

# Utjecaj organskih kiselina na ekstrakciju pektina iz kore naranče

---

Hanžek, Magdalena

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:055754>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-13**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Magdalena Hanžek  
0058220203**

**UTJECAJ ORGANSKIH KISELINA NA EKSTRAKCIJU PEKTINA IZ KORE  
NARANČE**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Analitička kemija

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

**Zagreb, 2024.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Utjecaj organskih kiselina na ekstrakciju pektina iz kore naranče**

**Magdalena Hanžek, 0058220203**

**Sažetak:** Pektin je polisaharaid prirodno zastupljen u staničnoj stijenci viših biljaka, poput voća i povrća. Uglavnom se ekstrahira iz kore citrusa i komine jabuka, a pokazao se izuzetnim gelirajućim i stabilizirajućim agensom, stoga se široko primjenjuje u prehrambenoj industriji. Ekstrakcija pektina pokazala se jednom od osnovnih faza u samoj proizvodnji pektina, a u ovom radu provedena je primjenom dviju organskih kiselina, oksalne i limunske. Cilj rada bio je utvrditi utjecaj odabranih kiselina na parametre kvalitete pektina ekstrahiranog iz kore naranče refluksiranjem, u vremenu od 3 sata pri 80 °C. Određena je boja pektina, evivalentna težina, sadržaj metoksi skupina, ukupnih uronskih kiselina i galakturonske kiseline te stupanj esterifikacije. Rezultati su pokazali da je veći prinos (3,46 %) kao i veći udio galakturonske kiseline (91,80 %) dobiven nakon ekstrakcije oksalnom kiselinom.

**Ključne riječi:** pektin, kora naranče, ekstrakcija, organske kiseline, galakturonska kiselina

**Rad sadrži:** 31 stranica, 6 slika, 4 tablice, 49 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Datum obrane:** 16. srpnja 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Chemistry and Biochemistry  
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

**The effect of organic acids on the extraction of pectin from orange peel**

**Magdalena Hanžek, 0058220203**

### **Abstract:**

Pectin is a polysaccharide that occurs naturally in the cell wall of higher plants, such as fruit and vegetables. It is mainly extracted from citrus peel and apple pomace and has proven to be an exceptional gelling and stabilising agent, which is why it is widely used in the food industry. Pectin extraction has proven to be one of the most fundamental steps in pectin production itself and is carried out in this work by using two organic acids, oxalic acid and citric acid. The aim of the work was to determine the influence of selected acids on the pectin quality parameters extracted from orange peels by refluxing at 80 °C for 3 hours. The pectin colour, the equivalent weight, the content of methoxy groups, the total content of anhydrouronic acid and galacturonic acid as well as the degree of esterification were determined. The results showed that a higher yield (3.46 %) and a higher content of galacturonic acid (91.80 %) were obtained after extraction with oxalic acid.

**Keywords:** pectin, orange peel, extraction, organic acids, galacturonic acid

**Thesis contains:** 31 pages, 6 figures, 4 tables, 49 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Antonela Ninčević Grassino, PhD, Associate Professor

**Thesis defended:** July 16<sup>th</sup>, 2024

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. STRUKTURA PEKTINA .....	2
2.2. IZVORI PEKTINA .....	3
2.2.1. KONVENCIONALNI IZVORI .....	3
2.2.2. NEKONVENCIONALNI IZVORI .....	4
2.3. EKSTRAKCIJA PEKTINA PRIMJENOM KISELINA .....	5
2.4. OSNOVNI PARAMETRI KARAKTERIZACIJE PEKTINA.....	6
2.4.1. GALAKTURONSKA KISELINA .....	6
2.4.2. METOKSI SKUPINE .....	7
2.4.3. STUPANJ ESTERIFIKACIJE.....	7
2.5. UPOTREBA PEKTINA.....	8
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>10</b>
3.1. MATERIJAL.....	10
3.1.1. KEMIKALIJE.....	10
3.1.2. LABORATORIJSKI PRIBOR .....	10
3.1.3. APARATURA I PRIBOR.....	11
3.2. METODE.....	11

3.2.1. EKSTRAKCIJA I IZOLACIJA PEKTINA IZ KORE NARANČE.....	11
3.2.2. PRINOS PEKTINA .....	12
3.2.3. ODREĐIVANJE BOJE PEKTINA.....	12
3.2.4. ODREĐIVANJE TOPLJIVOSTI PEKTINA U VODI .....	13
3.2.5. ODREĐIVANJE SADRŽAJA GALAKTURONSKE KISELINE U UZORCIMA PEKTINA .....	13
3.2.6. ODREĐIVANJE EKVIVALENTNE TEŽINE, SADRŽAJA METOKSI SKUPINA I URONSKE KISELINE TE STUPNJA ESTERIFIKACIJE U UZORCIMA PEKTINA.....	15
3.3. STATISTIČKA ANALIZA .....	16
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>17</b>
4.1. PRINOS PEKTINA .....	17
4.2. BOJA PEKTINA.....	18
4.3. TOPLJIVOST PEKTINA U VODI.....	21
4.4. SADRŽAJ GALAKTURONSKE KISELINE U PEKTINU .....	21
4.5. EKVIVALENTNA TEŽINA, SADRŽAJ METOKSI SKUPINA, URONSKE KISELINE I STUPANJ ESTERIFIKACIJE U UZORCIMA PEKTINA.....	23
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>25</b>
<b>6. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>26</b>

## 1. UVOD

Naranča (slatka naranča, *Citrus sinensis*) je suptropska biljka porodice *Rutaceae* te jedna od najzastupljenijih i najčešće uzgajanih kultura iz skupine agruma, odnosno citrusa. Iznimno je bogata vitaminima, posebice vitaminom C, mineralima te fitokemikalijama, kao što su karotenoidi i flavonoidi koje odlikuju snažna antioksidativna svojstva (Tütem i sur., 2020). Plodovi naranče su prepoznatljivi po obliku te sjajnoj narančastoj ili žuto crvenkastoj kožici ugodna mirisa. Kožica prekriva bijelu spužvastu koru, koja štiti sočno meso ploda podijeljeno u kriške, koje mogu i ne moraju sadržavati sjemenke. Osim što se konzumiraju svježe, često se obrađuju sa svrhom proizvodnje sokova, koncentrata sokova naranče ili džemova i marmelada. Prilikom obrade naranča zaostaje velika količina nusproizvoda, odnosno biootpada, koji čine uglavnom sjemenke i kora. Kora naranče je izrazito aromatična i bogata eteričnim uljima, fenolnim spojevima, vlaknima, proteinima te polimerima poput hemiceluloze, celuloze, lignina i pektina (Tiwari i sur., 2017). Iz tog razloga, kora naranče se koristi kao važna sirovina u prehrambenom i neprehrambenom sektoru, čime se ujedno i pridonosi smanjenju količine nastalog otpada.

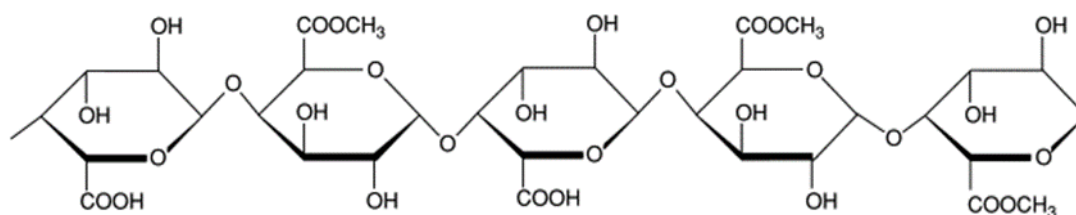
Pektin je polisaharid prirodno zastupljen u staničnim stijenkama biljnih stanica, posebice u višim biljkama, kao što su voće i povrće. Osnovna šećerna komponenta pektina je D-galakturonska kiselina. FAO/WHO odbor (FAO/WHO, 2016) za prehrambene aditive, odobrava sigurnu konzumaciju pektina kao dodatka prehrani, a uz prehrambenu industriju, primjenu je našao i u farmaceutskoj, kozmetičkoj i biotehnološkoj industriji. U komercijalne svrhe, pektin se prvenstveno ekstrahira iz kome jabuka, dok je danas sve više zastupljena upravo proizvodnja pektina iz kore citrusa. Konvencionalno se ekstrakcija pektina vrši anorganskim kiselinama, međutim, pokazalo se da one imaju negativan utjecaj ne samo na okoliš, već i na samu kvalitetu konačnog proizvoda i time posljedično na zdravlje (Iñiguez-Moreno i sur., 2024). U današnje vrijeme sve se više teži održivoj proizvodnji u skladu s načelima zelene kemije, stoga se kao alternativa u proizvodnji pektina počinju koristiti organske kiseline.

Osnovni cilj ovog istraživanja bio je provesti ekstrakciju pektina organskim kiselinama, kao ekološki prihvatljivijoj metodi ekstrakcije, te utvrditi utjecaj odabranih kiselina na osnovne parametre pri karakterizaciji pektina korištenjem nekih od analitičkih metoda.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. STRUKTURA PEKTINA

Strukturno gledajući, pektini su najslabiji polisaharidi prisutni u staničnoj stijenci biljne stanice. Radi se o skupini polisaharida, čija je osnovna šećerna komponenta D-galakturonska kiselina, koja čini gotovo 70 % molekule pektina. Jedinice galakturonske kiseline su povezane  $\alpha$ -1,4-glikozidnim kovalentnim vezama, te čine tzv. kostur molekule pektina (Mohnen, 2008) (slika 1).



