Karakterizacija pektina ekstrahiranih iz komine rajčice i mandarine

Jagodić, Ana Maria

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:622904

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Ana Maria Jagodić

Karakterizacija pektina ekstrahiranih iz komine rajčice i mandarine

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Fiziološki i biokemijski aspekti prehrane Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko - biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na iznimnom strpljenju i bezuvjetnoj pomoći tijekom izrade i pisanja diplomskog rada. Također se zahvaljujem asistenticama Kristini Radić i Nikolini Golub na velikoj pomoći u izradi eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Najviše hvala mojim roditeljima i sestri na potpori i razumijevanju tijekom cijelog studija, bez vas ovo ne bi bilo moguće; vi ste moja snaga.

Hvala baki Jagici, ostatku obitelji i prijateljicama; obogatili ste moje studiranje i učinili da kroz sve situacije prolazim s osmijehom na licu.

I za kraj, želim se zahvaliti Andreju; ti si moj kompas i uz tebe je sve bilo lako.

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1
1.1. Biootpad (otpad od hrane) ... 1
1.2. Komina rajčice ... 3
1.3. Komina mandarine ... 4
1.4. Pektini ... 6
1.4.1. Struktura pektina ... 6
1.4.2. Izvori biljnog materijala u proizvodnji pektina ... 8
1.4.3. Karakterizacija pektina ... 9
1.4.4. Metode ekstrakcije pektina iz biljnog materijala ... 10
1.4.5. Upotreba pektina ... 12
2. OBRAZLOŽENJE TEME ... 14
3. MATERIJALI I METODE ... 15
3.1. Materijali ... 15
3.1.1. Kemikalije i pribor ... 15
3.1.2. Radni instrumenti i oprema ... 15
3.1.3. Uzorci ... 16
3.2. Metode ... 16
3.2.1. Odmaščivanje komine rajčice i mandarine metodom po Soxhletu ... 16
3.2.2. Ekstrakcija pektina iz komine rajčice i mandarine ... 18
3.2.2.1. Izrada kemikalija i reagensa ... 18
3.2.2.2. Ekstrakcija pektina ... 18
3.2.3. Standardizacija 0,1 M otopine NaOH, titranta u titrimetrijskim postupcima karakterizacije pektina ... 19
3.2.3.1. Izrada kemikalija i reagensa ... 19
3.2.3.2. Određivanje faktora za 0,1 M HCl ... 20
3.2.3.3. Određivanje faktora za 0,1 M NaOH ... 20
3.2.4. Karakterizacija pektina ... 21
3.2.4.3. Izrada kemikalija i reagensa ... 22
3.2.4.2. Određivanje ekvivalentne mase ... 22
3.2.4.3. Određivanje metoksilnog ostatka ... 23
3.2.4.3. Određivanje stupnja esterifikacije ... 24
3.2.4.4. Određivanje udjela anhidrouronične (galakturonske) kiseline ... 25
3.2.5. Statistička obrada podataka ... 25
4. REZULTATI I RASPRAVA ... 26
4.1. Ekvivalentna masa ... 26
4.2. Metoksilni ostatak ... 28
4.3. Stupanj esterifikacije ... 30
4.4. Udio galakturonske kiseline ... 32
5. ZAKLJUČCI ... 34
6. LITERATURA ... 35
7. SAŽETAK ... 39
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

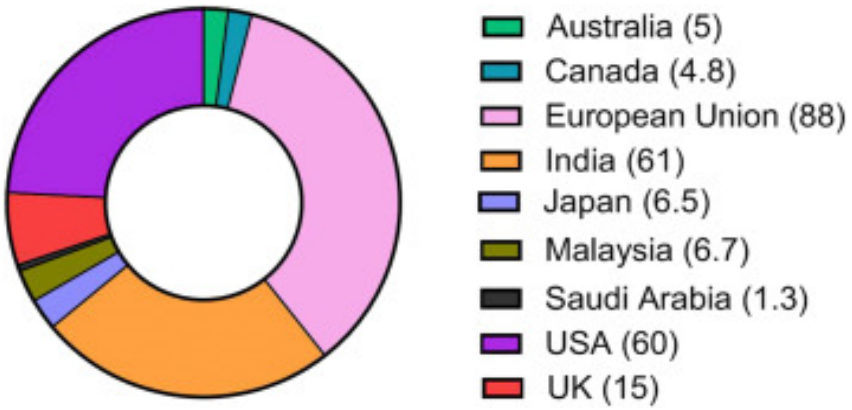
1.1. Biootpad (otpad od hrane)

Kontinuirani porast broja stanovnika rezultira povećanom potrebom za hranom i prirodnim resursima diljem svijeta (Ng i sur., 2020). "Gubitak hrane" definira se kao gubitak u procesu pripreme i obrade poslije žetve, dok se "biootpad" ili "otpad hrane" odnosi na rasipanje hrane tijekom stadija distribucije i potrošnje. Uočeno je da je "gubitak hrane" u zemljama u razvoju puno veći u stadijima koji slijede neposredno nakon žetve nego u ostalim stadijima. Biootpad kao posljedica konzumacije hrane bio je najveći u gospodarskim granama na koje utječu faktori kao što su estetika i zakonski određen rok za prodaju. U državama sa većim bruto društvenim proizvodom kao što su Švicarska i Singapur distribucija i konzumacija hrane rezultirale su najvećom količinom biootpada koji potječe iz kućanstva (Mak i sur., 2019).

Robusna industrijalizacija i neučinkovite strategije postupanja s biootpadom često rezultiraju nakupljanjem velikih količina istog iz raznih industrija uključujući lance opskrbe hranom, kućanstava te prehrambeno-prerađivačke industrije.

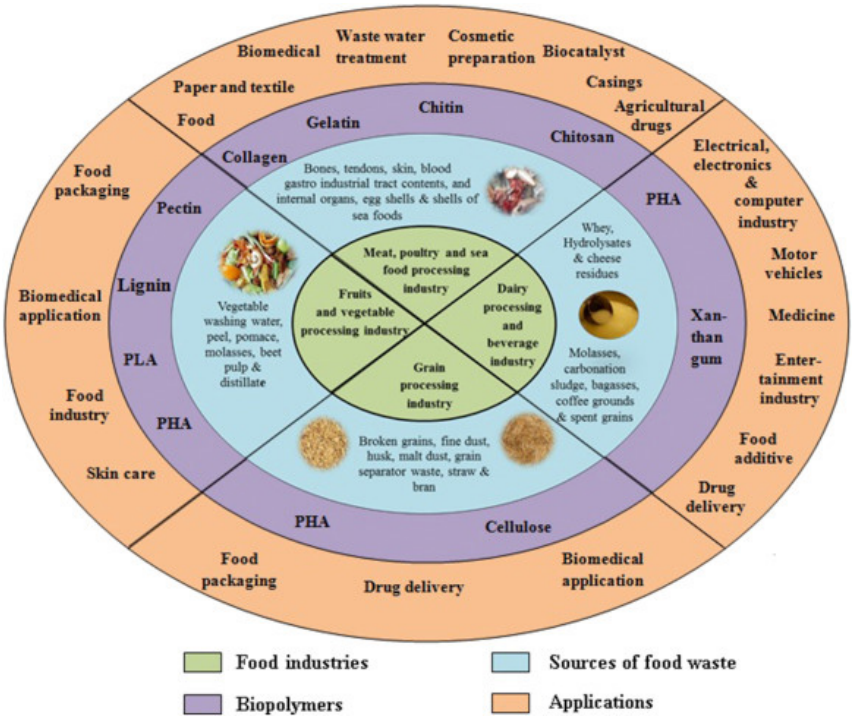
Prema statistici Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO) objavljenoj 2012. godine godišnje se generira približno 1.3 milijardi tona prehrambenog i poljoprivrednog otpada i taj broj kontinuirano raste kao posljedica ekonomskog i populacijskog porasta. (Paritosh i sur., 2017). Uočeno je da količina biootpada globalno varira ovisećі o geografskim značajkama. *Slika 1.* sažima procijenjenu količinu biootpada u nekoliko država. Zabrinjavajući podatak je da uz Indiju razvijene zemlje poput EU i SAD-a također značajno doprinose stvaranju otpada (Ranganathan i sur., 2020). Prema procjenama Ministarstva poljoprivrede u Republici Hrvatskoj godišnje nastane 400 000 tona otpada od hrane. U skladu s planom sprječavanja i smanjenja nastajanja otpada od hrane u Republici Hrvatskoj (2019.-2022.), čiji je cilj doprinos ostvarenju cilja UN Agende za održivi razvoj do 2030. godine, teži se prepoloviti otpad od hrane na razini maloprodaje i kućanstva te općenito smanjiti gubitke hrane duž cijelog prehrambenog lanca (https://poljoprivreda.gov.hr/istaknute-teme/hrana-111/sprjecavanje-nastanka-otpada-od-hrane/222). Nekontrolirano odlaganje otpada hrane rezultira zagađenjem tla, zraka i vode. Zabrinutost u vezi s pravilnim raspolaganjem nastalim

otpadom pobudila je interes istraživača o mogućim načinima valorizacije nakupljenog otpada. Osim što učinkovita valorizacija rezultira smanjenom količinom otpada, također dovodi do manjeg zagađenja okoliša. Prepoznato je da je prehrambeni otpad često bogat biološki važnim spojevima i da ima veliki potencijal kao primarna ili sekundarna sirovina za njihovu ekstrakciju Različite vrste otpada mogu se koristiti kao polazne sirovine za proizvodnju biološkog materijala, ali u novije vrijeme sve više pažnje se pridodaje otpadu iz prehrambeno-prerađivačke industrije koja bilježi visoki porast produkcije biootpada diljem svijeta (Ranganathan i sur., 2020). Imajući to na umu, znanstvena zajednica je posljednjih godina uložila puno truda u smjeru poboljšanje načina upravljanja otpadom te redukciji nakupljanja prehrambeno-prerađivačkog i poljoprivrednog otpada ponovno ga iskorištavajući kao sirovinu za proizvodnju visoko vrijednih bioloških spojeva (Ng i sur., 2020).



Slika 1. Količina biootpada u svijetu 2018. godine u milijunima tona (Ranganathan i sur., 2020)

Razvijaju se sve učinkovitije i ekološki prihvatljivije ekstrakcijske metode za izdvajanje bioloških spojeva visoke čistoće koji se mogu koristiti u farmaciji, kozmetici i prehrambenoj industriji (Ranganathan i sur., 2020). Između mnogih produkata dobivenih iz biootpada biološki polimeri dobivaju sve više na važnosti zahvaljujući njihovoj biorazgradivosti, biokompatibilnosti i biološkoj prirodi te nude širok spektar kemijski i mehaničkih svojstava koja mogu imati čitav niz različitih primjena (Bayon i sur., 2018).



*Slika 2. Primjena bioloških polimera iz različitih izvora biootpada (*Ranganathan i sur., 2020).

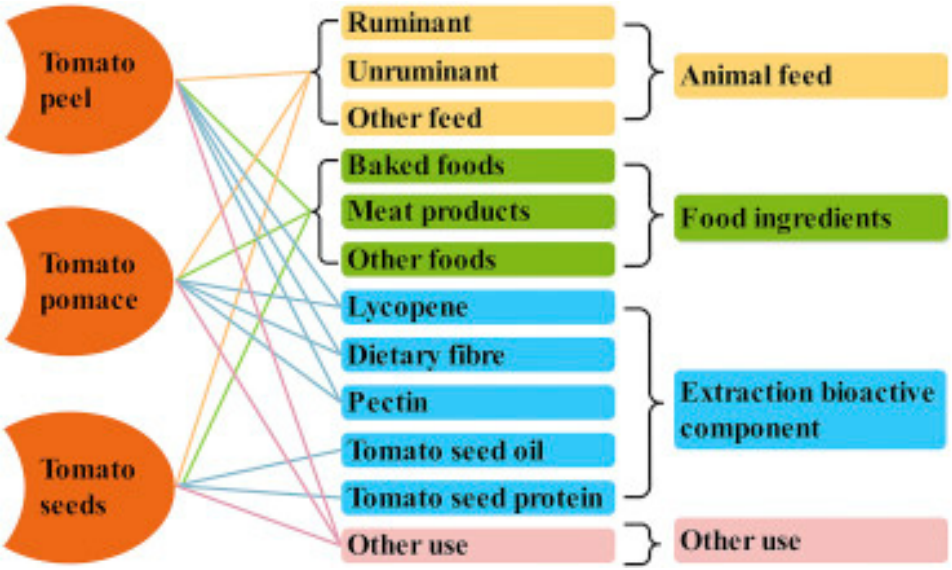
Štoviše, istraživači smatraju da se takvi produkti mogu dobiti iz otpada koristeći tehnologije koje se inače smatra nisko učinkovitima.

Slika 2. prikazuje primjenu bioloških polimera dobivenih iz različitih izvora biootpada. Polimeri poput celuloze, škroba, pektina, i derivata uglavnom su dobiveni iz prehrambeno-prerađivačke industrije. U ovome radu usredotočiti ćemo se na ekstrakciju i karakterizaciju pektina iz komine rajčice i mandarine.

1.2. Komina rajčice

Rajčica (lat. Solanum lycopersicum) je jednogodišnja biljka iz porodice Pomoćnica (Solanacae) te potječe iz Južne Amerike. Osim što se poslužuje kao svježe povrće također se konzumira u obliku različitih prerađenih proizvoda kao što su paste, sokovi i umaci. U procesu obrade ovih proizvoda nastaje nusprodukt kojeg uobičajeno nazivamo kominom rajčice koja se sastoji uglavnom od kore i sjemenki te male količine pulpe. Prosječno, komina rajčice na kraju procesa prerade predstavlja 3-5 % inicijalno upotrjebljenog sirovog materijala. 2016. godine ukupna površina usjeva rajčice iznosila je 4.8 × 10*6 hektara uz proizvodnju od 1.8 × 10*8 tona. Sukladno ovome, na godišnjoj razini nastane 5.4–9.0 × 10*6 tona komine rajčice. Pravilno

odlaganje i iskorištavanje komine rajčice je neizbježno i od iznimne je važnosti za prehrambenu industriju. Ako ju pravilno ne odlažemo, komina rajčice bit će podložna kvarenju zbog visokog sadržaja vode i hranjivih tvari dok istovremeno racionalno iskorištavanje pretvara kominu u iskoristiv izvor bioloških spojeva (Lu i sur., 2019).



