

Bioaktivni potencijal i sastav ugljikohidratne frakcije obične trske (*Phragmites australis*)

Zrnić, Karla

Master's thesis / Diplomski 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:159:979547>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-30**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2024.

Karla Zrnić

**BIOAKTIVNI POTENCIJAL I SASTAV
UGLJIKOHIDRATNE FRAKCIJE OBIČNE
TRSKE (*Phragmites australis*)**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta pod mentorstvom doc. dr. sc. Aleksandre Vojvodić Cebin.

Ovaj rad napravljen je u sklopu projekta „Biorafinerijski sustav za proizvodnju biogoriva i biokemikalija iz neprehrambenih lingoceluloznih sirovina” (Biorefinery-NFLRM; IP-2022-10-3075), voditelja prof. dr. sc. Božidara Šanteka (PBF), financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

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

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

BIOAKTIVNI POTENCIJAL I SASTAV UGLJIKOHIDRATNE FRAKCIJE OBIČNE TRSKE (*Phragmites australis*)

Karla Zrnić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058216186

Sažetak: Obična trska (*Phragmites australis*) je biljka vodenih staništa koja je kroz povijest korištena u razne svrhe. Danas se sve više istražuje njezin potencijal u proizvodnji bioplina, za pročišćavanje otpadnih voda i bioremedijaciju tla. Cilj ovog rada bio je karakterizirati polifenolnu i ugljikohidratnu frakciju obične trske. Provedena je ekstrakcija različitih dijelova biljke (cijela trska, cvijet, list i stabljika) te su određeni udjeli ukupnih i pojedinačnih polifenola (slobodni i vezani) te antioksidacijski kapacitet. Analizom monomernog profila te udjela vlakana, dobiven je uvid u sastav i udio strukturnih ugljikohidrata. Polifenolni profil svih dijelova trske bio je jednak te su određeni rutin, kvercetin-3-glukozid i kvercetin, čiji udio je bio najveći u listu trske, a najmanji u stabljici trske. Dodatak etanola pozitivno je utjecao na ekstrakcijski prinos navedenih spojeva. Nestrukturne ugljikohidrate činili su glukoza, fruktoza i maltoza, u ukupnom udjelu od 4,6 % s.tv. Hemiceluloza arabinoksilanskog tipa je bila najzastupljeniji strukturni polisaharid (~26 % s.tv.).

Ključne riječi: ekstrakcija, obična trska, *Phragmites australis*, polifenolni spojevi, strukturni ugljikohidrati

Rad sadrži: 54 stranice, 12 slika, 7 tablica, 85 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: doc. dr. sc. Aleksandra Vojvodić Cebin

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Božidar Šantek (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Aleksandra Vojvodić Cebin (mentor)
3. prof. dr. sc. Draženka Komes (član)
4. izv. prof. dr. sc. Antonija Trontel (zamjenski član)

Datum obrane: 16.12.2024.

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

Graduate university study programme: Food Engineering

BIOACTIVE POTENTIAL AND CARBOHYDRATE FRACTION COMPOSITION OF COMMON REED
(*Phragmites australis*)

Karla Zrnić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058216186

Abstract: Common reed (*Phragmites australis*) is a wetland plant and has been used for various purposes throughout history. Nowadays, its potential in the production of biofuels, wastewater purification, and soil bioremediation has been increasing. This work aimed to characterize the polyphenolic and carbohydrate fractions of common reed. Different parts of the plant (whole reed, flower, leaf and stem), were analyzed for total and individual phenolics (free and bound) and antioxidant capacity, upon extraction. Monomeric composition profiling and fibre analysis enabled the determination of nonstructural and structural carbohydrates. The analyzed parts of the reed did not differ with respect to the polyphenolic profile. Rutin, quercetin-3-glucoside and quercetin were identified, exhibiting the highest content in reed leaf while the lowest in reed stem. The addition of ethanol enhanced the extractability of these compounds. Nonstructural carbohydrates were comprised of glucose, fructose and maltose, reaching 4,6 % dmb. Arabinoxylan-type hemicellulose was the most abundant hemicellulosic polysaccharide (~26 % dry matter).

Keywords: extraction, common reed, *Phragmites australis*, polyphenolic compounds, structural carbohydrates

Thesis contains: 54 pages, 12 figures, 7 tables, 85 references, 1 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: Aleksandra Vojvodić Cebin, PhD, Assistant professor

Reviewers:

1. Božidar Šantek, PhD, Full professor (president)
2. Aleksandra Vojvodić Cebin, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Draženka Komes, PhD, Full professor (member)
4. Antonija Trontel, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 16.12.2024.

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE	2
2.1.1. Komponente lignoceluloznih sirovina	2
2.1.1.1. Struktura stanične stijenske	2
2.1.1.2. Celuloza	4
2.1.1.3. Hemiceluloza	4
2.1.1.4. Lignin	5
2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI	5
2.2.1. Flavonoidi	7
2.2.2. Kvercetin	8
2.2.3. Rutin	8
2.3. OBIČNA TRSKA (<i>Phragmites australis</i>)	9
2.3.1. Karakteristike obične trske	10
2.3.2. Primjena obične trske	11
2.3.3. Polifenoli obične trske	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJAL	14
3.1.1. Uzorci	14
3.1.2. Kemikalije	14
3.1.3. Aparatura i pribor	18
3.2. METODE	21
3.2.1. Određivanje udjela suhe tvari	21
3.2.2. Priprema ekstrakata slobodnih polifenolnih spojeva	22
3.2.2.1. Konvencionalna ekstrakcija	22
3.2.2.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima	23
3.2.2.3. Priprema alkoholno-netopljivog ostatka (AIR)	23
3.2.3. Alkalna hidroliza alkoholno-netopljivog ostatka	24
3.2.4. Karakterizacija bioaktivnog sastava ekstrakata	25
3.2.4.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola	25
3.2.4.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	26
3.2.4.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom	27
3.2.4.4. Određivanje udjela slobodnih i vezanih polifenola primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-DAD)	28
3.2.5. Karakterizacija ugljikohidratne frakcije	29
3.2.5.1. Određivanje udjela vlakana	29
3.2.5.2. Određivanje monomernog sastava strukturnih ugljikohidrata	33
3.2.5.2.2. Derivatizacija monosaharida 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on (PMP) reagensom	34
3.2.5.2.3. Analiza PMP derivata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-DAD)	34
3.2.5.3. Određivanje udjela nestrukturnih ugljikohidrata	35
3.2.6. Obrada podataka	36
4. REZULTATI I RASPRAVA	36
4.1. BIOAKTIVNI SASTAV OBIČNE TRSKE	36
4.1.1. Udio ukupnih polifenola	36
4.1.2. Antioksidacijski kapacitet	39
4.1.3. Udio pojedinačnih slobodnih polifenolnih spojeva	41

4.1.4. Udio vezanih polifenolnih spojeva	43
4.2. SASTAV UGLJIKOHIDRATNE FRAKCIJE	44
4.2.1. Sastav i udio nestrukturnih ugljikohidrata	45
4.2.2. Sastav i udio strukturnih ugljikohidrata	46
5. ZAKLJUČCI.....	49
6. LITERATURA.....	50
7. PRILOZI	

1. UVOD

Obična trska (*Phragmites australis*) je biljka močvarnih i vodenih staništa, a rasprostranjena je u cijelom svijetu, osim na Antarktici. Ljudi su tisućljećima koristili trsku za gradnju kuća i brodova, što se zadržalo i do danas, posebno u tradiciionalnim kulturama, dok se industrijski danas najčešće koristi kao obnovljiva sirovina za proizvodnju energije. Uz to, može se koristiti i kao stočna hrana, gnojivo u poljoprivredi, za pročišćavanje otpadnih voda te u proizvodnji papira. Obična trska pripada skupini neprehrambenih lignoceluloznih sirovina koje se smatraju najdostupnijim obnovljivim organskim resursom, koji se može koristiti za konverziju u biogoriva i visokovrijedne proizvode kao što su industrijski enzimi, organske kiseline, farmaceutski proizvodi i kemikalije te vanilin. Upravo zato, istraživanja takvih materijala, uključujući i trsku, proširuju spoznaje o potencijalu njihove primjene, kroz biotehnoške procese, ali i kao inovativnih sirovina u prehrambenoj industriji. Također je u zadnje vrijeme sve više znanstvenih istraživanja orijentirano na izdvajanje bioaktivnih spojeva, posebno polifenola, iz različitih biljnih materijala te na njihovo daljnje implementiranje u različite prehrambene proizvode. Polifenoli su važne molekule za fiziologiju biljaka, budući da su uključene u različite funkcije poput rasta, pigmentacije, rezistencije na patogene i druge. Polifenolni spojevi nalaze se u različitim dijelovima biljaka, imaju brojna svojstva koja su iznimno korisna za ljudsko zdravlje, među kojima se ističe antioksidacijski učinak. Ugljikohidrati, posebice strukturni polisaharidi, su skupina spojeva koja ima važnu, strukturnu ulogu u biljnim stanicama. Imaju i veliku mogućnost primjene u prehrambenoj industriji, pogotovo u tehnološkom smislu, ali se sve češće koriste i kao funkcionalni dodaci, u obliku vlakana ili funkcionalnih oligosaharida. Također su korisni u industriji kao izvor fermentabilnih šećera za dobivanje različitih vrsta proizvoda.

U skladu s navedenim, cilj ovog rada bio je odrediti bioaktivni potencijal obične trske te karakterizirati njezinu ugljikohidratnu frakciju kako bi se proširile dosadašnje spoznaje o valorizacijskom potencijalu ove lignocelulozne sirovine. Ovo istraživanje sukladno je tendencijama pronalaska novih izvora funkcionalnih komponenti, konkretno polifenola, te obnovljivih izvora za proizvodnju bioenergije, biokemikalija i biogoriva.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE

Lignocelulozna biomasa je nejestivi biljni materijal, dominantno sastavljen od polisaharida - celuloze (25 - 50 %) i hemiceluloze (20 - 40 %) te lignina (10 - 35 %) koji su osnovne strukturne jedinice biljnih staničnih stijenki takvih materijala (Sluiter i sur., 2010). Karakterizira ju kompleksna građa u kojoj je celuloza uklopljena u gustu mrežu međusobno povezanih hemiceluloze i lignina, a prisutnost kristaliničnih regija te hidrofoban karakter lignina čini ju vrlo čvrstom i otpornom, posebice prema enzimskoj razgradnji. Lignoceluloza je najzastupljenija komponenta biljne biomase i predstavlja lako dostupan obnovljivi izvor za različite namjene (Salvachua i sur., 2011). Lignocelulozne sirovine čine različiti poljoprivredni ostatci (agro-industrijski otpad), zatim drveni otpad i trave (Kumar i sur., 2017). Iako se često smatra otpadnim materijalom, značaj lignoceluloznih sirovina sve više raste temeljem brojnih istraživanja njihove ponovne primjene, prvenstveno kroz biotehnologiju, ali i prehrambenu tehnologiju. Kako bi se lignocelulozna biomasa mogla bolje iskoristiti, često se primjenjuju različite metode predobrade, a mogu uključivati fizikalne, fizikalno-kemijske, kemijske i biološke postupke. Lignocelulozne sirovine mogu se koristiti u različitim proizvodnim procesima: za dobivanje kemikalija (octena, limunska i fumarna kiselina, aceton, etanol, butanol, glicerol), biogoriva (bioplin, biodizel, bioetanol), enzima (celulaza, ksilanaza, hemicelulaza) te ostalih proizvoda visoke vrijednosti (ksilitol, furfural, galna kiselina, vanilin) (Howard i sur., 2003). Lignoceluloznih sirovina koje se mogu koristiti u navedene svrhe je zaista mnogo te se intenzivno istražuju nove potencijalno vrijedne sirovine, među kojima je i obična trska.

2.1.1. Komponente lignoceluloznih sirovina

2.1.1.1. *Struktura stanične stijenke*

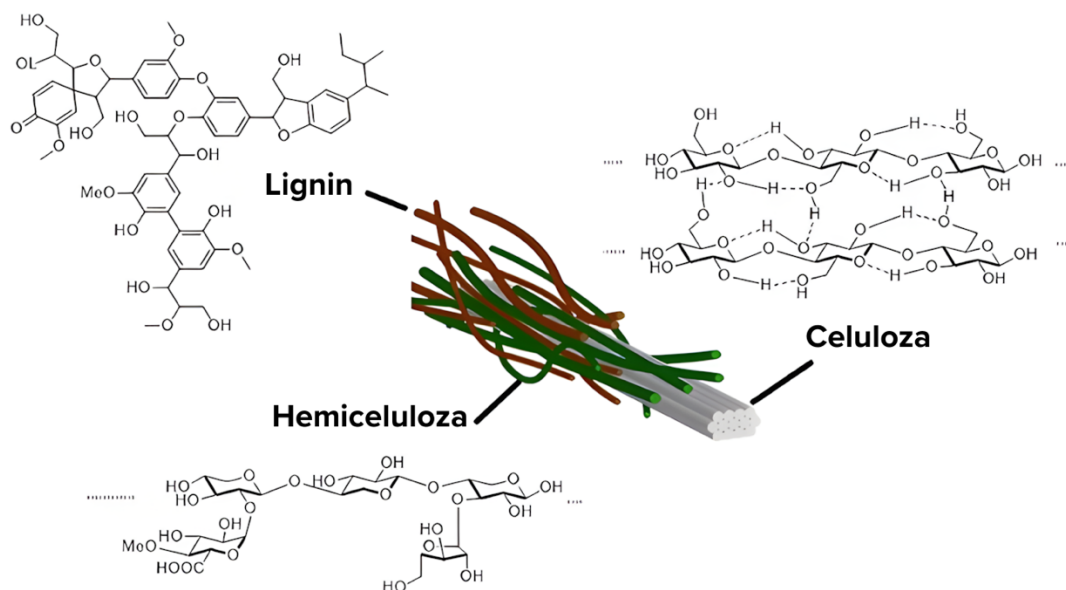
Stanična stijenka primarno određuje oblik i veličinu stanice te teksturu tkiva i izgled biljnih organa (Lazarević i Poljak, 2019). Odgovorna je za vrlo važne uloge u samoj biljci pa tako pruža otpornost stanice na mehanički stres, zaštitu od patogenih mikroorganizama te regulira prolaz signalnih molekula u stanicu, a dovoljno je porozna da omogući cirkulaciju vode, mikronutrijenata i mineralnih tvari. (Levy i sur., 2002). Stanična stijenka je građena od polisaharida, glikoproteina i anorganskih tvari, a njezini enzimi omogućavaju komunikaciju između stanica te transport i sekreciju tvari iz stanice (Lazarević i Poljak, 2019). Građa stanične stijenke uključuje tri sloja,

središnju lamelu te primarnu i sekundarnu staničnu stijenku, a ovisno o građi i tipu stanične stijenke moguće je odrediti funkciju stanice.

Kako bi se osiguralo kretanje tvari u stanicu i iz stanice, one moraju biti povezane na koherentan način, a tu adheziju omogućuje središnja lamela koja je najudaljenija od središta stanice, a većinski se sastoji od lignina koji je povezan s malim udjelom pektina, hemiceluloze i celuloze (Rytioja i sur., 2014).

Primarna stanična stijenka je poprilično tanka (30-100 nm), građena je od celuloznih mikrofibrila i karakteristična je za stanice koje se dijele i rastu te za stanice koje su uključene u metaboličke procese kao što su fotosinteza i skladištenje (Rytioja i sur., 2014). Vrlo je važna za regeneraciju i zacjeljivanje rana na biljci jer omogućuje diobu stanica i diferencijaciju tkiva. U primarnoj staničnoj stijenci dominiraju polisaharidi, a uglavnom se sastoji od lignina, pektina i hemiceluloze.

Sekundarna stanična stijenka karakteristična je za stanice koje imaju mehaničku ulogu te za one koje sudjeluju u transportu vode. Glavna komponenta sekundarne stanične stijenke je celuloza, a ne sadrži pektin i strukturne proteine, što ju čini čvrstom i zbog toga nije uopće elastična. U nju se ugrađuje lignin koji također povećava čvrstoću i nepropusnost za vodu te otpornost na patogenu razgranju stanične stijenke (Rose, 2003). Zbog kompleksnih međusobnih interakcija i veza između polisaharida koji čine staničnu stijenku lignoceluloza (Slika 1), nije jednostavno izdvojiti pojedine polisaharidne frakcije kao što su celuloza, hemiceluloza i lignin.



Slika 1. Struktura i komponente lignoceluloznih sirovina (*prema* Li i Takkellapati, 2018)

2.1.1.2. Celuloza

Celuloza je najrasprostranjenija obnovljiva organska molekula na zemlji i najzastupljeniji polisaharid u staničnoj stijenci (Sharma, 2015). Ona je nerijetko i sastavni dio određenih bakterija, algi i životinja, poput plaštenjaka. Prema molekulskoj strukturi, celuloza je linearni homopolimer građen od molekula glukoze povezanih β -1,4-glikozidnim vezama, a takvi dugački lanci polisaharida glukoze međusobno su povezani vodikovim vezama, pri čemu tvore celulozne mikrofibrile (Lazarević i Poljak, 2019). Pravilno povezane i visoko uređene jedinice mikrofibrila tvore kristaliničnu strukturu celuloze, a područja na kojima je ta struktura narušena ili prekinuta, nazivaju se amorfna područja. Mikrofibrili su obavijeni hemicelulozom i ligninom te tvore kompleksnu strukturu koja pruža dodatnu otpornost biljnoj stanici (Wada i sur., 2008). Broj jedinica glukoze u molekuli celuloze naziva se stupanj polimerizacije, a ovisno o izvoru i prethodnoj obradi lignocelulozne sirovine, može varirati između 250 i 1000. Celuloza, prisutna u staničnoj stijenci, je cjevastog izgleda, a celulozni lanci su povezani uz pomoć vodikovih veza te najčešće sadrže 60 do 80 molekula celuloze (Chen, 2014). Celuloza ima veliki potencijal kao obnovljivi izvor energije, a razgradnjom do fermentabilnih šećera, odnosno glukoze, može služiti u proizvodnji biogoriva (Sharma, 2015). S obzirom da je ona najzastupljeniji polisaharid u prirodi, cijena joj je relativno niska te je zbog toga veliki potencijal za razne industrijske primjene, posebno u proizvodnji kemikalija. Zbog svoje netopljivosti u vodi, razrijeđenim kiselinama i lužinama, pri sobnoj temperaturi, celuloza predstavlja izazov u tehnološkoj proizvodnji. Da bi se nadvladala izrazita fizikalna i kemijska stabilnost celuloznih sirovina potrebno je uključiti celulolitičke enzime i hidrolizu celuloze, a dobiveni šećeri se potom mogu fermentirati uz mikrobiološke i enzimske procese.

2.1.1.3. Hemiceluloza

Za razliku od celuloze koja je homopolimer, hemiceluloza je heteropolimer kompleksne strukture, a građena je od monosaharida kao što su glukoza, manoza, galaktoza, ksiloza, arabinoza, fukoza te glukuronske i galakturonske kiseline i drugih (Ebringerova i Heinze, 2000). Hemiceluloze često dobivaju naziv prema šećerima koji prevladavaju u njihovoj strukturi pa tako postoje arabinoglukuronoksilan, arabinogalaktan, glukuronoksilan, galaktoglukomanan i drugi. Hemicelulozu čine lanci od 500 do 3000 šećernih jedinica koji su isprepleteni i povezani s drugim polisaharidima, ligninom i proteinima u razgranatu strukturu. Okosnicu hemiceluloze, odnosno središnji lanac u većini slučajeva čine molekule glukoze, ksiloze ili manoze povezane β -1,4-

glikozidnim vezama. Najčešći polisaharid u hemicelulozi je ksilan, a najzastupljenija hemiceluloza ksiloglukan (Lazarević i Poljak, 2019). Hemiceluloze ksilanskog tipa imaju brojna funkcionalna svojstva koja se mogu primijeniti u prehrambenoj industriji, ali i drugdje. Mogu se koristiti kao prehrambena vlakna, u proizvodnji filmova u svrhu produljenja trajnosti proizvoda, poboljšivači u proizvodnji pekarskih proizvoda te kao stabilizatori emulzija ulje u vodi (Li i sur., 2011). Ostali tipovi hemiceluloze pronašli su svoje mjesto kao premazi, želirajući i stabilizirajući agensi te aditivi za povećanje viskoznosti i brojne druge mogućnosti.