**Slika 1.** Jedinice galakturonske kiseline unutar molekule pektina povezane  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama (Flutto, 2003)

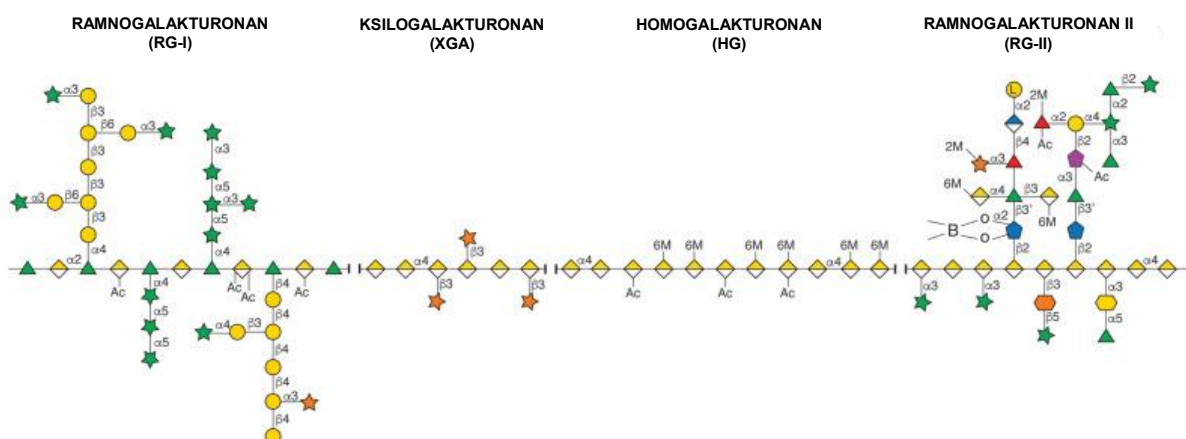
U pektinske polisaharide ubrajamo homogalakturonan (HG) i ramnogalakturonan I (RG-I) te supstituirane galakturonane, ramnogalakturonan II (RG-II) i ksilogalakturonan (XGA) (slika 2). Homogalakturonan (HG) je homopolimer galakturonske kiseline, koja može biti djelomično metil ili acetil esterificirana na C-6, odnosno O-2 i/ili O-3 položaju, pri čemu stupanj esterifikacije utječe ne samo na funkcionalna svojstva pektina, već i na njegovu daljnju upotrebu. Ramnogalakturonan II se smatra jednim od strukturno najkompleksnijih pektinskih polisaharida. Sastoji se od HG okosnice koju čini nekoliko  $\alpha$ -1,4-povezanih galakturonskih ostataka supstituiranih bočnim lancima, koji se sastoje od 12 različitih vrsta šećera, vezanih preko 20 različitih veza. Ksilogalakturonan je, kao što i samo ime govori, na O-3 položaju supstituiran ksilozom, a zajedno s RG-II pripada skupini supstituiranih galakturonana. (Mohnen, 2008.) S druge strane, ramnogalakturonan I (RG-I) je jedini pektinski polisaharid koji ne sadrži linearni lanac galakturonskih kiselina, već razgranat lanac s  $\alpha$ -1,2-povezanim ostacima ramnoze. U razgranatom bloku molekule, na ramnozu su na položaju O-4, rijetko i O-3, glikozidnom vezom pričvršćeni arabinanski i/ili galaktanski lanci u različitim kombinacijama (Abbott i sur., 2014).

Rodríguez Robledo i Castro Vázquez (2020) navode kako je u citrusnim pektinima prisutan linearni lanac 1,4-povezane  $\beta$ -D-galaktoze, koji sadrži do 25 % ostataka  $\alpha$ -L-arabinoze povezanih u kratkim bočnim lancima na O-4 položaju ramnozilnih ostataka. Od neutralnih



šećera u jabučnom pektinu, česte su D-glukoza, L-ramnoza i D-kiloza, dok su u drugim voćnim pektinima pojavljuju i male količine manoze i riboze (Rolin, 1993).

Contesini i suradnici (2014) navode da se pektin može smatrati jednim od najsloženijih ugljikohidrata pronađenih u prirodi, upravo zbog raznolikosti u stereokemiji glikozidnih veza koje stabiliziraju strukturu molekule te raznih pobočnih lanaca neutralnih šećera koji se javljaju u blokovima uz osnovne lance galakturonskih kiselina. Uz to, kao što je i opisano, molekula se sastoji od velikog broja različitih monosaharida, koji su međusobno povezani preko dvadeset različitih veza te se mogu kemijski modificirati eterskim ili esterskim skupinama. Strukturna raznolikost pektina je česta između različitih vrsta pektina, ali može doći i do razlike u strukturama pektina dobivenih iz istih izvora (Fraeye i sur., 2010). Također, nakon ekstrakcije je moguće kemijskim ili enzimskim putem modificirati struktura svojstva pektina ovisno o njegovoj daljoj primjeni.



Slika 2. Shematski prikaz strukture pektina (Varki i sur., 2022)

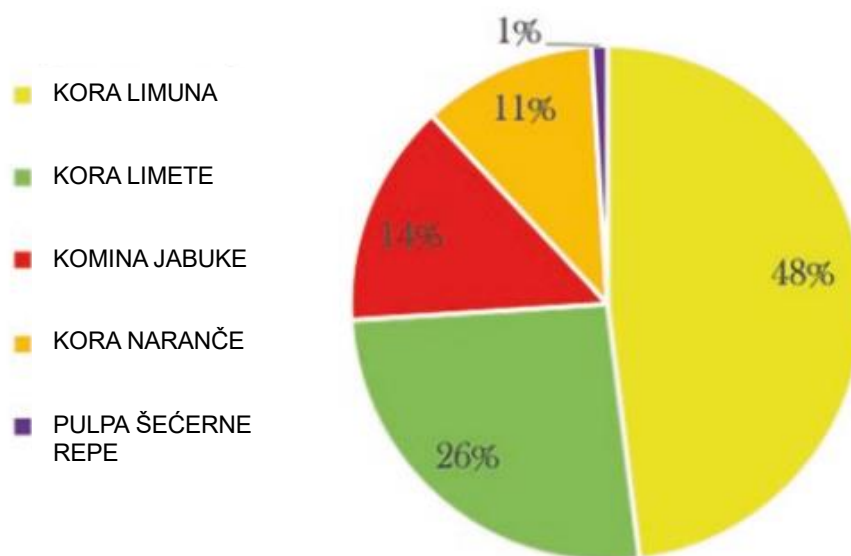
## 2.2. IZVORI PEKTINA

### 2.2.1. Konvencionalni izvori

Pektini se kao skupina biljnih polisaharida prirodno nalaze u različitom voću i povrću. Danas se gotovo 85 % komercijalnih pektina proizvede ekstrakcijom iz kore citrusa i 14 % iz kome jabuke, kao nusproizvoda prehrambene industrije, dok se 1 % proizvodi iz pulpe šećerne repe, koja zaostaje u industriji šećera (Pagliaro i sur., 2016) (slika 3). Što se tiče agruma, procjenjuje se da količina pektina iznosi 13,4 - 29,1 % suhe tvari, a kod jabučnog pektina 4,2 - 19 %. Citrusni pektin je svjetlosmeđe boje, gotovo bijele, dok su jabučni pektini tamniji. Svjetlija boja citrusnog pektina je pogodnija za džemove i marmelade, međutim neki proizvodi zahtijevaju

korištenje tamnijeg jabučnog pektina. Dakle, ove dvije sirovine zapravo proizvode nešto drugačije pektine, a koji ćemo primijeniti ovisi o željenom konačnom proizvodu. Jabučni pektin proizvodi teži, viskoziji gel, prikladan za nadjeve i punjenja u pekarstvu.

S druge strane, pektin šećerne repe pokazuje manja svojstva želiranja, stoga je prema primjeni inferioran u odnosu na pektin citrusa ili jabuke. Razlog tomu je njegova relativno niska molekulska masa, visok sadržaj acetilnih skupina i veće količine neutralnih šećera vezanih u bočnim lancima. Međutim, pektin šećerne repe se pokazao kao puno bolji emulgator od pektina ekstrahiranog iz citrusa ili jabuke, upravo zbog toga što se na arabinanskim bočnim lancima ramnogalakturonana I (RG-I) nalaze ostaci ferulinske kiseline koji omogućuju stvaranje kovalentno umreženih hidrogelova povećavajući njegov industrijski potencijal. Uz to, šećerna repa se smatra dobrim izvorom komercijalnog pektina zbog svoje dostupnosti tijekom cijele godine (Rodríguez Robledo i Castro Vázquez, 2020).



**Slika 3.** Glavni izvori komercijalnog pektina (Morris i Binhamad, 2020)

### 2.2.2. Nekonvencionalni izvori

Nekonvencionalnim izvorima pektina smatra se svo drugo voće i povrće, osim citrusa, jabuka i šećerne repe, kao i ostaci hrane te neke druge biljne vrste, koje sadrže različite udjele pektina, raznih fizikalno kemijskih svojstva. Od tropskog voća, pektin sadrže guava, banana, papaja, mango, marakuja (Hodgson i Kerr, 1991). Kora banane čini oko 1/4 ukupne težine voća i sadrži malu količinu pektina topljivog u vodi koji služi za želiranje, zgušnjavanje ili stabilizaciju. Kao primjer bobičastog voća koje sadrži pektin Alba i suradnici (2018) navode

crni ribiz, a od voćnih vrsta još se ističu i dinja (Denman i Morris, 2015) i lubenica. Banerjee i suradnici (2017) su dokazali da mokra kora lubenice sadrži 19 - 21 % (w/w) pektina niske molarne mase i visokog stupnja metil esterifikacije, što ukazuje da se može koristiti kao dobar emulgator, stabilizator i zgušnjivač.

Pektin je također zastupljen u malim količinama u mrkvi (Houben i sur., 2011), bundevi (Lalnunthari i sur., 2019), rajčici (Ninčević Grassino i sur., 2016), poriluku, celeru i zelenim mahunama (Christiaens i sur., 2015). Ostaci rajčice, nastali prilikom prerade rajčica u prehrambenoj industriji, uključuju velike količine komine rajčice i kore rajčice koje sadrže 7,55 - 22,6 % suhe tvari pektina (Del Valle, 2006).

Pektini koji se ekstrahiraju iz tzv. nekonvencionalnih izvora sadrže velike količine neutralnih šećera, poput arabinoze, galaktoze i ramnoze, što rezultira time da je udio galakturonske kiseline prenizak. Prema međunarodnim standardima (FAO/WHO, 2016) i direktivi Europske unije (EU regulation No 231/2012) najmanje 65 % pektinske supstance mora biti galakturonska kiselina kako bi se pektin klasificirao kao komercijalni pektin.

Naravno, pektin se može ekstrahirati iz još brojnih drugih biljnih vrsta, no ovdje su izdvojene samo neke od mogućih i češće korištenih sirovina. Također, važno je napomenuti da se pod pojmom izvor pektina uglavnom misli na otpadnu biomasu dobivenu preradom određenih vrsta voća i povrća.