Slika 3. Pregled mogućih smjerova valorizacije komine rajčice i njezinih frakcija (Lu i sur., 2019)

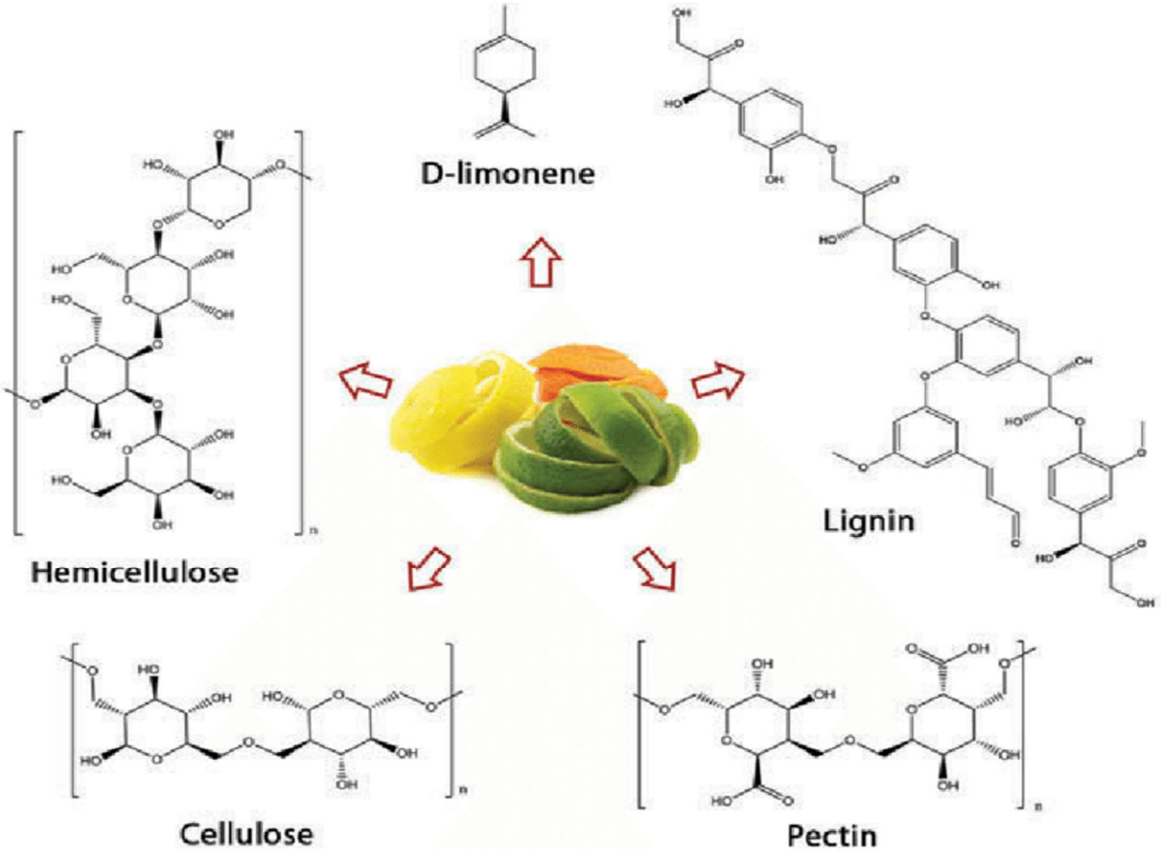
Glavne vrijedne sastavnice sjemenki i kore se znatno razlikuju. Kora je bogata prehrambenim vlaknima kao što su celuloza i pektini, likopenima i fenolnim spojevima dok sjemenke obiluju proteinima i biljnim uljima (Lu i sur., 2019).

Slika 3. prikazuje pregled mogućih smjerova valorizacije komine rajčice i njezini frakcija. Unatoč tome što predstavlja vrijedan izvor funkcionalnih spojeva, njen potencijal kao jeftinog organskog materijala za izolaciju bioloških spojeva još nije dovoljno iskorišten. U radu Grassina i sur. (2016) dokazano je da kominu rajčice možemo koristiti kao značajan izvor biljnog materijala u procesu izolacije pektina.

1.3. Komina mandarine

Mandarina (lat. Citrus reticulata Blanco, Citrus nobilis Lour) je trajnozelena biljka koja pripada porodici Rutvica (Reticulata) te je bogata vitaminima, mineralima i prehrambenim vlaknima. U novije vrijeme citrusno voće sve više dobiva na važnosti zbog visokog sadržaja biološki

aktivnih spojeva kao što su flavonoidi, karotenoidi, vitamini i minerali koji mogu smanjiti rizik oboljevanja od kroničnih bolesti (Sharma i sur., 2017).



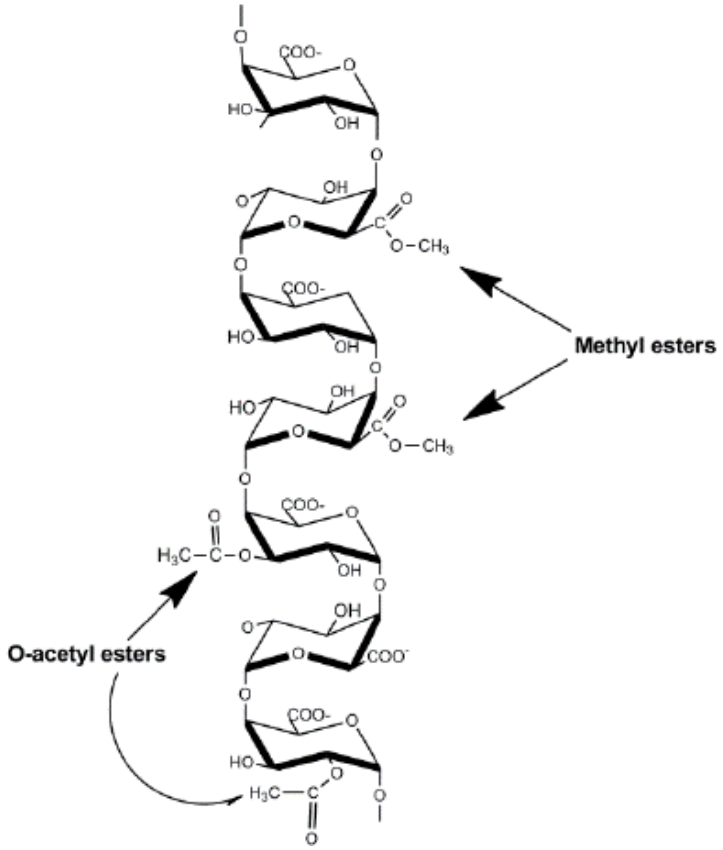
Slika 4. Struktura različitih spojeva koji čine kominu citrusnog voća (Indulekha i sur., 2017)

Citrusno voće se diljem svijeta konzumira kao svježe proizveden sok, a tijekom proizvodnje najčešće se kao nusprodukt odbacuje kora koje sadrži razne sekundarne sastavnice značajnog antioksidacijskog učinka. Globalno je proizvodnja citrusnog voća kontinuirano rasla te je 2010. godine dosegla količinu od 82 milijune tona od čega se najveći dio, čak 50 milijuna tona, odnosi na naranču kao komercijalno najvažnije citrusno voće. 34% ukupne količine voća iskorišteno je za proizvodnju soka rezultirajući nakupljanjem velikih količina kore kao nusprodukta. Kora citrusa je dobar izvor pektina i limonena te se obično suši, miješa sa osušenom pulpom i prodaje kao stočna hrana (Rafiq i sur., 2018). *Slika 4.* prikazuje strukture različitih spojeva koji čine kominu citrusnog voća. U novije vrijeme sve više dobiva na značaju u procesu proizvodnje pektina u kojemu je povijesno gledano glavnu ulogu imala kora jabuke (Brejnholt, 2010).

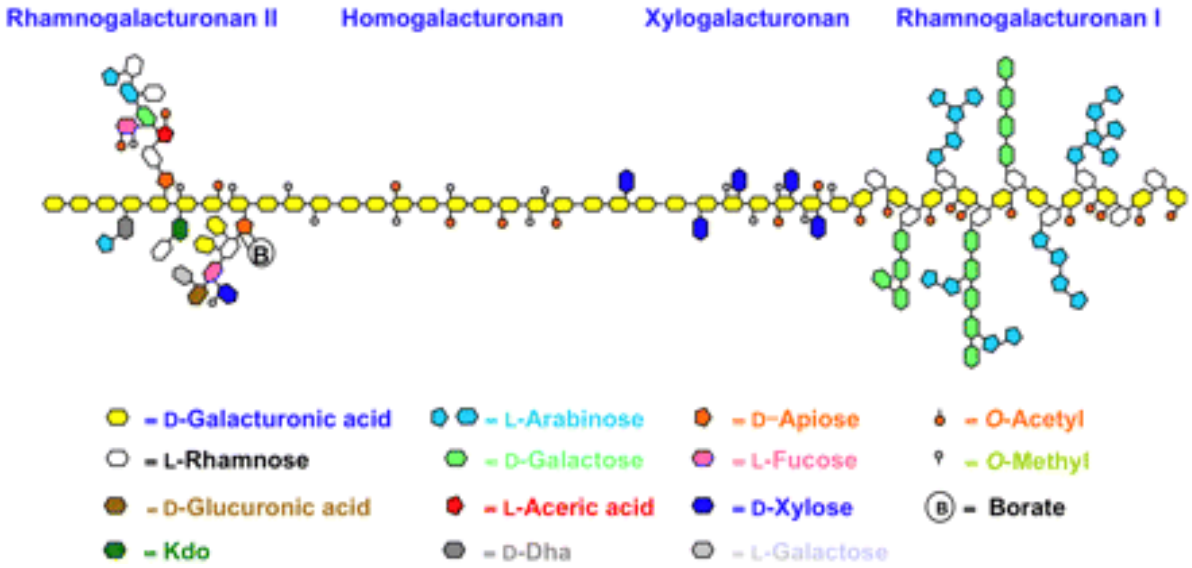
1.4. Pektini

1.4.1. Struktura pektina

Pektine možemo definirati kao smjesu polimernih oblika polisaharida koji se nalaze u staničnoj stijenci biljnog tkiva. Okosnicu njihove strukture čini D-galakturonska kiselina, izomer D-glukuronske kiseline. Ona može postojati u tri polimerna oblika od kojih je prvi **homogalakturonan;** linearni polimer sastavljen od podjedinica galakturonske kiseline povezanih α-1-4 glikozidnom vezom. Drugi polimerni oblik je **ramnogalakturonan I;** ponavljajući disaharid kojeg čine galakturonska kiselina i ramnoza povezane α-1-2 glikozidnom vezom. Posljednji polimerni oblik naziva se **ramnogalakturonan II** s homogalakturonskom osnovom na koju su vezani brojni kompleksni bočni lanci sačinjeni od ramnoze i ostalih neutralnih šećera. Dakle, smatra se da su pektini sastavljeni od barem 17 vrsta monosaharida od kojih prevladava D-galakturonska kiselina, a odmah za njom slijede ramnoza, D-galaktoza i L-arabinoza (Marić i sur., 2018). U bočnim lancima pektina pojavljuju se i drugi neutralni šećeri poput D-ksilopiranoze, D-glukopiranoze i L-fukopiranoze, dok se D-apioza, 2-0-metil-D-ksiloza i 2-0-metil-fukoza pojavljuju vrlo rijetko (Caffal i Mohnen, 2009). Polimerni oblik najzastupljeniji u staničnoj stijenci biljaka je homogalakturonan čije karboksilne skupine na c6 položaju mogu biti metil esterificirane te o-acetilirane na položaju o2 i o3. *Slika 5.* prikazuje homogalakturonan i položaje u strukturi na kojima može doći do o-acetilacije i metil esterifikacije. Na *slici 6.* može se vidjeti shematski prikaz strukture pektina i različiti tipove polisaharida koji ju mogu činiti.



Slika 5. Položaji o-acetilacije i metil esterifikacije homogalakturonana (Caffal i Mohnen, 2009)



Slika 6. Shematski prikaz strukture pektina (Harholt i sur., 2010)

1.4.2. Izvori biljnog materijala u proizvodnji pektina

Nakon što je 1908. godine u Njemačkoj proizveden prvi komercijalni tekući pektin iz komine jabuke industrija proizvodnje pektina doživjela je snažan rast u Europi i Sjevernoj Americi. Danas, komercijalna proizvodnja pektina ograničena je na dva glavna izvora biljnog materijala: kominu jabuke i citrusnog voća. Središte proizvodnje je Europa i zemlje Južne Amerike budući da su vodeći proizvođači citrusnog voća. Oba ekstrakcijska izvora predstavljaju nusprodukte industrijske proizvodnje soka. Nedostatak komine jabuke u usporedbi sa citrusnim voćem je niži sadržaj samih pektina. Procjenjuje se da kora citrusa sadrži količinu pektina koja odgovara 25-30% ukupne suhe mase. S druge strane, razlika u količini pektina između raznih vrsta jabuka istraživana je dugi niz godina i donesen je zaključak da su zimske vrste izvor kvalitetnijih pektina s većim ekstrakcijskim prinosom (Dranca i Oroian, 2018).

Malo je saznanja o utjecaju vremena skladištenja i skladišnih uvjeta na kemijska svojstva ekstrahiranih pektina. Većina istraživanja se usredotočuje na degradaciju pektina od strane pektolitičkih enzima (pektin metilesteraza, poligalakturonaza, pektin liaza) koji utječu na teksturu biljnog tkiva. Ostale promjene u strukturi su posljedice promjene ionske snage tekućina koje su u kontaktu sa pektinima iz stanične stijenke. U vlažnom stanju, sirovina će biti sklona razvoju gljivica i aktivaciji pektinskih enzima te se kao takva može skladištiti tek nekoliko dana dok ne nastupi degradacija pektina. Stoga je preporuka svježu sirovinu osušiti i skladištiti nekoliko mjeseci u rashlađenim uvjetima ili odmah podvrgnuti procesu ekstrakcije. Utvrđeno je da je količina ekstrahiranih pektina iz komine mandarine nakon 56 dana skladištenja u rashlađenim uvjetima porasla za 70-80% u odnosu na skladištenje pri sobnoj temperaturi (Pagán i sur., 2001). Još jedan razmatran izvor pektina je i pulpa šećerne repe zahvaljujući visokoj količini pektina (15-30% suhe mase) i dostupnosti u velikim količinama budući da se koristi u šećernoj industriji. Osim dosad navedenih sirovina ostali otpad voća i povrća također je istraživan kako bi mu se odredila prikladnost i isplativost za komercijalnu proizvodnju pektina. Posebna pozornost pridodana je ostacima industrijske prerade rajčice i mrkve budući da čine važne usjeve u različitim geografskim područjima. Prerada rajčice, posebice u industriji tijekom procesa konzerviranja hrane, dovodi do akumuliranja velikih količina komine koju čine kora, sjemenke i mala količina pulpe. U svrhu istraživanja karakteristika pektina rajčice uzete su dvije različite serije komine dobivene iz različitih industrijskih pogona i utvrđeno je da veći pektinski prinos nije nužno u korelaciji sa većom kvalitetom pektina i da podrijetlo uzorka ima značajan učinak na karakteristike istih (Dranca i Oroian, 20018).