2.1.1.4. Lignin

Lignin je sastavni dio stanične stijenke biljaka, aromatski heteropolimer sastavljen od fenolnih monomera, vrlo složene amorfnе građe. Lignin je ugrađen u matriks celuloze i hemiceluloze te osigurava čvrstoću biljaka i otpor na mehanički stres (Palonen, 2004). Dominantne jedinice odnosno prekursori za sintezu lignina su *p*-kumaril alkohol, koniferil alkohol i sinapil alkohol koji su nasumično povezani eterskim ili ugljik-ugljik vezama. Vrste lignina se razlikuju ovisno o broju metoksi skupina pa tako *p*-kumarilni alkohol ne sadrži metoksi skupinu, koniferilni sadrži jednu, a sinapilni alkohol ima dvije metoksi skupine (Wertz i sur., 2016). Lignin dominira u sekundarnoj staničnoj stijenci, s najvećom koncentracijom u središnjoj lameli, ispunjava prostore između celuloze, hemiceluloze i pektina te na taj način pruža dodatnu čvrstoću stanične stijenke (Marton i sur., 2009). Povezuje sve komponentne lignoceluloze poput ljepila te uz pomoć jakih intramolekulskih i intermolekulskih vodikovih veza cijelu strukturu čini netopljivom. Lignin olakšava transport vode kroz stanicu te štiti stanicu od mikroba i patogena, oksidacijskog stresa, insekata i biljojeda (Hatfield i Fukushima, 2005). Primjena lignina u industriji je široka, može služiti kao antioksidans, najčešće u kozmetici. Prirodni i industrijski lignin mogu se koristiti u proizvodnji karbonskih vlakana, koristi se čak i u proizvodnji asfalta. U kemijskoj industriji koristi se za proizvodnju raznih kemikalija.

2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI

Polifenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti, građeni od aromatskog prstena na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (Harborne, 1989). U većini slučajeva se dijele s obzirom na kemijsku strukturu, a najčešća podjela podrazumijeva 3 osnovne skupine: fenolne kiseline, flavonoide i tanine. Fenolne kiseline se dalje dijele na hidroksicimetne i hidroksibenzojeve, a flavonoide čine antocijani, flavonoli, flavanoli i flavoni (Naczki i Shahidi, 2006). Kod biljaka su

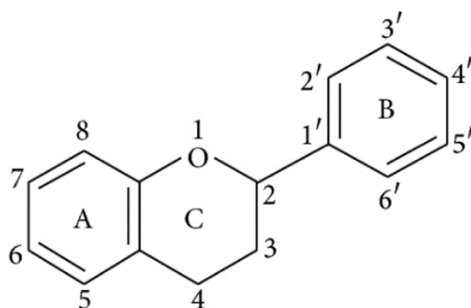
polifenoli prisutni u različitim dijelovima, od korijena, stabljike i listova do ljuske i koštica, a njihov udio ovisi o brojnim faktorima kao što su temperatura, vlaga, vrsta tla i nadmorska visina te različiti biološki čimbenici (Veneziani i sur., 2017). Polifenolni spojevi imaju jako antioksidacijsko i modulacijsko djelovanje na imunološki sustav, a mogu imati i antibakterijsko, antiparazitsko, antivirusno, protuupalno, antikancerogeno i antihipertenzivno djelovanje (Suleria i sur., 2015). Glavno svojstvo polifenola kao antioksidansa je neutralizacija slobodnih radikala i smanjenje oštećenja koja oni uzrokuju. Antioksidacijska sposobnost i djelovanje polifenola ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi na način da broj i položaj hidroksilnih skupina, prisutnost dvostruke veze i sposobnost delokalizacije elektrona omogućuju polifenolima da neutraliziraju slobodne radikale i doniraju atome vodika (Leicach i Chludil, 2014). Antioksidacijska svojstva polifenolnih spojeva sve su zanimljivija prehrambenoj industriji zbog moguće primjene u zaštiti lako oksidirajućih sastojaka hrane te u liječenju i prevenciji mnogih bolesti uzrokovanih neujednačenom ravnotežom oksidacijskih procesa u tijelu (Scalbert i sur., 2005).

Za razliku od topljivih polifenolnih spojeva koji ne stupaju u fizičke niti u kemijske interakcije s drugim molekulama, netopljivi vezani polifenoli kovalentno se vežu za matriks stanične stijenke biljnih stanica, povezuju se s makromolekulama kao što su celuloza, hemiceluloza, pektin te strukturni proteini putem eterskih, esterskih i ugljik-ugljik veza. Tako nastale kovalentne veze imaju glavnu ulogu u povezivanju tvari stanične stijenke i jačanju strukture stanice, a vezani polifenoli štite stanicu i biljku od brojnih patogena, napada insekata i životinja, prodora plijesni, kao i UV oštećenja (Jansen i sur., 2001). Fenolne kiseline su najčešći oblik polifenola koji se nalazi u vezanom i netopljivom obliku, a brojna *in vitro* istraživanja pokazala su da netopljivi vezani polifenoli pokazuju značajno veći antioksidacijski kapacitet u usporedbi sa slobodnim i topljivim polifenolima (Chandrasekara i Shahidi, 2010). Osnovna podjela fenolnih kiselina je na hidroksicimetne kod kojih su najpoznatije p-kumarinska, kafeinska, ferulinska i sinapinska kiselina te hidroksibenzojeve kiseline koje uključuju protokatehinsku, vanilinsku, galnu kiselinu i druge. Kisela i alkalna hidroliza najčešće su metode koje se koriste za ekstrakciju vezanih polifenola, a većina polifenolnih spojeva se bolje oslobađa u alkalnim uvjetima (Kim i sur., 2006). Značajno specifičnija i učinkovitija metoda je enzimska hidroliza kod koje enzimi poput pektinaze, celulaze, amilaze, hemicelulaze i glukanaze pomažu u razgradnji stanične stijenke i olakšavaju ekstrakciju polifenola, no primjena enzima značajno podiže cijenu postupka. Brojne su dobrobiti vezanih polifenolnih spojeva te je mogućnost njihove primjene široka pa se tako mogu koristiti kao zamjena za konzervanse u hrani te kao funkcionalni sastojci za poboljšavanje antioksidacijskog kapaciteta prerađene hrane. Također, *Food and Drug Administration* klasificira ferulinsku kiselinu kao antioksidans na popisu prehrambenih aditiva (Fazary i Ju, 2007). Ferulinska kiselina se može

koristiti i kao prekursor u proizvodnji arome vanilije. Netopljivi polifenoli u hrani često čine veći udio u ukupnim polifenolima od slobodnih, a s obzirom da se vezani polifenoli ne probavljaju dobro u ljudskom organizmu te u debelo crijevo često dospiju netaknuti, a njihov prehrambeni doprinos je značajan. Prema istraživanjima, ferulinska kiselina je pokazala antikancerogeno djelovanje u kultiviranim stanicama raka gušterače kod ljudi, a pokazala se učinkovita i protiv dijabetesa, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti i raka (Eitsuka i sur., 2014). Za kumarinsku i kafeinsku kiselinu utvrđeno je antikancerogeno djelovanje na stanične linije raka ljudskih pluća i adenokarcinoma debelog crijeva (Bouzaiene i sur., 2015).

2.2.1. Flavonoidi

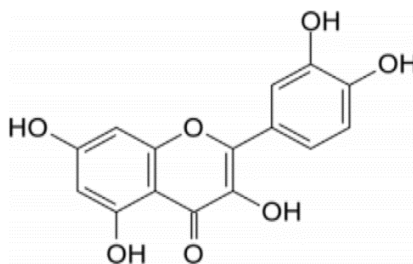
Flavonoidi su najveća skupina polifenolnih spojeva, koja se nalazi u biljkama, kao posljedica velikih mogućnosti modifikacija u strukturi koje rezultiraju novim spojem. Kostur flavonoida se sastoji od 15 ugljikovih atoma raspoređenih u dva aromatska prstena povezanih trećim heterocikličnim piranskim prstenom (Slika 2). U biljnim materijalima flavonoidi se mogu pojaviti u slobodnom i konjugiranom obliku, a pretežito se nalaze u obliku glikozida. Otkriveno je više od 80 različitih molekula šećera koje se mogu vezati na flavonoide, a najčešći glukozidi, glukuronidi, galaktozidi, arabinozidi i ramnozidi (Hollman i Arts, 2000). Upravo se flavonoidi smatraju jednim od najjačih biljnih antioksidanasa, a antioksidacijska sposobnost flavonoida smanjuje se vezanjem šećera na hidroksilne skupine pri čemu nastaju glikozilirani oblici (Rice-Evans i sur., 1996). Jedna od najraširenijih skupina flavonoida su flavonoli koji u većini slučajeva dolaze u formi glikozida od koji su naznačajniji glikozidi kvercetina, kemferola, miricetina i metilirani derivat izoramnetin.



Slika 2. Kemijska struktura flavonoida (Kumar i Pandey 2013)

2.2.2. Kvercetin

Kvercetin je polifenolni spoj iz podskupine flavonola. U prirodi se najčešće nalazi u obliku glikozida, a sastoji se od dva aromatska prstena, koji su međusobno povezani heterocikličkim prstenom koji sadrži kisik (Slika 3). Struktura kvercetina zaslužna je za njegova svojstva gašenja slobodnih radikala i metal-kelirajuća svojstva te rezultira značajnim antioksidacijskim svojstvima i potencijalu inhibicije enzima (Czepas i sur., 2014). Kvercetin se nalazi u mnogim biljnim vrstama, posebice u njihovim vanjskim dijelovima, što je vrlo vjerojatno posljedica izloženosti suncu (Albishi i sur., 2013). Uz izrazitu antioksidacijsku aktivnost, koja proizlazi iz njegove brze apsorpcije i spore eliminacije iz ljudskog organizma, istraživanjima je utvrđeno protuupalno djelovanje kvercetina, kao i preventivno djelovanje na sprječavanje koronarnih bolesti (Pandey i Rizvi, 2009). Ekstrakt kvercetina široko je rasprostranjen i koristi se kao dodatak prehrani, ali i kao terapijski sastojak.

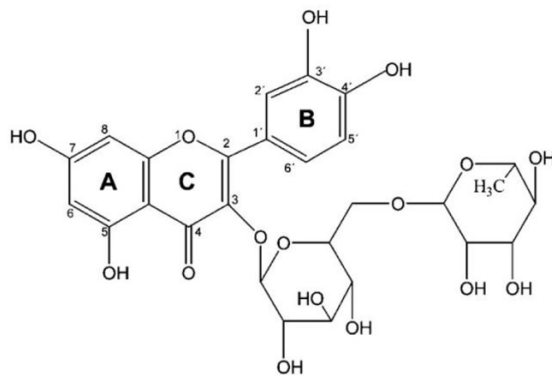


Slika 3. Kemijska struktura kvercetina (Pareek, 2018)

2.2.3. Rutin

Rutin predstavlja prirodni derivat flavonola, spoj niske molekularne mase, široko rasprostranjen u povrću i voću, koji ima jaka antioksidacijska svojstva (Yang i sur., 2008). U usporedbi s drugim flavonoidima (kvercetinom, akacetinom, morinom, hispidulinom, hesperidinom i naringinom), rutin pokazuje veći antioksidacijski potencijal (Eickhorst i sur., 2007). Rutin je jedan od najaktivnijih bioloških flavonoida poznat i kao vitamin P, a smatra se aktivirajućim faktorom za vitamin C. Prema kemijskoj strukturi, rutin je glikozid koji se sastoji od aglikona kvercetina na čijem je C-3 ugljikovom atomu C prstena vezan disaharid rutinozid (Slika 4). U svrhu ekstrakcije rutina iz različitih biljnih materijala se istražuju brojne metode, među kojima tradicionalne tehnike ekstrakcije otapalom, ali i inovativne metode, poput ekstrakcije superkritičnim fluidima, tekućinske ekstrakcije pod povišenim tlakom, mikroekstrakcije iz čvrste faze te ekstrakcije potpomognute ultrazvukom ili mikrovalovima (Chua, 2013). U prehrambenoj industriji rutin se koristi kao

konzervans, bojilo, stabilizator, antioksidans, UV upijač. Pri proizvodnji voćnih sokova, zajedno s antocijanima može poboljšati stabilnost boje voćnog soka tijekom skladištenja. Osim u prehrambenoj industriji, primjena rutina je i u kemijskoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Biljni agro-industrijski otpad može sadržavati značajnu količinu rutina te se može upotrijebiti kao njegova inovativan izvor, za proizvodnju ekstrakata rutina koji se mogu koristiti kao sastojak funkcionalne hrane, lijekova i dodataka prehrani (Frutos i sur., 2019).



Slika 4. Kemijska struktura rutina (Ghica i Brett, 2005)

2.3. OBIČNA TRSKA (*Phragmites australis*)

Obična trska, *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud (Slika 5), je višegodišnja biljka vodenih i močvarnih staništa koja pripada porodici trava (Poaceae). Naziv roda, *Phragmites*, potječe od grčke riječi "phragma", što u prijevodu znači ograda ili pregrada, a odnosi se na način rasta trske uz vodu. Naziv vrste, *australis*, na latinskom znači južni, a odnosi se na područje na kojem je biljka prvi put identificirana (Batterson i Hall, 1984).



Slika 5. Obična trska (*Phragmites australis*) (Anonymus 1, 2024) **(a)**, Močvarno stanište obične trske (Anonymus 2, 2024) **(b)**

2.3.1. Karakteristike obične trske

Trska je jedna je najrasprostranjenijih biljaka močvarnih područja, može se pronaći diljem svijeta (osim Antarktika), no najviše je zastupljena na području Europe, Bliskog Istoka i Amerike. Trska je karakteristična za vlažna staništa (Slika 1b), a osim močvarnih područja moguće ju je pronaći i na obalama jezera i rijeka pa čak i na rubovima pustinja, odnosno uz rezervoare s podzemnom vodom (Thevs i sur., 2007). Trska uglavnom raste u slatkoj vodi, ali može se pronaći i u bočatoj i slanoj vodi. Iako se smatra dosta otpornom i prilagodljivom biljkom, nepovoljniji uvjeti rasta, uključujući mraz, suše, povećani salinitet, hladnoću, manjak fosfata u tlu, mogu usporiti njezin rast (Batterson i Hall, 1984). Trska ima sposobnost brzog koloniziranja nekog područja, formira monokulturu, te na taj način uspijeva istisnuti druge vrste močvarnih biljaka i smanjiti biljnu raznolikost nekog sustava.

Obična trska ima dugačku, uspravnu, u presjeku okruglu stabljiku, debljine do 2,5 cm i dužine najčešće 2 do 4 metra, sa šupljim internodama i čvrstim člancima, karakteristično za mnoge predstavnike trava. Listovi su plosnati, dužine do 50 cm i širine približno 2 cm te se sužavaju prema vrhu. Cvat trske čini perasta metlica, duljine 20-50 cm, najčešće smeđecrvene ili ljubičaste boje, u kojoj su gusto raspoređeni sitni cvjetovi (Grlić, 2005). Cvat se razvija od srpnja do rujna. Korijski sustav obične trske čine rizomi, odnosno podzemne stabljike, koji joj omogućuju brzo širenje u novim područjima. Nadzemni dijelovi biljke odumiru na kraju vegetacijskog razdoblja svake godine, dok rizomi u tlu zadržavaju svoju sposobnost stvaranja novih biljaka dugi niz godina, služeći kao glavna pohrana hranjivih tvari (uglavnom škroba) te kao spremnik zraka. Obična trska ima široku mrežu rizoma čija dubina može biti od 10 do 200 cm (Haslam, 1972).

Obična trska se dominantno razmnožava upravo širenjem rizoma (Huhta, 2009). Klonska je biljka, što znači da iz istog rizoma nastaju genetički jednake jedinice. Razmnožavanje rizomima omogućuje biljci lakše „traženje“ nutrijenata (svjetlost i dušik) i drugih povoljnijih uvjeta za rast (niži salinitet i sulfidi) i na taj način joj omogućava prilagodbu staništu i brže širenje (Bart i Hartman, 2000). Upravo zbog toga, trska ima invazivni karakter na mnogim područjima. Primjerice, u Sjevernoj Americi je euroazijski varijetet trske, *P. australis* spp. *australis*, u značajnoj mjeri zamijenio nativnu *P. australis* spp. *americanus* (Meyerson i sur., 2016). Osim rizomima, trska se može razmnožavati i sjemenom, na način da se sjemenke raspršuju vodom, vjetrom ili putem životinja. S obzirom da se trska redovito koristi u hranidbi životinja poput koza i kunića, provedena su istraživanja u svrhu određivanja hranjive vrijednosti i sastava biljke obične trske. Prema istraživanjima koje su proveli Duke (1983) te Kadi i sur. (2012) hranjiva vrijednost trske na 100 g iznosi 1,73 MJ/kg. Sastav makronutrijenata uključuje 72,7 g ugljikohidrata, 10,6 g proteina te 2,1 g masti, a u slučaju mikronutrijenata i mineralnih tvari određeno je 14,6 g pepela, 480 mg kalcija, 130 mg magnezija te 60 mg fosfora.

2.3.2. Primjena obične trske

Korištenje trske za različite namjene seže daleko u povijest. Pronađeni su dokazi da je čovjek koristio trsku od posljednjeg ledenog doba za pokrivanje krovova na području oko Sjevernog i Baltičkog mora. Dolina rijeka Tigris i Eufrat vrlo je bogata trskom, a tamošnji narodi koristili su ju u različite svrhe (Thesiger, 1964). Zbog svojih karakteristika, trska se često kroz povijest koristila kao materijal u gradnji kuća, najviše za pokrivanje krovova, ali i za izradu vrtnih ograda i unutarnjeg namještaja. Zbog velikog omjera volumena i mase, odnosno prisutnih šupljina ispunjenih zrakom, trska slabo provodi toplinu te se koristila kao izolacijski materijal za podove i stropove. Poznata je uporaba trske među domorodačkim stanovništvom jugozapadne Amerike, prvenstveno stabljika trske, za izradu drški za strijele, molitvenih štapova, šipki za tkanje, prostirki, paravana, mreža i slamnatih krovova (Kearney i sur., 1960). Domorodačko stanovništvo Sjeverne Amerike također je koristilo trsku za slične namjene, kako je sumirano u radu Kiviat i Hamilton (2001), a trsku su koristili i za hranu. Naime, cijela biljka je jestiva; izdanci i listovi se mogu sakupljati u vegetacijskoj fazi, stabljike prije cvatnje, a rizomi tijekom cijele godine. Mladi izdanci mogu se jesti sirovi ili termički obrađeni kao povrće, zajedno s mladim listovima koji obiluju C vitaminom (Grlić, 2005). Stabljika se može sušiti i mljeti u fini prah koji se potom miješa s vodom u gustu smjesu od koje se izrađuje slastica nalik sljezovim kolačićima (eng. marshmallows). Egzudat stabljike (koji se luči nakon mehaničkih oštećenja ili djelovanja kukaca) bogat je šećerom, te su ga sjevernoamerički domoroci konzumirali kao slasticu. Rizomi, s obzirom da su bogati

škrobom, mogu se koristiti osušeni i samljeveni kao brašno ili za pripremu kaša, ali i prženi kao zamjena za kavu (Grlić, 2005). Trska, tj. njezini dijelovi koristili su se i u medicinske svrhe, primjerice rizomi su se u narodnoj medicini koristili pri liječenju artritisa, plućnih apscesa, trovanja hranom i kao diuretik (Boulos, 1983).