### **2.3. EKSTRAKCIJA PEKTINA PRIMJENOM KISELINA**

Pektin se uglavnom dobiva ekstrakcijom kore, odnosno komine voća i povrća. Prikupljene sirovine se prethodno obrađuju s ciljem uklanjanja određenih stranih čestica i interferenata, kako bi se mogle skladištiti na duže vrijeme. Prethodna obrada uključuje uklanjanje šećera, ulja i kiseline, zatim deaktivaciju enzima poput metilesteraze koja se nalazi u kori citrusa, depolimerizaciju, sušenje ako je potrebno, i usitnjavanje. Sušenje je vrlo važan korak tretiranja mokrih sirovina koje ne namjeravamo odmah iskoristiti jer se time spriječava mogućnost njene kontaminacije i degradacije.

Ekstrakcija se pokazala jednim od osnovnih koraka u samoj proizvodnji pektina, stoga je vrlo važno raditi u kontroliranim uvjetima s obzirom na temperaturu, pH i samo vrijeme provođenja ekstrakcije. Jedna od konvencionalnih metoda ekstrakcije je refluksiranje (Marić i sur., 2018), gdje se materijal ekstrahira primjenom visokih temperatura i kiseline. Međutim, problem je što se radi o vrlo dugotrajnom procesu tijekom kojeg može doći i do razgradnje pektina. S druge pak strane, ovom ekstrakcijskom tehnikom dobivaju se prilično visoki prinosi pektina s značajnim udjelom galakturonske kiseline (Morris i Binhamad, 2020). Uglavnom se ekstrakcija provodi u rasponu temperatura od 70 do 90 °C, pri vrlo niskom pH (1,5 - 3), a može trajati i do

10 sati, ovisno o početnoj sirovini i željenom proizvodu (Sañudo Barajas i sur., 2014). Materijal se refluksira nekoliko sati, uz miješanje s kiselinama različitih koncentracija. Kiseline djeluju na netopljivi protopektin dajući potreban pektin, no visoka kiselost može imati negativan utjecaj na određena poželjna fizikalna svojstva pektina. Pokazalo se da će prinos pektina biti to veći što je niži pH, odnosno kiselije sredstvo za ekstrakciju. Konvencionalne metode ekstrakcije pektina uključuju upotrebu kiselina i/ili kelirajućih agenasa. Uobičajena je upotreba anorganskih kiselina, poput klorovodične, dušične, fosforne i sumporne. Od organskih kiselina za izolaciju pektina se dosada najviše koristila limunska kiselina, ali je ekstrakcija moguća i azelaičnom, oksalnom, mliječnom i vinskom kiselinom (Banerjee i sur., 2016). Limunska kiselina ujedno djeluje i kao kelirajući agens, što ju također ističe u odnosu na ostale kiseline. To je dokazano i istraživanjem Yanga i suradnika (2018), gdje je najviši prinos pektina ostvaren upravo upotrebom limunske kiseline, iako su korištene još i dušična, klorovodična, sumporna, i azelaična kiselina. Koju ćemo kiselinu izabrati, uglavnom ovisi o dostupnosti kiselina, daljnjoj obradi, željenim karakteristikama i primjeni konačnog proizvoda. Također, pektin se može ekstrahirati i u bazičnim uvjetima, ali to rezultira niskim prinosima pektina (Roman-Benn i sur., 2023).

Nakon ekstrakcije, pektin se odvaja od ostatka komine ili kore filtracijom ili centrifugiranjem. Zatim se izolira iz pročišćenog ekstrakta taloženjem alkoholima ili solima. Nakon uklanjanja nečistoća i interferenta pektin se suši kako bi se uklonila vlaga, a dobiveni proizvod se usitnjava u prah u čestice jednolike veličine (Sañudo Barajas i sur., 2014).

Budući da se nastoji ograničiti upotreba jakih anorganskih kiselina kao ekstrakcijskih sredstva, pronađene su i neke alternative pri izolaciji pektina. Pektin se danas može ekstrahirati i nekim drugim inovativnim metodama, primjenom ultrazvuka, mikrovalova i enzima (Marić i sur., 2018), toplinskom i/ili mehaničkom obradom, kao i autoklaviranjem i ekstruzijom, pri čemu se dobiva jednaki ili čak veći prinosi pektina u odnosu na konvencionalne metode.

## **2.4. OSNOVNI PARAMETRI KARAKTERIZACIJE PEKTINA**

### **2.4.1. Galakturonska kiselina**

Galakturonska kiselina je glavni parametar čistoće pektina. Udjeli galakturonske kiseline kao i naboj molekule pektina imaju značajan utjecaj na fizikalna svojstva pektina, te na strukturu i teksturu pektinskog gela. Što je veći udio galakturonske kiseline, to je pektin čišći, a time i kvalitetniji (Chasanah i sur., 2019). Kada se kaže čisti pektin, misli se na pektin s niskim udjelom neutralnih šećera poput arabinoze, galaktoze i ramnoze. Procjena sadržaja galakturonske kiseline vrlo je važna za određivanje čistoće i stupnja esterifikacije, kao i za

procjenu fizičkih svojstava pektina. Preporučuje se da udio galakturonske kiseline ne bude niži od 65 %, jer se u protivnom takav pektin ne može koristiti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Arimpi i Pandia (2019) u svom istraživanju naglašavaju da što je veća koncentracija etanola, koji se koristi za ispiranje pektina, te što je duže vrijeme taloženja, očekuje se i veći udio galakturonske kiseline. To objašnjavaju činjenicom da etanol kao polarna molekula može istaložiti više pektina, a dugatrajnijim taloženjem se postiže da se više protopektina hidrolizira u pektin. Sadržaj galakturonske kiseline u pektinu može se odrediti primjenom različitih analitičkih metoda (Ninčević Grassino i sur., 2018), a u ovom radu je korištena UV/Vis spektrofotometrija uz primjenu karbazola kao kompleksirajućeg reagensa u kiselim uvjetima (sumporna kiselina).

#### **2.4.2. Metoksi skupine**

Sadržaj metoksila definira se kao broj molova metanola na 100 mola galakturonske kiseline. Ima vrlo važnu ulogu u određivanju funkcionalnih svojstva pektina te strukture i teksture pektinskog gela (Siddiqui i sur., 2021). Također, ova fizikalna veličina određuje sposobnost disperzije pektina u vodi i stvaranja samog gela. Što je veći udio metoksila, to pektin bolje formira gel. S obzirom na metoksi skupine, razlikujemo visoko metoksilirani pektin, gdje je udio veći ili jednak 7 % te nisko metoksilirani pektin gdje je udio metoksila manji od 7 %.

Sadržaj metoksila u pektinu određuje se saponifikacijom i kiselinsko-baznom titracijom slobodnih karboksilnih grupa (Ninčević Grassino i sur., 2018), što je korišteno i u ovom radu.

#### **2.4.3. Stupanj esterifikacije**

Stupanj esterifikacije (*engl.* degree of esterification, DE) definira se kao omjer udjela esterificiranih galakturonskih kiselina i ukupnih galakturonskih kiselina sadržanih u pektinu. DE se teoretski može kretati u rasponu 0 do 100 %, a ovisno o udjelu esterificiranih skupina razlikujemo pektine s visokim udjelom metoksila (*engl.* high-methoxyl, HM) i one s niskim udjelom metoksila (*engl.* low-methoxyl, LM). Pektin ima visok udio metoksila ukoliko stupanj esterifikacije iznosi više od 50 % i takvi pektini formiraju gelove pri niskim pH vrijednostima ili pri niskom udjelu topljivih krutih tvari poput saharoze. S druge strane, pektin čiji je DE manji od 50 % pripada pektinima s niskim udjelom metoksila i kao takav formira gelove u prisutnosti dvovalentnih kationa poput  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ili  $\text{Fe}^{2+}$  (Baraiya i sur., 2023) Prema tome, može se zaključiti da je stupanj esterifikacije dosta značajan za geliranje pektina.

Osim o udjelu metoksil grupa, stupanj esterifikacije daje nam i informaciju o ekvivalentnoj težini pektina. Ekvivalentna težina je fizikalna veličina kojom se iskazuje sadržaj slobodne galakturonske kiseline u pektinu (neesterificirane). Naime, Morris i suradnici (2000) navode da je DE obrnuto proporcionalan ekvivalentnoj težini. Prema tome, što je viši stupanj esterifikacije, ekvivalentna težina pektina je niža. Vrijednost stupnja esterifikacije mijenja se i ovisno o vremenu i temperaturi. Što su temperatura i vrijeme ekstrakcije viši, stupanj esterifikacije može biti optimalniji, ali postoji i mogućnost smanjenja stupnja esterifikacije uzrokovano razgradnjom pektina zbog depolimerizacije galakturonskih lanaca (Liew i sur., 2014).

Klasična analitička metoda za određivanje stupnja esterifikacije je kiselinsko-bazna titracija (Ninčević Grassino i sur., 2018), što je korišteno i u ovom radu.

## **2.5. UPOTREBA PEKTINA**

Najpoznatija je upotreba pektina u prehrambenoj industriji. Već dugi niz godina, pektin se koristi kao sredstvo za želiranje, zgušnjavanje te stabiliziranje proizvoda. Ključan je sastojak marmelada, džemova, sirupa, voćnih sokova, mliječnih proizvoda i želea (Freitas i sur., 2021). Radi se o netoksičnom prahu bijele boje, koji kada dođe u kontakt s vodom vrlo brzo formira gel. Pektin je prirodni sastojak voća, međutim, često ne u dovoljnoj količini, pa se prilikom proizvodnje dodaje kao prehrambeni aditiv. Može se dodati kao suhi prah, pomiješan sa šećerom, ili kao koncentrirana vodena otopina. U proizvodnji džemova, voćnih napitaka, kiselih mliječnih proizvoda, u pekarstvu i proizvodnji slatkiša, uglavnom se koristi HM pektin. S druge strane, LM pektin, koji ne zahtijeva prisutnost šećera za želiranje, značajan je u proizvodnji džemova i marmelada s manjim udjelom šećera, kao i u proizvodnjih nekih dijetetskih proizvoda.

