

Frakcioniranje polifenolnih spojeva - razvoj metodologije i primjena na mahuni graška

Kralj, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:159:021292>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Jelena Kralj

1232/ PI

**FRAKCIONIRANJE
POLIFENOLNIH SPOJEVA –
RAZVOJ METODOLOGIJE I
PRIMJENA NA MAHUNI GRAŠKA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Draženke Komes uz pomoć više asistentice dr. sc. Aleksandre Vojvodić Cebin.

ZAHVALA

Srdačno se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Draženki Komes na ukazanom povjerenju, stručnim savjetima, strpljenju i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem dr. sc. Aleksandri Vojvodić Cebin na trudu, nesebičnoj pomoći, korisnim savjetima i strpljivosti tijekom izrade cijelog rada.

Veliko hvala mojim prijateljima i kolegama koji su bili uz mene i uljepšali mi studentske dane.

Najveće hvala mojoj obitelji i dečku koji su mi svojim nesebičnim odricanjem, strpljenjem, potporom, razumijevanjem i ljubavi omogućili ovaj uspjeh.

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

FRAKCIONIRANJE POLIFENOLNIH SPOJEVA – RAZVOJ METODOLOGIJE I PRIMJENA NA MAHUNI GRAŠKA

Jelena Kralj, 1232/PI

Sažetak: Agro-industrijski otpad sadrži brojne vrijedne sastojke koji se mogu iskoristiti u razvoju i proizvodnji novih proizvoda dodane vrijednosti. U prehrambenoj industriji su među najzanimljivijima polifenolni spojevi zbog poznatih pozitivnih učinaka na zdravlje. Cilj ovoga rada bio je definirati postupak frakcijskog izdvajanja polifenolnih spojeva te ga primijeniti za određivanje polifenolnih spojeva u mahuni graška. U postupku frakcioniranja polifenolni spojevi su izdvojeni kao frakcije slobodnih, konjugiranih – esterificiranih i glikoziliranih te vezanih spojeva primjenom, redosljedno, ekstrakcije tekuće-tekuće, alkalne i kiselinske hidrolize izvornog ekstrakta te alkalne hidrolize ostatka nakon početne ekstrakcije. Analiza polifenolnih spojeva provedena je HPLC-DAD metodom, razvijenom za analizu 21 spoja iz različitih polifenolnih podskupina. Dodatak natrijevog klorida u koraku ekstrakcije tekuće-tekuće, a zatim i etilendiaminotetraoctene kiseline i askorbinske kiseline u koraku alkalne hidrolize, značajno su povećali stabilnost i ekstrakcijsko iskorištenje polifenolnih spojeva. U uvjetima frakcioniranja, modelne molekule esterificiranih i glikoziliranih polifenola bile su uspješno hidrolizirane, uz relativno zadovoljavajuće iskorištenje oslobođenih spojeva. Polifenoli u mahuni graška prisutni su uglavnom u konjugiranom obliku, kao esteri *p*-kumarinske i sinapinske kiseline, te kao glikozidi kvercetina, s udjelima, redosljedno, 207, 158 i 103 $\mu\text{g}_{\text{g}_{\text{s.t.v.}}^{-1}}$, dok su slobodni i vezani spojevi vrlo malo zastupljeni. Udio ukupnih polifenola u koncentriranom izvornom ekstraktu mahune graška iznosio je 4,77 $\text{mg}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{s.t.v.}}^{-1}$ (Folin-Ciocalteu), a prateći antioksidacijski kapacitet 12,91 $\mu\text{mol}_{\text{Trolox}} \text{g}_{\text{s.t.v.}}^{-1}$ (DPPH). Mahuna graška može se smatrati relativno dobrim izvorom polifenola, čiju djelomičnu identifikaciju je uvelike olakšala primjena razvijenog postupka frakcioniranja.

Ključne riječi: agro-industrijski otpad, frakcioniranje, hidroliza, mahuna graška, polifenoli

Rad sadrži: 54 stranice, 9 slika, 5 tablica, 61 literaturnih navoda, 6 priloga

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: dr. sc. Aleksandra Vojvodić Cebin

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Ksenija Marković
2. prof. dr. sc. Draženka Komes
3. prof. dr. sc. Ksenija Durgo
4. prof. dr. sc. Božidar Šantek (zamjena)

Datum obrane: 25. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Food Engineering

Laboratory for Chemistry and Technology of Carbohydrates and Confectionery Products

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

FRACTIONATION OF POLYPHENOL COMPOUNDS - METHODOLOGY DEVELOPMENT AND APPLICATION ON PEA POD

Jelena Kralj, 1232/PI

Abstract: Agro-industrial wastes contain a number of valuable ingredients that can be re-used in the development and production of new added-value products. Among them, polyphenols are particularly interest compounds because of their known health-beneficial properties. The aim of this work was to define the procedure for fractionation of polyphenols and further to apply it for determination of polyphenols form pea pod. During fractionation, the polyphenols were isolated as fractions of free, conjugated – esterified and glycosylated, as well as bound compounds following liquid-liquid extraction, alkaline and acidic hydrolysis of the initial extract and alkaline hydrolysis of the residue after the initial extraction, respectively. The analysis of polyphenols was performed using HPLC-DAD method, specially developed to analyse 21 individual compounds from different polyphenolic subgroups. The addition of sodium chloride during liquid-liquid extraction, and further of ethylenediaminetetraacetic and ascorbic acid during alkaline hydrolysis, have markedly contributed to the stability and recovery of polyphenolic compounds. With the defined fractionation conditions, the model molecules of esterified and glycosylated polyphenols were successfully hydrolysed, accompanied by relatively sufficient recovery of liberated compounds. Polyphenols in pea pod were mainly found as conjugates, as esters of *p*-coumaric and sinapic acids, as well as quercetin glycosides, with contents of 207, 158 i 103 $\mu\text{g g}_{\text{dw}}^{-1}$, respectively, while free and bound phenolics were minorly represented. Total phenolic content of concentrated initial pea pod extract exhibited 4.77 $\text{mg}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ (Folin-Ciocalteu), accompanied by antioxidant capacity of 12.91 $\mu\text{mol}_{\text{Trolox}} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ (DPPH). Pea pod can be established as relatively good source of polyphenols, the partial identification of which was largely enabled by the developed polyphenol fractionation procedure.

Keywords: agro-industrial waste, fractionation, hydrolysis, pea pod, polyphenols

Thesis contains: 54 pages, 9 figures, 5 tables, 61 references, 6 supplements

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: PhD. Aleksandra Vojvodić Cebin

Reviewers:

1. PhD. Ksenija Marković, Full Professor
2. PhD. Draženka Komes, Full Professor
3. PhD. Ksenija Durgo, Full Professor
4. PhD. Božidar Šantek, Full Professor (substitute)

Thesis defended: 25 September 2020

Sadržaj

1	UVOD	1
2	TEORIJSKI DIO	3
2.1	OTPAD U PROIZVODNJI HRANE BILJNOGA PODRIJETLA	3
2.2	VRIJEDNI SASTOJCI IZ OTPADA U PROIZVODNJI HRANE.....	6
2.2.1	Polifenoli.....	8
2.2.2	Metode izdvajanja polifenola iz biljnog otpada	10
2.3	MAHUNARKE	13
2.3.1	Mahuna graška	14
2.3.2	Primjena mahune graška	15
3	EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1	MATERIJAL	17
3.1.1	Mahuna graška	17
3.1.2	Kemikalije.....	18
3.1.3	Uređaji i posuđe.....	20
3.2	METODE RADA.....	22
3.2.1	Ekstrakcija i frakcioniranje polifenolnih spojeva.....	22
3.2.1.1	Ekstrakcija ukupnih topljivih polifenolnih spojeva	22
3.2.1.2	Priprema frakcije slobodnih topljivih polifenolnih spojeva.....	25
3.2.1.3	Priprema frakcija konjugiranih topljivih polifenolnih spojeva	25
3.2.1.4	Priprema frakcije vezanih polifenolnih spojeva	26
3.2.2	Ispitivanje iskorištenja pojedinih faza postupka frakcioniranja na čistim standardima polifenolnih spojeva	27
3.2.3	Karakterizacija polifenolnog sastava ekstrakata i frakcija.....	29
3.2.3.1	Određivanje udjela ukupnih polifenola	29
3.2.3.2	Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.....	30
3.2.3.3	Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom.....	31
3.2.3.4	Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC-PDA)	33
4	REZULTATI I RASPRAVA	35
4.1	Stabilnost odabranih polifenolnih spojeva u uvjetima primijenjenog frakcioniranja	35
4.2	Kvalitativni i kvantitativni profil polifenolnih spojeva izdvojenih iz mahune graška primjenom postupka frakcioniranja.....	41
4.3	Udjeli ukupnih polifenola te antioksidacijski kapacitet polifenolnih frakcija izdvojenih iz mahune graška	44
5	ZAKLJUČCI	47
6	LITERATURA	49
7	PRILOZI	55

1 UVOD

Agro-industrijski otpad nastaje u lancu proizvodnje i distribucije hrane od žetve/berbe do maloprodaje te obuhvaća ostatke na poljoprivrednim površinama, procesne ostatke, organske ostatke i otpadnu vodu nastalu u preradi. Zbog velike dostupnosti i brojnih vrijednih sastojaka agro-industrijskog otpada, poput šećera, vlakana i proteina te brojnih drugih spojeva sa značajnim biološkim učincima (minerali, polifenolni spojevi), postoji veliki potencijal za daljnju preradu u proizvode dodane vrijednosti (Kammerer i sur., 2014; Laufenberg i sur., 2003; Mussato i sur., 2012; Sath i sur., 2018).

Polifenolni spojevi predstavljaju jednu od najvećih skupina sekundarnih biljnih metabolita te se ubrajaju u visokovrijedne sastojake hrane (Belščak-Cvitanović i sur., 2018). Osim što doprinose senzorskim svojstvima i konačnoj kvaliteti hrane (Es-Safi i sur., 2003), oni posjeduju brojna funkcionalna svojstva, kao što su antioksidacijska, protuupalna, antialergijska i antikancerogena (Escarpa i Gonzalez, 2001). U prirodi se polifenolni spojevi nalaze u topljivom (slobodni, konjugirani) i vezanom- netopljivom obliku (Arruda i sur., 2018; Belščak-Cvitanović i sur., 2018), a za njihovu ekstrakciju koriste se brojne konvencionalne i inovativne metode. Kako bi se provelo određivanje slobodnih, konjugiranih i vezanih polifenolnih spojeva provodi se tzv. frakcijsko ekstrahiranje polifenolnih spojeva (Arruda i sur., 2018).

Grašak (*Pisum sativum* L.) je biljka porodice *Leguminosae* koja se intenzivno uzgaja zbog visoke nutritivne vrijednosti. Uklanjanjem zrna iz mahune graška, zaostaje velika količina praznih mahuna koje predstavljaju agro-industrijski otpad. Mahuna graška se konvencionalno koristi kao hrana za životinje, a u inovativnim primjenama za proizvodnju bio-etanola i bio-ugljena te kao izvor prehrambenih vlakana. Polifenolni sastav mahune graška relativno je neistražen, a provedena malobrojna istraživanja upućuju na potencijalna zdravstvena djelovanja mahune graška koja se povezuju s funkcionalnim komponentama, prvenstveno polifenolnim spojevima (Babbar i sur., 2012). Stoga su potrebna daljnja istraživanja sastava i udjela polifenolnih spojeva u mahuni graška te su ona važna su za promicanje ovog biljnog materijala, kao inovativnog izvora funkcionalnih sastojaka za primjenu u prehrambenoj industriji.

Cilj ovoga rada je definirati postupak frakcijske ekstrakcije polifenolnih spojeva s ciljem izdvajanja istih u frakcijama topljivih slobodnih spojeva, njihovih konjugata u obliku

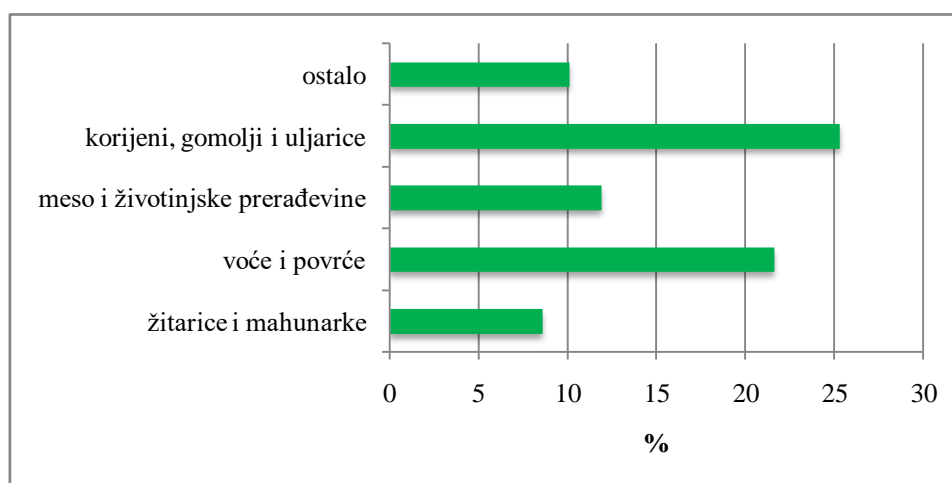
glikozida i estera te netopljivih, vezanih spojeva. Razvijeni postupak primijenit će se u karakterizaciji polifenolnih spojeva mahune graška s ciljem proširenja spektra ponovne primjene ovog materijala kao potencijalnog inovativnog izvora polifenola, kao sastojaka dodane vrijednosti, u skladu s globalnim trendovima valorizacije agro-industrijskog otpada općenito.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 OTPAD U PROIZVODNJI HRANE BILJNOGA PODRIJETLA

Proizvodnja hrane biljnoga podrijetla uključuje tri usko vezana područja: poljoprivredu, poljoprivredno-prehrambenu industriju te distribuciju i maloprodaju. Jedan od najvažnijih proizvodnih sektora u Europskoj uniji upravo je prehrambena industrija (De Corato i Cancellara, 2019).

U novije vrijeme sve se više naglašava globalni problem gubitka hrane i nastanka otpada duž lanca proizvodnje i opskrbe hranom. Otpad koji nastaje u lancu proizvodnje i distribucije hrane od žetve/berbe do maloprodaje, naziva se gubitkom hrane (engl. foodloss), dok se od maloprodaje do krajnje potrošnje svaki gubitak prehrambene mase smatra otpadom (engl. foodwaste) (FAO, 2020). Prema procjeni Organizacije za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO) iz 2011.godine, oko 1/3 hrane svake godine se izgubi ili postane otpad (FAO, 2020). Organizacija za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO) izračunala je i „indeks gubitka hrane” koji omogućava preciznije mjerenje količine hrane koja se gubi od berbe do maloprodaje (ne uključuje maloprodaju). Početne procjene „indeksa gubitka hrane” ukazuju da se oko 14 % hrane u svijetu gubi od berbe do maloprodaje, odnosno usporedbom „indeksa gubitka hrane” po regijama, u svijetu se najmanje hrane gubi u Australiji i Novom Zelandu (5-6 %), a najviše u Srednjoj i Južnoj Aziji (20-21 %). Na slici 1 prikazan je gubitak hrane s obzirom na odabrane sirovine prehrambene industrije, prema kojem se najveći gubitak ostvaruje u proizvodnji hrane biljnoga podrijetla (FAO, 2020).



Slika 1. Prikaz udjela gubitaka prilikom proizvodnje hrane (%) za odabrane kategorije prehrambenih sirovina (FAO, 2020)

Prehrambena industrija proizvodi veliku količinu različitog otpada i nusproizvoda u tekućem i krutom stanju, a njihovo odlaganje često predstavlja problem za okoliš (Gonzalez-Saiz i sur., 2008). U otpad prehrambene industrije ubrajaju se školjke, koža, otpaci prerade šećera, kore, sjemenke, ljuške, talog, iscrpljena pulpa, stabljike i ostali biljni materijal koji nije namijenjen proizvodnji hrane (da Silva i Jorge, 2014; Vojvodić i sur., 2016). Prehrambeni otpad složenog je sastava i sastoji se od dijelova izvorne sirovine koji su odbačeni tijekom nekog postupka prerade. Ovisno o podrijetlu i specifičnostima prerađivačkih industrija, takav otpad može se podijeliti u 2 osnovne skupine: biljne i životinjske, te nadalje u 7 podskupina, kako je prikazano u tablici 1 (Galankis, 2012).

Tablica 1. Podjela prehrambenog materijala (Galanakis, 2012).

Kategorija osnovne sirovine	Potkategorija osnovne sirovine	Primjeri biljnog otpada
Biljno podrijetlo	Žitarice	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Rižine mekinje ▪ Pšenična slama ▪ Pšenične mekinje ▪ Sladna prašina ▪ Slad od proizvodnje piva
	Korijeni i gomolji	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kora krumpira ▪ Melasa šećerne repe
	Uljarice i mahunarke	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sjeme suncokreta ▪ Sjeme soje ▪ Otpad sojinog ulja ▪ Iscrpljena pulpa masline
	Voće i povrće	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kora agruma (naranča, limun, mandarina..) ▪ Kora jabuke ▪ Iscrpljena pulpa jabuke ▪ Koštice marelice ▪ Kora banana ▪ Iscrpljena pulpa rajčice ▪ Kora mrkve
Životinjsko podrijetlo	Mesni proizvodi	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nusproizvodi proizvodnje piletine ▪ Nusproizvodi klaonica ▪ Goveđa krv
	Riba i plodovi mora	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ostaci ribe (koža, glava, kosti) ▪ Otpadne vode surimija
	Mliječni proizvodi	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sirutka

Ljudi od davnina dodaju različit biljni otpad u tlo, reciklirajući tako hranjive sastojke i poboljšavajući razinu organskih tvari u tlu. Uslijed današnje intenzivne poljoprivredne, stočarske i industrijske aktivnosti te uz primjenu mineralnih gnojiva i pesticida, dolazi do velikog porasta u količini nastalog biljnog otpada koji se ne može adekvatno iskoristiti u svojoj tradicionalnoj primjeni kao kompost (Yusuf, 2017).

Dobiveni biljni otpad te brojni nusproizvodi poljoprivredno-prehrambene industrije predstavljaju izvor bogat organskim ostacima koji se ubraja u agro-industrijski otpad (Yusuf, 2017). Agro-industrijski otpad može se podijeliti na industrijski otpad i poljoprivredni otpad. U poljoprivredni otpad ubrajaju se ostaci na poljoprivrednim površinama (stabljike, lišće, mahune) te procesni ostaci (mahune, sjemenke, korijenje, otpaci u preradi šećera, melasa), a u industrijski otpad organski ostaci (kora, koža) i nastala otpadna voda (Sadh i sur., 2018). Većina nastalog agro-industrijskog otpada zbrinjava se spaljivanjem, odlaganjem na otpad ili neplaniranim odlaganjem na zemlju, a tako odloženi neobrađeni otpad predstavlja svojevrsan ekološki rizik (Sadh i sur., 2018). Danas se, stoga, razvijaju smjernice na globalnoj razini u smjeru njegove ponovne primjene kao alternativnih i obnovljivih sirovina/izvora (Sadh i sur., 2018), a i politika upravljanja otpadom u EU usmjerena je na recikliranje i prevenciju nastanka otpada čime bi se reducirala njegova količina (Gonzalez-Saiz i sur., 2008).

Biljni agro-industrijski otpad posjeduje veliki potencijal za ponovno korištenje u različite svrhe na temelju bogatog kemijskog sastava te se danas sve više razmatra kao potencijalna sekundarna sirovina nego kao otpad (Galanakis, 2012; Mussato i sur., 2012). Osim kao izvor brojnih vrijednih spojeva, postoji dodatni interes za ponovnim korištenjem agro-industrijskog otpada s ekonomskog i ekološkog gledišta. Ekonomski se aspekt temelji na činjenici da se otpad može koristiti kao jeftina sirovina s očekivanim smanjenjem troškova proizvodnje, dok ekološki aspekt podrazumijeva smanjenje negativnih učinaka na okoliš koji su rezultat neadekvatnog zbrinjavanja takvog otpada (Mussato i sur., 2012; Galanakis, 2012). U mnogim slučajevima agro-industrijski otpad ima veliki potencijal za recikliranje i daljnju preradu u proizvode dodane vrijednosti te kao sirovina za druge industrije (Laufenberg i sur., 2003). Na slici 2 prikazane su neke mogućnosti iskorištenja agro-industrijskog otpada za dobivanje proizvoda s dodanom vrijednošću. Jedno od rješenja gospodarenja organskim otpadom može biti njegova upotreba za proizvodnju bioplina i biogoriva, čime bi se omogućilo smanjenje problema poput onečišćenja okoliša i iscrpljivanja prirodnih resursa (Korys i sur., 2019). Agro-industrijski otpad može se koristiti kao sirovina za proizvodnju enzima, limunske kiseline, pigmentata, aroma i brojnih bioaktivnih spojeva (Yusuf, 2017). U kontekstu

prehrambene industrije, potencijalno najveću dodanu vrijednost omogućuje izdvajanje spojeva izraženih antioksidacijskih svojstava (Naziri i sur., 2014). Osim u prehrambenoj industriji, brojni funkcionalni sastojci iz otpadnih materijala svoju primjenu mogu naći i u farmaceutskoj industriji (da Silva i Jorge, 2014).