Trska se stoljećima, pa i danas, koristila kao stočna hrana za bivole, krave, ovce, goveda, koze i magarce. Visok sadržaj dušika, kalija ($10,9 \text{ g kg}^{-1}$) i mangana ($2,65 \text{ g kg}^{-1}$) čini je posebno dobrom krmnom biljkom za preživače. Iako ima nešto nižu nutritivnu vrijednost od ostalih krmnih biljaka, jeftina je i lako dostupna (Haslam, 2010).

Trska je bogata celulozom i hemicelulozom, udio celuloze kreće se od 33 % do 59 %, ovisno o uvjetima rasta (Fouad i sur., 2023) te se stabilnije trske mogu koristiti u proizvodnji papira. Trska ima vrlo visok udio kratkih vlakana u svom sastavu te se stoga mora miješati sa sirovinom koja ima veći udio dugih vlakana kako bi se postigla određena gustoća papira i otpornost na trganje. Kao lignocelulozna sirovina, trska se može koristiti u biorafinerijskim procesima, primjerice za proizvodnju funkcionalnih polimera i bioplastike. Prvo je potrebno samljeti materijal, koji se zatim tretira različitim kemikalijama pod visokim tlakom i temperaturom. Na taj se način odvajaju lignin te hemiceluloza i celuloza. Iz dobivene ligninske frakcije se nadalje može proizvesti bioplastika, dok se celulozna i hemicelulozna frakcija mogu iskoristiti za proizvodnju bioetanolu i bioplina. Biorafinerijski način primjene trske danas se sve više istražuje. Uz navedeno, trska se danas također intenzivno koristi i u bioremedijaciji, odnosno kao biološki filter za pročišćavanje voda, komunalnih i industrijskih otpadnih voda. Naime, trska ima sposobnost akumuliranja organskih zagađivača, teških metala i patogenih mikroorganizama iz tla u biomasu (Lakatos i sur., 1999). U tu svrhu, u novije vrijeme se sve više istražuje uzgoj trske u umjetno stvorenim lagunama.

2.3.3. Polifenoli obične trske

Polifenoli biljke obične trske, kao i kod drugih biljaka, imaju ključnu ulogu u rastu i razvoju biljke, obrambenim mehanizmima, prilagodbi na okoliš te posjeduju antioksidacijska, protuupalna, antibakterijska i antikancerogena svojstva. Pomažu biljci u zaštiti od biljojeda i insekata tako što potiču stvaranje gorčine i toksičnih spojeva koji odbijaju biljojede. Obična trska je invazivna vrsta koja je vrlo otporna te ima veliku mogućnost prilagodbe, što je povezano s njezinim sekundarnim metabolitima, uključujući polifenole. Najzastupljeniji polifenoli u običnoj trsci su flavonoidi, fenolne kiseline poput kafeinske i ferulinske, lignin koji daje biljci mehaničku čvrstoću i pomaže u obrani od patogena te tanini. U tradicionalnoj medicini trska se koristila za liječenje bolesti ljudi i stoke, upravo zbog antioksidacijskih te hepatoprotektivnih svojstava koja su dokazana u rizomima te biljke, a ekstrakti lišća su pokazali i antivirusno djelovanje (Chen i sur., 2013). Trska ima

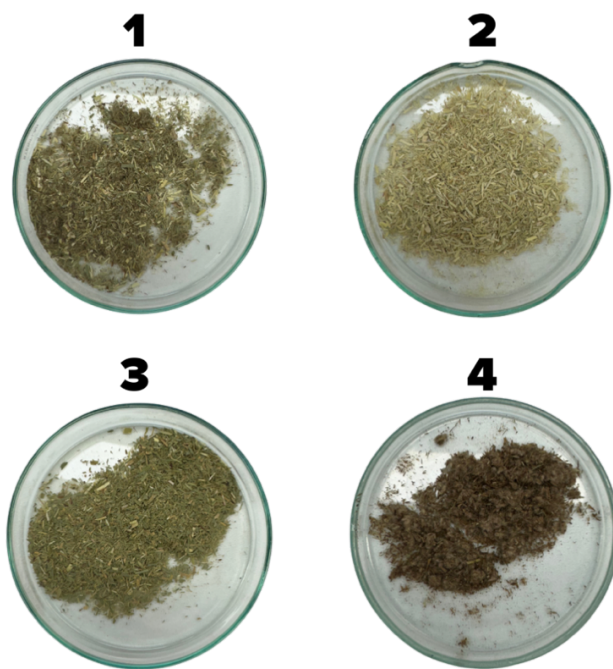
sposobnost alelopatije, mehanizma koji pomaže biljci u invaziji i suzbijanju rasta drugih biljnih vrsta na način da otpušta fitotoksine, u obliku različitih fenolnih spojeva, u tlo što joj omogućuje da dominira nekim staništem (Callaway i sur., 2008). Uočene su značajne promjene u kemijskom sastavu tla i vode u invazivnim područjima obične trske, a galna kiselina je identificirana kao glavni čimbenik invazivnosti ove biljne vrste (Rudrappa i sur., 2007). Obična trska raste u staništima sa stresnim uvjetima poput slanih močvara s vrlo oslabljenim pristupom nutrijentima. U tom slučaju polifenoli, a posebno flavonoidi i fenolne kiseline koji imaju snažna antioksidativna svojstva mogu neutralizirati slobodne radikale u biljnim tkivima, smanjujući oštećenja uzrokovana oksidativnim stresom i omogućiti biljci otpornost na slane uvjete, regulaciju osmotskog tlaka i zaštitu od UV zračenja. Takva područja često imaju i veću količinu teških metala, a obična trska zbog svog polifenolnog sastava ima sposobnost podnošenja i nakupljanja značajnih količina teških metala zbog čega se smatra fitoremedijatorom, a služi i kao bioindikator za područja onečišćena teškim metalima (Rohal et al., 2019). Provedena istraživanja pokazala su da na sadržaj i sastav polifenola značajno utječe prisutnost toksičnih teških metala, kao što su olobo, krom, živa i kadmij. Biljke čije je stanište sadržavalo povišene koncentracije tih metala, pokazale su veći udio polifenola, pri čemu se isticao rutin. Polifenoli omogućuju detoksikaciju biljke na način da se vežu za metalne ione i smanjuju njihovu sposobnost apsorpcije i štetnih učinaka (Borowska i sur., 2018).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci

U ovome radu korišteni su nadzemni dijelovi biljke obične trske (*Phragmites australis*), sakupljene na obalama akumulacijskog jezera Dubrava na Dravi (Republika Hrvatska) tijekom rujna/listopada 2023. godine. Uzorci za analizu bili su podijeljeni u četiri kategorije: cijela trska, stabljika, list i cvijet trske. Nakon prikupljanja, uzorci su osušeni na zraku u sjeni te su prvobitno samljeveni u frakciju veličine 4 mm, a kasnije u mlinčiću za kavu za kućanstvo (Slika 6). Usitnjeni uzorci spremljeni su u *zip-lock* vrećice i čuvani na suhom i tamnom mjestu.



Slika 6. Prikaz usitnjenih i osušenih uzoraka: 1 – cijela trska; 2 – stabljika; 3 – list; 4 – cvijet
(vlastita fotografija)

3.1.2. Kemikalije

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

Određivanje udjela suhe tvari

- Pijesak – opran i žaren, Gram mol d.o.o. (Zagreb, RH)

Priprema ekstrakata slobodnih i vezanih polifenolnih spojeva

- Aceton, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Etanol (96 %-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- L-askorbinska kiselina, Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- 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, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela ukupnih polifenola

- Folin-Ciocalteau reagens, Lach-Ner, s. r. o. (Neratovice, Češka)
- Galna kiselina (>97,5 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- Natrijev karbonat, Lach-Ner, s. r. o. (Neratovice, Češka)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

- Metanol, Fisher Scientific (Hampton, New Hampshire, SAD)
- DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal), Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

- Etanol (96 %-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev peroksodisulfat, Honeywell Fluka (Charlotte, Sjeverna Karolina, SAD)
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol), Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)

Određivanje udjela slobodnih i vezanih polifenola u ekstraktima primjenom HPLC metode

- Acetonitril, HPLC grade, Fisher Scientific (Hampton, New Hampshire, SAD)
- Analitički standardi bioaktivnih spojeva:
 - *t*-ferulinska kiselina (98 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
 - *p*-kumarinska kiselina (99 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
 - kvercetin (>97 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
 - kvercetin-3-glukozid, Fluka/Honeywell (Charlotte, SAD)
 - rutin (>97 %), Acros Organics/Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
- Mravlja kiselina, Fisher Scientific (Hampton, New Hampshire, SAD)
- Voda HPLC kvalitete (vodljivost ≤ 5 μS)

Određivanje udjela netopljivih i topljivih vlakana

- Aceton, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Etanol (96 %-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kalcijev klorid, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Maleinska kiselina, Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Njemačka)
- Natrijev hidroksid u zrnima, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Octena kiselina (glacial), Alkaloid Skopje (Skoplje, Makedonija)
- Pomoćno filtracijsko sredstvo Celite® 545 AW, Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- Set za određivanje vlakana (K-INTDF), Megazyme (Bray, Irska)
- Trizma Base, Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Njemačka)
- Ambersep 200 H⁺ (Megazyme, Irska)
- Amberlite FPA OH⁻ (Megazyme, Irska)

Određivanje udjela proteina

- Borna kiselina, Carlo Erba Reagents, (Barcelona, Španjolska)
- Indikator bromkrezol zeleno, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Indikator metil crveno, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kjeldahl tablete (bez žive i selena), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Njemačka)
- Klorovodična kiselina (0,1 M) - KEFO d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)
- Natrijev hidroksid, T. T. T. d.o.o (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Sumporna kiselina (96 %-tna), Carlo Erba Reagents (Barcelona, Španjolska)

Hidroliza polisaharida stanične stijenke

- Kalcijev karbonat, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Sumporna kiselina 2,5 M, Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)
- Sumporna kiselina (96 %-tna), Carlo Erba Reagents (Barcelona, Španjolska)

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

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

Određivanje monomernog sastava strukturnih ugljikohidrata HPLC metodom

- Acetonitril, HPLC grade, Fisher Scientific (Hampton, New Hampshire, SAD)
- Analitički standardi:
 - D-(+)-manoza, D-(+)-galaktoza, D-(-)-ksiloza, D-(+)-arabinoza and L-(+)-ramnoza monohidrat, LGC Standards (Teddington, Ujedinjeno Kraljevstvo)
 - D-(+)-glukoza monohidrat, Fluka (Buch, Švicarska).
 - L-(-)-fukoza, Acros Organics (Geel, Belgija)
 - D-(+)-galakturonska kiselina, D-glukuronska kiselina, D-(-)-riboza, Sigma-Aldrich/Merck (SAD)
- Fosforna kiselina 85 %, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev dihidrogenfosfat, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidrogenfosfat dihidrat, Acros Organics (New Jersey, MA, SAD)
- Natrijev hidroksid u zrcima, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela nestrukturnih ugljikohidrata HPLC metodom

- Demineralizirana voda (HPLC kvalitete), PBF
- D-(+)-glukoza monohidrat, Fluka (Buch, Švicarska).
- D-(+)-fruktoza, maltoza, Sigma-Aldrich/Merck (SAD)

3.1.3. Aparatura i pribor

Određivanje udjela suhe tvari

- Aluminijske posudice s poklopcima
- Analitička vaga (New Classic ML204/01), Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Laboratorijski sušionik ST-06, Instrumentaria d.d. (Zagreb, Hrvatska)
- Termometar, eksikator

Priprema ekstrakata slobodnih i vezanih polifenolnih spojeva

- Analitička vaga (New Classic ML204/01), Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Aparatura za filtraciju (Büchnerov lijevak, filter papir Whatman No.1, Erlenmeyerova tikvica 250 mL)
- Centrifuga SL 8R s rotorom s utorima pod fiksnim kutom, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, SAD)
- Laboratorijska vaga preciznosi 0,01 g, GF- 3000 EC; A&D Instruments (Tokio, Japan)
- Laboratorijski pribor: teflonski magneti, propipete, silikonske cijevi, metalni stalci, parafinsko ulje, gumene brtve, termometar
- Laboratorijsko plastično posuđe: Falcon epruvete (15 i 50 mL), Eppendorf epruvete (2 mL), Pasteur pipete
- Laboratorijsko stakleno posuđe: laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice, reagens boce, tikvice s okruglim dnom (50 i 100 mL), štapići, epruvete s navojnim čepom s PTFE septom, Dimroth hladilo
- Magnetska miješalica s grijačima SMHS 6, Witeg Labortechnik GmbH (Wertheim, Njemačka)
- Mikropipete (P200, P1000, P5000), Gilson (Villiers-le-Bel, Francuska)
- Uređaj za ekstrakciju mikrovalovima Ethos X, Milestone s.r.l. (Soriso, Italija)
- pH-metar (FiveEasy FE20), Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Rotacijski vakuum uparivač IKA RV8 IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Njemačka)
- Termoblok HB120-S, DLAB Scientific Co. (Beijing, Kina)
- Vakuumska pumpa IKA VACSTAR digital, IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Njemačka)
- SPE kolonice za pripremu uzoraka (CHROMABOND C18 3 mL/200 mg, 45 µm), Macherey-Nagel (Njemačka)

Spektrofotometrijske analize (ukupni polifenoli, antioksidacijski kapacitet)

- Laboratorijski pribor: propipete, kivete za mjerenje u spektrofotometru
- Laboratorijsko stakleno posuđe: laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice, staklene epruvete s navojem i čepovima
- Mikropipete (P200, P1000, P5000), Gilson (Villiers-le-Bel, Francuska)
- Spektrofotometar (GenesysTM 10S UV-VIS), Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)

Određivanje udjela slobodnih i vezanih polifenola HPLC metodom

- Kromatografske kolone:
 - Kinetex Biphenyl (4,6 x 150 mm, 2,6 μm), Phenomenex (Torrance, CA, SAD)
- Laboratorijski pribor: plastične šprice (2 mL), mikrofilteri (regenerirana celuloza) veličine pora 0,2 μm (13/45) (Macherey-Nagel, Njemačka), lađice za vaganje, HPLC vijale s priparajućim navojnim čepovima sa septom
- Laboratorijsko stakleno posuđe: reagens boce, pipete, laboratorijske čaše, odmjerne tikvice, menzure
- Tekućinski kromatograf Agilent Series 1200, Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornija, SAD) sastavljen od degazera, kvaterne pumpe, automatskog injektora s autosamplrom, termostata kolone i DAD (engl. diode-array) detektora

Određivanje udjela netopljivih i topljivih vlakana

- Analitička vaga (New Classic ML204/01), Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Mikropipete (P200, P1000, P5000), Gilson (Villiers-le-Bel, Francuska)
- Laboratorijske boce s čepovima (250 mL, 500 mL), Duran (Wertheim/main, Njemačka)
- Laboratorijski pribor i posuđe: staklene pipete, laboratorijske čaše, boce sisaljke, menzure, špatule, eksikator, sinter lončići za filtraciju (porozitet 2, Duran)
- Laboratorijski sušionik ST-06, Instrumentaria d.d. (Zagreb, Hrvatska)
- Vodena kupelj (Inko VKZ ERN), Inkolab d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Magnetska miješalica s grijačima SMHS 6, Witeg Labortechnik GmbH (Wertheim, Njemačka)
- Tekućinski kromatograf Agilent Series 1200, Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornija, SAD) sastavljen od degazera, kvaterne pumpe, automatskog injektora s autosamplrom, termostata kolone i DAD (engl. diode-array) detektora

- Kromatografska kolona - Zorbax Hi-Plex Ca (7,7 x 300 mm, 8 µm), Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)

Određivanje udjela proteina

- Analitička vaga (New Classic ML204/01), Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Erlenmeyer tikvice (250 mL), staklena bireta (50 mL), staklene pipete, lijevci, laboratorijske čaše, odmjerne tikvice, menzure
- Kjeldahl kivete za digestiju (500 mL), FOSS, (Haganäs, Sweden)
- Poluautomatska aparatura za određivanje dušika prema Kjeldalu, Kjeltec TM 2100, FOSS (Haganäs, Sweden)
- Tehnička vaga tip 1111, Tehnica (Železniki, Slovenija)
- Termoblok za digestiju uzoraka s odgovarajućim nastavkom za odsis para, Digestion system 6, 1007 Digester, Tecator (Hillerød, Danska)

Određivanje udjela mineralnog ostatka

- Analitička vaga (New Classic ML204/01), Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Bunsen plamenici, tronožac s glinenim trokutom, porculanski lončići, drvene i metalne hvataljke, satna stakalca, eksikator
- Mufolna peć tip Heraeus KR-170, W.C. Heraeus GmbH (Hanau, Njemačka)

Hidroliza polisaharida stanične stijenke

- Analitička vaga (New Classic ML204/01), Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Automatska pipeta 20-200µL, 100-1000µL, Gilson (Francuska)
- Centrifuga SL 8R s rotorom s utorima pod fiksnim kutom, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, SAD)
- Laboratorijsko posuđe: staklene epruvete s pripadajućim PP čepovima s brtvom, stakleni štapići, Eppendorf epruvete od 2 ml, špatule
- Termoblok HB120-S, DLAB Scientific Co. (Beijing, Kina)
- Vortex (MX-S), DLAB Scientific Co. (Beijing, Kina)

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

- Automatska pipeta 20-200µL, 100-1000µL, Gilson (Francuska)

- Laboratorijsko posuđe: Eppendorf epruvete od 2 ml, plutajući stalci za Eppendorf epruvete, staklene pipete od 2 ml, propipete, staklene čaše
- pH indikatorske trakice 0-14, LLG Labware (Meckenheim, Njemačka)
- Stolna centrifuga za Eppendorf epruvete od 1,5 i 2 mL DLAB Scientific Co. (Beijing, Kina)
- Vodena kupelj (Inko VKZ ERN), Inkolab d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Vortex (MX-S), DLAB Scientific Co. (Beijing, Kina)

Određivanje monomernog sastava strukturnih ugljikohidrata HPLC metodom

- HPLC kolona – Zorbax Extend C18 (250x4,6 mm; 5 µm), Agilent Technologies (SAD)
- Laboratorijski pribor: plastične šprice (2 mL), mikrofilteri (regenerirana celuloza) veličine pora 0,2 µm (13/45) (Macherey-Nagel, Njemačka), lađice za vaganje, HPLC vijale s priparajućim navojnim čepovima sa septom
- Laboratorijsko stakleno posuđe: reagens boce, pipete, laboratorijske čaše, odmjerne tikvice, menzure
- Tekućinski kromatograf Agilent Series 1200, Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornija, SAD) sastavljen od degazera, kvaterne pumpe, automatskog injektora s autosamplerom, termostata kolone i DAD (engl. diode-array) detektora

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje udjela suhe tvari

Udjel suhe tvari određen je prema modificiranoj AOAC 930.15 metodi (Padmore, 1990a). Ova metoda prati promjenu mase uzorka tijekom sušenja pri 105 °C do uspostave konstantne vrijednosti.

Postupak rada:

U aluminijske posudice s poklopcem (promjera 50 mm i visine 30 mm) odvaže se uzorak u količini od 0,5 g (s točnošću ±0,0050 g). Prije samog vaganja uzorka, aluminijske posudice s poklopcem suše se u sušioniku pri 105 °C tijekom 30 minuta te zatim hlade do sobne temperature u eksikatoru i važu s točnošću od 4 decimale. Posudice s uzorkom suše se otklopljene u sušioniku

1 sat, a zatim se hlade u eksikatoru do sobne temperature i važu s točnošću od 4 decimale. Postupak se ponavlja dok se ne postigne ustaljena masa sušenog uzorka ($\pm 0,0005$ g).