Ostali nekonvencionalni manje značajni izvori pektina su ljuska kakaa, komina grožđa, komina breskve, kora lubenice i kora banane (Marić i sur., 2018).
Za ekstrakciju pektina iz biljnog materijala primjenjuje se više različitih metoda. Pronalaženje najprikladnije ekstrakcijske metode ima veliki značaj u povećanju prinosa i kvalitete samog proizvoda. Među ekstrakcijskim tehnikama razlikujemo konvencionalne metode kao što su ekstrakcija sa anorganskim i organskim kiselinama te različite inovativne tehnike poput ekstrakcija potpomognutih ultrazvukom, mikrovalovima i enzimima (Marić i sur., 2018).

1.4.3. Karakterizacija pektina

Prije opisivanja samih metoda ekstrakcije valja objasniti parametre koji su povezani sa strukturom i ukazuju na kvalitetu samih pektina i mogućnost ispoljavanja svojstava koja će odrediti daljnu primjenu. Pektini se upotrebljavaju kao stabilizatori, sredstva za geliranje i sredstva za zgušnjavanje (Dranca i Oroian, 2018). Jedan od parametara kojima možemo okarakterizirati ekstrahirane pektine je **ekvivalentna masa**. Što je ekvivalentna masa veća, mogućnost pektina da formira gel je bolja. Ona varira ovisno o uvjetima ekstrakcije te će prilikom dužeg izlaganja pektina višem temperaturama zasigurno biti manja (Kute i sur., 2020). Drugi važan parametar koji opisuje vrijeme potrebno da pektin formira gel je metoksilni ostatak (udio metoksilnih skupina naspram ukupne mase pektina). Pektine sa metoksilnim udjelom većim od 7% karakteriziramo kao visoko metoksilirane pektine (HM) dok one s nižim vrijednostima od 7% kao nisko metoksilirane (LM) (Mohamed, 2016). Sljedeći bitan parametar je **stupanj esterifikacije** koji predstavlja udio esterificiranih karboksilnih skupina jedinica galakturonske kiseline. Razlikujemo visoko esterificirani pektin sa stupnjem esterifikacije višim od 50% i nisko esterificirani pektin sa stupnjem esterifikacije nižim od 50% (Marić i sur., 2018). Nisko esterificirani pektin podliježe ionotropnom geliranju u prisutnosti polivalentnih kationa kao što su Ca^{2+} i Zn^{2+}, ali na proces stvaranja gela također možemo utjecati i promjenom temperature i pH vrijednosti. Mehanizam stvaranja gela uključuje dvije faze. Tijekom inicijalne faze dolazi do dimerizacije polimernih lanaca, a nakon toga slijedi agregacija nastalih dimera. Tijekom prve faze neesterificirani slijedovi galakturonske kiseline povezuju se stvarajući takozvane "spojne zone". Unutar spojnih zona se stvaraju šupljine u koje se uklapaju kationi. Budući da samo disocirane karboksilne skupine sudjeluju u povezivanju sa ionima, pH potreban za formiranje gela biti će viši od onog potrebnog kod visokoesterificiranih pektina gdje karboksilne skupine trebaju ostati nedisocirane. Čvrstoća gela izravno je povezana s

metoksilnim ostatkom budući da on ukazuje na zauzetost karboksilnih skupina koje povezivanjem s ionima doprinose formiranju gela. Stoga, niskoesterifcirani pektini s manjom vrijednoću metoksilnog ostatka zahtijevaju manje količine prisutnih iona za formiranje gela od onih s vrijednosti metoksilnog ostatka većom od 7%. Proces geliranja visoko esterificiranog pektina uključuje nekoliko vrsta intramolekularnih interakcija koje se uspostavljaju u prisutnosti šećera i kiselina. Spojne zone stabilizirane su hidrofobnim interakcijama i vodikovim vezama. Vodikove veze stvaraju se između nedisociranih karboksilnih skupina i sekundarnih alkoholnih skupina molekula galakturonske kiseline. Hidrofobne interakcije stvaraju se u prisutnosti molekula vode inkompatibilnih s metoksilnim skupinama koje su prisiljene na formiranje spojnih zona kako bi smanjile kontaktnu površinu s molekulama vode. Šećeri doprinose jačanju hidrofobnih interakcija smanujući aktivnost molekula vode koje okružuju esterske skupine (Löfgren, 2000). Visoko esterificirani pektin ne podliježe procesu ionotropnog geliranja u prisutnosti polivalentnih kationa zbog niskog udjela slobodnih karboksilnih skupina (Bayon i sur., 2017). Posljednji bitan parametar koji će utjecati na krajnju primjenu ekstrahiranog pektina i koji će biti ispitivan u ovom radu je udio **anhidrouronske (galakturonske)** kiseline koji ukazuje na čistoću pektina i ne bi smio iznositi manje od 65 % ako se pektin primjenjuje u farmaceutske svrhe ili kao prehrambeni aditiv (Khamsucharit i sur., 2017). Nizak udio galakturonske kiseline ukazuje na prisutnost proteina, škroba i šećera u precipitiranom pektinu (Mohamed, 2016).

1.4.4. Metode ekstrakcije pektina iz biljnog materijala

Tradicionalno, prvi korak pri izolaciji pektina je ekstrakcija vrućim otopinama 0,05-2 M sumporne, nitratne, fosporne, octene ili klorovodične kiseline uz kontinuirano miješanje 1-2 sata na temperaturama od 80 do 100 celzijevih stupnjeva. Ova konvencionalna ekstrakcijska metoda ovisi o brojnim faktorima kao što su temperatura, pH vrijednost, svojstva otapala, brzina difuzije te stoga možemo zaključiti kako je ovaj korak ključan i ima najveću mogućnost prilagodbe raznih parametara u cilju optimizacije same metode (Marić i sur., 2018). Organske kiseline za razliku od anorganskih imaju manji hidrolitički učinak budući da imaju manju konstantu disocijacije te je stoga očekivano da će imati manji utjecaj na depolimerizaciju pektina. Tako su u jednoj studiji pektini iz komine citrusa ekstrahirani uporabom otopina limunske kiseline umjesto klorovodične. Koristeći 0,5 M limunsku kiselinu pri temperaturi od 65 °C dobiveni su pektini veće ekvivalente mase što ukazuje da korištenje limunske kiseline

nije uzrokovalo degradaciju pektina (Kurita i sur., 2008). Također, u jednoj studiji istraživana je razlika u prinosu prilikom esktrakcije sa klorovodičnom kiselinom u odnosu na vodu. Prinos uporabom klorovodične kiseline iznosio je 15, 59%, dok je s vodom iznosio svega 0,95% što ukazuje da porast prinosa korelira s padom pH vrijednosti (Ueno i sur.,2008). Nadalje, pokazano je da su pri pH vrijednosti nižoj od 2 i temperaturama višim od 65 celzijevih stupnjeva veze između jedinica galakturonske kiseline puno jače neko veze galakturonske kiseline s neutralnim šećerima. Pektin ekstrahiran alkalnim otapalom pri nižim temperaturama ima veći udio ramnogalaktouronana I i II u usporedbi sa kiselom ekstrakcijom pri nižim pH vrijednostima. Ostaci kore citrusa tretirani su sa 0,6 % NaOH pri temperaturi od 32 stupnja kroz 10 minuta te je zatim pH vrijednost podešena na 6-7. Ekstrahirani pektin sadržavao je 82,5 % ramnogalakuturonana dok je korištenjem klorovodične kiseline taj postotak iznosio 44 % (Zhang i sur., 2018). Rehmann i sur. (2004) postigli su maksimalan prinos pektina iz kore manga pri uvjetima od 80 °C, korištenjem sumporne kiseline pH vrijednosti 2,5 i u vremenu ekstrakcije od 120 min. Nadalje, u radu Li i sur. (2015) utvrđeno je da prinos pektina iz otpada šećerne repe varira između 6,3 i 23% te raste s povećanjem temperature, ekstrakcijskog vremena i snižavanjem pH vrijednosti ekstrakcijskog otapala. Usprkos činjenici što se ponašaju kao učinkoviti emulgatori, upotreba pektina šećerne repe ograničena je zbog slabih gelirajućih svojstava koja su odraz visokog stupnja acetilacije i udjela neutralnih šećera. Već je ranije navedeno na primjeru komine rajčice kako kvaliteta dobivenih pektina značajno ovisi o izvoru same sirovine. Iz opisanih primjera možemo zaključiti da za dobivanje što većih prinosa i kvalitetnijih pektina moramo pažljivo birati sirovinu i prema tome optimizirati uvjete ekstrakcije kako bi smanjili degradaciju, depolimerizaciju i deesterifikaciju samih pektina.

Iduća faza postupka konvencionalne metode ekstrakcije uključuje filtraciju tijekom koje odvajamo filtrat od ostalog neotopljenog biljnog tkiva. Sljedeći korak je taloženje pektina u filtratu otapalima u kojima je pektin netopljiv (etanol, aceton, propanol), a ostale nečistoće jesu. Zatim sirovi pektin dodatno ispiremo etanolom kako bi dobili pročićeni pektin i uklonili zaostale topljive nečistoće te na kraju preostaje sušenje. Iako je ovakva konvencionalna ekstrakcijska metoda najčešće korištena pri proizvodnji komercijalnog pektina i također će biti upotrjebljena pri izradi ovog rada, treba naglasiti njene brojne mana počevši od gubitaka hlapljivih sastavnica, ekoloških problema i troškova proizvođača povezanih s eliminacijom otpada nastalog njihovom primjenom i degradacije pektina zbog koje se uvjeti ovakve metode moraju pažljivo optimirati. Glavni princip konvencionalnih ekstrakcijskih metoda je oslobađanje pektina iz stanične stijenke kemijskim mehanizmima pokrenutim pri niskim pH

vrijednostima i visokim temperaturama za razliku od inovativnih metoda gdje oslobađanje pektina uzrokuju promjene u strukturi stanične stijenke uzrokovane mikrovalovima i ultrazvučnim zračenjem (Marić i sur., 2018). Navedene metode su se nedavno počele razvijati i budući da će imati niže ekonomske troškove i manje štetne učinke na okoliš, smatra se da će biti od velikog značaja u budućnosti (Bayon i sur.,2018).

1.4.5. Upotreba pektina

Pektini se već dugi niz godina primjenjuju u prehrambenoj industriji kao gelirajuća sredstva u proizvodnji džemova i želea. Pri tome visoko esterificirani pektin zahtijeva prisutnost šećera, vode i kiseline da bi mogao formirati gel i uglavnom se koristi u proizvodnji džemova, jogurta i pekarskih proizvoda. Budući da niskoesterificirani pektin može formirati gel u prisutnosti kationa (najčešće se u tu svrhu formulaciji dodaje kalcij) prikladan je za primjenu u dijetetskim proizvodima (Tan i Nie, 2020). Pektini se također dodaju u formulacije proizvoda koji se podvrgavaju procesima smrzavanja i odmrzavanja te kao stabilizatori pri proizvodnji alkoholnih pića.

U novije vrijeme na važnosti dobiva primjena pektina u medicini i farmaceutskoj industriji. Pektini smanjuju koncentraciju serumskog kolesterola sprječavajući reapsorpciju žučnih soli eneterohepatičkom cirkulacijom i povećavaju njihovo izlučivanje. Također, u kolonu podliježu razgradnji djelovanjem bakterija prilikom čega nastaju kratkolančane masne kiseline koje su hrana kolonocitima. Na taj se način osnažuju imunogena svojstva kolonocita te stoga dostatatan unos pektina može biti prevencija kolitisu i raku debelog crijeva (Guillon i Champ, 2000). Nadalje, sigurnost i učinkovitost lijekova može biti poboljšana vezanjem aktivne supstance na nosač od biološkog materijala. Prirodni polimeri su se za većinu načina dostave lijeka pokazali kao inertni i biokompatibilni nosači. Novije studije ukazuju da niskoesterifcirani pektini u nazalnim pripravcima s kontroliranim oslobađanjem pokazuju mukoadhezivni svojstva koja se temelje na vodikovim vezama između mucina i slobodnih karboksilnih skupina pektina. Na animalnim modelima je dokazano da pektini mogu spriječiti širenje metastaza i rast primarnog tumora. Mehanizam je sljedeći: galektin-3 koji je uključen u nekoliko faza progresije tumora, angiogeneze i odgovora na citotoksične lijekove prepoznaje galakturonsku podjedinicu pektina, veže se za nju i na taj način se inhibira. Stoga, modificirani pektini, u kombinaciji sa citotoksičnim lijekovima, imaju velik potencijal u povećanju učinkovitosti konvencionalne kemoterapije (Munarin i sur., 2012). U novije vrijeme, bioaktivne komponente poput vitamina,

minerala, karotenoida i esencijalnih ulja podliježu nano-inkapsulaciji u svrhu zaštite i povećanja bioraspoloživosti, topljivosti i permeabilnosti. Pektin ima obećavajuću ulogu kao inkapsulacijski materijal budući da djeluje kao stabilizator emulzija i posjeduje gelirajuća svojstva. Osim toga, ovisno o stupnju esterifikacije i metoksilnom udjelu pektini imaju različitu hidrofobnost. Visoko metoksilirani pektini su izrazito hidrofobni i mogu stupati u interakcije s hidrofobnim molekulama kao što su antiobiotici i neki vitamini te na taj način poboljšavaju uklapanje lijeka u matriks i osiguravaju kontrolirano oslobađanje (Rehman i sur., 2019).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Pektin se već dugo koristi kao prehrambeni aditiv, a danas se sve više spominje i kao fermentabilno prehrambeno vlakno, u kontekstu brojnih pozitivnih učinaka na zdravlje. Glavni izvori pektina su komina jabuke i citrusnog voća (naranča, limun, grejp) koja zaostaje nakon proizvodnje voćnih sokova. U posljednje vrijeme sve više raste interes za valorizacijom drugih vrsta prehrambenog otpada kao izvora pektina. Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti karakteristike pektina dobivenih iz zapostavljenih i do sada nedovoljno istraženih izvora: kore mandarine sorte Unshiu (najrasprostranjenije sorte u RH) i komine rajčice. Dodatni cilj istraživanja bio je istražiti fizikalno-kemijske karakteristike nepročišćenih pektinskih frakcija iz navedenih izvora, obzirom da one, ovisno o sirovini iz koje se dobivaju, mogu sadržavati značajne količine biološki aktivnih sastavnica polifenolnog i karotenoidnog tipa. Takav kemijski sastav ih svrstava u kategoriju nutriceutika te širi mogućnosti njihove primjene izvan kategorije prehrambenih aditiva (zgušnjivač, stabilizator, sredstvo za geliranje i povećanje volumena) u područje funkcionalne hrane i dodataka prehrani.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije i pribor