Budući da se radi o biorazgradivom i jeftinom polimeru, pektin je primjenu našao i u proizvodnji ambalaže za hranu. Naime, kod klasične ambalaže je moguće da neželjeni kemijski spojevi iz plastičnih materijala za pakiranje migriraju u hranu, što naravno upotrebom pektinskih filmova nije slučaj. Folije na bazi pektina također imaju vrlo dobru barijeru za kisik pa time ujedno i produljuju rok trajanja pakirane hrane (Younis, 2022).

Osim u prehrambenoj industriji, značajna je i primjena pektina u farmaceutskoj industriji i medicini. Zdravstvene dobrobiti pektina proizlaze iz njegovog sastava i pristunosti specifičnih skupina koje odlikuje široka bioaktivnost. Do sada su istražena antitumorska, antibakterijska, protuupalna i antioksidativna svojstva pektina te djelovanje pektina kao imunomodulatora (Freitas i sur., 2021). Pretpostavlja se da u kombinaciji s drugim tvarima djeluje inhibirajuće na rast tumorskih stanica, međutim, mehanizmi djelovanja još nisu potpuno istraženi. Osim

toga, djeluje i kao prirodna profilaktična tvar te tako štiti od trovanja toksičnim kationima (Sriamornsak, 2003). Topiva vlakna koja se nalaze u pektinu potiču izlučivanje žučnih kiselina, što utječe na smanjenje kolesterola u krvi, a samim time umanjuje rizik od obolijevanja kardiovaskularnim bolestima. Istraživanja pokazuju da HM pektini visoke molekulske mase učinkovitije snižavaju razinu kolesterola od LM pektina (Wicker i sur., 2014). Navodi se da je konzumiranjem 6 g pektina dnevno moguće u 2 tjedna sniziti razinu kolesterola gotovo do 13 %.

Pektin se i široko koristi kao nosač za prijenos lijeka do ciljnog mjesta djelovanja, kao matriks za tablete te kao sastojak filmova za oblaganje tableta. Kako bi se smanjila topljivost u vodi, povećala otpornost i stabilnost gela te konstruirali novi materijali sa specifičnim svojstvima potrebnim za isporuku lijeka do mjesta djelovanja, pektin se u tu svrhu često kombinira s drugim prirodnim polimerima i bioaktivnim spojevima, poput kitozana i cisteina (Freitas i sur., 2021).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. MATERIJAL**

U ovom istraživanju korištena je kora zrele naranče kupljena u supermarketu (Zagreb, Hrvatska). Prije rada, kora naranče narezana je na manje komade i usitnjena električnim mlincem za kavu.

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

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

##### **3.1.2. Laboratorijski pribor**

- Automatske pipete (1 - 5 mL)
- Bireta po Schelbachu
- Eksikator
- Erlenmeyerove tikvice (250 - 1000 mL)
- Filter papir
- Laboratorijske čaše (150 - 600 mL)
- Lađice za vaganje
- Magnetić
- Odmjerne tikvice (25, 100 i 1000 mL)
- Pinceta



- Propipeta
- Staklene i plastične kivete
- Staklene i plastične menzure (50, 100 i 500 mL)
- Stakleni i plastični lijevci
- Stakleni štapić
- Tarionik s tučkom
- Tikvice s okruglim dnom (500 mL)
- Trbušaste pipete (2, 5 i 10 mL)
- Žlice

### **3.1.3. Aparatura i pribor**

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

## **3.2. METODE**

### **3.2.1. Ekstrakcija i izolacija pektina iz kore naranče**

Izvagano je 20 g usitnjene kore naranče te preneseno u tikvicu s okruglim dnom volumena 500 mL. Nakon dodatka 400 mL ekstrakcijskog sredstva (oksalne ili limunske kiseline) uzorak kore naranče se refluksira tijekom 3 sata na temperaturi od 80°C. Nakon završetka ekstrakcije, otopina se ohladi na sobnoj temperaturi, filtrira preko filter papira, a zatim i pomoću vakuum filtera. Dobiven filtrat se prenosi u Erlenmayerovu tikvicu (1000 mL), a potom se dodaje 800 mL etanola (96 %) kako bi došlo do koagulacije pektina. Tako pripremljena suspenzija se stavi na magnetsku miješalicu, a nakon miješanja u vremenu od 3 h, provede se filtracija preko običnog filter papira. Tijekom filtracije pektin zaostaje na filter papiru te se ispiri etanolom i acetonom kako bi se uklonile nečistoće. Nakon ispiranja se prebaci u porculanske posudice i suši na sobnoj temperaturi. Osušeni pektin se usitni u tarioniku, a potom se dobiveni prah važe te prenese i čuva u staklene kivete do provođenja daljnjih analiza.

### 3.2.2. Prinos pektina

Usitnjeni uzorci pektina izvagani su u lađicama za vaganje na analitičkoj vagi (JOBST, Samobor, Hrvatska), a potom je prinos pektina ( $w$ ) izražen kao masa izoliranog pektina u odnosu na početnu masu uzorka kore naranče [1]:

$$w (\text{pektin}) = \frac{m (\text{pektin})}{m (\text{kora naranče})} \cdot 100 \quad [1]$$

### 3.2.3. Određivanje boje pektina

Određivanje parametara boje provedeno je korištenjem kolorimetra CM-3500d (Konica Minolta Sensing, Inc. Osaka, Japan) čiji se rad temelji na trodimenzionalnom prostoru boja CIE  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ .

Hunter-ove  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti podudaraju se sa sljedećim rasponima boja:

- $a^*$  vrijednost: zeleno ( $- a^*$ ) ili crveno ( $+ a^*$ )
- $b^*$  vrijednost: plavo ( $- b^*$ ) ili žuto ( $+ b^*$ )
- $L^*$  vrijednost: svjetlo ( $L^* = 100$ ) ili tamno ( $L^* = 0$ )

Na temelju dobivenih  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti je određena ukupna razlika obojenosti, odnosno kolorimetrijska razlika ( $\Delta E$ ) između uzorka pektina izoliranih iz kore naranče u odnosu na referentne uzorke, citrusni i jabučni pektin. Ukupna kolorimetrijska razlika je izračunata u odnosu na oba referentna uzorka pomoću formule [2]:

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

gdje je:

$$\Delta L = L_1 - L_0$$

$$\Delta a = a_1 - a_0$$

$$\Delta b = b_1 - b_0$$

$L_0$ ,  $a_0$ ,  $b_0$  - vrijednosti boje referentnog uzorka

$L_1$ ,  $a_1$ ,  $b_1$  - vrijednosti boje ispitivanog uzorka

Tumačenje odstupanja boje ispitivanog od referentnog (kontrolnog) uzorka se određuje prema sljedećim kriterijima:

- $-\Delta L$  uzorak je tamniji od standarda

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

### 3.2.4. Određivanje topljivosti pektina u vodi

1 g uzorka pektina se izvaže u prethodno osušene i izvagane čašice te im se doda 10 mL destilirane vode. Nakon 24 sata inkubacije na sobnoj temperaturi, provedeno je sušenje u eksikatoru nakon čega su uzorci izvagani. Na temelju izmjerenih vrijednosti početne mase uzorka i mase nakon sušenja izračunata je topljivost pektina (*engl.* water solubility index, WSI) prema niže napisanoj formuli [3]:

$$w \text{ (WSI)} = \frac{m \text{ (osušenog ostatka)}}{m \text{ (uzorak)}} \cdot 100 \quad [3]$$

### 3.2.5. Određivanje sadržaja galakturonske kiseline u uzorcima pektina

Za određivanje sadržaja galakturonske kiseline u uzorcima pektina izoliranih iz kore naranče UV/Vis spektrofotometrijom potrebno je izraditi baždarni dijagram i izračunati nepoznate koncentracije galakturonske kiseline ( $\gamma$ ) u uzorcima pektina.

#### ○ Izrada baždarnog dijagrama

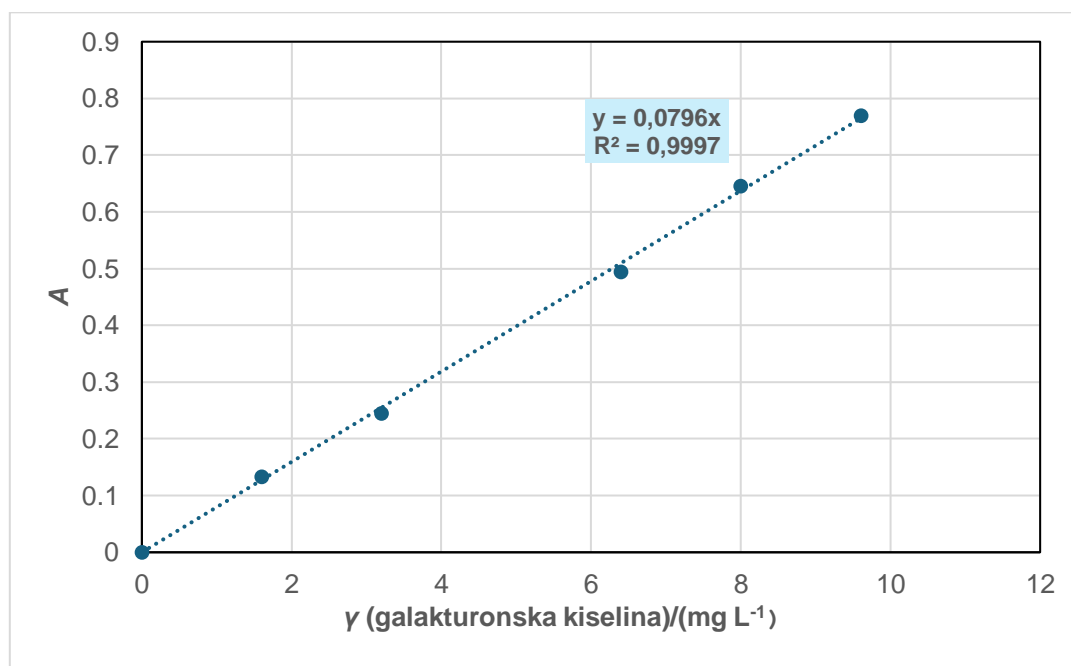
Odvagano je 120,5 mg galakturonske kiseline, kvantitativno prenešeno u odmjernu tikvicu od 1000 mL, nakon čega je dodano 10 ml 0,05 M otopine natrijeva hidroksida, nadopunjeno s destiliranom vodom do oznake i ostavljeno stajati preko noći.