Izračun rezultata:

Određivanje udjela suhe tvari provedeno je u paraleli za svaki uzorak, a izračun je proveden prema formuli [1]:

$$\text{Suha tvar (\%)} = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \times 100 \quad [1]$$

Gdje je: m_0 – masa uzorka (g)

m_1 – masa prazne posude s poklopcem (g)

m_2 – masa posude s poklopcem i uzorkom nakon sušenja (g)

3.2.2. Priprema ekstrakata slobodnih polifenolnih spojeva

Za potrebe istraživanja provedene su ekstrakcije različitih dijelova biljke obične trske. Svaki od uzoraka, cijela trska, cvijet, stabljika i list, zasebno je ekstrahiran. U ekstrakcijama su kao otapalo korištene vodene otopine etanola (96 %) volumnog udjela 40 % i 80 % te čista voda, a tehnike ekstrakcije uključivale su konvencionalnu ekstrakciju i ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima.

3.2.2.1. Konvencionalna ekstrakcija

U tikvicu s okruglim dnom od 100 mL izvagaže se 1,5 g uzorka te se pomiješa s 30 mL otapala (80 %-tni, 40 %-tni EtOH (v/v), pripremljenog iz 96 %-tnog etanola, ili voda). Zatim se tikvica postavlja na povratno vodeno hladilo, pri čemu je uronjena u uljnu kupelj koja je prethodno zagrijana na temperaturu ekstrakcije (80 °C). Ekstrakcija se provodila uz kontinuirano miješanje. Nakon 30 minuta ekstrakcije, tikvica se skida s hladila i kratko uranja u hladnu vodu (5 minuta). Sadržaj tikvice zatim se filtrira preko Büchnerovog lijevka i Whatman No.1 filter papira, uz pomoć vakuuma. U boci sisaljci izdvaja se filtrat koji se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL te nadopuni do oznake korištenim otapalom.

3.2.2.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima provedena je na uređaju MicroSYNTH (Milestone, Italija). Kao otapalo u ekstrakciji korištena je otopina 80 %-tnog etanola, a omjer uzorka i otapala iznosio je 1:20 (w/v). Izvagano je 0,75 g uzorka, u specijalne teflonske tube (epruvete) koje su dizajnirane za uređaj u kojem se provodila ekstrakcije te je u njih potpom dodano 15 mL otopine 80 %-tnog etanola. Sama ekstrakcija sastoji se od 3 faze nakon kojih slijedi hlađenje, a parametri ekstrakcije prikazani su u Tablici 1:

Tablica 1. Parametri ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

Faza	Trajanje (min)	Snaga (W)	Temperatura (°C)	Miješanje	Razina ventilacije
1	3	750	80	da	1
2	3 ili 9	250	80	da	1
3	3	0	20	da	3

Pri završetku procesa, ekstrakt je profiltriran kroz filter papir (Whatman No.1) u odmjernu tikvicu od 25 mL, a talog je dodatno ispran 2 puta u cilju maksimalnog izdvajanja ekstrahiranih bioaktivnih spojeva iz taloga i opet profiltriran. Na kraju je tikvica napunjena otapalom do oznake. Ekstrakcija mikrovalovima provedena je u paraleli.

3.2.2.3. Priprema alkoholno-netopljivog ostatka (AIR)

Alkoholno-netopljivi ostatak uzoraka trske dobiveni su uzastopnim ekstrakcijama 80 %-tnim etanolom, kako je prethodno opisano u poglavlju 3.2.2. Nakon prve ekstrakcije, izdvojeni čvrsti ostatak na Buchnerovom lijevku se ponovo prebaci u tikvicu s okruglim dnom te se doda jednak volumen otapala kao u prvoj ekstrakciji (30 mL) i ponovi se postupak ekstrakcije. Uzastopne ekstrakcije se ponavljaju ukupno 3 puta (prva ekstrakcija + 2 dodatne ekstrakcije) kako bi se potpuno uklonili topljivi šećeri i slobodni polifenolni. Nakon svake ekstrakcije se dobiveni ekstrakt pripremi u odmjernoj tikvici od 50 mL. Nakon provedenih ekstrakcija, čvrsti ostatak (alkoholno-netopljivi ostak) se suši izmjenom otapala. Materijal se prvo 2 puta uzastopno ispiri s 96 %-tnim etanolom u omjeru 1:3,5 (w/v) (između dva ispiranja, otapalo se odvaja filtracijom na Büchnerovom lijevku uz pomoć vakuuma), a zatim 1 put s acetonom u omjeru 1:2 (w/v), koji se također ukloni filtracijom. Ekstrahirani materijal zatim se suši u digestoru, prekriven staničevinom.

Ukupna ekstrahirana suha tvar određena je sušenjem alikvota dobivenih ekstrakata do konstantne mase (poglavlje 3.2.1.). Aluminijske posudice se suše sa slojem kvarcnog pijeska. Kao uzorak, pipetira se po 5 mL ekstrakata dobivenih nakon 3 uzastopne ekstrakcije (ukupno 15 mL) te se suši pri 105 °C do postizanja konstantne mase. Postotak ekstraktabilne suhe tvari izračuna se iz formule [2]:

$$\% \text{ ekstraktabilna s. tv.} = \frac{m_1}{V_{\text{aliqu.}}} * \frac{V_{\text{ukupno}}}{m_{\text{uzorak}}} * 100 \quad [2]$$

Pri čemu je:

m_1 - konstantna masa suhog uzorka

$V_{\text{aliqu.}}$ - volumen pipetiranog alikvota ekstrakata

V_{ukupno} - ukupni volume ekstrakata

m_{uzorka} - masa uzorka korištenog u pripremi ekstrakata.

Ekstraktabilna suha tvar određena je u duplikatu, a podatak se koristi za preračunavanje rezultata na masu izvornog uzorka ako je u analitičkom postupku kao uzorak korišten AIR.

3.2.3. Alkalna hidroliza alkoholno-netopljivog ostatka

Vezani polifenoli određuju se iz alkoholno-netopljivog ostatka. Uzork je prethodno usitnjen na kugličnom mlinu tijekom 1 min i pri frekvenciji 30^{-1} (Cryomill, Retsch (Haan, Njemačka)). Provedeni postupak ekstrakcije vezanih fenolnih spojeva predstavlja modificirani protokol prema radu Arruda i suradnika (2018).

Postupak rada:

Izvaže se približno 50 mg uzorka u plastičnu Falcon epruvetu te se dodaje redom: 1,25 mL otopine koja sadrži 20 mM EDTA i 2 % (w/v) askorbinske kiseline, 250 μ L internog standarda (kafeinska kiselina, 1 mg mL⁻¹), 375 μ L destilirane vode i 625 μ L 8M NaOH. Epruveta se zatim vorteksira i postavi na magnetsku miješalicu pri sobnoj temperaturi. Nakon dva sata, reakcija se zaustavlja neutralizacijom smjese tako što se dodaje 1,5 mL 4M HCl i 1 mL vode. Neutralizirani uzorci stavljaju se u centrifugu na 9000 o min⁻¹, 5 min. Nakon toga, supernatant se odvoji u drugu epruvetu. Dalje se provodi ekstrakcija na SPE (engl. solid phase extraction) C18 preparativnim kolonicama, koje je potrebno pripremiti na način da se doda 1 mL metanola na vrh kolonice te se isti propušta kap po kap, a zatim se kolonica na isti način ispiri s 2 mL demineralizirane vode. Takve kolonice spremne su nanošenje uzorka. Alikvot od 1 mL supernatanta nakon alkalne

hidroliza se nanosi na vrh kolonice i eluira kap po kap. Nakon toga se kolonica ispere s 1 mL demineralizirane vode. Polifenoli su sada vezani za punilo kolonice, a njihova elucija provodi se dodatkom 1 mL metanola te se eluat skuplja u čistu epruvetu (2 mL). Taj uzorak se uparava do suhog na rotacijskom vakuum uparivaču. Upareni uzorak se resuspendira u 1 mL otapala 80 % EtOH te je takav uzorak spreman za HPLC analizu. Osim uzorka, na jednak način (alkalna hidroliza i SPE) je pripremljena i smjesa standarada (*t*-ferulinska, *p*-kumarinska kiselina uz interni standard kafeinske kiseline u istoj koncentraciji kao u uzorku). Alkalna hidroliza uzoraka trske provedena je u triplikatu.

3.2.4. Karakterizacija bioaktivnog sastava ekstrakata

3.2.4.1. *Određivanje udjela ukupnih polifenola*

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

Priprema uzoraka:

Ukupni polifenoli određeni su u vodenim i etanolnim ekstraktima cvijeta, stabljike, lista i cijele biljke obične trske, čija je priprema opisana u poglavlju 3.2.2. Prema potrebi, ekstrakti se razrijeđuju prije postavljanja reakcije.

Postupak rada:

U staklene epruvete otpipetira se 3,95 mL demineralizirane vode, 50 μ L uzorka, 0,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa (prethodno razrijeđenog s vodom u omjeru 1:2 (v/v)), a zatim i 0,75 mL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3). Reakcijska smjesa se homogenizira na vorteksu i ostavi pri sobnoj temperaturi u mraku tijekom 2 h. Po isteku vremena, izmjeri se apsorbancija reakcijskih otopina pri 765 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba se priprema na isti način kao i ispitivani uzorci, ali se umjesto uzorka dodaje jednaki volumen demineralizirane vode.

Izračun rezultata:

Da bi se mogao odrediti udjel ukupnih polifenola potrebno je izraditi baždarni pravac za jedan reprezentativni spoj. U tu svrhu najčešće se koristi galna kiselina, a udjel ukupnih polifenola izražava se kao ekvivalent galne kiseline (engl. gallic acid equivalents - GAE). Iz osnovne otopine standarda galne kiseline, pripreme se razrjeđenja 50, 100, 200, 300, 400, 600 i 800 mg L⁻¹ te se ponovi prethodno opisani postupak reakcije s Folin-Ciocalteu reagensom za svako razrjeđenje, uz slijepu probu. Na temelju poznatih vrijednosti koncentracija galne kiseline i izmjerenih vrijednosti apsorbancija, konstruira se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji [3]

$$y = 0,001 x - 0,0001 \quad [3]$$

Određivanje udjela udjela ukupnih polifenola reakcijom s Folin-Ciocalteu metodom provedno je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao maseni udio (mg GAE g_{s. tv.}⁻¹) u uzorku te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.4.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Ova metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini. U prisutnosti elektron donora dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje otopine u žutu, što se prati mjerenjem apsorbancije (Brand-Williams i sur., 1995).

Postupak rada:

Potrebno je pripremiti otopinu DPPH radikala 0,094 mM u metanolu. Apsorbancija takve otopine mora biti ~ 1, a otopina se mora čuvati u tikvici omotanoj aluminijskom folijom. Prije mjerenja se pripremi svježa otopina DPPH radikala. U epruvetu se otpipetira 50 µL ispitivanog uzorka i doda se 1,95 mL 0,094 mM otopine DPPH. Po dodatku otopine DPPH pripremljeni uzorci se vorteksiraju te stavljaju na mračno mjesto (pri sobnoj temperaturi) u trajanju od 30 minuta nakon čega se mjeri apsorbancija pri 515 nm . U drugu epruvetu, koja predstavlja slijepu probu, umjesto uzorka doda se 50 µL metanola te 1,95 mL otopine DPPH. Po potrebi se uzorak razrjeđuje prije analize razrjeđuje.

Izračun rezultata:

Iz osnovne otopine standarda Trolox-a (vodeno-topljiv analog vitamina E) koncentracije 1 mM, pripreme se razrjeđenja 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM i 0,8 mM te se provede reakcija s DPPH radikalom u odnosu na slijepu probu. Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih

vrijednosti koncentracija Trolox-a, konstruira se baždarni pravac ovisnosti promjene apsorbancije o koncentraciji [4].

Jednadžba baždarne krivulje:

$$y = 0,6 x \quad [4]$$

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom (Trolox-ekvivalentni (TE) antioksidacijski kapaciteta) provedena je u paraleli. Rezultati su izraženi kao maseni udio ($\mu\text{mol TE g}_{\text{s. tv.}}^{-1}$) ekvivalenata Trolox-a u uzorku te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.4.3. *Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom*

Ova metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta temelji se na “gašenju” plavo-zelenog 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kation), koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a. Dodatak antioksidansa iz uzorka rezultira redukcijom prethodno generiranog ABTS radikala, što ovisi o vremenu i mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala (Re i sur., 1999).

Postupak rada:

Potrebno je pripremiti otopinu ABTS^+ radikala na način da se pomiješa 88 μL (140 mM) otopine kalijevog peroksodisulfata s otopinom ABTS-a (7 mM) reagensa do volumena 5 mL. Reakcija se provodi pri sobnoj temperaturi, u mraku, tijekom 12-16 h kako bi ABTS u potpunosti oksidirao. Prije same analize otopina se razrijedi na 1% (v/v) otopinu s 96%-tnim etanolom, a apsorbancija tako pripremljene otopine treba iznositi $0,70 \pm 0,02$. U epruvetu se otpipetira 20 μL ekstrakta i 2 mL otopine ABTS^+ radikala. te se izmjeri apsorbancija na 734 nm nakon točno 6 minuta trajanja reakcije u mraku. Prije mjerenja uzoraka potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se umjesto uzorka, 20 μL vode pomiješa s istom količinom reagensa.

Izračun rezultata:

Izračun rezultata provodi se analogno DPPH metodi, korištenjem Trolox-a kao standarda. Pritom, jednadžba baždarnog pravca za ABTS metodu glasi [5]:

$$y = 0,3115 x \quad [5]$$

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom (Trolox-ekvivalentni (TE) antioksidacijski kapaciteta) provedena je u paraleli. Rezultati su izraženi kao maseni udjel ($\mu\text{mol TE g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) ekvivalenata Trolox-a u uzorku te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.4.4. Određivanje udjela slobodnih i vezanih polifenola primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-DAD)

Pojedinačni slobodni i vezani polifenoli identificirani su i kvantificirani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) s DAD detektorom. Korištena je analitička HPLC kolona Kinetex 2,6 μm Biphenyl 100 Å (4,6 x 150 mm). Uzorci (ekstrakti) su prije injektiranja (5 μL) profiltrirani kroz mikrofiltre u HPLC vialu. Elucija je provedena dvokomponentnom mobilnom fazom (A - 0,1% mravlja kiselina u vodi, B - 0,1% mravlja kiselina u acetonitrilu) u gradijentu: 0. min - 10 % B, 2. min - 10 % B 17. min - 45 % B, 20. min - 70 % B, 23. min - 70 % B, 25. min - 10 % B, 5 min postrun, uz protok 0,5 mL/min. Temperature kolone iznosila je 35 °C. Eluat je sniman pri 320, 350 i 370 nm (DAD).

Identifikacija odabranih polifenolnih spojeva provedena je usporedbom retencijskog vremena izdvojenih pikova s retencijskim vremenima HPLC standarda te usporedbom apsorpcijskih spektara istih snimljenih u valnom području 190- 400 nm. Kvantifikacija je provedena korištenjem odgovarajućih baždarnih pravaca (Tablica 2). Prikupljanje i obrada podataka provedeni su aplikacijom OpenLAB CDS ChemStation (v. C.01.10) (Agilent Technologies), a rezultati su dodatno obrađeni u programu Microsoft Office Excel. Rezultati udjela pojedinačnih slobodnih i vezanih polifenola izraženi su kao maseni udjel ($\mu\text{g g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$) u suhoj tvari početnog uzorka te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

Tablica 2. Jednadžbe baždarnih pravaca za pojedinačne slobodne i vezane polifenolne spojeve određivane u uzorcima biljke obične trske

Naziv spoja	Koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Valna duljina detekcije (nm)	Jednadžba baždarnog pravca		
			Bez internog standarda	S internim standardom	Vrsta i koncentracija internog standarda ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Rutin	1-100	350	$y=15,291x+6,1168$ $R^2=0,9999$	-	-
Kvercetin	1-100	370	$y=40,781x-17,467$ $R^2 = 0,9999$	-	-
Kvercetin-3-glukozid		350			
<i>t</i> -ferulinska kiselina	0,2 – 2,0*	320	-	$y=1,0065x+0,0041$ $R^2 = 0,9947$	Kafeinska kiselina, 50
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,2 – 2,0*	320	-	$y=1,1626x+0,0179$ $R^2 = 0,9993$	Kafeinska kiselina, 50

*relativna koncentracija s obzirom na koncentraciju internog standarda

3.2.5. Karakterizacija ugljikohidratne frakcije

3.2.5.1. Određivanje udjela vlakana

Udjel netopljivih i topljivih vlakana određen je integriranom enzimsko-gravimetrijskom metodom AOAC 2011.25, uz pomoć seta za određivanje ukupnih vlakana (K-INTDF, Megazyme, Irska). Enzimska hidroliza biljnog materijala provodi se termostabilnom alfa-amilazom, amiloglukozidazom i proteazom pri definiranim uvjetima. Udjeli netopljivih vlakana i topljivih vlakana kvantificiraju se gravimetrijski nakon filtracije, a naknadno se analiziraju udjeli proteina i mineralnog ostatka u svrhu korekcije rezultata. Detaljno opisan protokol po kojem je provedena metoda dio je komercijalnog seta.

Postupak rada:

Enzimska digestija

Uzorak cijele trske je prethodno usitnjen na kugličnom mlinu (Cryomill, Retsch (Haan, Njemačka)). Potrebno je izvagati $1,000 \pm 0,005$ g usitnjenog uzorka u laboratorijske boce od 250 ml, nakon čega se uzorak navlaži s 1 mL etanola (96 %-tni) te se doda 40 mL 50 mM maleat-

pufera (pH 6,0) koji sadrži pankreasnu α -amilazu i amiloglukozidazu. Uzorci se inkubiraju 16 h pri 37 °C uz kontinuirano miješanje. Dodatkom 3 mL 0,75 M trizma bazične otopine (konačni pH ~ 8,2) te zagrijavanjem reakcijske smjese u vodenoj kupelji pri 95-100 °C tijekom 20 minuta, dolazi do zaustavljanja enzimske hidrolize. Potom se uzorci ohlade na 60 °C te se dodaje 100 μ L otopine proteaze. Nakon toga slijedi inkubacija uzoraka na 60 °C tijekom 30 minuta, uz miješanje. Enzimska reakcija zaustavlja se dodavanjem 4 mL 2 M octene kiseline (konačni pH ~ 4,3). Na kraju se dodaje 1 mL otopine sorbitola (100 mg/mL) koji služi kao interni standard.

Određivanje udjela netopljivih vlakana (IDF)

Nakon provedene enzimske digestije, uzorci se kvantitativno filtriraju uz pomoć vakuuma na prethodno pripremljenim sinter lončićima. Zaostali talog na sinter lončiću ispire se 78 %-tnim etanolom, a zatim i 96 %-tnim etanola i acetonom (po 15 mL svako otapalo) te se suši u digestoru, a zatim i u sušioniku pri 105 °C, do konstantne mase. Filtrat se nadopunjava vodom do 70 mL te se koristi za određivanje topljivih vlakana.

Određivanje udjela topljivih vlakana (SDF)

Sakupljeni filtrat iz prethodne faze (70 mL), potrebno je zagrijati na 60 °C, a zatim se u njega dodaje 4 puta veći volumen 96 %-tnog zagrijanog etanola, uz intenzivno miješanje. Uzorak se zatim ostavi stajati na sobnoj temperaturi 60 minuta. Istaložena topljiva vlakana se potom kvantitativno filtriraju jednako kao i netopljiva vlakna, ispiru i suše do konstantne mase.