- Petroleter (Kemika, Hrvatska)
- Limunska kiselina 1-hidrat (Grammol, Hrvatska)
- Etanol, C_2H_5OH, 96% (Grammol, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina, 35% (Lach-ner, Češka)
- Kalijev hidrogenkarbonat (Kemika, Hrvatska)
- Metil-oranž (Sigma-Aldrich, SAD)
- Natrijev hidroksid (Sigma-Aldrich, SAD)
- Metilensko crvenilo (Sigma-Aldrich, SAD)
- Metilensko plavilo (Sigma-Aldrich, SAD)
- Natrij klorid, krist. (Kemika, Hrvatska)
- Phenolphtalein (Sigma-Aldrich, SAD)
- destilirana voda
- Tikvice s okruglim dnom
- Staklene čaše
- lađice, stakleni štapići, žlice
- lijevci
- Erlenmeyerove tikvice
- sterilna gaza, filter papir
- Sinter lijevci
- Pipete
- Birete

3.1.2. Radni instrumenti i oprema

- Analitička vaga (Metler Toledo AB265S)
- Soxhlet aparatura (Behr Labortechnik, Njemačka)
- pH-metar (Methrom, Švicarska)

- Vodena kupelj (GFL 1086 , Helago, Češka)

- Magnetska mješalica (Magnetic motion, SAD)

- Sušionik (Instrumentaria, Zagreb)

3.1.3. Uzorci

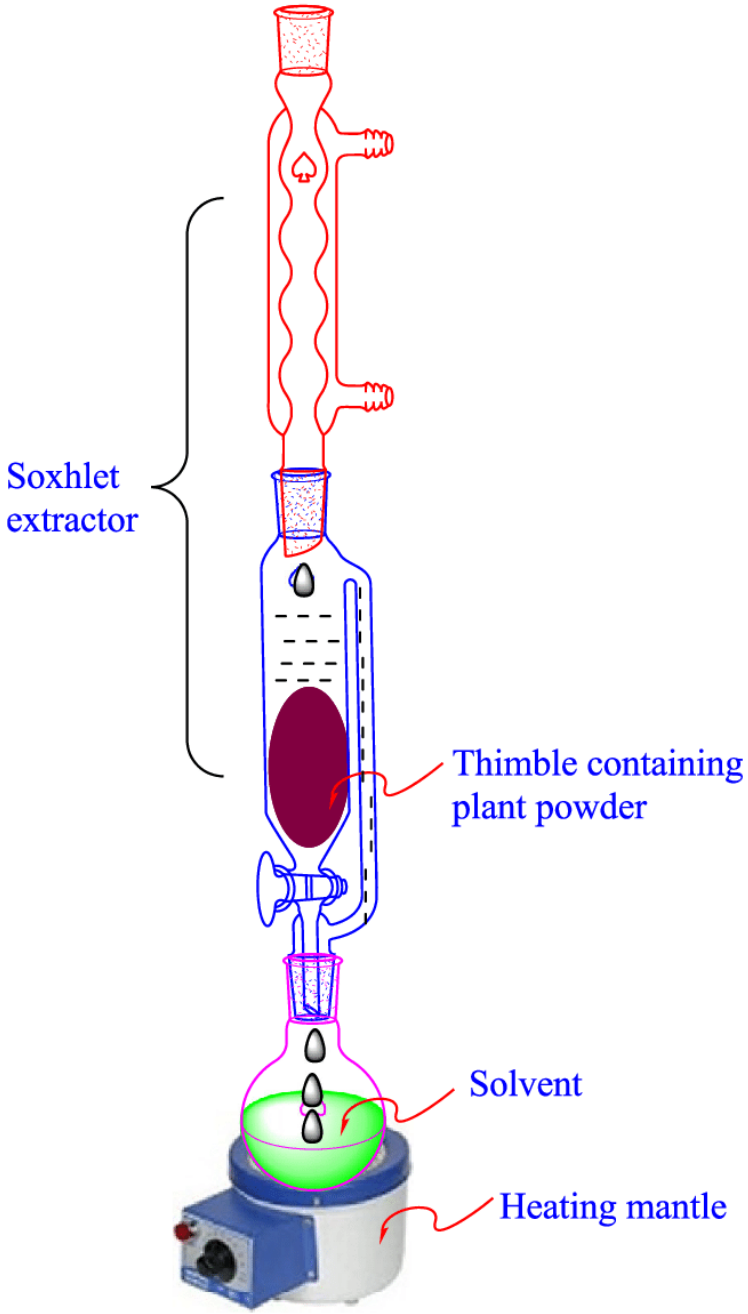
Komina rajčice i mandarine usitnjena je i sušena 72 h na 60 °C. Komina mandarine je nakon sušenja usitnjena u mlinu i prosijana kroz sito promjera 0.8 mm. Komina rajčice je najprije prosijana kroz mlin većeg promjera kako bi se razdvojile frakcije kožice /pulpe od frakcije koštica. Nakon toga je frakcija kožice/pulpe dodatno mljevena i prosijana kroz sito promjena 0.8 mm. Kao referentni uzorak korišten je komercijalni pektin (Pectin E440, Esarom, Austrija).

3.2. Metode

3.2.1. Odmaščivanje komine rajčice i mandarine metodom po Soxhletu

Udio masti u korištenim sirovinama određen je metodom po Soxhletu. 5 g uzorka odvaže se u papirnati celulozni cilindar za odmaščivanje te se na uzorak natisne sloj vate kako bi se spriječio gubitak uzorka iz cilindra za vrijeme ekstrakcije otapalom. Nakon toga, cilindar s uzorkom smješta se u središnji dio Soxhletove aparature (*Slika 7.),* ekstraktor, te se gornji kraj ekstraktora spoji s vodenim hladilom, a donji s recipijentom za mast. Recipijent za mast predstavlja staklena tikvica s kuglicama za vrenje prethodno sušena 1 sat na 105 celzijevih stupnjeva, ohlađena u eksikatoru pola sata. Kao ekstrakcijsko sredstvo koristio se petroleter te njegova količina ovisi o volumenu ekstraktora i tikvice. Radi toga se preko lijevka u hladilo ulije količina otapala dostatna da se ekstraktor napuni i pomoću teglice isprazni u tikvicu. Zatim dodajemo količinu otapala koja će ispuniti otprilike polovinu ekstraktora, računajući od dna do vrha teglice, uzimajući u obzir da cjelokupna količina otapala ne prelazi ¾ volumena tikvice. Kroz hladilo aparature propusti se jaka struja voda i uključi zagrijavanje otapala u tikvici. Zbog zapaljivosti otapala tikvica se zagrijava na pješčanoj kupelji. Temperatura zagrijavanja regulirana je na način da kondenzirane kapljice otapala padaju tolikom brzinom da se jedva mogu brojiti. Za ekstrakciju uzoraka komine rajčice i mandarine bilo je potrebno 2 sata. Kraj ekstrakcije određuje se testom masne mrlje i najbolje ju je prekinuti u onom trenutku kada se otapalo

upravo prelije u tikvicu. Zatim se otvori aparatura i pusti da kap otapala iz ekstrakta padne na filter papir i ako nakon hlapljenja otapala ne ostane masna mrlja ekstrakcija je gotova. Na kraju se izvadi čahura sa supstancom, aparatura ponovno zatvori i otapalo predestilira iz tikvice u ekstraktor.



Slika 7. Aparatura za ekstrakciju po Soxhletu-u (https://www.researchgate.net/figure/Soxhlet-set-up-for-extraction-of-crude-plant-extract_fig1_337847859)

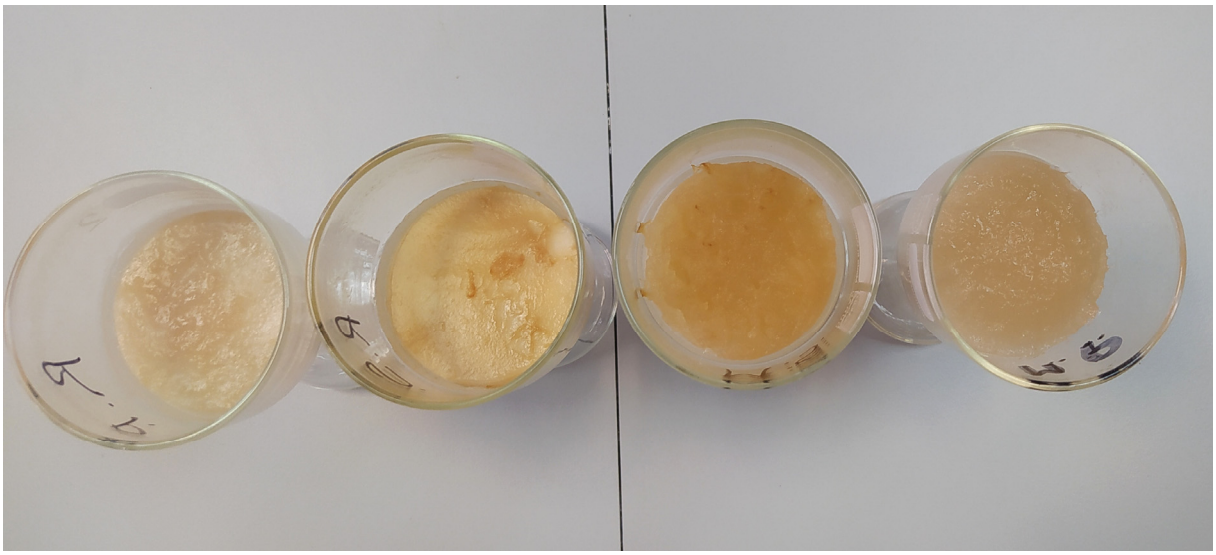
3.2.2. Ekstrakcija pektina iz komine rajčice i mandarine

3.2.2.1. Izrada kemikalija i reagensa

- Limunska kiselina, 1% → pripremljena je otapanjem 20,0662 grama limunske kiseline 1-hidrata u 2000 ml vode, uz korištenje pH-metra te polagano dodavanje 5M HCl-a pH vrijednost je podešena na 1,5
- Etanol, 63 % → otopina pripremljena iz 96% etanola otapanjem 65,63 g u 342,75 ml vode

3.2.2.2. Ekstrakcija pektina

Ekstrakcija pektina provedena je prema postupku Casas-Orozco i suradnika (2015) uz manje modifikacije. 10 g odmašćene komine mandarine (15 g odmašćene komine rajčice) ekstrahira se sa 200 ml (300 m za rajčicu) 1% limunske kiseline (pH 1,5) tijekom 2 sata pri temperaturi od 85 celzijevih stupnjeva. Ekstrakcija se provodi u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 ml, zatvorenim čvrstom alu-folijom uz konstantno protresanje (100 o/min). Nakon ekstrakcije reakcijska smjesa se vruća profiltrira prvo kroz sterilnu gazu koju je potrebno ručno stijesniti kako bi se uklonili zaostali dijelovi komine od ostatka smjese, a zatim kroz obični filter papir. Da bi se dodatno istaložili interferenti koji bi mogli utjecati na čistoću pektinskog ekstrakta, filtrirani uzorci stavljaju se 24 sata u hladnjak na +4 °C. Potom je uzorke potrebno još jednom profiltrirati kroz obični filter papir u Erlenmeyerovu tikvicu od 1000 ml. Precipitacija pektina provodila se dodatkom dvostruke količine 96% etanola u odnosnu na količinu limunske kiseline. Otopina filtrata i etanola miješa se 2 sata na magnetskoj miješalici i zatim stavlja u hladnjak na 1 sat. Nakon toga slijedi vakuum filtracija preko sinter ljevaka kako bi se ubrzalo izdvajanje sirovog pektina. Sinter lijevci sa filter papirom prethodno su osušeni na 105 celzijevih stupnjeva u sušioniku i izvagani kako bi se na kraju mogao odrediti prinos pektina. Dio sirovog pektina dodatno se ispire 63% etanolom da bi se uklonile preostale topljive nečistoće i dobio pročišćeni pektin. Na *Slici 8.* mogu se vidjeti ekstrahirani sirovi i pročišćeni pektini iz rajčice i mandarine spremni za sušenje. Nakon što se osuše na sobnoj temperaturi, lijevci sa uzorcima se izvažu i iz početne odvage uzoraka i lijevaka te konačne odvage lijevaka izračuna prinos pektina. Sirovi i čisti pektin se dalje koriste u postupcima karakterizacije.



Slika 8. Sirovi i pročišćeni pektini ekstrahirani iz komine rajčice i mandarine spremni za sušenje (snimljeno prilikom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada)

3.2.3. Standardizacija 0,1 M otopine NaOH, titranta u titrimetrijskim postupcima karakterizacije pektina

Kako bi se dobili što precizniji rezultati potrebno je standardizirati 0,1 M otopinu NaOH koja će se koristiti za titraciju uzoraka prilikom karakterizacije pektine. Kako bi odredili faktor 0,1 M NaOH potrebno je najprije odrediti faktor 0,1 M HCl.