Slika 2. Mogućnosti iskorištenja agro-industrijskog otpada za proizvode s dodanom vrijednosti (Yusuf, 2017)

2.2 VRIJEDNI SAS TOJCI IZ OTPADA U PROIZVODNJI HRANE

Agro-industrijski otpad izvor je različitih makrokomponentata (šećera, prehrambenih vlakana, proteina) i brojnih drugih spojeva sa značajnim biološkim učincima (mineralne tvari, polifenolni spojevi) te je stoga izuzetno zanimljiva sirovina za proizvodnju drugih proizvoda (Kammerer i sur., 2014; Mussato i sur., 2012; Sath i sur., 2018).

Svoju primjenu prehrambeni otpad često nalazi kao nosač za mikroorganizme iz rodova *Aspergillus*, *Rhizopus* i *Lactobacillus* u proizvodnji organskih kiselina (limunska, mliječna, oksalna) koje se u prehrambenoj industriji koriste za produljenje trajnosti različitih prehrambenih proizvoda (Mussato i sur., 2012). Nusproizvodi prerade voća često se koriste kao izvor pigmentata u proizvodnji boja visoke stabilnosti i čistoće čija je prednost biorazgradivost, manja toksičnost/netoksičnost i ekološka prihvatljivost u odnosu na sintetske (Yusuf, 2017). Biljni agro-industrijski otpad ima potencijal i za proizvodnju aroma i konzervansa; primjerice u proizvodnji vanilina, jedne od najvažnijih aroma u prehrambenoj industriji, koriste se nusproizvodi iz žitarica (kukuruz, riže i pšenice) i pulpa šećerne repe. U

nekim biljnim tkivima prisutna je askorbinska kiselina (vitamin C) koja se može izolirati i koristiti kao prirodni konzervans (Yusuf, 2017).

Osim navedenog, biljni agro-industrijski otpad izvor je i različitih polifenolnih spojeva za koje se danas zna da imaju veliku biološku važnost (Yusuf, 2017) i stoga se koriste kao prirodni prehrambeni aditivi ili pak u proizvodnji funkcionalnih prehrambenih proizvoda i dodataka prehrani (Babbar i sur., 2012).

Ponovnom iskorištavanju biljnih otpadnih materijala, često se koristi pristup biorafinerije kojim se dobivaju vrijedni bio-proizvodi: bio-energija, bio-materijali i bio-kemikalije, a time se osnovnom materijalu povećava vrijednost. Koncept biorafinerije analogan je današnjim rafinerijama nafte, u kojima se iz iste sirovine dobivaju različiti proizvodi s ciljem njezina što većeg iskorištenja. No biorafinerije osim proizvodnje različitih goriva imaju mogućnost proizvodnje kemijskih proizvoda, odnosno komponenata visoke vrijednosti iz brojnih međuprodukata, uz nastajanje male količine otpada (Angel Siles Lopez i sur., 2010).

Primjer biorafinerije biljnog agro-industrijskog otpada ilustriran je primjerom ponovnog korištenja otpada iz prerade citrusa.

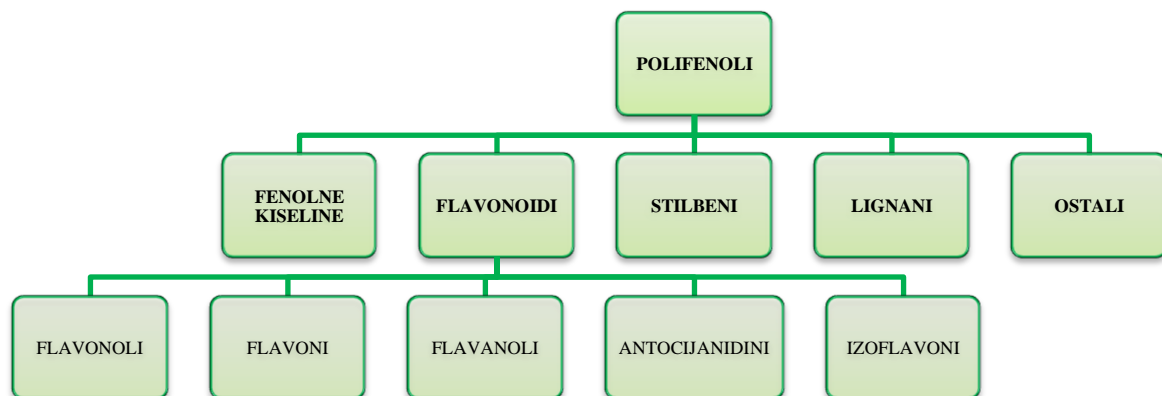
Citrusi su jedna od najpopularnijih voćnih kultura te se konzumiraju u svježem obliku ili prerađeni, najčešće u sokove, pri čemu zaostaju kora i koštice kao dominantni nusproizvodi. Kora predstavlja primarni otpad prerade citrusa bogat pektinom i limonenom, uz prisutnost organskih kiselina, ostalih esencijalnih ulja, topljivih šećera, škroba, prehrambenih vlakana uključujući celulozu, hemicelulozu i lignin, zatim polifenola, vitamina, mineralnih tvari, proteina i karotenoida (Rafiq i sur., 2018; Angel Siles Lopez i sur., 2010). Kora citrusa konvencionalno se koristi kao sirovina za proizvodnju pektina, a također i za proizvodnju karakterističnog eteričnog ulja. Eterična ulja svoju primjenu nalaze u kemijskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, a dominantna komponenta eteričnih ulja citrusa, -D-limonen, koristi se kao aroma. Izolacija eteričnih ulja iz kore citrusa je relativno jednostavna, a provodi se hladnim prešanjem, destilacijom ili ekstrakcijom. Pektin je strukturni heteropolisaharid koji se u prehrambenoj industriji koristi kao sredstvo za želiranje. Iz osušenih kora citrusa pektin se komercijalno izdvaja najčešće kiselinskom hidrolizom. Postoji veliki potencijal kore citrusa za proizvodnju polifenolnih ekstrakata sa značajnim udjelom flavonoida, dominantno u glikoziliranom obliku (Angel Siles Lopez i sur., 2010). Kora citrusa sadrži i celulozu, hemicelulozu i lignin te se može koristiti lignocelulozni supstrat kore za proizvodnju različitih biotehnoloških proizvoda, primjerice etanola ili metana (Angel Siles Lopez i sur., 2010).

2.2.1 Polifenoli

Polifenolni spojevi ubrajaju se u visokovrijedne sastojke hrane zbog brojnih funkcionalnih svojstava, prvenstveno antioksidacijskog djelovanja, te potencijalnog preventivnog djelovanja na različite bolesti povezane s oksidacijskim stresom (Belščak-Cvitanović i sur., 2018).

Polifenolni spojevi su jedna od najvećih skupina sekundarnih metabolita u biljkama koja broji i do nekoliko tisuća različitih spojeva. Prema kemijskoj strukturi ovi spojevi mogu biti relativno jednostavni, sadržavajući jedan aromatski, fenolni prsten, te složeni, sadržavajući u svojoj strukturi više povezanih aromatskih prstena s hidroksilnim skupinama (Quideau i sur., 2011).

Polifenoli su heterogena skupina prirodnih spojeva koji se mogu podijeliti ovisno o podrijetlu, rasprostranjenosti, biološkim funkcijama i kemijskoj strukturi. Na slici 3 shematski je prikazana podjela polifenola ovisno o kemijskoj strukturi prema kojoj se polifenoli dijele u pet osnovnih skupina: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni, lignani i ostali spojevi (D'Archivio i sur., 2008). Najveća skupina polifenola su flavonoidi, a ista se nadalje može podijeliti u pet podskupina: flavonoli, flavoni, flavanoli, antocijanidini i izoflavoni (Olivares-Vicente i sur., 2018).



Slika 3. Podjela polifenolnih spojeva (D'Archivio i sur., 2008; Olivares-Vicente i sur., 2018)

Polifenolni spojevi u različitim biljnim sirovinama i prehrambenim proizvodima nositelji su senzorskih svojstava poput boje i okusa, primarno gorčine, te su vrlo važni za konačnu kvalitetu hrane (Es-Safi i sur., 2003). Ipak, mnogo zanimljivija su njihova bioaktivna svojstva budući da su polifenolni spojevi najpoznatiji prirodni antioksidansi. Stoga se njihovo određivanje i primjena u prehrambenim proizvodima proteže od aspekta tehnološke primjene

u osiguranju oksidacijske i mikrobiološke stabilnosti hrane (Cory i sur., 2018), do potencijalnih pozitivnih učinaka na zdravlje čovjeka u kontekstu proizvodnje ciljanih funkcionalnih proizvoda.

Pozitivan učinak polifenola na zdravlje očituje se kroz smanjenje rizika od nastanka, ali i pomoć u liječenju nekih nezaraznih bolesti, poput nekih tipova karcinoma, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa tipa 2, osteoporoze, pankreatitisa, gastrointestinalnih problema, oštećenja pluća i neurodegenerativnih bolesti (Cory i sur., 2018).

Otpriblike jednu trećinu fenolnih spojeva u ljudskoj prehrani čine fenolne kiseline. Fenolne kiseline su spojevi koji sadrže benzenski prsten, karboksilnu skupinu i jednu ili više hidroksilnih i/ili metoksiliranih skupina, a ovisno o strukturi razlikujemo dvije skupine fenolnih kiselina: derivate hidroksibenzojeve i derivate hidroksicimetne kiseline (Lafay i Gil-Izquierdo, 2007). Benzojeve kiseline sadrže 7 atoma ugljika i predstavljaju najjednostavnije fenolne kiseline u prirodi (Bravo, 1998). U skupinu derivata hidroksibenzojeve kiseline ubrajaju se: galna, elaginska, protokatehinska, 4-hidroksibenzojeva te mnoge druge (Lafay i Gil-Izquierdo, 2007). Cimetne kiseline sadrže devet atoma ugljika (Bravo, 1998). U hidroksicimetne kiseline pripadaju kafeinska, ferulinska, sinapinska, *p*-kumarinska kiselina kao najzastupljeniji predstavnici (Lafay i Gil-Izquierdo, 2007). Derivati i hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina rijetko se nalaze u slobodnom obliku, već se najčešće nalaze u esterificiranom obliku (Lafay i Gil-Izquierdo, 2007). Antioksidacijski učinak derivata hidroksicimetnih kiselina veći je u odnosu na derivate hidroksibenzojeve kiseline (Sanchez-Moreno, 2002).

Flavonoidi su najveća i najraširenija skupina polifenolnih spojeva (Bravo, 2001) te se međusobno razlikuju prema stupnju nezasićenosti i hidroksilacije, a unutar podskupina mogu biti sulfatirani, metilirani i konjugirani s monosaharidima ili disaharidima te formirati komplekse s oligosaharidima, lipidima, aminima, karboksilnim kiselinama i organskim kiselinama (Duthie i sur., 2003). Flavonoli su najveća i najčešća podskupina flavonoida u voću i povrću, a glavni predstavnici su kvercetin i kemferol (Panche i sur., 2016) pri čemu je kvercetin najzastupljeniji flavonoid koji se obično u biljnim izvorima nalazi u konjugiranom obliku kao glikozid (Lakhanpal i Kumar Rai, 2007). Kvercetin posjeduje izvrsna antioksidacijska i protuupalna svojstva te ima pozitivne učinke na visoki krvni tlak i endotelnu funkciju u ljudskom organizmu (D'Andrea, 2015).

2.2.2 Metode izdvajanja polifenola iz biljnog otpada

Biljni agro-industrijski otpad je upravo zbog svog biljnog podrijetla, potencijalno važan, ali nedovoljno iskorišten izvor polifenola koji se mogu koristiti kao funkcionalni sastojci hrane (Kammerer i sur., 2014). Danas se u ekstrakciji polifenolnih spojeva koriste brojne tehnike specifične ponajprije za vrstu biljnog materijala i spojeve koji se u njemu nalaze, a uobičajena je njihova podjela na konvencionalne i inovativne (Mourtzinis i Goula, 2019). Na odabir načina ekstrakcije utječu kemijska priroda spojeva koji se izdvajaju, veličina čestica uzorka te prisutnost interferirajućih spojeva (Brglez Mojzer i sur., 2016).

Konvencionalne tehnike podrazumijevaju ekstrakciju tekuće-tekuće i čvrsto-tekuće, a najčešće se provode maceracijom ili Soxhlet ekstrakcijom. Kod konvencionalnih ekstrakcija na prinos polifenolnih spojeva, tj. učinkovitost ekstrakcije najviše utječu vrsta otapala, pH, temperatura, vrijeme ekstrakcije i stupanj usitnjenosti biljnog tkiva. Za ekstrakciju polifenolnih sastojaka iz biljnog tkiva obično se koriste organska otapala, polarna: etanol, metanol i etil acetat, ali i nepolarna, poput heksana ili dietil etera. Također se polarna otapala često koriste u kombinaciji s vodom ili se pak koristi čista voda za ekstrakciju polarnih spojeva. Neovisno o upotrijebljenoj vrsti otapala, volumen otapala mora biti dovoljan kako bi kompletan biljni materijal bio uronjeno u otapalo tijekom cijelog postupka ekstrakcije. Vrlo važan čimbenik za ekstrakciju polifenola je temperatura budući da se polifenoli smatraju termoosjetljivim spojevima. Primjena konvencionalnih, tradicionalnih, ekstrakcijskih tehnika uz sebe veže brojne nedostatke kao što su velika potrošnja otapala i energije, toplinska razgradnja komponenata osjetljivih na toplinu, relativno dugo vrijeme ekstrakcije te neselektivnost (Mourtzinis i Goula, 2019).

Zbog navedenih nedostataka konvencionalnih tehnika ekstrakcije, sve više se istražuju i primjenjuju alternativne, inovativne tehnike u ekstrakciji polifenolnih spojeva, s ciljem zadržavanja ili povećanja ekstrakcijske učinkovitosti uz uštedu energije i kemikalija. U inovativne tehnike ekstrakcije ubrajaju se ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i mikrovalovima, pojedinačno ili u kombinaciji, zatim potpomognute pulsirajućim električnim poljem ili enzimima, ili pak ekstrakcije uz primjenu inovativnih otapala, poput superkritičnih fluida ili ionskih tekućina te uz primjenu ciklodekstrina (Brglez Mojzer i sur., 2016; Mourtzinis i Goula, 2019). Ove tehnike karakterizira jednostavnost izvedbe, kraće vrijeme ekstrakcije te manja potrošnja otapala u odnosu na konvencionalne tehnike (Brglez Mojzer i sur., 2016).

Prilikom ekstrakcije polifenolnih spojeva, vrlo važno svojstvo je njihova topljivost u određenom otapalu, koja ovisi o kemijskoj strukturi ovih spojeva, ali i njihovoj lokalizaciji unutar stanice, tj. povezanosti s drugim staničnim strukturama. Najčešće se polifenolni spojevi, s obzirom na topljivost, dijele na topljive i netopljive, pri čemu topljivi spojevi mogu biti u slobodnom ili konjugiranom obliku, kao glikozidi ili esteri, dok netopljivi spojevi mogu biti vezani - u pravilu konjugati s velikim staničnim makromolekulama koje uvjetuju netopljivost takvih spojeva, ili pak polimerizirani oblici polifenolnih spojeva (Arruda i sur., 2018)

Ukupni udio polifenolnih spojeva u nekom biljnom materijalu nije lako odrediti te se provođenjem jednostavnih ekstrakcija čvrsto-tekuće u pravilu izostave netopljivi polifenolni spojevi. Postupak određivanja slobodnih, konjugiranih i vezanih polifenolnih spojeva sastoji se od više koraka u kojima se nastoje selektivno izdvojiti navedene polifenolne frakcije i u tom kontekstu se govori o frakcijskoj ekstrakciji polifenolnih spojeva iz biljnog materijala (Arruda i sur., 2018).

U biljnim izvorima se fenolne kiseline uglavnom nalaze u netopljivom, vezanom obliku, a flavonoidi kao konjugati, odnosno glikozidi (Acosta-Estrada i sur., 2014). U određivanju netopljivih, vezanih polifenolnih spojeva, isti se prvo oslobađaju iz netopljivih kompleksa primjenom alkalnih i/ili kiselinskih hidroliza (Brglez Mojzer i sur., 2016), a također se u tu svrhu mogu koristiti i enzimi (Liyana-Pathirana i Shahidi, 2006). Alkalna i kiselinska hidroliza češće se primjenjuju u odnosu na enzimске postupke, a pritom se optimiraju koncentracija primijenjene kiseline, odnosno lužine, vrijeme i temperatura hidrolize. Djelovanjem kiseline prilikom kiselinske hidrolize selektivno dolazi do razaranja glikozidnih veza između polifenolnih spojeva i šećera, tj. oslobađaju se polifenolni aglikoni te se zatim određuju kao slobodni topljivi polifenolni spojevi. Do razaranja esterskih veza, kojima su polifenolni spojevi najčešće povezani s polisaharidima stanične stijenke (vezani fenoli), dolazi prilikom alkalne hidrolize. Osim primjene lužine, alkalna hidroliza se često provodi uz dodatak etilendiaminotetraoctene kiseline (EDTA) i askorbinske kiseline kako bi se spriječila degradacija polifenolnih spojeva pri povišenom pH (Acosta-Estrada i sur., 2014).

Značaj vezanih polifenolnih spojeva u određivanju ukupnih polifenolnih spojeva u biljnim materijalima ilustriran je kroz nekoliko primjera, kako slijedi.

Žitarice su bogate različitim polifenolnim komponentama, posebno flavonoidima i fenolnim kiselinama, koje se uglavnom nalaze u posijama. Posebno su zastupljene hidroksicimetne

kiseline, među kojima najviše ferulinska kiselina, kao jedan od najzastupljenijih polifenolnih spojeva u žitaricama općenito (Bueno-Herrera i Perez-Magarino, 2020). U provedenim istraživanjima Adom i Liu (2002) te Liyana-Pathirana i Shahidi (2006) dokazali su značajno veći doprinos vezanih polifenolnih spojeva u udjelu ukupnih polifenolnih spojeva i antioksidacijskom kapacitetu žitarica u odnosu na slobodne i esterificirane frakcije. Prema Adom i Liu (2002) udio ukupnih polifenola u žitaricama (kukuruzu, pšenici, zobi i riži) u vezanom obliku iznosio je od 62 do 85 % te je dokazano da vezani polifenolni spojevi najviše doprinose ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti (od 58 do 90 %). U radu Liyana-Pathirana i Shahidi (2006) postupak frakcijskog izdvajanja slobodnih, esterificiranih i vezanih polifenola iz posija pšenice obuhvaćao je ekstrakciju smjesom otapala metanol-aceton-voda u svrhu izdvajanja ukupnih topljivih spojeva. Nakon toga su slobodni polifenoli ekstrahirani dietil eterom, a preostali esterificirani konjugati u vodenoj fazi podvrgnuti su alkalnoj hidrolizi te su oslobođeni polifenoli koncentrirani ponovnom ekstrakcijom tekuće-tekuće pomoću dietil etera. Frakcija vezanih polifenola izdvojena je nakon alkalne hidrolize ostatka nakon ekstrakcije ukupnih topljivih polifenola, također ekstrakcijom tekuće-tekuće pomoću dietil etera. U dobivenim frakcijama udio vezanih polifenola je 8,3 puta veći u odnosu na esterificirane frakcije polifenola i 13,4 puta veći u odnosu na slobodne frakcije polifenola posija tvrde pšenice, a doprinos vezanih polifenola antioksidacijskoj aktivnosti uzorka veći je od 80 %. U radu Bueno-Herrera i Perez-Magarino (2020) gotovo 70 % identificiranih polifenolnih spojeva makinja pšenice činile su fenolne kiseline, od kojih su se derivati hidroksibenzojeve kiseline nalazili najviše u slobodnom obliku, a derivati hidroksicimetne kiseline vezani na polisaharide u staničnoj stijenci. Kao najvažniji spoj u netopljivoj, vezanoj frakciji određena je ferulinska kiselina, koja čini 70-90 % ukupnog udjela fenolnih kiselina u zrnu pšenice.

Wang i sur. (2016) primijenili su postupak fracioniranja u određivanju polifenola iz *ploda žižule* (*Ziziphus jujuba* Miller). Ukupni topljivi polifenoli izdvojeni su ekstrakcijom metanolom, te je frakcija slobodnih polifenola izdvojena ekstrakcijom etil acetatom. Vodena faza nakon izdvajanja slobodnih polifenola podvrgnuta je alkalnoj hidrolizi nakon koje su oslobođeni polifenoli izdvojeni ekstrakcijom tekuće-tekuće pomoću etil acetata u frakciju esterificiranih topljivih spojeva. Nakon toga je provedena i kiselinska hidroliza kojom su oslobođeni aglikoni iz glikoziliranih oblika polifenola, preostalih nakon alkalne hidrolize, te su isti izdvojeni u zasebnu frakciju pomoću ekstrakcije etil acetatom. Netopljivi vezani

polifenoli izdvojeni su nakon alkalne hidrolize ostatka nakon ekstrakcije ukupnih topljivih spojeva, ekstrakcijom etil acetatom.

Na identičan način Arruda i sur. (2018) ekstrahirali su i frakcionirali topljive i netopljive (vezane) polifenolne spojeve iz ploda (pulpe, kore i sjemenki) biljke *Annona crassiflora* Mart. Udio svih topljivih polifenolnih spojeva (slobodnih, esterificiranih i glikoliziranih) bio je veći od udjela netopljivih, vezanih polifenola, no, oni nisu zanemarivi jer njihov udio u ukupnim polifenolima varira od 20 do 45 %. Provedenom analizom udjela ukupnih polifenola utvrđene su najviše vrijednosti u kori ploda, zatim u pulpi i sjemenkama.