Određivanje udjela topljivih vlakana male molekulske mase (SDFS)

Topljiva vlakna male molekulske mase određuju se u filtratu preostalom nakon filtracije precipitiranih topljivih vlakana velike molekulske mase (precipitacija etanolom). Proveden je modificiran postupak prema McClearyju i suradnicima (2012). Polovica volumena filtrata (približno 175 mL) se upari do suhoga pomoću rotacijskog vakuum uparivača, a zatim se suhi talog resuspendira u 5 mL demineralizirane vode. Alikvot 1 mL se pomiješa s prethodno ispranim smolama Amberlite i Ambersep pomiješanima u omjeru 1:1 (ukupno 4 g), u laboratorijskoj čašici. Doda se također i 10 mL demineralizirane vode te se sadržaj miješa tijekom 10 min na magnetskoj mješalici, a nakon toga se profiltrira preko filter papira Whatman 1 u tikvicu s okruglim dnom. Filtrat se upari do suhoga, a talog se resuspendira u 1 mL demineralizirane vode, mikrofiltrira i analizira HPLC-RID metodom.

HPLC-RID analiza topljivih vlakana male molekulske mase

Korišten je kromatografski sustav Agilent 1200 Series i kromatografska kolona Agilent Hi-PlexCa (7,7 x 300 mm, 8 μ m). Mobilnu fazu činila je demineralizirana voda. Uzorak je injektiran u volumenu od 10 μ L, a elucija je provedena izokratno, uz protok mobilne faze od 0,6 mL min⁻¹. Temperatura kolone iznosila je 80 °C, a detektora 40 °C. Na kromatogramima uzoraka izuzme se ukupna površina pikova koji eluiraju prije retencije karakteristične za disaharid maltozu (odredi se analizom uzorka (Retention Time Standard koji je sastavni dio enzimskog seta). Koncentracija topljivih vlakana male molekulske mase izračuna se pomoću internog standarda sorbitola (iz njegove poznate dodane koncentracije u uzorak i izračunatog faktora odziva za glukozu). Određivanje topljivih vlakana male molekulske mase provedeno je u duplikatu.

Izračun rezultata:

Masa netopljivih (NV) i topljivih (TV) vlakana određuje se iz razlike konstantne mase sinter lončića prije i nakon filtracije. Udio vlakana određuje se s obzirom na početnu masu uzorka (ili masu suhe tvari) kojom je započeta enzimska hidroliza. Dobiveni udio potrebno je korigirati s obzirom na udio proteina i pepela u uzorcima netopljivih i topljivih vlakana.

Analize netopljivih i topljivih vlakana napravljene su u 4 paralele, a korekcijske analize napravljene su u duplikatu. Rezultati su izraženi kao maseni udjel (%) topljivih i netopljivih vlakana u sirovoj ugljikohidratnoj frakciji i prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.5.1.1. Određivanje udjela proteina

Udjel proteina određuje se prema metodi po Kjeldahl-u, poluautomatiziranim postupkom. Metoda se odvija se u tri koraka (Padmore, 1990b).

Postupak rada:

Mineralizacija

U Kjeldahl kivete kvantitativno se prenese uzorak netopljivih ili topljivih vlakana sa sinter lončića te se doda 5 g tabletiranog katalizatora (Kjeldahl tablete) i 12 mL koncentrirane sumporne kiseline. Slijepa proba sadrži samo katalizator i sumpornu kiselinu. Epruvete se postavljaju u digestijsku jedinicu se se provodi mineralizacija uzoraka pri visokoj temperaturi. Mineralizacija je

gotova kada tekućina u kivetama postane bistra i svijetlozelene boje bez crnih čestica, a stijenke kiveta su potpuno čiste. Epruvete se ostave hladiti do sobne temperature te se u svaku epruvetu potom doda 80 mL destilirane vode.

Alkalizacija i destilacija

Destilacija se odvija u Kjeltec sustavu u koji se stavlja kiveta s mineraliziranim razrijeđenim uzorkom. Dodatkom otopine natrijeve lužine (NaOH, 40% w/v, 70 mL) i vodene pare, oslobađa se amonijak koji se predestilira (tijekom 4min) u otopinu borne kiseline s indikatorima (25 mL) u Erlenmeyerovoj tikvici koja poprima zelenu boju.

Titracija

Bireta se napuni s 0,1 M HCl-om te se titrira sadržaj Erlenmeyer tikvice nakon destilacije. U završnoj točki titracije boja otopine postane blijedo ružičasta. Isti postupak provodi se i za slijepu probu.

Izračun rezultata:

Utrošak kloridne kiseline za titraciju preračunava se na udjel oslobođenog dušika u uzorku [6], a potom se udjel dušika u uzorku putem prikladnih korekcijskih faktora preračunava na udjel proteina u uzorku [2]. Korekcijski faktori mogu se razlikovati ovisno o uzorcima i prisutnosti neproteinskog dušika u istima.

$$\% N = \frac{(V - V_S) * c(HCl) * 14,007 * 100}{m(\text{uzorak})} \quad [6]$$

$$\% \text{ proteina} = \% N * F \quad [7]$$

gdje je:

V - volumen HCl-a utrošen za titraciju uzorka (mL)

V_S - volumen HCl-a utrošen za titraciju slijepa probe (mL)

c - molaritet kiseline (mol/L)

m - masa uzorka (g)

F - faktor za preračunavanje dušika u proteine (6,25)

Određivanje udjela proteina u netopljivim i topljivim vlaknima uzorka trske provedeno je u duplikatu te je podatak korišten za korekciju rezultata udjela netopljivih i topljivih vlakana.

3.2.5.1.2. Određivanje udjela pepela

Udio pepela u netopljivim i topljivim vlaknima uzorka cijele trske određen je suhom mineralizacijom u mufolnoj peći te gravimetrijskom kvantifikacijom dobivenog ostatka (Padmore, 1990c).

Postupak rada:

Sinter lončići s netopljivim i topljivim vlaknima se stave u hladnu mufolnu peć. Peć se podese na 550 °C i uključi. Spaljivanje uzoraka provodi se tijekom 6 h, mjereći otkad je postignuta zadana temperatura. Nakon spaljivanja, lončići se postupno hlade u peći te se izvade u eksikator kada se dosegne temperatura približno 130 °C, u kojem se zatim ohlade do sobne temperature. Ohlađeni lončići s pepelom se važu. Udio pepela u uzorku izračuna se iz razlike mase lončića s uzorkom i poznate mase praznog lončića te se koristi za korekciju udjela netopljivih i topljivih vlakana u uzorku.

3.2.5.2. Određivanje monomernog sastava strukturnih ugljikohidrata

3.2.5.2.1. Kiselinska hidroliza

Hidrolizom u kiselom mediju i pri povišenoj temperaturi dolazi do oslobađanja monomernih šećera koji čine polisaharide stanične stijenke materijala, koji se onda određuju prikladnim instrumentalnim metodama. U ovome istraživanju provedena su 2 načina hidrolize - sa ili bez prethodne predhidrolize. U staklene epruvete s čepovima na navoj odvažuje se 25±2 mg polisaharidnog uzorka, odnosno alkoholno-netopljivog ostatka (priprema opisana u poglavlju 3.2.2.3.). Zatim se dodaje 250 µL 72 %-tne v/v sumporne kiseline te se uzorak homogenizira u kiselini pomoću staklenog šapića tijekom 30 min i pri sobnoj temperaturi. Homogenizacija s jakim mineralnom kiselinom, odnosno predhidroliza, omogućuje narušavanje visokoorganiziranih polisaharidnih struktura stanične stijenke te njihovu uspješniju potpunu hidrolizu u daljnjim koracima. Nakon predhidrolize, kiselina se razrjeđuje do koncentracije 1 M, dodatkom 2,25 mL demineralizirane vode te 0,5 mL internog standarda riboze (vodena otopina, 2,4 mg mL⁻¹). Uzorci se potom vorteksiraju, izvade se stakleni štapići, epruvete se začepi i postave u prethodno zagrijani termoblok (100 °C) na daljnju hidrolizu. Hidroliza se provodi daljnjih 2 h (ukoliko je nastavak na predhidrolizu), a postupak pripreme uzorka je istovjetan kao i za predhidrolizu, osim što se kiselina dodaje zadnja. Po završetku hidrolize, uzorci se kratko ohlade u hladnoj vodi te zatim i centrifugiraju (3000 rpm, 5 min, sobna temp.). Izuzme se 1 mL bistrog supernatanta u plastičnu Falcon epruvetu u koji se postupno dodaje 0,11 g praškastog kalcijevog karbonata u

svrhu neutralizacije. Uzorci se zatim ponovno centrifugiraju (9000 rpm, 10 min, sobna temp.) te se provjeri pH supernatanta pomoću pH indikatorskih trakica (pH 6-7). Izuzme se 200 µL neutralnog hidrolizata za daljnje analize.

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

U Eppendorf epruvete od 2 mL otpipetira se 50 µL neutraliziranog hidrolizata te se dodaje 50 µL 0,6 M otopine natrijevog hidroksida, vorteksira, a zatim se doda i 100 µL 0,5 M metanolne otopine PMP reagensa te ponovno promiješa na vorteksu. Epruvete se dobro začepe te postave u kupelj prethodno zagrijanu na 70 °C. Reakcija derivatizacije odvija se tijekom 60 min, uz povremeno vorteksiranje uzoraka. Po završetku derivatizacije, uzorci se kratko ohlade u hladnoj vodi te se neutraliziraju dodatkom 120 µL 0,3 M otopine klorovodične kiseline i dopune s 680 µL vode. Otopini se izmjeri pH (4-6) pomoću pH indikatorskih trakica. Suvišak PMP reagensa uklanja se uzastopnim (ukupno 3) ekstrakcijama s klorformom, koji se dodaje u omjeru 1:0,5 (v:v). Svaka ekstrakcija provodi se najmanje 30 sekundi intenzivnim miješanjem na vorteksu, nakon čega se faze odijele kratkim centrifugiranjem. Pažljivo se izdvoji gornji vodeni sloj u kojem se nalaze PMP-derivati monosaharida.

3.2.5.2.3. Analiza PMP derivata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-DAD)

Analiza PMP derivata provedena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) uz DAD detektor (engl. *diode array detector*). Korištena je kromatografska kolona Zorbax Extend C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm), a mobilna faza sastojala se od 2 komponente: A- 100 mM Na-fosfatni pufer, pH 8,0 i B- 100 % acetonitril. Uzorak se injektirao u volumenu od 10 µL, a elucija je provedena gradijentno, uz protok mobilne faze od 1 mL min⁻¹, temperatura kolone iznosila je 25 °C. Kromatogrami su snimljeni pri 245 nm. Prije same analize uzorci su profiltrirani kroz mikrofiltere. Identifikacija spojeva provedena je usporedbom retencijskog vremena izdvojenih pikova s retencijskim vremenima analitičkih standarda, a kvantifikacija je provedena odgovarajućim baždarnim pravcima (Tablica 3). Za izradu baždarnih pravaca, pripremljena je smjesa standarada monomernih šećera koja je također podvrgnuta kiselinskoj hidrolizi (2 h, bez predhidrolize) te neutralizaciji, PMP derivatizaciji i analizi kako je opisano.

Tablica 3. Jednadžbe baždarnih pravaca za PMP-derivate monomernih šećera

Naziv spoja	Jednadžba baždarnog pravca	Koncentracijski raspon*
<i>Arabinoza</i>	$y=1,1842x-0,0155, R^2=0,9985$	0,1 - 1
<i>Fukoza</i>	$y=0,9309x-0,0151, R^2=0,9986$	0,1 - 1
<i>Galaktoza</i>	$y=0,996x-0,0178, R^2=0,9980$	0,1 - 1
<i>Glukoza</i>	$y=0,7948x+0,0041, R^2=0,9987$	0,1 - 1
<i>Ksilozna</i>	$y=1,024x-0,0076, R^2=0,9987$	0,1 - 1
<i>Manoza</i>	$y=0,8434x-0,0006, R^2=0,9984$	0,1 - 1
<i>Ramnoza</i>	$y=0,8904x-0,0072, R^2=0,9991$	0,1 - 1
<i>Glukuronska kiselina</i>	$y=0,724x-0,00007, R^2=0,9991$	0,1 - 1
<i>Galakturonska kiselina</i>	$y=0,7463x-0,0006, R^2=0,9991$	0,1 - 1

*u odnosu na interni standard riboze u koncentraciji 400 µg mL⁻¹

3.2.5.3. Određivanje udjela nestrukturnih ugljikohidrata

Analiza nestrukturnih ugljikohidrata provodena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) uz RI detektor (engl. *refractive index detector*). Korišten je kromatografski sustav Agilent 1200 Series i kromatografska kolona Agilent Hi-PlexCa (7,7 x 300 mm, 8 µm). Parametri analize opisani su u poglavlju 3.2.5.1. (jednaki kao i za analizu topljivih vlakana male molekulske mase). Prije analize uzorci su pripremljeni na način da je alikvot od 5 mL 80 %-tnog etanolnog ekstrakta uparen do otprilike 1 mL pomoću rotacijskog vakuum uparivača (u svrhu uklanjanja etanola), a zatim je upareni uzorak kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 5 mL i nadopunjen demineraliziranim vodom. Tako pripremljen uzorak je profiltriran kroz mikrofilter (RC, 0,2 µm). Identifikacija spojeva provedena je usporedbom retencijskog vremena pikova na kromatogramima uzoraka s retencijskim vremenima analitičkih standarda, a kvantifikacija je provedena odgovarajućim baždarnim pravcima (Tablica 4). Analiza nestrukturnih ugljikohidrata provedena je u duplikatu.

Tablica 4. Jednadžbe baždarnih pravaca nestrukturnih ugljikohidrata

Naziv spoja	Jednadžba baždarnog pravca
<i>Glukoza</i>	$y=172020x-3534,2, R^2=0,9970$
<i>Fruktoza</i>	$y=152109x-865,13, R^2=0,9989$
<i>Maltoza</i>	$y=156256x+71,051, R^2=0,9999$

3.2.6. Obrada podataka

Svi rezultati u radu prikazani su kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom, što je izračunato pomoću programa Microsoft Excel (IBM, SAD). Obrada kromatograma i spektralnih podataka za odabrane pikove omogućena je OpenLAB Chemstation programom (Agilent Technologies, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

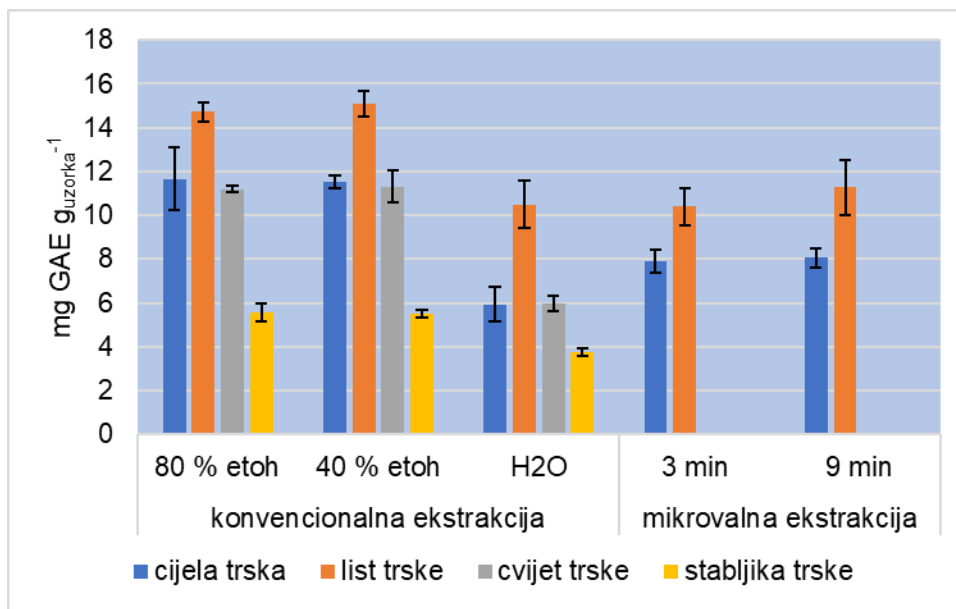
Biljka obične trske smatra se potencijalno vrijednom sirovinom, a glavna prednost joj je dostupnost u velikoj količini, mogućnost uzgoja na različitim područjima te niska cijena. U svrhu istraživanja mogućnosti valorizacije lignocelulozne sirovine obične trske, ovaj rad bio je usmjeren na karakterizaciju polifenolne i ugljikohidratne frakcije. U tom smislu, istražen je polifenolni sastav obične trske i dijelova biljke - cvijeta, lista i stabljike, određivanjem ukupnih i pojedinačnih slobodnih i vezanih polifenolnih spojeva te antioksidacijskog kapaciteta sirovine. Pritom su istražene mogućnosti konvencionalne ekstrakcije, a zatim i učinkovitost mikrovalne ekstrakcije s najpogodnijim otapalom. Ugljikohidratna frakcija karakterizirana je s obzirom na udio vlakana te monomerni sastav polisaharida stanične stijenke.

4.1. BIOAKTIVNI SASTAV OBIČNE TRSKE

Ekstrakti obične trske i njezinih dijelova pripremljeni su konvencionalnom ekstrakcijom uz miješanje i zagrijavanje (80 °C) i primjenom 3 otapala koja su se razlikovala s obzirom na koncentraciju etanola - 80 % (v/v), 40 % (v/v) i čista demineralizirana voda (0 % etoh). U dobivenim ekstraktima određen je udio ukupnih polifenola reakcijom s Folin-Ciocalteu reagensom i Trolox-ekvivalentni antioksidacijski kapacitet dvjema metodama - ABTS i DPPH. Osim konvencionalne, provedena je mikrovalna ekstrakcija (MAE - engl. microwave-assisted extraction) s 80 %-tnim etanolom i pritom je uspoređeno vrijeme ekstrakcije od 3 i 9 min uz stalne parametre konačne temperature i snage mikrovalova. U MAE ekstraktima također je određen udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet. Osim karakterizacije spektrofotometrijskim metodama, u svim ekstraktima određeni su i udjeli pojedinačnih polifenola, sukladno dostupnim standardima, HPLC-DAD metodom.

4.1.1. Udio ukupnih polifenola

Udjeli ukupnih polifenola obične trske i dijelova biljke, prikazani su na Slici 7.