3.2.3.1. Izrada kemikalija i reagensa

- indikator metil-oranž → 0,02 g metil-oranža otopi se u destiliranoj vodi i nadopuni vodom u odmjernoj tikvici od 100 ml
- 0,1 M HCl → pripremljena je iz 8,22 ml 35% klorovodične kiseline nadopunjene vodom u tikvici od 1L
- 0,1 M NaOH → odvaže se 4 g NaOH, otopi i nadopuni vodom u tikvici od 1L
- Tashiro indikator → priprema se iz 40 ml 0,1% otopine metilnog crvenila (0,1 g metilnog crvenila otopi se u 70% etanolu i nadopuni do 100 ml) i 60 ml 0,1% otopine metilenskog plavila (0,1 g metilenskog plavila otopi se u 70% etanolu i nadopuni do 100 ml)

3.2.3.2. Određivanje faktora za 0,1 M HCl

1 g KHCO3 (sušen 1 sat na 103-105 celzijevih stupnjeva) otopi se u 100 ml vode. 20 ml te otopine uz dodatak 10 kapi metil-oranža kao indikatora titrira se sa 0,1 M HCl do promjene boje iz žute u tamno narančastu.
Da bi se odredio faktor za KHCO3 podijeli se 1g (zadana odvaga) sa stvarnom odvagom.

f (KCHO3)= 1 g (zadana odvaga)/ stvarna odvaga (g)

Faktor za 0,1 M HCl izračuna se koristeći sljedeću formulu:
20 ml KHCO3 x 0,1 M x f (KHC03)= ml HCl x 0,1 M x f (0,1 M HCl)

Iz ove jednakosti slijedi:
f (0,1M HCl)= 20 x 0,1 x f(KCH03) / ml HCl (utrošak kod titriranja, srednja vrijednost) x 0,1

Dobivena vrijednost faktora 0,1 M HCl koristi se u formuli za određivanje faktora 0,1 M NaOH.

3.2.3.3. Određivanje faktora za 0,1 M NaOH

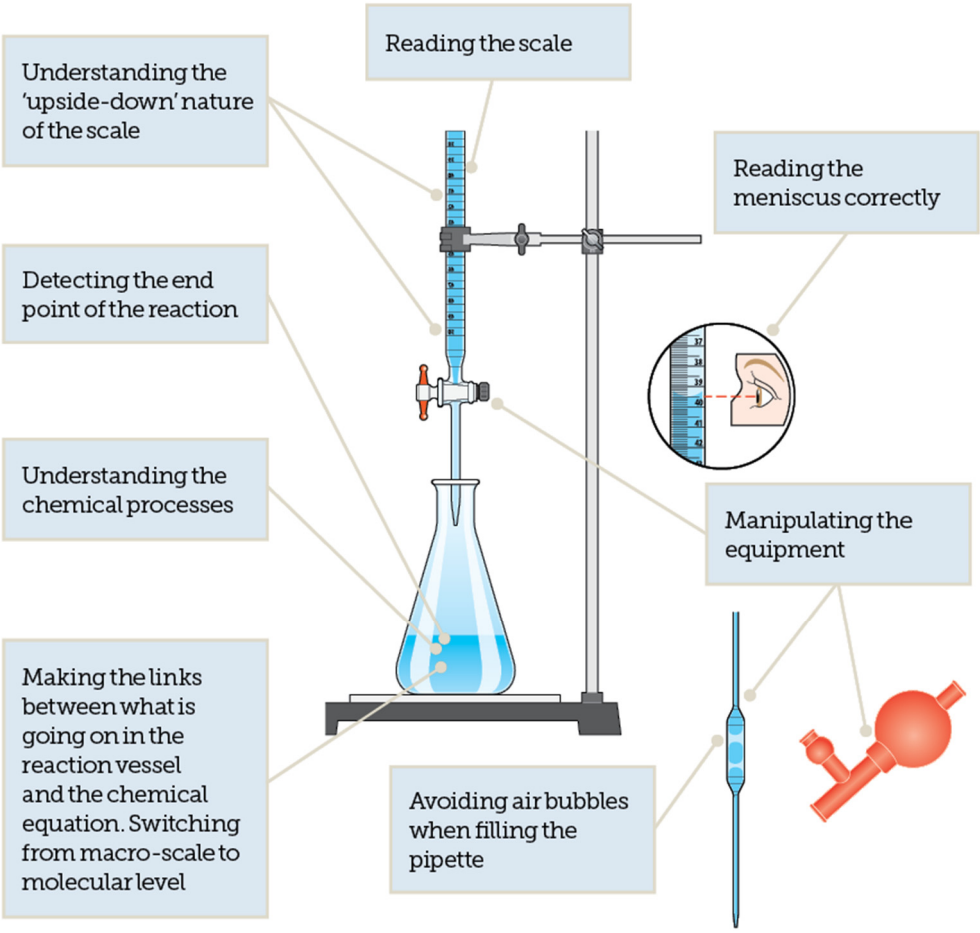
U Erlenmeyerovu tikvicu otpipetira se 20 ml 0,1 M HCl čiji se faktor prethodno odredio te doda 0,5 ml Tashiro indikatora (toliko da otopina poprimi tamnoljubičastu boju). U biretu se stavi 0,1 M otopina NaOH čiji se faktor određuje. Titracija se vrši dok otopina u Erlenmeyerovoj tikvici ne poprimi maslinasto zelenu boju.

Faktor za 0,1 M NaOH izračuna se koristeći sljedeću formulu:
ml 0,1 M NaOH x f (0,1 M NaOH) x 0,1 M= ml 0,1 M HCl x f (0,1 M HCl) x 0,1 M

Iz ove jednakosti slijedi:
f (0,1 M NaOH) = 20 x f (0,1 M HCl) x 0,1 / ml NaOH (utrošak kod titriranja, srednja vrijednost) x 0,1

3.2.4. Karakterizacija pektina

Za karakterizaciju ekstrahiranih pektina korištene su titrimetrijske metode prema postupku Rangannae (1995) i Liew i sur. (2014) uz manje modifikacije. Titracija je kvantitativna laboratorijska metode za određivanje nepoznate koncentracije poznatog analita. Budući da mjerenje volumena ima ključnu ulogu također se naziva volumetrijskom analizom. Reagens, koji se naziva i titrantom, pripremljen je u poznatoj koncentraciji (0,1 M NaOH). Poznata koncentracija i volumen titranta reagira s otopinom analita/titranda čija se koncentracija određuje. Potreban volumen titranta naziva se titracijski volumen. Acido-bazna titracija se temelji na reakciji neutralizacije između kiseline i baze i prva kap baze (0,1 M NaOH) viška označiti će kraj titracije na koji ukazuje promjena boje acido-baznog indikatora. Na *Slici 9.* vidi se potreban laboratorijski pribor i na što sve treba obratiti pažnju prilikom izvođenja titracijskih metoda.



Slika 9. Prikaz koraka na koje je potrebno obratiti pažnju tijekom titracije (https://edu.rsc.org/cpd/moles-and-titrations/2000006.article)

3.2.4.3. Izrada kemikalija i reagensa

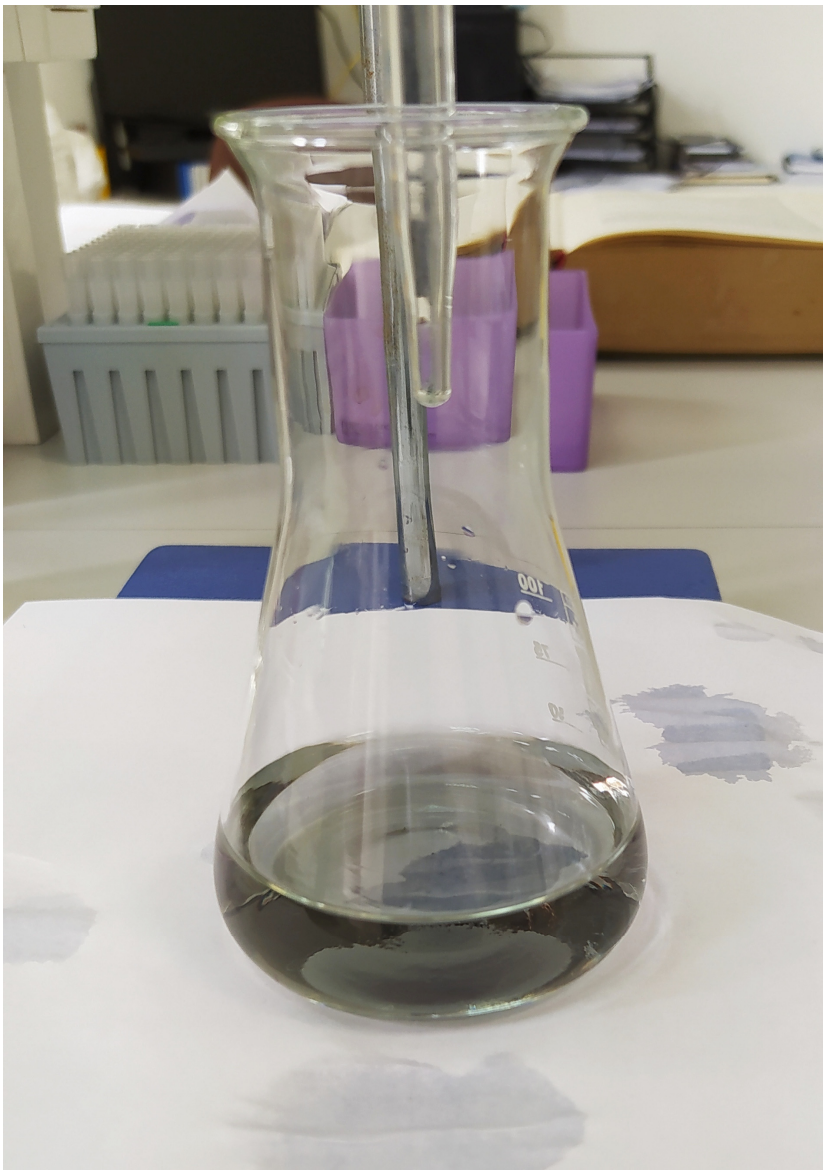
- voda bez CO2 → ultrazvučna kupelj, 30 min
- NaOH, 0,25 M → 125 ml 1 M NaOH doda se u tikvicu od 500 ml i napuni vodom do oznake
- HCl, 0,25 M → 125 ml 1M HCl doda se u tikvicu od 500 ml i nadopuni vodom do oznake
- indikator fenolftalein, 1% → 1 g phenolphtaleina otopi se u vodi u odmjernoj tikvici od 100 ml

3.2.4.2. Određivanje ekvivalentne mase

Što je ekvivalentna masa pektina veća, mogućnost pektina da formira gel je bolja. Ona varira sukladno uvjetima ekstrakcije. Uzorak pektina od 0,25 g važe se u Erlenmeyerovu tikvicu od 100 ml i navlaži sa 1 ml 96% etanola uz brzo miješanje kako bi se spriječilo lijepljenje pektina na stijenke tikvice. Suspenziji se doda 50 ml vode bez CO2 te se smjesa postavi na magnetsku mješalicu (srednja brzina). Doda se 0,5 g natrijevog klorida kako bi se izoštrila krajnja točka titracije i 6 kapi Tashiro indikatora. Smijesa se miješa na magnetskoj miješalici dok se pektin u potpunosti ne otopi (bistra otopina). Titracija se vrši uz polagani dodatak 0,1 M NaOH čiji je faktor prethodno određen sve dok se boja indikatora ne promjeni iz ljubičaste u maslinasto zelenu (pH 7,5). Na *Slici 9.* vidi se kako izgleda promjena boje Tashiro indikatora. Neutralizirana otopina sačuvana je za određivanje metoksilnog ostatka.

Ekvivaletna masa izračuna se iz jednakosti:

Ekvivaletna masa (g/mol)= m uzorka (g) x 1000 / V NaOH (ml) x M NaOH (mol/L) x f (NaOH)



Slika 9. Promjena boje Tashiro indikatora
(snimljeno prilikom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada)

3.2.4.3. Određivanje metoksilnog ostatka

Metoksilni ostatak predstavlja udio metoksilnih skupina u ukupnoj količini pektina. Određuje se saponifikacijom (hidrolitička razgradnja estera) pektina lužinom nakon čega se titriraju oslobođene karboksilne skupine.

U neutraliziranu otopinu dobivenu pri određivanju ekvivalentne težine doda se 12,5 ml 0,25 M NaOH. Smjesa se temeljito promiješa i ostavi da odstoji 30 minuta na sobnoj temperaturi u

začepljenoj tikvici kako bi se odvio proces saponifikacije. Zatim se u smjesu doda 12,5 ml 0,25 M HCl-a kako bi neutralizirali lužinu (boja smjese vraća se u ljubičastu) i titrira se sa 0,1 M NaOH do pojave maslinasto zelene boje.

Sadržaj metoksila računa se iz jednakosti:

Metoksilni ostatak % = ml NaOH x M NaOH (mol/L) x 31 x 100 / m uzorka (g) x 1000

3.2.4.3. Određivanje stupnja esterifikacije

Stupanj esterifikacije (DE) predstavlja omjer esterificiranih skupina poligalakturonske kiseline i ukupnog broja pristunih skupina poligalakturonske kiseline. 0,2 g osušenog uzorka pektina natopljeno je sa 2 ml etanola, a masa je zatim otopljena u 20 ml destilirane vode. Smjesa se ostavi 24 sata na magnetskoj miješalici (srednja brzina) dok se pektin u potpunosti ne otopi. Ako i nakon jednoga dana pektin nije otopljen dodati još 20 ml destilirane vode i postaviti na magnetsku miješalicu do potpunog otapanja. Zatim se otopina titrira sa 0,1 M NaOH nakon dodavanja tri kapi fenolftaleina do pojave ružičaste boje. Broj slobodnih karboksilnih skupina izračunat je iz volumena NaOH utrošenog za početnu titraciju (inicijalni volumen titracije). Zatim se doda 10 ml 0,1 M NaOH kako bi se neutralizirala poligalakturonska kiselina te se uzorak začepi čepom, snažno promućka i ostavi na sobnoj temperaturi 2 sata kako bi se odvila deesterifikacija pektina. Smjesi se zatim doda 10 ml 0,1 M HCl kako bi se neutralizirala lužina i mućka se sve dok ružičasta boja ne nestane. Dodane su tri kapi fenolftaleina i uzorak je dalje titriran sa 0,1 M NaOH do pojave ružičaste boje. Volumen titracije zabilježen je kao konačan volumen titracije i iz njega je izračunat broj esterificiranih karboksilnih skupina poligalakturonske kiseline.