2.3 MAHUNARKE

Mahunarke (*Leguminosae*) su treća najveća porodica među višim biljkama (Erbersdobler i sur., 2017) koju čini oko 770 rodova i oko 19500 vrsta. Brojne vrste porodice *Leguminosae* uzgajaju se širom svijeta (Rawal i Navarro, 2019), kao jednogodišnje i višegodišnje biljke, a s ekonomskog stajališta njihov je uzgoj drugi po značaju iza vrsti porodice *Poaceae* (trave, kojima pripadaju i žitarice) (Azani i sur., 2017). Na kraju 2014. godine globalna proizvodnja mahunarki iznosila je 77 milijuna tona (Rawal i Navarro, 2019), a najčešće uzgajane kulture bile su soja, grah, grašak, leća i slanutak (Erbersdobler i sur., 2017), odnosno jednogodišnje mahunarke.

Mahunarke se primarno uzgajaju za prehranu ljudi jer predstavljaju nutritivno bogate namirnice. Energetska vrijednost većine mahunarki je između 300 i 540 kcal / 100 g (Ofuya i Akhidue, 2005). One sadrže visoki udio proteina, prehrambenih vlakana i mineralnih tvari te nizak udio masti (Rawal i Navarro, 2019). Osim prehrambenih vlakana, u mahunarkama se nalaze i ostale skupine ugljikohidrata, poput škroba i oligosaharida (rafinoze i stahioze) (Ofuya i Akhidue, 2005). Provedena istraživanja povezuju konzumiranje mahunarki sa smanjenjem rizika od krvožilnih bolesti i dijabetesa te održavanjem tjelesne mase (Rawal i Navarro, 2019). Visoki udio polifenolnih spojeva i značajna antioksidacijska aktivnost potvrđeni su u brojnim biljkama porodice *Leguminosae*, a njihova velika zastupljenost u ljudskoj prehrani ukazuje na doprinos u održavanju oksidacijske ravnoteže u organizmu (Chew i sur., 2009). Osim za prehranu ljudi, neke mahunarke se koriste i kao hrana za životinje (Rawal i Navarro, 2019), a u poljoprivredi i za obogaćivanje tla dušikom (Erbersdobler i sur., 2017).

Prilikom industrijske prerade jednogodišnjih mahunarki, nastaje velika količina agro-industrijskog otpada kojeg čini lišće, stabljike i prazne mahune. Slika 4 shematski prikazuje preradu svježih mahunarki, a nusproizvodi odnosno agro-industrijski otpad nastaje u nekoliko koraka. Najznačajniji dio otpada nastaje na polju prilikom berbe i odvajanja sjemenki (zrna) od praznih mahuna, dok se manji dio otpada generira i u daljnjim koracima sortiranja zrna (Tassoni i sur., 2020). Prazne mahune su nusproizvod bogat vlaknima, oligosaharidima, masnim kiselinama, mineralnim tvarima i ostalim vrijednim sastojcima i stoga se danas sve više istražuju kao inovativni izvori za njihovo izdvajanje i primjenu u proizvodnji funkcionalnih prehrambenih proizvoda (Mateos-Aparicio i sur, 2010).



Slika 4. Shematski prikaz prerade mahunarki (Tassoni i sur., 2020)

2.3.1 Mahuna graška

Grašak (*Pisum sativum L.*) (slika 5) je jedna od najstarijih kultiviranih biljaka na svijetu koja danas predstavlja jednu od važnijih biljnih sirovina kojom se zamjenjuju proteini životinjskog podrijetla, zbog visoke hranjive vrijednosti, dobrih tehnoloških svojstava i niske cijene (Lobo i Dorta, 2019). Grašak je druga najrasprostranjenija mahunarka na svijetu (Mejri i sur., 2019), a prema podacima FAO, u 2018. godini proizvedeno je 21 225 579 t zelenog graška (FAOSTAT, 2020). Čak 88,5 % ukupne svjetske proizvodnje svježega graška odnosi se na azijske zemlje, među kojima dominiraju Kina i Indija. Na proizvodnju u Europi otpada približno 5 % ukupne svjetske proizvodnje, a zatim slijede Afrika (3,2 %), Sjeverna i Južna Amerika (3,1 %) i Oceanija (0,3 %). U Europi je najveći proizvođač Europska unija, odnosno Francuska. U Republici Hrvatskoj je u 2018. godini proizvedeno 3 296 t svježeg (zelenog) graška. Grašak se koristi kao svježi ili konzervirani proizvod, pri čemu na svjetskoj razini ipak dominira proizvodnja sušenog graška (Tassoni i sur., 2020).



Slika 5. Grašak (*Pisum sativum L.*) (Anonymus 1)

Nakon berbe graška na polju zaostaju stabljike, vitice, lišće te prazne mahune (Luzardo-Ocampo i sur., 2019). Mahuna je vanjski omotač sjemena koji čini 35-40 % mase ukupnog ploda (zrna s mahunom) (Rudra i sur., 2020). Nakon odvajanja zrna, prazna mahuna se izdvaja kao otpad, a nakupljena biljna biomasa (Rudra i sur., 2020) konvencionalno se koristi kao hrana za životinje, dok se u novije vrijeme razmatra njeno iskorištavanje u kontekstu biorafinerija (Mejri i sur., 2019; Tassoni i sur., 2020).

2.3.2 Primjena mahune graška

Mahuna je glavni nusprodukt prerade graška o čijem sastavu i biološkoj aktivnosti nema mnogo informacija te je zato njena primjena kao sastojka s dodanom vrijednošću ograničena (Mejri i sur., 2019). U osnovnom makrokomponentnom sastavu mahuna graška sadrži 78,4 % ugljikohidrata (od čega su 65,5 % topljiva prehrabena vlakna), 14,7 % proteina, 6,3 % mineralnih tvari te 0,7 % masti (Vojvodić i sur., 2016).

Konvencionalna primjena mahune graška je u proizvodnji bio-etanola i bio-ugljena, kao izvor ugljikohidrata i polisaharida, izvor prehrabnih vlakana (Mejri i sur., 2019) te kao hrana za životinje (Tassoni i sur., 2020). Visok udio celuloze i hemiceluloze u mahuni graška omogućava proizvodnju različitih biotehnoški proizvedenih kemikalija, poput bio-butanola (Nimbalkar i sur., 2018). Zbog visokog udjela prehrabnih vlakana, topljivih šećera, mineralnih tvari i linoleinske kiseline te izražene antioksidacijske aktivnosti, mahuna graška svoju primjenu nalazi i kao sastojak prehrabnih proizvoda (Tassoni i sur., 2020). Prehrabna vlakna iz mahune graška mogu se koristiti u proizvodnji pekarskih proizvoda (Luzardo-Ocampo i sur., 2019). Mahuna graška primjenjuje se i kao hrana za životinje koja je dobar izvor proteina, prehrabnih vlakana i mineralnih tvari (Tassoni i sur., 2020).

Provedene *in vitro* analize ukazuju na brojne zdravstvene učinke mahune graška, kao što su laksativni, antikancerogeni, antifungalni, kardio-protektivni, antioksidacijski, antimikrobni i antidijabetički kao rezultat prisustva funkcionalnih komponenata: esencijalnih aminokiselina, ugljikohidrata, mineralnih tvari i masnih kiselina (Mejri i sur., 2019). Višestruki biološki učinci, uključujući antioksidacijsku aktivnost, mogu se povezati i s polifenolnim spojevima (Babbar i sur., 2012).

U istraživanju Mejri i sur. (2019) u metanolnom ekstraktu mahune graška određeno je 15 polifenolnih spojeva. Mahuna graška je relativno neistražena biljna sirovina u smislu polifenolnog sastava te su istraživanja sastava i udjela ukupnih polifenolnih spojeva, kao i njihovih frakcija važna za promicanje ovog biljnog materijala kao inovativnog izvora funkcionalnih sastojaka za primjenu u prehrambenoj industriji.

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJAL

3.1.1 Mahuna graška

U ovome radu korištena je suha mahuna graška (engl. pea pod; oznaka uzorka PP). Iz cijelih svježih mahuna graška (~ 10 kg) izdvojena su zrna graška te su prazne mahune graška sušene na zraku u tankom sloju tijekom 48 h, a zatim su dosušene u laboratorijskom sušioniku pri 50°C tijekom 24 h, odnosno do postizanja udjela vode u uzorku do 15 %. Osušene mahune graška usitnjene su pomoću mlinca za kavu i prosijane kroz sito veličine pora 450 μm . Opisanim postupkom dobivena je homogena frakcija suhe mahune graška (Slika 6) koja je čuvana u zatvorenoj plastičnoj posudi na suhom mjestu.



Slika 6. Homogena frakcija mahune graška nakon usitnjavanja i prosijavanja (vlastita fotografija)

3.1.2 Kemikalije

Sve kemikalije korištene u ovome radu bile su visoke analitičke (p.a.) i/ili HPLC čistoće.

Priprema ekstrakata i frakcija polifenolnih spojeva

- Aceton, GRAM-MOL d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- L-askorbinska kiselina, Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- Dietil eter, Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- Etil acetat, Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- n-heksan, Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- Klorovodična kiselina (37 %), Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- Kompleksal III (etilendiaminotetraoctena kiselina, dinatrijeva sol, dihidrat), T. T. T. d.o.o. (Sveta Nedelja, Hrvatska)
- Metanol, J. T. Baker (Pennsylvania, SAD)
- Natrijev hidroksid, u zrcima, T. T. T. d.o.o. (Sveta Nedelja, Hrvatska)
- Natrijev klorid, Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- Natrijev sulfat, bezvodni, Gram mol (Zagreb, Hrvatska)

Karakterizacija polifenolnog sastava i antioksidacijskog kapaciteta

- ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), dinatrijeva sol, min. 98 % (TLC)), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; min 85 % CHN), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- Etanol, 96 %, Gram mol (Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Formaldehid, T. T. T. d.o.o. (Sveta Nedelja, Hrvatska)
- Kalijev peroksodisulfat, Fluka/Honeywell (Charlotte, SAD)
- Klorovodična kiselina (37 %), Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- Metanol, J. T. Baker (Pennsylvania, SAD)
- Natrijev karbonat, bezvodni, Gram mol (Zagreb, Hrvatska)
- Trolox ((±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), Sigma Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)

Analiza tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti

- Acetonitril, HPLC kvaliteta, Fischer Scientific (Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Analitički standardi polifenolnih spojeva:

Hidroksibenzojeve kiseline :

- galna kiselina (>97,5 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- protokatehinska kiselina (>97 %), Acros Organics/Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
- 4-hidroksibenzojeva kiselina (>99 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- vanilinska kiselina (>98,5 %), Acros Organics/Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
- siringinska kiselina (>95 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)

Hidroksicimetne kiseline :

- kafeinska kiselina (HPLC standard), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- p-kumarinska kiselina (98 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- trans-ferulinska kiselina (99 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- sinapinska kiselina (>95 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- trans-cimetna kiselina (98 %), Acros Organics/Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
- klorogenska kiselina (95 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- ružmarinska kiselina (97 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)

Flavanoli:

- (+)-katehin, (>98 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- (-)-epikatehin (>90 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)

Flavonoli:

- miricetin (>98 %), Fluka/Honeywell (Charlotte, SAD)
- kvercetin (>97 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- kvercetin-3-glukozid, Fluka/Honeywell (Charlotte, SAD)
- kemferol (>97 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- kemferol-3-glukozid (>97 %), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Njemačka)
- rutin trihidrat (>97 %), Acros Organics/Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)

Flavoni:

- apigenin (95 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- *o*-fosforna kiselina, min 85 %, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Metanol, HPLC kvalitete, J. T. Baker (Pennsylvania, SAD)
- Voda HPLC kvalitete

3.1.3 Uređaji i posuđe

Priprema biljnog materijala

- Laboratorijski sušionik, ST-06, Instrumentaria (Hrvatska)
- Mlinac za kavu za kućanstvo
- Sito veličine pora 450 µm, Fritsch GMBH (Njemačka)

Priprema ekstrakata i frakcija polifenolnih spojeva

- Analitička vaga (New Classic ML204/01), Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Centrifuga (SL 8R) s rotorom s utorima pod fiksnim kutom (HIGHConic™ III), Thermo Scientific (Massachusetts, SAD)
- Laboratorijski pribor: teflonski magneti, propipete, željezni stalak
- Laboratorijsko plastično posuđe: Falcon epruvete (15 i 50 mL), plastične Eppendorf epruvete (2 mL), plastične Pasteur pipete
- Laboratorijsko stakleno posuđe: laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice, reagens boce, tikvice s okruglim dnom (50 i 100 mL). štapići, pipete
- Magnetska miješalica (SMHS-6), Witeg (Wertheim, Njemačka)
- pH metar (FiveEasy FE20), Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Rotacijski vakuum uparivač Buchi R-205 (Flawil, Švicarska) s vakuum pumpom Buchi V-700 (Flawil, Švicarska)
- Laboratorijska vaga (GF-3000 EC), A&D Instruments (Japan)
- Tresilica (MX-S), DLAB Scientific Co. (Beijing, Kina)
- Ultrazvučna kupelj (S 60 H) Elmasonic, Elma (Singen, Njemačka)
- Termostatirana vodena kupelj(VK 2 ERN), Inkolab (Zagreb, Hrvatska)

Karakterizacija polifenolnog sastava i antioksidacijskog kapaciteta

- Laboratorijski pribor: propipete, kivete za spektrofotometar (optičko staklo)
- Laboratorijsko stakleno posuđe: laboratorijske čaše, odmjerne tikvice, reagens boce, staklene epruvete (20 mL)
- Mikropipete (P200, P1000, P5000), Gilson (Frakuska)
- Spektrofotometar (GenesysTM 10S UV-VIS), Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
- Tresilica (MX-S), DLAB Scientific Co. (Beijing, Kina)

Analiza tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti

- Analitička vaga (New Classic ML204/01), Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Laboratorijsko stakleno posuđe: reagens boce, pipete, laboratorijske čaše, odmjerne tikvice
- Laboratorijski pribor: plastične šprice (2 mL), mikrofilteri (regenerirana celuloza) veličine pora 0,45 µm (13/45), HPLC posude za uzorke (vials) s čepovima
- Ultrazvučna kupelj S 60 H Elmasonic, Elma (Singen, Njemačka)
- Tekućinski kromatograf Agilent Series 1200, Agilent Technologies (Santa Clara, SAD) koji se sastoji od degazera, kvaterne pumpe, automatskog injektora, termostata kolone i DAD (engl. diode-array) detektora

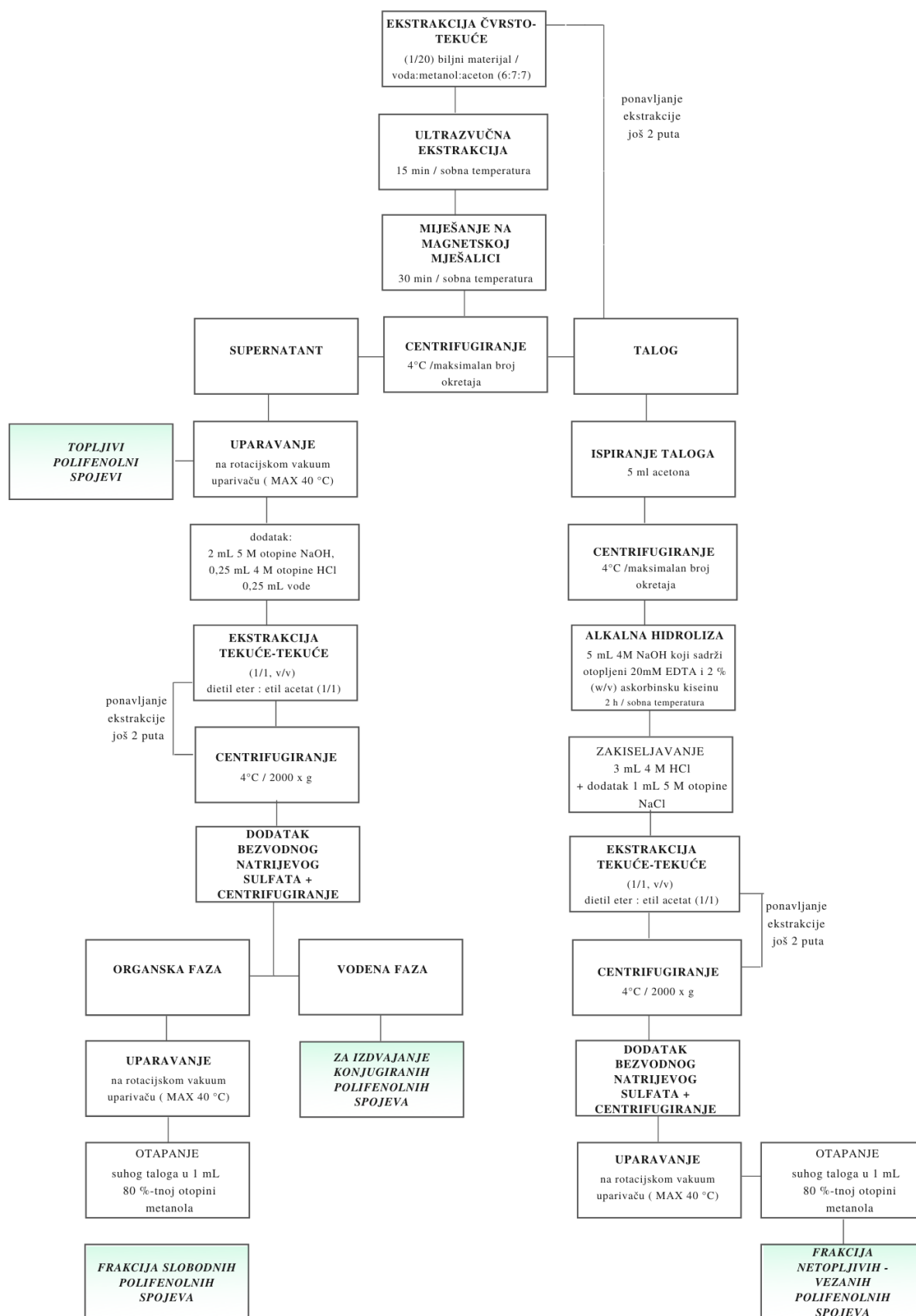
3.2 METODE RADA

3.2.1 Ekstrakcija i frakcioniranje polifenolnih spojeva

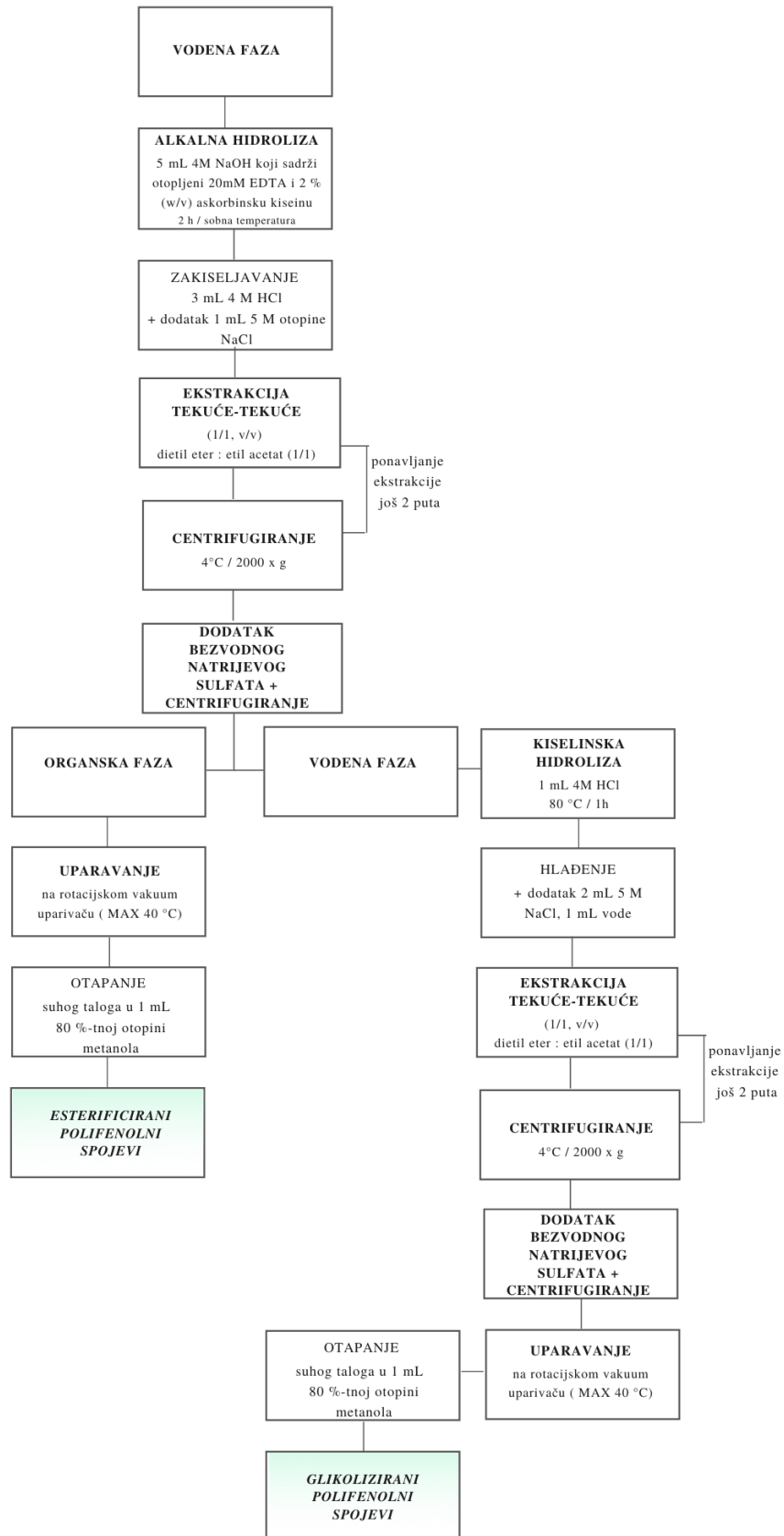
Ekstrakcija i frakcioniranje polifenolnih spojeva provedeni su prema radu Arruda-e i sur. (2018), uz određene modifikacije. Prvo je provedena ekstrakcija ukupnih topljivih polifenolnih spojeva, nakon čega su iz dobivenog ekstrakta selektivno izdvojene frakcije slobodnih i konjugiranih (esteri i glikozidi) polifenolnih spojeva. Iz ostatka nakon ekstrakcije ukupnih topljivih polifenolnih spojeva izdvojeni su vezani polifenolni spojevi. Shematski prikaz ukupnog postupka izdvajanja pojedinih frakcija polifenolnih spojeva iz mahune graška prikazan je na Slici 7.