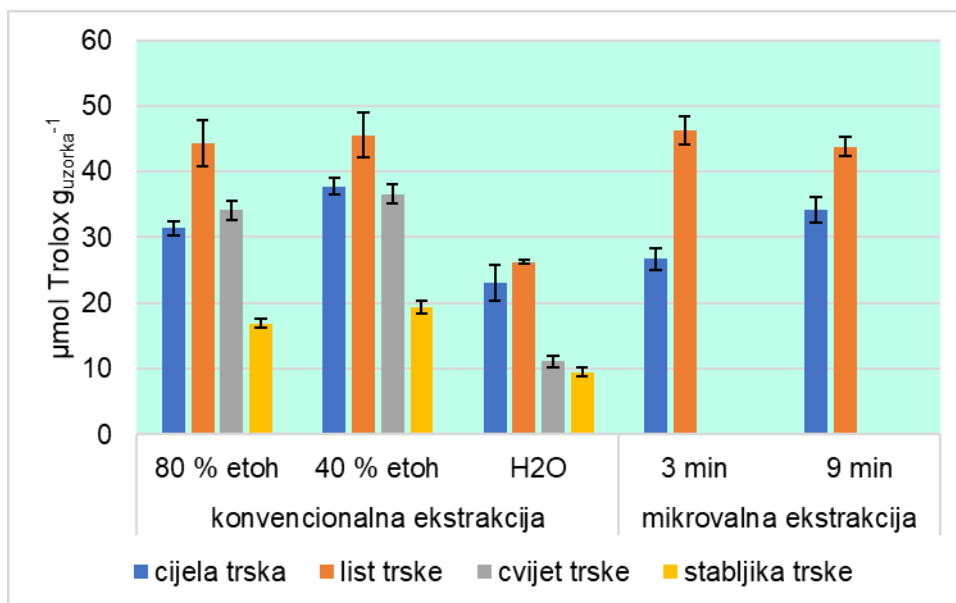
Slika 7. Udio ukupnih polifenola (mg GAE g^{-1} uzorka) u vodenim i etanolnim ekstraktima obične trske i njezinih dijelova

Među analiziranim uzorcima podvrgnutim konvencionalnoj ekstrakciji, najveći udjel ukupnih polifenola, određen je listu obične trske, a slijede cijela trska, cvijet trske i stabljika trske s najmanjim udjelom. S obzirom na ekstrakcijsko otapalo, općenito se može zaključiti da ekstrakciji ukupnih polifenola iz obične trske pogoduje povećan udio etanola u ekstrakcijskom otapalu, a pritom povećanje koncentracije etanola od 40 do 80 % nije utjecalo na povećanje ekstrakcijske učinkovitosti (u smislu koncentracije izdvojenih polifenola u istom vremenu). S druge strane, promjenom čiste vode kao otapala udio ukupnih polifenola se smanjio, približno 2 puta u uzorcima cijele trske i cvijeta trske i približno 25 % u uzorcima lista i stabljike. Iz navedenog se može zaključiti da ekstrakciji polifenolnih spojeva iz biljke obične trske pogoduje smanjenje polarosti otapala, što je postignuto povećanjem koncentracije etanola. Etanol ima GRAS (engl. Generally Recognized As Safe) status i njegova primjena kao ekstrakcijskog otapala je favorizirana u odnosu na, primjerice, metanol, koji se također koristi u istraživanjima ekstrakcije polifenola iz biljnih materijala s obzirom na sličnu polarnost. Od svih analiziranih uzoraka, najveći udio ukupnih polifenola određen je u ekstraktu lista obične trske otopinom etanola volumnog udjela 40 % ($15,10 \pm 0,59 \text{ mg GAE g}^{-1}$ uzorka), dok je najmanji udjel ukupnih polifenola utvrđen kod vodenog ekstrakta stabljike obične trske ($3,21 \pm 0,65 \text{ mg GAE g}^{-1}$ uzorka). Dobiveni rezultati upućuju na to da je otopina etanola volumnog udjela 40 % optimalna za izdvajanje polifenola iz uzorka trske. Unuofin i suradnici (2024) odredili su sadržaj ukupnih polifenola u vodenom ekstraktu lišća biljke

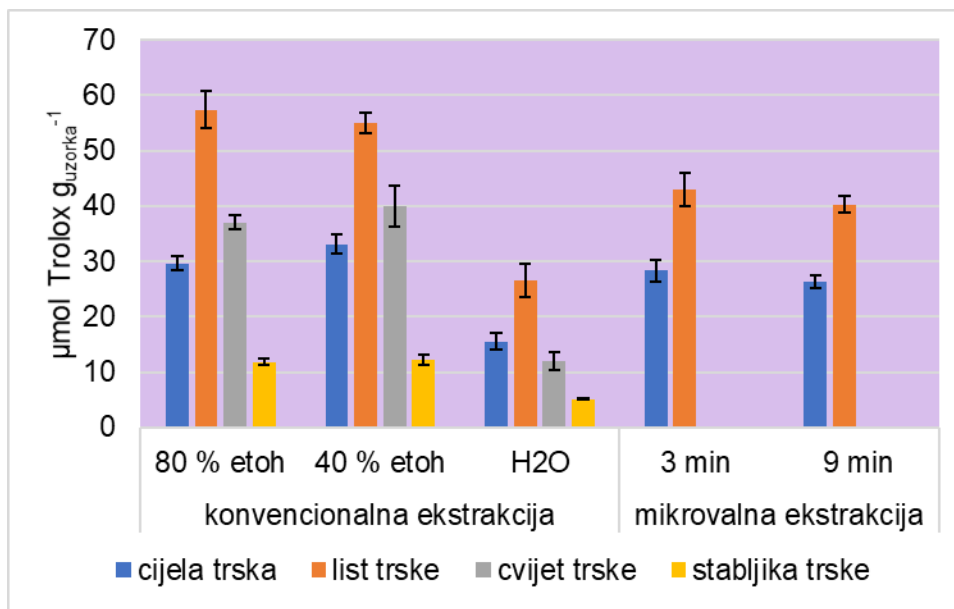
obične trske, $39,17 \pm 0,65$ mg GAE g^{-1} uzorka. U istraživanju koje su proveli Sohaib i suradnici (2022) u etanolnim ekstraktima izdanaka biljke obične trske određen je udio ukupnih polifenolnih spojeva od $131,08 \pm 3,10$ mg GAE g^{-1} uzorka. Takav udio polifenola puno je veći od onih koji su dobiveni u ovom istraživanju u bilo kojem od uzoraka, no to nije iznenađujuće zbog velikog broja varijabli koje mogu utjecati na polifenolni sastav od samog tla, lokacije i staništa biljke, do različitih dijelova koji se ekstrahiraju te načina pripreme uzorka i samog postupka ekstrakcije. Song i suradnici (2024) istraživali su promjenu polifenolnog sastava kao odgovor na uvjete u kojima raste biljka obične trske te su došli do zaključka da slanost tla uvelike utječe na sastav. Mikrovalna ekstrakcija provedena je u uzorcima lista i cijele biljke obične trske, uz različitim vremensko trajanje te s otapalom 80 % EtOH. U uzorku lista (3 min MV: 10,40 mg GAE g^{-1} uzorka; 9 min MV: 11,27 mg GAE g^{-1} uzorka) potvrđen je veći udio ukupnih polifenola u odnosu na uzorak cijele biljke obične trske (3 min MV: 7,92 mg GAE g^{-1} uzorka; 9 min MV: 8,06 mg GAE g^{-1} uzorka). Ako gledamo duljinu trajanja ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, iz dobivenih rezultata vidljivo je da je i kod jednog i kod drugog uzorka došlo do blagog povećanja ukupnih polifenola pri duljem trajanju ekstrakcije. Kada usporedimo ekstrakcije potpomognute mikrovalovima s konvencionalnom, vidljivo je da je u slučaju konvencionalne ekstrakcije dobiven viši udio polifenola i kod uzorka lista i kod cijele biljke obične trske. Iz toga je moguće zaključiti da duljina trajanja ekstrakcije potpomognute mikrovalovima nema značajnog utjecaja na povećanje koncentracije ukupnih polifenola u uzorcima, a konvencionalna ekstrakcija je u ovom slučaju bila učinkovitija i omogućila je izdvajanje veće koncentracije ukupnih polifenola. Milani i suradnici (2020) uspoređivali su učinkovitost mikrovalne ekstrakcije u odnosu na konvencionalnu pri ekstrakciji polifenola iz izdanaka bambusa *Phyllostachys pubescens* koji dolazi pripada porodici Poaceae kao i obična trska. Prilikom ekstrakcije varirani su vrijeme ekstrakcije, temperatura i omjer čvrsto/tekuće, a ukupni udio polifenola dobiven pri optimalnim uvjetima mikrovalne ekstrakcije (4 min na 105 °C s omjerom 6,25 mg/mL) bio je oko osam puta veći od onoga dobivenog konvencionalnim metoda ekstrakcije. S obzirom na rezultate dobivene u ovom radu, konvencionalna ekstrakcija pokazala se boljom, a uz to je i financijski prihvatljivija te lakša za optimizaciju iako iziskuje više vremena za provođenje. Moguće je da dobiveni rezultati za ekstrakciju uz pomoć mikrovalova nisu dali maksimalne vrijednosti jer nije provedena optimizacija takve metode. Stoga bi, za daljnja istraživanja i potpuno pouzdane rezultate, to bilo potrebno napraviti.

4.1.2. Antioksidacijski kapacitet

Rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta u vodenim i etanolnim ekstraktima obične trske prikazani su na Slikama 8 i 9. Sukladno najvećim udjelima ukupnih polifenola, najveći antioksidacijski kapacitet određen je u listu trske (ABTS $44,27 \pm 3,53 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ uzorka i DPPH $57,36 \pm 3,34 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ uzorka), podjednako u 40 % i 80 % etanolnom ekstraktu. Najmanji antioksidacijski kapacitet ABTS $11,58 \pm 2,53 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ uzorka i DPPH $6,02 \pm 1,08 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ uzorka) određen je u vodenom ekstraktu stabljike obične trske.



Slika 8. Antioksidacijski kapacitet ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ uzorka) vodenih i etanolnih ekstrakata obične trske i njezinih dijelova određen ABTS metodom

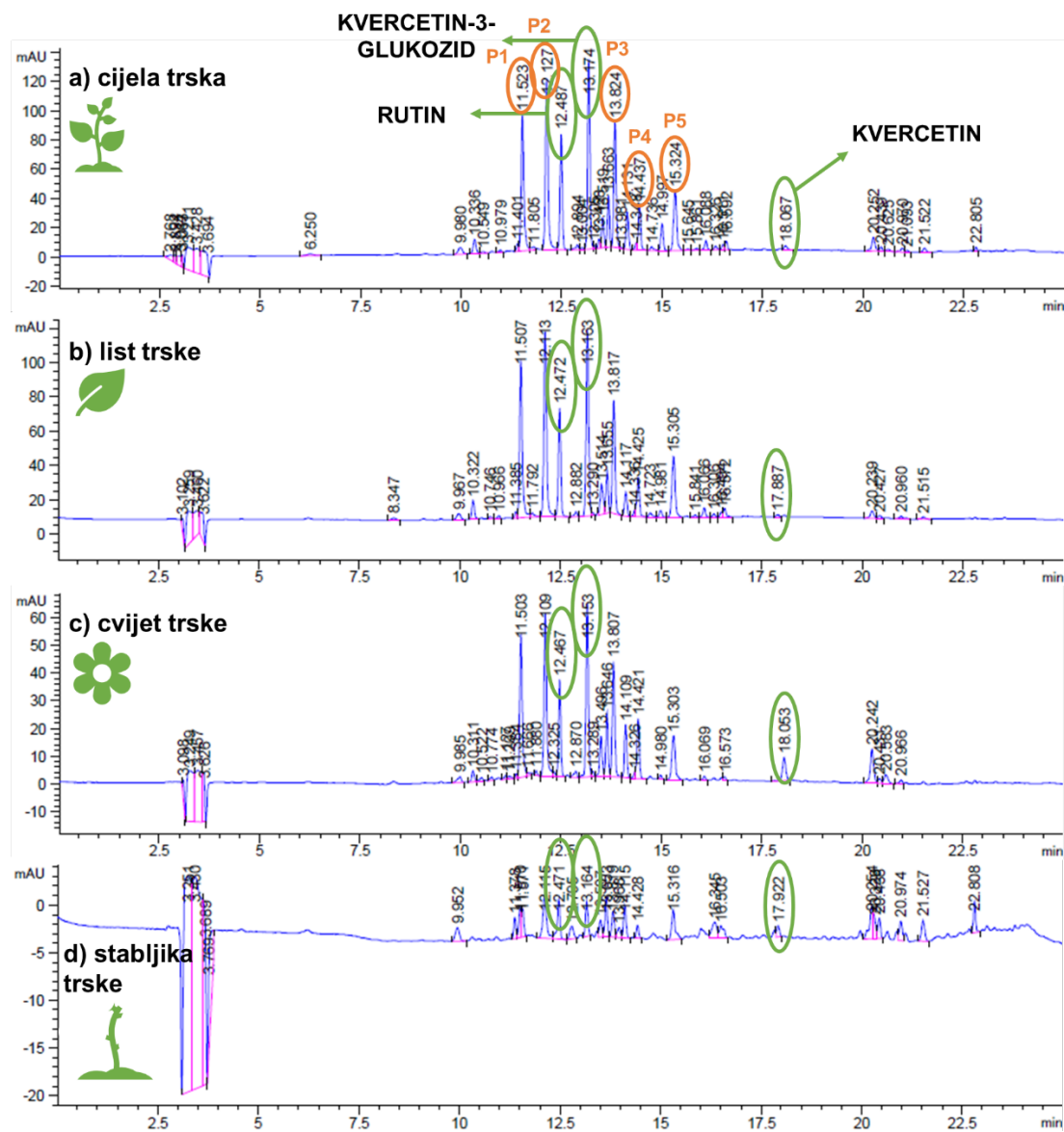


Slika 9. Antioksidacijski kapacitet ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ uzorka) vodenih i etanolnih ekstrakata obične trske i njezinih dijelova određen DPPH metodom

Nakon provedene ekstrakcije uz pomoć mikrovalova u trajanju od 3 i 9 minuta na uzorcima lista i cijele biljke obične trske uz otapalo 80 %-tnog etanola, veći antioksidacijski kapacitet dobiven je za uzorke lista podvrgnute ekstrakciji uz pomoć mikrovalova u trajanju od 3 minute, nego u trajanju od 9 minuta. No, razlika je vrlo mala pa možemo reći da su dobivene otprilike jednake vrijednosti za ta dva uzorka. Ako takav način ekstrakcije usporedimo s konvencionalnom, konvencionalna ekstrakcija je pokazala veći antioksidacijski kapacitet u uzorcima lista obične trske uz DPPH metodu, a ABTS metoda je pokazala vrlo slične rezultate. U uzorku cijele biljke obične trske veći antioksidacijski kapacitet za reakciju u trajanju od 3 minute dobiven je DPPH metodom ($28,33 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ uzorka), u usporedbi s ABTS metodom ($26,70 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ uzorka) za isto trajanje reakcije, dok je za reakciju u trajanju od 9 minuta obrnuto. Takve razlike i odstupanja u rezultatima mogu se pripisati ljudskoj pogrešci tijekom provođenja metode te drugačijim reakcijama između slobodnih radikala i antioksidansa u uzorcima, što ovisi o strukturi odnosno vrsti polifenola. Za neke uzorke pokazala se manja nedosljednost između antioksidacijskog kapaciteta i udjela ukupnih polifenola, a zbog bliskih srednjih vrijednosti, mogućnosti interferencije drugih spojeva osim polifenola u samim metodama i osjetljivosti pojedine metode s obzirom na zastupljene polifenolne spojeve u sktraktu, ove razlike mogu se pripisati eksperimentalnoj pogrešci (Sanchez-Rangel i sur., 2013). Ipak, za većinu ekstrakata poredak vrijednosti antioksidacijskih kapaciteta podudara se s poretkom vrijednosti prema udjelu ukupnih polifenola.

4.1.3. Udio pojedinačnih slobodnih polifenolnih spojeva

Kromatogrami uzoraka trske analizirani HPLC-DAD metodom s prikazom pikova slobodnih polifenolnih spojeva prikazani su na Slici 10 a-d.



Slika 10. Kromatogrami 80 % etanolnog ekstrakta (konvencionalna ekstrakcija) obične trske (a), lista trske (b), cvijeta trske (c) i stabljike trske (d)

Na kromatogramima ekstrakata obične trske i njezinih dijelova, vidljivo je 10-ak pikova, od kojih 5 dominira s obzirom na ukupnu površinu. Među njima identificirani su rutin i kvercetin-3-glukozid,

a također je identificiran i kvercetin aglikon, međutim s malom relativnom površinom u odnosu na dominantne pikove (Slika 10).

Od ostalih dominantnih neidentificiranih pikova, koji odgovaraju retencijskom vremenima 11,5 (P1) min, 12,1 min (P2), 13,8 min (P3), 14,4 min (P4) i 15,3 min (P5), uvidom u karakteristične apsorpcijske spektre u području 190-450 nm (Prilog 1), indicirano je da ovi spojevi pripadaju skupini flavonoida (Taniguchi i sur., 2023). S obzirom na veliku sličnost spektara P3, P4 i P5 sa spektrima rutina i kvercetin-3-glukozida, može se pretpostaviti da se radi o nekim drugim kvercetinским glikozidima ili pak glikozidima drugih flavonola. Neidentificirani pikovi P1 i P2 imaju pak međusobno identičan spektar, različit od ostalih neidentificiranih pikova (a time i rutina i kvercetin-3-glukozida), a s obzirom na podatke dostupne u literaturi, postoji mogućnost da se radi o C-glikozidima flavonola (Nawar i sur., 1980). Spojevi koji su uspješno identificirani, također su i kvantitativno određeni, a rezultati udjela prikazani su u Tablici 5. Usporedbom svih uzoraka, može se općenito zaključiti da je list najbogatiji identificiranim spojevima, a konvencionalna ekstrakcija se opet pokazala učinkovitijom u odnosu na ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima. Ovi rezultati sukladni su udjelima ukupnih polifenola.

Tablica 5. Udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva u ekstraktima obične trske

Dio trske	Ekstrakcija	Otopalo / vrijeme	Polifenolni spoj (mg g ⁻¹ s.tv.)		
			Kvercetin	Kvercetin-3-glukozid	Rutin
Cijela trska	konvencionalna	80 % EtOH	0,038 ± 0,003	0,909 ± 0,075	0,660 ± 0,010
		40 % EtOH	0,049 ± 0,003	0,932 ± 0,019	0,658 ± 0,008
		H ₂ O	-	0,274 ± 0,036	0,333 ± 0,023
	MAE	3 min	0,024 ± 0,000	0,776 ± 0,126	0,547 ± 0,088
		9 min	0,026 ± 0,004	0,831 ± 0,063	0,585 ± 0,050
List	konvencionalna	80 % EtOH	0,047 ± 0,003	1,559 ± 0,020	1,173 ± 0,027
		40 % EtOH	0,048 ± 0,004	1,657 ± 0,044	1,113 ± 0,043
		H ₂ O	-	0,562 ± 0,063	0,647 ± 0,016
	MAE	3 min	0,032 ± 0,008	1,425 ± 0,308	0,927 ± 0,202
		9 min	0,026 ± 0,007	1,629 ± 0,039	1,050 ± 0,022
Cvijet	konvencionalna	80 % EtOH	0,160 ± 0,017	0,984 ± 0,065	0,590 ± 0,023
		40 % EtOH	0,151 ± 0,015	0,791 ± 0,078	0,401 ± 0,120
		H ₂ O	-	0,140 ± 0,075	0,175 ± 0,077
Stabljika	konvencionalna	80 % EtOH	-	0,038 ± 0,005	0,053 ± 0,005
		40 % EtOH	-	0,036 ± 0,004	0,054 ± 0,000
		H ₂ O	-	-	0,038 ± 0,016

Najmanja koncentracija identificiranih flavonoida pronađena je u stabljici obične trske. Iz tablice 4 je vidljivo da izdvajanju kvercetina pogoduje manja polarnost otapala te su najviši udjeli određeni u etanolnim ekstraktima, dok u vodenim uopće nije detektiran. Napolarna priroda kvercetina vidljiva je i iz kasnije elucije tijekom HPLC analize kada u mobilnoj fazi ima više organskog modifikatora. Najviša koncentracija kvercetina određena je u uzorku cvijeta trske (konvencionalna ekstrakcija, 80 % etanolni ekstrakt, $0,160 \pm 0,017 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv. U vodenim ekstraktima svih uzoraka kvercetin nije identificiran. U gotovo svim uzorcima (osim stabljike trske) najviše je određeno kvercetin-3-glukozida. Najviši udio kvercetin-3-glukozida određen je u uzorku lista trske (konvencionalna ekstrakcija, 40 % etanolni ekstrakt, $1,657 \pm 0,044 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.). Rutin je također određen u značajnim udjelima, a najviši udio određen je u uzorku lista trske (konvencionalna ekstrakcija, 80 % etanolni ekstrakt, $1,113 \pm 0,043 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.), dok najmanji u vodenom ekstraktu stabljike trske. Klorogenska kiselina, rutin i kvercetin glavni su fenolni spojevi čiji se sadržaj povećava s izlaganjem teškim metalima, dok se sadržaj kafeinske, ferulinske i vanilinske kiseline smanjuje (Janczak-Peniasek i sur., 2023). S obzirom da veća koncentracija etanola u ekstraktu pogoduje ekstrakciji kvercetina, a potencijalno i drugih kvercetinskih glikozida, ali i drugih prisutnih flavonoida, u mikrovalnoj ekstrakciji je kao otapalo korištena 80 %-tna otopina, dok je od uzoraka, uz cijelu trsku, ekstrahirano još i list kao dio trske koji je najbogatiji polifenolnim spojevima. U usporedbi primijenjenih ekstrakcijskih tehnika, vidljivo je da je mikrovalnom ekstrakcijom postignuta približno jednaka učinkovitost za kvercetin-3-glukozid i rutin, a produljenje mikrovalne ekstrakcije na 9 min izotermne ekstrakcije pri $80 \text{ }^\circ\text{C}$, pri snazi mikrovalova od 250 W, rezultiralo je blagim povećanjem udjela kvercetin-3-glukozida i rutina. S obzirom na dostupnu literaturu, istraživanja polifenolnih spojeva u ekstraktima obične trske su limitirana, što dodatno daje na važnosti ovome radu i provedenom istraživanju u tu svrhu. Al-Sayed i suradnici (2024) odredili su, u 70 % etanolnim ekstraktima obične trske, dvije fenolne kiseline – klorogensku i ružmarinsku, zatim luteolin 6-C-glukozid i luteolin 8-C-glukozid, kvercetin-3-O-ksilozid, kvercitrin, apigenin hesperidin, naringin i druge. U ovom radu nije identificiran niti jedan od tih spojeva, ali je potrebna daljnja identifikacija pikova i detaljnija analiza uz dodatne standarde za prepoznavanje određenih polifenolnih spojeva.