Stupanj esterifikacije računa se iz jednakosti:

DE %= V NaOH konačni (ml) x 100 / V NaOH konačni (ml) + volumen NaOH inicijalni (ml)

3.2.4.4. Određivanje udjela anhidrouronične (galakturonske) kiseline

Određivanje udjela anhidrouronične kiselina (AUA) važno je za procjenjivanje čistoće pektina i za evaluaciju fizikalnih svojstava. Dobiva se računski, korištenjem titracijskih volumena dobivenih određivanjem ekvivalentne težine i metoksilnog ostatka.

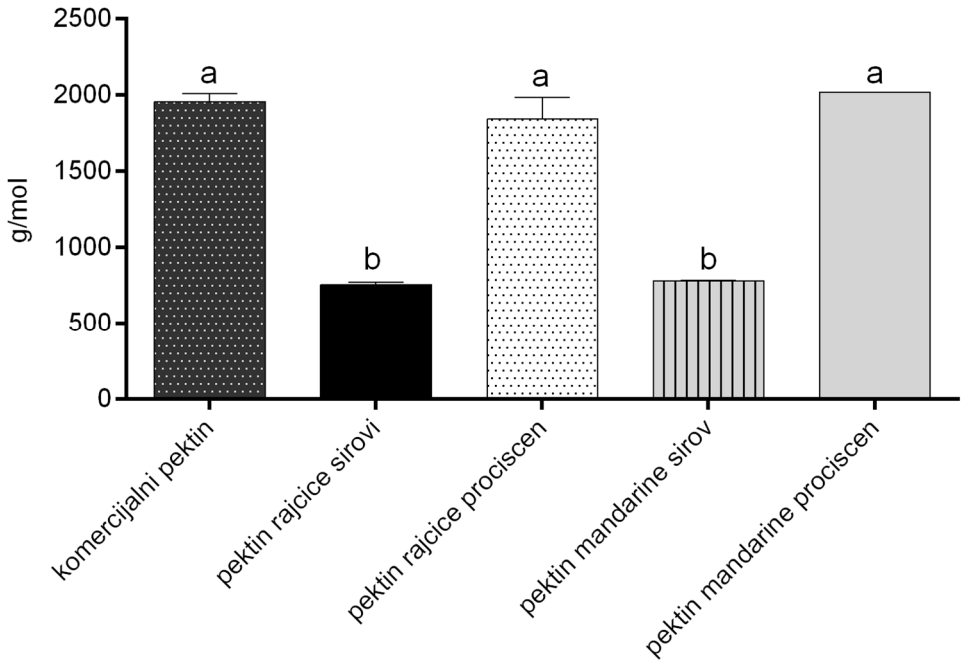
AUA računa se iz jednakosti:
AUA %= (176 x 0,1z x 100 / m uzorka (g) x 1000) + (176 x o,1y x 100 / m uzorka (g) x 1000) , pri čemu je jedna molekularna jedinica AUA 176 g, z (ml) je titar NaOH iz određivanja ekvivalentne težine, y (ml) je titar NaOH iz određivanja metoksilnog ostatka.

3.2.5. Statistička obrada podataka

Za statističku analizu dobivenih podataka i izradu grafičkih prikaza korišteni su Microsoft Office Excel i Graph Pad Prism 6.0 for Windows. Određivanje ekvivalentne mase i metoksilnog ostatka je za svaki uzorak provedeno u duplikatu. Određivanje stupnja esterifikacije za sve uzorke provedeno je u duplikatu uz napomenu da je zbog nedostatka uzorka u ispitivanju korištena duplo manja količina pročišćenih pektina rajčice i pročišćenih pektina mandarine (0,1 g). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Usporedba vrijednosti pojedinih parametara provedena je korištenjem jednosmjerne analize varijance uz post hoc Tukey-ev test. Razina značajnosti definirana je kao $p \leq 0.05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ekvivalentna masa



Slika 10. Ekvivalentna masa pektina u analiziranim uzorcima.

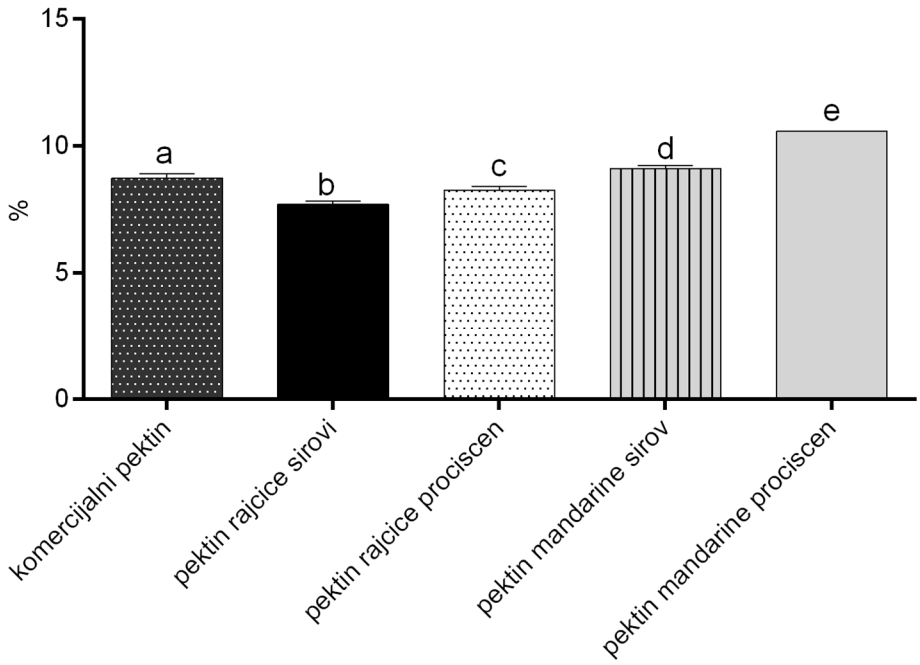
Stupci označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ($p<0.05$)

Iz podataka prikazanih na *Slici 10.* vidi se da se ekvivalentna masa analiziranih pektina kretala od 742,48 do 2018,74 g/mol. Pročišćene pektinske frakcije komine mandarine i komine rajčice imale su ekvivalentnu masu usporedivu sa komercijalnim pektinom dobivenim iz kore jabuke. Prosječna vrijednost ekvivalentne mase pročišćenih pektina rajčice iznosila je 1841,09 g/mol, pročišćenih pektina mandarine 2018,74 g/mol, dok je ekvivalentna masa komercijalnog pektina iznosila 1954,61 g/mol. Sirove pektinske frakcije dobivene i iz jedne i iz druge sirovine imale su značajno manju ekvivalentnu masu (prosječna vrijednost je 754,65 g/mol za rajčicu i 780,07 g/mol za mandarinu) što pokazuje da tijekom procesa čišćenja pektina dolazi do polimerizacije. To je u skladu s našim opažanjima koja su pokazala da tijekom čišćenja dolazi do formiranja gela. Pektinski gelovi formiraju se kada se jedinice homogalakturonana unakrsno povezuju i

stvaraju čvrste spojeve te na taj način formiraju trodimenzionalne strukture unutar kojih zarobljavaju vodu i druge molekule (Williats i sur., 2006). Rezultati su također u skladu s činjenicom da veća ekvivalentna masa pektina poboljšava mogućnost formiranja gela. U radu Morales-Contreras i sur. (2017) ekvivalentna masa pektina izoliranih iz Tomatilla (jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice Solanacae, srodna rajčici) iznosila je od 542 do 699 g/mol. Budući da pektini tijekom procesa ekstrakcije nisu dodatno pročišćavani, može se zaključiti da su vrijednosti ekvivalentne mase približno jednake kao i za sirove pektine rajčice (780,07 g/mol). Razlog nešto nižih vrijednosti ekvivalentne mase pektina iz rada Morales-Contreras i sur. (2017) može biti u degradaciji uzrokovanoj provođenjem ekstrakcije pri višim temperaturama (80 °C) uz korištenje HCl-a umjesto limunske kiseline.

U radu Kute i sur. (2020) ekvivalentna masa sirovog pektina iz komine naranče određena je također titracijom sa NaOH i iznosila je 381 g/mol. Proces ekstrakcije provodio se pri 80 °C uz korištenje HNO_3. Mohamed i sur. (2016) odredili su ekvivalentnu masu pročišćenog pektina grejpa koja je iznosila od 624 do 749 g/mol. Ekstrakcija je provođena pri 80°C uz korištenje HCl-a te je ekvivalentna masa određena titrimetrijski. Iz ovoga proizlazi da i sirovi i pročišćeni pektini mandarine imaju veću ekvivalentnu masu od pektina izoliranih iz citrusnog voća iz navedenih istraživanja te stoga posjeduju bolja gelirajuća svojstva. Važno je naglasiti da se dodatnom precipitacijom s etanolom u procesu čišćenja sirovog pektina uklanjaju zaostali monosaharidi, disaharidi i polifenoli što dovodi do gubitka antioksidativnog učinka (Repajić i sur., 2020). Stoga, uspoređujući rezultate s navedenim radovima može se zaključiti da bez obzira što je ekvivalentna masa sirovog pektina mandarine puno manja od ekvivalentne mase pročišćenog pektina mandarine, i dalje je duplo veća od ekvivalentne mase sirovog pektina komine naranče i veća od ekvivalentne mase pročišćenih pektina grejpa te tako predstavlja dobar izvor nepročišćenog pektina. Isto vrijedi i za nepročišćene pektine rajčice koji imaju približno jednaku vrijednost ekvivalentne mase kao i oni iz mandarine te nešto veću vrijednost ekvivalentne mase od pektina izoliranih iz srodne vrste.

4.2. Metoksilni ostatak



Slika 11. Metoksilni ostatak u analiziranim uzorcima

Stupci označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ($p<0.05$)

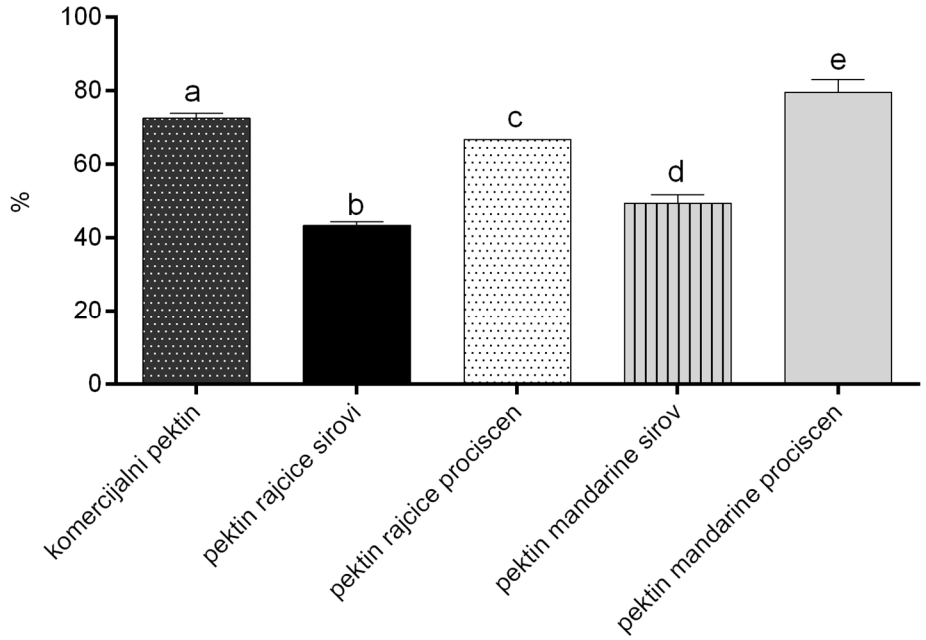
Metoksilni ostatak predstavlja udio metoksilnih skupina naspram ukupne mase pektina. Pektine sa metoksilnim udjelom većim od 7% karakteriziramo kao visoko metoksilirane pektine (HM) dok one s nižim vrijednostima od 7% kao nisko metoksilirane (LM). Pektini s vrijednošću metoksilnog ostatka većom od 7% imaju veću hidrofobnost i gelove formiraju brže u prisutnosti šećera i kiselina. Metoksilni ostatak u analiziranim uzorcima kretao se od 7,61 do 10,56%. Stupanj metoksilacije pročišćenog pektina komine rajčice bio je usporediv s onim komercijalnog dok je pektin dobiven iz komine mandarine imao značajno veći stupanj metoksilacije. Procesom pročišćavanja sirovih pektinskih frakcija došlo je do blagog porasta stupnja metoksilacije, neovisno o izvoru pektina. Iz prikazanih rezultata (*Slika 11.)* vidljivo je da sve analizirane pektine možemo svrstati u skupinu visokometoksiliranih pektina. To ih čini pogodnima u proizvodima koji sadržavaju šećer i kiseline dok bi im gelirajuća svojsta u dijetetskim proizvodima bila ograničena. Zbog graničnih vrijednosti metoksilnog ostatka

sirovog pektina rajčice treba uzeti u obzir i vrijednosti stupnja esterifikacije u procjeni optimalnih uvjeta stvaranja gela.

U radu Ninčević Grassina i sur. (2015) vrijednosti metoksilnog ostatka za pročišćeni pektin rajčice iznosile su 9,03 %, s napomenom da je konvencionalna metoda ekstrakcije provedena pod refluksom čime je dodatno optimizirana, dok je za pročišćene pektine rajčice vrijednost metoksilnog ostatka u ovome radu prosječno iznosila 8,26 %. Nepročišćeni, sirovi pektini rajčice imaju blago snižene vrijednosti metoksilnog udjela koje u prosjeku iznose 7,69% no i dalje se svrstavaju u skupinu visokometoksiliranih pektina. Spoznaje o optimalnim uvjetima formiranja gela su važne jer nepročišćeni pektini rajčice na sebi imaju vezane karotenoide (likopene) i fenole te bi uz ulogu prehrambenih aditiva imali dodatni značaj kao nutriceutici u području funckionalne hrane i dodataka prehrani.