3.2.1.1 Ekstrakcija ukupnih topljivih polifenolnih spojeva

Uzorak suhe mahune graška (približno 0,5 g) pomiješa se sa smjesom otapala voda:metanol:acetone (6:7:7, v/v/v) u omjeru 1:20 (w/v) u Falcon epruveti od 15 mL. Uzorak se suspendira u otapalu pomoću vorteksa te se uroni u ultrazvučnu kupelj i ekstrahira tijekom 15 minuta. Ekstrakcija se zatim nastavi na magnetskoj miješalici tijekom idućih 30 minuta, pri sobnoj temperaturi i uz postignutu potpunu homogenost čvrstog uzorka u otapalu. Po završetku ekstrakcije, uzorak se centrifugira pri maksimalnom broju okretaja i temperaturi od 4°C (u prethodno ohlađenoj centrifugi). Izdvojeni supernatant odvoji se u tikvicu za uparavanje, a talog se ponovno ekstrahira s jednakim volumenom svježeg otapala (smjese otapala) prema opisanom postupku. Navedeni postupak ekstrakcije provodi se ukupno 3 puta. Supernatanti iz svake ekstrakcije združuju se u tikvici s okruglim dnom te se jedinstveni ekstrakt upari na rotacijskom vakuum uparivaču, pri 40 °C i uz maksimalni vakuum postignut vodenom vakuum sisaljkom, do malog volumena (približno 2,5 mL). Upareni ekstrakt kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 5 mL i nadopuni vodom do oznake. Ekstrakcija ukupnih topljivih polifenolnih spojeva provedena je u duplikatu.



Slika 7. Shematski prikaz postupka frakcioniranja polifenolnih spojeva mahune graška (Arruda i sur., 2018)



Slika 7. Shematski prikaz postupka frakcioniranja polifenolnih spojeva mahune graška (nastavak) (Arruda i sur., 2018)

3.2.1.2 Priprema frakcije slobodnih topljivih polifenolnih spojeva

Alikvot od 2,5 mL uparenog vodenog ekstrakta prenese se u staklenu epruvetu s navojnim čepom te se u isti doda 2 mL 5 M otopine natrijevog klorida (NaCl), 0,25 mL 4 M otopine klorovodične kiseline (HCl) i 0,25 mL vode (kako bi konačni volumen iznosio 5 mL). Otopina se dobro promiješa na vorteksu, a zatim se ekstrahira s jednakim volumenom smjese otapala dietil eter - etil acetat (1:1, v/v). Ekstrakcija tekuće-tekuće provodi se u čvrsto zatvorenim epruvetama intenzivnim miješanjem pomoću vorteksa tijekom 1 minute. Odvajanje faza nakon ekstrakcije pospješuje se kratkim centrifugiranjem (1 min) pri 2000 x g i 4 °C, nakon čega se odvoji gornja organska faza u zasebnu epruvetu. Ekstrakcija organskim otapalima provodi se ukupno 3 puta. U sakupljenu organsku fazu nakon 3 ekstrakcije dodaje se malo (na vrhu špatule) bezvodnog natrijevog sulfata kako bi se vezala rezidualna voda. Smjesa soli i otapala se nakon kratkog miješanja na vorteksu centrifugira pri 2000 x g i 4 °C tijekom 5 min. Supernatant organske faze pažljivo se prenese u tikvicu s okruglim dnom te se otapalo otpari do suhoga na rotacijskom vakuum uparivaču, pri 40 °C i uz maksimalno postignuti vakuum pomoću vodene vakuum sisaljke. Suhi talog u tikvici otopi se u 1 mL 80 % -tne otopine metanola što čini uzorak za spektrofotometrijske i HPLC analize. Ekstrakcija ukupnih topljivih polifenolnih spojeva iz mahune graška provedena je u duplikatu.

3.2.1.3 Priprema frakcija konjugiranih topljivih polifenolnih spojeva

Konjugirani topljivi polifenolni spojevi određeni su detekcijom slobodnih polifenolnih spojeva nastalih kao produkt hidrolize prisutnih konjugata – esterificiranih i glikoziliranih spojeva, i to: primjenom lužine (alkalna hidroliza; esteri), odnosno kiseline (kiselinska hidroliza; glikozidi). Topljivi konjugirani polifenolni spojevi određeni su u vodenoj fazi preostaloj nakon ekstrakcije slobodnih topljivih polifenolnih spojeva. Za alkalnu hidrolizu, u staklenoj epruveti s navojnim čepom pomiješa se alikvot od 1 mL vodene faze preostale nakon ekstrakcije slobodnih polifenolnih spojeva s 1,25 mL 4 M otopine natrijevog hidroksida (NaOH) u kojoj su otopljeni etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA, 20 mM) i askorbinska kiselina (2 %, w/v), a zatim se doda još 0,05 mL 4 M otopine NaOH i 0,2 mL vode. Otopina se dobro promiješa na vorteksu i ostavi 2 h pri sobnoj temperaturi. Po isteku vremena provede se neutralizacija i zakiseljavanje polaganim dodatkom 1,5 mL 4 M otopine HCl (uz hlađenje), pri čemu suvišak kiseline služi za postizanje niskog pH koji pogoduje kasnijoj ekstrakciji deesterificiranih polifenolnih spojeva u organsko otapalo. U zakiseljenu otopinu dodaje se 1 mL 5 M otopine NaCl te se otopina dobro promiješa na vorteksu, nakon čega se ekstrahira

jednakim volumenom smjese otapala dietil eter - etil acetat (1:1, v/v), kako je prethodno opisano u poglavlju 3.2.1.2.

Također su pripremljeni i kontrolni uzorci kao svojevrsna slijepa proba zbog moguće interferencije koekstrahiranih EDTA i askorbinske kiseline, posebice u određivanju antioksidacijskog kapaciteta. U tu svrhu, umjesto uzorka (vodena faza nakon ekstrakcije slobodnih topljivih polifenolnih spojeva) se u reakcijsku smjesu dodaje 1 mL destilirane vode, a ostatak postupka provodi se kako je opisano.

Za kiselinsku hidrolizu, u staklenoj epruveti s navojnim čepom pomiješa se alikvot od 1 mL vodene faze preostale nakon ekstrakcije slobodnih polifenolnih spojeva te se u isti dodaje 1 mL 4 M otopine HCl. Otopina se zagrijava pri 80 °C tijekom 1 h, nakon čega se ohladi u hladnoj vodi, i nadopuni s 2 mL 5 M otopine NaCl i 1 mL vode. Otopina se dobro promiješa na vorteksu i ekstrahira jednakim volumenom smjese otapala dietil eter-etil acetat (1:1, v/v), kako je prethodno opisano u poglavlju 3.2.1.2.

Suhi talog nakon uparavanja združenih organskih faza (nakon ekstrakcije tekuće-tekuće) alkalnih i kiselinskih hidrolizata otopi se u 1 mL 80 %-tnog metanola, čime se dobivaju uzorci za spektrofotometrijske i HPLC analize.

Alkalne i kiselinske hidrolize slobodnih konjugiranih polifenolnih spojeva provedene su u duplikatu.

3.2.1.4 Priprema frakcije vezanih polifenolnih spojeva

Vezani polifenolni spojevi izdvajaju se alkalnom hidrolizom iz čvrstog ostatka nakon ekstrakcije ukupnih topljivih polifenolnih spojeva (ekstrakcija sa smjesom otapala metanol:acetona:voda). U tu svrhu, čvrsti ostatak nakon ekstrakcije ispere se dva puta s po 5 mL acetona (potrebno je dobro resuspendirati ostatak u otapalu), a aceton se izdvoji centrifugiranjem pri maksimalnom broju okretaja tijekom 5 min, pri 4 °C. Talog se ostavi u digestoru preko noći kako bi preostali aceton ishlapio. U čvrsti ostatak ispran i osušen acetonom dodaje se 5 mL 2 M otopine NaOH u kojoj su otopljeni EDTA (10 mM) i askorbinska kiselina (1 %, w/v). Hidroliza se provodi tijekom 2 h i pri sobnoj temperaturi, uz konstantno miješanje uzorka na magnetskoj miješalici. Po isteku vremena, smjesa se neutralizira i zakiseljava polaganim dodavanjem 3 mL 4 M otopine HCl, pri čemu suvišak kiseline osigurava postizanje niskog pH što pogoduje ekstrakciji deesterificiranih polifenolnih spojeva u organsko otapalo. Zakiseljenoj otopini dodaje se i 2 mL 5 M otopine NaCl, nakon čega se ista dobro promiješa na vorteksu. Za ekstrakciju organskim otapalom, izuzme se

aliquot (1 mL) koji se ekstrahira s jednakim volumenom smjese otapala dietil eter-etil acetat (1:1, v/v), kako je prethodno opisano u poglavlju 3.2.1.2. Suhi talog nakon uparavanja združenih organskih faza otopi se u 1 mL 80 %-tnog metanola, čime se dobivaju uzorci za spektrofotometrijske i HPLC analize. Alkalna hidroliza i ekstrakcija vezanih polifenolnih spojeva provedena je u duplikatu.

Također su pripremljeni i kontrolni uzorci kao svojevrsna slijepa proba zbog moguće interferencije koekstrahiranih EDTA i askorbinske kiseline, posebice u određivanju antioksidacijskog kapaciteta. U tu svrhu reakcijsku smjesu čini 1 mL 2 M otopine NaOH koja sadrži 10 mM EDTA i 1 % (w/v) askorbinske kiseline, 0,6 mL 4 M otopine HCl i 0,4 mL 5M otopine NaCl. Nakon što se dobro promiješa na vorteks tresilici, otopina se ekstrahira jednakim volumenom smjese otapala dietil eter-etil acetat (1:1, v/v), kako je opisano.

3.2.2 Ispitivanje iskorištenja pojedinih faza postupka frakcioniranja na čistim standardima polifenolnih spojeva

Ispitivanje iskorištenja za čiste standarde provedeno je za sljedeće faze postupka frakcioniranja:

- 1) ekstrakcija tekuće-tekuće smjesom otapala dietil eter – etil acetat (1:1, v/v), pri čemu je ispitivan i utjecaj dodatka otopine NaCl s obzirom na učinak izoliranja,
- 2) alkalna hidroliza, pri čemu je ispitivan i utjecaj dodatka EDTA i askorbinske kiseline u konačnoj koncentraciji od 10 mM (EDTA) i 1 % (w/v, askorbinska kiselina),
- 3) kiselinska hidroliza.

Za ispitivanje iskorištenja korišteni su sljedeći standardi:

- hidoksibenzojeve kiseline (galna, protokatehinska, 4-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska kiselina),
- hidroksicimetne kiseline (*p*-kumarinska, *trans*-ferulinska, sinapinska, *trans*-cimetna, kafeinska, ružmarinska i klorogenska kiselina, pri čemu su zadnje dvije predstavljale modelne molekule za esterificirane konjugate)
- monomerni flavanoli (katehin i epikatehin)
- flavonoli (miricetin, kvercetin, kemferol, kvercetin-3-glukozid, rutin, kemferol-3-glukozid, pri čemu su zadnja 3 predstavljali modelne molekule za glikozilirane konjugate),
- flavoni (apigenin).

U eksperimentima su korišteni standardi pripremljeni u 80 %-tnom metanolu u koncentraciji $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, bilo zasebno ili kao komponenta smjese standarda. Smjesa standarda sadržavala je navedene standarde bez spojeva koji su služili kao modeli konjugata molekula estera i glikozida (ružmarinska i klorogenska kiselina te kvercetin-3-glukozid, rutin i kemferol-3-glukozid), koji su pripremljeni i analizirani zasebno. Reakcijske smjese definirane su kako je navedeno u Tablici 2, a sam postupak proveden je sukladno opisanim postupcima u poglavljima 3.2.1.2 i 3.2.1.3.

Tablica 2. Sažeti prikaz provedenih eksperimenata određivanja stabilnosti čistih standarda u uvjetima frakcioniranja

Komponenta reakcijske smjese (mL)	Ekstrakcija tekuće-tekuće		Alkalna hidroliza		Kiselinska hidroliza
	Bez dodatka NaCl	S dodatkom NaCl	Bez dodatka EDTA i askorbinske kiseline	S dodatkom EDTA i askorbinske kiseline	
Smjesa standarda	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
5M NaCl	2	-	1*	1*	2*
Demineralizirana voda	2,25	4,25	0,7	0,7	0,5 + 1*
4 M NaOH	-	-	1,3	0,05	-
4 M NaOH + 20 mM EDTA + 2 % (w/v) askorbinska kiselina	-	-	-	1,25	-
4 M HCl	0,25	0,25	1,5*	1,5*	1
Ukupni volumen (mL)	5	5	5	5	5

*dodaje se nakon provedene hidrolize

Alkalna hidroliza provedena je pri sobnoj temperaturi tijekom 2 h, dok je kiselinska hidroliza provedena pri $80 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 1 h. Nakon alkalne i kiselinske hidrolize uslijedila je trostruka ekstrakcija jednakim volumenom smjese otapala dietil eter – dietil acetat (1:1, v/v). Združene organske faze uparene su do suhoga pomoću rotacijskog vakuum uparivača, a suhi talozi otopljeni su u 1 mL 80 %-tnog metanola.

Izračun rezultata:

Iskorištenje (%) za pojedini spoj u svakoj od faza postupka frakcioniranja izračunato je kao omjer koncentracije određene primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC-DAD) prema definiranoj metodi (kako je opisano u poglavlju 3.2.3.4) te poznate

teorijske koncentracije tog spoja koja se nalazi u reakcijskoj smjesi. Za spojeve koji su korišteni kao modeli konjugata-estera i konjugata-glikozida, nakon provedenih odgovarajućih hidroliza instrumentalno su određeni slobodni polifenolni spojevi, tj. slobodne kiseline i polifenolni aglikoni, a njihovo iskorištenje (%) izračunato je kao omjer koncentracije određene HPLC-DAD metodom i teorijske koncentracije promatranog spoja sadržane u modelnoj molekuli. Pritom su korištene molarne mase kako slijedi:

Mr (ružmarinska kiselina) = 360,31 g mol⁻¹

Mr (klorogenska kiselina) = 354,31 g mol⁻¹

Mr (kafeinska kiselina) = 180,16 g mol⁻¹

Mr (kvercetin-3-glukozid) = 464,10 g mol⁻¹

Mr (rutin) = 610,52 g mol⁻¹

Mr (kvercetin) = 302,24 g mol⁻¹

Mr (kempferol-3-glukozid) = 448,37 g mol⁻¹

Mr (kempferol) = 286,23 g mol⁻¹

3.2.3 Karakterizacija polifenolnog sastava ekstrakata i frakcija

3.2.3.1 *Određivanje udjela ukupnih polifenola*

Princip metode:

Metoda za određivanje udjela ukupnih polifenola temelji se na redukciji Folin-Ciocalteu reagensa nekim reducirajućim agensom, u ovom slučaju polifenolima, pri čemu nastaju plavo obojeni volframovi i molibdenovi oksidi (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b; Ough i Amerine, 1988).

Opis postupka:

U staklene epruvete otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100 µL uzorka, 500 µL Folin-Ciocalteu reagensa razrijeđenog s vodom u omjeru 1:2 (v/v) i 1,5 mL natrijevog karbonata. Reakcijska smjesa se promiješa na vorteksu te se ostavi 2 h na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Po isteku vremena izmjeri se apsorbancija nastalog plavog obojenja pri 765 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba se priprema na sličan način, s iznimkom da se umjesto uzorka pipetira 100 µl destilirane vode.

Izračun rezultata:

Koncentracija ukupnih polifenola izračunava se s obzirom na standard galne kiseline. U tu svrhu pripreme se otopine standarda galne kiseline u rasponu koncentracija 50 – 800 mg L⁻¹ te se provede reakcija s Folin-Ciocalteu reagensom prema opisanome postupku. Iz vrijednosti apsorbancija (765 nm), tj. razlike apsorbancija uzorka (standarda) i slijepe probe, za poznate vrijednosti koncentracija galne kiseline, izradi se baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji. Jednadžba baždarnog pravca za galnu kiselinu glasi:

$$y = 0,0010x - 0,0001 \quad [1],$$

gdje je:

y - vrijednost razlike apsorbancije (765 nm) uzorka i slijepe probe,

x - tražena koncentracija ekvivalenta galne kiseline (mg GAE L⁻¹).

Koncentracija ukupnih polifenola u analiziranom ekstraktu određuje se iz baždarne krivulje te se izražava na ekvivalent galne kiseline (*engl.gallic acid equivalents* - GAE). Pritom, dobivenu koncentraciju treba pomnožiti s faktorom razrjeđenja ako je analiza provedena s razrijeđenim ekstraktom. Uz poznati ukupni volumen ekstrakta, masu korištenog uzorka za pripremu ekstrakta te udjel suhe tvari u uzorku, izračuna se maseni udjel ukupnih polifenola u uzorku.

Rezultati određivanja ukupnih polifenola ekstrakata i frakcija iz mahune graška izraženi su kao maseni udjeli ekvivalenta galne kiseline u suhoj tvari mahune graška te prikazani kao srednje vrijednosti 2 paralelna mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama.

3.2.3.2 Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Princip metode:

DPPH metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini što je praćeno promjenom boje radikala iz intenzivno ljubičaste u žutu (Brand-Williams i sur., 1995). Do promjene boje dolazi uslijed prisutnosti elektron donora (antioksidans) koji sparuje nesporeni elektron DPPH reagensa.

Opis postupka:

Pripremi se 0,094 mM otopina DPPH u metanolu. U epruvetu se otpipetira 100 μL uzorka i doda se 3,9 mL prethodno pripremljene otopine DPPH. Reakcijska smjesa se dobro promiješa

pomoću vorteksa te se ostavi u mraku i pri sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta. Slijepa proba se priprema dodatkom 100 µL metanola umjesto uzorka. Po isteku vremena, izmjeri se apsorbancija reakcijske smjese pri 515 nm.

Izračun rezultata:

Antioksidacijski kapacitet izračunava se s obzirom na standard Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina; sintetski, vodeno-topljiv analog vitamina E). U tu svrhu pripreme se otopine standarda Trolox-a u rasponu koncentracija 0,1 – 0,75 mM te se provede reakcija s DPPH reagensom prema opisanom postupku. Iz vrijednosti apsorbancija reakcijskih smjesa pri 515 nm, tj. razlika apsorbancija slijepe probe i uzorka (standarda), za poznate vrijednosti koncentracija Trolox-a, izradi se baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji. Jednadžba baždarnog pravca za Trolox glasi:

$$y = 0,603x - 0,006 \quad [2],$$

gdje je:

y – vrijednost razlike apsorbancije (515 nm) slijepe probe i uzorka,

x- tražena koncentracija ekvivalenta Trolox-a (mmol Trolox L⁻¹).

Antioksidacijski kapacitet analiziranog ekstrakta određuje se iz navedene baždarne krivulje te se izražava na ekvivalent Trolox-a (*engl.* Trolox equivalents - TE). Pritom, dobivenu ekvivalentnu koncentraciju treba pomnožiti s faktorom razrjeđenja ako je analiza provedena s razrijeđenim ekstraktom. Uz poznati ukupni volumen ekstrakta, masu korištenog uzorka za pripremu ekstrakta te udjel suhe tvari u uzorku, izračuna se antioksidacijski kapacitet s obzirom na suhu tvar uzorka. Rezultati antioksidacijskog kapaciteta interpretiraju se kao koncentracije Trolox-a kojima se postiže ekvivalentni učinak na reakcijsku smjesu. Analiza antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom provedena je u duplikatu.

3.2.3.3 Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom

Princip metode:

ABTS metoda se temelji na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kationa) u prisutnosti antioksidansa, čime isti gubi karakterističnu plavo-zelenu boju (Re i sur., 1999). Spektrofotometrijski se prati smanjenje apsorbancije ABTS-a pri 734 nm kao funkcija vremena i koncentracije antioksidansa u uzorku te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije uzrokovanim Trolox-om,

koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize (Re i sur., 1999). Kao oksidacijska otopina ABTS-a koristi se otopina kalijevog persulfata, a dodatak antioksidansa rezultira redukcijom prethodno generiranog ABTS radikala. Redukcija ovisi o antioksidacijskoj aktivnosti i koncentraciji antioksidansa te trajanju reakcije. Udjel ABTS radikala kojeg "gase" antioksidansi se izražava kao funkcija koncentracije i vremena, a mjeri se spektrofotometrijski praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala u usporedbi sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline).