Iz pripremljene ishodne otopine galakturonske kiseline priređene su pojedinačne standardne otopine masenih koncentracija 1,6; 3,2; 6,4; 8,0 i 9,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  u odmjernim tikvicama od 100 mL, nadopunjavanjem s destiliranom vodom. Točno 3 mL pojedine otopine standarda otpipetirano je u staklene epruvete, a potom je dodano 1 ml 0,1 % (w/v) karbazola i 12 ml koncentrirane sumporne kiseline uz konstantno miješanje. Nakon dodatka kiseline, otopina je ostavljena 15 min na sobnoj temperaturi, kako bi došlo do razvitka ružičastog obojenja, a potom je nastalom kompleksu izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 525 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija i pripadajućih masenih koncentracija pojedinačnih standardnih otopina galakturonske kiseline (tablica 1) nacrtan je baždarni dijagram (slika 1).

Slijepa proba je pripremljena tako da je umjesto 2 mL standarda i 1 karbazola, upotrijebljeno 2 mL destilirane vode, odnosno 1 mL 96 % etanola.

**Tablica 1.** Rezultati mjerenja apsorbancije standardnih otopina poznatih koncentracija galakturonske kiseline pri valnoj duljini 525 nm

$\gamma$ (galakturonska kiselina)/(mg L <sup>-1</sup> )	A
	srednja vrijednost $\pm$ SD
0,0	0,000 $\pm$ 0,000
1,6	0,134 $\pm$ 0,002
3,2	0,245 $\pm$ 0,009
6,4	0,495 $\pm$ 0,024
8,0	0,646 $\pm$ 0,004
9,6	0,769 $\pm$ 0,032



**Slika 4.** Baždarni dijagram galakturonske kiseline

○ **Priprema uzorka za mjerenje apsorbancije**

Odvagano je 100 mg uzorka i otopljeno u 100 mL 0,05 M otopine natrijeva hidroksida. Otopina je ostavljena 30 minuta na sobnoj temperaturi kako bi došlo do deesterifikacije pektina. Točno 2 ml deesterificirane otopine razrijeđeno je s destiliranom vodom u odmjerne tikvici od 100

mL. Potom je otpipetirano 3 mL razrijeđene otopine, dodano 1 mL karbazola i 12 mL koncentrirane sumporne kiseline uz konstanto miješanje. Nakon 15 min priređenim uzorcima izmjerena je apsorbancija na valnoj duljini od 525 nm.

- **Određivanje nepoznate masene koncentracije galakturonske kiseline u pektinu**

Nepoznate masene koncentracije ( $\text{mg L}^{-1}$ ) galakturonske kiseline u otopinama pektina određene su iz regresijskog pravca (baždarni dijagram), a potom su dobivene vrijednosti pretvorene u g galakturonske kiseline na 100 g uzorka, uzevši u obzir odvagu, volumen otopine pektina i razrijeđenje.

### 3.2.6. Određivanje ekvivalentne težine, sadržaja metoksi skupina i uronske kiseline te stupnja esterifikacije u uzorcima pektina

- **Ekvivalentna težina (*engl.* equivalent weight, EW)**

Odvažuje se 0,25 g pektina u E. tikvicu od 250 mL, doda se 5 mL etanola (96 %), 0,5 g NaCl i 100 mL destilirane vode. Otopina se promiješa te se doda indikator bromtimol modro (žuta boja otopine). Ovako priređena otopina se titrira sa 0,1 M otopinom NaOH do promjene boje (modra boja otopine). Ekvivalentna težina se računa prema niže napisanoj formuli [4]:

$$EW = \frac{m(\text{uzorka})}{V_1(\text{NaOH}) \cdot c(\text{NaOH})} \quad [4]$$

- **Određivanje sadržaja metoksi skupina (*engl.* methoxyl content, MeO)**

Prethodnoj otopini dobivenoj nakon titracije i određivanja ekvivalentne težine doda se 25 mL 0,25 M otopine NaOH. Nakon snažnog miješanja na magnetskoj mješalici tijekom 30 min otopini se doda 25 mL 0,25 M HCl pri čemu dolazi do pretvorbe modre boje otopine u žutu. Slijedi ponovna titracija otopinom NaOH koncentracije 0,1 M do pojave modre boje otopine. MeO sadržaj izračuna se iz niže napisane formule [5]:

$$w(\text{MeO}) = \frac{V_2(\text{NaOH}) \cdot c(\text{NaOH}) \cdot 31}{m(\text{uzorak})} \cdot 100 \quad [5]$$

- **Određivanje sadržaja uronske kiseline (*engl.* anhydrouronic acid content, AUA)**

Za određivanje sadržaja ukupnih uronskih kiselina (AUA) potrebno je koristiti vrijednosti

utrošenih volumena NaOH prilikom određivanja ekvivalentne težine ( $V_1$ ) i metoksi skupina ( $V_2$ ). AUA sadržaj izračuna se na temelju niže napisanih formula [6 i 7]:

$$z = \frac{m \text{ (uzorak)}}{V_1 \text{ (NaOH)} \cdot c_1 \text{ (NaOH)} + V_2 \text{ (NaOH)} \cdot c_2 \text{ (NaOH)}} \quad [6]$$

$$w \text{ (AUA)} = \frac{176 \cdot 100}{z} \quad [7]$$

- **Određivanje stupnja esterifikacije (*engl.* esterification degree, DE)**

Za određivanje DE potrebno je koristiti prethodno izračunate vrijednosti sadržaja metoksi skupina i ukupnih uronskih kiselina za pojedini pektinski uzorak. DE izračuna se iz niže napisane formule [8]:

$$w \text{ (DE)} = \frac{176 \cdot \text{MeO (\%)} \cdot 100}{31 \cdot \text{AUA (\%)}} \quad [8]$$

### 3.3. STATISTIČKA ANALIZA

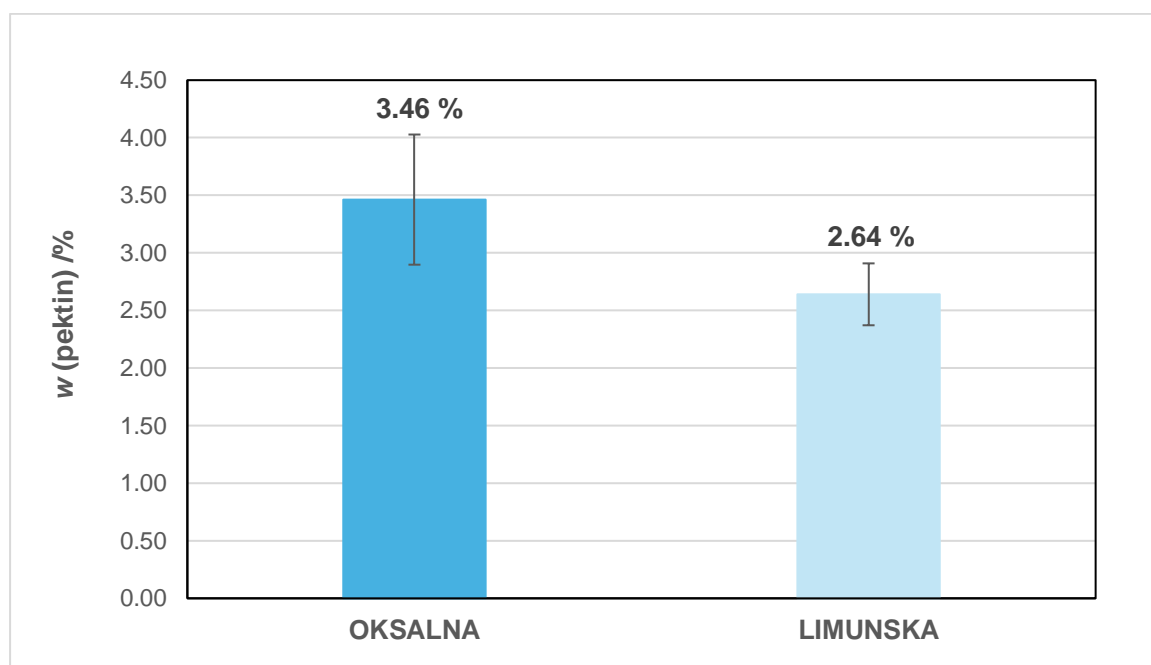
Statistička analiza je napravljena u programu Microsoft Excel (2021). Dobivene vrijednosti analizom uzoraka prikazane su kao srednja vrijednost triju paralelnih mjerenja ( $n = 3$ ) ± standardna devijacija (SD).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. PRINOS PEKTINA

Prije određivanja osnovnih parametara karakterizacije pektina, određeno je iskorištenje ekstrakcije, odnosno prinos pektina ( $w$ ). Prinost je određen neposredno nakon sušenja i usitnjavanja pektina s obzirom na početnu masu uzorka.

Budući da su uvjeti ekstrakcije bili jednaki za sve uzorke, te je korišten isti polazni materijal, možemo zaključiti kako je prinos pektina ovisan o odabranom ekstrahirajućem sredstvu. Kore naranče ekstrahirana je upotrebom dviju različitih organskih kiselina, oksalne (dvoprotonska kiselina) i limunske (troprotonska) kiseline. Iz priložene slike 5 možemo vidjeti kako je veći prinos ostvaren upotrebom oksalne kiseline (3,46 %), a nešto manji limunskom (2,64 %).



**Slika 5.** Prinost pektina dobiven nakon ekstrakcije kore naranče oksalnom i limunskom kiselinom

Radi se o slabim organskim kiselinama, međutim, konstanta disocijacije oksalne kiseline veća je od konstante disocijacije limunske kiseline, što oksalnu kiselinu čini jačom, pa je samim time i efikasnija ekstrakcija. Da je prinos pektina veći što je veća konstanta disocijacije kiseline, potvrđuje i istraživanje Cho i suradnika (2019).