U radu Kute i sur. (2020) vrijednosti metoksilnog ostatka sirovog pektina iz komine naranče iznosili su 5,75 % dok su u radu Mohameda i sur. (2016) vrijednosti za metoksilni ostatak pročišćenog pektina grejpa iznosile od 7,54 do 8,78 %. Za pektine mandarine analizirane u ovome radu metoksilni ostatak je veći i iznosi 9,1% za sirovi te 10,56 % za pročišćeni pektin. Može se zaključiti da pektini izolirani iz mandarine imaju veću sposobnost geliranja u prisustnosti šećera i kiselina te veći stupanj hidrofobnost od srodnog citrusnog voća kao što su naranča i grejp. Nepročišćeni pektini rajčice i mandarine zbog svoje hidrofobnosti imaju potencijal stupanja u interakcije s hidrofobnim molekulama kao što su vitamini i esencijalna ulja te bi kao takvi bili prikadan inkapsulacijski materijal u dodacima prehrani budući da posjeduju gelirajuća svojstva i djeluju kao stabilizatori, a uz to bi imali dodatna antioksidativna svojstva zbog vezanih karotenoida i fenolnih spojeva.

4.3. Stupanj esterifikacije



Slika 12. Stupanj esterifikacije u analiziranim uzorcima

Stupci označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ($p<0.05$)

Stupanj esterifikacije predstavlja udio esterificiranih karboksilnih skupina jedinica galakturonske kiseline. Razlikujemo visoko esterificirani pektin sa stupnjem esterifikacije višim od 50% i nisko esterificirani pektin sa stupnjem esterifikacije nižim od 50% .Nisko esterificirani pektin podliježe ionotropnom geliranju u prisutnosti polivalentnih kationa kao što su Ca^{2+} i Zn^{2+}, ali na proces stvaranja gela također možemo utjecati i promjenom temperature i pH vrijednosti. Jačina gela i brzina njegovog formiranja ovise o udjelu slobodnih disociranih karboksilnih skupina te što je metoksilni ostatak veći više koncentracije kationa biti će potrebne za formiranje čvrstog gela. Proces geliranja visoko esterificiranog pektina uključuje nekoliko vrsta intramolekularnih interakcija koje se uspostavljaju u prisutnosti šećera i kiselina. Hidrofobne i vodikove interakcije doprinose stvaranju gela, a one ovise o udjelu metoksilnih skupina i nedisociranih karboksilnih skupina. Visoko esterificirani pektin ne podliježe procesu ionotropnog geliranja u prisutnosti polivalentnih kationa zbog niskog udjela slobodnih karboksilnih skupina. Vrijednosti stupnja esterifikacije pročišćenih pektinskih frakcija kretale

su se od 66,67 do 81,97% te ih sve možemo svrstati u skupinu visoko estetificiranih pektina. Nasuprot tome sirove pektinske frakcije imale su značajno niži stupanj esterifikacije (pektini račice 43,39%, pektini madarine 49,34%) te ih ubrajamo u skupino nisko esterificiranih pektina. Na *Slici 12.* vidi se da pročišćene frakcije pektina imaju približno jednake vrijednosti stupnja esterifikacije kao komercijalni pektin kore jabuke. Za razliku od ekvivalentne mase i metoksilnog ostatka koji su analizirani kroz kontinuirani postupak sa istom odvagom uzoraka (te udjela galakturonske kiseline koja je onda izračunata računski), određivanje stupnja esterifikacije provedeno je zasebnim postupkom s novim odvagama uzoraka. Stupanj esterifikacije mogao se odrediti i računski iz vrijednosti metoksilnog ostatka i udjela galakturonske kiseline bez provođenja dodatnog eksperimenta. *Tablica 1.* prikazuje usporedbu vrijednosti stupnja esterifikacije dobivenih računski i onih dobivenih eksperimentalno.

Tablica 1. Usporedba računski i eksperimentalno dobivenih stupnjeva esterifikacije

Uzorak	DE % računski, srednja vrijednost	DE % eksperimentalno, srednja vrijednost
Komercijalni pektin	83,96	72,49
Pektin rajčice sirovi	64,69	43,39
Pektin rajčice pročišćeni	82,39	66,67
Pektin mandarine sirovi	69,07	49,34
Pektin mandarine pročišćeni	86,64	79,51

Računski dobivene vrijednosti stupnja esterifikacije su od 11,47 do 21,3 % veće od vrijednosti dobivenih eksperimentalno. Razlog navedene razlike u vrijednostima može biti nedovoljna deesterifikacija pektina koja se odvijala 2h na sobnoj temperaturi te je rezultirala manjim eksperimentalno dobivenim vrijednostima. To je bitno naglasiti jer su metoksilni udio i stupanj esterifikacije bitni za optimizaciju uvjeta u kojim će pektini stvarati gel, a u pojedinim uzorcima dolazi do razlika u klasifikaciji. Naime, sirovi pektini rajčice su klasificirani kao visoko metoksilirani te visokog stupnja esterifikacije ako se gledaju računski podaci. Ako se uzmu u obzir eksperimentalne vrijednosti sirovi pektini rajčice pripadaju u skupinu niskoesterificiranih, te ako se uzmu u obzir granične vrijednosti metoksilnog ostatka (7,69%) može se zaključiti da će nepročišćeni pektini rajčice ipak bolje i brže formirati gel u prisutnosti većih koncentracija

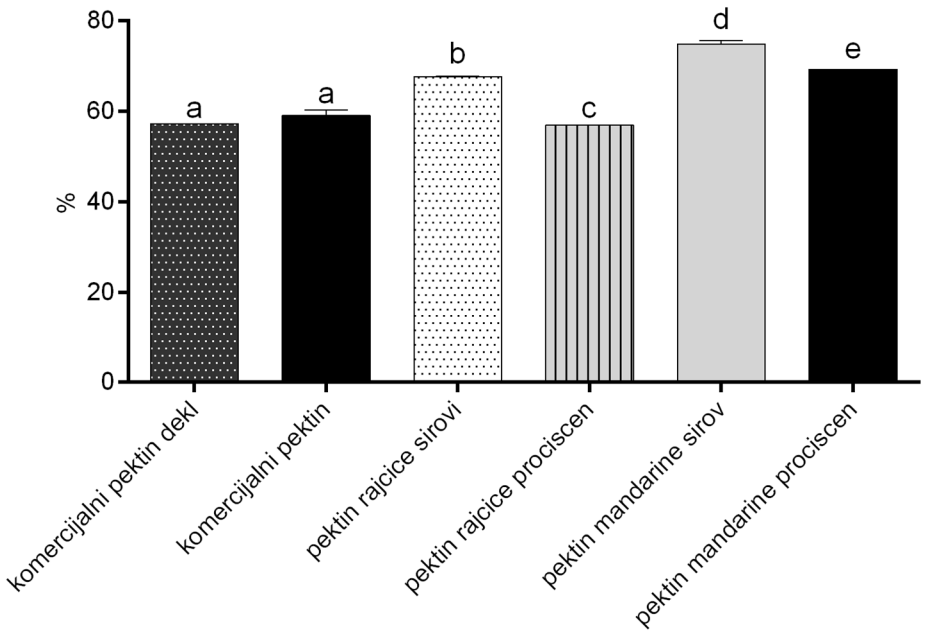
polivalentnih kationa. Vrijednost metoksilnog ostatka sirovih pektina mandarine su ipak znatno veće (9,01%) te se zasigurno mogu svrstati u skupinu visokometoksilirianih pektina, a budući da su vrijednosti eksperimentalno dobivenog stupnja esterifikacije približno 50% može se pretpostaviti da će pokazati bolja gelirajuća svojstva u prisutnosti šećera i kiselina. Potrebna koncentracija šećera i kiselina za formiranje gela će biti veća budući da je stupanj esterifikacije u graničnim vrijednostima. Za obje pročišćene frakcije optimalni uvjeti za formiranje gela ostaju isti kao prilikom proučavanja metoksilnog ostatka budući da i računski i eksperimentalno dobivene vrijednosti stupnja esterifikacije klasificiraju pročišćene pektine u visokoesterificirane. U radu Morales-Contreras i sur. (2017) stupanj esterifikacije nepročišćenih pektina izoliranih iz Tomatilla iznosio je više od 60% za sve uzorke što je u skladu s računski dobivenim vrijednostima za sirovi pektin rajčice u ovome radu, dok vrijednosti nisu u skladu s onima eksperimentalno dobivenim. Za pročišćeni pektin rajčice Ninčević Grassino i sur. (2015) dobili su vrijednosti stupnja esterifikacije od 84,5 do 89 % što je, kao i prethodno utvrđeno za metoksilni ostakak, nešto više od računski dobivenih vrijednosti tijekom ovog istraživanja (82,39%), dok s druge strane nisu u skladu s onim rezultatima dobivenim eksperimentalno.

U skladu s očekivanjem Kute i sur. (2019) dobili su značajno niže vrijednosti stupnja esterifikacije sirovog pektina komine naranče (35,48%) što je i vrijedilo i za vrijednosti ekvivalentne mase i metoksilnog ostatka.. Mohamed i sur. (2016) u istraživanju pročišćenih pektina grejpa dobili su vrijednosti stupnja esterifikacije od 55.01 do 51.24%. Stoga, pektini izolirani iz mandarine imaju puno veći stupanj esterifikacije (i eksperimentalno i računski dobiveni) od pektina izoliranih iz grejpa, te posebice iz naranče.

4.4. Udio galakturonske kiseline

Određivanjem udjela galakturonske kiseline može se ispitati i točnost samog postupka budući da komercijalni pektin ima deklarirani sadržaj galakturonske kiseline (65/100g suhe tvari, tj. 57,2% na originalan uzorak). T-test (usporedba deklarirane i eksperimentalno utvrđene vrijednosti udjela galakturonske kiseline) pokazao je da nema značajne razlike između eksperimentalno utvrđene (58,14%) i deklarirane količine. U ostalim uzorcima udio galakturonske kiseline kretao se od 56,91 do 75,38 % i smanjivao se čišćenjem. *Slika 13.*

prikazuje udjele galakturonske kiseline analiziranih uzoraka u usporedbi s komercijalnim pektinom.



Slika 13. Udio galakturonske kiseline u analiziranim uzorcima

Stupci označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ($p<0.05$)

Budući da udio galakturonske kiseline ukazuje na čistoću pektina i ne bi smio iznositi manje od 65 % ako se pektin primjenjuje u farmaceutske svrhe ili kao prehrambeni aditiv, može se zaključiti da biološki vrijedni sirovi pektini imaju zadovoljavajući udio galakturonske kiseline koji za sirove pektine rajčice iznosi 67,54%, a za sirove pektine mandarine 74,81%.

Ninčević Grassino i sur. (2015) dobili su nešto više vrijednosti udjela galakturonske kiseline za pročišćeni pektin rajčice koji je iznosio 57,2%, dok je tijekom ovog istraživanja dobivena vrijednost od 56,92 %. To je u skladu s do sada uspoređenim karakterističnim svojstvima budući da su i metoksilni ostatak i stupanj esterifikacije bili blago povišeni u odnosu na pročišćene pektine rajčice analizirane u ovome istraživanju. U uspordebi s udjelima galakturonske kiseline pektina izoliranih iz grejpa u radu Mohamed i sur. (2016) koji su iznosili prosječno 60,95 % može se zaključiti da i sirovi i pročišćeni pektini mandarine imaju 9 do 14% veće udjele galakturonske kiseline.

5. ZAKLJUČCI

- kora mandarine sorte Unshiu i komina rajčice predstavljaju vrijedne izvore pektina
- pektini dobiveni iz kore mandarine i pektini dobiveni iz komine rajčice međusobno se značajno razlikuju po svojim funkcionalnim karakteristikama
- pročišćene i sirove frakcije pojedinih pektina međusobno se razlikuju po svojim funkcionalnim karakteristikama
- ekvivalentna masa komercijalnog te pročišćenih frakcija pektina mandarine i rajčice bila je podjednaka (1841,09 g/mol-2018,74 g/mol). Sirove frakcije pektina imale su značajno manju ekvivalentnu masu (754,65 g/mol (rajčica) i 780,07g/mol (mandarina)), a do porasta ekvivalentne mase dolazi zbog polimerizacije i stvaranja gela tijekom procesa čišćenja
- Sve dobivene pektine možemo svrstati u skupinu visokometoksiliranih pektina pri čemu je pektin kore mandarine sadržavao veći udio metoksilnog ostatka u odnosu na pektin komine rajčice, a tijekom procesa pročišćavanja pektina došlo je blagog porasta sadržaja metoksilnog ostatka u analiziranim pektinima. To ih čini pogodnima u proizvodima koji sadržavaju šećer i kiseline dok bi im gelirajuća svojsta u dijetetskim proizvodima bila ograničena.
- Vrijednosti stupnja esterifikacije pročišćenih pektinskih frakcija kretale su se od 66,67 do 81,97% te ih se može svrstati u skupinu visoko estetificiranih pektina. Nasuprot tome sirove pektinske frakcije imale su značajno niži stupanj esterifikacije (pektini rajčice 43,39%, pektini mandarine 49,34%) te ih se svrstava u skupinu nisko esterificiranih pektina.
- Udio galakturonske kiseline u analiziranim uzorcima kretao se od 56,91 do 75,38 % i smanjivao se čišćenjem.

6. LITERATURA

Bayon B, Berti IR, Gagneten AM, Castro GR. Biopolymers from wastes to high-value products in biomedicine. U: Waste to health. Singhania RR, Agarwal RA, Kumar RP, Sukumaran RK, urednici, Singapore, Springer, 2018, str. 1-44.

Brejnholt SM. Pectin. U: Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents. Imeson A, urednik, Blackwell Publishing, Chichester, 2009, str. 237-266.

Caffall KH., Mohnen D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohyd. Res*, 2009, 344, 1879-1900.

Casas-Orozco D, Villa AL, Bustamante, F, González, LM. Process development and simulation of pectin extraction from orange peels. *Food Bioprod. Process*, 2015, 96, 86–98.

Dranca F, Oroian M. Extraction, purification and characterization of pectin from alternative sources with potential technological applications. *Food Res. Int*, 2018, 113, 327–350.

Guillon F, Champ M. Structural and phisical properties of dietery fibers and consequences of processing on human physiology. *Food Resear Int*, 2020, 33, 237-244.

Harholt J, Suttangkakul A, Scheller VS. Biosyinthesis of Pectin. *J. Plant Physiol*, 2010, 153, 384-395.

Indulekha J, Karuppan M, Appusamy A. A review on the potential of citrus waste for D-Limonene, pectin, and bioethanol production. *Int. J. Green Energy*, 2017, 75-83.