4.1.4. Udio vezanih polifenolnih spojeva

Udio vezanih fenolnih spojeva određen je nakon alkalne hidrolize alkoholno-netopljivog ostatka. U staničnim stijenkama lignoceluloznih sirovina očekivano je detektiranje hidroksicimetnih kiselina kao što su p-kumarinska i t-ferulinska, one se također nalaze i u staničnim stijenkama biljaka iz porodice Poaceae iz koje potječe i biljka obične trske. Ferulinska i kumarinska kiselina

povezuju su na lignin, polisaharide i strukturne proteine staničnih stijenki, umrežujući te komponente pri čemu pružaju potporu u formiranju stanične stijenke. U lignoceluloznim sirovinama, *t*-ferulinska kiselina je često povezana eterskim vezama s arabinoksilanom ili ligninom, a esterskim vezama s *p*-kumarinskom kiselinom. Udio vezanih fenolnih spojeva u običnoj trsci prikazan je u Tablici 6.

Tablica 6. Udjel vezanih polifenolnih spojeva u ekstraktima obične trske

Uzorak	<i>p</i> -kumarinska kiselina (mg g _{s.tv.} ⁻¹)	<i>t</i> -ferulinska kiselina (mg g _{s.tv.} ⁻¹)
CIJELA TRSKA	5,130 ± 0,181	3,233 ± 0,157
CVIJET	6,732 ± 0,563	2,705 ± 0,176
LIST	3,436 ± 0,105	3,284 ± 0,053
STABLJIKA	5,000 ± 0,324	3,075 ± 0,182

U listu trske su *p*-kumarinska i *t*-ferulinska kiselina određene u približno jednakim udjelima (3,2 – 3,4 mg g_{s.tv.}⁻¹), dok u drugim uzorcima trske je udio *p*-kumarinske kiseline bio približno 1,5 – 2,5 puta veći od udjela *t*-ferulinske kiseline te je najveći udio (6,732 ± 0,563 mg g⁻¹ s.tv.) određen je u cvijetu trske. U uzorku cijele trske, udio vezanih fenolnih spojeva približno je iznosio 0,84 % s.tv. Prema dostupnoj literaturi, istraživanja koja su se bavila odreživanjem i kvantifikacijom vezanih polifenolnih spojeva u biljci obične trske. Neka od istraživanja fokusirala su se na proučavanje tih spojeva u različitim biljkama drugih lignoceluloznih sirovina, pa je tako koncentracija ferulinske kiseline u uzorku pšenične slame iznosila 464 mg g⁻¹ uzorka, a *p*-kumarinskom kiselinom u uzorcima pšenične i kukuruzne slame kretala se u rasponu između 30 – 70 mg g⁻¹ uzorka (Radenkovs i sur., 2021).

4.2. SASTAV UGLJIKOHIDRATNE FRAKCIJE

Analiza sastava ugljikohidratne frakcije uključivala je određivanje udjela nestrukturnih ugljikohidrata, strukturnih ugljikohidrata u obliku monomernog profila polisaharida stanične stijenke te topljivih i netopljivih vlakana. Ovime je omogućena detaljna karakterizacija sastava ugljikohidratne frakcije na temelju koje je moguće procijeniti udjele osnovnih polisaharidnih skupina, a što omogućava uvid u potencijal njihovog daljnjeg iskorištavanja.

4.2.1. Sastav i udio nestrukturnih ugljikohidrata

Prema Raessleru i sur. (2010), nestrukturane ugljikohidrate sačinjavaju šećerni alkoholi, monosaharidi, disaharidi, nativni oligosaharidi te škrob. Nestrukturani ugljikohidrati određeni su kao (i) udjeli jednostavnih šećera – maltoze, glukoze i fruktoze u 80 % etanolnom ekstraktu (konvencionalna ekstrakcija), zatim (ii) udio topljivih vlakana male molekulske mase kao dio protokola za određivanje vlakana specijaliziranim setom te, posredno, (iii) udio škroba. Udio nesturkturnih ugljikohidrata određen je HPLC-RID metodom, a rezultati su prikazani u Tablici 7.

Tablica 7. Udio nestrukturnih šećera u suhoj tvari obične trske

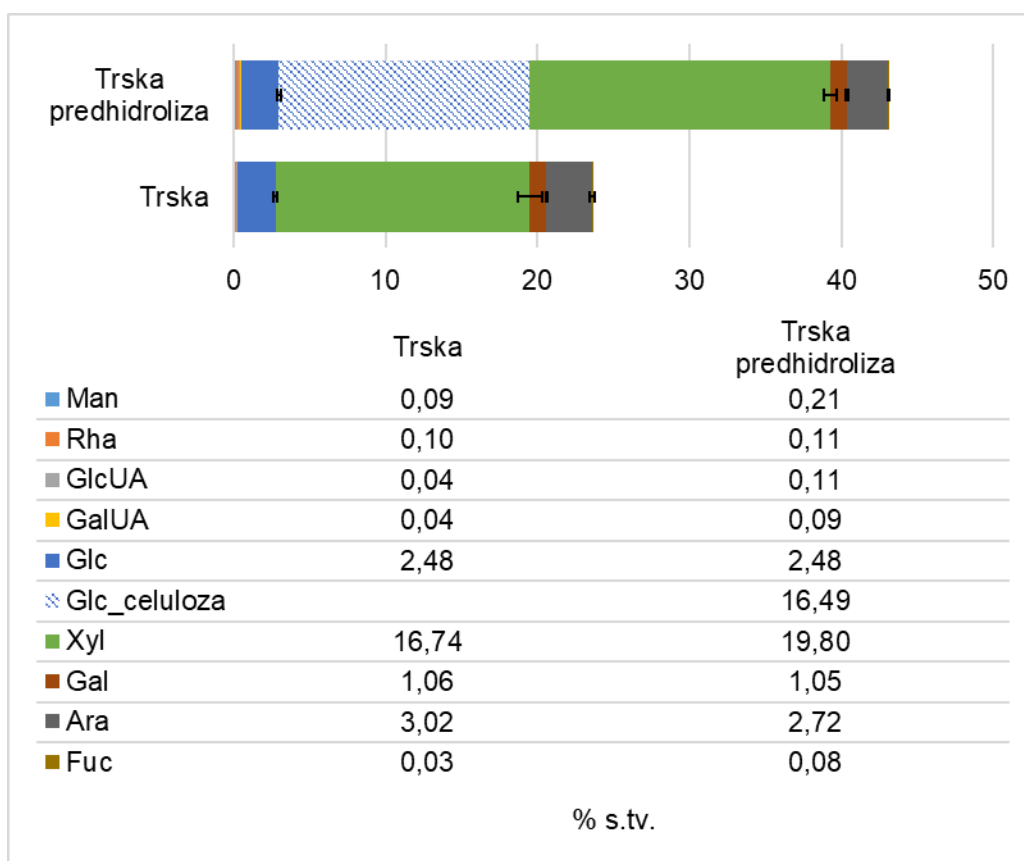
<i>Uzorak</i>	<i>Maltoza (% s.tv.)</i>	<i>Glukoza (% s.tv.)</i>	<i>Fruktoza (% s.tv.)</i>	<i>SDFS* (% s.tv.)</i>	<i>Škrob (% s.tv.)</i>
<i>Cijela trska</i>	1,14±0,02	1,62±0,10	1,86±0,08	0,68±0,05	n.d.

Dobiveni rezultati pokazuju da ukupan udio nestrukturnih ugljikohidrata u običnoj trsci iznosi približno 5,3 % suhe tvari, od čega se glavnina odnosi na jednostavne šećere – maltozu, glukoze i fruktozu. Škrob u uzorku cijele trske nije određen, tj. njegov udio bio je zanemariv. Analiza škroba provedena je neizravno usporedbom rezultata udjela glukoze određenog u 80 %-tnom etanolnom ekstraktu i udjela glukoze prilikom analize udjela topljivih vlakana male molekulske mase - SDFS (engl. soluble dietary fibre, soluble). Naime, prvi korak prilikom analize vlakana je enzimski digestija amilolitičkim enzimima – α -amilazom i amiloglukozidazom prilikom kojeg dolazi do razgradnje škroba do glukoze. S obzirom da nativno prisutna glukoza u uzorku izravno interferira s ovom metodom, potrebno je neovisno odrediti udio glukoze ili ju ukloniti prije enzimske digestije. Enzimski digest se taloži s četverostrukim udjelom etanola, a svi ugljikohidrati koji se pritom ne precipitiraju te eluiraju prije standarda koji predstavlja disaharid, određuju se kao topljiva vlakna male molekulske mase, odnosno nativno prisutni oligosaharidi u uzorku. Nakon enzimske digestije, određen je udio glukoze u uzorku od $1,9 \pm 0,1$ % s.tv. što je vrlo blizu vrijednosti određene ekstrakcijom s 80 % etoh. Dobivena razlika od 0,28 % je vrlo mala te predstavlja zanemariv udio škroba u uzorku. Također je bilo zanimljivo primijetiti iščezavanje pika maltoze, što je očekivano s obzirom na primjenu amiloglukozidaze. Korištena HPLC metoda, naime, ne diferencira saharozu i maltozu prilikoma analize (potpuna koelucija pikova) te je na ovaj način zapravo zaključeno da uzorak sadrži maltozu. Udio topljivih vlakana male molekulske mase u običnoj trsci bio je relativno nizak, približno 0,7 % s.tv. Bez obzira na male udjele nestrukturnih

ugljikohidrata, njihovo određivanje je važno u analizi ugljikohidratne frakcije nekog biljnog materijala jer mogu utjecati na rezultate određivanja monomernog sastava.

4.2.2. Sastav i udio strukturnih ugljikohidrata

Strukturni ugljikohidrati obične trske određeni su s obzirom na monomerni profil polisaharida stanične stijenke, a također je određen udio topljivih i netopljivih prehrambenih vlakana velike molekulske mase. Iz dobivenih rezultata pretpostavljen je udio celuloze, hemiceluloze i lignina u običnoj trsci te je dobiven uvid u sastav hemiceluloznih polisaharida. Rezultati udjela monomera koji sačinjavaju polisaharide stanične stijenke obične trske prikazani su na Slici 11.



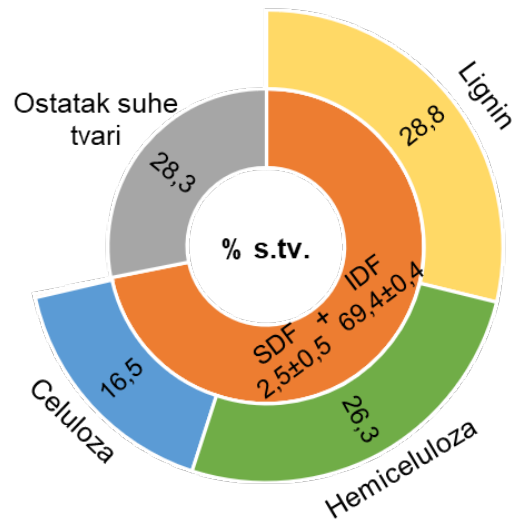
Slika 11. Monomerni profil strukturnih polisaharida obične trske

Iz dobivenih rezultata je vidljivo da strukturne polisaharide obične trske dominantno čine glukoza (Glc) i ksiloza (Xyl), a također su zastupljeni i arabinoza (Ara) te galaktoza (Gal). Udjeli ostalih monomera – manoze (Man), ramnoze (Rha), glukuronske kiseline (GlcUA), galakturonske kiseline (GalUA) i fukoze (Fuc) bili su zanemarivi, tj. iznosili su ukupno 0,3-0,6 % s.tv. Udio

strukturnih polisaharida u običnoj trsci iznosi približno 43 % suhe tvari, a određen je kao zbroj udjela svih monomera oslobođenih u hidrolizi s predhidrolizom. Usporedbom udjela ukupne glukoze sa i bez predhidrolize, može se zaključiti da celuloza čini približno 16,5 % suhe tvari obične trske. Naime, predhidroliza podrazumijeva homogenizaciju uzorka u jakoj mineralnoj kiselini uslijed čega dolazi do solvatacije (a kasnije i hidrolize) najotpornijih polisaharida, prvenstveno celuloze. Dio ukupne glukoze koji je uspješno hidroliziran i bez predhidrolize, najvjerojatnije pripada hemiceluloznim polimerima, poput ksiloglukana. Udio ukupne ksiloze u običnoj trsci iznosi približno 20 % s.tv. Ksilozna je dio hemiceluloznih polisaharida, dominantno arabinoksilana te manje zastupljenih ksiloglukana. Ukupni udio hemiceluloze može se procijeniti iz zbroja udjela ukupne ksiloze, arabinoze te i necelulozne glukoze. Razlika udjela ukupne ksiloze sa i bez predhidrolize može se pripisati nepotpunoj hidrolizi hemiceluloze (bez predhidrolize). Naime, hemiceluloza se nalazi u bliskim interakcijama s celulozom i ligninom te je moguće da je jedan manji dio hemiceluloze mogao biti uspješno hidroliziran tek uz primjenu predhidrolize. Tozluoğlu (2017) je u svom radu odredio da udio ukupnih šećera obične trske čini 51,8 % suhe biomase te da glukana, kao glavna komponenta stanične stijenke, čini 33,6 %, ksilan, glavni sastojak hemiceluloze, 16,5 %, a arabinan i galaktan, samo 1,45 % odnosno 0,21 % biomase. Iz monomernog sastava može se zaključiti i o prisutnosti pektina, i to prema udjelima galakturonske kiseline, ramnoze te dijela galaktoze i arabinoze, kao najzastupljenijih komponenata tog polimera (McCready i Gee, 1960). Prema navedenom, udio pektina u običnoj trsci je vrlo nizak, gotovo zanemariv (s obzirom na vrlo nizak udio galakturonske kiseline), a pretpostavka je da većina ukupne arabinoze i galaktoze ipak hemiceluloznog podrijetla.

Udio lignina, hemiceluloze i celuloze te netopljivih i topljivih vlakana velike molekulske mase u običnoj trsci prikazan je na Slici 12.

Ukupna vlakna velike molekulske mase (SDF + IDF, engl. soluble/insoluble dietary fibre) činila su približno 72 % suhe tvari obične trske, među kojima su dominantna bila netopljiva vlakna. Iz razlike udjela ukupnih vlakana i ukupnih strukturnih polisaharida, približno je određen udio lignina u uzorku, približno 29 % s.tv. Udio celuloze procijenjen je kao razlika oslobođene glukoze prilikom hidrolize sa i bez predhidrolize te iznosi približno 16,5 % s.tv. Hemicelulozni polisaharidi čini nešto više od četvrtine suhe tvari trske (26,3 % s.tv.) i u njima dominiraju pentozni šećeri i među njima dominira arabinoksilan, karakteristično za stanične stijenke predstavnika porodice Poaceae. Garido i suradnici (2017) odredili su da se trska kao sirovina za proizvodnju biogoriva sastoji od približno 37% hemiceluloze, 44% celuloze, 15% lignina i ostatka anorganskih tvari.



Slika 12. Udjeli topljivih i netopljivih vlakana, celuloze, hemiceluloze i lignina u običnoj trsci

5. ZAKLJUČCI

1. Povećanje udjela etanola do 40 % (v/v) u otapalu pozitivno je utjecalo na ekstraktabilnost ukupnih polifenola iz obične trske prilikom konvencionalne ekstrakcije, a također i na antioksidacijski kapacitet dobivenih ekstrakata. Primjenom mikrovalne ekstrakcije s vodenom-alkoholnim otapalom nije postignuto povećanje prinosa ukupnih polifenola.

2. Najveći udio ukupnih polifenola (15,10 mg GAE g⁻¹) te antioksidacijski kapacitet (DPPH 54,95 μmol Trolox g⁻¹, ABTS 45,56 μmol Trolox g⁻¹), u 40 %-tnom etanolnom ekstraktu, određen je u listu obične trske, a najmanji u stabljici trske (ukupni polifenoli 5,49 mg GAE g⁻¹, antioksidacijski kapacitet: DPPH 12,21 μmol Trolox g⁻¹, ABTS 19,39 μmol Trolox g⁻¹).

3. Iz analize pojedinačnih polifenola HPLC-DAD metodom, vidljiv je jednak profil u svim dijelovima obične trske: listu, stablici i cvijetu. Uspješno su identificirani rutin i kvercetin-3-glukozid, dok ostali pikovi nisu mogli biti identificirani zbog nedostatka analitičkih standarada. Ipak, uvidom u njihove apsorpcijske spektre, indicirano je da se radi o glikozidima flavonola i/ili flavona.

4. Vezani polifenoli obične trske pripadaju skupini fenolnih kiselina, a dominirali su *p*-kumarinska i *t*-ferulinska kiselina. Najveći udio *p*-kumarinske kiseline određen je u cvijetu trske (6,732 ± 0,563 mg g⁻¹ s.tv.), a *t*-ferulinska kiselina je bila zastupljena s približno jednakim udjelom u svim dijelovima biljke (2,705 - 3,284 mg g⁻¹ s.tv.).

5. Nestrukturani ugljikohidrati u običnoj trsci činili su približno 5,3 % suhe tvari, što se većino odnosilo na jednostavne šećere: maltozu (1,14 % s.tv.), glukozu (1,62 % s.tv.) i fruktozu (1,86 % s.tv.).

6. Strukturni polisahridi činili su približno 43 % suhe tvari obične trske, a u monomernom sastavu dominirali su: glukoza (~19 %), ksiloza (~19,8 %) i arabinoza (~2,7 %).

7. Udio celuloze u običnoj trsci iznosio je približno 16,5 % s.tv., hemiceluloze približno 26,3 % s.tv., u kojoj dominira arabinoksilan, dok je udio lignina iznosio približno 28,8 % s.tv.