Dobivene vrijednosti prinosa pektina iz kore naranče upotrebom i oksalne i limunske kiseline su niske u usporedbi s prinosima pektina izoliranih iz citrusa konvencionalnim metodama

koristeći prvenstveno vodu kao otapalo za ekstrakciju. Sulieman i suradnici (2013) navode da se vrijednosti prinosa pektina dobivenih iz citrusa kreću od 15,25 % (naranča) do 20,75 % (limun) ukoliko se ekstrahira vodom i malom količinom HCl (50 mL) 24 sata. Khule i suradnici (2012) su pokazali da se prinos pektina ekstrahiranog iz citrusa kreće između 5,29 i 18,21 %, ovisno o pH vrijednosti (pH 1,2 - 2) i omjeru pektinskog ekstrakta i etanola.

Niske vrijednosti prinosa pektina mogu se povezati i s provođenjem višekratnih filtracija tijekom izolacije pektina, prilikom kojih dio pektina zaostaje ne samo na filter papiru, nego i na stijenkama tikvica. No, neovisno o dobivenom prinosu ipak se može zaključiti da oksalna kiselina, kao jača organska kiselina, daje veći udio pektina, pa bi se i daljnja istraživanja trebala usmjeriti k njenoj primjeni te podešavanju uvjeta ekstrakcije koji bi mogli doprinijeti efikasnijoj izolaciji pektina (npr. omjer kore naranče i kiseline, jakost kiseline). Međutim, Sayah i suradnici (2014) ističu kako je limunska kiselina pogodna organska kiselina za ekstrakciju pektina jer ne samo da daje zadovoljavajuće prinose pektina, već je netoksična i ekološki prihvatljiva.

#### 4.2. BOJA PEKTINA

Boju pektina važno je odrediti iz više razloga. Prije svega, boja je indikator kvalitete pektina te utječe na izgled dobivenog gela. Na temelju boje također možemo utvrditi sadrže li pektini polifenole ili neke druge pigmente. Tako su Ninčević Grassino i suradnici (2016) pokazali kako smeđe obojeni pektini imaju veći ukupni sadržaj fenola u odnosu na bijele, odnosno svjetlije pektine. Boja pektina nam daje i informaciju o daljnjoj primjeni pektina, pa je tako svjetliji pektin pogodniji za upotrebu u prehrambenoj industriji.

Parametri boje pektina izoliranog iz kore naranče prikazani se u tablici 2. Praćena je promjena, odnosno razlika boje u odnosu na referentne (kontrolne) uzorke (jabučni i citrusni pektin) te međusobno između uzorka dobivenih ekstrakcijom različitim organskim kiselinama (oksalna i limunska).

$L$  vrijednosti pokazuju razinu svjetline uzorka, što je  $L$  vrijednost viša, uzorak je svjetliji.  $a$  vrijednost pokazuje udio crvene ( $+a$ ), odnosno zelene boje ( $-a$ ), dok  $b$  vrijednost pokazuje udio žute ( $+b$ ) i plave boje ( $-b$ ).

Prema tome, možemo zaključiti da je pektin ekstrahiran limunskom kiselinom ( $L = 85,86$ ) svjetliji od pektina ekstrahiranog oksalnom kiselinom ( $L = 77,48$ ). S druge strane, pektin ekstrahiran oksalnom kiselinom pokazuje više  $a$  i  $b$  vrijednosti ( $a = 3,12$  i  $b = 13,11$ ), što ga čini crvenijim i žućim u odnosu na pektin ekstrahiran limunskom kiselinom ( $a = 1,30$  i  $b = 8,53$ ). Vrijednosti  $\Delta L$ ,  $\Delta a$  i  $\Delta b$  daju informaciju o razlici u  $L$ ,  $a$  i  $b$  vrijednostima između uzorka pektina izoliranih iz kore naranče i referentnih uzorka. Pozitivna  $\Delta L$  vrijednost ukazuje na svjetliju boju, dok niže, odnosno negativne  $\Delta L$  vrijednosti ukazuju na tamnije obojenje. Pektin ekstrahiran



limunskom kiselinom pokazuje svjetliju boju u odnosu na referentne uzorke ( $\Delta L = 5,51$  i  $15,00$ ). S druge strane, pektin ekstrahiran oksalnom kiselinom nešto je tamniji od referentnog citrusnog pektina ( $\Delta L = -2,88$ ), no svjetliji je u odnosu na jabučni pektin ( $\Delta L = 6,62$ ). Pektini dobiveni ekstrakcijom i sa oksalnom i limunskom kiselinom jesu zeleniji ( $-\Delta a$ ) i plaviji ( $-\Delta b$ ) u odnosu na referentne uzorke, no, veći udio zelene i plave boje ipak ostaje u pektinu ekstrahiranom sa limunskom kiselinom.

Ukupna razlika obojenosti ( $\Delta E$ ) više je izražena u pektinu izoliranom limunskom kiselinom. Također, vidi se da pektin ekstrahiran limunskom kiselinom pokazuje veću razliku u tonalnosti, zasićenosti i svjetlini boje u odnosu na referentni jabučni pektin. Kad ekstrakcije oksalnom kiselinom ukupna razlika obojenosti postaje veća u odnosu na referentni citrusni pektin.

**Tablica 2.** Parametri boje određeni u uzorcima pektina dobivenih ekstrakcijom kore naranče oksalnom i limunskom kiselinom

<b>UZORCI</b>	<b><math>L_0</math></b>	<b><math>a_0</math></b>	<b><math>b_0</math></b>				
<b>CP</b>	80,35	3,60	26,21				
	<b><math>L \pm SD</math></b>	<b><math>a \pm SD</math></b>	<b><math>b \pm SD</math></b>	<b><math>\Delta L \pm SD</math></b>	<b><math>\Delta a \pm SD</math></b>	<b><math>\Delta b \pm SD</math></b>	<b><math>\Delta E \pm SD</math></b>
<b>1</b>	77,48 ± 1,26	3,12 ± 0,40	13,11 ± 0,80	-2,88 ± 1,26	-0,49 ± 0,40	-13,11 ± 0,79	13,42 ± 0,60
<b>2</b>	85,86 ± 0,52	1,30 ± 0,06	8,53 ± 0,16	5,51 ± 0,52	-2,30 ± 0,06	-17,69 ± 0,16	18,67 ± 0,31
	<b><math>L_0</math></b>	<b><math>a_0</math></b>	<b><math>b_0</math></b>				
<b>JP</b>	70,86	6,56	19,33				
	<b><math>L \pm SD</math></b>	<b><math>a \pm SD</math></b>	<b><math>b \pm SD</math></b>	<b><math>\Delta L \pm SD</math></b>	<b><math>\Delta a \pm SD</math></b>	<b><math>\Delta b \pm SD</math></b>	<b><math>\Delta E \pm SD</math></b>
<b>1</b>	77,48 ± 1,26	3,12 ± 0,40	13,11 ± 0,80	6,62 ± 1,26	-3,45 ± 0,40	-6,23 ± 0,80	9,72 ± 1,50
<b>2</b>	85,86 ± 0,52	1,30 ± 0,06	8,53 ± 0,16	15,00 ± 0,52	-5,26 ± 0,06	-10,81 ± 0,16	19,22 ± 0,51

CP - referentni uzorak citrusnog pektina; JP - referentni uzorak jabučnog pektina, 1 - pektin ekstrahiran oksalnom kiselinom; 2 - pektin ekstrahiran limunskom kiselinom

### 4.3. TOPLJIVOST PEKTINA U VODI

Rezultati topljivosti pektina u vodi (tablica 3) pokazuju vrijednosti od 92,62 % i 92,76 % za pektin ekstrahiran oksalnom, odnosno limunskom kiselinom. Vrlo slične vrijednosti dobivene su i za referente uzorke pektina, pa tako citrusni kontrolni pektin pokazuje vrijednost od 92,29 %, a jabučni 92,66 %.

Općenito, pektini su topljivi u vodi, pa će tako visoko razgranati pektini biti topljiviji od onih manje razgranatih. Pektini se neće nužno odmah otopiti u doticaju sa vodom. Na njihovu topljivost kao i koloidna svojstva pektina utječu stupanj metilacije, naboj, stupanj granjanja i sastav bočnih lanaca, stupanj polimerizacije, molekularna masa te uvjeti okoliša poput temperature i pH.

Važno je napomenuti da je pektin topljiv u čistoj vodi, ali nije topljiv u alkoholu i drugim polarnim otapalima. Upravo ovo svojstvo omogućuje dobivanje pektina iz vodenih otopina kiselina uz kontinuirano zagrijavanje.

**Tablica 3.** Topljivosti uzorka pektina u vodi (WSI) dobivenih ekstrakcijom kore naranče oksalnom i limunskom kiselinom

UZORCI	w (WSI)/%
	srednja vrijednost ± SD
1	92,62 ± 0,45
2	92,76 ± 0,22
CP	92,29 ± 0,34
JP	92,66 ± 0,49

CP - referentni uzorak citrusnog pektina; JP - referentni uzorak jabučnog pektina, 1 - pektin ekstrahiran oksalnom kiselinom; 2 - pektin ekstrahiran limunskom kiselinom