Khamsucharit P, Laohaphatanalert K, Gavinlertvatana P, Sriroth K, Sangseethong K. Characterization of pectin extracted from banana peels of different varieties. *Food Science and Biotechnology*, 2017, 27, 623–629.

Kurita O, Fujiwara T, Yamazak E. Characterization of the pectin extracted from citrus peel in the presence of citric acid. *Carbohydr. Polym*, 2008, 74(3), 725-730.

Kute AB, Mohapatra D, Kotwaliwale N, Giri SK, Sawant BP. Characterization of Pectin Extracted from Orange Peel Powderusing Microwave-Assisted and Acid Extraction Methods. *Agric Res*, 2020, 9, 241-248.

Kute B, Mohapatra D, Kotwaliwale N, Giri SK, Sawant BP. Characterization of Pectin Extracted from Orange Peel Powderusing Microwave-Assisted and Acid Extraction Methods. *Agric. Res*, 2020, 9, 241-248.

Liew SQ, Chin NL, Yusof YA. Extraction and character-ization of pectin from passion fruit peel. U: 2ndInternational conference on agricultural & food engineering; New trends forward. Chin NL, urednik, Kuala Lumpur, Elsevier Procedia, 2014, str. 231–236.

Löfgren C. Pectins-structure and gel forming properties, a literature review. SIK Institute for Food and Biotechnology, Švedska , 2000, 665.

Lu Z, Wang J, Gao R, Je F, Zhao G. Sustainable valorisation of tomato pomace: A comprehensive review. *Trends Food Sci. Technol*, 2019, 86, 172-187.

Mak TMW, Xiong X, Tsang DCW, Yu IKM, Sun Poon C. Sustainable food waste managment towards circular bioeconomy: Policy review, limitations and opportuinites. *Bioresour. Technol*, 2019, 122497.

Marić M, Grassino AN, Zhu Z, Barba FJ, Brnčić M, Rimac Brnčić S. An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends Food Sci. Technol*, 2018, 7, 28-37.

Mohamed H. Extraction and characterization of pectin from grapefruit peels. *Food Process Technol*, 2016, 2, 31□38.

Moles and titrations, scary stuff?, 2015., https://edu.rsc.org/cpd/moles-and-titrations/2000006.article, pristupljeno 11.11.2020.

Morales-Contreras BE, Contreras-Esquivel JC, Wicker L, Ochoa-Martinez LA, Morales-Castro J. Husk Tomato (Physalis ixocarpaBrot.) Waste as a Promising Source of Pectin: Extraction andPhysicochemical Characterization. *J. Food Sci.*, 2017, 82, 1594-1601.

Munarin F, Tanzi MC, Petrini,P. Advances in biomedical applications of pectin gels. *Int. J. Biol. Macromol*, 2012, 51(4), 681–689.

Ng HS, Kee PE, Yim HS, Chen PT, Wei YH, Chi-Wei Lan J. Recent advances on the sustainable approaches for conversion and reutilization of food wastes to valuable bioproducts. *Bioresour. Technol*, 2020, 302, 122889.

Ninčević Grassino A, Halambek J, Đaković S, Rimac Brnčić S, Dent M, Grabarić Z. Utilization of tomato peel waste from canning factory as a potential source for pectin production and application as tin corrosion inhibitor. *Food Hydrocolloids*, 2016, 52, 265-274.

Pagán J, Ibarz A, Llorca M, Pagán A, Barbosa-Cánovas GV. Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace. *Food Res. Int*, 34, 2001, 605–612.

Paritosh K, Kushwaha SK, Yadav M, Pareek N, Chawade A, Vivekanand V. Food Waste to Energy: An Overview of Sustainable Approaches for Food Waste Management and Nutrient Recycling. *Biomed Res. Int*, 2017, 2370927.

Phytochemical screening, metal concentration determination, antioxidant activity, and antibacterial evaluation of Drymaria diandra plant, 2019.,https://www.researchgate.net/figure/Soxhlet-set-up-for-extraction-of-crude-plant-extract_fig1_337847859, pristupljeno 11.11.2020.

Rafiq S, Kaul R, Sofi SA, Bashir N, Nazir F, Ahmad Nayik G. Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *J. Saudi Soc. Agric. Sci*, 2018, 17, 351-358.

Ranganathan S, Dutta S, Moses JA, Anandharamakrishnan C. Utilization od food waste streams for the production of biopolymers. *Heliyon*, 2006, 6, e04891.

Ranganna S. Pectin. U: Hand book of analysis and quality controlfor fruits and vegetable products. New Delhi, McGraw Hill publishing Co, 1995, str. 1-57.

Rehmana A, Ahmadb T, Muhammad Aadilb R, Spottic MJ, Bakryd AM, Khana IM , Zhaoa L, Riaza T, Tonga Q. Pectin polymers as wall materials for the nano-encapsulation of bioactive compounds. *Trends Food Sci. Technol*, 2019, 90, 35-46.

Rehmann ZU, Salatiya AM, Shah WH. Utilization of mango peels as a source of pectin. *J. Chem. Soc*, 2004, 26, 73–76.

Repajić M, Cegledi E, Kruk V, Pedisić S, Çınar,F, Bursać Kovačević D, Dragović-Uzelac V. Accelerated Solvent Extraction as a Green Tool for the Recovery of Polyphenols and Pigments from Wild Nettle Leaves. *Processes*, 2020, 8(7), 1-19.

Sharma K, Mahato N, Cho MH, Lee YR. Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmently friendly approaches. *Nutr. J*, 2017, 34, 29-46.

Sprječavanje nastanka otpada od hrane, 2020., https://poljoprivreda.gov.hr/istaknute-teme/hrana-111/sprjecavanje-nastanka-otpada-od-hrane/222, pristupljeno 4.11.2020.

Tan H, Nie S. Deciphering diet-gut microbiota-host interplay: Investigations of pectin. *Trends Food Sci. Technol.*, 2020, 106, 171-181.

Ueno H, Tanaka M, Hosino M, Sasaki M, Goto M. Extraction of valuable compounds from the flavedo of Citrus using subcritical water. *Sep. Purif. Technol*, 2008, 62(3), 513-516.

Williats GT, Knox JP, Dalgaard Mikkelsen J. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends Food Sci Technol*, 2006, 17, 97-104.

Zhang W, Xie F, Lan X, Gong S, Wang Z. Characteristics of pectin from black cherry 1150 tomato waste modified by dynamic high-pressure microfluidization. *J. Food Eng*, 2018, 216, 90-97.

7. SAŽETAK

U okviru ovog rada istražene su karakteristike pektina dobivenih iz kore mandarine sorte Unshiu i komine rajčice , a dodatni cilj istraživanja bio je istražiti fizikalno-kemijske karakteristike nepročišćenih pektinskih frakcija. Ekstrakcija pektina provedena je konvencionalnom ekstrakcijskom metodom, a za karakterizaciju ekstrahiranih pektina korištene su titrimetrijske metode. Sirove frakcije pektina imale su značajno manju ekvivalentnu masu od pročišćenih frakcija, a do porasta ekvivalentne mase dolazi zbog polimerizacije i stvaranja gela tijekom procesa čišćenja. Sve dobivene pektine možemo svrstati u skupinu visokometoksiliranih pektina pri čemu je pektin kore mandarine sadržavao veći udio metoksilnog ostatka u odnosu na pektin komine rajčice. Vrijednosti stupnja esterifikacije pročišćenih pektinskih frakcija svrstavaju ih u skupinu visoko esterificiranih pektina. Nasuprot tome sirove pektinske frakcije imale su značajno niži stupanj esterifikacije te ih se svrstava u skupinu nisko esterificiranih pektina. Stoga, sirovi pektini rajčice bili bi pogodni u dijetetskim proizvodima te bi formirali gel u prisutnosti polivalentnih kationa, dok bi ostali bili pogodni u proizvodima koji sadržavaju šećer i kiseline. U nepročišćenim pektinskim frakcijama udio galakutoronske kiseline bio je veći od 65 % te se nepročišćeni pektini mogu koristiti kao prehrambeni aditivi i u farmaceutske svrhe. Zaključno, kora mandarine sorte Unshiu i komina rajčice predstavljaju značajne izvore pektina. Biološki vrijedne sirove pektinske frakcije pokazuju zadovoljavajuće fizikalno-kemijske karakteristike. Buduća istraživanja potrebno je usmjeriti na optimizaciju ekstrakcijskih metoda i uporabu što osjetljivijih analitičkih metoda u postupcima karakterizacije s ciljem unaprjeđenja valorizacije prehrambenog otpada rajčice i mandarine koji predstavlja značajan izvor nutriceutika.

SUMMARY

In the context of this work, the characteristic features of raw (unpurified) and purified pectins obtained from satsuma mandarin peel and tomatoo pomace were being explored. Pectin extraction was carried out by applying conventional extraction and titrimetric methods were used for the characterization of extracted pectins. Crude pectin fractions had significantly smaller equivalent weight than the purified fractions, while the increase of equivalent weight came as a result of polymerization and gelling during the purification process. All obtained pectins can be classified in a group of highly metoxilated pectins, where mandarin peel pectin contained higher content of metoxilated residue as compared to tomato pomace pectin. The values of the degree of esterification of purified pectin fractions classify them in the group of high-esterified pectins. By contrast, crude pectin fractions had significantly lower degree of esterification thus classified in the group of low-esterified pectins. Therefore, non-purified tomato pectin would be sutiable in dietetic products and they will form gel in the presence of polyvalent cations, while other pectins would be suitbale for products concatining acids and sugar. In non-purified pectin fractions, the content of galacturonic acid was by 65% higher, thus non-purified pectins may be used as food additives, as well as for pharmaceutical purposes. To conclude, satsuma mandarin peel and tomato pomace are good sources of pectin. Biologically valuable crude pectin fractions show satisfactory physicochemical features. Future research activities should focus on the optimization of extraction methods and use of sensitive analytical methods for their characterization with the aim of improving the exploitation of tomato and mandarin nutritional waste which constitutes a significant source of nutraceuticals.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Kemiju prehrane
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Karakterizacija pektina ekstrahiranih iz komine rajčice i mandarine

Ana Maria Jagodić

SAŽETAK

U okviru ovog rada istražene su karakteristike pektina dobivenih iz kore mandarine sorte Unshiu i komine rajčice , a dodatni cilj istraživanja bio je istražiti fizikalno-kemijske karakteristike i sirovih (nepročišćenih) pektinskih frakcija. Ekstrakcija pektina provedena je konvencionalnom ekstrakcijskom metodom, a za karakterizaciju ekstrahiranih pektina korištene su titrimetrijske metode. Sirove frakcije pektina imale su značajno manju ekvivalentnu masu od pročišćenih frakcija, a do porasta ekvivalentne mase dolazi zbog polimerizacije i stvaranja gela tijekom procesa čišćenja. Sve dobivene pektine možemo svrstati u skupinu visokometoksiliranih pektina pri čemu je pektin kore mandarine sadržavao veći udio metoksilnog ostatka u odnosu na pektin komine rajčice. Vrijednosti stupnja esterifikacije pročišćenih pektinskih frakcija svrstavaju ih u skupinu visoko esterificiranih pektina. Nasuprot tome sirove pektinske frakcije imale su značajno niži stupanj esterifikacije te ih se svrstava u skupinu nisko esterificiranih pektina. Stoga, sirovi pektini rajčice bili bi pogodni u dijetetskim proizvodima te bi formirali gel u prisutnosti polivalentnih kationa, dok bi ostali bili pogodni u proizvodima koji sadržavaju šećer i kiseline. U nepročišćenim pektinskim frakcijama udio galakutoronske kiseline bio je veći od 65 % te se nepročišćeni pektini mogu koristiti kao prehrambeni aditivi i u farmaceutske svrhe. Zaključno, kora mandarine sorte Unshiu i komina rajčice predstavljaju značajne izvore pektina. Biološki vrijedne sirove pektinske frakcije pokazuju zadovoljavajuće fizikalno-kemijske karakteristike. Buduća istraživanja potrebno je usmjeriti na optimizaciju ekstrakcijskih metoda i uporabu što osjetljivijih analitičkih metoda u postupcima karakterizacije s ciljem unaprjeđenja valorizacije prehrambenog otpada rajčice i mandarine koji predstavlja značajan izvor nutriceutika.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 40 stranica, 4 grafička prikaza, 1 tablicu i 38 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Kora mandarine, komina rajčice, pektin, ekvivalentna masa, metoksilni ostatak, stupanj esterifikacije, udio galakturonske kiseline

Mentor: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo,** *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Ivan Pepić, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić , *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: siječanj, 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of food chemistry
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Characterization of pectins extracted from tomato pomace and mandarine peel

Ana Maria Jagodić

SUMMARY

In the context of this work, the characteristic features of raw (unpurified) and purified pectins obtained from satsuma mandarin peel and tomatoo pomace were being explored. Pectin extraction was carried out by applying conventional extraction and titrimetric methods were used for the characterization of extracted pectins. Crude pectin fractions had significantly smaller equivalent weight than the purified fractions, while the increase of equivalent weight came as a result of polymerization and gelling during the purification process. All obtained pectins can be classified in a group of highly metoxilated pectins, where mandarin peel pectin contained higher content of metoxilated residue as compared to tomato pomace pectin. The values of the degree of esterification of purified pectin fractions classify them in the group of high-esterified pectins. By contrast, crude pectin fractions had significantly lower degree of esterification thus classified in the group of low-esterified pectins. Therefore, non-purified tomato pectin would be sutiable in dietetic products and they will form gel in the presence of polyvalent cations, while other pectins would be suitbale for products concatining acids and sugar. In non-purified pectin fractions, the content of galacturonic acid was by 65% higher, thus non-purified pectins may be used as food additives, as well as for pharmaceutical purposes. To conclude, satsuma mandarin peel and tomato pomace are good sources of pectin. Biologically valuable crude pectin fractions show satisfactory physicochemical features. Future research activities should focus on the optimization of extraction methods and use of sensitive analytical methods for their characterization with the aim of improving the exploitation of tomato and mandarin nutritional waste which constitutes a significant source of nutraceuticals.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 40 pages, 4 figures, 1 table and 38 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Mandarine peel, tomato pomace, pectins, equivalent weight, metoxyl content, degree of esterification, galacutorinic acid content

Mentor: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.***Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivan Pepić, Ph.D. *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D. *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: January, 2021.