Postupak rada:

Pripremi se otopina ABTS⁺ radikala oksidacijom 7 mM vodene otopine ABTS reagensa sa 140 mM kalijevim peroksodisulfatom, do konačne koncentracije otopine kalijevog peroksodisulfata od 2,45 mM. Za pripremu ove otopine potrebno je pomiješati 88 µL 140 mM otopine kalijevog peroksodisulfata te nadopuniti sa 7 mM otopinom ABTS reagensa do volumena od 5 mL. Pripremljenu otopinu omotati folijom i ostaviti najmanje 12-16 h u mraku i pri sobnoj temperaturi kako bi došlo do potpune oksidacije. Na dan analize pripremljena oksidirana otopina se razrijedi u 96 % etanolu do konačne koncentracije ABTS⁺ radikala od 1 % (v/v), a apsorbancija otopine iznosi $0,70 \pm 0,02$.

Alikvot od 20 µL uzorka doda se u epruvetu ispunjenu s 2 mL otopine ABTS⁺ radikala te se otopina dobro promiješa pomoću vorteksa. Reakcijska smjesa ostavi se tijekom 6 min u mraku i pri sobnoj temperaturi. Slijepa proba pripremi se dodatkom 20 µL otapala u kojem je pripremljen uzorak, umjesto uzorka. Nakon 6 minuta provedene reakcije izmjeri se apsorbancija reakcijske smjese pri 734 nm.

Izračun rezultata:

Antioksidacijski kapacitet izračunava se s obzirom na standard Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina; sintetski, vodeno-topljiv analog vitamina E). U tu svrhu pripreme se otopine standarda Trolox-a u rasponu koncentracija $0,2 - 0,8 \text{ mg L}^{-1}$ te se provede reakcija s ABTS reagensom prema opisanom postupku. Iz vrijednosti apsorbancija reakcijskih smjesa pri 734 nm, tj. razlika apsorbancija slijepe probe i uzorka (standarda), za poznate vrijednosti koncentracija Trolox-a, izradi se baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji. Jednadžba baždarnog pravca za Trolox glasi:

$$y = 0,303x + 0,0006 \quad [3],$$

gdje je:

y – vrijednost razlike apsorbancije (734 nm) slijepe probe i uzorka,

x- tražena koncentracija ekvivalenata Trolox-a ($\text{mmol Trolox L}^{-1}$).

Antioksidacijski kapacitet analiziranog ekstrakta određuje se iz navedene baždarne krivulje te se izražava na ekvivalent Trolox-a (*engl.* Trolox equivalents - TE). Pritom, dobivenu ekvivalentnu koncentraciju treba pomnožiti s faktorom razrjeđenja ako je analiza provedena s razrijeđenim ekstraktom. Uz poznati ukupni volumen ekstrakta, masu korištenog uzorka za pripremu ekstrakta te udjel suhe tvari u uzorku, izračuna se antioksidacijski kapacitet s obzirom na suhu tvar uzorka. Rezultati antioksidacijskog kapaciteta interpretiraju se kao koncentracije Trolox-a kojima se postiže ekvivalentni učinak na reakcijsku smjesu. Analiza antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom provedena je u duplikatu.

3.2.3.4 Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC-PDA)

Na temelju HPLC metode objavljene u radu Belščak-Cvitanović i sur. (2011) razvijena je nova HPLC metoda za analizu polifenolnih spojeva. U analizi je korištena kromatografska kolona Kinetex 2.6 μm C18 (4,6 x 150 mm, 100 Å) (Phenomenex, SAD) i kromatografski sustav Agilent 1200 Series. Uzorak je injektiran u sustav automatskim injektorom u volumenu 5 μL , a elucija je provedena gradijentno dvokomponentnom mobilnom fazom (A - 0,1 % H_3PO_4 u H_2O , B - 0,1 % H_3PO_4 u acetonitrilu) i pri protoku od 0,5 mLmin^{-1} . Gradijent je uspostavljen kako slijedi: 0. min - 7 % B, 5. min - 7 % B, 45. min - 40 % B, 47. min - 70 % B, 52. min - 70 % B + 10 min ekvilibracije na početne uvjete analize. Temperatura kolone iznosila je 25 °C. Detekcija analita omogućena primjenom detektora s fotodiodama nizu (*engl.* Photo Diode Array Detection - PDA ili DAD), snimanjem pri valnim duljinama 260, 278, 320, 350 i 370 nm što odgovara maksimumima apsorpcijskih spektara različitih polifenolnih spojeva koji su analizirani ovom metodom. Ovako definirana metoda pogodna je za analizu ukupno 21 spoja iz skupine polifenola.

Identifikacija pikova na kromatogramima uzoraka provedena je usporedbom retencijskih vremena s poznatim čistim standardima, kao i usporedbom apsorpcijskih spektara snimljenih u valnom području 190-600 nm.

Kvantifikacija identificiranih pikova provedena je s obzirom na konstruirane baždarne pravce za pojedini standard. Jednadžbe baždarnih pravaca s koeficijentima determinacije te valne

duljine detekcije pojedinih standarda i koncentracijski raspon u kojem baždarni pravci vrijede, prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Jednadžbe baždarnih pravaca za odabrane standarde, koncentracijski raspon u kojem vrijede te valne duljine detekcije pojedinih standarda

	Naziv spoja	Jednadžba baždarnog pravca	R ²	Valna duljina (nm)	Koncentracijski raspon ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Hidroksibenzojeve kiseline	galna	$y = 33,396x - 4,7429$	0,9999	278	0,5-100
	protokatehinska	$y = 43,058 - 5,0989$	0,9999	260	0,5-100
	4-hidroksibenzojeva	$y = 68,274x - 7,736$	0,9998	260	0,5-100
	vanilinska	$y = 41,142x - 4,2626$	1,0000	260	0,5-100
	siringinska	$y = 35,96x - 3,5584$	1,0000	278	0,5-100
Hidroksicimetne kiseline	<i>p</i> -kumarinska	$y = 72,452x - 4,8714$	0,9998	320	0,5-100
	<i>t</i> -ferulinska	$y = 57,705x - 4,7275$	0,9999	320	2-100
	sinapinska	$y = 46,977x - 6,1781$	1,0000	320	0,5-100
	kafeinska	$y = 61,812x - 5,9758$	1,000	320	0,5-100
	<i>t</i> -cimetna	$y = 93,47x - 9,3932$	1,0000	278	0,5-100
	klorogenska	$y = 32,164x - 2,5785$	0,9999	320	0,5-100
	ružmarinska	$y = 26,487x - 2,4296$	0,9998	320	0,5-100
Flavan- 3-oli	katehin	$y = 6,6188x - 1,8432$	0,9998	278	2-100
	epikatehin	$y = 6,934 - 2,0829$	1,0000	278	2-100
Flavonoli	kvercetin	$y = 44,351x - 17,124$	0,9999	370	0,5-100
	kvercetin-3- glukozid	$y = 21,59x - 3,4171$	1,0000	350	0,5-100
	rutin	$y = 16,345x - 0,8389$	0,9997	350	0,5-100
	kempferol	$y = 38,189x - 14,314$	0,9998	370	0,5-100
	kemferol-3-glukozid	$y = 21,443x - 1,4952$	1,000	350	0,5-100
	miricetin	$y = 25,14x - 12,57$	0,9998	370	0,5-100
Flavoni	apigenin	$y = 42,189x - 14,432$	0,9999	350	0,5-100

4 REZULTATI I RASPRAVA

Mahuna graška je otpadni biljni materijal koji zaostaje kao nusproizvod berbe i prerade graška te čini potencijalno vrijednu sekundarnu sirovinu čiji ukupni potencijal nije još dovoljno istražen. Tradicionalna primjena mahune graška uključuje uglavnom prehranu životinja, a danas se sve više istražuju drugi načini valorizacije, kroz fermentacijske i biokonverzijske procese te izravnu i neizravnu primjenu u prehrambenoj industriji. Jedan od takvih inovativnih pristupa je i promatranje agro-industrijskog otpada kao izvora funkcionalnih spojeva, prvenstveno polifenola, kao i razvoj adekvatnih postupaka za njihovo izdvajanje i ponovnu primjenu u razvoju novih funkcionalnih proizvoda. Cilj ovoga rada bio je definirati postupak frakcijskog izdvajanja polifenolnih spojeva iz nekog biljnog materijala s obzirom na njihova iskorištenja u pojedinom koraku te isti primijeniti za određivanje slobodnih, konjugiranih i vezanih polifenolnih spojeva u mahuni graška.

4.1 Stabilnost odabranih polifenolnih spojeva u uvjetima primijenjenog frakcioniranja

U ovome radu razvijen je postupak frakcijskog izdvajanja polifenolnih spojeva prema kojem se mogu odrediti: (i) slobodni topljivi polifenolni spojevi, konjugirani topljivi polifenolni spojevi u obliku (ii) estera i (iii) glikozida te (iv) netopljivi vezani polifenolni spojevi. Ukupni topljivi polifenolni spojevi izdvajaju se ponovljenim ekstrakcijama smjesom otapala metanol-aceton-voda primjenom ultrazvuka i klasičnog miješanja. Iz izvornog ekstrakta se, nakon uklanjanja organske faze, slobodni spojevi izdvajaju ekstrakcijom tekuće-tekuće smjesom otapala dietil eter-etil acetat. Preostala vodena faza podvrgava se prvo alkalnoj, a zatim i kiselinskoj hidrolizi kako bi se oslobodili slobodni polifenoli iz estera i glikozida. Nakon svake hidrolize se slobodni polifenoli izdvajaju i koncentriraju u smjesi otapala dietil eter-etil acetat. Netopljivi vezani polifenoli oslobađaju se alkalnom hidrolizom iz ostatka nakon ekstrakcije ukupnih topljivih polifenola te se potom izdvajaju i koncentriraju ekstrakcijom tekuće-tekuće smjesom pomoću smjese otapala dietil eter-etil acetat. Ovaj općeniti postupak može se primijeniti na različite biljne supstrate, a pritom se u pojedinom koraku mogu varirati specifični parametri, poput sastava otapala, temperature, vremena, koncentracije kiseline i lužine i slično. U ovome radu, za postupak frakcijskog izdvajanja, ispitano je iskorištenje ekstrakcije tekuće-tekuće kao zajedničkog završnog koraka kojim se izdvajaju i koncentriraju slobodni polifenolni spojevi, bilo izvorno slobodni ili oslobođeni nakon hidrolize. Također je ispitano iskorištenje alkalne i kiselinske hidrolize. Za ispitivanje iskorištenja, tj. stabilnosti u

definiranim uvjetima frakcioniranja, u ovome radu odabran je 21 polifenolni spoj, s predstavnicima u podskupinama derivata hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline, flavan-3-ola, flavonola i flavona, pri čemu je definirano 5 spojeva kao modelnih molekula, i to za estere – 2 estera hidroksicimetnih kiselina (klorogenska i ružmarinska kiselina) i glikozide – 2 jednostavna glikozida flavonola (kvercetin-3-glukozid i kemferol-3-glikozid) te 1 složeniji glikozid flavonola (rutin). Ostalih 16 spojeva činili su slobodni polifenoli iz prethodno navedenih podskupina, uključujući, naravno, i slobodne polifenole koji se nalaze u sastavu odabranih modelnih molekula estera i glikozida. Svi odabrani spojevi uspješno se mogu odrediti razvijenom HPLC-DAD metodom, tj. vide se kao zasebni pikovi na kromatogramima (Prilog 1). Snimanje kromatograma provedeno je na nekoliko valnih duljina koje odgovaraju maksimumima apsorpcijskih spektara pojedinih spojeva. Iako se gotovo svi spojevi dobro vide pri 260 nm, snimanje pri višim valnim duljinama omogućuje postizanje selektivnosti za pojedine spojeve, u ovom slučaju to se najviše očituje na primjeru vidljivosti fenolnih kiselina i flavonola.

Rezultati iskorištenja (%) analiziranih polifenolnih spojeva prikazani su u Tablici 4. U ekstrakcijskom koraku ispitan je učinak dodatka natrijevog klorida (NaCl). Prilikom ekstrakcije polifenolnih spojeva iz relativno polarnih otapala u organsko nepolaro otapalo, potrebno je sniziti pH vrijednost (najčešće na vrijednost pH 2) kako bi se većina polifenolnih spojeva nalazila u protoniranom obliku, a time imala i veći afinitet za nepolaru organsku fazu prilikom ekstrakcije tekuće-tekuće. Vrijednost pKa karboksilne skupine fenolnih kiselina iznosi između 4 i 5 (Stalikas, 2007) te se u pravilu pri pH 2 oko 99 % molekula nalazi u protoniranom stanju. Zbog toga je prilikom ekstrakcije slobodnih polifenola iz uparenog izvornog ekstrakta isti zakiseljen dodatkom HCl. Zbog postizanja uniformnosti postupka te praktičnosti, definirana je koncentracija HCl od 0,2 M prije koraka ekstrakcije tekuće-tekuće, što je i više nego dovoljno za postizanje potpune protonacije. Utjecaj dodatka NaCl ili neke druge soli prilikom ekstrakcije tekuće-tekuće očituje se u promjeni (povećanju) koeficijenta raspodjele spojeva koji se ekstrahiraju u organsku fazu (Hyde, 2017), što se naziva i učinkom isoljavanja. Time se pospješuje učinkovitost ekstrakcije tekuće-tekuće kroz brže i lakše odvajanje faza. Ekstrakcija tekuće-tekuće primjenom dietil etera, etil acetata ili njihove kombinacije, vrlo često se provodi prije analiza u svrhu pročišćavanja i koncentriranja željenih spojeva (Stalikas, 2007).

Tablica 4. Prikaz iskorištenja analiziranih polifenolnih spojeva za pojedine korake primijenjenog frakcijskog izdvajanja

Podskupina Naziv spoja	Ekstrakcija tekuće-tekuće Iskorištenje (%)		Alkalna hidroliza Iskorištenje (%)				Kiselinska hidroliza Iskorištenje (%)		
	uz dodatak NaCl	bez NaCl	uz dodatak EDTA+AA	oslobodeni spoj	bez EDTA+AA	oslobodeni spoj	oslobodeni spoj		
Hidroksi- benzojeve kisljine	Galna	103,84±2,20	94,06±2,70	91,91±0,12		0,49±0,00		94,42±2,26	
	Protokatehinska	106,29±2,76	100,41±2,84	96,66±1,88		8,24±0,23		92,63±2,05	
	4-hidroksibenzojeva	106,46±2,71	100,61±2,87	97,61±1,45		110,28±1,08		90,49±2,26	
	Vanilinska	106,06±2,68	100,31±2,78	96,45±1,43		97,94±0,43		89,67±2,67	
	Siringinska	108,17±1,93	101,79±2,83	96,15±2,04		94,71±0,33		90,30±2,19	
Hidroksicimjne kisljine	<i>p</i> -kumarinska	105,88±2,56	98,99±1,36	71,96±4,10		76,33±3,84		37,41±1,89	
	<i>trans</i> -ferulinska	104,25±3,39	97,93±2,09	75,47±4,10		80,56±2,73		39,46±1,07	
	<i>trans</i> -cimetna	104,36±1,93	98,20±2,30	89,72±1,55		91,75±0,52		71,83±1,76	
	Sinapinska	102,21±1,52	99,55±2,32	93,63±2,21		61,21±2,21		29,00±1,95	
	Kafeinska	101,54±5,29	95,27±2,83	102,34±2,84		-		39,81±1,85	
	Ružmarinska	95,40±5,47	91,02±3,93	23,34±0,63	74,91±0,69 ¹	-	- ¹	32,16±2,35	
	Klorogenska	69,70±3,26	51,40±3,84	-	92,75±2,47 ¹	-	- ¹	14,95±1,21	
Flavan- 3-oli	Katehin	91,63±5,84	51,17±3,02	-		-		-	
	Epikatehin	88,95±3,23	47,74±2,29	-		-		-	
Flavonoli	Kvercetin	102,02±3,23	98,56±1,82	63,52±2,65		-		60,10±5,19	
	Kvercetin-3-glukozid	99,35±1,99	78,17±0,45	64,52±2,61	15,31±2,15 ²	5,46±0,09	2,11±0,00 ²	-	27,28±0,81 ²
	Kempferol	105,43±0,00	100,97±2,73	75,45±2,82		-		58,73±2,53	
	Kempferol-3-glukozid	104,12±2,26	90,36±0,56	74,04±1,86	21,60±1,99 ³	77,29±1,16	8,01±0,00 ³	-	75,52±2,61 ³
	Rutin	12,55±0,84	7,55±0,34	6,22±0,45		-		-	51,79±3,61 ²
	Miricetin	78,82±9,51	79,33±9,71	50,94±4,50		-		37,40±3,17	
Flavoni	Apigenin	107,13±1,93	101,67±2,88	87,79±5,89		92,88±0,90		68,93±1,97	

EDTA - etilendiaminotetraoctena kisljina; AA – askorbinska kisljina; ¹oslobodena kafeinska kisljina; ²aglikon kvercetina; ³aglikon kempferola

Iz rezultata (Tablica 4) vidljivo je da se ekstrakcijom tekuće-tekuće smjesom otapala dietil eter-etil acetat postižu vrlo visoka, gotovo teorijska iskorištenja za sve slobodne fenolne kiseline (galna, protokatehinska, 4-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska, *p*-kumarinska, *t*-ferulinska, *t*-cimetna, sinapinska, kafeinska), ali također i za slobodne flavonole (kvercetin, kempferol, miricetin) i flavone (apigenin), neovisno o dodatku NaCl. Drugim riječima, zakiseljavanjem su postignuti dovoljni uvjeti za postizanje visokih iskorištenja ekstrakcije. Katehin i epikatehin iz skupine flavan-3-ola pokazali su najmanje iskorištenje, od približno 50 %, koje se značajno povećalo dodatkom NaCl, do visokih 90 %. Što se tiče modelnih spojeva estera, može se primijetiti da se ružmarinska kiselina (ester kafeinske i 3-(3,4-dihidroksifenil) mliječne kiseline) i klorogenska kiselina (ester kafeinske i kininske kiseline), iako su obje esteri kafeinske kiseline, drugačije ponašaju prilikom ekstrakcije tekuće-tekuće. Ružmarinska kiselina vrlo dobro se ekstrahira u nepolarno otapalo te iskorištenje iznosi najmanje 90 %, neovisno o dodatku NaCl. S druge strane, iskorištenje klorogenske kiseline bilo je relativno nisko, približno 50 %, a dodatkom NaCl došlo je do značajnog povećanja, do približno 70 %. Modelni spojevi konjugata jednostavnih glikozida (kvercetin- i kempferol-3-glukozidi) također su pokazali visoka iskorištenja, približno 80 i 90 % u ekstrakciji bez dodatka NaCl te gotovo 100 % uz dodatak NaCl. Model složenijeg glikozida (rutin – glikozid kvercetina i disaharida rutinoze (6-*O*- α -L-ramnozil-D-glukoza)) pokazao je relativno nisko iskorištenje (oko 10 %) bez obzira na dodatak NaCl prilikom ekstrakcije. Iako je postupkom frakcioniranja, u kojem je ekstrakcija tekuće-tekuće prvi korak kojim se izdvajaju slobodni polifenoli, pretpostavljeno da se konjugirani spojevi zadrže u preostaloj vodenoj fazi nakon ekstrakcije tekuće-tekuće, iz dobivenih rezultata vidljivo je da se neki oblici konjugata estera i glikozida također ekstrahiraju u frakciju slobodnih polifenola, što prvenstveno ovisi o strukturi konjugata. Tako, prema primijenjenoj metodi, u frakciji slobodnih polifenola mogu se izdvojiti i jednostavniji glikozidi (s 1 molekulom šećera) te esteri fenolnih kiselina. S obzirom na ove rezultate, potrebno je postupak frakcioniranja u ovoj fazi prilagoditi, ili pak provesti naknadnu hidrolizu frakcije slobodnih polifenola kako bismo bili sigurni da u frakciji dominiraju slobodni polifenolni spojevi. Dodatak NaCl rezultirao je povećanjem udjela ukupnih polifenola te pojedinačnih polifenolnih spojeva iz maslinovog ulja (Perez i sur., 2008).

U koraku alkalne hidrolize, istražen je utjecaj dodatka metalnog kelatora - EDTA i snažnog antioksidansa - askorbinske kiseline kao zaštitnih agensa za sprječavanje degradacije polifenola u alkalnom mediju (Nardini i sur., 2002). Iz rezultata (Tablica 4) je vidljiv značajan

ili potpuni gubitak nekih polifenola tijekom alkalne hidrolize bez dodatka EDTA i askorbinske kiseline. Iz skupine derivata hidroksibenzojeve kiseline, 4-hidroksibenzojeva, vanilinska i siringinska kiselina su pokazale potpunu stabilnost u lužnatom mediju, što se održalo i prilikom hidrolize uz dodatak EDTA i askorbinske kiseline. Za ovu skupinu se protektivni učinak najviše očituje kod galne i protokatehinske kiseline za koje je određeno vrlo visoko iskorištenje uz dodatak EDTA i askorbinske kiseline (najmanje približno 92 %), u odnosu na gotovo potpunu degradaciju primjenom samo lužine. Predstavnici skupine hidroksicimne kiseline: *p*-kumarinska, *t*-ferulinska, sinapinska i *t*-cimetna kiselina, pokazali su relativno dobru stabilnost u lužnatom mediju, s iskorištenjima u rasponu približno 61 (sinapinska) – 81 % (*t*-cimetna). Osim za sinapinsku kiselinu, čije je iskorištenje znatno povećano dodatkom EDTA i askorbinske kiseline (94 %), za ostale spojeve dodatak istih nije imao učinka. Najveće promjene u stabilnosti prilikom alkalne hidrolize, za hidroksicimne kiseline, očituju se na kafeinskoj kiselini i njezinim derivatima: ružmarinskoj i klorogenskoj kiselini. Sva 3 navedena spoja u potpunosti se degradiraju prilikom alkalne hidrolize bez dodatka EDTA i askorbinske kiseline, a također je i oslobođena kafeinska kiselina iz estera bila u potpunosti degradirana. Dodatak EDTA i askorbinske kiseline omogućio je potpuno očuvanje kafeinske kiseline u uvjetima alkalne hidrolize. Pri istim uvjetima, klorogenska kiselina bila je u potpunosti deesterificirana, a iskorištenje oslobođene kafeinske kiseline bilo je vrlo visoko (približno 93 %). Ružmarinska kiselina je pokazala nešto jaču otpornost prema hidrolizi te je preostalo približno 23 % ovog spoja u izvornom obliku, dok je iskorištenje oslobođene kafeinske kiseline (iz hidrolizirane ružmarinske kiseline) iznosilo približno 75 %. Vrlo visoko iskorištenje, tj. potpuno očuvanje strukture kafeinske kiseline prilikom alkalne hidrolize uz dodatak EDTA (10 mM) i askorbinske kiseline (1 %, w/v) određeno je i u radu Nardini i sur. (2002). Predstavnici skupine flavan-3-ola, katehin i epikatehin se u potpunosti degradiraju u uvjetima alkalne hidrolize, bez obzira na dodatak EDTA i askorbinske kiseline. Predstavnici flavanola, osim kempferol-3-glukozida (iskorištenje približno 77 %), također su pokazali nestabilnost pri uvjetima alkalne hidrolize, a pritom su i oslobođeni aglikoni također pokazali niska iskorištenja. Dodatkom EDTA i askorbinske kiseline, vidljiv je znatan porast iskorištenja flavanola te iznosi između približno 50 i 75 %, uz iznimku rutina (približno 6 %, što se pripisuje niskom iskorištenju same ekstrakcije te protektivni učinak zapravo i nije vidljiv) te oslobođenih aglikona. Iskorištenje apigenina (predstavnik flavona u ovome radu) u uvjetima alkalne hidrolize iznosilo je približno 90 %, neovisno o dodatku EDTA i askorbinske kiseline. U uvjetima kiselinske hidrolize, visoko iskorištenje postignuto je za predstavnike derivata hidroksibenzojeve kiseline (približno 90- 95 %), dok su predstavnici

derivata hidroksicimetne kiseline manje stabilni, u prosjeku je iskorištenje iznosilo 30-40 %, s iznimkama *t*-cimetne kiseline (približno 72 %) i klorogenske kiseline (približno 15 %). Oslobođena kafeinska kiselina iz ružmarinske i klorogenske kiseline također je pokazala relativno nisko iskorištenje (približno 40 %). Iskorištenja monomernih flavonola iznosila su približno 60 % za kvercetin i kempferol te približno 37 % za miricetin. Svi analizirani glikozidi su bili u potpunosti hidrolizirani, a iskorištenje oslobođenog aglikona kvercetina iznosilo je približno 27 % za kvercetin-3-glukozid te približno 52 % za rutin, dok je iskorištenje aglikona kempferola bilo relativno visoko te je iznosilo približno 76 %. Ako se usporede iskorištenja kvercetina u izvornom obliku te u obliku oslobođenog aglikona, može se primijetiti da stabilnost tog spoja ovisi o njegovom izvornom obliku, pri čemu je više podložan degradaciji ako se ishodno nalazi u glikoziliranom obliku. Iskorištenje flavona apigenina za uvjete kiselinske hidrolize iznosilo je približno 70 %.

S obzirom na dobivena iskorištenja pojedinih polifenolnih spojeva, postupak frakcioniranja definiran je na način da se prilikom izdvajanja frakcije slobodnih polifenola ekstrakcija tekuće-tekuće provodi uz dodatak NaCl, a alkalna hidroliza uz dodatak EDTA i askorbinske kiseline. S obzirom na nešto veću stabilnost istraživanih spojeva u uvjetima alkalne hidrolize, poželjno je da se ona provodi prva, a nakon nje kiselinska hidroliza. Najveći gubitci tijekom ukupnog postupka frakcioniranja očekuju se za glikozide polifenola s obzirom da nije moguće u potpunosti očuvati njihovu stabilnost tijekom alkalne hidrolize, a i tijekom kiselinske hidrolize dolazi do određenog stupnja degradacije oslobođenih aglikona.

4.2 Kvalitativni i kvantitativni profil polifenolnih spojeva izdvojenih iz mahune graška primjenom postupka frakcioniranja

Mahuna graška predstavlja značajnu količinu agro-industrijskog otpada koji nastaje prilikom prerade graška u primarnim fazama tj. izdvajanjem zelenih zrna iz mahune (Ruda i sur., 2020). Mahuna graška je potencijalno vrijedna sekundarna sirovina bogata nutritivno vrijednim i funkcionalnim sastojcima, poput prehrambenih vlakana i bioaktivnih spojeva (Mejri i sur., 2019; Vojvodić i sur., 2016). Prema dostupnim literaturnim podacima, mahuna graška posjeduje određena antioksidacijska svojstva (Mejri i sur., 2019) te je dobar izvor polifenolnih spojeva (Babbar i sur., 2002), no kvalitativni i kvantitativni podaci o pojedinačnim polifenolnim spojevima su prilično limitirani. S ciljem detaljne karakterizacije polifenolnih spojeva prisutnih u mahuni graška, primijenjen je definirani postupak frakcioniranja. Provedenim postupkom izdvojene su ukupno 4 polifenolne frakcije: (i) slobodni polifenoli (PP_SP), (ii) esterificirani polifenoli (PP_A), (iii) glikozilirani polifenoli (PP_K) i (iv) (netopljivi) vezani polifenoli (PP_NVP). Analizom uparenog izvornog ekstrakta dobiveni su kromatogrami na kojima se ističu 3 pika (Prilog 2) koji prema svojim retencijama i UV-VIS spektrima ne odgovaraju niti jednom od standarda korištenih prilikom uspostavljanja HPLC-DAD metode i određivanja njihove stabilnosti u uvjetima frakcioniranja. Maksimumi ova 3 pika u UV-VIS području postignuti su pri približno 320, 350 i 360 nm (Prilog 2), a svojim oblikom (u odnosu na analizirane dostupne standarde) potencijalno odgovaraju fenolnim kiselinama ili flavonoidima – flavonolima, odnosno konjugatima istih. Promatrajući frakciju slobodnih polifenola mahune graška (Prilog 3), odmah se može uočiti da dominantnih pikova, prisutnih u izvornom ekstraktu, nema, što navodi na zaključak da se radi o složenijim konjugatima koji su zaostali u vodenoj fazi nakon izdvajanja frakcije slobodnih polifenola. Nakon alkalne i kiselinske hidrolize preostale vodene faze, na kromatogramima izdvojenih frakcija esterificiranih (Prilog 4) polifenola i glikoziliranih polifenola mahune graška (Prilog 5) vidljivi su pikovi od kojih je neke bilo moguće identificirati s obzirom na dostupne standarde. Ukupni polifenoli gotovo u potpunosti pripadaju topljivim spojevima budući da u frakciji vezanih spojeva gotovo da i nije bilo pikova na kromatogramima (Prilog 6).

Na temelju HPLC-DAD analize, u izdvojenim polifenolnim frakcijama mahune graška identificirano je ukupno 8 polifenolnih spojeva, iz skupine derivata hidroksibenzojeve kiseline: protokatehinska i 4-hidroksibenzojeva kiselina, iz skupine derivata hidroksicimetne kiseline: *p*-kumarinska, *t*-ferulinska, sinapinska i kafeinska te iz skupine flavonola: kvercetin i

kvercetin-3-glukozid (Prilozi 3-6). Udjeli navedenih spojeva, izraženi kao masa identificiranog spoja (μg) po masi suhe tvari mahune graška ($\text{g}_{\text{s.tv.}}$), prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Udjeli pojedinih polifenolnih spojeva određenih u frakcijama pripremljenima iz izvornog ekstrakta mahune graška te ostatka nakon ekstrakcije

Naziv spoja	Polifenolna frakcija			
	$\mu\text{g g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$			
	PP_SP	PP_A	PP_K	PP_NVP
Protokatehinska	1,12±0,03	-	-	-
4-hidroksibenzojeva	8,48±0,02	-	-	-
<i>p</i>-kumarinska	9,62±0,09	207,08±5,57	-	13,40±0,57
<i>trans</i>-ferulinska	2,13±0,05	37,05±1,03	-	5,04±0,03
Sinapinska	1,37±0,06	158,24±7,66	-	7,82±0,11
Kafeinska	-	7,38±0,49	-	-
Kvercetin	-	-	103,08±3,20	-
Kvercetin-3-glukozid	5,50±0,16	-	-	-

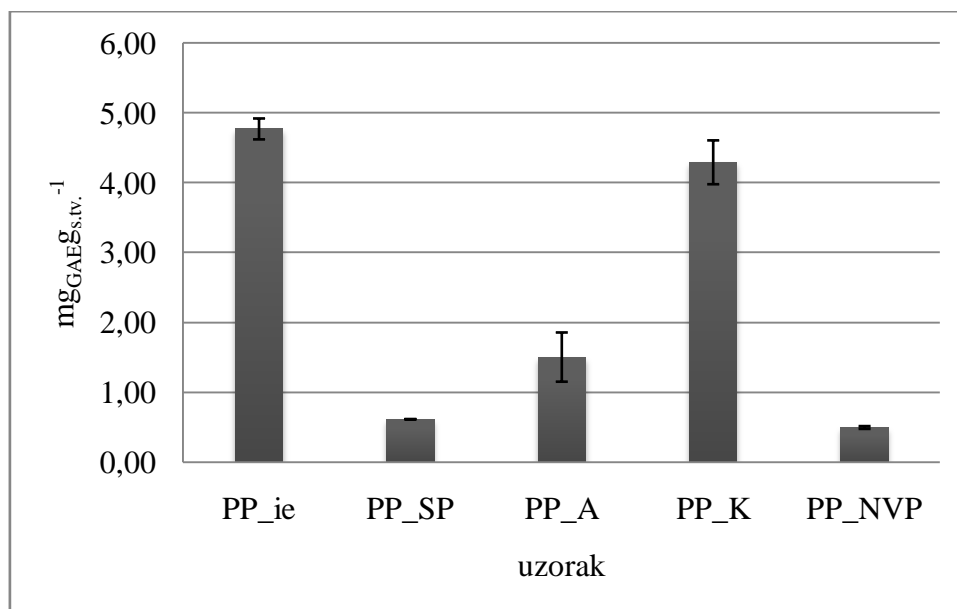
PP_ie - izvorni ekstrakt; PP_SP - frakcija slobodnih polifenola; PP_A - frakcija esterificiranih polifenola; PP_K - frakcija glikoliziranih polifenola; PP_NVP - frakcija (netopljivih) vezanih polifenola

U frakciji slobodnih polifenola identificirano je 6 polifenolnih spojeva. Od fenolnih kiselina određene su: protokatehinska, 4-hidroksibenzojeva, *p*-kumarinska, *t*-ferulinska i sinapinska kiselina, a od flavonoida kvercetin-3-glukozid. Iz rezultata je vidljiva najveća zastupljenost fenolnih kiselina, odnosno *p*-kumarinske ($9,62\pm 0,09 \mu\text{g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) i 4-hidroksibenzojeve ($8,48\pm 0,02 \mu\text{g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$). U frakciji esterificiranih polifenola određeni su isključivo spojevi iz skupine derivata hidroksicimetnih kiselina: *p*-kumarinska, *t*-ferulinska, sinapinska i kafeinska kiselina, među kojima dominiraju *p*-kumarinska kiselina ($207,08\pm 5,57 \mu\text{g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) i sinapinska kiselina ($158,24\pm 7,66 \mu\text{g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$). U frakciji glikoziliranih polifenola izdvojio se pik kvercetina ($103,08\pm 3,20 \mu\text{g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$), dok su u frakciji vezanih polifenola u vrlo niskom udjelu prisutne hidroksicimetne kiseline: *p*-kumarinska, *t*-ferulinska i sinapinska. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da se polifenoli u mahuni graška prisutni dominantno u konjugiranom obliku, kao esteri hidroksicimetnih kiselina, prvenstveno *p*-kumarinske i sinapinske kiseline, i flavonola koji potencijalno odgovaraju najizraženijim pikovima na kromatogramima uparenog izvornog ekstrakta (Prilog 2). Prema dostupnoj literaturi, Mejri i sur. (2019) su u metanolnom ekstraktu mahune graška HPLC-PDA-ESI-MS/MS metodom

(tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti uz PDA (fotodiode u nizu) detekciju i tandemsku masenu spektrometriju uz ionizaciju elektroraspršenjem) identificirali 15 različitih polifenolnih spojeva koji uključuju 5 fenolnih kiselina i njihovih derivata, 6 flavonol-glikozida, 2 flavan-3-ola, 1 flavon-glikozid te 1 antocijan, što je u skladu s rezultatima dobivenima u ovome radu. Analiza HPLC-DAD metodom izvornih ekstrakata ograničena je dostupnošću čistih standarda potrebnih za identifikaciju i stoga analize nedovoljno istraženih biljnih supstrata mogu biti otežane, pogotovo ako se radi o konjugiranim oblicima ili derivatima polifenola. Primjena semi-selektivnih ekstrakcija u kombinaciji s kiselinskim i alkalnim hidrolizama značajno može pomoći u identifikaciji polifenola iz biljnih materijala budući da se kompleksniji polifenolni oblici, poput konjugata, neposredno određuju preko oslobođenih slobodnih polifenolnih spojeva. U nedostatku sofisticiranije detekcijske tehnike, poput masene spektrometrije, ovakav pristup uvelike sužava izbor potencijalnih konjugiranih spojeva – kandidata za neki neidentificirani pik na kromatogramu, ili pak ovakva analiza može biti sama po sebi dovoljna, ovisno o zahtjevima preciznosti i specifičnosti za kvalitativni profil. S obzirom na kvantitativne gubitke koji se događaju prilikom alkalnih i kiselinskih hidroliza, pristup identifikacije polifenola postupkom frakcioniranja nije naročito precizan u kvantitativnom smislu, a dobivene rezultate za konjugirane spojeve najbolje je interpretirati kao udjele ekvivalenata slobodnih polifenola. U tom smislu, mahuna graška najbogatija je fenolnim kiselinama, predominantno u esterificiranom obliku, u udjelima od najmanje približno 200 $\mu\text{g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$ ekvivalenata *p*-kumarinske kiseline te približno 160 $\mu\text{g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$ ekvivalenata sinapinske kiseline, a zatim i glikoziliranim flavonolima u udjelu od najmanje približno 100 $\mu\text{g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$ ekvivalenata kvercetina.

4.3 Udjeli ukupnih polifenola te antioksidacijski kapacitet polifenolnih frakcija izdvojenih iz mahune graška

U polifenolnim frakcijama izdvojenima iz mahune graška određen je udio ukupnih polifenola (Slika 8) i antioksidacijski kapacitet pomoću ABTS i DPPH metoda (Slika 9).



Slika 8. Udjel ukupnih polifenola u polifenolnim frakcijama izdvojenima iz mahune graška

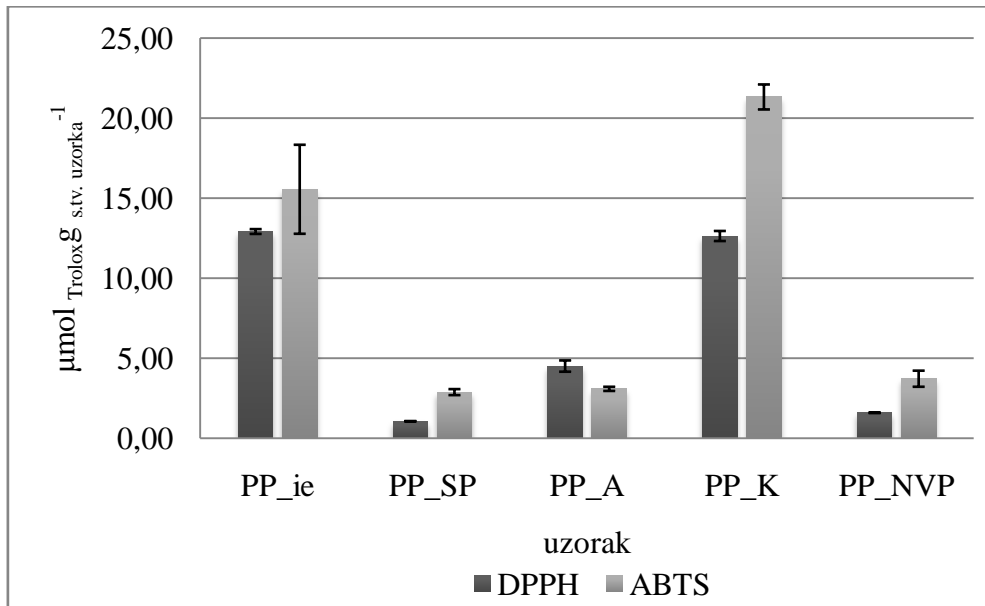
Najveći udio ukupnih polifenola određen je u izvornom uparenom ekstraktu (PP_ie) ($4,77 \pm 0,15 \text{ mg}_{\text{GAEs.tiv.}}^{-1}$), koji predstavlja udio ukupnih topljivih polifenola, dok je najmanji udio određen u frakciji vezanih polifenola (PP_NVP) ($0,49 \pm 0,02 \text{ mg}_{\text{GAEs.tiv.}}^{-1}$), a vrlo slično i u frakciji slobodnih polifenola. Dobiveni rezultati su u skladu s HPLC-DAD analizom koja je pokazala da se većina polifenolnih spojeva mahune graška nalazi u topljivom (ekstraktabilnom) obliku. U frakciji glikoziliranih polifenola (PP_K) određeno je približno 2,5 puta više ukupnih polifenola nego u frakciji esterificiranih spojeva (PP_A), što može ukazivati na značajniju prisutnost spojeva u frakciji glikozida koji nisu mogli biti identificirani, ali također može biti rezultat i drugačijeg odziva spektrofotometrijske metode za ukupne polifenole s obzirom na pojedine standarde, tj. metoda je potencijalno osjetljivija (daje veći odziv) za flavonole nego za fenolne kiseline. Jednako tako, prisutnost različitih drugih spojeva, nativno prisutnih ili degradativnih produkata hidrolize, može interferirati u reakciji s Folin-Ciocalteu reagensom. EDTA i askorbinska kiselina značajno mogu interferirati prilikom određivanja ukupnih polifenola (Lester i sur., 2012) i stoga su za frakcije esterificiranih i vezanih polifenola pripremljene posebne slijepe probe (kako je opisano u

poglavlju 3.2.3.1) kako bi se potencijalne interferencije pokušale uračunati u izračun konačnih rezultata.

S obzirom da je za tako definirane slijepe probe dobiveno karakteristično plavo obojenje u reakciji s Folin-Ciocalteu reagensom, zaključuje se da se EDTA i askorbinska kiselina (pojedinačno ili zajedno) djelomično ekstrahiraju prilikom ekstrakcije tekuće-tekuće pomoću dietil etera-etil acetata.

Rezultati dobiveni u ovome radu su u skladu s rezultatima Pinchao-Pinchao i sur. (2019) koji su odredili udio ukupnih polifenola od $3,98 \pm 0,012$ i $5,66 \pm 0,15$ $\text{mg}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$ u etanolnom ekstraktu dobivenom ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom iz liofiliziranih mahuna graška. U radu Babbar i sur. (2012) udio ukupnih polifenola u metanolnom ekstraktu mahune graška iznosio je $13,6 \pm 0,20$ $\text{mg}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$, značajno više nego u ovome radu, što se može pripisati različitostima u samim uzorcima, ali i primijenjenoj analitičkoj metodi.

Osim udjela ukupnih polifenola, izdvojenim polifenolnim frakcijama određen je i antioksidacijski kapacitet primjenom metoda gašenja slobodnih radikala (DPPH i ABTS) (Slika 9).



Slika 9. Antioksidacijski kapacitet polifenolnih frakcija izdvojenih iz mahune graška

Rezultati antioksidacijskog kapaciteta uglavnom prate trend udjela ukupnih polifenola, s manjim razlikama u primjeni 2 slobodna radikala. Najviši antioksidacijski kapacitet prema DPPH metodi određen je u uparenom izvornom ekstraktu (PP_ie) ($12,91 \pm 0,02$

$\mu\text{mol}_{\text{Troloxg.s.tv.uzorka}^{-1}}$), dok kod polifenolnih frakcija u frakciji glikozida polifenola (PP_K) ($12,63 \pm 0,68 \mu\text{mol}_{\text{Troloxg.s.tv.uzorka}^{-1}}$). Najmanje DPPH vrijednosti određene su u frakcijama slobodnih i vezanih polifenola (manje od približno $1,5 \mu\text{mol}_{\text{Troloxg.s.tv.uzorka}^{-1}}$). Prema ABTS metodi, najveći antioksidacijski kapacitet određen je u frakciji glikoliziranih polifenola (PP_K) ($21,32 \pm 0,78 \mu\text{mol}_{\text{Troloxg.s.tv.uzorka}^{-1}}$), a zatim slijedi izvorni ekstrakt (PP_ie) ($15,55 \pm 2,78 \mu\text{mol}_{\text{Troloxg.s.tv.uzorka}^{-1}}$), dok su u frakciji slobodnih polifenola određene najmanje vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom ($2,88 \pm 0,19 \mu\text{mol}_{\text{Troloxg.s.tv.uzorka}^{-1}}$). Različiti poredak vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta polifenolnih frakcija primjenom dvije metode može se pripisati različitim mehanizmima reakcije (Perez-Jimenez i sur., 2008). U radu Mejri i sur. (2019) određen je relativno nizak antioksidacijski kapacitet ekstrakta mahune graška, što je povezano s udjelom glikoliziranih flavonoida koji potencijalno iskazuju niži antioksidacijski kapacitet u odnosu na aglikone.