6. LITERATURA

- Albishi T, John JA, Al-Khalifa AS, Shahidi F (2013) Antioxidative phenolic constituents of skins of onion varieties and their activities. *J Funct Foods* **5**, 1191-1203. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.04.002>
- Anonymus 1 (2024) Obična trska (*Phragmites australis*). <https://cnps-verbabuena.org/common-reed-phragmites-australis/> Pristupljeno 2. studenog 2024.
- Anonymus 2 (2024) Močvarno stanište obične trske. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cañas_\(Phragmites_australis\),_Delta_del_Danubio,_Rumanía,_2016-05-28,_DD_23.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cañas_(Phragmites_australis),_Delta_del_Danubio,_Rumanía,_2016-05-28,_DD_23.jpg) Pristupljeno 2. studenog 2024.
- Arruda HS, Pereira GA, de Moraes DR, Eberlin MN, Pastore GM (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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.120>
- Bart D, Hartman JM (2000) Environmental determinants of *Phragmites australis* expansion in a New Jersey salt marsh: an experimental approach. *Oikos*, **89** 59–69. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.890107.x>
- Batterson, TR i Hall, DW (1984). Common reed, *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steudel. *Aquatics* **6** (2): 16-20.
- Boulos L (1983) Medicinal plants of North Africa, 2. Izd., Reference Publications Inc, Algonac, Michigan, str. 186.
- Bouzaiene NN, Jaziri SK, Kovacic H, Chekir-Ghedira L, Ghedira K, Luis, J (2015) The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. *Eur J Pharmacol* **766**, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.09.044>
- Borowska S, Brzoska MM, Tomczyk M (2018) Complexation of bioelements and toxic metals by polyphenolic compounds – implications for health. *Curr Drug Tar* **19**, 1612-1638. <https://doi.org/10.2174/1389450119666180403101555>
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci Tech*, **28** 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Callaway RM, Cipollini D, Barto K, Thelen GC, Hallett SG, Prati D i sur. (2008) Novel weapons: invasive plant suppresses fungal mutualists in America but not in its native Europe. *Ecology* **89**, 1043–1055. <https://doi.org/10.1890/07-0370.1>
- Chandrasekara N, Shahidi F (2011) Effect of roasting on phenolic content and antioxidant activities of whole cashew nuts, kernels, and testa. *J Agric Food Chem* **59**, 5006–5014. <https://doi.org/10.1021/jf2000772>
- Chen H (2014) Biotechnology of lignocellulose, Theory and practice, 2. izd., Business Media, London, str. 25-72.
- Chen S, Ju M, Luo Y, Chen Z, Zhao C, Zhou Y i sur. (2013) Hepatoprotective and antioxidant activities of the aqueous extract from the rhizome of *Phragmites australis*. *Zeitschrift für Naturforschung* **68**, 439–444. <https://doi.org/10.1515/znc-2013-11-1202>
- Chua LS (2013) A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* **150**, 805–817. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.036>
- Duke JA (1983) Handbook of energy crops: *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud, 1.izd., Center for New Crops and Plants Products, Purdue University/West Lafayette.
- Ebringerova A, Heinze T (2000) Xylan and xylan derivatives-biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties.

- Macromol Rapid Commun* **21**, 542-556. [https://doi.org/10.1002/1521-3927\(20000601\)21:9%3C542::aid-marc542%3E3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/1521-3927(20000601)21:9%3C542::aid-marc542%3E3.0.co;2-7)
- Eickhorst K, DeLeo V, Csaposs J (2007) Rue the herb: *Ruta graveolens*-associated phytophototoxicity. *Dermat Contact Atopic Occup Drug* **18**, 52–55. <https://doi.org/10.2310/6620.2007.06033>
- Eitsuka T, Tatewaki N, Nishida H, Kurata T, Nakagawa K, Miyazawa T (2014) Synergistic inhibition of cancer cell proliferation with a combination of delta-tocotrienol and ferulic acid. *Biochem Biophys Res Commun* **453**, 606–611. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.09.126>
- Fazary AE, Ju YH (2007) Feruloyl esterases as biotechnological tools: Current and future perspectives. *Acta Biochim Biophys Sin* **39**, 811–828. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00348.x>
- Fouad AMM, Moustafa AA, Zaghloul MS, Arnous MO (2023) Unraveling the Impact of Global Warming on *Phragmites australis* Distribution in Egypt. *Catrina* **27**(1), 59-73.
- Frutos MJ (2019) Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements, 1.izd., Academic Press, Alicante, str. 111-117.
- Garrido R, Reckamp J, Satrio J (2017) Effects of Pretreatments on Yields, Selectivity and Properties of Products from Pyrolysis of *Phragmites australis* (Common Reeds). *Environments* **4**, 96. <https://doi.org/10.3390/environments4040096>
- Ghica ME, Oliveira-Brett AM (2005) Electrochemical oxidation of rutin. *Electroanalysis* **17**, 313-318. <https://doi.org/10.1002/elan.200403100>
- Grić LJ (2005) Enciklopedija samoniklog bilja, 3. izd., Ex libris, Rijeka, str. 97.
- Harborne JB (1989) Methods in plant biochemistry, General Procedures and Measurement of Total Phenolics, 1. izd., Academic Press, London, str. 1-28.
- Haslam SM (2010) A book of reed: (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel, *Phragmites communis* Trin., 1. izd., Forrest Text, London.
- Haslam SM (1972) Biological flora of the British Isles, *Phragmites communis* Trin. *J Ecol* **60**, 585-610. <https://doi.org/10.2307/2258363>
- Hatfield R, Fukushima RS (2005) Can Lignin Be Accurately Measured? *Crop Sci* **45**, 832-839. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0238>
- Hollman PCH, Arts ICW (2000) Flavonols, flavones and flavanols-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agr* **80**, 1081-1093. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0010\(20000515\)80:7%3C1081::aid-jsfa566%3E3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0010(20000515)80:7%3C1081::aid-jsfa566%3E3.0.co;2-g)
- Howard RL, Abotsi E, Jansen van Rensburg EL, Howard S (2003) Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *J Afr Biotechno* **2**(12), 602-619. <https://doi.org/10.4314/ajb.v2i12.14892>
- Huhta A (2009) Decorative or Outrageous - The significance of the Common Reed (*Phragmites australis*) on water quality. *Turk Univ Appl Sci* **48**, 1–33. <https://doi.org/978-952-216-086-7>
- Janczak-Pieniazek M, Cichonski J, Michalik P, Chrzanowski G (2023) Effect of heavy metal stress on phenolic compounds accumulation in winter wheat plants. *Molecules* **28**, 241. <https://doi.org/10.3390/molecules28010241>
- Jansen MA, van den Noort RE, Tan MY, Prinsen E, Lagrimini LM, Thorneley RN (2001) Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. *Plant Physiol* **126**, 1012–1023. <https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1012>
- Kadi SA, Quendi M, Selmani K, Bannelier C, Berchiche M, Gidenne T (2012) Nutritive value of common reed (*Phragmites australis*) leaves for rabbits. U: Proceedings of the World Rabbit Congress, 10th World Rabbit Congress, Sharm El-Sheikh, 513–517.
- Kearney TH, Peebles RH, Howell JT McClintock E (1960) Arizona Flora, 2. Izd., California University Press, str. 1085.

Kim K, Tsao R, Yang R, Cui SW (2006) Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chem* **95**, 466–473. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.032>

Kiviat E, Hamilton E (2001) *Phragmites* use by Native North Americans. *Aquat Bot* **69**, 341-357. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(01\)00147-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(01)00147-4)

Kumar S, Pandey AK (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci World J* **11**, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>

Kumar S, Krishna CR, Preedy VR (2018) Assessment of antioxidant potential of dietary components. U: Preedy VR, Watson RR (ured.) HIV/AIDS, 2. izd., Academic Press, Cambridge, str. 239 - 253.

Kumar K, Yadav AN, Kumar V, Vyas P, Dhaliwal HS (2017) Food waste: a potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. *Bioresour Bioprocess* **4(1)**, 18. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0148-6>

Lakatos G, Kiss M, Mészáros I (1999) Heavy metal content of common reed (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel) and its periphyton in Hungarian shallow standing waters. *Hydrobiologia* **415**, 47-53. <https://doi.org/10.1023/a:1003817016633>

Leicach SR, Chludil HD (2014) Plant secondary metabolites: Structure – activity relationships in human health prevention and treatment of common diseases. U: Attaur R (ured.) Studies in Natural Products Chemistry, 1. izd., Elsevier, Amsterdam, str. 267 - 304.

Levy I, Shani Z, Shoseyov O (2002) Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4-[beta]-glucanase and cellulose-binding domains. *Biomol Eng* **19(1)**, 17-30. [https://doi.org/10.1016/s1389-0344\(02\)00007-2](https://doi.org/10.1016/s1389-0344(02)00007-2)

Li T, Takkellapati S (2018) The current and emerging sources of technical lignins and their applications. *Biofuel Bioprod Bioref* **12**, 756-787. <https://doi.org/10.1002/bbb.1913>

Li X, Shi X, Wang M, Du Y (2011) Xylan chitosan conjugate - A potential food preservative. *Food Chem* **126**, 520-525. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.037>

Marton TP, Estevez JM, Fachuang L, Ruel K, Denny MW, Somerville C i sur. (2009) Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture. *Curr Biol* **19**, 169-175. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.12.031>

McCready RM, Gee M (1960) Determination of pectic substances by paper chromatography. *J Agric Food Chem* **8**, 510–513. <https://doi.org/10.1021/jf60112a027>

Meyerson LA, Cronin JT, Pyšek P (2016) *Phragmites australis* as a model organism for studying plant invasions. *Biol Invasions* **18**, 2421–2431. <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1132-3>

Milani G, Curci F, Cavalluzzi MM, Crupi P, Pisano I, Lentini G i sur. (2020) Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Antioxidants from Bamboo Shoots of *Phyllostachys pubescens*. *Molecules* **25**, 209-215. <https://doi.org/10.3390/molecules25010215>

Naczki M, Shahidi F (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J Pharmaceut Biomed* **41**, 1523–1542. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.002>

Nawar MAM, ElSissi HI, Baracat HH (1980) The flavonoids of *Phragmites australis* flowers. *Phytochem* **19**, 1954-1856. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83831-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83831-5)

Padmore JM (1990a) Animal feed - AOAC official method 930.15 - Moisture in animal feed. U: Helrich K (ured.) Official Methods of Analysis, Vol. 1, 15. izd., AOAC International, Arlington, VA, str. 69-70.

Padmore JM (1990b) Animal feed - AOAC official method 976.05 - Protein (crude) in animal feed, automated Kjeldhal method. U: Helrich K (ured.) Official Methods of Analysis, Vol. 1, 15. izd., AOAC International, Arlington, VA, str. 72.

Padmore JM (1990c) Animal feed - AOAC official method 942.05 - Ash of animal feed. U: Helrich K (ured.) Official Methods of Analysis, Vol. 1, 15. izd., AOAC International, Arlington, VA, str. 70.

Pandey KB, Rizvi SI (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med and Cell Longev* **2**, 270-278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>

Palonen H (2004) Role of Lignin in the Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose (doktorski rad), Helsinki University of Technology, Helsinki, Finska.

Pareek S, Sagar NA, Sharma S, Kumar V (2018) Fruit and Vegetable Phytochemicals, 2. izd., John Wiley & Sons Ltd, str. 1145–1147.

Radenkova V, Juhneva-Radenkova K, Kviesis J, Lazdina D, Valdovska A, Vallejo F i sur. (2021) Lignocellulose-Degrading Enzymes: A Biotechnology Platform for Ferulic Acid Production from Agro-Industrial Side Streams. *Foods* **10**, 3048-3056. <https://doi.org/10.3390/foods10123056>

Raessler M, Wissuwa B, Breul A, Unger W, Grimm T (2010) Chromatographic analysis of major nonstructural carbohydrates in several wood species – an analytical approach for higher accuracy of data. *Anal Method* **2**, 532-538. <https://doi.org/10.1039/b9ay00193j>

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* **26**, 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

Reham S, Al-sayed A, Farg A, Ali A (2024) Phytochemical analysis of *Phragmites australis* aerial parts extract by LC–ESI–MS and its silver nanoparticles as well as their biological activities. *Egypt J Chem* **67**, 519–528. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2024.258168.9073>

Rice-Evans C, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* **20**, 933 - 956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)

Rohal CB, Cranney CR, Hazelton ELG, Kettenring KM (2019) Invasive *Phragmites australis* management outcomes and native plant recovery are context dependent. *Ecol Evol* **9**, 13835-13849. <https://doi.org/10.1002/ece3.5820>

Rose JCK (2003) The plant cell wall, 4. izd., Blackwell Publishing Ltd, New York.

Rudrappa T, Bonsall J, Gallagher JL, Seliskar DM, Bais HP (2007) Root-secreted allelochemical in the noxious weed *Phragmites australis* deploys a reactive oxygen species response and microtubule assembly disruption to execute rhizotoxicity. *J Chem Ecol* **33**, 1898–1918. <https://doi.org/10.1007/s10886-007-9353-7>

Rytioja J, Hildén K, Yuzon J, Hatakka A, de Vries RP, Mäkelä MR (2014) Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. *Microbiol Mol Biol Rev* **78**(4), 614–649. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00035-14>

Salvachua D, Prieto A, Lopez-Abelairas M, Lu-Chau T, Martinez AT, Martinez MJ (2011) Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresour Technol* **102**, 7500-7506. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.027>

Sanchez-Rangel JC, Benavides J, Heredia JB, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velasquez DA (2013) The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal Methods* **5**, 5990-5999. <https://doi.org/10.1039/C3AY41125G>

Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* **81**, 215-217. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.215S>

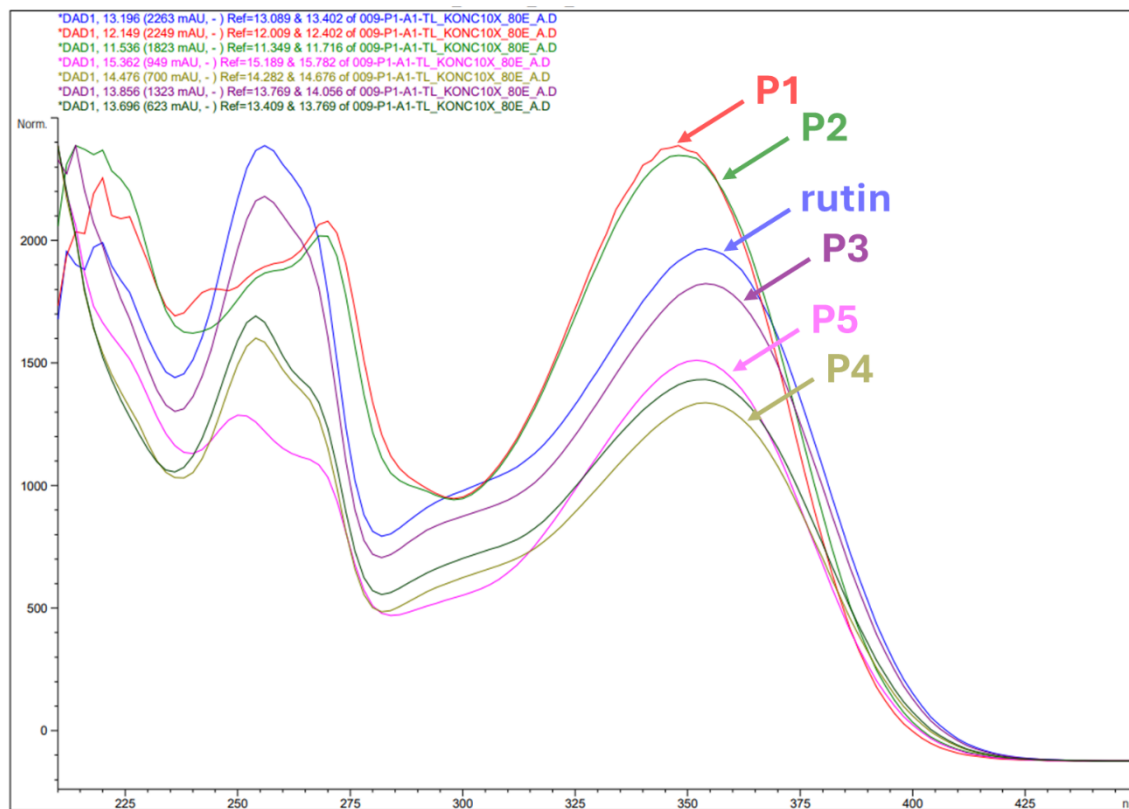
Sharma R, Rawat R, Bhogal RS, Oberoi HS (2015) Multi-component thermostable cellulolytic enzyme production by *Aspergillus niger* HN-1 using pea pod waste: Appraisal of hydrolytic potential with lignocellulosic biomass. *Process Biochem* **50**, 696–704. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.01.025>

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticul* **16**, 144-158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>

Sluiter JB, Ruiz RO, Scarlata CJ, Sluiter AD, Templeton DW (2010) Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks, 1. Review and description of methods. *J Agric Food Chem* **58**, 9043-9053. <https://doi.org/10.1021/jf1008023>

- Sohaib M, Al-Barakah FNI, Migdadi HM, Husain FM (2021) Comparative study among *Avicennia marina*, *Phragmites australis*, and *Moringa oleifera* based ethanolic-extracts for their antimicrobial, antioxidant, and cytotoxic activities. *Saudi J Biol Sci* **29**, 111-122. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.062>
- Song H, Guo X, Yang J, Liu L, Li M, Wang J i sur. (2024) Phenotypic plasticity variations in *Phragmites australis* under different plant-plant interactions influenced by salinity. *J Plant Ecol* **17**, 36-42. <https://doi.org/10.1093/jpe/rtae035>
- Suleria H, Osborne S, Masci P, Gobe G (2015) Marine-Based Nutraceuticals: An Innovative Trend in the Food and Supplement Industries. *Mar Drugs* **13(10)**, 6336-6351. <https://doi.org/10.3390/md13106336>
- Taniguchi M, LaROcca CA, Bernat JD, Lindsey JS (2023) Digital database of absorption spectra of diverse flavonoids enables structural comparisons and quantitative evaluations. *J Nat Prod* **86**, 1087-1119. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c00720>
- Thesiger W (1964) *The Marsh Arabs*, 1. Izd., Penguin Books, Harmondsworth, Middlesex, England.
- Thevs N, Zerbe S, Gahlert E, Mijit M, Succow M (2007) Productivity of reed (*Phragmites australis* Trin. ex Steud.) in continental-arid NW China in relation to soil, groundwater, and land-use. *J Appl Bot Food Qual* **81(1)**, 62–68.
- Tozluoğlu A (2018) Bioethanol production from common reed (*Phragmites australis*): Enzymatic hydrolysis and fermentation. *Roman Biotech Lett* **23**, 13473. <https://rombio.unibuc.ro/wp-content/uploads/2022/05/23-2-12.pdf>
- Unuofin JO, Oladipo AO, More GK, Adeeyo AO, Mustapha HT, Msagati TAM i sur. (2024) Phytochemical Profiling of *Phragmites australis* Leaf Extract and Its Nano-Structural Antioxidant, Antimicrobial, and Anticancer Activities. *J Inorg and Organomet P* **12**, 24. <https://doi.org/10.1007/s10904-024-03100-9>
- Veneziani G, Novelli E, Esposto S, Taticchi A, Servili M (2017) Applications of recovered bioactive compounds in food products. U: Galanakis CM (ured.) *Olive Mill Waste*, 1. izd., Academic Press, Cambridge, str. 231–253.
- Wada M, Nishiyama Y, Chanzy H, Forsyth T, Langan P (2008) The structure of celluloses. *Powder Diffr* **23**, 92-95. <https://doi.org/10.1154/1.2912442>
- Wertz JL, Deleu M, Coppée S, Richel A (2016) *Hemicelluloses and Lignin in Biorefineries*, 1. izd., CRC Press, Boca Raton, str. 142.
- Yang J, Guo J, Yuan J (2008) In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT Food Sci Tech* **41(6)**, 1060-1066. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.06.010>

7. PRILOZI



Prilog 1. Apsorpcijski spektri odabranih neidentificiranih pikova na kromatogramu ekstrakta trske (oznake odgovaraju pikovima prikazanima na Slici 10)

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis