65**, 28-41.

- Mohnen, D. (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 266-277.
- Munarin, F., Tanzi, M. C., Petrini, P. (2012) Advances in biomedical applications of pectin gels. *Int. J. Biol. Macromol.* **51**, 681-689.
- Mussato, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., Teixeira, J. A. (2012) Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes. U: *Industrial waste* (Show, K. Y., Guo, X., ured.), InTech, Rijeka, str. 121-141.
- O'Neill, M. A., Ishii, T., Albersheim, P., Darvill, A. G. (2004) Rhamnogalacturonan II: Structure and function borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu. Rev. Plant Bio.* **55**, 109-139.
- Ovodov, Y. S. (2009) Current views on pectin substances. *Russ. J. Bioorganic Chem.* **35**, 293-310.
- Pagán, J., Ibarz, A., Llorca, M., Pagán, A., Barbosa-Cánovas, G. V. (2001) Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace. *Food Res. Int.* **34**, 605-612.
- Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F. (1993) Structure and properties of apple and sugar-beet pectins extracted by chelating agents. *Carbohydr. Res.* **244**, 99-114.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., Mohnen, D. (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry.* **57**, 929-967.
- Roldán, E., Sánchez-Moreno, C., de Ancos, B., Cano, M. P. (2008) Characterisation of onion (*Allium cepa* L.) by-products as food ingredients with antioxidant and antibrowning properties. *Food Chem.* **108**, 907-916.
- Round, A. N., Rigby, N. M., MacDougall, A. J., Morris, V. J. (2010) A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. *Carbohydr. Res.* **345**, 487-497.
- Salak, F., Daneshvar, S., Abedi, J., Furukawa, K. (2013) Adding value to onion (*Allium cepa* L.) waste by subcritical water treatment. *Fuel Process. Technol.* **112**, 86-92.
- Singh, B. N., Singh, B. R., Singh, R. L., Prakash, D., Singh, D. P., Sarma, B. K., Upadhyay, G., Singh, H. B. (2009) Polyphenolics from various extracts/fractions of red onion (*Allium*

cepa) peel with potent antioxidant and antimutagenic activities. *Food Chem. Toxicol.* **47**, 1161-1167.

Smith, B. G., Melton, L. D. (2012) Plant Cell Wall Polysaccharides. U: *Food carbohydrate chemistry* (Wrolstad, R. E., ured.), Wiley-Blackwell, Hoboken, str. 135-145.

Srivastava, P., Malviya, R. (2011) Sources of pectin and its application in pharmaceutical industry - An overview. *Indian J Nat. Prod. Resour.* **2**, 10-18.

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. *Carbohydr. Polym.* **114**, 432-439.

Thakur, B. R., Singh, R. K., Handa, A. K. (1997) Chemistry and uses of pectin-a review. *Food Sci. Nutr.* **37**, 47-73.

Thibault, J. F., Ralet, M. C. (2003) Physico-chemical properties of pectins in the cell walls and after extraction. U: *Advances in pectin and pectinase research* (Voragen, F., Schols, H., Visser, R., ured.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, str. 91-105.

Thibault, J. F., Renard, C. M. G. C., Axelos, M. A. V., Roger, P., Crépeau, M. J. (1993) Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. *Carbohydr. Res.* **238**, 271-286.

Van Buren, J. P. (1991) Function of pectin in plant tissue structure and firmness. U: *The chemistry and technology of pectin* (Walter, R. W., ured.), Academic Press, Inc., London/San Diego, str. 1-22.

Vriesmann, L. C., Teófilo, R. F., de Oliveira Petkowicz, C. L. (2011) Optimization of nitric acid-mediated extraction of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) using response surface methodology. *Carbohydr. Polym.* **84**, 1230-1236.

Westerman, P. W., Bicudo, J. R. (2005) Management considerations for organic waste use in agriculture. *Bioresour. Technol.* **96**, 215-221.

Willats, W. G. T., Knox, J. P., Mikkelsen, J. D. (2006) Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 97-104.

Wrolstad, R. E. (2012) Nutritional roles of carbohydrates. U: *Food carbohydrate chemistry* (Wrolstad, R. E., ured.), Wiley-Blackwell, Hoboken, str. 147-163.

Yangilar, F. (2013) The application of dietary fibre in food industry: Structural features, effects on health and definition, obtaining and analysis of dietary fibre: a review. *Food Nutr. Res.* **1**, 13-23.

Yapo, B. M. (2011) Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins-a new hypothetical model. *Carbohydr. Polym.* **86**, 373-385.

Yapo, B. M., Rober, C., Etienne, I., Wathelet, B., Paquot, M. (2007a) Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. *Food Chem.* **100**, 1356-1364.

Yapo, B. M., Wathelet, B., Paquot, M. (2007b) Comparison of alcohol precipitation and membrane filtration effects on sugar beet pulp pectin chemical features and surface properties. *Food Hydrocoll.* **21**, 245-255.