S obzirom na rezultate HPLC-DAD analize, udjele ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet, mahuna graška može se promatrati kao dobar izvor konjugiranih polifenolnih spojeva s potencijalno značajnim antioksidacijskim kapacitetom. Dobiveni rezultati predstavljaju izvrsnu podlogu za daljnja istraživanja usmjerena na identifikaciju ostalih polifenola prisutnih u mahuni graška, kao i metode njihove što uspješnije ekstrakcije, što proširuje kontekst ponovne primjene mahune graška za izdvajanje sastojaka s dodanom vrijednošću.

5 ZAKLJUČCI

S obzirom na rezultate dobivene u ovome radu, izvode se sljedeći zaključci:

1. U fazi izdvajanja slobodnih polifenola iz zakiseljenog vodenog ekstrakta primjenom ekstrakcije tekuće-tekuće, u postupku frakcioniranja polifenola provedenom na čistim odabranim standardima, dodatak NaCl u konačnoj koncentraciji 2 M najviše se očituje u povećanju iskorištenja monomernih flavan-3-ola (katehina – 91,63 % i epikatehina – 88,95 %), dok se za ostale analizirane spojeve visoka iskorištenja postižu i bez dodatka NaCl.
2. U fazi izdvajanja slobodnih polifenola iz zakiseljenog vodenog ekstrakta primjenom ekstrakcije tekuće-tekuće, u postupku frakcioniranja polifenola provedenom na čistim odabranim standardima, modelni konjugirani polifenolni spojevi: jednostavni glikozidi (monoglukozidi) flavonola kvercetina i kempferola te esteri kafeinske kiseline (ružmarinska i klorogenska kiselina), uspješno se ekstrahiraju u organsku fazu, pri čemu je najmanje iskorištenje određeno za klorogensku kiselinu (50 %) i povećava se uz dodatak NaCl, dok za ostale spojeve iznosi najmanje 80 %, neovisno o dodatku NaCl, što nije u skladu s pretpostavkom postupka frakcioniranja.
3. Složeniji glikozid kvercetina rutin, uglavnom zaostaje u vodenoj fazi prilikom ekstrakcije tekuće-tekuće (iskorištenje približno 10 %), što je u skladu s pretpostavkom postupka frakcioniranja polifenolnih spojeva u fazi izdvajanja frakcije slobodnih polifenola.
4. Dodatak EDTA i askorbinske kiseline prilikom alkalne hidrolize značajno utječe na očuvanje stabilnosti ispitivanih polifenolnih spojeva, što je posebice važno za konjugirane polifenole i odgovarajuće polifenolne spojeve koji se oslobađaju njihovom hidrolizom, a u kontekstu ovoga rada vidljivo najviše na primjeru kafeinske kiseline i njezinih derivata (ružmarinska i klorogenska), koje se u potpunosti degradiraju u uvjetima alkalne hidrolize bez dodatka EDTA i askorbinske kiseline.
5. Alkalnom hidrolizom uz dodatak EDTA i askorbinske kiseline, pri definiranim uvjetima, kvantitativno se hidrolizira klorogenska kiselina, uz iskorištenje oslobođene kafeinske kiseline od približno 93 %, dok se u slučaju ružmarinske kiseline hidroliziralo približno 86 % početne koncentracije, s iskorištenjem oslobođene kafeinske kiseline od približno 75 %. Pri istim uvjetima monoglukozidi kvercetina i kempferola pokazali su zadovoljavajuću stabilnost (iskorištenje najmanje 65 %), dok

se o stabilnosti rutina ne može zaključiti zbog niskog iskorištenja uvjetovanog samom ekstrakcijom tekuće-tekuće.

6. U primijenjenim uvjetima kiselinske hidrolize dolazi do kvantitativne hidrolize kvercetin-3-glukozida, rutina i kempferol-3-glukozida, uz iskorištenja oslobođenih aglikona kvercetina od približno 28 % (iz monoglukozida) i 52 % (iz rutina) te aglikona kempferola od približno 76 %.
7. Polifenoli mahune graška dominantno se nalaze u obliku topljivih konjugata, i to kao esteri *p*-kumarinske kiseline, s udjelom od najmanje $207,08 \pm 5,57 \mu\text{g}_{\text{ekvivalenata } p\text{-kumarinske kiseline g}_{\text{s.tv.}}^{-1}}$ te esteri sinapinske kiseline, s udjelom od najmanje $158,24 \pm 7,66 \mu\text{g}_{\text{ekvivalenata sinapinske kiseline g}_{\text{s.tv.}}^{-1}}$, a zatim i kao glikozidi kvercetina, s udjelom od najmanje $103,08 \pm 3,02 \mu\text{g}_{\text{ekvivalenata kvercetina g}_{\text{s.tv.}}^{-1}}$, dok je zastupljenost topljivih slobodnih i netopljivih vezanih polifenola vrlo niska i odnosi se uglavnom na fenolne kiseline.
8. Postupak frakcioniranja, u slučaju mahune graška, uvelike je olakšao djelomičnu identifikaciju polifenolnih spojeva s obzirom da u izvornom ekstraktu nije bilo moguće identificirati dominantne pikove budući na dostupan način detekcije kao i čiste standarde.
9. Analizom udjela ukupnih polifenola, najviše vrijednosti određene su u frakciji glikoziliranih polifenola ($4,29 \pm 0,31 \text{ mg}_{\text{GAE g}_{\text{s.tv.}}^{-1}}$), vrlo blisko udjelu ukupnih polifenola u koncentriranom izvornom ekstraktu ($4,77 \pm 0,15 \text{ mg}_{\text{GAE g}_{\text{s.tv.}}^{-1}}$), što je bilo praćeno i najvišim vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta, u frakciji glikoziliranih polifenola - $12,63 \pm 0,68 \mu\text{mol}_{\text{Trolox g}_{\text{s.tv.}}^{-1}}$ (DPPH) i $21,32 \pm 0,78 \mu\text{mol}_{\text{Trolox g}_{\text{s.tv.}}^{-1}}$ (ABTS), odnosno u koncentriranom izvornom ekstraktu - $12,91 \pm 0,02 \mu\text{mol}_{\text{Trolox g}_{\text{s.tv.}}^{-1}}$ (DPPH) i $15,55 \pm 2,78 \mu\text{mol}_{\text{Trolox g}_{\text{s.tv.}}^{-1}}$ (ABTS).
10. Mahuna graška može se smatrati relativno dobrim izvorom polifenola, čime se proširuje spektar njezine primjene u kontekstu valorizacije i nastanka proizvoda dodane vrijednosti.

6 LITERATURA

- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serna-Saldívar, S. O. (2014) Bound phenolics in foods, a review. *Food Chem.* **152**, 46–55.
- Adom, K. K., Liu, R. H. (2002) Antioxidant Activity of Grains. *Journal of Agricultural and Food Chem.* **50**(21), 6182–6187.
- Angel Siles Lopez, J., Li, Q., Thompson, I. P. (2010). Biorefinery of waste orange peel. *Crit. Rev. Biotechnol.* **30**(1), 63–69.
- Anonymus 1. <<https://gospodarski.hr/rubrike/agroekonomika/grasak-zasto-ga-proizvoditi/>> Pristupljeno: 17. kolovoza 2020.
- Arruda, H. S., Pereira, G. A., de Moraes, D. R., Eberlin, M. N., Pastore, G. M. (2018) Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. *Food Chem.* **245**, 738–749.
- Azani i sur. (2017) A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny: The Legume Phylogeny Working Group (LPWG) *Taxon* **66**(1), 44–77.
- Babbar, N., Oberoi, H. S., Sandhu, S. K., Bhargav, V. K. (2012) Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residues and their evaluation as natural sources of antioxidants. *J. Food Sci. Technol.* **51**(10), 2568–2575.
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., Komes, D. (2018) Overview of polyphenols and their properties. U: *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*, 1. izd. (Galanakis, C., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 3–44.
- Belščak-Cvitanović, A., Stanojević, R., Manojlović, V., Komes, D., Juranović Cindrić, I., Nedović, V., Bugarski, B. (2011) Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Res. Int.* **44**, 1094–1101.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT* **28**, 25–30.

- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317–333.
- Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., Bren, U. (2016) Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules* **21**(7), 901.
- Bueno-Herrera, M., Perez-Magarino, S. (2020) Validation of an extraction method for the quantification of soluble free and insoluble bound phenolic compounds in wheat by HPLC-DAD. *J. Cereal Sci.* **93**, 102984.
- Chew, Y.-L., Goh, J.-K., Lim, Y.-Y. (2009) Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from *Leguminosae* family in Peninsular Malaysia. *Food Chem.* **116**(1), 13–18.
- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., Mattei, J. (2018) The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review. *Front. Nutr.* **5**, 87.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovanni, C., Masella, R. (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita* **43**, 348–361.
- Da Silva, A. C., Jorge, N. (2014) Bioactive compounds of the lipid fractions of agro-industrial waste. *Food Res. Int.* **66**, 493–500.
- De Corato, U., Cancellara, F. A. (2019) Measures, technologies, and incentives for cleaning the minimally processed fruits and vegetables supply chain in the Italian food industry. *J. Clean. Prod.* **237**, 117735.
- Duthie, G.G., Gardner, P.T., Kyle, J. A. M. (2003) Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc. Nutr. Soc.* **62**, 599–603.
- Erbersdobler, H.F., Barth, C.A., Jahreis, G. (2017) Legumes in human nutrition. Nutrient content and protein quality of pulses. *Ernahrungs Umschau* **64**(9), 134–139.
- Escarpa, A., Gonzalez, M. C. (2001). An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **31**(2), 57–139.

Es-Safi, N.-E., Cheynier, V., Moutounet, M. (2003) Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties. *J. Food Compos. Anal.* **16**(5), 535–553.

FAO (2020) The state of food and agriculture. FAO- Food and Agriculture Organization of the United States. <<http://www.fao.org/state-of-food-agriculture/2019/en/>> Pristupljeno: 27.srpnja 2020.

FAOSTAT (2020) Food and Agriculture Organization of the United States<<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Pristupljeno: 20.kolovoza 2020.

Gabriele D'Andrea (2015) Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?. *Fitoterapia* **106**, 256-271.

Galanakis, C. M. (2012) Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends Food Sci. Tech.* **26**, 68-87.

Gonzalez-Saiz, J.-M., Esteban-Diez, I., Rodriguez-Tecedor, S., Pizarro, 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**(4), 776–787.

Hyde, A. M., Zultansky, S. L., Waldman, J. H., Zhong, Y.-L., Shevlin, M., Peng, F. (2017) General principles and strategies for salting-out informed by the Hofmeister series. *Org. Process Res. Dev.* **9**, 1355-1370.

Kammerer, D. R., Kammerer, J., Valet, R., Carle, R. (2014) Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and application as valuable food ingredients. *Food Res. Int.* **65**, 2–12.

Korys, K. A., Latawiec, A. E., Grotkiewicz, K., Kuboń, M. (2019) The review of biomass potential for agricultural biogas production in Poland. *Sustainability* **11**(22), 6515.

Lafay, S., Gil-Izquierdo, A. (2007) Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem. Rev.* **7**(2), 301–311.

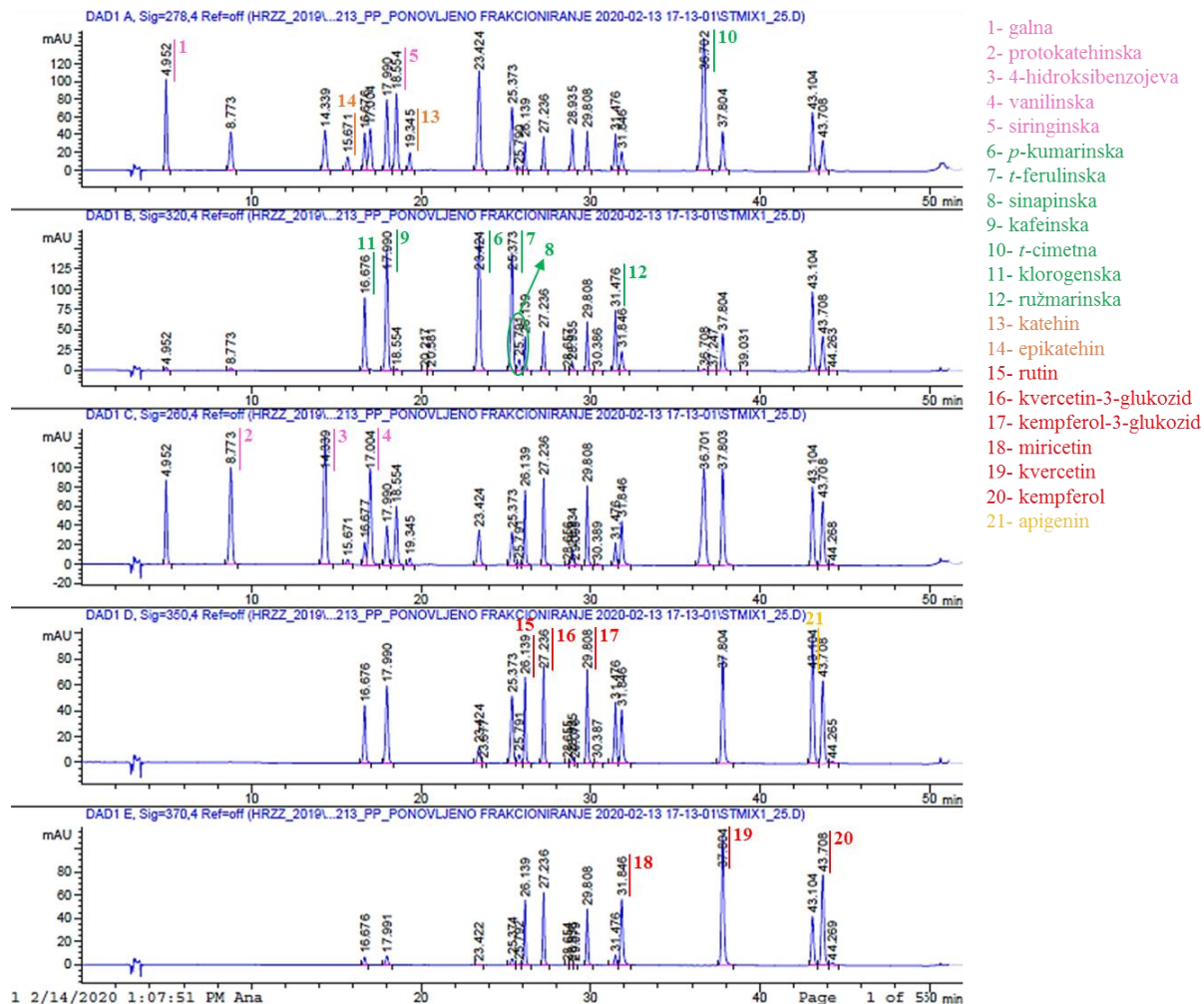
Lakhanpal, P., Kumar Rai, D. (2007) Quercetin: A versatile flavonoid. *Internet J.Med. Update* **2**, doi:10.4314/ijmu.v2i2.39851.

- Laufenberg, G., Kunz, B., Nystroem, M. (2003) Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresour. Technol.* **87**, 167-198.
- Lester, G. E., Lewers, K. S., Medina, M. B., Saftner, R. A. (2012) Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *J Food Compos. Anal.* **27**(1), 102–107.
- Liyana-Pathirana, C. M., Shahidi, F. (2006) Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. *J. Agr. Food Chem.* **54**(4), 1256–1264.
- Lobo, M.G., Dorta, E. (2019) Utilization and Management of Horticultural Waste. U: *Postharvest Technology of Perishable Horticultural Commodities* (Yahia, E. M., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 661-662.
- Luzardo-Ocampo, I., Cuellar-Nuñez, M. L., Oomah, B. D., Loarca-Piña, G. (2019) Pulse by-products. U: *Food Wastes and By-products: Nutraceutical and Health Potential* (Campos-Vega, R., Oomah, B. D., Vergara-Castaneda, H. A., ured.), John Wiley & Sons Ltd., New Jersey, str. 59–92.
- Mejri, F., Ben Khoud, H., Njim, L., Baati, T., Selmi, S., Martins, A., Hosni, K. (2019) *In vitro* and *in vivo* biological properties of pea pods (*Pisum sativum* L.). *Food Biosci.* **32**, 100482.
- Mourtzinis, I., Goula, A. (2019) Polyphenols in Agricultural Byproducts and Food Waste. U: *Polyphenols in Plants*, 2.izd. [online] (Watson, R. R., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 23–44.
- 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., ur., ISBN: 978-953-51-0253-3, InTech, <http://www.intechopen.com/books/industrial-waste/use-of-agro-industrial-wastes-in-solid-state-fermentation-processes> Pristupljeno 20. kolovoza 2020.
- Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., Mencarelli, D, Comisso, A., Scaccini, C. (2002) Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chem.* **79**(1), 119–124.

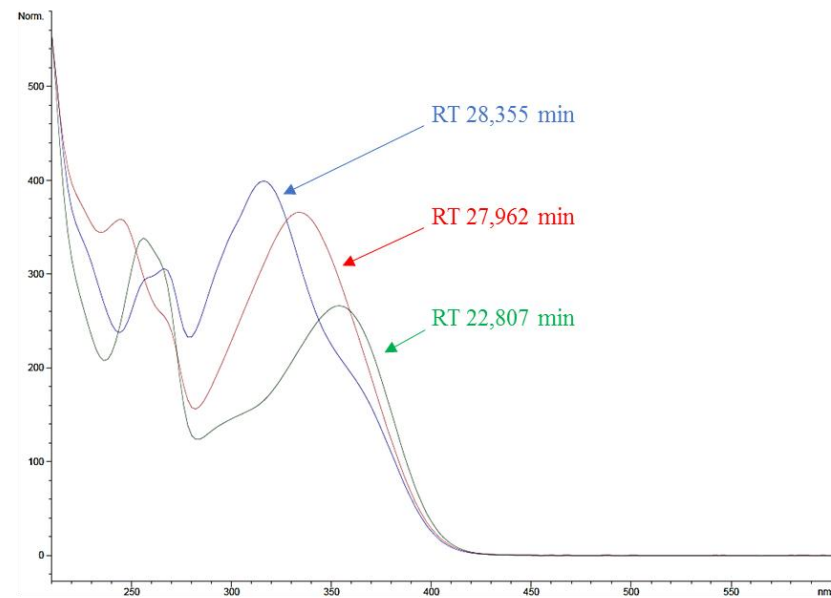
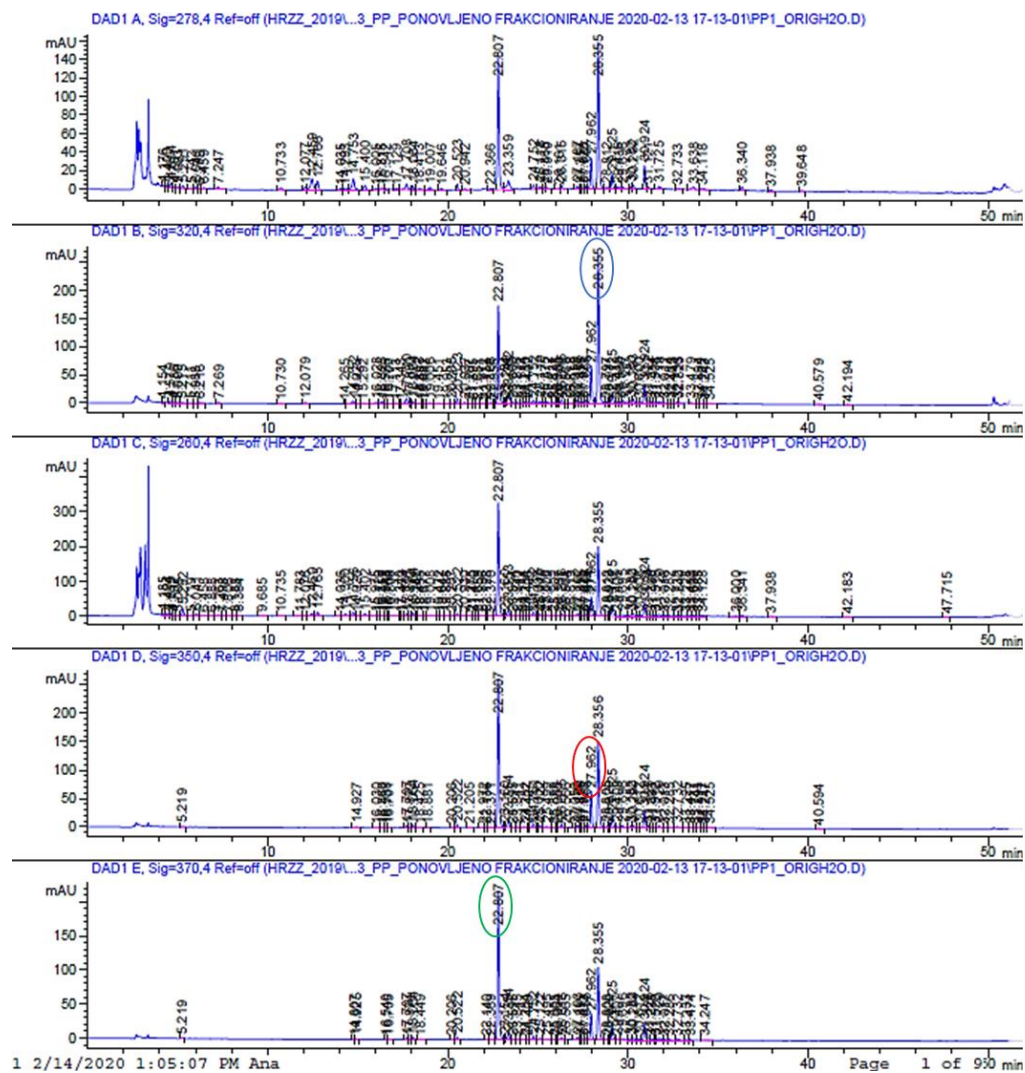
- Naziri, E., Nenadis, N., Mantzouridou, F. T., Tsimidou, M. Z. (2014) Valorization of the major agrifood industrial by-products and waste from Central Macedonia (Greece) for the recovery of compounds for food applications. *Food Res. Int.* **65**, 350–358.
- Nimbalkar, P. R., Khedkar, M. A., Chavan, P. V., & Bankar, S. B. (2018) Biobutanol production using pea pod waste as substrate: Impact of drying on saccharification and fermentation. *Renew. Energ.* **117**, 520–529.
- Ofuya, Z. M. (2005) The Role of Pulses in Human Nutrition: A Review. *J. Appl. Sci. Environ. Mgt.* **9**(3), 99-104.
- Olivares-Vicente, M., Barrajon-Catalan, E., Herranz-Lopez, M., Segura-Carretero, A., Joven, J., Encinar, J. A., Micol, V. (2018) Plant-derived polyphenols in human health: biological activity, metabolites and putative molecular targets. *Curr. Drug Metab.* **19**(4), 351–369.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R. (2016) Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* **5**, E47. doi:10.1017/jns.2016.41.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz- Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., Saura-Calixto, F. (2008) Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res. Int.* **41**(3), 274–285.
- Pinchao-Pinchao, Y. A., Ordoñez-Santos, L. E., Osorio-Mora, O. (2019). Evaluation of the effect of different factors on the ultrasound assisted extraction of phenolic compounds of the pea pod. *DYNA* **86**(210), 211–215.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L. (2011) Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem.* **50**, 586–621.
- Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S. A., Bashir, N., Nazir, F., Ahmad Nayik, G. (2018) Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* **17**, 351-358.
- Rawal, V., Navarro, D. K. (2019). The Global Economy of Pulses, FAO, Rim.<http://www.fao.org/3/i7108en/I7108EN.pdf>. Pristupljeno 25. kolovoza 2020.
- Re, P., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* **26**, 1231-1237.

- Rudra, S. G., Hanan, E., Sagar, V. R., Bhardwaj, R., Basu, S., Sharma, V. (2020) Manufacturing of mayonnaise with pea pod powder as a functional ingredient. *J. Food Meas. Charact.* **14**, 2402–2413.
- Sadh, P. K., Duhan, S., Duhan, J. S. (2018) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresour. Bioprocess.* **5**:1.
- Sanchez-Moreno, C. (2002). Compuestos polifenólicos: estructura y clasificación: presencia en alimentos y consumo: biodisponibilidad y metabolismo. *Alimentaria* **329**, 19–28.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* **16**, 144-158.
- Stalikas, C. D. (2007) Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* **30**, 3268-3295.
- Tassoni, A., Tedeschi, T., Zurlini, C., Cigognini, I. M., Petrusan, J.-I., Rodríguez, Ó., Corvini, P. F. X. (2020) State-of-the-art production chains for peas, beans and chickpeas—valorization of agro-industrial residues and applications of derived extracts. *Molecules* **25**(6), 1383.
- Vojvodić, A., Komes, D., Vovk, I., Belščak-Cvitanović, A., Bušić, A. (2016) Compositional evaluation of selected agro-industrial wastes as valuable sources for the recovery of complex carbohydrates. *Food Res. Int.* **89**, 565-573.
- Wang, B., Huang, Q., Venkitasamy, C., Chai, H., Gao, H., Cheng, N., Pan, Z. (2016) Changes in phenolic compounds and their antioxidant capacities in jujube (*Ziziphus jujuba* Miller) during three edible maturity stages. *LWT-Food Sci. and Technol.* **66**, 56–62.
- Yusuf M. (2017) Agro-Industrial waste materials and their recycled value-added applications: Review. U: *Handbook of Ecomaterials*, Edition 1, (Leticia Myriam Torres Martínez, L., M. T., Kharissova, O. V., Kharisov, B. I., ured.), Springer International Publishing, str. 1-11.

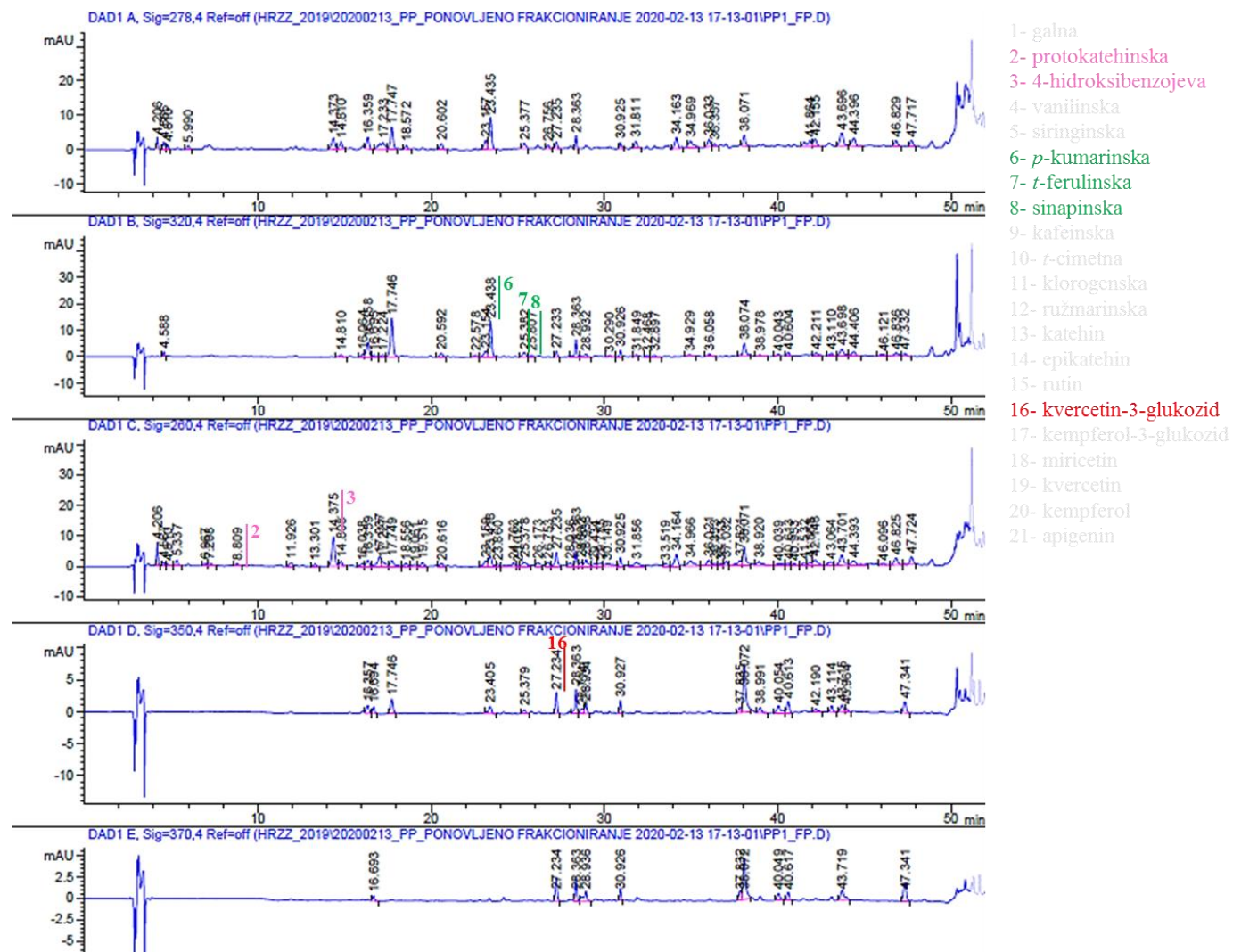
7 PRILOZI



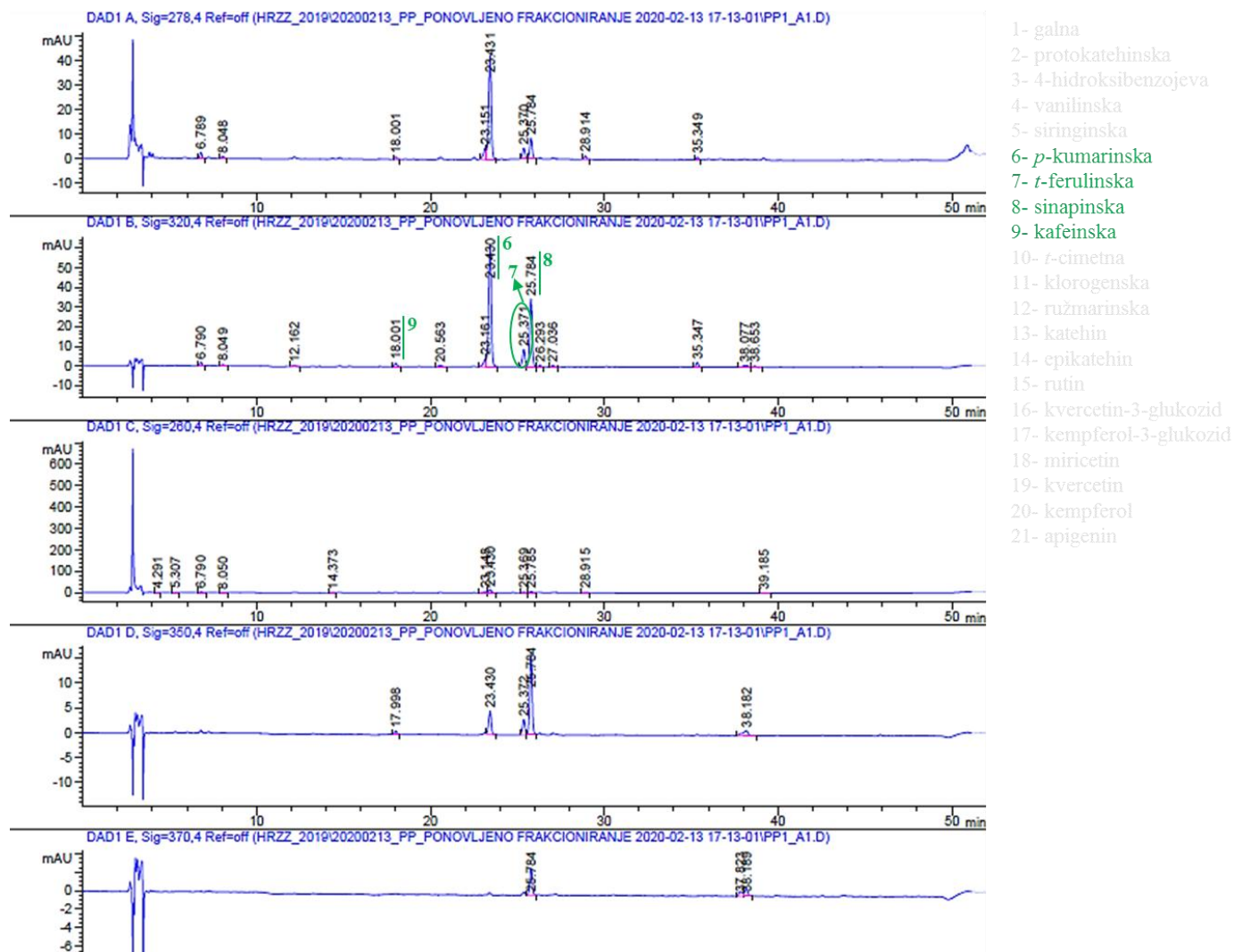
Prilog 1. Kromatogrami smjese standarda snimljeni pri valnim duljinama koje odgovaraju apsorpcijskim maksimumima pojedinih polifenolnih spojeva.



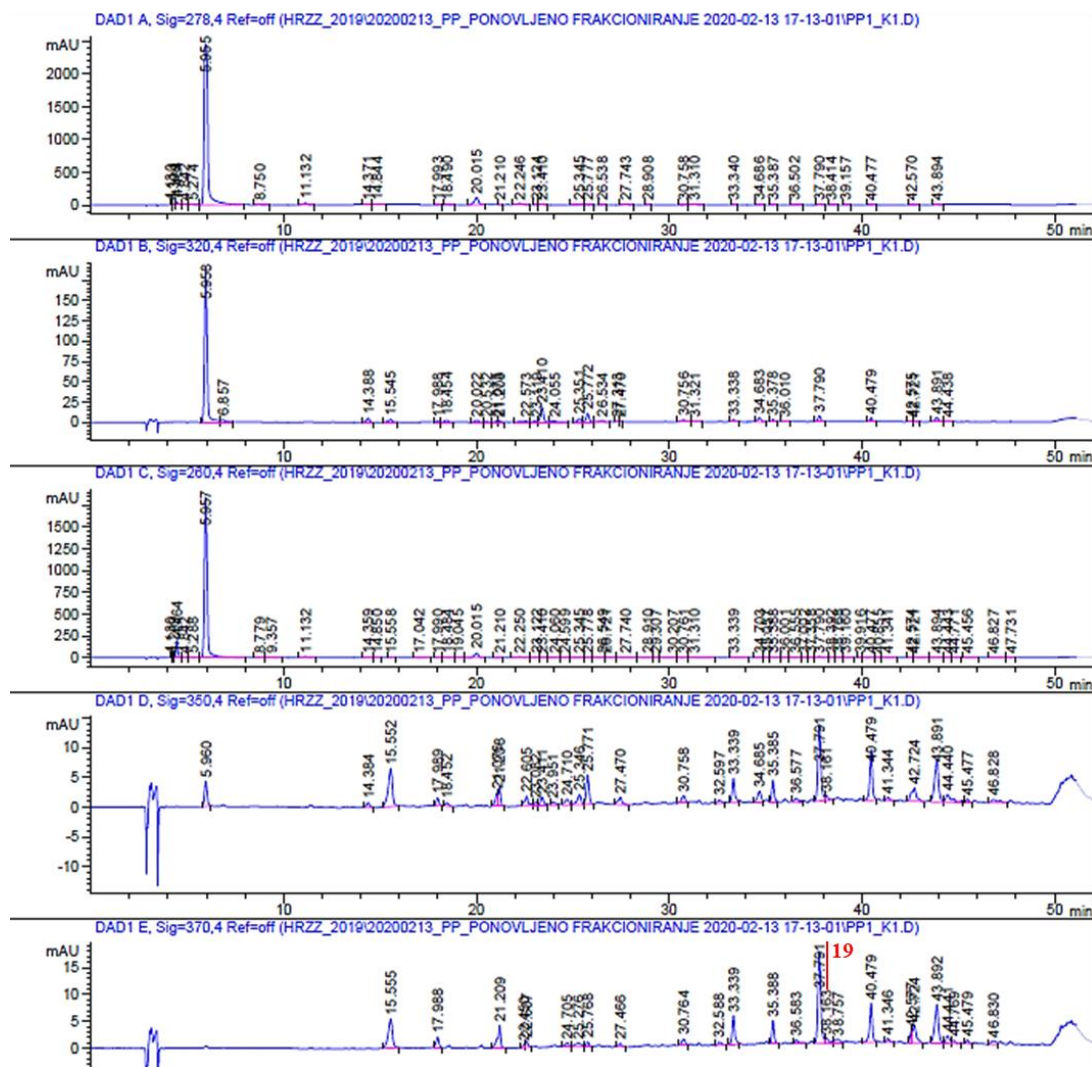
Prilog 2. Kromatogrami uparenog izvornog ekstrakta snimljeni pri različitim valnim duljinama te apsorpcijski spektri 3 istaknuta pika na kromatogramima.



Prilog 3. Kromatogrami frakcije slobodnih polifenola (PP_SP) snimljeni pri različitim valnim duljinama (260, 278, 320, 350 i 370 nm).

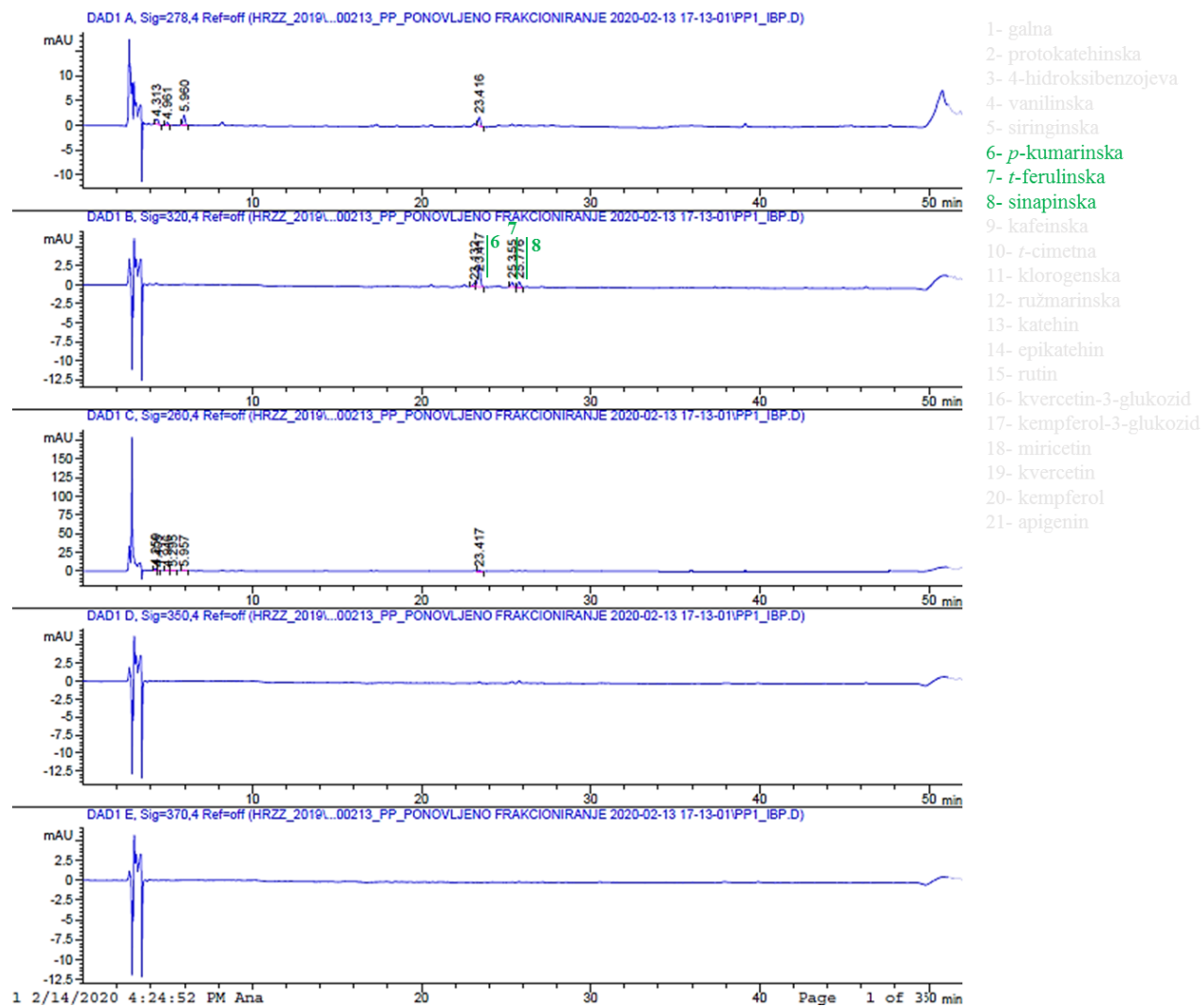


Prilog 4. Kromatogrami frakcije alkalno hidroliziranih polifenola (PP_A) snimljeni pri različitim valnim duljinama (260, 278, 320, 350 i 370 nm).



- 1- galna
- 2- protokatehinska
- 3- 4-hidroksibenzojeva
- 4- vanilinska
- 5- siringinska
- 6- *p*-kumarinska
- 7- *t*-ferulinska
- 8- sinapinska
- 9- kafeinska
- 10- *t*-cimetna
- 11- klorogenska
- 12- ružmarinska
- 13- katehin
- 14- epikatehin
- 15- rutin
- 16- kvercetin-3-glukozid
- 17- kempferol-3-glukozid
- 18- miricetin
- 19- kvercetin
- 20- kempferol
- 21- apigenin

Prilog 5. Kromatogrami frakcije kiselinskih hidroliziranih polifenola (PP_K) snimljeni pri različitim valnim duljinama (260, 278, 320, 350 i 370 nm).



Prilog 6. Kromatogrami frakcije vezanih polifenola (PP_NVP) snimljeni pri različitim valnim duljinama (260, 278, 320, 350 i 370 nm)

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mogeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.


Ime i prezime studenta