### 4.4. SADRŽAJ GALAKTURONSKE KISELINE U PEKTINU

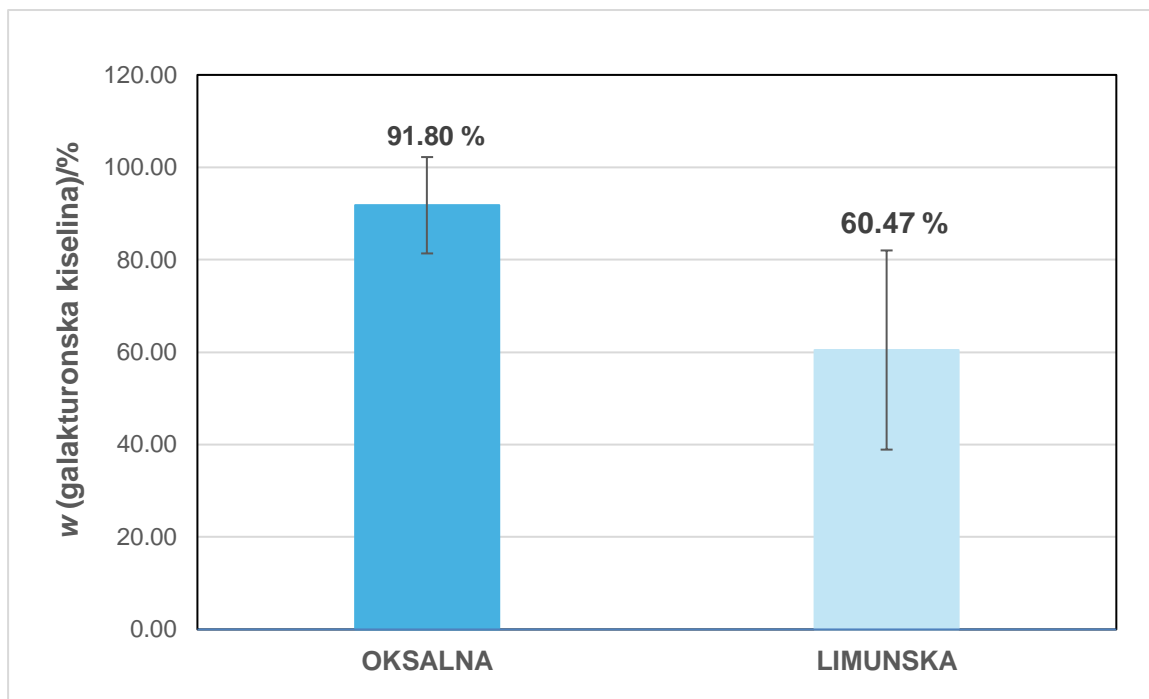
Nepoznate masene koncentracije galakturonske kiseline u otopini pektina određene su iz baždarnog dijagrama (slika 4), a zatim su dobivene vrijednosti pretvorene u g galakturonske kiseline na 100 g uzorka. Slika 6 prikazuje vrijednosti masenih udjela galakturonske kiseline u pektinu nakon ekstrakcije oksalnom i limunskom kiselinom.

Dobiveni rezultati su pokazali da pektin ekstrahiran oksalnom kiselinom sadrži znatno veći udio galakturonske kiseline (91,80 %) u odnosu na pektin ekstrahiran limunskom kiselinom

(60,47 %). Naime, u pektinskom lancu prisutan je velik broj glikozidnih veza koje imaju različitu otpornost na kiseline. Najotpornije su glikozidne veze između jedinica galakturonskih kiselina, zatim veze između galakturonskih kiselina i ramnoze, a najslabije su one između neutralnih šećera. Kiseline zapravo djeluju kao katalizatori, tj. utječu na pucanje veza između neutralnih šećera u molekulama pektina, dajući pritom pektin sa znatno višim sadržajem galakturonske kiseline. Iz tog razloga u ovom je radu oksalnom kiselinom, kao jačom od dviju korištenih organskih kiselina, dobiven veći udio galakturonske kiseline, pa možemo pretpostaviti da je njome pocijepano više veza, a time ujedno i oslobođeno više jedinica galakturonske kiseline. Industrijski pektin se ekstrahira iz kometine jabuke ili kore citrusa upotrebom anorganskih kiselina kao ekstrakcijskih sredstva pri visokim temperaturama (60 - 100 °C). Prema odredbama FAO/WHO (FAO/WHO, 2016) pektin mora sadržavati najmanje 65 % galakturonske kiseline kako bi se mogao upotrijebiti kao dodatak hrani ili u farmaceutске svrhe.

Kiseline uglavnom imaju prednost kao sredstva za ekstrakciju jer će dobiveni pektini biti bogati galakturonskom kiselinom, što ukazuje i na veću čistoću uzorka (Yapo, 2007). Budući da je galakturonska kiselina pokazatelj čistoće pektina, može se zaključiti da korištenjem oksalne kiseline, ne samo da dobivamo veći udio galakturonske kiseline, već i pektin veće čistoće.

Također, ovisno koriste li se anorganske ili organske kiseline, sadržaj galakturonske kiseline varira. Yapo (2009) je pokazao kako pektin ekstrahiran iz marakuje anorganskim kiselinama (sumporna i nitratna), sadrži veći udio galakturonske kiseline, nego onaj dobiven upotrebom limunske kiseline. Pham i suradnici (2021) su pokazali da je upotrebom jače organske kiseline, limunske kiseline, pri ekstrakciji pektina iz kore pomela udio galakturonske kiseline (76,5 - 85,0 %) veći nego pri ekstrakciji slabijom octenom (65,1 - 68,2 %) ili mliječnom kiselinom (60,4 - 65,8 %).



**Slika 6.** Maseni udio galakturonske kiseline u uzorcima pektina dobivenih ekstrakcijom kore naranče oksalnom i limunskom kiselinom

#### 4.5. EKVIVALENTNA TEŽINA, SADRŽAJ METOKSI SKUPINA, URONSKE KISELINE I STUPANJ ESTERIFIKACIJE U UZORCIMA PEKTINA

Karakterizacija pektina koji je ekstrahiran oksalnom kiselinom pokazuje da ekvivalentna težina iznosi  $463.88 \text{ g mol}^{-1}$ , udio metoksila 6,69 %, udio ukupnih uronskih kiselina 48,56 % i stupanj esterifikacije 78,28 %. Provođenjem ekstrakcije limunskom kiselinom ekvivalentna težina je znatno veća i iznosi  $1022,26 \text{ g mol}^{-1}$ , dok su ostale veličine manje. Udio metoksila iznosi 3,03 %, udio ukupnih uronskih kiselina 31,29 %, a stupanj esterifikacije 56,04 % (tablica 4).

**Tablica 4.** Osnovni parametri pri karakterizaciji pektina dobivenog ekstrakcijom kore naranče oksalnom i limunskom kiselinom

UZORCI	EW/(g mol <sup>-1</sup> ) ± SD	w (MeO)/% ± SD	w (AUA)/% ± SD	w (DE)/% ± SD
1	463,88 ± 24,43	6,69 ± 0,35	48,56 ± 0,97	78,28 ± 5,70
2	1022,26 ± 29,22	3,03 ± 0,09	31,29 ± 5,48	56,04 ± 11,42

1 - pektin ekstrahiran oksalnom kiselinom; 2 - pektin ekstrahiran limunskom kiselinom

Ekvivalentna težina (EW) je manja upotrebom jače organske kiseline (oksalne) kao ekstrakcijskog sredstva. Muthukumar i suradnici (2017) navode da je razlog niže ekvivalente težine pri nižem pH polimerizacija pektina. Viša temperatura također rezultira nižom ekvivalentnom težinom (Alma i sur., 2023). U radu Bakhrul i suradnika (2023) je navedeno da bi ekvivalentna masa pektina trebala biti od 600 do 800 mg, pa se može zaključiti da pektin dobiven u ovom radu ne zadovoljava postavljene vrijednosti.

Što se tiče vrijednosti stupnja esterifikacije, ekvivalentna težina je obrnuto proporcionalna DE vrijednostima, odnosno što je DE vrijednost viša, to je EW vrijednost niža, što pokazuju rezultati prikazani u tablici 4. S obzirom na stupanj esterifikacije (DE), pektin može biti visoko metoksilni (DE > 50 %) ili nisko metoksilni (DE < 50 %). Prema dobivenim rezultatima (tablica 4), pektin dobiven nakon ekstrakcije i oksalnom i limunskom kiselinom pripada visoko metoksiliranim pektinima te može stvarati gel pri niskim pH vrijednostima (pH od 2 do 3,5) uz visoke udjele šećera (> 55 %) (Jong, 2023). U odnosu na ovo istraživanje Sayah i suradnici (2016) dobivaju vrijednosti DE između 63,29 i 75 % za pektin ekstrahiran iz kore naranče te 70,73 do 75,53 % za pektin ekstrahiran iz kore grejpa.

Što se tiče ukupnih uronskih kiselina (AUA), sadržaj AUA u pektinu prema IPPA standardima (2001) ne bi smio biti manji od 65 %. Dobiveni pektini (tablica 4) ne zadovoljavaju ovaj standard, stoga se ne mogu koristiti kao dodaci u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji jer nisu dovoljno čisti.

Sadržaj metoksila utječe na čvrstoću i stabilnost formiranog gela. Pektin se smatra visoko metoksilnim ukoliko je sadržaj metoksila veći ili jednak 7 %. Podaci pokazani u tablici 4 pokazuju kako su dobiveni pektini nisko metoksilni ( $w(\text{MeO}) = 6,69$  i  $3,03$  %). Azad i suradnici (2014) su pokazali da utjecaj zrelosti voća (limuna) utječe na sadržaj metoksila te utvrdili da pektin dobiven ekstrakcijom nezrelog voća ima najveći sadržaj metoksila (10,25 %).

Prema istraživanju Alama i suradnika (2023) udio metoksila iznosi 8,43 % kod ekstrakcije pektina iz kore naranče klorovodičnom kiselinom (pH 2). Baraiya i suradnici (2023) su pokazali da izolirani citrusni pektini (sedam uzoraka) imaju visoke udjele metoksila (23,25 - 38,75 %), a k tome i vrlo visoke vrijednosti ekvivalentne težine (preko 1000), te stupanj esterifikacije manji od 50 %. Također su pokazali da uzorci pektina izolirani iz sedam vrsta citrusa imaju sadržaj AUA veći od 65 %, pa se može zaključiti kao MeO, AUA i DE sadržaj varira i ovisi o vrsti citrusa kao i o uvjetima provođenja ekstrakcija.

## 5. ZAKLJUČCI

Nakon provedene ekstrakcije pektina iz kore naranče korištenjem dviju organskih kiselina, može se zaključiti:

1. Veći prinos pektina dobiven je nakon ekstrakcije oksalnom kiselinom.
2. Ekstrakcija oksalnom kiselinom pokazala se uspješnijom s obzirom na kvalitetu pektina.
3. Topljivost pektina u vodi nakon ekstrakcije oksalnom i limunskom kiselinom je vrlo slična i iznosi 92,62 %, odnosno 92,76 %.
4. Pektin ekstrahiran limunskom kiselinom svjetliji je od pektina ekstrahiranog oksalnom kiselinom.
5. S obzirom na vrijednosti ekvivalentne težine i ukupnih uronskih kiselina, pektin ne zadovoljava IPPA standardne vrijednosti stoga se ne može koristiti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.
6. Veći udio galakturonske kiseline sadržan je u pektinu ekstrahiranom oksalnom kiselinom i iznosi 91,80 %.
7. Dobiven pektin pripada pektinima s visokim stupnjem esterifikacije, stoga može stvarati gel pri niskim pH vrijednostima.

## 6. POPIS LITERATURE

Abbott DW, Farnell B, Yamashita JW (2014) Pectin: Structure, modification and the human distal gut microbiota. U: Bush PL (ured.) Pectin: Chemical Properties, Uses and Health Benefits, Nova Science Publishers, Inc., New York, str. 83-116.

Alba K, MacNaughtan W, Laws AP, Foster TJ, Campbell GM, Kontogiorgos V (2018) Fractionation and characterisation of dietary fibre from blackcurrant pomace. *Food Hydrocoll* **81**, 398-408. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.03.023>

Azad AKM, Ali MA, Akte MS, Rahman MJ, Ahmed M (2014) Isolation and Characterization of Pectin Extracted from Lemon Pomace during Ripening. *J. Food Nutr Sci* **2**, 30-35. <https://doi.org/10.11648/j.jfns.20140202.12>

Bakhrul AY, Tankoiko S, Matlubah US, Agustina E, Hidayati I, Andiarna F (2023) Isolation and Characterization of Pectin from Orange Peel (Citrus Sp.). U: Proceedings The 3<sup>rd</sup> International Conference on Sustainable Health Promotion, **3**, Surabaya, str. 245-252. <https://proceedings.uinsa.ac.id/index.php/ICOSHPRO/article/view/1429>

Banerjee J, Singh R, Vijayaraghavan R, MacFarlane D, Patti AF, Arora A (2017) Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. *Food Chem* **225**, 10-22. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.12.093>

Banerjee J, Vijayaraghavan R, Arora A, MacFarlane DR, Patti AF (2016) Lemon Juice Based Extraction of Pectin from Mango Peels: Waste to Wealth by Sustainable Approaches., *ACS Sustainable Chem Eng* **4**, 5915-5920. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01342>

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

Cho EH, Jung HT, Lee BH, Kim HS, Rhee JK, Yoo, SH (2019). Green process development for apple-peel pectin production by organic acid extraction. *Carbohydr Polym* **204**, 97-103. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.09.086>

Christiaens S, Uwibambe D, Uyttebroek M, van Droogenbroeck B, van Loey AM, Hendrickx ME (2015) Pectin characterisation in vegetable waste streams: A starting point for waste valorisation in the food industry. *LWT - Food Sci Technol* **61**, 275-282. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2014.12.054>



Contesini F, Melo R, Lopes D, Junior J, Kawaguti H, Berger Ceresino E (2014) Pectin: An Efficient Matrix for Cell and Enzyme Immobilization. U: Bush PL (ured.) Pectin: Chemical Properties, Uses and Health Benefits, Nova Science Publishers, Inc., New York, str. 49-63.

Denman L, Morris G (2015) An experimental design approach to the chemical characterisation of pectin polysaccharides extracted from Cucumis melo Inodorus. *Carbohydr Polym* **117**, 364-369. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.081>

FAO/WHO (2016) Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), <<https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/Home/Chemical/3043>>. Pristupljeno 30. lipnja 2024.

Flutto L (2003) PECTIN: Properties and Determination. U: Benjamin Caballero (ured.) Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, 2. izd., str. 4440-4449. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00901-9>

Fraeye I, Duvetter T, Doungra E, van Loey A, Hendrickx M (2010) Fine-tuning the properties of pectin-calcium gels by control of pectin fine structure, gel composition and environmental conditions. *Trends Food Sci Technol* **21**, 219-228. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.02.001>

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

Hodgson AS, Kerr LH (1991) Tropical Fruit Products. U: Reginald H. Walter (ured.) The Chemistry and Technology of Pectin, Academic press, Inc., San Diego, str. 67-86.

Iñiguez-Moreno M, Pizaña-Aranda JJP, Ramírez-Gamboa D, Ramírez-Herrera CA, Araújo RG, Flores-Contreras EA i sur. (2024) Enhancing pectin extraction from orange peel through citric acid-assisted optimization based on a dual response. *Int J Biol Macromol* **263**, 130230. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2024.130230>

IPPA (2001) Facts About Pectin. IPPA - International Pectin Producers' Association, <<http://www.ippa.info/index.htm>>. Pristupljeno 1. srpnja 2024.

Jong SH, Abdullah N, Muhammad N (2023) Effect of acid type and concentration on the yield, purity, and esterification degree of pectin extracted from durian rinds. *Results Eng* **17**, 100974. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rineng.2023.100974>

Khule NR, Mahale N, Shelar DS, Rokade MM, Chaudhari SR (2012) Extraction of pectin from citrus fruit peel and use as natural binder in paracetamol tablet. *Phar Lett* **4**, 558-564.

Lalnunthari C, Devi LM, Badwaik LS (2020) Extraction of protein and pectin from pumpkin industry by-products and their utilization for developing edible film. *J Food Sci Tech* **57**, 1807-1816. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04214-6>

Liew SQ, Chin NL, Yusof YA (2014) Extraction and Characterization of Pectin from Passion Fruit Peels. *Agric Sci Procedia* **2**, 231-236. <https://doi.org/10.1016/J.AASPRO.2014.11.033>

Marić M, Grassino AN, Zhu Z, Barba FJ, Brnčić M, Rimac Brnčić S (2018) An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends Food Sci Technol* **76**, 28-37. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.03.022>

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

Morris GA, Foster TJ, Harding SE (2000) The effect of the degree of esterification on the hydrodynamic properties of citrus pectin. *Food Hydrocoll* **14**, 227-235. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(00\)00007-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(00)00007-2)

Morris G, Binhamad H (2020) Isolation and Characterisation of Pectin, U: Kontogiorgos V (ured.) Pectin: Technological and Physiological Properties, Springer Nature Switzerland, str. 61-82.

Muthukumar C, Banupriya L, Harinee S, Sivaranjani S, Govindasamy S, Sekar R i sur. (2017) Pectin from muskmelon (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) peels: extraction optimization and physicochemical properties. *3 Biotech* **7**, 66. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0655-3>

Ninčević Grassino A, Halambek J, Djaković S, Rimac Brnčić S, Dent M, Grabarić Z (2016) Utilization of tomato peel waste from canning factory as a potential source for pectin production and application as tin corrosion inhibitor. *Food Hydrocoll* **52**, 265-274. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.06.020>

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

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

Pagliari M, Ciriminn R, Fidalgo A, Delisi R, Ilharco L. (2016) Pectin Production and Global Market. *Agro Food Ind Hi Tech* **27**, 17-20.

Picauly P, Tetelepta G (2021) Characterization of pectin from tongka langit banana peels with various extraction temperature. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* **883**, 012060. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/883/1/012060>

Regulation (EU) No. 231/2012 laying down specifications for food additives listed in Annexes II and III to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council 1. European Commission 9 March 2012.

Rodríguez Robledo V, Castro Vázquez IL (2020) Pectin - Extraction, Purification, Characterization and Applications - IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85588>.  
Pristupljeno 1. srpnja 2024.

Rolin C (1993) Pectin. U: Whistler RL, Bemiller JN (ured.) *Industrial Gums*, 3. izd., Academic Press., str. 257–293

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

Sañudo Barajas JA, González Ayón MA, Velez R, Verdugo-Perales M, Valenzuela Lagarda JL, Allende R (2014) Pectins: From the gelling properties to the biological activity. U: Bush PL (ured.) *Pectin: Chemical Properties, Uses and Health Benefits*, Nova Science Publishers, Inc., New York, str. 203-224.

Sayah M, Chabir R, Benyahia H, Kandri Y, Fouad O, Touzani H i sur. (2016). Yield, Esterification Degree and Molecular Weight Evaluation of Pectins Isolated from Orange and Grapefruit Peels under Different Conditions. *PLoS One* **11**, e0161751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161751>

Sayah M, Chabir R, El Madani N, Rodi El Kandri Y, Kandri E, Fouad O i sur. (2014) Comparative Study on Pectin Yield According To the State of the Orange Peels and Acids

Used. *Int J Innov Res Sci Eng Technol* **3**, 15658-15665.  
<https://doi.org/10.15680/IJRSET.2014.0308078>

Sriamornsak P (2003) Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: A review. *Silpakorn University International Journal* **3**, 206-228.  
[https://www.researchgate.net/publication/215872059\\_Chemistry\\_of\\_pectin\\_and\\_its\\_pharmaceutical\\_uses\\_A\\_review](https://www.researchgate.net/publication/215872059_Chemistry_of_pectin_and_its_pharmaceutical_uses_A_review)

Sulieman AM, Khodari K, Salih Z (2013) Extraction of Pectin from Lemon and Orange Fruits Peels and Its Utilization in Jam Making. *Int J Food Sci Nutr Eng* **5**, 81-84.  
<https://doi.org/10.5923/j.food.20130305.01>

Tiwari A, Nath S, Katiyar DS (2017) Extraction and Characterization of Pectin from Orange Peels. *Int J Biotechnol Biochem* **13**, 39-47.

Tütem E, Sözgen Başkan K, Karaman Ersoy Ş, Apak R (2020) Orange. U: Jaiswal AK (ured.), *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables*, 1.izd., Academic Press., str. 353-376.

Valle M, Cámara M, Torija M (2006) Chemical characterization of tomato pomace. *J Sci Food Agric* **86**, 1232-1236. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2474>

Wicker L, Kim Y, Kim MJ, Thirkield B, Lin Z, Jung J (2014) Pectin as a bioactive polysaccharide - Extracting tailored function from less. *Food Hydrocoll* **42**, 251-259.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.002>

Yang Y, Wang Z, Hu D, Xiao K, Wu JY (2018) Efficient extraction of pectin from sisal waste by combined enzymatic and ultrasonic process. *Food Hydrocoll* **79**, 189-196.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.051>

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

Yapo BM, Robert C, Etienne I, Wathelet B, Paquot M (2007) Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. *Food Chem* **100**, 1356-1364. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.012>

Younis H, Zhao G, Abdellatif H (2022) Pectin and Its Applicability in Food Packaging. U: In Var I, Uzunlu S (ured.) A Glance at Food Processing Applications - IntechOpen <https://doi.org/10.5772/intechopen.101614>. Pristupljeno 5. srpnja 2024.

## Izjava o izvornosti

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

Magdalena Hanžek

---

Vlastoručni potpis