

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Slaven Jurić i Marinela Nutrizio

**POTENCIJAL SEKUNDARNIH BILJNIH SIROVINA KAO
IZVORA FUNKCIONALNIH SASTOJAKA PREHRAMBENIH
PROIZVODA**

Zagreb, 2014.

„Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo pod vodstvom prof. dr. sc. Draženke Komes i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2013/2014.“

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI.....	4
3. TEORIJSKI DIO	6
3.1. Sekundarne biljne sirovine (agro-industrijski otpad) u suvremenom društvu.....	7
3.1.1. Pulpa šećerne repe.....	8
3.1.2. Ljuska oraha.....	9
3.1.3. Kakaova ljuska	9
3.1.4. Ljuska crvenog luka	11
3.1.5. Kora krumpira.....	12
3.1.6. Mahuna graška	13
3.2. Prehrambena vlakna	14
3.2.1. Topljivost prehrambenih vlakana.....	15
3.2.2. Tehnološka svojstva prehrambenih vlakana	15
3.2.3. Značenje prehrambenih vlakana u industrijskoj proizvodnji	16
3.3. Biološki aktivne komponente hrane.....	18
3.3.1. Polifenolni spojevi	19
3.3.2. Biološki aktivne komponente u sekundarnim biljnim sirovinama	21
4. MATERIJAL I METODE.....	22
4.1. Materijal	23
4.1.1. Uzorci sekundarnih biljnih sirovina	23
4.1.2. Kemikalije	24
4.1.3. Aparatura i pribor	26
4.2. Metode rada.....	30
4.2.1. Priprema uzoraka sekundarnih biljnih sirovina za analize	31
4.2.2. Određivanje udjela suhe tvari sekundarnih biljnih sirovina	31
4.2.3. Određivanje udjela masti u sekundarnim biljnim sirovinama.....	32
4.2.4. Određivanje udjela proteina u sekundarnim biljnim sirovinama.....	33
4.2.5. Određivanje udjela mineralnog ostatka (pepela) u sekundarnim biljnim sirovinama	35
4.2.6. Određivanje udjela sirove ugljikohidratne frakcije	36
4.2.7. Priprema vodenih i etanolnih ekstrakata	36
4.2.7.1. Soxhlet ekstrakcija.....	36
4.2.7.2. Konvencionalna ekstrakcija.....	37

4.2.8. Karakterizacija sirove ugljikohidratne frakcije	38
4.2.8.1. Određivanje udjela vlakana u sekundarnim biljnim sirovinama.....	38
4.2.8.1.1. Određivanje netopljivih vlakana.....	38
4.2.8.1.2. Određivanje topljivih vlakana.....	39
4.2.8.2. Određivanje udjela slobodnih ugljikohidrata primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC).....	40
4.2.8.3. Određivanje sastava polisaharida sekundarnih biljnih sirovina	42
4.2.8.3.1. Priprema kiselinskih hidrolizata	42
4.2.8.3.2. Određivanje u kiselini netopljivog ostatka	43
4.2.8.3.3. Određivanje monomernog sastava kiselinskih hidrolizata sekundarnih biljnih sirovina pomoću tankoslojne kromatografije visoke učinkovitosti (HPTLC)	43
4.2.9. Određivanje sastava i udjela bioaktivnih spojeva	45
4.2.9.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola.....	45
4.2.9.2. Određivanje udjela ukupnih neflavonoida i flavonoida	46
4.2.9.3. Određivanje pojedinačnih polifenola i metilksantina primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC)	48
4.2.10. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta.....	50
4.2.10.1. ABTS metoda	50
4.2.10.2. DPPH metoda	52
4.3. Statistička obrada podataka.....	53
5. REZULTATI.....	54
5.1. Fizikalno-kemijski parametri sekundarnih biljnih sirovina	55
5.2. Kemijski sastav sekundarnih biljnih sirovina	56
5.2.1. Udjeli osnovnih nutrijenata	56
5.2.2. Sastav sirove ugljikohidratne frakcije.....	58
5.2.2.1. Udjeli pojedinih ugljikohidratnih komponenata	58
5.2.2.2. Sastav i udjeli slobodnih ugljikohidrata.....	61
5.2.2.3. Sastav i udjel polisaharida - kiselinska hidroliza.....	62
5.3. Sastav i udjeli polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet sekundarnih biljnih sirovina....	64
5.4. Pregled sastava suhe tvari ispitivanih sekundarnih biljnih sirovina	70
5.5. Statistička obrada rezultata.....	72
6. RASPRAVA.....	75
6.1. Fizikalno-kemijski parametri sekundarnih biljnih sirovina	76
6.1.1. Udjel sekundarnih biljnih sirovina	76
6.1.2. Udjel suhe tvari.....	76

6.1.3. Raspodjela veličine čestica	77
6.2. Kemijski sastav sekundarnih biljnih sirovina	77
6.2.1. Udjeli osnovnih nutrijenata	77
6.2.1.1. Udjel masti.....	77
6.2.1.2. Udjel proteina.....	77
6.2.1.3. Udjel mineralnog ostatka	78
6.2.1.4. Udjel sirove ugljikohidratne frakcije.....	78
6.2.2. Sastav sirove ugljikohidratne frakcije sekundarnih biljnih sirovina	79
6.2.2.1. Udjel netopljivih i topljivih vlakana - enzimaska hidroliza	80
6.2.2.2. Udjel i sastav slobodnih ugljikohidrata - ekstrakcija polarnim otapalima.....	80
6.2.2.3. Udjel i sastav polisaharida - kiselinska hidroliza.....	81
6.3. Biološki aktivni spojevi u sekundarnim biljnim sirovinama	83
6.3.1. Udjeli ukupnih polifenola, flavonoida i neflavonoida.....	83
6.3.2. Antioksidacijski kapacitet	84
6.3.3. Sastav i udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva i metilksantina.....	85
6.3.4. Usporedba konvencionalne i Soxhlet ekstrakcije.....	87
6.4. Statistička obrada rezultata.....	87
6.4.1. Korelacije rezultata određenih u vodenim i etanolnim ekstraktima (Soxhlet ekstrakcija) .	87
6.4.2. Utjecaj određivanih parametara sastava ispitivanih sirovina na njihov bioaktivni potencijal određen primjenom analize glavnih komponenti	88
7. ZAKLJUČCI	90
8. ZAHVALE	94
9. POPIS LITERATURE	96
10. SAŽETAK.....	106
11. SUMMARY	108



1. UVOD

Prema dostupnim podacima trenutno oko 15 % svjetske populacije gladije (FAO, 2012), dok se s druge strane povećava broj zemalja u kojima veliki problem predstavljaju bolesti povezane s pretjeranom i neadekvatnom konzumacijom hrane te zabrinjavajućim povećanjem količine sekundarnih biljnih sirovina (agro-industrijskog otpada). Sekundarne biljne sirovine čine ostaci visokog udjela organske tvari koji najčešće nastaju tijekom procesiranja sirovina (Galanakis, 2012), a čine ih kore, ljuske, stabljike, koštice i drugi neiskorišteni dijelovi biljnog materijala koji se prema većini važećih europskih legislativa klasificiraju kao otpad budući da se uklanjaju iz proizvodnog procesa. Dosadašnja uporaba takvog materijala bila je najvećim dijelom usmjerena na pripremu stočne hrane i komposta ili se isti koristio kao pomoćno gorivo (Angulo i sur., 2012), no, i ta primjena je ograničena (Schieber i sur., 2001), a budući da se količina otpada povećava otvaraju se mogućnosti za istraživanje šireg spektra primjene.

Sekundarne sirovine biljnoga podrijetla posebno su zanimljive i zbog kemijskog sastava u kojem dominiraju polisaharidi i različiti biološki aktivni spojevi, važni za ljudsko zdravlje. Stoga, jedna od mogućnosti primjene agro-industrijskog otpada je upravo izdvajanje pojedinih sastojaka tih sirovina i vraćanja u proizvodni lanac u obliku dodatka hrani u svrhu poboljšanja njezine kakvoće i razvoja funkcionalnih prehrambenih proizvoda (Galanakis, 2012).

Polisaharidi se, kao sastavni dio biljnih staničnih stijenki, svakodnevno konzumiraju u ljudskoj prehrani kao prehrambena vlakna koja imaju brojne pozitivne učinke na probavni sustav jer povećavaju volumen sadržaja crijeva, ubrzavaju peristaltiku, usporavaju hidrolizu polisaharida do glukoze, vežu i izlučuju toksine iz organizma (Elleuch i sur., 2011), smanjuju rizik od pojave krvožilnih bolesti, hipertenzije, pretilosti i brojnih gastrointestinalnih bolesti i karcinoma (Anderson i sur., 2009). Pozitivni zdravstveni učinci prehrambenih vlakana mogu se povezati s njihovim fizikalno-kemijskim osobinama, osobito topljivošću. Prema dosadašnjim istraživanjima, netopljiva prehrambena vlakna najviše su povezana s regulacijom probave, dok se topljiva vlakna povezuju s učinkom smanjenja razine kolesterola te adsporpcijom glukoze (Schneeman, 1987).

Osim prehrambenih vlakana, sekundarne biljne sirovine su izvrstan izvor brojnih antioksidansa, polifenola i pigmenta te drugih mikronutrijenata koji djeluju antiinflamatorno, antimikrobno, antifungalno, diuretički, antihepatotoksično, antihipertenzivno, antikoagulirajuće, spazmolitički, kardiotonično, antialergijski, antiulkusno, analgetski, antimalarično i hipoglikemijski (Crozier i sur., 2006).

Ovisno o vrsti sirovine i načinu njezine prerade, sastav i udjel sastojaka se mijenja i stoga karakterizacija sastava sekundarnih biljnih sirovina otvara brojne mogućnosti izdvajanja pojedinih sastojaka i njihovog dodatka u različite prehrambene proizvode kreirajući tako široku paletu različitih funkcionalnih proizvoda.

U tom kontekstu, svrha ovog rada je proširiti saznanja o kemijskom sastavu šest sekundarnih biljnih sirovina (pulpa šećerne repe, ljuska oraha, kakaova ljuska, ljuska crvenog luka, kora krumpira, mahuna graška) s detaljnim uvidom u sastav ugljikohidrata i polifenola.

Primjenom mnogobrojnih analitičkih tehnika provesti će se detaljna karakterizacija fizikalno-kemijskog sastava s posebnim naglaskom na sastav ugljikohidratne frakcije i antioksidacijski potencijal istraživanih sekundarnih biljnih sirovina.

Istraživanje će doprinjeti novim znanstvenim spoznajama o tehnološkom i funkcionalnom potencijalu ispitivanih sekundarnih biljnih sirovina.



2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI

Sukladno tendencijama razvoja prehrambene industrije koja uključuje pronalaženje novih izvora različitih bioaktivnih sastojaka kao funkcionalnih dodataka prehrambenim proizvodima, opći cilj istraživanja je karakterizacija kemijskog sastava sekundarnih biljnih sirovina (pulpa šećerne repe, ljuska oraha, kakaova ljuska, ljuska crvenog luka, kora krumpira, mahuna graška) u svrhu njihove primjene u kreiranju novih funkcionalnih prehrambenih proizvoda.

Specifični ciljevi rada su:

- 1) Određivanje udjela makronutrijenata (ugljikohidrati, proteini, masti) u sekundarnim biljnim sirovinama
- 2) Određivanje udjela slobodnih ugljikohidrata u sekundarnim biljnim sirovinama
- 3) Određivanje udjela topljivih, netopljivih i ukupnih vlakana u sekundarnim biljnim sirovinama
- 4) Određivanje sastava polisaharida u sekundarnim biljnim sirovinama
- 5) Određivanje sastava i udjela biološki aktivnih spojeva u sekundarnim biljnim sirovinama
- 6) Određivanje antioksidacijskog potencijala sekundarnih biljnih sirovina



3. TEORIJSKI DIO

3.1. Sekundarne biljne sirovine (agro-industrijski otpad) u suvremenom društvu

Suvremena prehrambena industrija nalazi se pred brojnim izazovima koji su s jedne strane usmjereni na veliku potražnju za hranom, a s druge strane na razvoj proizvoda visoke nutritivne vrijednosti čijom konzumacijom se može poboljšati opće stanje organizma, ali i spriječiti nastanak i razvoj specifičnih oboljenja. U tom pogledu jedna od glavnih smjernica razvoja prehrambene industrije je i pronalaženje novih sirovina i izvora potencijalno funkcionalnih sastojaka koji bi omogućili realizaciju tih izazova.

Nadalje, prehrambena industrija generira veliku količinu sekundarnih biljnih sirovina (agro-industrijskog otpada) koje značajno utječu na okoliš zbog spore biorazgradivosti, onečišćenja voda, emisije metana i sličnih ekoloških problema (Misi i Forster, 2002). U cilju smanjenja štetnog utjecaja agro-industrijskog otpada na okoliš i njegovog nagomilavanja, otkrivaju se brojni načini njegovog iskorištavanja. U zadnje vrijeme, sve se više gleda na agro-industrijski otpad kao materijal za recikliranje i iskorištavanje njegovih prehrambenih sastojaka (Chapla i sur., 2010).

Među brojnim sekundarnim biljnim sirovinama, trenutno se najviše agro-industrijskog otpada stvara prilikom prerade šećera. Godišnje se proizvodi 8,6 milijuna tona pulpe šećerne repe u svijetu, koja se najčešće upotrebljava kao stočna hrana. Najveći proizvođači navedenog materijala su Njemačka, Sjedinjene Američke Države, Francuska i Velika Britanija, koje proizvode više od 50 % godišnje svjetske proizvodnje (Anonymous 1).

Zahvaljujući biljnom podrijetlu, sekundarne biljne sirovine obiluju ugljikohidratima, prvenstveno prehrambenim vlaknima te brojnim biološki aktivnim komponentama. Prehrambena vlakna, kao skupina spojeva uključuju smjese biljnih polimera ugljikovodika, kako oligosaharida, tako i polisaharida. U probavnom sustavu čovjeka, prehrambena vlakna ne prolaze hidrolizu, ne probavljaju se niti aposrbiraju u tankom crijevu, nego utječu na: povećanje volumena stolice, stimuliraju fermentaciju u debelom crijevu, smanjuju postprandijalnu razinu glukoze u krvi (smanjuje reakciju inzulina) i smanjuju predprandijalnu razinu kolesterola u krvi (Elleuch i sur., 2011). Prehrambena vlakna također mogu poslužiti kao funkcionalni sastojci za poboljšanje nutritivne kvalitete hrane te fizikalnih i strukturnih svojstava kao što su vezanje i zadržavanje vode, kapacitet vezanja ulja, viskoznost, tekstura, senzorska svojstva i produljenje roka trajanja (Elleuch i sur., 2011).

Sekundarne biljne sirovine bogat su izvor raznih biološki aktivnih komponenata, prvenstveno polifenola. Polifenoli su široko rasprostranjeni spojevi koji doprinose senzorskim svojstvima hrane, pa su tako mnogi od njih ujedno i pigmenti, a vrlo su značajni i zbog izraženog antioksidacijskog potencijala (Safi i sur., 2003), zahvaljujući kojem štite organizam od pojave i razvoja brojnih bolesti, posebice bolesti krvožilnog sustava i karcinoma (Soobrattee, 2005).

Biljno podrijetlo agro-industrijskog otpada značajna je prednost i izazov za znanstvenike i prehrambene tehnologe, ostvarujući tako brojne mogućnosti istraživanja kemijskog sastava i primjene izdvojenih sastojaka u razvoju inovativnih prehrambenih proizvoda. Interes za traženjem novih biljnih izvora visokog udjela prehrambenih vlakana i antioksidansa postaje sve veći, što je potkrijepljeno brojnim novim znanstvenim istraživanjima (Soobrattee i sur., 2002; Carocho i Ferreira, 2013), usmjerenima na izolaciju vrijednih nutrijenata sekundarnih biljnih sirovina i njihovu implementaciju u prehrambene proizvode (Elleuch i sur., 2011).

3.1.1. Pulpa šećerne repe

Značajne količine pulpe šećerne repe (slika 1) proizlaze procesiranjem šećerne repe (*Beta vulgaris* L. spp. *vulgaris* var. *saccharifera* Alef.), posebice u Europi i SAD-u. Osim u svrhu stočne hrane, pulpa šećerne repe pokazuje dobar potencijal u proizvodnji ksantan gume (Yoo i Harcum, 1999), koristi se kao gnojivo (Medina i sur., 2007) te kao sirovina za proizvodnju biogoriva (Ghanem i sur., 1992; Hutnan i sur., 2000; Koppa i Pullammanappallil, 2008; Labat i sur., 1984; Polematidis i sur., 2007).



Slika 1. Briketirana šećerna repa (Anonymous 2)

Pulpa šećerne repe (*Beta vulgaris* L.) sadrži 20-25 % celuloze, 25-36 % hemiceluloze, 20-25 % pektina, 10-15 % proteina i 1-2 % lignina, računato na suhu tvar (Micard, 1996; Michel, 1988). Ostaci šećerne repe preostali nakon ekstrakcije šećera koriste se kao stočna hrana jer sadrže ugljikohidrate, proteine i minerale (Asadi, 2007).

3.1.2. Ljuska oraha

Znanstvena istraživanja vezana uz karakterizaciju i uporabu ljuske oraha prilično su limitirana, a najviše je dostupnih podataka vezano za proizvodnju i preradu oraha u Turskoj.

U Turskoj, voćne ljuske i druge sekundarne biljne sirovine potencijalno su važan izvor energije. Ukupna godišnja proizvodnja ljuske oraha u Turskoj iznosi 968 478 tona, procijenjeno prosječnom proizvodnjom između 2006. i 2010. godine (TurkStat, 2011). Orah (*Juglans regia* L.) je kultiviran u brojnim regijama Turske i jedan je od najvažnijih poljoprivrednih proizvoda zbog različitih primjena u prehrambenoj industriji (Surmen i Demirbas, 2003).



Slika 2. Ljuska oraha (Anonymous 3)

Ljuska oraha (slika 2) ima veliki potencijal, zbog njegove visoke godišnje proizvodnje u Turskoj (procijenjeno oko 150 000 tona) i sukladno tome visokog energijskog sadržaja od 20,18 MJ/kg (Surmen i Demirbas, 2003). Nažalost, ovaj se agro-industrijski otpad obično direktno spaljuje u svrhu grijanja, iako se potencijalno može iskoristiti, kako za izdvajanje pojedinih visoko vrijednih biološki aktivnih sastojaka, tako i za različite oblike goriva odgovarajućim procesima, kao što je primjerice piroliza.

3.1.3. Kakaova ljuska

Tijekom prerade kakaovog zrna (*Theobroma cacao* L.), uklanja se ljuska na koju otpada najmanje 10 % mase kakaovog ploda (Owusu-Domfeh, 1972). Kakaova ljuska (slika 3) predstavlja potencijalni ekološki problem kada se samo skladišti u blizini pogona za preradu jer, osim što uzrokuje

neugodan miris zbog razgradnje, ista može biti i značajan izvor bakterija koje uzrokuju bolesti kao što je primjerice crna trulež (Barazarte i sur., 2008; Donkoh i sur., 1991; Figueira i sur., 1993; Kalvatchev i sur., 1998).



Slika 3. Kakaova ljuška (Anonymous 4)

Procijenjeno je da će svjetska proizvodnja suhog kakaovog zrna narasti sa približno 3,6 milijuna tona u 2009./2010. na 3.9 milijuna tona u 2013./2014. (ICCO, 2001) što će rezultirati i povećanjem mase agro-industrijskog otpada i predstavljati ozbiljan izazov za njegovo upravljanje.

U zemljama koje proizvode kakaovo zrno, procesiranje takvog otpada može pružiti ekonomsku prednost i smanjiti opseg ekoloških problema. Alternativna metoda procesiranja kakaove ljuške mogla bi biti izdvajanje pektina ljuške koji se koristi kao sredstvo za geliranje i stabiliziranje različitih prehrambenih, ali i kozmetičkih te farmaceutskih proizvoda (Rolin, 1993; Voragen i sur., 1995).

Trenutno je ekstrakcija pektina iz kakaove ljuške dušičnom kiselinom dosegla prosječno 11,5 g/100 g suhe tvari (Vriesmann i sur., 2011). Nedavna istraživanja (Canteri-Schemin i sur., 2005; Klieman i sur., 2009; Pinheiro i sur., 2008; Virk i Sogi, 2004; Yapo, 2009a, 2009b) pokazuju da je limunska kiselina također vrlo učinkovita u ekstrakciji pektina i prema prinosu i prema fizikalno-kemijskim svojstvima. Limunska kiselina ujedno je prirodan i siguran aditiv u hrani i samim time je atraktivnija u odnosu na dušičnu, klorovodičnu ili sumpornu kiselinu u pogledu ekstrakcije komercijalnog pektina (Yapo, 2009b). Osim ekonomske strane, primjena limunske kiseline ima prednost i s ekološkog aspekta jer bi se smanjio utjecaj korozivne otpadne vode na okoliš (Canteri-Schemin i sur., 2005; Klieman i sur., 2009; Pinheiro i sur., 2008).

3.1.4. Ljuska crvenog luka

Vezano uz primjenu otpada koji nastaje primarnom obradom luka provedena su istraživanja koja ukazuju na potrebu za odgovarajućim i stabilnim tretmanom ove sirovine u svrhu njegovog daljnjeg iskorištavanja za prehrambene svrhe. Prethodna istraživanja proučavala su utjecaj sterilizacije sekundarnih biljnih ostataka luka (*Allium cepa* L.) (slika 4) na frakcije vlakana, njihov sastav i fizikalno-kemijska svojstva kako bi se procijenio učinak sterilizacije s ciljem upotrebe ostataka luka kao novog izvora prehrambenih vlakana (Benitez i sur., 2011).



Slika 4. Ljuska crvenog luka (Anonymous 5)

Više od 500 000 tona agro-industrijskog otpada luka (slika 4) proizvodi se godišnje u Europskoj Uniji, najviše u Španjolskoj, Velikoj Britaniji i Nizozemskoj (Waldron, 2001).

Sekundarni biljni ostaci luka nisu pogodni za iskorištavanje u obliku hrane za krmivo zbog jake arome koju posjeduju, a ne mogu biti iskorišteni niti kao organsko gnojivo zbog njihove osjetljivosti na fitopatogene kao što je *Sclerotium cepivorum* (bijela trulež) (Schieber i sur., 2001). Štoviše, njihovo uklanjanje putem sagorijevanja postaje sve skuplje što je viši udjel vode u ostacima. Stoga, znanstvenici i prehrambena industrija predlažu konverziju otpada luka u sastojke koji će se zbog pozitivnih utjecaja na zdravlje moći inkorporirati u hranu (Roldán i sur., 2008; Waldron, 2001; Corzo-Martínez i sur., 2007).

Sekundarni biljni ostaci luka izvor su aromatičnih spojeva, prehrambenih vlakana, nestrukturnih ugljikohidrata kao što su fruktani i fruktooligosaharidi, kao i flavonoida, posebice kvercetina i glikozida (Jaime i sur., 2001; Jaime i sur., 2000; Roldán i sur., 2008; Rose i sur., 2005).

Prehrambena vlakna kombinacija su mnogih sastojaka koji se razlikuju u fizikalnim i kemijskim svojstvima. Koncentrati prehrambenih vlakana iz povrća i voća mogu sadržavati značajne udjele prehrambenih vlakana i imati bolji omjer topljivih i netopljivih prehrambenih vlakana nego žitarice (Garau i sur., 2007). Omjer topljivih i netopljivih vlakana važan je za ljudsko zdravlje, ali i za tehnološke

karakteristike sirovine; 30-50 % topljivih vlakana i 70-50 % netopljivih vlakana smatra se dobro balansiranim omjerom kako bi se zadovoljili i osigurali fiziološki učinci obje frakcije (Grigelmo-Miguel i Martin-Belloso, 1999). Ljuska luka sadrži značajan udjel prehrambenih vlakana s dobrim omjerom topljivih i netopljivih frakcija povezanih s različitim metaboličkim i fiziološkim učincima istih (Jaime i sur., 2002).

3.1.5. Kora krumpira

Kora krumpira (slika 5), kao sekundarna sirovina nastala primarnom obradom krumpira (*Solanum tuberosum* L.), dobar je izvor prehrambenih vlakana i polifenola (Singh i sur., 2005). Krumpir je jedna od najvažnijih namirnica na svijetu, odmah nakon kukuruza, pšenice i riže. Proizvodnja krumpira je 2007. godine u Kini dosegla 72 040 000 tona što je bilo više od petine svjetske proizvodnje krumpira (325 milijuna tona) (FAO, 2008).



Slika 5. Kora krumpira (Anonymous 5)

Kina je najveći proizvođač krumpira, nakon koje slijedi Rusija (35 718 000 tona), Indija (26 280 000 tona), Ukrajina (19 102 300 tona), SAD (17 653 920 tona), Njemačka (11 604 500 tona) i Poljska (11 221 100 tona). Najviše krumpira konzumira se u Bjelorusiji (338 kg/stanovniku) nakon koje slijedi Kirgistan (152 kg), Rusija (142 kg), Ukrajina (142 kg), Latvija (136 kg), Armenija (132 kg), Litva (131 kg) te Poljska (128 kg). Međutim, skoro pola svjetskih zaliha krumpira konzumirano je u Aziji, posebice u Kini (52 882 000 tona) (FAO, 2008).

Krumpir sadrži brojne polifenolne spojeve i glikoalkaloide koji su najviše sadržani u kori. Istražene su brojne fenolne kiseline koje su glavni nosioci antioksidacijske aktivnosti kore krumpira (Nara i sur., 2006; Rodriguez de Sotillo i sur., 1994).

Najveći dio kore krumpira sastavljen je od tvari netopljivih u alkoholu (Mahmood i sur. 1998) s udjelom prehrambenih vlakana od prosječno 40 % (Camire i Flint, 1991). Udjel škroba u kori ovisi o postupku guljenja krumpira; guljenjem uz pomoć pare u kori zaostaje oko 28 % škroba, abrazivnim guljenjem udjel škroba u kori je skoro dva puta veći (51 %), zbog toga što se tim procesom uklanja više krumpira (Camire i sur., 1997). Kora krumpira kao sekundarna sirovina primarne obrade krumpira, dostupna je u velikim količinama, a sadrži široki spektar sastojaka koji bi se mogli upotrijebiti kao dodaci prehrambenim proizvodima. Unatoč brojnim pokušajima, za sada ne postoji koncept kojim bi se u potpunosti mogla iskoristiti kora krumpira. Potrebna je odgovarajuća strategija industrije krumpira koja bi dala dodatnu vrijednost i mogućnost uporabe kore krumpira, a samim time i smanjila ogromne količine otpada, uz ekonomski prihvatljivi trošak te ekološki prihvatljivu tehnologiju. Kora krumpira sadrži brojne biološki aktivne sastojke (Schieber i Saldana, 2009) te u skladu s tendencijama primjene prirodnih sastojaka u razvoju različitih prehrambenih proizvoda pokazuje veliki potencijal.

3.1.6. Mahuna graška

Prehrambena vlakna glavni su sastojak mahune graška (*Pisum sativum* L.) (slika 6), koja ima veći udjel netopljivih vlakana u odnosu na topljiva, pri čemu netopljivi dio predstavlja 93 % ukupnog udjela vlakana. Omjer netopljivih i topljivih vlakana je blizu 13. Prehrambena vlakna glavni su sastojak mahune graška i čine više od 50 % suhe tvari pa se stoga mahuna graška može smatrati dobrim izvorom prehrambenih vlakana što joj daje dodatnu vrijednost i mogućnost balansiranja hrane prema prehrambenim potrebama (Mateos-Aparicio i sur., 2010).



Slika 6. Mahuna graška (Anonymous 6)

3.2. Prehrambena vlakna

Prehrambena vlakna definiraju se kao jestivi dijelovi biljaka ili analogni ugljikohidrati koji su neprobavljivi i ne apsorbiraju se u tankom crijevu čovjeka, dok se u debelom crijevu djelomično ili potpuno razgrađuju djelovanjem crijevne mikroflore.

Prehrambena vlakna se sastoje od neprobavljivih ugljikohidrata, lignina i drugih povezanih tvari biljnog podrijetla, vlakana životinjskog podrijetla i modificiranih ili sintetičkih neprobavljivih polimera ugljikohidrata. Neprobavljivi ugljikohidrati se sastoje od sljedećih polisaharida: celuloze, β -glukana, hemiceluloze, guma, sluzi, pektina, inulina, rezistentnog škroba; oligosaharida: fruktooligosaharida, oligofruktoze, polidekstroze, galaktooligosaharida; i oligosaharida soje, rafinoze i stahioze. Kitozan je primjer vlakana životinjskog podrijetla, dobiven iz hitina sadržanog u egzoskeletu rakova i lignji, a njegova molekularna struktura slična je celulozi. Svaki polisaharid karakteriziran je prema svojim šećernim jedinicama i prirodi veze između njih (Borderias i sur., 2005).

Izvor prehrambenih vlakana su namirnice biljnog podrijetla: voće, povrće, orašasto voće i žitarice, a kod brojnih namirnica je veći udjel vlakana u kori nego u samom plodu (Borderias i sur., 2005).

Nadopuna dnevnog unosa prehrambenih vlakana kroz hranu može rezultirati brojnim pozitivnim zdravstvenim učincima, niske je kalorijske vrijednosti, kolesterola i masti. Prema postojećim preporukama (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2001) prosječna dnevna potreba za prehrambenim vlaknima je 25 g/dan za žene mlađe od 50 godina, 21 g/dan za žene starije od 50, 38 g/dan za muškarce mlađe od 50 i 30 g/dan za muškarce starije od 50 godina. Većina nutricionista i dijetetičara predlaže da bi oko 20-30 % dnevnog unosa prehrambenih vlakana trebala biti vlakna topljiva u vodi. Prehrambena vlakna imaju brojne pozitivne učinke u organizmu, poput povećanja volumena sadržaja u crijevima (i sukladno tome dužem osjećaju sitosti), ubrzavanja peristaltike, usporavanja hidrolize polisaharida do glukoze, snižavanja serumske koncentracije kolesterola u krvi te zbog prebiotičkog učinka dovode do pojačane kolonizacije crijeva bifidobakterijama na račun enteropatogena koji se izlučuju fecesom. Osim navedenih, prehrambena vlakna također mogu pružiti i neka funkcionalna svojstva u hrani, kao npr. povećati kapacitet vezanja vode, povećati kapacitet vezanja ulja, djelovati kao emulgator i/ili formirati gel. Prehrambena vlakna inkorporirana u prehrambene proizvode (pekarski proizvodi, mliječni proizvodi, džemovi, meso, juhe) mogu modificirati teksturalna svojstva, izbjeći sinerezu (separaciju tekućine iz gela uzrokovanu stezanjem), stabilizirati hranu bogatu mastima i stabilizirati emulzije te produžiti rok trajanja proizvodu (Elleuch i sur., 2011).

3.2.1. Topljivost prehrambenih vlakana

Prehrambena vlakna se mogu podijeliti na topljiva i netopljiva ovisno o tome tvore li otopinu kada se pomiješaju sa vodom (topljiva) ili ne (netopljiva). Topljiva prehrambena vlakna uključuju pektine, gume, sluzi i neke hemiceluloze, a netopljiva vlakna celulozu i neke druge vrste hemiceluloza te lignin (Davidson i McDonald, 1998; Roehrig, 1988; Schneeman, 1987).

Topljivost je povezana sa strukturom polisaharida; koji mogu biti postavljeni pravilno (netopljivi) ili nepravilno (topljivi) na okosnicu ili bočne lance. Prisutnost supstitucijske skupine kao što je COOH ili SO_4^{2-} povećava topljivost. Na topljivost još utječu temperatura i jakost ionske veze (Bertin i sur., 1988; Fleury i Lahaye, 1991; Manas, 1994).

Topljiva i netopljiva priroda prehrambenih vlakana uključuje raznolikost u njihovim tehnološkim funkcijama i fiziološkom djelovanju (Jimenez-Escrig i Sanchez-Muniz, 2000; Roehrig, 1988). Topljiva vlakna karakterizirana su sposobnošću povećanja viskoznosti i smanjenja glikemijskog odgovora i kolesterola u plazmi (Abdul-Hamid i Luan, 2000; Olson i sur., 1987; Roehrig, 1988; Schneeman, 1987). Netopljiva vlakna karakterizirana su poroznošću, niskom gustoćom te sposobnošću povećanja volumena stolice i smanjenja crijevnog tranzita (Olson i sur., 1987).

Usporedno s netopljivim prehrambenim vlaknima u procesiranju hrane, topljive frakcije pokazuju veći utjecaj na viskoznost, imaju sposobnost formiranja gelova i/ili djeluju kao emulgatori, imaju zadovoljavajuću teksturu i okus te ih je lakše inkorporirati u proizvodnji hrane i pića (Roehrig, 1988).

3.2.2. Tehnološka svojstva prehrambenih vlakana

Vlakna kao sastojci hrane posjeduju određena tehnološka svojstva koja rezultiraju različitim fiziološkim učincima nakon konzumiranja proizvoda bogatih vlaknima (tablica 1).

Tablica 1. Tehnološka i fiziološka svojstva proizvoda s prehrambenim vlaknima

Tehnološko svojstvo	Fiziološko svojstvo
Kapacitet vezanja vode	Laksativ
Sposobnost upijanja vode	Smanjenje razine kolesterola u krvi
Sposobnost zadržavanja vode	Smanjenje razine glukoze u krvi
Topljivost u vodi	Smanjenje rizika od kroničnih bolesti (bolesti srca i krvnih žila, dijabetes, pretilost, neki oblici raka)
Kapacitet vezanja ulja	
Viskoznost	
Tekstura	
Stabilnost	
Sposobnost formiranja gela	
Antioksidativna svojstva	

3.2.3. Značenje prehrambenih vlakana u industrijskoj proizvodnji

Prehrambena industrija može iskoristiti fizikalno-kemijska svojstva prehrambenih vlakana kako bi poboljšala viskoznost, teksturu, senzorske karakteristike i produžila rok trajanja proizvoda. Vlaknima bogate sekundarne biljne sirovine izvor su sastojaka koji se mogu inkorporirati u hranu kao jeftina, nekalorijska sredstva za bubrenje i vezanje vode, kao djelomična zamjena za brašno, mast ili šećer te u svrhu poboljšanja emulzija ili oksidativne stabilnosti. Međutim, udio vlakana koji se može dodati je ograničen jer može uzrokovati nepoželjne promjene, posebice promjene u boji i teksturi hrane.

Pregledom literaturnih podataka i proizvoda već prisutnih na tržištu, može se utvrditi u koje vrste prehrambenih proizvoda su već implementirana prehrambena vlakna:

- pekarski proizvodi
- napitci
- bombonski proizvodi
- mliječni proizvodi i smrznuti mliječni proizvodi
- meso
- tjestenine
- juhe.

Najčešće se prehrambena vlakna inkorporiraju u pekarske proizvode zahvaljujući njihovoj sposobnosti zadržavanja vode a sa svrhom produljenja njihove svježine, čime se smanjuju i ekonomski gubici u proizvodnji ovih proizvoda. Dodatak vlakana pekarskim proizvodima može modificirati

volumen kruha, njegovu elastičnost, mekoću korice kruha i čvrstoću kruha (Sangnark i Noomhorm, 2004; Wang i sur., 2002).

3.2.4. Prehrambena vlakna kao sastojci funkcionalne hrane

Trenutačno još uvijek nema opće i univerzalno priznate zakonske definicije naziva „funkcionalna hrana“, premda se definicije koje su ponudile i koje koriste različite profesionalne zdravstvene organizacije često podudaraju. Jedna od definicija funkcionalne hrane koja na jednostavan način objašnjava taj pojam je ta da se hrana može nazvati „funkcionalnom“ ako pored svoje osnovne nutritivne vrijednosti na pozitivan i zadovoljavajući način utječe na jedan ili više ciljanih funkcija ljudskog organizma smanjujući rizike razvoja pojedinih bolesti (Diplock i sur., 1999). Funkcionalna hrana uključuje raznovrsne prehrambene proizvode kao što su obogaćene žitarice, kruh i peciva, sportski napitci, pločice, „snack“ proizvodi, dječja hrana, gotovi obroci i sl.

Prehrambena vlakna zadovoljavaju sve karakteristike potrebne da se uzmu u obzir kao sastojci funkcionalnih prehrambenih proizvoda, osobito zbog pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje (Heredia i sur., 2002). Važnost prehrambenih vlakana dovela je do razvoja tržišta proizvoda bogatih vlaknima, a posljednjih godina povećava se trend pronalaska novih izvora vlakana, koji bi se mogli koristiti kao funkcionalni sastojci u prehrambenoj industriji (Chau i Huang, 2003).

Iako su na tržištu već prisutni proizvodi s dodatkom različitih vlakana kao funkcionalnih sastojaka, potrebna su daljnja istraživanja o strukturi i funkciji prehrambenih vlakana u različitim prehrambenim proizvodima. Zbog kompleksnog sastava i djelovanja prehrambenih vlakana te moguće interakcije s drugim sastojcima proizvoda, tek nakon detaljnijih istraživanja biti će omogućeno „dizajnirati“ nove prehrambene proizvode s postignutom ciljanom funkcionalnošću prehrambenih vlakana sa tehnološkog i fiziološkog aspekta (Guillon i Champ, 2000).

3.3. Biološki aktivne komponente hrane

Premda su makronutrijenti u najvećem udjelu zastupljeni u prehrani, danas se sve više pažnje posvećuje sastojcima hrane koji se u proizvodima nalaze u malim količinama, a koji zahvaljujući sposobnosti neutralizacije utjecaja štetnih tvari u ljudskom organizmu mogu imati povoljan utjecaj na zdravlje. Takvi sastojci nazivaju se biološki aktivnim komponentama i definiraju se kao fiziološki aktivni sastojci hrane ili proizvoda koji potječu iz biljnih i životinjskih izvora, a pokazali su da imaju ulogu u prevenciji bolesti i očuvanju zdravlja. Biološki aktivne komponente hrane uključuju i one sastojke koji su potrebni za zadovoljavanje osnovnih ljudskih prehrambenih potreba, a neki od tih sastojaka su vitamini, minerali, razni pigmenti, polifenolni spojevi, flavonoidi, fitosteroli, enzimi, alkaloidi, prehrambena vlakna i drugi. Sve biološke aktivne komponente razlikuju se po kemijskoj strukturi i njihovoj funkciji u organizmu te mogu povoljno utjecati na zdravlje, djelujući na različite sustave u organizmu poput gastrointestinalnog, krvožilnog, endokrinog, živčanog, imunološkog sustava i drugih (Kris-Etherton i sur., 2002). Ovi sastojci mogu biti nutritivnog i nenuitritivnog karaktera. Nutritivni sastojci imaju kalorijsku vrijednost i to su ugljikohidrati, masne kiseline, aminokiseline, vitamini i minerali. Nenuitritivni sastojci nemaju nutritivnu vrijednost, ali su svejedno bitni za zdravlje organizma. Takvi sastojci su npr. polifenoli, flavonoidi, klorofil, alkaloidi, steroli i drugi (Crowe i Francis, 2013).

Najučinkovitiji način osiguravanja dostatnog unosa ovih spojeva je konzumiranje raznolike i uravnotežene prehrane, te svakodnevno konzumiranje barem pet serviranja voća i povrća. Na taj način se osigurava unos hranjivih sastojaka važnih za normalno funkcioniranje organizma (vlakna, vitamini, minerali, esencijalne masne kiseline) (Tiwari i sur., 2013).

Prema podrijetlu, biološki aktivne komponente mogu biti: biljnog (karotenoidi, fenoli, flavonoidi, glikozidi, alkaloidi, saponini), animalnog (kolostrum, probiotici, proteini sirutke), mineralnog podrijetla (kalcij, magnezij, jod) i iz mikroorganizama (funkcionalne mikrobne kulture). Vrlo su različitog kemijskog sastava, a najčešće su to sekundarni biljni metaboliti (Tringalli, 2004).

Zahvaljujući raznolikosti biljnog svijeta, identificiran je velik broj biološki aktivnih komponenata koje mogu biti primarni ili sekundarni biljni metaboliti (Kris-Etherton i sur., 2002). Trenutno je otkriveno oko 100 000 različitih biološki aktivnih spojeva biljaka, a ta brojka konstantno raste (Ribera i Zuniga, 2012). U primarne metabolite biljaka spadaju šećeri, masne kiseline, aminokiseline i nukleinske kiseline i oni omogućavaju biljkama osnovne funkcije za život te su prisutni u svim biljkama. Sekundarni biljni metaboliti su spojevi koji se sintetiziraju u biljkama i sudjeluju u interakciji biljke s okolinom. Dugo se za njih smatralo da nisu neophodni za život biljke, no, novija istraživanja pokazuju da su sekundarni biljni metaboliti esencijalni za rast i razvoj biljke, posebice za prilagodbu i preživljavanje u nepovoljnim uvjetima (Kliebenstein i Osbourn, 2012). Sekundarni biljni

metaboliti nemaju samo važnu ulogu za biljke, nego i za čovjeka, budući da povoljno utječu na zdravlje organizma pa se stoga ubrajaju u biološki aktivne komponente.

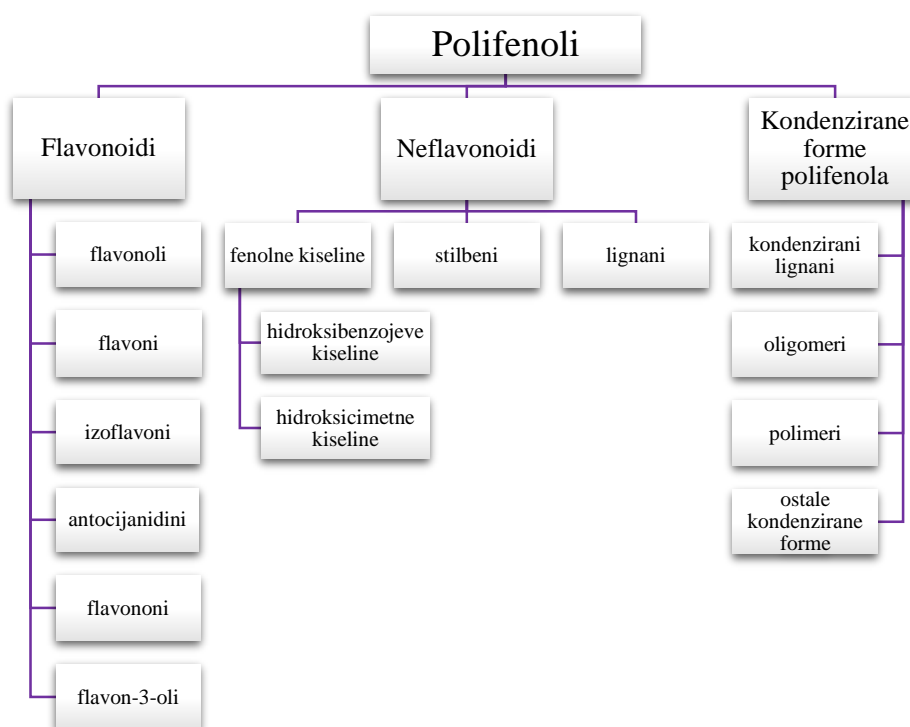
Sekundarni biljni metaboliti mogu se podijeliti u tri skupine (Crozier i sur. 2006):



Spojevi iz skupine polifenola se nalaze u svim biljkama, dok su neki spojevi, poput alkaloida specifični samo za pojedine vrste i u određenim uvjetima (Kliebenstein i Osbourn, 2012).

3.3.1. Polifenolni spojevi

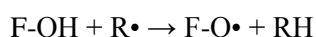
Polifenolni spojevi čine skupinu sekundarnih biljnih metabolita koji doprinose nutritivnoj i senzorskoj kvaliteti voća, povrća i drugih biljnih vrsta. Ovi spojevi posjeduju aromatski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina i čija struktura varira od onih jednostavnijih (fenolne kiseline, fenilpropanoidi, flavonoidi) do visoko polimeriziranih molekula (lignini, melanini, tanini) (Balasundram i sur., 2006). U literaturi postoje brojni načini klasifikacije ovih spojeva, a na slici 7 je prikazan jedan od njih.



Slika 7. Podjela polifenola (Fuss i sur., 2003; Chong i sur., 2009; Stalikas, 2010).

Polifenoli su nosioci senzorskih svojstava namirnica, kao što su okus i boja, djeluju kao konzervansi prehrambenih proizvoda (Valenzuela et al., 1992) te imaju brojne industrijske primjene (bojila, aditivi u hrani, sirovine u proizvodnji boja, papira i kozmetičkih proizvoda). Brojni polifenolni spojevi su pigmenti, odnosno nosioci boje namirnica. Tako su antocijanidini odgovorni za crvenu, plavu i ljubičastu boju mnogih namirnica, flavoni, flavonoli, flavononi za zelenu, bijelu, žutu i narančastu boju. Visok udjel polifenolnih spojeva, posebice visokomolekularnih polimeriziranih polifenola povezuje se s izraženom gorčinom i trpkooćom nekih učestalo konzumiranih proizvoda (kava, čaj, kakao) (Safi i sur., 2003).

Polifenolni spojevi najpoznatiji su zbog svojih iznimnih antioksidacijskih svojstava, zahvaljujući kojima pomažu u prevenciji mnogih patoloških poremećaja u organizmu, kao što su ateroskleroza, disfunkcija moždanog tkiva i kancerogena stanja (Gordon, 1996; Rodrigez i sur., 2009). Polifenoli reagiraju kao antioksidansi zahvaljujući sposobnosti prelaska u fenoksil– radikale otpuštajući vodikov atom, koji se veže na slobodne radikale:



Osim sposobnosti sparivanja elektrona slobodnih radikala, polifenolne spojeve karakterizira i sposobnost vezanja iona prijelaznih metala (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+}) te aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza.

3.3.2. Biološki aktivne komponente u sekundarnim biljnim sirovinama

Tablica 2. Biološki aktivni spojevi identificirani u sekundarnim biljnim sirovinama







Sekundarne biljne sirovine	Biološki aktivni spojevi	Literatura
Pulpa šećerne repe	- ferulinska kiselina, <i>p</i> -kumarinska kiselina, vanilinska kiselina, <i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina i <i>p</i> -hidroksibenzaldehidna kiselina	Sun i Hughes, 1998
Ljuska oraha	- flavan-3-oli, proantocijanini, klorogenska, kava, ferulinska, galna, elaginska, protokatehinska, vanilinska, katehinska, epikatehinska kiseline	Oliveira i sur., 2008
Kakaova ljuska	- otkriveno je da kakaova ljuska sadrži brojne polifenolne spojeve, ali nije detaljno istraženo koji su to spojevi	Vriesmann i sur., 2011
Ljuska crvenog luka	- flavonoidi, posebice antocijani i flavonoli (najznačajniji kvercetin) - spojevi sa sumporom: <i>s</i> -alkil cistein sulfoksidi, a dominiraju 1-propenil derivati, propenatinal S-oksid (cikloalilin)	Benitez i sur., 2011; Crozier i sur., 2006
Kora krumpira	- fenolne kiseline: klorogenska, galna, protokatehinska, ferulinska, kumarinska, vanilinska i kava kiselina - fitoaleksini i glikoalkaloidi	Friedman, 1997; Nara i sur., 2006; Rodriguez de Sotillo i sur., 1994
Mahuna graška	- budući da se u grašku nalaze brojni polifenolni spojevi poput protokatehinske, <i>p</i> -hidroksibenzojeve, vanilinske i kumarinske kiseline, očekuje se prisustvo nekih od tih spojeva i u mahuni graška	Lopez-Amaros i sur., 2006



4. MATERI JAL I METODE

4.1. Materijal

4.1.1. Uzorci sekundarnih biljnih sirovina

Naziv sirovine	Načini dobivanja sekundarnih biljnih sirovina i oznake
 <p>Šećerna repa (<i>Beta vulgaris</i> L.).</p>	Pulpa šećerne repe je dopremljena u osušenom briketranom obliku iz tvornice šećera Viro PŠR
 <p>Orah (<i>Juglans regia</i> L.).</p>	Ljuska oraha dobivena je primarnom obradom sirovine LjO
 <p>Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.).</p>	Kakaova ljuska dobivena je iz prehrambene industrije Zvečevo KLj
 <p>Crveni luk (<i>Allium cepa</i> L.).</p>	Kora crvenog luka dobivena je primarnom obradom sirovine LjCL
 <p>Krumpir (<i>Solanum tuberosum</i> L.).</p>	Kora krumpira dobivena je primarnom obradom sirovine KK
 <p>Grašak (<i>Pisum sativum</i> L.).</p>	Mahuna graška dobivena je primarnom obradom sirovine MG

Slika 8. Prikaz primarnih sirovina i načina dobivanja sekundarnih biljnih sirovina te njihove oznake

4.1.2. Kemikalije

Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke (p.a.) ili HPLC čišće.

Određivanje udjela suhe tvari:

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

Određivanje udjela masti:

- Petroleter, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela proteina:

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

Priprema vodenih i etanolnih ekstrakata:

- Etanol (96%-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Destilirana voda

Određivanje udjela netopljivih i topljivih vlakana:

- Aceton, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Celite 545, Fisher Scientific (Loughborough, Velika Britanija)
- Enzimski set za određivanje vlakana, Megazyme International Ireland (Wicklow, Irska)
- Etanol (96 %-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kalcijev klorid, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Maleinska kiselina, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)
- Natrijev hidroksid, T. T. T. d.o.o (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Octena kiselina (glacial), Alkaloid Skopje (Skoplje, Makedonija)
- Trizma Base, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

Određivanje udjela slobodnih ugljikohidrata:

- Acetonitril, J. T. Baker (Deventer, Nizozemska)
- Redestilirana voda (HPLC čistoće)
- Standardi:
 - glukoza monohidrat, fruktoza, saharoza; Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

Određivanje sastava polisaharida:

- 1-propanol, Merck (SAD)
- Acetonitril, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)
- Anilin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)
- Difenilamin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)
- Etil-acetat, Merck (SAD)
- Fosfatna kiselina, Merck (SAD)
- Kalcijev karbonat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev dihidrogenfosfat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)
- Natrijev hidroksid, T. T. T. d.o.o (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Sumporna kiselina (96 %-tna), Carlo Erba Reagents (Barcelona, Španjolska)
- Standardi:
 - glukoza monohidrat, galaktoza, galakturonska kiselina, arabinoza, ksiloza, manoz; Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

Određivanje udjela ukupnih polifenola, ne flavonoida i flavonoida:

- Etanol (96%-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Formaldehid (35%-tni), Alkaloid, AD (Skopje, Makedonija)
- Klorovodična kiselina (37%-tna), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Standard:
 - Galna kiselina, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

HPLC analiza pojedinačnih bioaktivnih spojeva:

- Acetonitril, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)
- Mravlja kiselina, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Redestilirana voda (HPLC kvaliteta vode)
- Standardi:
 - kava kiselina, klorogenska kiselina, ferulinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, elaginska kiselina, galna kiselina, protokatehinska kiselina, vanilinska kiselina, apigenin, kvercetin, rutin, luteolin, kafein, teobromin; Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta:

ABTS metoda

- 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)
- Etanol (96%-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev peroksodisulfat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

DPPH metoda

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)
- Metanol, J. T. Baker (Deventer, Nizozemska)
- Standardi:
 - 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

4.1.3. Aparatura i pribor

Priprema sekundarnih biljnih sirovina:

- Kuglični mlin - Retsch Mixer Mill MM 301, Retsch GmbH (Haan, Germany)
- Laboratorijski sušionik (Tehtnica Železniki, Slovenija)
- Mastersizer 2000 s jedinicom za doziranje i disperziju praškastih uzoraka, Scirocco 2000, Malvern Instruments Ltd (Worcestershire, Velika Britanija)
- Sito poroziteta 450 μm

Određivanje udjela osnovnih nutrijenata:

Suha tvar

- Aluminijske posudice s poklopcima, termometar, eksikator
- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Švicarska)
- Laboratorijski sušionik (Tehtnica Železniki, Slovenija)

Masti

- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Švicarska)
- Aparatura po Soxhletu
- Celulozne čahure za ekstrakciju, eksikator
- Laboratorijski sušionik (Tehtnica Železniki, Slovenija)
- Rotacijski vakuum uparivač (R-205) s pripadajućom vodenom kupelji (B-490), Büchi New Castle, DE, SAD)

Proteini

- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Švicarska)
- Erlenmeyer tikvice (250 mL), staklena bireta (50 mL), vodena vakuum sisaljka, 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, (Tehtnica Železniki, Slovenija)
- Termoblok za digestiju uzoraka s odgovarajućim nastavkom za odsis para, Digestion system 6, 1007 Digester, Tecator (Hillerød, Danska)

Mineralni ostatak

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

Priprema vodenih i etanolnih ekstrakata:

- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Švicarska)
- Aparatura po Soxhletu
- Celulozne čahure za ekstrakciju, vodena vakuum sisaljka, tikvice za uparavanje, odmjerne tikvice (200 mL i 25 mL), staklene čaše, lijevci, kapaljke, stakleni štapići, termometri
- Rotacijski vakuum uparivač (R-205) s pripadajućom vodenom kupelji (B-490), Büchi (New Castle, DE, SAD)

Određivanje sastava ugljikohidratne frakcije:

Određivanje netopljivih i topljivih vlakana

- Automatska pipeta od 20-200 µL, Gilson (SAD)
- Laboratorijska tresilica Certomat RM, Sartorius (Göttingen, Njemačka)
- Laboratorijske boce s čepovima (250 mL, 500 mL), Duran (Wertheim/main, Njemačka)
- Laboratorijski sušionik (Tehtnica Železniki, Slovenija)
- Sinter lončići (porozitet 2) za filtraciju, Duran (Wertheim/main, Njemačka)
- Staklene pipete, laboratorijske čaše, menzure, špatule, eksikator
- Vodena kupelj s tresilicom, boce za vakuum odsisavanje, vodena vakuum sisaljka

Određivanje slobodnih ugljikohidrata

Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC)

Priprema uzoraka i mobilne faze

- Celuloza-acetat mikrofilteri veličine pora 0,45 µm i 0,2 µm, Macherey-Nagel (Njemačka)
- HPLC viala s pripadajućim navojnim čepovima sa septom, Agilent Technologies (SAD)
- Ultrazvučna kupelj, Transsonic 460 (Elma, Njemačka)

Priprema standarada

- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Švicarska)
- Automatska mikropipeta od 100-1000 µL, Gilson (SAD)
- Odmjerne tikvice (10 mL)

Instrument

- HPLC kolona Phenomenex Luna NH₂ (4,6x250 mm; 5 µm), Phenomenex (SAD)
- HPLC-RID sustav Agilent 1200 Series (tekućinski kromatograf visoke učinkovitosti s RI („Refractive Index“) detekcijom, Agilent Technologies (SAD)

Određivanje sastava polisaharida

Priprema hidrolizata

- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Švicarska)
- Laboratorijske boce (100 mL), Duran (Wertheim/Main, Njemačka)
- Staklene epruvete, staklene pipete (5 mL, 10 mL), menzure (100 mL), laboratorijske čaše (50 mL), termometar
- Vertikalni autoklav s dvostrukom stijenkom (Sterilizator vodenom parom), INKO Lab (Zagreb, Hrvatska)
- Vodena kupelj, Tehnica Železniki (Slovenija)
- Vortex EV-102, Tehnica Železniki (Slovenija)

Određivanje ostatka netopljivog u kiselinu

- Sinter lončići (porozitet 2) za filtraciju, Duran (Wertheim/main, Njemačka)
- Vodena vakuum sisaljka, boce za vakuum odsisavanje, plastično posuđe za čuvanje uzoraka, staklene menzure (100 mL), staklene pipete

Određivanje monosaharida u hidrolizatima

Priprema uzoraka

- Celuloza-acetat mikrofilteri veličine pora 0,20 µm (CA-20/25), Macherey-Nagel (Njemačka)
- Centrifuga LC-321, (Tehnica Železniki, Slovenija)
- pH metar s elektrodom, Mettler-Toledo (Švicarska)
- Plastične kivete s čepovima za centrifugiranje, magnetska mješalica, plastično posuđe za čuvanje uzoraka

Tankoslojna kromatografija visoke učinkovitosti (HPTLC)

- Denzitometar, TLC Scanner 3, Camag (Švicarska)
- Grijaća ploča, TLC Plate Heater, Camag (Švicarska)
- HPTLC ploče 20x10 cm, Silica gel 60, Merck (Njemačka)
- Kade za ascendentno razvijanje (20x10 cm, s pregradom), Camag (Švicarska)
- Mikroinjekcija 100 µL, Hamiltom (Švicarska)
- pH-metar s elektrodom, Mettler-Toledo (Švicarska)
- Poluautomatski sustav za nanošenje uzoraka na ploče, Linomat 5, Camag (Švicarska)
- Staklene pipete, menzura (25 mL), tikvice s čepovima (200 mL)
- Uređaj za derivatizaciju ploča s pripadajućom kadom (20x10 cm), Chromatogram Immersion Device III, Camag (Švicarska)
- Uređaj za foto-dokumentaciju (DigiStore, digitalna kamera), Camag (Švicarska)

Određivanje sastava i udjela biološki aktivnih spojeva te antioksidacijskog kapaciteta:

Spektrofotometrijski

- Automatske mikropipete od 100-1000 µL i 20-200 µL, Gilson (SAD)
- Celuloza-acetat mikrofilteri veličine pora 0,45 µm (CA-45/25), Macherey-Nagel (Njemačka)
- Kivete od optičkog stakla (10 mm) za spektrofotometrijska mjerenja, odmjerne tikvice od 10 mL, staklene pipete od 5 mL i 10 mL
- Spektrofotometar Genesys 10s UV-Vis, Thermo Scientific (SAD)

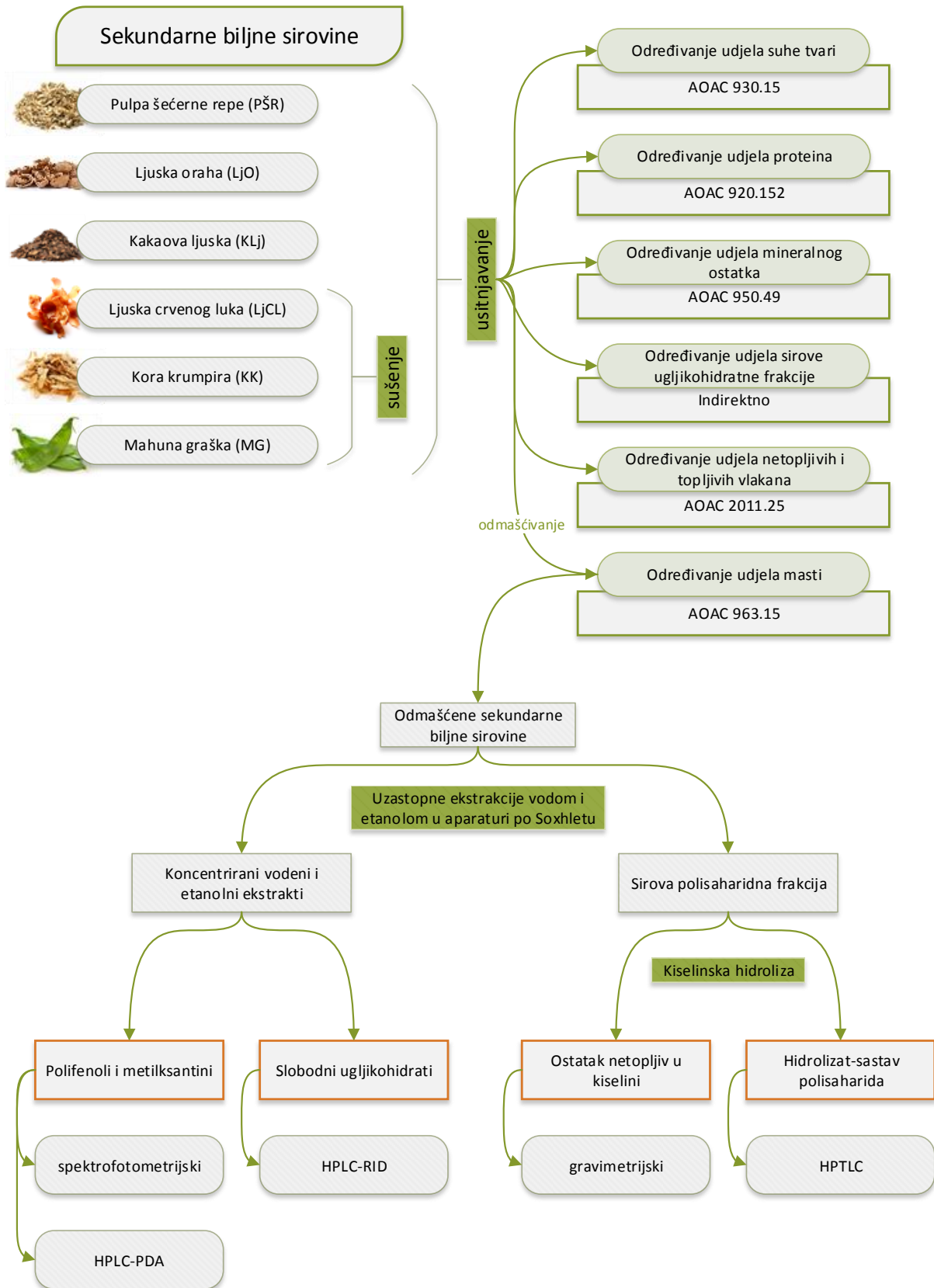
Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC)

Priprema uzoraka, mobilne faze i standarada (v. odjeljak „Određivanje sastava ugljikohidratne frakcije - Određivanje slobodnih ugljikohidrata“)

Instrument

- HPLC kolona InertSustain C-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), GL Sciences (Japan)
- HPLC-PDA sustav Agilent 1200 Series (tekućinski kromatograf visoke učinkovitosti s PDA („Photo Diode Array“) detekcijom, Agilent Technologies (USA)

4.2. Metode rada



Slika 9. Shematski prikaz provedbe znanstvenog istraživanja

4.2.1. Priprema uzoraka sekundarnih biljnih sirovina za analize

Sve sirovine su usitnjene i prosijane kroz sito poroziteta 450 µm. Tako pripremljenim sirovinama izmjereni su fizikalno-kemijski parametri udjela suhe tvari i raspodjele veličine čestica. Udjel suhe tvari određen je standardnom metodom sušenja na 105 °C do konstantne mase, dok je analiza raspodjele veličine čestica napravljena pomoću Mastersizer 2000 analizatora.

4.2.2. Određivanje udjela suhe tvari sekundarnih biljnih sirovina

Udjel suhe tvari određuje se prema modificiranoj AOAC 930.15 (1990b) metodi.

Princip metode:

Ovim postupkom mjeri se masa suhe tvari nakon sušenja do konstantne mase budući da na temperaturi sušenja od 105 °C dolazi do izdvajanja slobodne vlage iz uzorka. Udjel suhe tvari izračunava se obzirom na početnu masu uzorka koji se suši.

Postupak rada:

Odvaž se 1 g (s točnošću ± 0,0001) dobro homogeniziranog uzorka u prethodno osušenu (do konstantne mase pri 105 °C), ohlađenu i izvaganu aluminijsku posudicu s poklopcem. Nepokrivena posudica s uzorkom i poklopac suše se 1 sat u sušioniku pri 105 °C (period sušenja počinje od trenutka kad je u sušnici postignuta temperatura točno 105 °C). Nakon isteka vremena sušenja, aluminijska posudica s uzorkom pokrije se poklopcem dok je još u sušioniku, prebaci u eksikator i važe čim se ohladi na sobnu temperaturu. Postupak se ponavlja dok se ne postigne konstantna masa uzorka u posudici (s točnošću ± 0,0003g). Ostatak uzorka predstavlja suhu tvar, a gubitak u masi, udjel vode u uzorku.

Izračun rezultata:

Postotak vlage izračuna se prema formuli (1), dok se % suhe tvari izračuna iz razlike do ukupnog udjela od 100% (2).

$$\% \text{ vode} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad (1)$$

gdje je : m_1 - masa prazne aluminijske posudice (g)
 m_2 - masa aluminijske posudice s uzorkom prije sušenja (g)
 m_3 - masa aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

$$\% \text{ suhe tvar} = 100 - \% \text{ vode} \quad (2)$$

4.2.3. Određivanje udjela masti u sekundarnim biljnim sirovinama

Udjela masti određuje se prema modificiranoj AOAC 963.15 (2012) metodi.

Princip metode:

Višekratna kontinuirana ekstrakcija masti organskim otapalom u aparaturi po Soxhlet-u. Prilikom ekstrakcije u tikvici se izdvaja lipidna frakcija te se iz razlike mase prazne tikvice i tikvice s lipidnom frakcijom izračuna masa ekstrahirane masti.

Postupak rada:

Odvaže se 5 g osušenog i usitnjenog uzorka u celulozne čahure koje se začepe na vrhu suhom vatom te se postave uspravno u Soxhlet ekstraktor. U ekstraktor se pomoću lijevka ulijeva otapalo u volumenu 2 ekstraktora (volumen ekstraktora je volumen otapala potreban da se prelije otapalo iz ekstraktora u tikvicu preko preljevne cijevi). Tikvica s kuglicama za vrenje i ekstraktorom se spoji na hladilo i započne se sa zagrijavanjem. Ekstrakcija traje 6 sati uz brzinu ekstrakcije od 10-12 sifona po satu (jedan sifon je oznaka za jednu izmjenu otapala iz ekstraktora u tikvicu preko preljevne cijevi), nakon čega se tikvica s otapalom i ekstrahiranom masti odvoji od ostatka aparature. Otapalo iz tikvice se otpari na rotacijskom vakuum uparivaču, a tikvica s ekstrahiranom masti suši se do konstantne mase pri 105 °C te se hladi i čuva u eksikatoru. Čahura s uzorkom se suši u sušioniku kako bi se otparilo zaostalo otapalo te se čuva u eksikatoru za daljnje analize.

Izračun rezultata:

Masa ekstrahirane masti izračuna se iz razlike konstantnih masa tikvice s ekstrahiranom masti i prazne tikvice s kuglicama za vrenje (3), dok se udjel računa obzirom na masu početnog uzorka (ili suhe tvari) korištenog za ekstrakciju.

$$\%masti = \frac{b-a}{m} \times 100 \quad (3)$$

gdje je: a – masa prazne tikvice (g)
b – masa tikvice i ekstrahirane masti (g)
m – masa uzorka (g)

Određivanje udjela masti ekstrakcijom po Soxhletu provedeno je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao maseni udjel u suhoj tvari početnog uzorka (mg/g s. tv.) i prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom. Obrada rezultata napravljena je pomoću programa Microsoft Office Excel 2013.

4.2.4. Određivanje udjela proteina u sekundarnim biljnim sirovinama

Udjel proteina određuje se prema AOAC 920.152 (1995) metodi (metoda po Kjeldahl-u (poluautomatski)).

Princip metode:

Organski dušik iz uzorka se prevede u amonijak putem mineralizacije u koncentriranoj sulfatnoj kiselini pri povišenoj temperaturi i uz prisustvo katalizatora, te alkalizacijom nastale amonijeve soli. Oslobođeni amonijak se destilira u otopinu borne kiseline pri čemu otopina postaje bazična (indikator mijenja boju), dok se u krajnjem koraku titrimetrijski odredi količina oslobođenog dušika preko volumena utrošene klorovodične kiseline.

Postupak rada:

Mineralizacija

U Kjeldahl kivete za digestiju odvagane se po 2 g uzorka (ako je uzorak u tekućem stanju tada se pipetira i rezultat izražava na volumen). U svaku kivetu se doda 5g tabletiranog katalizatora (Kjeldahl tablete) i 12 mL koncentrirane sulfatne kiseline (dodaje se 15 mL koncentrirane H₂SO₄ ako uzorak sadrži masti u količini iznad 10 %) te se lagano miješa dok se uzorak potpuno navlaži s kiselinom (može se ostaviti preko noći, kako bi se spriječilo pjenjenje uzorka). Po završetku reakcije, stalak s epruvetama stavi se u digestijsku jedinicu za mineralizaciju i nastavi se sustav za odvod para (vakuum). Temperaturu bloka za digestiju treba postupno povisivati kako ne bi došlo do naglog pjenjenja i eventualnog gubitka uzorka u nastavku za odvod para. Mineralizacija je gotova kada tekućina u kivetama postane bistra i

svijetlozelene boje, a stijenke kiveta su potpuno čiste. Epruvete se zajedno sa stalkom uklone iz digestijske jedinice i ostave hladiti zajedno s poklopcem do sobne temperature. Tada se u svaku epruvetu oprezno doda 80 mL destilirane vode.

Alkalizacija i destilacija

Na početku prve destilacije potrebno je izvršiti ispiranje tako da se u cijev stavi oko 100 mL destilirane vode i predestilira u Erlenmeyerovu tikvicu. Nakon toga u Kjeltec sustav stavlja se kiveta s mineraliziranim razrijeđenim uzorkom. Prihvat amonijaka nakon destilacije vrši se u Erlenmeyerovoj tikvici u kojoj se nalazi 25 mL 4% borne kiseline s indikatorom. Spuste se zaštitna vrata i pritisne se gumb za dodavanje lužine. Lužina se dozira u pet obroka po 10 mL, a destilacija se odvija automatski 4 minute. Obzirom na prisutnost amonijaka, destilat s vremenom poprima zelenu boju (ako se amonijak otapa, otopina borne kiseline postaje lužnata te indikator, inicijalno roze boje, mijenja boju u zelenu).

Titracija kloridnom kiselinom

Napuni se bireta s 0,1 M HCl-om (volumetrijski standard) i titrira sadržaj tikvice nakon destilacije u Kjeltec sustavu. U završnoj točki titracije boja otopine postane blijedo ružičasta. Zapiše se utrošak kloridne kiseline za titraciju uzorka.

Izračunavanje rezultata:

Utrošak kloridne kiseline za titraciju uzorka i titraciju slijepa probe preračunava se na udjel oslobođenog dušika u uzorku (4), a potom se udjel dušika u uzorku putem prikladnih korekcijskih faktora preračunava na udjel proteina u uzorku (5). Korekcijski faktori mogu se razlikovati ovisno o uzorcima i prisutnosti neproteinskog dušika u istima.

$$\% N = \frac{\{(a-b) \times c_{kis} \times f_{kis} \times 1,4007\}}{m_{uzorka}} \quad (4)$$

gdje je:

- a = volumen HCl-a utrošen za titraciju uzorka (mL)
- b = volumen HCl-a utrošen za titraciju slijepa probe (mL)
- c = molaritet kiseline (mol/L)
- f = faktor kiseline
- m = masa uzorka (g)

$$\% \textit{ proteina} = \% N \times F \quad (5)$$

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

Određivanje udjela proteina metodom po Kjeldahlu provedeno je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao maseni udjel u suhoj tvari početnog uzorka (mg/g s. tv.) i prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom. Obrada rezultata napravljena je pomoću programa Microsoft Office Excel 2013.

4.2.5. Određivanje udjela mineralnog ostatka (pepela) u sekundarnim biljnim sirovinama

Udjel mineralnog ostatka (pepela) određuje se prema AOAC 950.49 (1997) metodi.

Princip metode:

Suha mineralizacija pomoću visoke temperature, pri čemu od početnog uzorka zaostaje samo anorganska komponenta u obliku pepela koji se kvantificira gravimetrijski.

Postupak rada:

Odvažuje se 5 g (s točnošću $\pm 0,0001$) dobro homogeniziranog uzorka u porculansku zdjelicu (prethodno izarenu, ohlađenu u eksikatoru i izvaganu) te se lagano zagrijava na plameniku dok potpuno ne poughljeni, odnosno dok se uzorak prestane dimiti. Zdjelica s karboniziranim uzorkom se stavi u mufolnu peć zagrijanu pri 550 °C i ostavi spaljivati dok se ne postigne jednolično svijetlo sivi pepeo bez crnih čestica uz praćenje postizanja konstantne mase. Nakon završene mineralizacije, porculanska zdjelica s mineralnim ostatkom se ohladi u eksikatoru i važe čim postigne sobnu temperaturu (oko 30 minuta).

Izračun rezultata:

$$\% \textit{ pepela} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100 \quad (6)$$

gdje je: m_1 – masa prazne porculanske zdjelice (g)
 m_2 – masa porculanske zdjelice i uzorka prije spaljivanja (g)
 m_3 – masa porculanske zdjelice i pepela (g)

Određivanje udjela mineralnog ostatka provedeno je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao maseni udjel u suhoj tvari početnog uzorka (mg/g s. tv.) i prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom. Obrada rezultata napravljena je pomoću programa Microsoft Office Excel 2013.

4.2.6. Određivanje udjela sirove ugljikohidratne frakcije

Definiranje osnovnog kemijskog sastava sekundarnih sirovina biljnoga podrijetla uključuje određivanje udjela 4 skupine osnovnih nutrijenata: udjel masti, proteina, mineralnog ostatka i ugljikohidrata. Prve 3 skupine (masti, proteini i mineralni ostatak) određene su prema gore opisanim metodama, dok je udjel ugljikohidratne frakcije izračunat kao razlika ukupnog zbroja udjela svih komponenata do 100%. Ova veličina također je izražena kao maseni udjel (mg/g s. tv.) na suhu tvar početnog uzorka (sekundarne sirovine). Obzirom da se radi o procjeni udjela ugljikohidrata, koji može sadržavati i druge neugljikohidratne komponente, za ovu skupinu nutrijenata korišten je naziv „sirova ugljikohidratna frakcija“. Daljnim analizama, za istu su dobiveni dodatni podaci o sastavu.

4.2.7. Priprema vodenih i etanolnih ekstrakata

4.2.7.1. Soxhlet ekstrakcija

Ekstrakti sekundarnih sirovina pripremljeni su uzastopnim ekstrakcijama vodom i etanolom iz prethodno odmašćenih uzoraka. Ekstrakcije su provedene prema protokolu kako su opisali Sluiter i sur. (2008), uz manje izmjene, a provode se u svrhu uklanjanja slobodnih ugljikohidrata i ostalih polarnih komponenata, odnosno pripreme uzorka za analizu sastava polisaharida pomoću kiseline hidrolize.

Ekstrakcija vodom provedena je u aparaturi po Soxhletu, postupkom kako je opisan u nastavku. U celulozne čahure za ekstrakciju odvaži se 2,5 g i odmašćenog uzorka, začepi komadićem vate, te se one uspravno postave u ekstraktore. Otapalo (190 mL destilirane vode) se ulije u Soxhlet tikvice koje se zajedno s ekstraktorom pričvrste na vodeno hladilo i zatim se uključi grijač (pješčana kupelj). Ekstrakcija traje 6 h, brzinom 1-1,5 sifona po satu (jedan sifon predstavlja jednu izmjenu otapala iz ekstraktora u tikvicu putem preljevne cijevi), a vrijeme se mjeri od trenutka kada se počnu nakupljati prve kapi otapala na dnu ekstraktora. Po završetku ekstrakcije, tikvice s ekstraktom odvajaju se od ostatka aparature, a ocijeđene čahure se stavljaju sušiti u sušionik na 60 °C. Ohlađeni vodeni ekstrakt (na sobnu temperaturu) se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 200 mL i nadopuni do oznake s

destiliranom vodom. Tako pripremljeni ekstrakt upari se do volumena od 25 mL pomoću rotacijskog vakuum uparivača na temperaturi od 60 °C i kao takav se koristi za daljnje analize.

Osušene čahure s ekstrahiranim uzorkom postavljaju se za drugu ekstrakciju s etanolom prema istom postupku. Ekstrakcija traje 6 h brzinom 4-6 sifona po satu, a dobiveni etanolni ekstrakti se također uparavaju do 25 mL. Obzirom da je primijećena pojava zamućenja u koncentriranim ekstraktima (koja vjerojatno potječe od mikroskopskih čestica uzoraka sekundarnih sirovina koje su prošle kroz celuloznu čahuru prilikom Soxhlet ekstrakcija), dobiveni koncentrirani ekstrakti su profiltrirani kroz celuloza-acetat mikrofiltere (0,45 µm) prije daljnjih spektrofotometrijskih i HPLC analiza.

Ovako pripremljeni ekstrakti korišteni su za daljnje analize:

- određivanje udjela slobodnih ugljikohidrata,
- određivanje udjela ukupnih polifenola,
- određivanje udjela ukupnih ne flavonoida i ukupnih flavonoida,
- određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS i DPPH metodom
- HPLC analize pojedinačnih polifenola i metilksantina

U svim ekstraktima određen je također i udjel suhe tvari, a taj podatak je korišten za izračun udjela ukupne ekstraktibilne tvari. Vodene i etanolne ekstrakcije napravljene su u duplikatu, kao i analize suhe tvari, a rezultati udjela ukupne ekstraktibilne tvari izraženi su kao maseni udjel (mg/g s. tv.) u suhoj tvari početnog uzorka te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom. Obrada rezultata napravljena je pomoću programa Microsoft Office Excel 2013.

4.2.7.2. Konvencionalna ekstrakcija

Osim Soxhlet ekstrakcije (4.2.7.1.), za pripremu ekstrakata za određivanje udjela polifenola i antioksidacijskog kapaciteta primijenjena je i „tzv“ konvencionalna ekstrakcija (Hurs, 2008) prema slijedećem:

Izvaže se 2 g uzorka u laboratorijsku čašu od 100 mL i doda 50 mL destilirane vode. Ekstrakcija se provodi zagrijavanjem uzorka u otapalu pri temperaturi od 80 °C uz konstantno miješanje kroz 30 minuta. Nakon završene ekstrakcije otopina se ohladi, a dobiveni ekstrakti se filtriraju kroz Whatman No4 filter papir kako bi se uklonile veće čestice, nakon čega se dodatno filtriraju kroz mikrofiltere veličine pora 0,45 µm u svrhu uklanjanja fino dispergiranih čestica.

Ovako pripremljeni ekstrakti korišteni su za daljnje analize:

- određivanje udjela ukupnih polifenola,
- određivanje udjela ukupnih neflavonoida i ukupnih flavonoida,
- određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS i DPPH metodom
- HPLC analize pojedinačnih polifenola i metilksantina

4.2.8. Karakterizacija sirove ugljikohidratne frakcije

4.2.8.1. Određivanje udjela vlakana u sekundarnim biljnim siovinama

Udjel netopljivih i topljivih vlakana provodi se integriranom enzimsko-gravimetrijskom metodom (AOAC 2011.25 (2012)).

Princip metode:

Enzimska hidroliza biljnog materijala provodi se termostabilnom alfa-amilazom, proteazom i amiloglukozidazom pri definiranim uvjetima. Udjel netopljivih vlakana velike molekulske mase određuje se gravimetrijski nakon filtracije istih. Topljiva vlakna izdvajaju se taloženjem etanolom iz dobivenog filtrata te se također kvantificiraju gravimetrijski nakon filtracije.

Postupak rada:

Enzimska hidroliza uzorka:

Odvaž se $1\text{g} \pm 0,005\text{ g}$ usitnjenog uzorka u laboratorijske boce (250 ml). Uzorak se navlaži s 1 mL etanola (95 %-tni), doda se 40 mL maleatnog pufera (pH 6,0) koji sadrži pankreasnu α -amilazu i amiloglukozidazu. Uzorci se inkubiraju na tresilici pri 37 °C tijekom 16 h, pri brzini okretaja 150 rpm. Enzimska reakcija se zaustavlja dodatkom 3,0 mL 0,75 M trizma bazične otopine (konačni pH ~ 8,2) te zagrijavanjem sadržaja boca u vodenoj kupelji na 95-100 °C kroz 20 minuta. Sadržaj boca se ohladi na 60 °C i potom se doda. 100 μL otopine proteaze. Sadržaj se inkubira na 60 °C tijekom 30 minuta, uz trešnju. Boce se izvade iz kupelji, a enzimska reakcija se zaustavlja odmah dodavanjem 4,0 mL 2M octene kiseline (konačni pH ~ 4,3).

4.2.8.1.1. Određivanje netopljivih vlakana

Sadržaj boce nakon uzastopnih enzimskih hidroliza filtrira se pomoću vakuuma na sinter lončićima (lončići moraju biti prethodno dobro oprani, izareni, ohlađeni i izvagani). Kao pomoćno

filtracijsko sredstvo koristi se Celite koji se nanosi u ravnomjernom sloju na filtracijsku površinu lončića. Budući da talog na sinter lončićima predstavlja netopljiva vlakna, vrlo je važno kvalitativno prenijeti sav sadržaj boce na filter, što se čini pomoću tople vode zagrijane na 60 °C (ukupno 20 mL). Sakupljeni filtrat nadopuni se do volumena od 70 mL i sačuva za određivanje topljivih vlakana. Ostatak na lončiću ispere se s dvije porcije od 15 mL slijedećeg: 78 %-tni etanol, 95 %-tni etanol i aceton; filtrat od ispiranja se baca. Lončići s talogom suše se na 105 °C preko noći prekriveni alu-folijom, nakon čega se hlade i čuvaju (do vaganja) u eksikatoru.

4.2.8.1.2. Određivanje topljivih vlakana

Za određivanje topljivih vlakana potrebno je zagrijati sakupljeni filtrat (70 mL, iz prethodne analize) na 60 °C te dodati četverostruki volumen (280 mL, volumen izmjeren na sobnoj temperaturi) 95 %-tnog etanola zagrijanog na 60 °C i dobro promiješati. Otopina se ostavi stajati na sobnoj temperaturi 60 minuta, nakon čega se istaložena topljiva vlakna filtriraju pomoću vakuuma na sinter lončićima s pomoćnim filtracijskim sredstvom (kao za netopljiva vlakna), s time da se sadržaj boce kvantitativno prenese sa 78 %-tnim etanolom. Lončići s talogom suše se na 105 °C preko noći prekriveni alu-folijom, nakon čega se hlade i čuvaju (do vaganja) u eksikatoru.

Izračun rezultata:

Masa netopljivih i topljivih vlakana određuje se iz razlike konstantne mase lončića s talogom (nakon sušenja na 105 °C) te opranog i žarenog lončića s pomoćnim filtracijskim sredstvom, dok se udjel istih računa obzirom na početnu masu uzorka (ili masu suhe tvari) kojom se započinje enzimaska hidroliza. U svrhu dobivanja što točnijih rezultata, potrebno je izvršiti korekcijske analize za udjele (masa) mineralnog ostatka i proteina (14 i 15). Analitički postupci za određivanje mineralnog ostatka i proteina prethodno su opisani (4.2.5 i 4.2.4). Prilikom analize proteina, kvantitativno se izdvaja talog (zajedno s pomoćnim filtracijskim sredstvom) s lončića, dok se prilikom analize mineralnog ostatka talog mineralizira u sinter lončićima. Masa (udjel) ukupnih vlakana dobije se kao zbroj korigiranih vrijednosti za netopljiva i topljiva vlakna.

$$m (SNT/STV) = m (\text{lončić s talogom}) - m (\text{lončić s Celite} - \text{om}) \quad (7)$$

$$m (NV/TV) = m (SNT/STV) - m (\text{proteini}) - m (\text{mineralni ostatak}) \quad (8)$$

$$m (\text{ukupna vlakna}) = m (NV) + m (TV) \quad (9)$$

gdje su: SNT - sirova netopljiva vlakna
NV - netopljiva vlakna
STV - sirova topljiva vlakna
TV - topljiva vlakna

Analize netopljivih i topljivih vlakana, kao i korekcijske analize, napravljene u duplikatu, a rezultati su izraženi kao maseni udjel (%) u sirovoj ugljikohidratnoj frakciji te prikazani kao srednje vrijednosti. Obrada rezultata napravljena je pomoću programa Microsoft Office Excel 2013.

4.2.8.2. Određivanje udjela slobodnih ugljikohidrata primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC)

Priprema uzoraka

Profil slobodnih ugljikohidrata određen je u koncentriranim vodenim i etanolnim ekstraktima sekundarnih sirovina pripremljenih prema opisanom postupku (4.2.7.1.). Prije analize, uzorci su profiltrirani kroz celuloza-acetat mikrofiltere (0,45 μm). Obzirom da se radi o kompleksnim supstratima, filtrirani uzorci razrijeđeni su acetonitrilom u omjeru 1:1 (50 % udjela acetonitrila), kako bi se dodatno izdvojile topljive komponente koje se talože organskim otapalima, a razrijeđeni uzorci ponovno su filtrirani kroz PTFE mikro filtere (0,2 μm). Na taj način je zaštićena kolona od mogućeg začepljenja, a također je smanjen odziv pika otapala zbog sličnog sastava mobilne faze (udjela organske komponente) i uzorka.

Postupak rada

Analiza slobodnih ugljikohidrata provedena je kromatografijom hidrofilnih interakcija (eng. HILC - Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) na Phenomenex Luna NH2 koloni (polarna stacionarna faza), temeljem svojstava polarosti i solvatacije pojedinih analita uslijed čega se oni raspodjeljuju između pretežito vodenog sloja mobilne faze, koji se adsorbira na hidrofilnoj stacionarnoj fazi, i pretežito organskog sloja (najčešće acetonitrila) mobilne faze (Buszewski i Noga, 2012). U svrhu postizanja zadovoljavajućeg razdvajanja analita, optimirani su kromatografski parametri koji su

definirani kao jedinstvena metoda prema kojoj su analizirani svi uzorci. Mobilnu fazu činio je dvokomponentni sustav vode i acetonitrila, pomiješan u omjeru 80:20 (v/v). Obzirom na detekciju, uspostavljena je isključivo izokratna elucija, pri protoku od 1 mL/min. Temperatura kolone, kao i detektora, bila je 35 °C, dok je volumen injektiranih uzoraka iznosio 20 µL. Separacija slobodnih ugljikohidrata pod gore navedenim uvjetima postignuta je unutar 15 min (trajanje metode), od čega se zadnjih 3 min odnosilo na stabilizaciju sustava prije početka slijedeće analize. Detekcija ugljikohidrata provedena je snimanjem eluata na RI (eng. Refractive Index) detektoru, pri čemu signal nastaje usijed promjene otklona zrake svjetlosti koja prolazi kroz analitičku ćeliju (ispunjena eluatom) u odnosu na referentnu (ispunjena čistom mobilnom fazom).

Identifikacija i kvantifikacija detektiranih spojeva

Identifikacija pikova na dobivenim kromatogramima provedena je pomoću vanjskih standarada usporedbom retencijskih vremena. Otopine standarada glukoze, fruktoze i saharoze analizirane su prema istoj metodi kao i ekstrakti, čime su dobiveni podaci o njihovim retencijskim vremenima, jednako kao i za svaki pik na snimljenim kromatogramima ekstrakata.

Za kvantifikaciju identificiranih pikova, dobiveni kromatogrami ekstrakata su integrirani, čime su dobivene površine ispod svakog pika. Baždarni pravci za svaki identificirani spoj (ugljikohidrat) definirani su analizom otopina različitih koncentracija (razrijeđenja) odgovarajućeg standarda prema istoj metodi kao i za ekstrakte, uključujući i jednake integracijske parametre, te koreliranjem poznatih koncentracija s odgovarajućim odzivom sustava, odnosno površinama ispod pikova (tablica 3).

Tablica 3. Baždarni pravci identificiranih slobodnih ugljikohidrata u uzorcima ekstrakata sekundarnih biljnih sirovina

Naziv spoja	Jednadžba baždarnog pravca
<i>glukoza</i>	$Y = 94,761x + 341,59; R^2 = 1,0000$
<i>fruktoza</i>	$Y = 72,633x + 779,28; R^2 = 0,9997$
<i>saharoza</i>	$Y = 104,74x + 806,63; R^2 = 0,9996$

Koristeći odgovarajuće baždarne pravce, iz vrijednosti dobivenih površina (nakon integracije) identificiranih pikova u kromatogramima vodenih i etanolnih ekstrakata, izračunate su odgovarajuće koncentracije prema općoj formuli (10).

$$y = kx + l \rightarrow x = \frac{y-l}{k} x f \quad (10)$$

gdje su: x – tražena koncentracija, odnosno poznata koncentracija standarda
 y – izmjerena vrijednost apsorbancije
 f – faktor razrjeđenja

HPLC analize provedene su u duplikatu, a udjeli pojedinačnih slobodnih šećera izračunati su obzirom na početnu masu uzorka korištenog za ekstrakcije i volumena dobivenih ekstrakata. Rezultati su izraženi su kao maseni udjel (mg/g s. tv.) u suhoj tvari početnog uzorka te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom. Obrada kromatograma (identifikacija i integracija) napravljena je pomoću programa ChemStation (Agilent Technologies, SAD), dok je obrada rezultata napravljena pomoću programa Microsoft Office Excel 2013.

4.2.8.3. Određivanje sastava polisaharida sekundarnih biljnih sirovina

4.2.8.3.1. Priprema kiselinskih hidrolizata

Priprema kiselinskih hidrolizata provodi se prema NREL/TP-510-42618 protokolu (Sluiter i sur. 2008).

Princip metode:

Katalizirana hidroliza biljnog materijala u kiselim uvjetima i pri povišenoj temperaturi i tlaku, pri čemu dolazi do cijepanja polisaharida do monomernih jedinica.

Priprema uzoraka:

Za kiselinsku hidrolizu su korišteni odmašćeni ekstrahirani uzorci sekundarnih biljnih sirovina. Odmašćivanje je provedeno ekstrakcijom pomoću petroletera u aparaturi po Soxhletu (4.2.3.), nakon čega su uslijedile uzastopne ekstrakcije vodom i etanolom (također u aparaturi po Soxhletu) (4.2.7.1). Tako pripremljeni uzorci su osušeni i čuvani u eksikatoru.

Postupak rada:

Odvaže se $0,3000 \pm 0,0010$ g uzorka u epruvete, oprezno se doda $3,00 \pm 0,01$ mL 72 %-tne sumporne kiseline te se smjesa dobro homogenizira na vorteksu. Sadržaj u epruvetama se inkubira u termostatiranoj kupelji na 30 ± 3 °C tijekom 60 min uz povremenu (svakih 10-ak min) homogenizaciju na vorteksu. Po završetku inkubacije, sadržaj epruveta se kvantitativno prenese u laboratorijske boce od

100 mL pogodne za autoklaviranje, pri čemu se sumporna kiselina razijeđuje vodom do udjela 4 % (dodaje se ukupno $84,00 \pm 0,04$ mL vode). Boce se začepe (čep ne zavrtati do kraja) i autoklaviraju 1 h pri 121 °C.

Kiselinska hidroliza svih uzoraka provedena je u duplikatu.

4.2.8.3.2. Određivanje u kiselini netopljivog ostatka

Priprema kiselinskih hidrolizata provodi se prema NREL/TP-510-42618 protokolu (Sluiter i sur. 2008).

Autoklavirane boce s uzorcima u razrijeđenoj sulfatnoj kiselini sadrže u kiselini netopljivi ostatak i hidrolizat u kojem se nalaze monomerne glikozilne jedinice od kojih su sastavljeni polisaharidi. U kiselini netopljivi ostatak odvaja se filtracijom od hidrolizata i kvantificira gravimetrijski.

Nakon autoklaviranja boce se polako ohlade do sobne temperature, a potom se sadržaj filtrira pomoću vakuuma preko prethodno opranih, izžarenih, ohlađenih i izvaganih sinter lončića na kojima se nalazi ravnomjeran sloj pomoćnog filtracijskog sredstva (Celite). Ostatak netopljiv u kiselini se kvantitativno prenese na lončić i ispiri s najmanje 50 mL demineralizirane vode, ali tek nakon što se izdvoji hidrolizat (u obliku filtrata), te se istom izmjeri volumen. Talog na sinter lončićima se suši na 105 °C do konstantne mase u sušioniku, nakon čega se lončići izvade, hlade u eksikatoru i važu kad se ohlade na sobnu temperaturu.

Obzirom da je kiselinska hidroliza provedena u duplikatu, mase ostataka netopljivih u kiselini također su gravimetrijski određene u duplikatu. Udjeli istih izračunati su obzirom na početnu masu uzorka. Rezultati su izraženi kao maseni udjel (mg/g s. tv.) u suhoj tvari početnog uzorka te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom. Obrada rezultata napravljena je pomoću programa Microsoft Office Excel 2013.

4.2.8.3.3. Određivanje monomernog sastava kiselinskih hidrolizata sekundarnih biljnih sirovina pomoću tankoslojne kromatografije visoke učinkovitosti (HPTLC)

Priprema uzoraka - neutralizacija hidrolizata:

Kiselinski hidrolizati (4 %-tna H₂SO₄) odmašćenih i ekstrahiranih sekundarnih sirovina neutralizirani su kalcijevim karbonatom u svrhu uklanjanja sulfatnih iona. Količina kalcijevog karbonata

izračunata je iz stehiometrijskih omjera reakcije neutralizacije. U alikvot hidrolizata od 10 mL, otpipetiran u laboratorijsku čašu od 50 mL, polako se dodaje kalcijev karbonat pomoću špatule, uz stalno miješanje na magnetskoj mješalici i praćenje promjene pH vrijednosti pomoću pH-metra. Nakon postizanja pH vrijednosti od oko 6,7, sadržaj čaše se prenosi u kivetu za centrifugiranje i centrifugira 5 minuta brzinom 3000 okretaja u minuti pri sobnoj temperaturi. Neutralni supernatant se odvaja u Eppendorf kivete i koristi za daljnje analize.

Za potrebe analize HPTLC tehnikom, neutralni hidrolizati su razrijeđeni metanolom i dodatno profiltrirani kroz PVDF mikrofiltre (0,2 µm) zbog naknadnog taloženja uslijed dodatka organske faze.

Postupak rada:

HPTLC Silica gel 60 ploča (20x10 cm) impregnira se potapanjem u otopini za impregnaciju tijekom 1 minute, nakon čega se dobro osuši i aktivira zagrijavanjem na 110 °C u laboratorijskom sušioniku. Uzorci i standardi nanose se na ohlađenu impregniranu ploču pomoću mikroinjekcije poluautomatskim sustavom Linomat 5. Ploča se razvija ascendentno u kadi odgovarajućih dimenzija, koja se prethodno zasiti parama otapala za razvijanje, tijekom 15 min (20 mL otapala). Razvijanje ploče ponavlja se ukupno 3 puta, a između svakog sljedećeg razvijanja ploča se dobro osuši. Nakon završnog razvijanja, osušena ploča se derivatizira uranjanjem ploče u otopinu za derivatizaciju tijekom 2 sekunde, ponovno se suši i zatim zagrijava na grijaćoj ploči temperiranoj na 150 °C tijekom 3 minute. Na ohlađenoj derivatiziranoj ploči jasno se mogu vidjeti razdvojene, karakteristično obojene linije monosaharida. Ploča se dokumentira pomoću digitalnog foto-sustava u remisijsko-transmisijskom (RT) i transmisijskom (T) načinu snimanja.

Identifikacija i kvantifikacija:

Identifikacija monosaharida vrši se usporedbom retencijskih faktora (R_f) linija standarda i linija u uzorcima (omjer udaljenosti pojedine komponente od mjesta nanosa s udaljenošću kojeg prijede fronta otapala pri definiranim kromatografskim uvjetima). Retencijski faktori izračunavaju se obradom digitalne fotografije ploče. Za kvantifikaciju se također koristi digitalna fotografija ploče (RT), koja se obrađuje pomoću programa WinCATS i VideoScan (Camag (Švicarska)), pri čemu se baždarne krivulje određuju za svaki standard (i za svaku ploču) na temelju intenziteta obojenja (koji je proporcionalan koncentraciji standarda).

Uz pretpostavku da ulazna masa dovoljno pročišćena prethodnim ekstrakcijama te sadržava samo netopljivi ostatak u kiselini i polisaharid, teorijski udjel (mg/g s. tv.) polisaharida u suhoj tvari početnih sirovina izračunat je kao razlika ulazne mase u hidrolizu i mase ostatka netopljivog u kiselini. Izračinati udjel polisaharida (mg/g s. tv.) u suhoj tvari početnih sirovina određen je kao zbroj udjela pojedinačnih monomernih jedinica (monosaharida) identificiranih u hidrolizatima pojedinih sirovina.

Sastav polisaharida prikazan je kao % zastupljenosti (relativni omjer) pojedinačnih monosaharidnih jedinica u odnosu na sve identificirane monosaharidne jedinice u hidrolizatima pojedinih sirovina.

4.2.9. Određivanje sastava i udjela bioaktivnih spojeva

4.2.9.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Princip metode:

Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s nekim reducirajućim reagensom (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 volframovih i molibdenovih oksida. Nakon dva sata reakcije u kojoj svi polifenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na 765 nm (Ough i Amerine, 1988) pri čemu je intenzitet obojenja direktno proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom uzorku (Singelton i Rossi, 1965).

Priprema uzoraka:

Ukupni polifenoli izmjereni su u koncentriranim vodenim i etanolnim ekstraktima sekundarnih sirovina pripremljenih prema opisanim postupcima (4.2.7.1. i 4.2.7.2.). Prema potrebi, pojedini ekstrakti (vodeni i etanolni) su razrijeđeni.

Postupak rada:

U odmjernu tikvicu od 10 mL otpipetira se 0,1 mL uzorka, 6 mL destilirane vode te 0,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđenog s vodom u omjeru 1:2), promiješa i doda 1,5 mL 20 %-tne otopine natrijeva karbonata (Na_2CO_3). Sadržaj tikvice se zatim ponovno dobro promiješa i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Tako pripremljeni uzorci ostave se stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba priprema se na isti način kao i ispitivani uzorci, s razlikom da se umjesto uzorka u reakcijsku smjesu dodaje jednaki volumen destilirane vode.

Izrada baždarnog pravca za određivanje ukupnih polifenola:

Iz osnovne otopine standarda galne kiseline koncentracije 1000 mg/L, u odmjerne tikvice od 50 mL pripreme se slijedeća razrjeđenja: 50, 100, 200, 300, 400, 600 i 800 mg/L.

Ponovi se prethodno opisani postupak reakcije s Folin-Ciocalteu reagensom s time da se umjesto uzorka u reakcijsku smjesu dodaje 0,1 mL pripremljenih razrjeđenja galne kiseline.

Izračun rezultata:

Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija galne kiseline, konstruira se pravac ovisnosti apsorbancije (Y-os (ΔA)) o koncentraciji (X-os (mg/L)), odnosno baždarni pravac (11) prema čijoj jednadžbi se izračunava koncentracija ukupnih polifenola u uzorcima za izmjerene vrijednosti apsorbancija prema formuli (12), a rezultati se izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline (EGK).

$$y = 0,0011x + 0,0079, R^2 = 0,9988 \quad (11)$$

$$x = \frac{(y-0,0079)}{0,0011} \quad (12)$$

gdje su: x – poznata koncentracija otopine galne kiseline (mg/L)
y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm umanjene za vrijednost slijepe probe (ΔA)

Mjerenja ukupnih polifenola provedena su u duplikatu, a udjeli su izračunati obzirom na početnu masu uzorka, korištenog za ekstrakcije i volumena dobivenih ekstrakata. Rezultati su izraženi kao maseni udjel (mg EKG/g s. tv) u suhoj tvari početnog uzorka te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom. Obrada rezultata napravljena je pomoću programa Microsoft Office Excel 2013.

4.2.9.2. Određivanje udjela ukupnih neflavonoida i flavonoida

Princip metode:

Flavonoidi se iz uzorka talože pomoću formaldehida koji reagira s C-6 ili C-8 na 5,7-dihidroksi flavonoidu stvarajući metilol derivate koji dalje reagiraju s drugim flavonoidnim spojevima također na C-6 ili C-8 položaju itd. Kondenzirane molekule nastale ovom reakcijom uklone se filtriranjem, a ostatak neflavonoidnih polifenola određuje se prema metodi za ukupne polifenole (Ough i Amerine, 1988).

Priprema uzoraka:

Ukupni flavonoidi se talože iz koncentriranih vodenih i etanolnih ekstrakata sekundarnih sirovina pripremljenih prema opisanim postupcima (4.2.7.1. i 4.2.7.2.). Nakon taloženja i filtracije, prema potrebi, pojedini ekstrakti (vodeni i etanolni) su razrijeđeni.

Postupak rada:

U Eppendorf kivete od 2 mL otpipetira se 1 mL uzorka, 0,5 ml otopine kloridne kiseline (1:4 v/v) i 0,5 mL formaldehida te se otopina ostavi stajati 24 sata na mračnom i hladnom mjestu, nakon čega se profiltrira kroz celuloza-acetat mikrofiltere (0,45 µm). Tako pripremljen novi uzorak analizira se prema opisanom postupku za određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu-ovim reagensom (4.2.8.1.), pri čemu u reakciji sudjeluju ostali polifenolni spojevi (neflavonoidi), osim flavonoida.

Izračunavanje rezultata:

Koncentracija ukupnih neflavonoida izračunava se prema istom baždarnom pravcu kao i za ukupne polifenole (10), dok se koncentracija ukupnih flavonoida izračunava iz razlike koncentracije ukupnih polifenola i ukupnih neflavonoida (13) te je rezultat izražen na ekvivalente galne kiseline (EGK).

$$\text{ukupni flavonoidi} = \text{ukupni fenoli} - \text{ukupni neflavonoidi} \quad (13)$$

Mjerenja ukupnih neflavonoida provedena su u duplikatu, a udjeli su izračunati obzirom na početnu masu uzorka korištenog za ekstrakcije i volumena dobivenih ekstrakata. Rezultati su izraženi kao maseni udjel (mg EGK/L) u suhoj tvari početnog uzorka te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom. Obrada rezultata napravljena je pomoću programa Microsoft Office Excel 2013.

4.2.9.3. Određivanje pojedinačnih polifenola i metilksantina primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC)

Razvijena je metoda koja je pomoću gradijentne elucije otapala omogućila dobru separaciju i kvantifikaciju polifenolnih spojeva i metilksantina prisutnih u ispitivanim uzorcima (Belščak-Cvitanović i sur. 2011).

Priprema uzoraka

Profil polifenola i metilksantina određen je u koncentriranim vodenim i etanolnim ekstraktima sekundarnih sirovina pripremljenih prema opisanim postupcima (4.2.7.1. i 4.2.7.2.). Prije analize, uzorci su profiltrirani kroz celuloza-acetat mikrofiltere (0,45 µm).

Postupak rada

Analiza bioaktivnih spojeva provedena je kromatografijom obrnutih faza na InertSustain C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) koloni (nepolarna stacionarna faza), na temelju različitosti u polarnosti pojedinih komponenata, elucijom polarnim otapalima. U svrhu postizanja zadovoljavajućeg razdvajanja analita, optimirani su kromatografski parametri koji su definirani kao jedinstvena metoda prema kojoj su analizirani svi uzorci. Mobilnu fazu činile su dvije komponente; A - 2% -tna otopina mravlje kiseline u vodi (v/v) i B – 2 %-tna otopina mravlje kiseline u acetonitrilu (v/v). Optimalno razdvajanje komponenata postignuto je uspostavljanjem linearnog gradijenta sastava mobilne faze u vremenu prema slijedećem: 90 % A, 10 % B u 0-toj minuti; 60 % A, 40 % B u 25. minuti; 30 % A, 70 % B u 45. minuti, pri protoku od 1 mL/min. Temperatura kolone je 25 °C, dok je volumen injektiranih uzoraka iznosi 20 µL. Vrijeme potrebno za analizu jednog uzorka, tj. trajanje metode, bilo je podešeno na ukupno 45 min, od čega se zadnjih 5 min se odnosilo na stabilizaciju sustava u smislu uspostavljanja početnog sastava mobilne faze. Detekcija bioaktivnih spojeva provedena je snimanjem eluata na valnoj duljini 278 nm (UV područje) pomoću PDA detektora, pri čemu su dobiveni karakteristični kromatogrami vodenih i etanolnih ekstrakata sekundarnih biljnih sirovina.

Identifikacija i kvantifikacija detektiranih spojeva

Izdvojeni spojevi detektirani su pomoću Diode Array Detector-a pri valnim duljinama od 190 do 400 nm, uz rezoluciju od 1,2 nm. Usporedbom vremena zadržavanja (Rt) izdvojenih pikova na kromatogramima s vremenima zadržavanja vanjskih standarda te usporedbom s UV-spektrima standarda identificirani su spojevi na pojedinim kromatogramima. Kvantitativna determinacija spojeva omogućena je korištenjem jednadžbi baždarnih pravaca (tablica 4) pojedinih standarda. Poseban

software Chem32 Chromatography Workstation omogućava prikupljanje i obradu podataka dobivenih HPLC analizom.

Tablica 4. Baždarni pravci identificiranih bioaktivnih spojeva u vodenim i etanolnim ekstraktima sekundarnih sirovina

Naziv spoja	Jednadžba baždarnog pravca
<i>Elaginska kiselina</i>	$y = 11,311x - 8,02; R^2=0,9999$
<i>Ferulinska kiselina</i>	$y = 60,496x + 11,83; R^2 = 1$
<i>Galna kiselina</i>	$y = 56,244x - 31,86; R^2 = 0,9999$
<i>Kafein</i>	$y = 60,160x + 82,54; R^2 = 0,9998$
<i>Kava kiselina</i>	$y=129,030x + 81,68; R^2 = 0,9999$
<i>Klorogenska kiselina</i>	$y=24,414x + 33,45; R^2 = 0,9992$
<i>Kvercetin</i>	$y = 44,013x + 18,62; R^2 = 0,9998$
<i>Luteolin</i>	$y = 39,577x + 198,40; R^2=0,9941$
<i>p-kumarinska kiselina</i>	$y = 121,28x + 24,90; R^2 = 0,9999$
<i>Protokatehinska kiselina</i>	$y = 34,738x - 22,37; R^2 = 0,9997$
<i>Teobromin</i>	$y = 46,967x + 39,20; R^2 = 0,9999$
<i>Vanilinska kiselina</i>	$y = 73,661x + 5,53; R^2 = 0,9999$

Koristeći odgovarajuće baždarne pravce, iz vrijednosti dobivenih površina (nakon integracije) identificiranih pikova u kromatogramima vodenih i etanolnih ekstrakata, izračunate su odgovarajuće koncentracije prema općoj formuli (10). HPLC analize provedene su u duplikatu, a udjeli pojedinačnih polifenola i metilksantina izračunati obzirom na početnu masu uzorka korištenog za ekstrakcije i volumena dobivenih ekstrakata. Rezultati su izraženi kao maseni udjel ($\mu\text{g/g}$ s. tv.) u suhoj tvari početnog uzorka te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom. Obrada kromatograma (identifikacija i integracija) napravljena je pomoću programa ChemStation (Agilent Technologies, SAD), dok je obrada rezultata napravljena pomoću programa Microsoft Office Excel 2013.

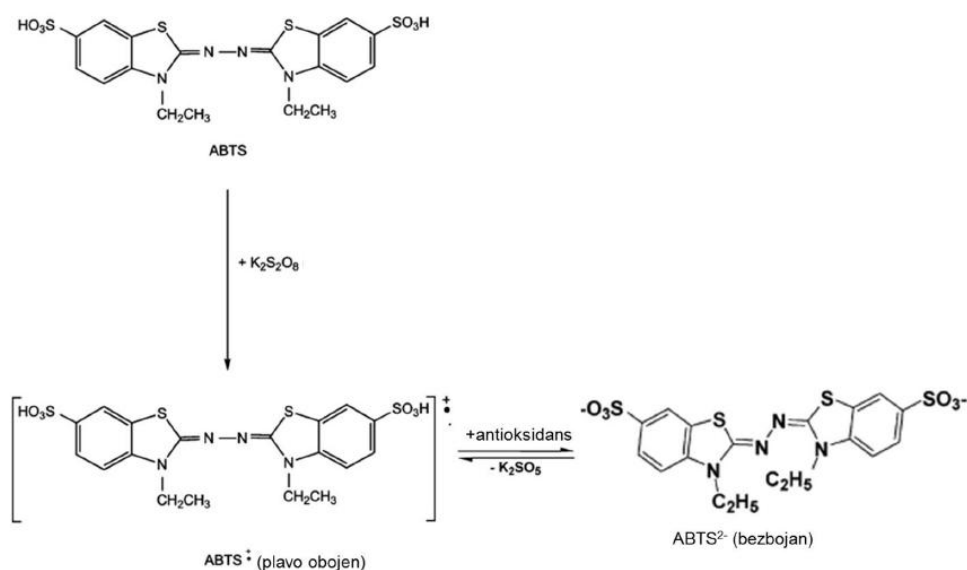
4.2.10. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

Antioksidacijski kapacitet određen je u koncentriranim vodenim i etanolnim ekstraktima sekundarnih sirovina pripremljenih prema opisanom postupku (4.2.7.1. i 4.2.7.2.). Prema potrebi, neki od ekstrakata su prethodno razrijeđeni.

4.2.10.1. ABTS metoda

Princip metode:

Ova metoda temelji se na oksido-redukcijskoj reakciji „gašenja“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kationa), koji se formira bilo kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize (slika 10). Praćenjem promjene apsorbancije ABTS radikala na 734 nm, određuje se antioksidacijski kapacitet ispitivanog uzorka u odnosu na 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilokroman-2-karboksilnu kiselinu (Trolox - analog vitamina E, topljiv u vodi), pri istim uvjetima (Re i sur., 1999).



Slika 10. Mehanizam oksidacije ABTS radikala i reakcija s antioksidansom (Re i sur. 1999).

Postupak rada:

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka (ekstrakata) pripremi se otopina ABTS+ radikala, oksidacijom 7 mM vodene otopine ABTS reagensa s 140 mM kalijevim peroksodisulfatom, do konačne koncentracije otopine kalijevog peroksodisulfata od 2,45 mM. Budući da ABTS i kalijev peroksodisulfat reagiraju u stehiometrijskom odnosu 2:1 neće doći do potpune oksidacije te je stoga potrebno pripremljenu otopinu omotati folijom i ostaviti stajati preko noći (min. 12-16 h) na sobnoj temperaturi. Na dan analize otopina se razrijedi etanolom (96 %-tnim) do konačne koncentracije ABTS+ radikala od 1%, tako da apsorbancija te otopine pri 734 nm iznosi $0,70 \pm 0,02$. Alikvot od 20 μL uzorka pomiješa se s 2 mL otopine ABTS+ radikala u kivetu te se izmjeri apsorbancija na 734 nm nakon točno 6 minuta. 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 (2 mL otopine ABTS+ radikala).

Izrada baždarnog pravca:

Iz osnovne otopine standarda Trolox-a koncentracije 1 mM, u odmjerne tikvice od 50 mL pripreme se slijedeća razrjeđenja: 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM i 0,8 mM. Ponovi se prethodno opisani postupak reakcije s ABTS radikalom, s time da se umjesto uzorka u reakcijsku smjesu dodaje 20 μL pripremljenih razrjeđenja standarda Trolox-a.

Izražavanje rezultata:

Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija Trolox-a, konstruira se pravac ovisnosti apsorbancije (Y-os (ΔA)) o koncentraciji (X-os (mM/L)), odnosno baždarni pravac. Promjena apsorbancije ABTS radikala nakon reakcije s uzorkom računa se oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe. Koristeći baždarni pravac (14), ista se preračuna na koncentraciju Trolox-a kojom se postiže isti reakcijski učinak (obezbojenje otopine radikala pri istim uvjetima).

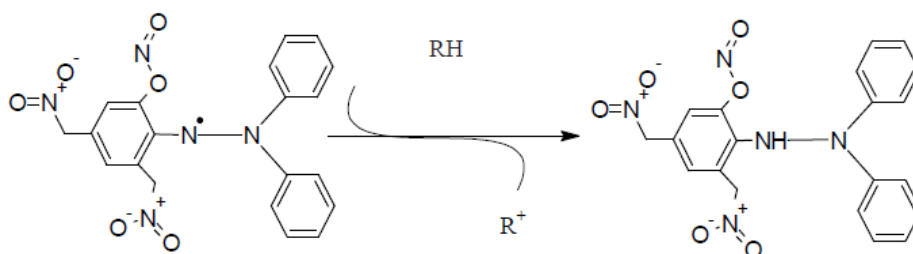
$$y = 0,2915x + 0,0055, R^2 = 0,9993 \quad (14)$$

Analiza antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom provedena je u duplikatu, a konačni rezultat je izračunat obzirom na početnu masu uzorka korištenog za ekstrakciju i volumen dobivenih ekstrakata. Rezultati su izraženi su kao maseni udjel ($\mu\text{mol ET/g s. tv.}$) ekvivalenata Trolox-a (ET) u suhoj tvari početnog uzorka te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom. Obrada rezultata napravljena je pomoću programa Microsoft Office Excel 2013.

4.2.10.2. DPPH metoda

Princip metode:

Ova metoda temelji se na redukciji 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u metanolnoj otopini. DPPH radikal radi nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm), dok u prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji „gasi“ slobodne radikale) dolazi do stabilizacije DPPH radikala sparivanjem elektrona te do promjene ljubičaste boje (oksidirani oblik radikala) otopine u žutu (reducirani oblik radikala), što se mjeri promjenom apsorbancije reakcijske smjese u definiranom vremenu u odnosu na isti učinak koji se postiže s poznatim reducensom (Trolox) (Brand-Williams i sur., 1995) (slika 11).



Slika 11. Mehanizam reakcije DPPH radikala s antioksidansom (Brand-Williams i sur.,1995)

Postupak rada:

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U optičku kivetu za spektrofotometrijsko mjerenje otpipetira se 100 μ L ispitivanog uzorka i doda 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH i promiješa. Reakcija se odvija 30 minuta (vrijeme potrebno da se ravnotežno stanje) u mraku nakon čega se mjeri apsorbancija pri 515 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba, umjesto uzorka, sadržava jednaki volumen metanola.

Izrada baždarnog pravca:

Iz osnovne otopine standarda Trolox-a koncentracije 1 mM, u odmjerne tikvice od 50 mL pripreme se slijedeća razrjeđenja: 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM i 0,75 mM. Ponovi se prethodno opisani postupak reakcije s DPPH radikalom, s time da se umjesto uzorka u reakcijsku smjesu dodaje 100 μ L pripremljenih razrjeđenja standarda Trolox-a.

Izražavanje rezultata:

Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija Trolox-a, konstruira se pravac ovisnosti apsorbancije (Y-os (ΔA)) o koncentraciji (X-os (mM/L)), odnosno baždarni pravac. Promjena apsorbancije DPPH radikala nakon reakcije s uzorkom računa se oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe. Koristeći baždarni pravac (15), ista se preračuna na koncentraciju Trolox-a kojom se postiže isti reakcijski učinak (obezbojenje otopine radikala pri istim uvjetima).

$$y = 0,6115x - 0,0097, R^2 = 0,9997 \quad (15)$$

Analiza antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom provedena je u duplikatu, konačni rezultat je izračunat obzirom na početnu masu uzorka korištenog za ekstrakcije i volumen dobivenih ekstrakata. Rezultati su izraženi kao maseni udjel ($\mu\text{mol ET/g s. tv.}$) ekvivalenta Trolox-a (ET) u suhoj tvari početnog uzorka te prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom. Obrada rezultata napravljena je pomoću programa Microsoft Office Excel 2013.

4.3. Statistička obrada podataka

Multivarijantna statistička analiza- Metoda analize glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*- PCA) korištena je kako bi se vizualizirao odnos između sastava analiziranih polifenolnih komponenti, antioksidacijske aktivnosti i ispitivanih uzoraka. Ova metoda temelji se na korelaciji između varijabli te grupira uzorke u glavne komponente (engl. *principal components PCs*). Metoda daje opis odnosa između varijabli te omogućuje vizualizaciju njihovog odnosa, tj. dali su one slične ili različite. Objekti koji su slični jedan drugome grupirat će se zajedno, dok će oni različiti biti udaljeniji. PCA je primijenjena na set podatka nakon standardizacije (rezultat za svaki uzorak je oduzet od srednje vrijednosti te podijeljen sa standardnom devijacijom) da bi sva mjerenja sveli na međusobno usporedive vrijednosti. Zbog velikog broja ispitivanih parametara bioaktivnog sastava za provođenje analize glavnih komponenti (*Principal Component Analysis*), kao zavisne varijable izabrani su sljedeći parametri: udjel suhe tvari, udjel masti, udjel proteina, udjel mineralnog ostatka, udjel ugljikohidratne frakcije, udjel ukupnih slobodnih ugljikohidrata, udjel glukoze, udjel fruktoze, udjel saharoze, ukupni polifenoli, ukupni flavonoidi, ukupni neflavonoidi, ABTS, DPPH i HPLC.



5. REZULTATI

5.1. Fizikalno-kemijski parametri sekundarnih biljnih sirovina

Tablica 5. Udjel (%) sekundarnih biljnih sirovina nastalih primarnom obradom namirnica i udjel (% ± SD) suhe tvari u istima

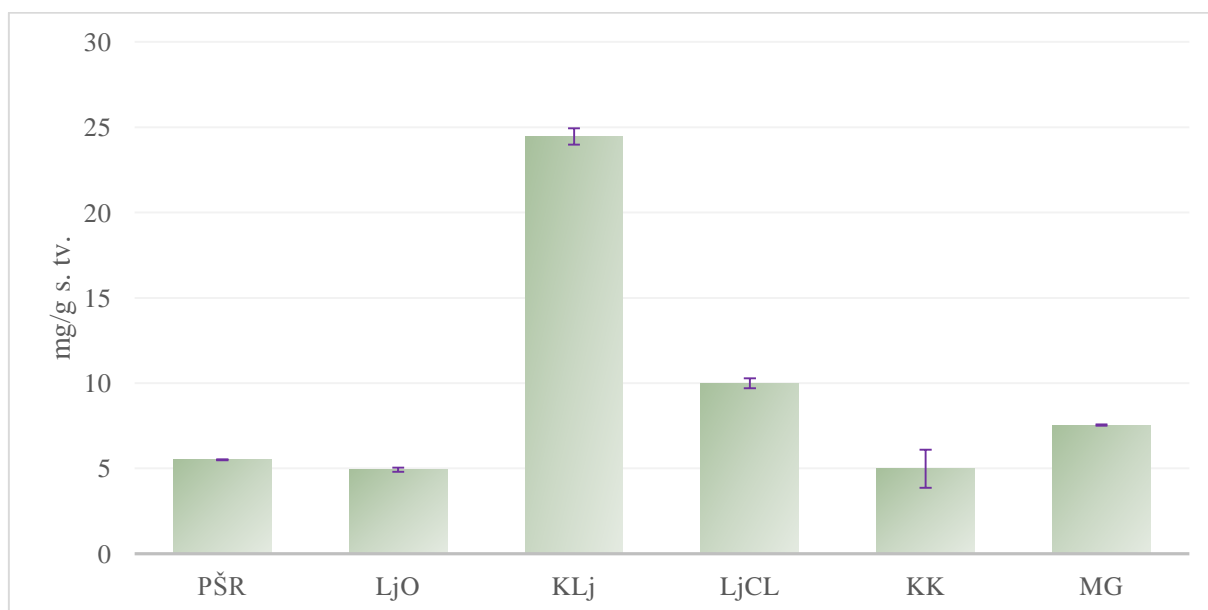
Uzorak	Oznaka	Udjel otpada (%)	Udjel s. tv. (%)
<i>Pulpa šećerne repe</i>	PŠR	25	91,70±0,05
<i>Ljuska oraha</i>	LjO	46	91,67±0,07
<i>Kakaova ljuska</i>	KLj	10	91,11±0,01
<i>Ljuska crvenog luka</i>	LjCL	21	89,26±0,05
<i>Kora krumpira</i>	KK	22	90,68±0,01
<i>Mahunu graška</i>	MG	52	89,11±0,30

Tablica 6. Parametri raspodjele veličine čestica (μm) sekundarnih biljnih sirovina

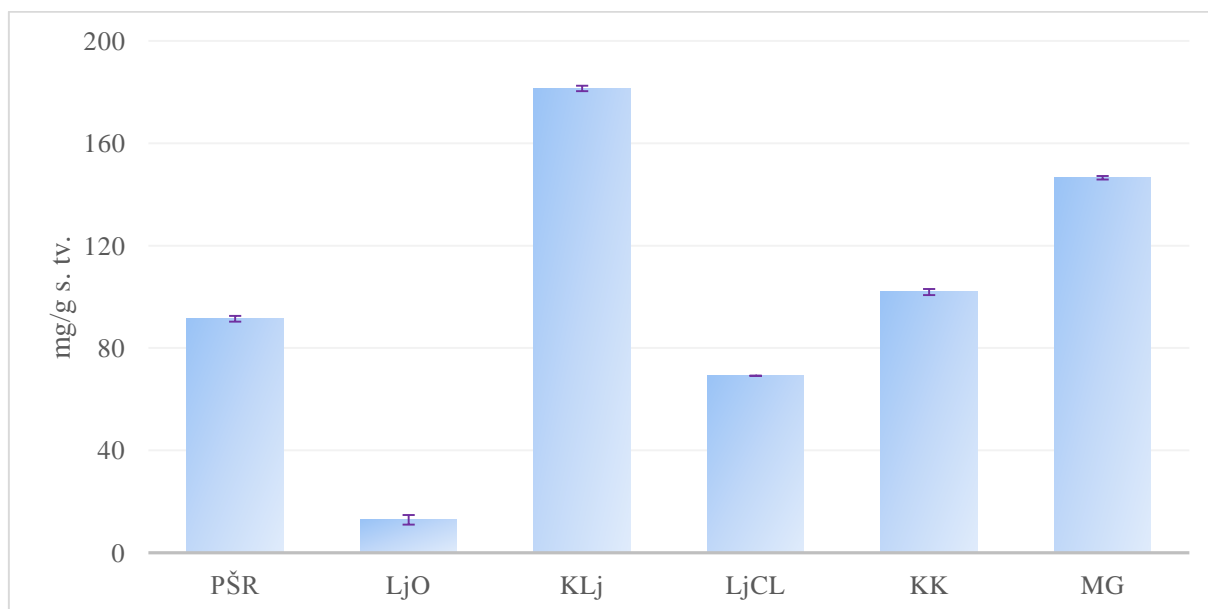
Uzorak	D[3,2]/μm	d(0,1)/μm	d(0,5)/μm	d(0,9)/μm
PŠR	124,395	70,157	392,436	798,297
LjO	77,811	35,568	278,149	786,557
KLj	103,875	53,541	333,679	676,436
LjCL	148,491	85,504	343,329	683,139
KK	96,949	305,567	367,378	770,684
MG	128,265	83,459	344,289	820,075

5.2. Kemijski sastav sekundarnih biljnih sirovina

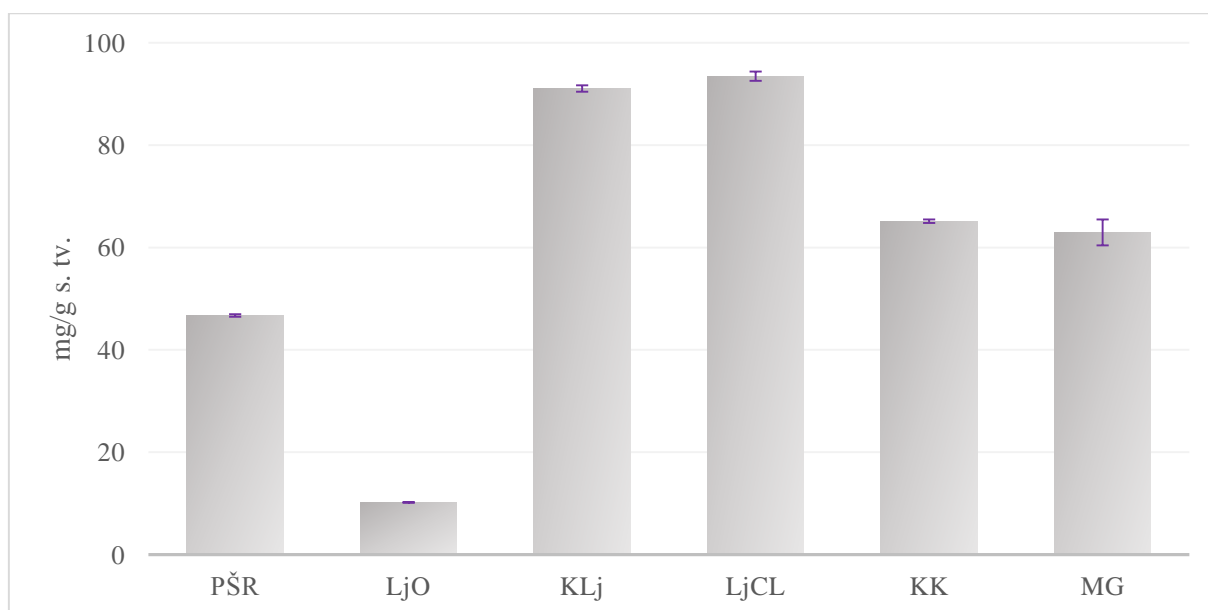
5.2.1. Udjeli osnovnih nutrijenata



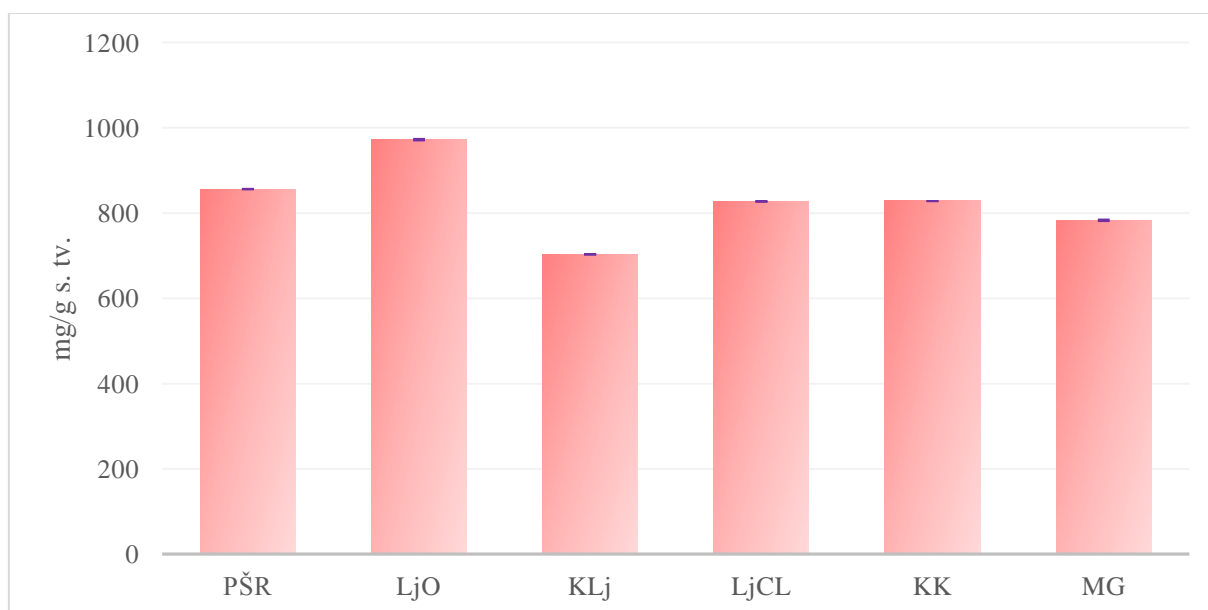
Slika 12. Udjel (mg/g s. tv.) masti u sekundarnim biljnim sirovinama



Slika 13. Udjel (mg/g s. tv.) proteina u sekundarnim biljnim sirovinama



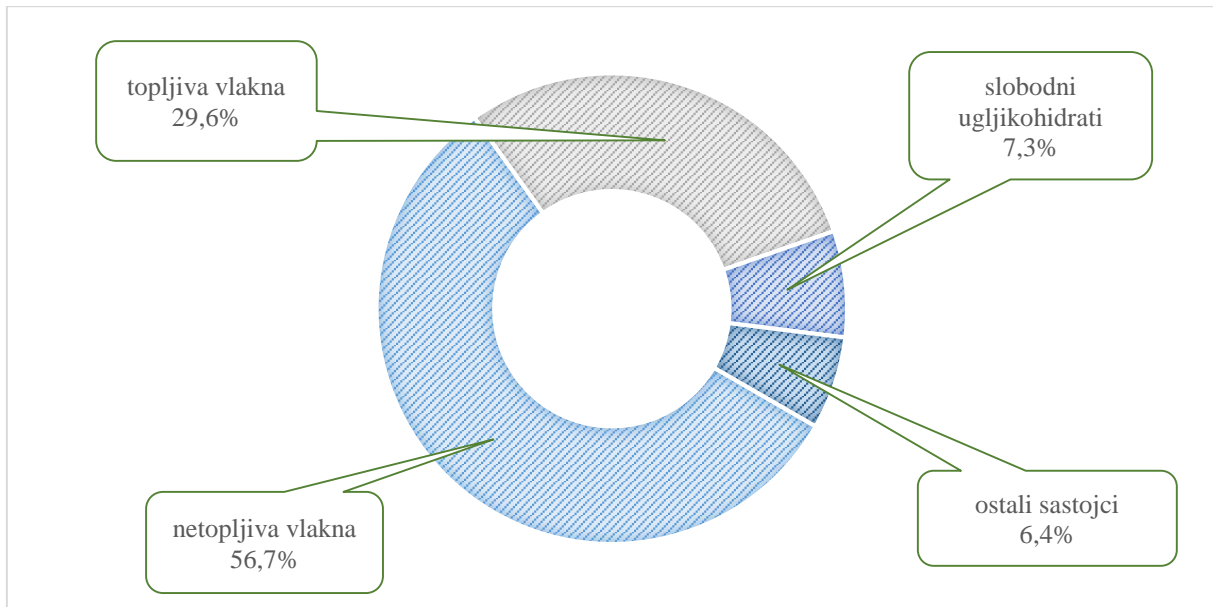
Slika 14. Udjel (mg/g s. tv.) mineralnog ostatka (pepela) u sekundarnim biljnim sirovinama



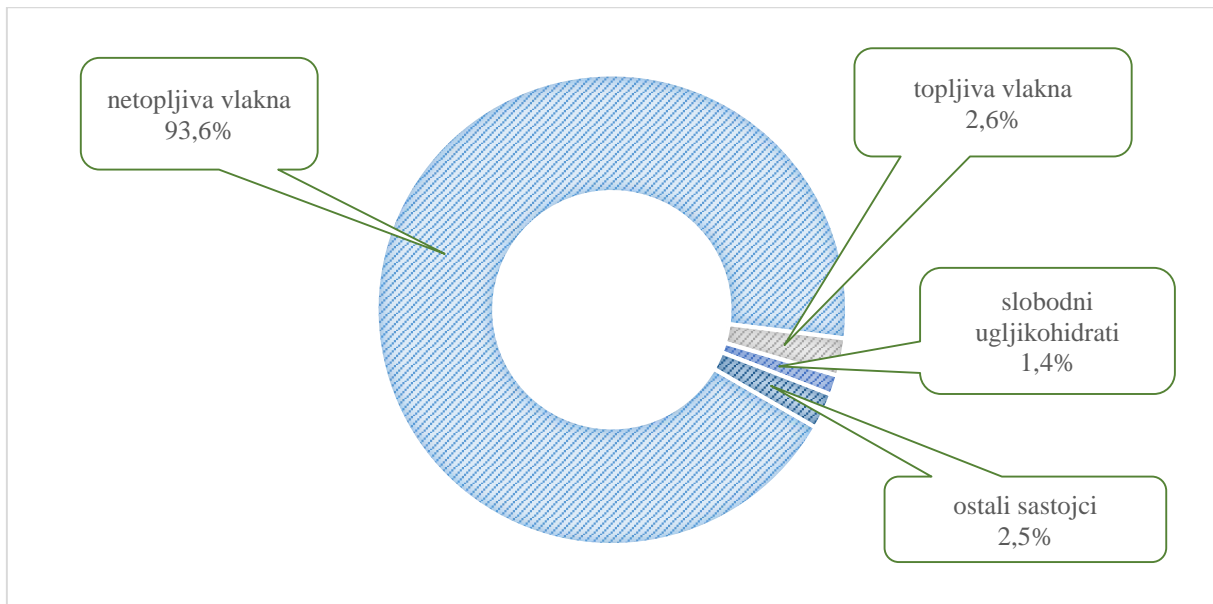
Slika 15. Udjel (mg/g s. tv.) ukupne sirove ugljikohidratne frakcije u sekundarnim biljnim sirovinama

5.2.2. Sastav sirove ugljikohidratne frakcije

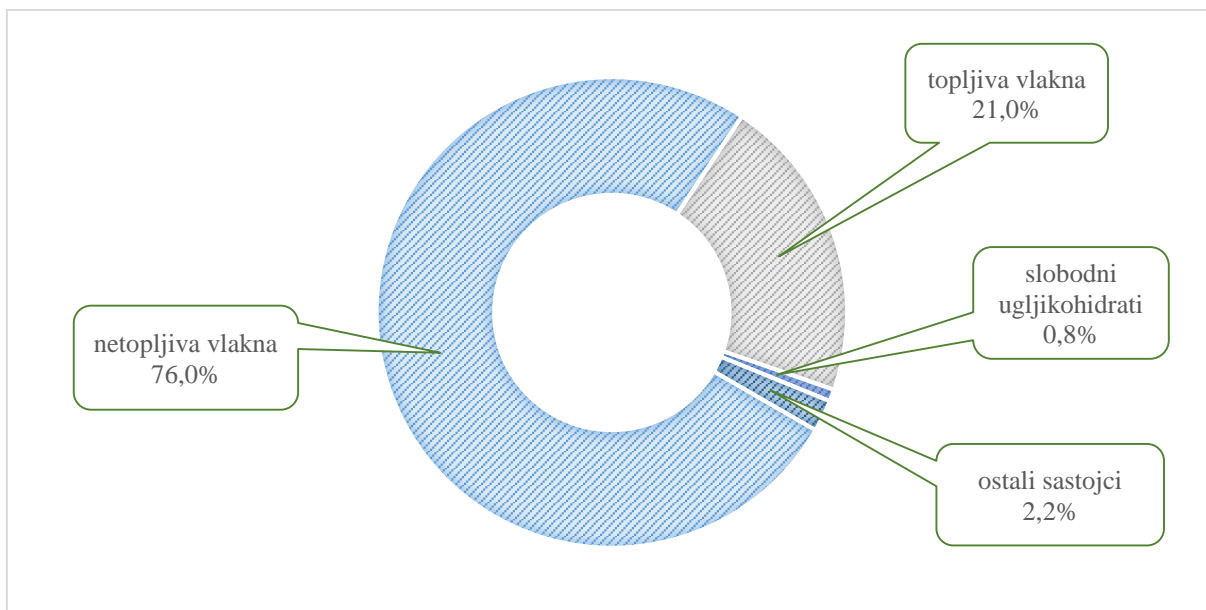
5.2.2.1. Udjeli pojedinih ugljikohidratnih komponenata



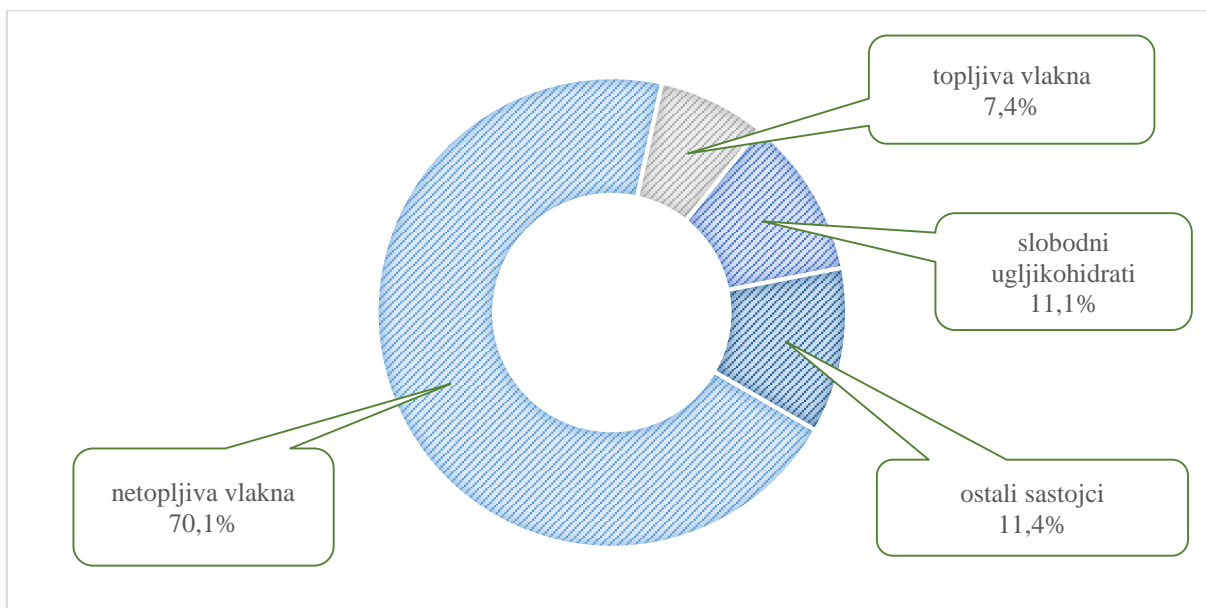
Slika 16. Udjeli (%) pojedinih komponenata sirove ugljikohidratne frakcije pulpe šećerne repe



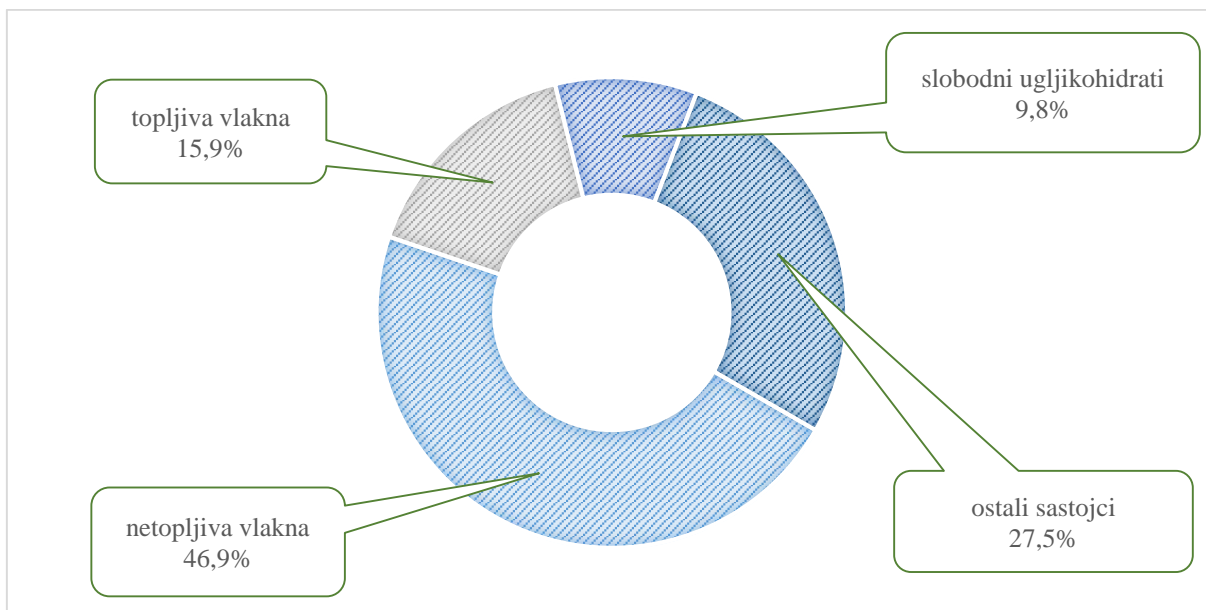
Slika 17. Udjeli (%) pojedinih komponenata sirove ugljikohidratne frakcije ljuske oraha



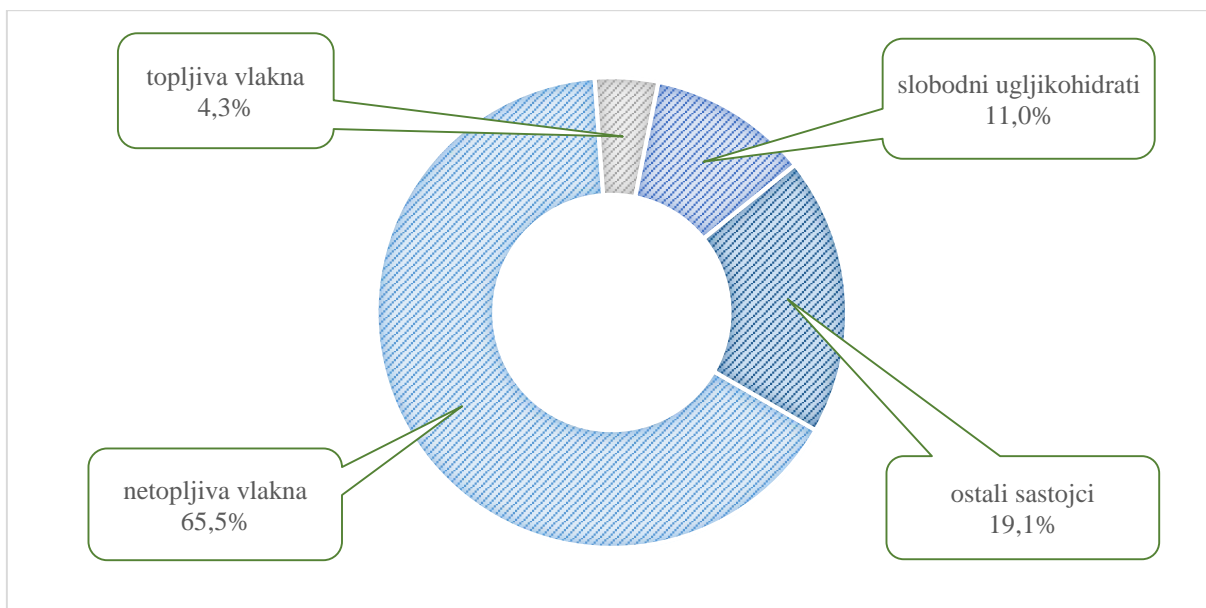
Slika 18. Udjeli (%) pojedinih komponenata sirove ugljikohidratne frakcije kakaove ljsuke



Slika 19. Udjeli (%) pojedinih komponenata sirove ugljikohidratne frakcije ljsuke crvenog luka



Slika 20. Udjeli (%) pojedinih komponenata sirove ugljikohidratne frakcije kore krumpira



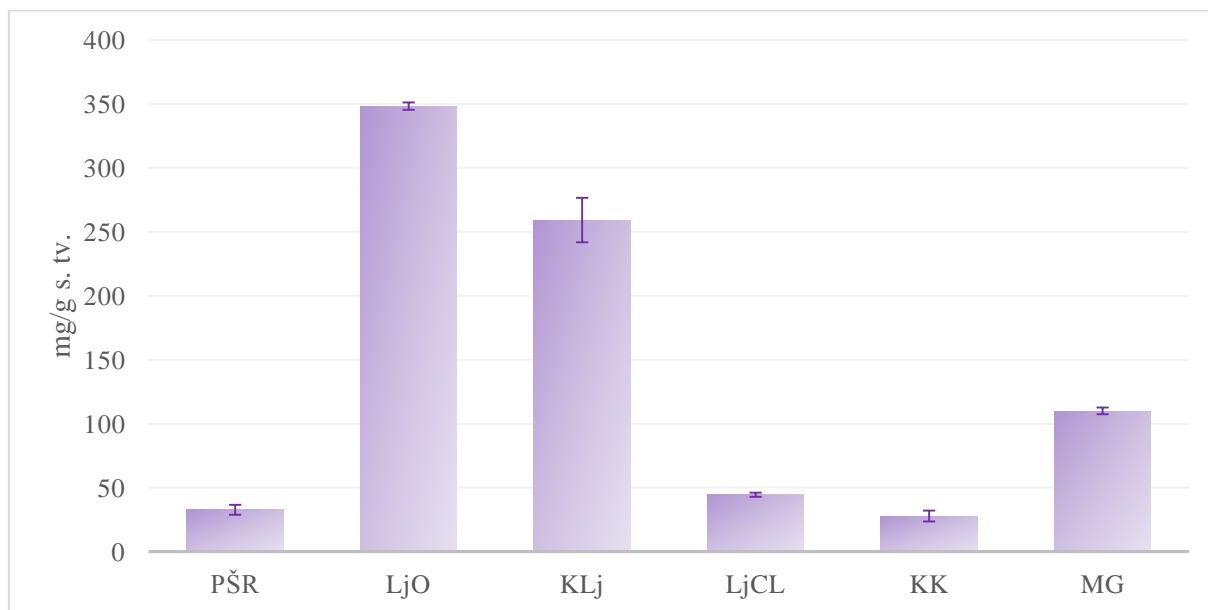
Slika 21. Udjeli (%) pojedinih komponenata sirove ugljikohidratne frakcije mahune graška

5.2.2.2. Sastav i udjeli slobodnih ugljikohidrata

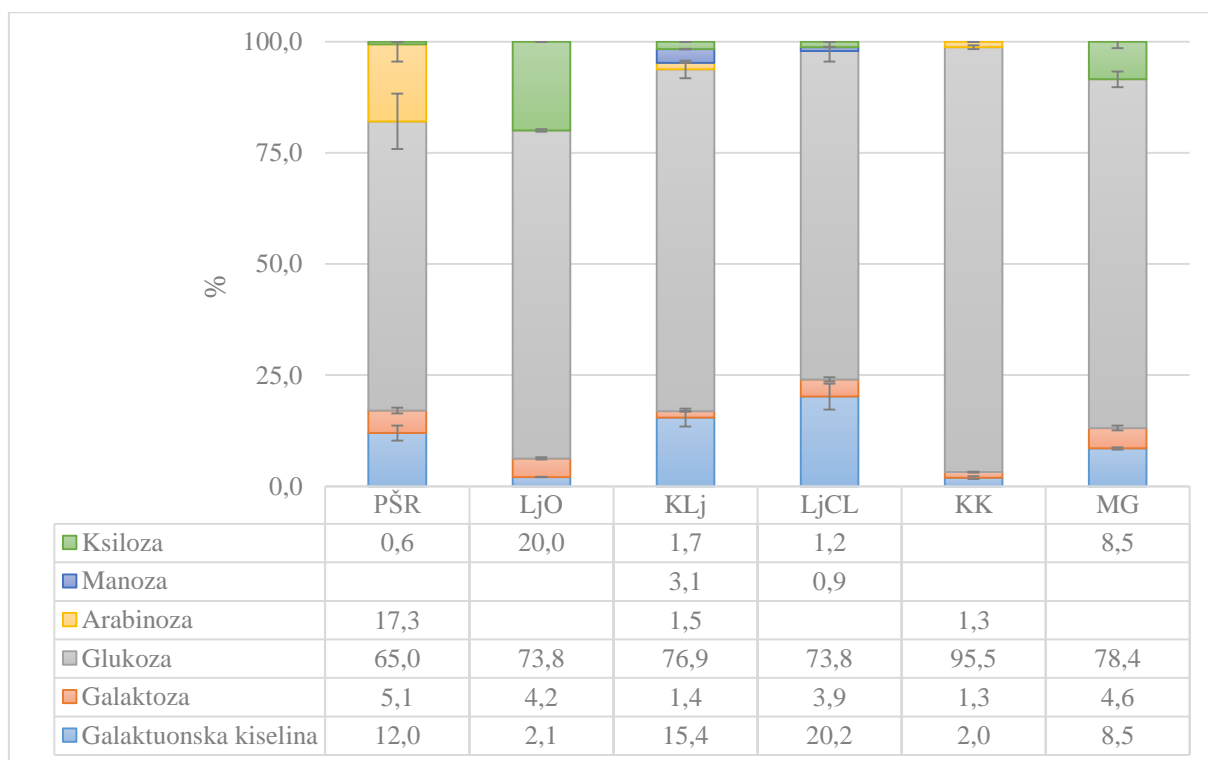
Tablica 7. Udjeli (mg/g s. tv.) slobodnih ugljikohidrata nakon uzastopne vodene i etanolne ekstrakcije sekundarnih biljnih sirovina (Soxhlet ekstrakcija)

Ugljikohidrati	Ekstrakt	Uzorak					
		PŠR	LjO	KLj	LjCL	KK	MG
Glukoza (mg/g s. tv.)	H ₂ O	3,10±0,05	0,00±0,00	2,25±0,15	16,83±0,32	3,48±0,13	28,13±1,41
	EtOH	1,49±0,04	0,00±0,00	0,00±0,00	10,40±0,18	1,67±0,06	5,11±0,13
	ukupno	4,59±0,09	0,00±0,00	2,25±0,12	27,22±0,51	5,15±0,19	33,24±1,54
Fruktoza (mg/g s. tv.)	H ₂ O	4,01±0,19	11,96±0,40	1,83±0,08	30,51±0,65	3,70±0,07	19,38±0,36
	EtOH	1,48±0,03	0,00±0,00	0,00±0,00	20,18±0,20	3,04±0,05	3,21±0,13
	ukupno	5,49±0,22	11,49±0,40	1,83±0,08	50,68±0,84	6,47±0,12	22,60±0,49
Saharoza (mg/g s. tv.)	H ₂ O	32,67±3,67	1,51±0,08	1,68±0,40	7,52±0,01	35,08±0,47	23,75±1,60
	EtOH	19,82±0,98	0,00±0,00	0,00±0,00	6,82±0,57	33,82±2,82	6,75±0,10
	ukupno	52,49±4,61	1,51±0,08	1,68±0,40	14,34±0,58	68,91±3,29	30,50±1,70
UKUPNO (mg/g s. tv.)		62,57±4,91	13,47±0,48	5,76±0,61	92,25±1,93	80,80±3,60	86,34±3,73

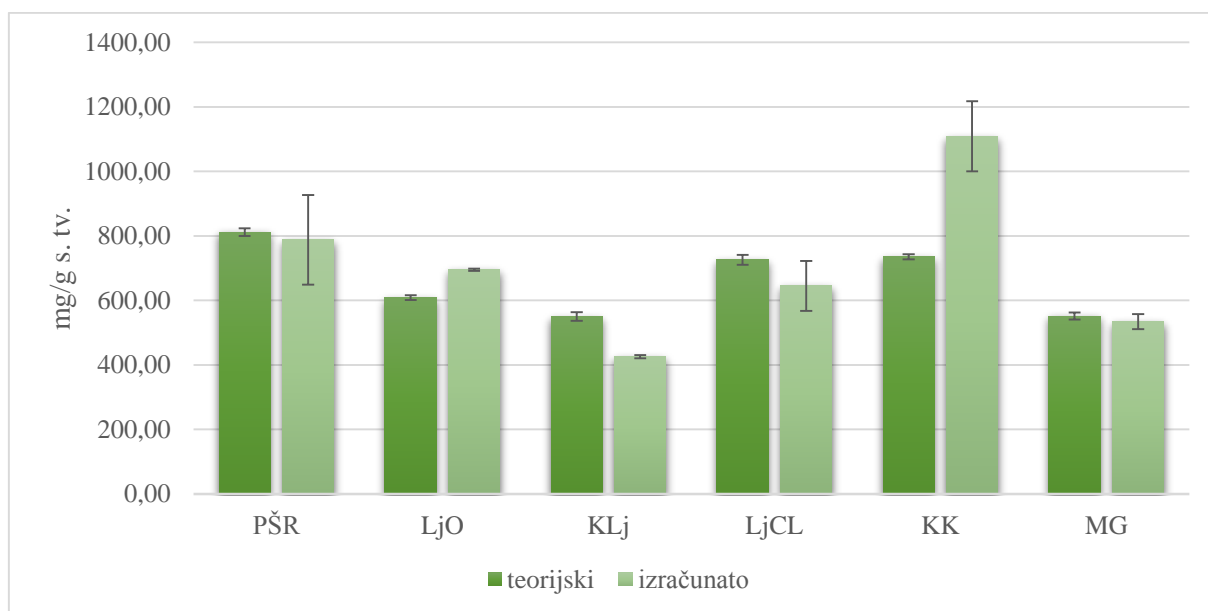
5.2.2.3. Sastav i udjel polisaharida - kiselinska hidroliza



Slika 22. Udjel (mg/g s. tv.) u kiselini netopljivog ostatka sekundarnih biljnih sirovina



Slika 23. Sastav i udjeli (%) monomernih ugljikohidratnih jedinica u neutralnim hidrolizatima sekundarnih biljnih sirovina



Slika 24. Usporedba (%) polisaharida u sekundarnim biljnim sirovinama s teorijskim vrijednostima istih

5.3. Sastav i udjeli polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet sekundarnih biljnih sirovina

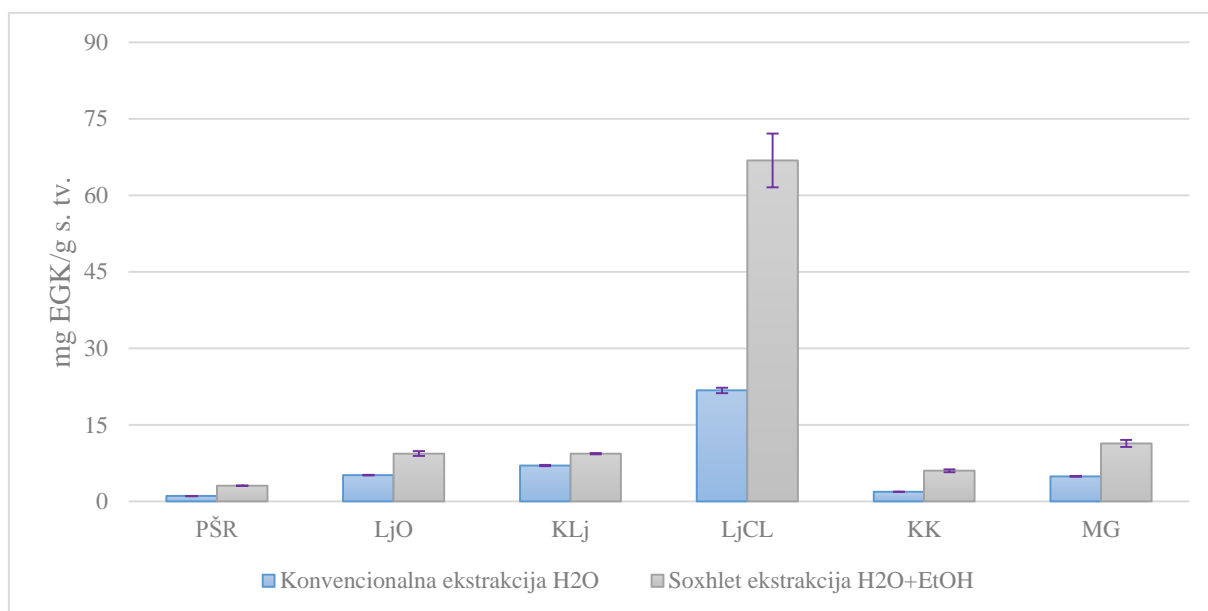
Tablica 8. Udjeli (mg EGK/g s. tv.) ukupnih polifenola (UP), flavonoida (UF) i neflavonoida (UNF) te antioksidacijski kapacitet ($\mu\text{mol ET/g s. tv.}$), određen DPPH i ABTS metodom, nakon uzastopne ekstrakcije vodom i etanolom sekundarnih biljnih sirovina (Soxhlet ekstrakcija)

Metoda	Ekstrakt	Uzorak					
		PŠR	LjO	KLj	LjCL	KK	MG
UP (mg EGK/g s. tv.)	H ₂ O	2,16±0,02	6,36±0,39	5,20±0,03	17,50±1,09	2,76±0,21	7,65±0,57
	EtOH	0,91±0,01	3,02±0,06	4,15±0,09	49,34±4,21	3,24±0,09	3,17±0,13
UF (mg EGK/g s. tv.)	H ₂ O	1,39±0,03	3,77±0,07	3,00±0,02	11,79±1,08	0,99±0,07	2,72±0,15
	EtOH	0,32±0,00	1,25±0,06	2,07±0,09	33,39±3,68	0,73±0,09	1,79±0,11
UNF (mg EGK/g s. tv.)	H ₂ O	0,77±0,04	2,59±0,32	2,20±0,00	5,71±0,00	1,77±0,14	4,93±0,42
	EtOH	0,59±0,01	1,78±0,09	2,09±0,00	15,95±0,53	2,51±0,36	1,92±0,11
ABTS ($\mu\text{mol ET/g s. tv.}$)	H ₂ O	6,80±0,12	41,79±1,04	51,33±0,24	98,30±0,75	18,48±1,70	47,42±4,47
	EtOH	4,79±0,08	41,82±2,60	57,61±0,35	238,34±5,68	17,50±0,44	15,10±1,45
DPPH ($\mu\text{mol ET/g s. tv.}$)	H ₂ O	2,82±0,05	30,85±1,55	31,19±2,99	43,52±3,13	8,91±0,94	18,86±1,82
	EtOH	2,34±0,10	45,21±3,78	36,90±0,06	126,69±6,10	8,97±0,21	4,87±0,41

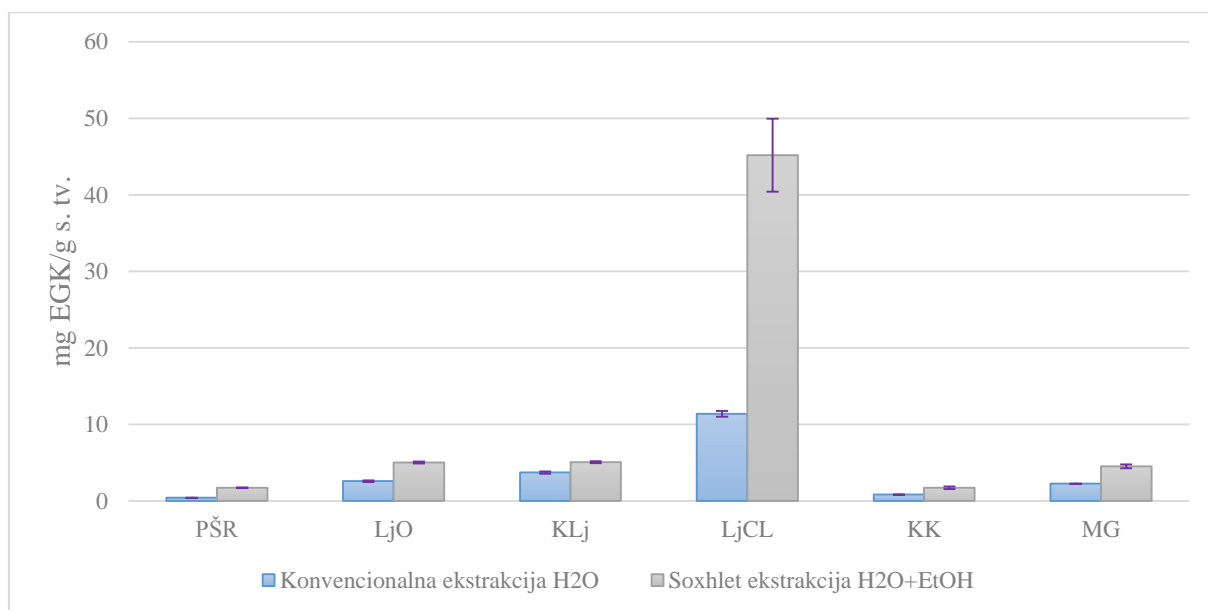
Tablica 9. Sastav i udjeli ($\mu\text{g/g}$ s. tv.) fenolnih kiselina, flavonoida i metilksantina u sekundarnim biljnim sirovinama (Soxhlet ekstrakcija)

Spojevi	Uzorak					
	PŠR	LjO	KLj	LjCL	KK	MG
Fenolne kiseline ($\mu\text{g/g}$ s. tv.)						
<i>Kava kiselina</i>	n.d.	21,88±0,30	2,28±0,07	n.d.	94,81±4,74	n.d.
<i>Klorogenska kiselina</i>	n.d.	n.d.	93,56±0,13	n.d.	872,64±3,17	n.d.
<i>Ferulinska kiselina</i>	3,81±0,05	n.d.	n.d.	n.d.	83,37±3,10	n.d.
<i>p-kumarinska kiselina</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,95±0,07	8,92±0,41
Σ derivata hidroksicimetne kiseline	n.d.	19,31±2,04	n.d.	n.d.	932,87±15,85	n.d.
<i>Elaginska kiselina</i>	n.d.	563,57±24,94	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Galna kiselina</i>	23,63±0,24	100,38±1,55	374,33±1,93	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Protokatehinska kiselina</i>	n.d.	122,21±13,06	257,42±5,93	3772,14±79,97	58,31±5,46	64,44±0,76
<i>Vanilinska kiselina</i>	1,92±0,08	n.d.	n.d.	27,16±0,29	7,60±0,32	2,64±0,07
Σ derivata hidroksibenzojeve kiseline	n.d.	113,34±1,81	n.d.	98,85±4,66	n.d.	13,77±0,42
Flavonoidi ($\mu\text{g/g}$ s. tv.)						
<i>Kvercetin</i>	n.d.	n.d.	n.d.	552,73±17,11	n.d.	8,44±0,11
Σ derivata kvercetina	n.d.	19,68±2,08	n.d.	8117,06±465,64	172,02±1,46	124,42±7,34
Σ derivata luteolina	n.d.	n.d.	n.d.	219,43±11,46	n.d.	n.d.
Metilksantini ($\mu\text{g/g}$ s. tv.)						
<i>Kafein</i>	n.d.	n.d.	821,31±11,51	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Teobromin</i>	n.d.	n.d.	6979,60±108,21	n.d.	n.d.	n.d.
UKUPNO ($\mu\text{g/g}$ s. tv.)	29,36±0,37	960,37±45,78	8528,50±127,78	12787,37±579,13	2225,57±34,17	222,63±9,11

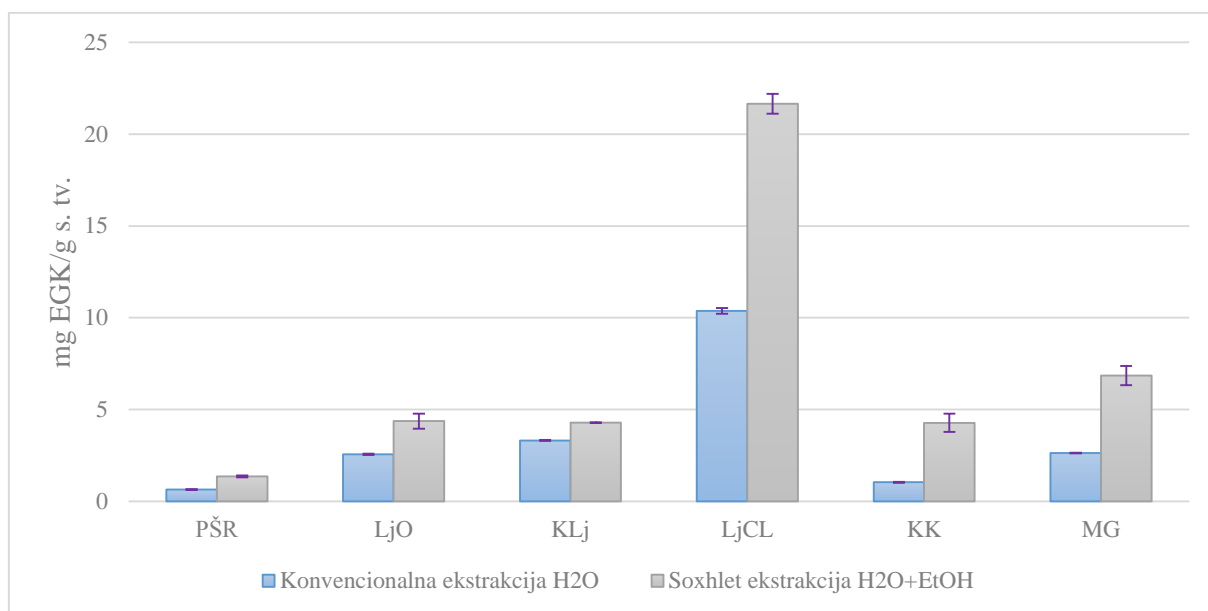
* n.d. – nije detektirano



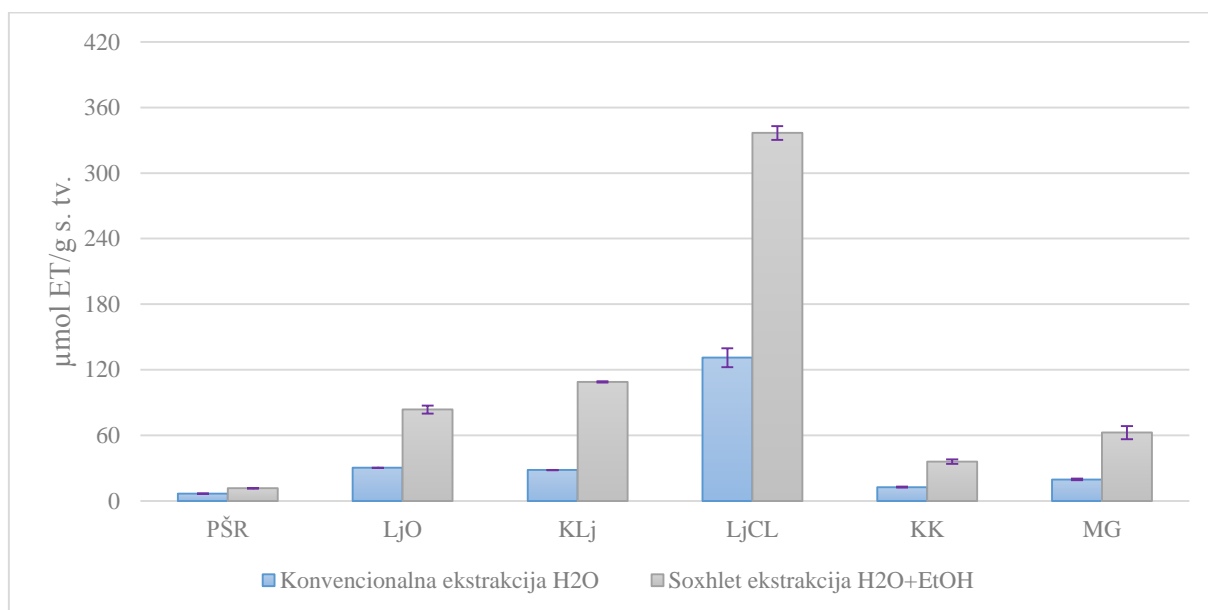
Slika 25. Usporedba udjela (mg EGK/g s. tv.) ukupnih polifenola u različito pripremljenim sekundarnim biljnim sirovinama



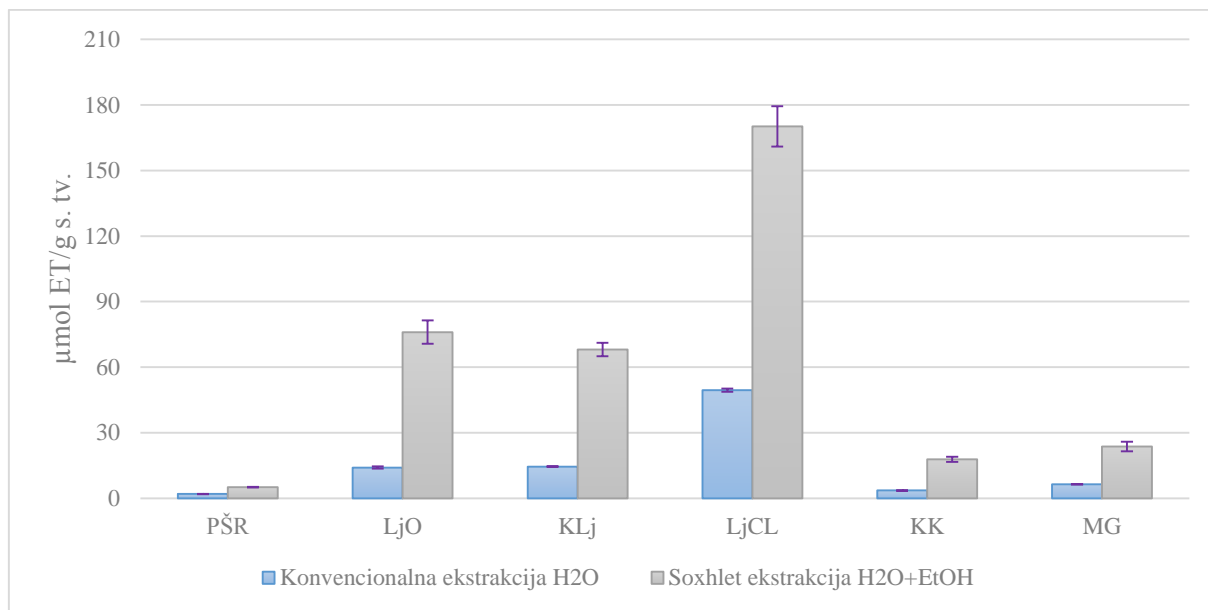
Slika 26. Usporedba udjela (mg EGK/g s. tv.) ukupnih flavonoida u različito pripremljenim sekundarnim biljnim sirovinama



Slika 27. Usporedba udjela (mg EGK/g s. tv.) ukupnih neflavonoida u različito pripremljenim sekundarnim biljnim sirovinama



Slika 28. Usporedba antioksidacijskog kapaciteta (μmol ET/g s. tv.) različito pripremljenih sekundarnih biljnih sirovina, određenog ABTS metodom



Slika 29. Usporedba antioksidacijskog kapaciteta ($\mu\text{mol ET/g s. tv.}$) različito pripremljenih sekundarnih biljnih sirovina, određenog DPPH metodom

Tablica 10. Sastav i udjeli ($\mu\text{g/g}$ s. tv.) fenolnih kiselina, flavonoida i metilksantina u sekundarnim biljnim sirovinama (konvencionalna ekstrakcija)

Spojevi	Uzorak					
	PŠR	LjO	KLj	LjCL	KK	MG
Fenolne kiseline ($\mu\text{g/g}$ s. tv.)						
<i>Kava kiselina</i>	n.d.	n.d.	1,36±0,00	n.d.	28,44±0,61	n.d.
<i>Klorogenska kiselina</i>	n.d.	n.d.	94,07±5,87	287,94±21,23	154,95±9,93	n.d.
<i>Ferulinska kiselina</i>	1,66±0,11	26,35±2,12	n.d.	n.d.	5,86±0,27	n.d.
<i>p-kumarinska kiselina</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,65±0,10	7,03±0,76
Σ derivata hidroksicimetne kiseline	n.d.	80,63±6,11	n.d.	n.d.	46,76±0,52	n.d.
<i>Elaginska kiselina</i>	n.d.	106,23±9,80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Galna kiselina</i>	18,01±1,23	44,92±4,14	224,31±20,19	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Protokatehinska kiselina</i>	n.d.	78,13±5,89	142,38±5,66	3086,22±122,57	n.d.	n.d.
<i>Vanilinska kiselina</i>	6,43±0,64	n.d.	n.d.	76,84±7,86	n.d.	n.d.
Σ derivata hidroksibenzojeve kiseline	n.d.	31,82±2,91	n.d.	n.d.	18,32±1,93	95,62±1,26
Flavonoidi ($\mu\text{g/g}$ s. tv.)						
<i>Kvercetin</i>	n.d.	n.d.	n.d.	2409,48±148,91	n.d.	n.d.
Σ derivata kvercetina	n.d.	49,96±3,94	n.d.	2995,51±189,55	n.d.	143,70±8,94
Σ derivata luteolina	n.d.	n.d.	n.d.	1022,91±83,24	n.d.	n.d.
Metilksantini ($\mu\text{g/g}$ s. tv.)						
<i>Kafein</i>	n.d.	n.d.	454,61±5,01	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Teobromin</i>	n.d.	n.d.	4998,59±382,15	n.d.	n.d.	n.d.
UKUPNO ($\mu\text{g/g}$ s. tv.)	26,10±1,98	418,04±34,91	5915,32±418,88	9878,90±573,36	256,98±13,36	246,35±10,96

* n.d. – nije detektiran

5.4. Pregled sastava suhe tvari ispitivanih sekundarnih biljnih sirovina



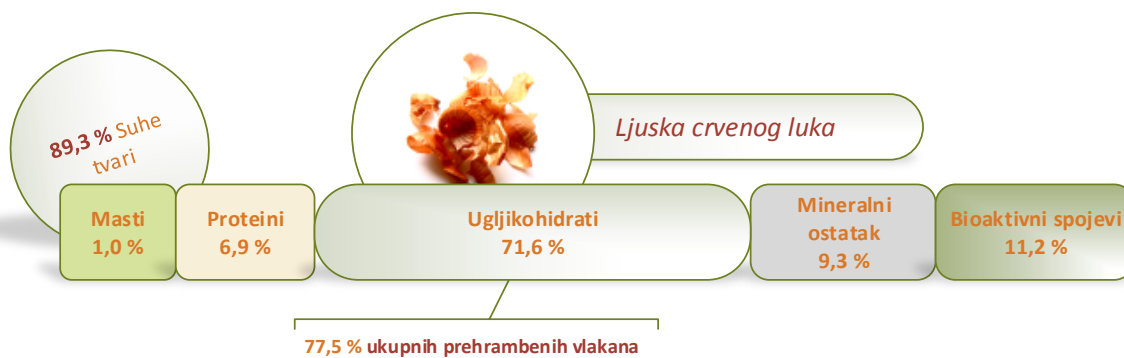
Slika 30. Sastav suhe tvari pulpe šećerne repe



Slika 31. Sastav suhe tvari ljuske oraha



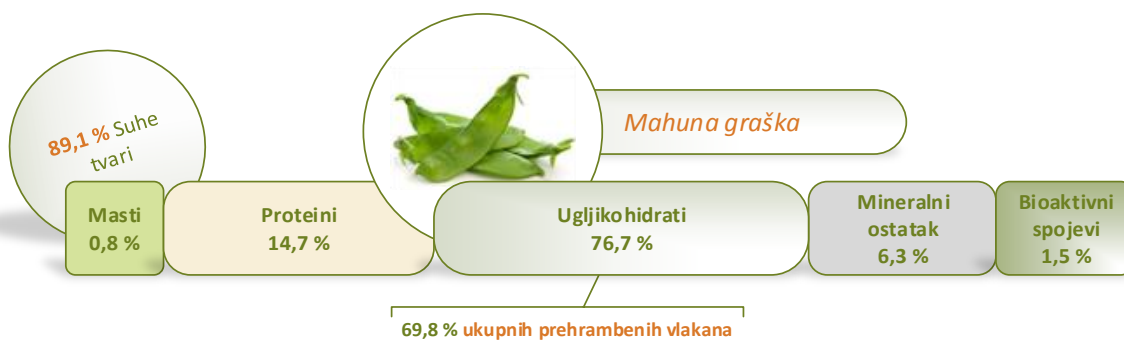
Slika 32. Sastav suhe tvari kakaove ljuske



Slika 33. Sastav suhe tvari ljuske crvenog luka



Slika 34. Sastav suhe tvari kore krumpira



Slika 35. Sastav suhe tvari mahune graška

5.5. Statistička obrada rezultata

Tablica 11. Korelacije rezultata određenih u (Soxhlet ekstrakcija) sekundarnim biljnim sirovinama

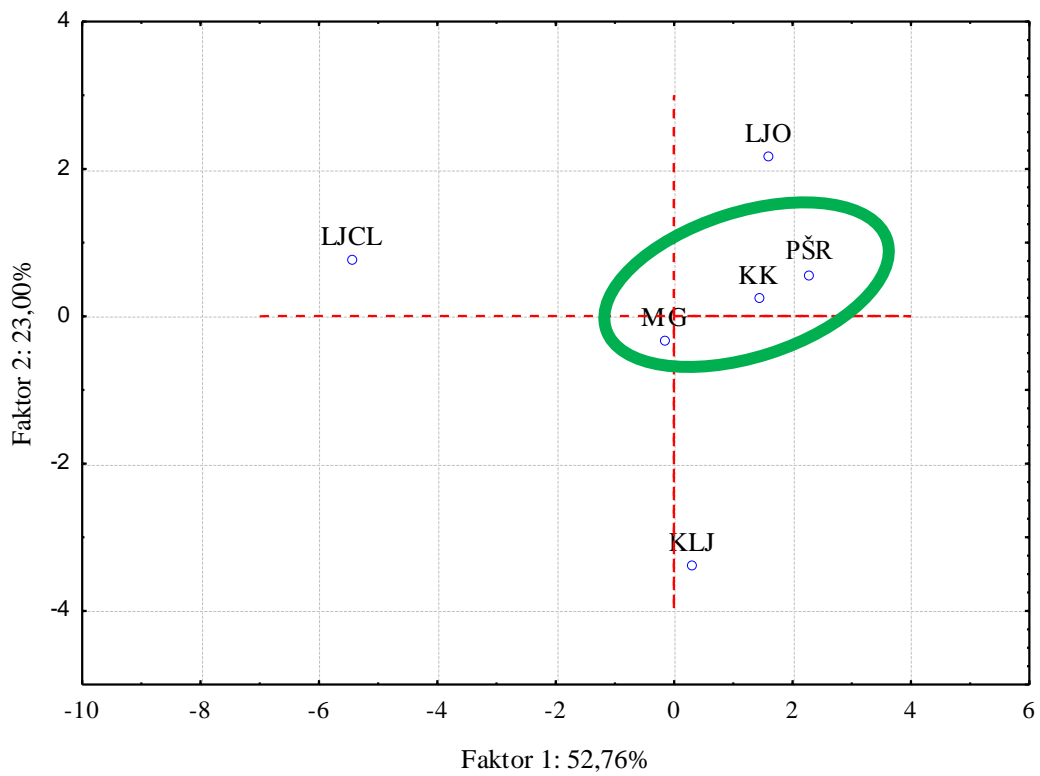
	UP	UF	UNF	ABTS	DPPH
UP	1				
UF	0,9982	1			
UNF	0,9903	0,9802	1		
ABTS	0,9773	0,9770	0,9642	1	
DPPH	0,9115	0,9164	0,8874	0,9690	1

Tablica 12. Korelacije rezultata određenih u (konvencionalna ekstrakcija) sekundarnim biljnim sirovinama

	UP	UF	UNF	ABTS	DPPH
UP	1				
UF	0,9997	1			
UNF	0,9996	0,9985	1		
ABTS	0,9902	0,9895	0,9903	1	
DPPH	0,9917	0,9931	0,9892	0,9928	1

Tablica 13. Rezultati analize glavnih komponenti sa svojstvenim vrijednostima i iznosima varijanci za prve 4 glavne komponente (faktora)

	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5
Svojstvene vrijednosti	7,9135	3,4494	2,7634	0,8143	0,05932
% Ukupne varijance	52,75701	22,99587	18,42281	5,42879	0,39546
<i>Udjel suhe tvari</i>	0,741682	0,067101	-0,560437	0,319964	-0,170113
<i>Udjel masti</i>	-0,194975	-0,897469	-0,392981	-0,039896	-0,022547
<i>Udjel proteina</i>	0,078558	-0,924275	0,357218	-0,104490	-0,031955
<i>Udjel mineralnog ostatka</i>	-0,636189	-0,680721	0,241015	0,271509	0,008791
<i>Udjel ugljikohidratne frakcije</i>	0,185293	0,937976	-0,291588	-0,020641	0,020441
<i>Udjel uk. slobodnih ugh.</i>	-0,439919	0,297825	0,829283	0,170202	-0,033050
<i>Udjel glukoze</i>	-0,670866	0,042457	0,592435	-0,436875	-0,079355
<i>Udjel fruktoze</i>	-0,928619	0,326245	0,122730	-0,115940	-0,052219
<i>Udjel saharoze</i>	0,352412	0,171658	0,748697	0,533759	0,029888
<i>UP</i>	-0,974108	0,171087	-0,085940	0,109203	-0,050314
<i>UF</i>	-0,963233	0,175299	-0,119810	0,139501	-0,087393
<i>UNF</i>	-0,985893	0,158912	-0,005935	0,037190	0,036665
<i>ABTS</i>	-0,965052	0,055390	-0,248654	0,061123	0,006433
<i>DPPH</i>	-0,876717	0,109268	-0,464066	0,018093	0,061186
<i>HPLC</i>	-0,837525	-0,339555	-0,333047	0,265115	0,045257



Slika 36. Grafički prikaz odnosa faktora 1 (PCA1) i faktora 2 (PCA2) za ispitivane sirovine s obzirom na udjel parametara bioaktivnog potencijala



6. RASPRAVA

U ovom radu korišteno je šest sekundarnih biljnih sirovina: pulpa šećerne repe, ljuska oraha, kakova ljuska, ljuska crvenog luka, kora krumpira i mahuna graška. Sirovinama je nakon početne pripreme određen kemijski sastav u svrhu njihove detaljne karakterizacije, pri čemu je poseban naglasak stavljen na karakterizaciju ugljikohidrata. Osim udjela osnovnih nutrijenata, sekundarnim sirovinama je istražen i bioaktivni potencijal analizama udjela polifenola te određivanjem antioksidacijskog kapaciteta. Detaljna karakterizacija ovih sirovina omogućit će njihovo bolje upoznavanje kao visokovrijednih materijala s velikim potencijalom za ponovno iskorištavanje.

6.1. Fizikalno-kemijski parametri sekundarnih biljnih sirovina

6.1.1. Udjel sekundarnih biljnih sirovina

Sekundarne biljne sirovine dobivene su primanom obradom, odnosno uklanjanjem nejestivih dijelova cijelih plodova ili kao nusproizvod iz tehnoloških procesa proizvodnje šećera i čokolade. Osim uzoraka koji su dopremljeni u gotovom obliku, tj. kao sekundarne sirovine (kakova ljuska- ljuska kakaovog zrna i pulpa šećerne repe- osušeni i briketirani rezanci nakon ekstrakcije saharoze), ostali su pripremljeni čišćenjem, pri čemu je određena količina otpada koj nastaje, odnosno udjel sekundarne sirovine u odnosu na cijeli plod (primarnu sirovinu). Rezultati udjela sekundarnih sirovina prikazani su u tablici 5, pri čemu su za pulpu šećerne repe i kakovu ljuskuprikazani literaturni podaci. Iz rezultata je vidljivo da se najmanja količina otpada (10 %) izdvaja prženjem kakaovog zrna, u obliku kakaove ljuske, a najveći čišćenjem plodova graška, gdje odvojene prazne mahune čine više od polovice ukupne mase ploda (52 %). Također, vrlo velika količina otpada dobivena je odvajanjem jezgri oraha od čvrste ljuske. Udjel ljusaka, odnosno kora, koje nastaju čišćenjem glavica crvenog luka i gomolja krumpira kreće se oko 20%.

6.1.2. Udjel suhe tvari

Sekundarne sirovine koje po svojoj prirodi nisu suhe (ljuska oraha) ili nisu dopremljene u suhom obliku (kakova ljuska, pulpa šećerne repe), osušene su radi mikrobiološke stabilizacije, budući da se radi o sirovinama visokog udjela organske tvari, a također i radi lakšeg rukovanja uzorkom prilikom homogenizacije i analiza. Osušanim uzorcima određen je udjel suhe tvari, a rezultati su prikazani tablici 5. Iz rezultata je vidljivo da su sve sirovine osušene do udjela vlage od najviše 10 % što je dovoljno za njihovo čuvanje na suhom mjestu bez opasnosti od promjene kemijskog sastava ili kvarenja.

6.1.3. Raspodjela veličine čestica

Osušene sekundarne biljne sirovine usitnjene sumljevenjem te im je ujednačena veličina čestica prosijavanjem kroz sito veličine pora 450 μm . Sirovine su usitnjene u svrhu što bolje homogenizacije te minimiziranja utjecaja parametra veličine čestica prilikom analiza. Također, usitnjavanjem čestica postiže se veća aktivna površina za izmjenu tvari, što je neophodno za efikasne ekstrakcijske postupke. Raspodjela veličine čestica određena je pomoću Mastersizer 2000 analizatora, a dobiveni parametri (tablica 6) uključuju: Sauterov promjer D [3,2], koji predstavlja specifičnu dodirnu površinu, odnosno ukupnu dodirnu površinu svih čestica podijeljenu s masom uzorka; $d(0,1)$, koji predstavlja promjer čestice od kojeg 10% svih čestica uzorka ima manji promjer; $d(0,5)$, koji predstavlja promjer čestice od kojeg 50 % svih čestica uzorka ima veći promjer i 50% svih čestica uzorka ima manji promjer, te $d(0,9)$, koji predstavlja promjer čestice od kojeg 90 % svih čestica uzorka ima manji promjer. Iz tablice 6 vidljivo je da je postignuta relativno uniformna raspodjela veličine čestica uzoraka prema svim parametrima, čime je potvrđena jednolika usitnjenost svih sirovina.

6.2. Kemijski sastav sekundarnih biljnih sirovina

6.2.1. Udjeli osnovnih nutrijenata

6.2.1.1. Udjel masti

Udjeli masti sekundarnih biljnih sirovina prikazani su na slici 12. Iz rezultata je vidljivo da analizirane sekundarne biljne sirovine općenito sadrže vrlo niske udjele masti. Najniži udjel masti određen je u ljusci oraha, gdje iznosi 4,93 mg/g s. tv., a slijede kora krumpira s 4,98 mg/g s. tv., pulpa šećerne repe s 5,50 mg/g s. tv., mahuna graška s 7,54 mg/g s. tv., ljuska crvenog luka s 9,99 mg/g s. tv. te kakaova ljuska s najvećim udjelom masti, 24,46 mg/g s. tv. Referentni literaturni podaci pokazuju vrijednosti od 1 mg/g za koru krumpira (Singh i Saldana, 2011), 1-2 mg/g sirovine (Sun i Hughes, 1998; Wang i sur., 2002) za pulpu šećerne repe, 13 mg/g s. tv. sirovine za mahunu graška (Meteos-Aparicio i sur., 2010), 5,22 mg/g sirovine za ljusku crvenog luka (Ko i sur., 2011) te 22,7 mg/g sirovine za kakaovu ljusku (Yapo i sur., 2013), što je u skladu s rezultatima dobivenima u ovom radu prema redu veličine.

6.2.1.2. Udjel proteina

Udjel proteina u sekundarnim biljnim sirovinama određen je metodom po Kjeldahl-u, a rezultati su prikazani na slici 13. Iz rezultata je vidljivo da neke sekundarne biljne sirovine sadrže relativno visok

udjel proteina, kao što su kakaova ljuska ($181,50 \pm 1,03$ mg/g s. tv.), i mahuna graška ($146,61 \pm 0,70$ mg/g s. tv.). Najmanji udjel proteina među analiziranim sirovinama sadrži ljuska oraha ($12,88 \pm 1,92$ mg/g s. tv.). Udjeli proteina određeni u ovom radu prema redu veličine su sukladni dostupnim literaturnim podacima koji iznose: 15 g/100g za kakaovu ljusku (Bonvehi i Coll, 1999), 10,8 g/100g s. tv. za mahunu graška (Meteos-Aparicio i sur., 2010), 13,9 % za koru krumpira (Mohdaly i sur., 2010), oko 10 % (Sun i Hughes, 1998; Mohdaly i sur., 2010) za pulpu šećerne repe i 3,98 % za ljusku crvenog luka (Ko i sur., 2011). S obzirom na nedostatak literaturnih podataka o udjelu proteina u ljusci oraha, rezultati su uspoređeni udjelom proteina u ljusci engleskog lješnjaka ($1,3$ g/100g) (Wartelle i Masrhall, 2000).

6.2.1.3. Udjel mineralnog ostatka

Udjel mineralnog ostatka u sekundarnim biljnim sirovinama određen je gravimetrijski nakon suhe mineralizacije uzorka do konstantne mase. Rezultati analize prikazani su na slici 14 te je iz njih vidljivo da udjel pepela uvelike ovisi o vrsti sirovine te za sve analizirane sirovine iznosi manje od 10 %. Najveći udjel određen je u ljusci crvenog luka ($93,48$ mg/g s. tv.), kojeg slijedi kakaova ljuska, također s relativno visokim udjelom, dok je najmanji udjel određen u ljusci oraha (10 mg/g s. tv.). Rezultati dobiveni u ovom radu sukladni su referentni literaturnim podacima udjela mineralnog ostatka u sekundarnim biljnim sirovinama, koji pokazuju vrijednosti od 7,1 % za ljusku crvenog luka (Ko i sur., 2011), 8 % za kakaovu ljusku (Yapo i sur, 2013), 8,48 % za koru krumpira (Mohdaly i sur., 2010), 6,6 g/100 g za mahunu graška (Meteos-Aparicio i sur., 2010), 3,7 % za pulpu šećerne repe (Sun i Hughes, 1998) te 1,1 g/100 g za ljusku engleskog lješnjaka (Wartelle i Marshall, 2000) (s obzirom na nedostatak literaturnih podataka za ljusku oraha).

6.2.1.4. Udjel sirove ugljikohidratne frakcije

Udjel sirove ugljikohidratne frakcije sekundarnih biljnih sirovina određen je indirektno, uz pretpostavku da se organski materijal u biljnim sirovinama sastoji od 4 osnovne skupine: masti, proteina, ugljikohidrata i mineralnog ostatka. Prema tome, udjeli ugljikohidratne frakcije izračunati su oduzimanjem udjela masti, proteina i mineralnog ostatka određenih u suhoj tvari od 100 %, te su prikazani na slici 15. Naziv sirova ugljikohidratna frakcija koristi kako bi se istaknuo kompleksni i prvenstveno nepročišćeni sastav ove frakcije, budući da je indirektno određena. Iz rezultata je vidljivo da je sirova ugljikohidratna frakcija u analiziranim sirovinama udjelom najdominantnija, s prosjekom udjela od 82,9 % suhe tvari sirovina, što nije iznenađujuće obzirom na biljno podrijetlo istih. Najveći udjel sirove ugljikohidratne frakcije sadrži ljuska oraha ($972,01$ mg/g s. tv.), zatim pulpa šećerne repe

(856,34 mg/g s. tv.), ljuska crvenog luka (827,34mg/g s. tv.), kora krumpira (828,01 mg/g s. tv.), mahuna graška (782,89 mg/g s. tv.) te kakaova ljuska (702,99 mg/g s. tv.). Literaturni podaci za udjel ugljikohidrata pulpe šećerne repe pokazuju slične vrijednosti dobivenima u ovom istraživanju: 78,9 % (Sun i Hughes, 1998) te 75-80 % (Michel i sur., 2006). Što se tiče ljuske crvenog luka, referentni literaturni podaci pokazuju puno niže vrijednosti udjela ukupnih ugljikohidrata, 47,6 % (Ko i sur., 2011), a mogući razlog tome je razlika u sastavu sekundarnih sirovina, budući da je u ovom radu sirovina ljuske luka sadržavala i znatan udjel otpadne pulpe te vršne dijelove ploda i korjenčiće, za razliku od materijala u radu Ko i sur. (2011), gdje je korištena samo vanjska crvena suha ljuska. Za koru krumpira također su pronađene niže vrijednosti udjela ugljikohidrata, 56,2 % (Mohdaly i sur., 2010), međutim, te vrijednosti su izražene na ukupnu masu sirovine i pri tome su rezultati prividno manji u odnosu na rezultate izražene na suhu tvar uzorka (kako je prikazano u ovom radu), zbog udjela vode. Podaci za mahunu graška (Meteos-Aparicio i sur., 2010) pokazuju udjel od 81,3 %, što je u skladu s rezultatima dobivenima u ovom radu, dok su referentni literaturni podaci za kakaovu ljusku nešto viši (80 % prema Yapó i sur. (2013)).

Obzirom da ugljikohidratna frakcija potječe uglavnom iz staničnih stijenci biljnih materijala, gdje se nalazi u vrlo kompleksnim strukturama, provedene su daljnje analize ove frakcije u svrhu dobivanja detaljnijeg uvida u sastav i prirodu ugljikohidratnih komponenata koje ju sačinjavaju. Detaljna karakterizacija također je važna i sa potencijalno funkcionalnog aspekta, čime se omogućava bolje poznavanje ugljikohidratnog sastava sirovine kako bi se lakše mogli optimirati tehnološki postupci pripreme i izdvajanja funkcionalnih ugljikohidratnih jedinica, kao što su oligosaharidi s prebiotičkim svojstvima. Karakterizacija sirove ugljikohidratne frakcije provedena je na temelju enzimske i kiselinske hidrolize te ekstrakcije sirovina u polarnim otapalima do iscrpljenja.

6.2.2. Sastav sirove ugljikohidratne frakcije sekundarnih biljnih sirovina

Određivanje udjela i sastava polisaharida u biljnim materijalima predstavlja analitički izazov zbog njihove prirode i biološke uloge, koje uvjetuju kompleksne strukture u staničnoj stijenci. Analitički postupci za određivanje polisaharida zbog toga zahtijevaju pročišćavanje kompleksnih matriksa (kao što je biljni) kako bi se materijal što bolje pripremio za analize. U ovom radu su u tu svrhu korištene uzastopne ekstrakcije petroleterom, vodom i etanolom u aparaturi po Soxhletu, nakon čega je dobivena sirovafrakcijapolisaharida koja je zatim korištena za daljnje analize sastavaistih, dok su se u ekstraktima (vodenim i etanolnim) izdvojili slobodni ugljikohidrati. Također, u ovom radu su polisaharidi određeni i kao vlakna, selektivnim izdvajanjem primjenom enzima.

6.2.2.1. Udjel netopljivih i topljivih vlakana - enzimska hidroliza

Enzimskom hidrolizom sekundarnih biljnih sirovina, ugljikohidratna frakcija karakterizirana je obzirom na udjel netopljivih i topljivih vlakana. Dobiveni rezultati preračunati su na udjel u sirovoj ugljikohidratnoj frakciji (slike 16-21), a ukazuju na udjel polisaharida u uzorcima. Iz prikazanih rezultata može se vidjeti da je u svim uzorcima dominantan udjel netopljivih vlakana koji je višestruko veći od udjela topljivih vlakana, karakteristično za svaku pojedinu sirovinu. Ljuska oraha sadrži najveći udjel netopljivih vlakana (93,6 %) što je u skladu s visokim udjelima lignina, celuloze i hemiceluloze (Kar, 2011). Također, ova sirovina sadrži najmanji udjel topljivih vlakana (2,6%). Najmanji udjel netopljivih vlakana sadrži kora krumpira (46,9 %), međutim, ova sirovina sadrži značajan udjel topljivih vlakana (15,9 %). Zbog nedostatka literaturnih podataka, usporedba s referentnim vrijednostima u ovom slučaju nije moguća. Pulpa šećerne repe ističe se najvećim udjelom topljivih vlakana od 29,6 %, te s najmanjim omjerom topljivih i netopljivih vlakana koji iznosi 1,92 u korist netopljivih vlakana. Prema literaturnim podacima, sadržaj polisaharida u pulpi šećerne repe je sljedeći: 22-30 % celuloze, 25-30 % hemiceluloze (uglavnom arabinani i (arabino) galaktani) i 25 % pektina, što odgovara dobivenim rezultatima uz pretpostavku da se topljiva vlakna sastoje pretežito od pektina, a netopljiva od celuloze i hemiceluloze. Kakaova ljuska, osim što sadrži visoki udjel netopljivih vlakana (76,0 %), bogat je izvor i topljivih vlakana (21,0 %). Udjel netopljivih vlakana ove sirovine 3,62 puta je veći od topljivih, što se može usporediti s rezultatima Yapo i sur. (2013), koji su odredili omjer 4,17 u korist netopljivih vlakana. Rezultati udjela vlakana za mahunu graška pokazuju 65,5 % netopljivih i 4,3 % topljivih vlakana, što je u skladu s rezultatima Mateos-Aparicio i sur. (2010), gdje je dobiveni udjel netopljivih vlakana iznosio 54,5 %, a udjel topljivih vlakana 4,2 %. Nešto viši udjeli određeni su za sirovinu kakaove ljuske, 70,1 % za netopljiva i 7,4 % za topljiva vlakna.

6.2.2.2. Udjel i sastav slobodnih ugljikohidrata - ekstrakcija polarnim otapalima

Sirova polisaharidna frakcija pripremljena je odmašćivanjem sekundarnih biljnih sirovina petroleterom, nakon čega je uslijedila uzastopna ekstrakcija polarnim otapalima, vodom i etanolom, u aparaturi po Soxhletu, kako bi se izdvojili slobodni ugljikohidrati (polarni spojevi). Analizom dobivenih vodenih i etanolonih ekstrakata HPLC tehnikom s RI detekcijom određen je sastav i udjel istih, a rezultati su prikazani u tablici 7. Iz rezultata je vidljivo da slobodne ugljikohidrate sačinjavaju 3 komponente: glukoza, fruktoza i saharoza, pri čemu njihovi udjeli u suhoj tvari uvelike ovise o vrsti sirovine. Vodenom ekstrakcijom izdvojeno je više slobodnih ugljikohidrata nego etanolnom, međutim to ne govori o selektivnosti otapala, već je razlog tome redoslijed ekstrakcija (ekstrakcije su bile uzastopne).

Ukupno najviše ekstraktibilnih ugljikohidrata određeno je u ljusci crvenog luka (92,25 mg/g s. tv.), a slijede ih uzorci mahune graška (86,34 mg/g s. tv.), kore krumpira (80,80 mg/g s. tv.), pulpe šećerne repe (62,57 mg/g s. tv.), ljuske oraha (13,47 mg/g s. tv.) i kakaove ljuske (5,76 mg/g s. tv.) kao sirovine u kojoj je određen najmanji udjel slobodnih ugljikohidrata. Ove vrijednosti slijede udjele slobodnih ugljikohidrata u sirovoj ugljikohidratnoj frakciji, redom: 11,1 % (LjCL), 11 % (MG), 9,8 % (KK), 7,3 % (PŠR), 2,6 % (LjO) i 0,8 % (KLj) (slike 16-21), što je dobar pokazatelj da se za većinu sirovina ove komponente ne mogu zanemariti, odnosno, time se potvrđuje opravdanost ekstrakcija u svrhu pročišćavanja sirovina za daljnje analize. Razmatrajući pojedinačne komponente slobodnih ugljikohidrata, iz tablice 7 može se vidjeti da mahuna graška sadrži najviši udjel glukoze (33,24 mg/g s. tv.), što je primjenjivo i za ljuskucrvenog luka (27,22 mg/g s. tv.). Ljuska oraha jedina je sirovina u kojoj nije detektirana glukoza, dok se u slučaju kakaove ljuske sva glukoza ekstrahirala već tijekom prve ekstrakcije (vodene). Najviši udjel fruktoze određen je u ljusci crvenog luka (50,68 mg/g s. tv.). Saharozu je određena u najvišem udjelu u kori krumpira (68,91 mg/g s. tv.), a slijedi ju pulpa šećerne repe s udjelom od 52,49 mg/g s. tv., odnosno otprilike 5 % na suhu tvar osušenih i briketiranih rezanaca, što predstavlja udjel neekstrahirane saharoze koji zaostaje prilikom proizvodnje konzumnog šećera.

6.2.2.3. Udjel i sastav polisaharida - kiselinska hidroliza

Sirove polisaharidne frakcije sekundarnih biljnih sirovina (dobivene nakon odmašćivanja i ekstrakcije polarnim otapalima) podvrgnute su postupku hidrolize sa sumpornom kiselinom, prilikom čega dolazi do neselektivnog cijepanja glikozidnih veza unutar polisaharida te oslobađanja i solvatacije monosaharidnih jedinica koje ih sačinjavaju. Nakon hidrolize, dobiveni monosaharidi se izdvajaju u topljivom dijelu u obliku filtrata, dok se u kiselini netopljivi ostatak izdvaja kao talog na filteru. Prema rezultatima prikazanim na slici 22 vidljivo je da postoje velike razlike u udjelima ostatka netopljivog u kiselini, a najveći udjeli određeni su za uzorke ljuske oraha ($348,18 \pm 2,85$ mg/g s. tv.), kakove ljuske ($259,12 \pm 17,42$ mg/g s. tv.) i mahune graška ($110,01 \pm 2,74$ mg/g s. tv.), dok su za preostale uzorke udjeli istih iznosili manje od 5 % suhe tvari početne sirovine.

Tankoslojna kromatografija visoke učinkovitosti (HPTLC) pokazala se kao dobra tehnika za razdvajanje monosaharidnih komponenata u neutralnim hidrolizatima, pri čemu su kromatografski uvjeti optimirani u svrhu što boljeg razdvajanja, kojim se omogućuje i točnija kvantifikacija. S obzirom na strukturnu sličnost nekih monosaharida, selektivnost je bilo teško postići, pri čemu se postupak impregnacije silika gel ploče s natrijvim dihidrogenfosfatom, nakon utvrđivanja optimalnog sastava otapala za razvijanje, pokazao vrlo učinkovitim u tu svrhu. Rezultati tankoslojne kromatografije omogućili su uvid u sastav hidroliziranih polisaharida (slika 23) te izračun udjela pojedinih

identificiranih monosaharida, odnosno određivanje izračunatog udjela polisaharida (slika 24). HPTLC tehnikom uz postkromatografsku derivatizaciju identificirano je ukupno 5 monosaharida i 1 uronska kiselina: galaktoza, glukoza, manoza, arabinoza i ksiloza te galakturonska kiselina, od čega su galakturonska kiselina, galaktoza i glukoza zajednički konstituenti za sve sekundarne sirovine, dok se manoza, arabinoza i ksiloza pojavljuju samo u nekima (slika 23). Relativni odnosi, odnosno zastupljenost monosaharidnih jedinica, značajno variraju u ovisnosti o vrsti sirovine. Obzirom na kompleksni sastav teško se temeljem ovih podataka može zaključiti o točnim udjelima polisaharida poput celuloze, hemiceluloze i pektina, međutim, njihova prisutnost može se procijeniti obzirom na pojedine monosaharidne frakcije. Analizom sastava monosaharida utvrđen je dominantan udjel glukanske frakcije, zastupljene u prosjeku oko 76 % (s izuzetkom uzorka pulpe šećerne repe- 65 % i kore krumpira- 95,5 %). Visoki udjel glukanske frakcije (njegov najvećeg dijela) može također indicirati dominantnu prisutnost celuloze, izuzev uzorka kore krumpira, kod kojeg se pretpostavlja da glukanska frakcija potječe pretežno od škroba, budući da kora sadržava i značajan udjel pulpe, za koju je poznato da obiluje ovim polisaharidom. Hemiceluloza i pektin su heteropolimeri za razliku od celuloze i sadržavaju nekoliko vrsta monosaharida u međusobno različitim omjerima, što znatno otežava njihovoodređivanje iz monosaharidnog sastava, međutim, njihova prisutnost može se procijeniti iz udjela galakturonske kiseline i ksiloze kao najzastupljenijih komponenata. Na slici 23 može se vidjeti da uzorak pulpe šećerne repe, uz glukansku frakciju, obiluje arabinanskom i galakturanskom frakcijom. Za ljusku oraha utvrđeno je da sadržava najveći udjel ksilanske frakcije, a slijedi ju uzorak mahune graška. Osim već navedene pulpe šećerne repe, sirovine kakaove ljuske, ljuske crvenog luka i mahuna graška također imaju relativno visoku zastupljenost galakturonske kiseline, s ljuskom crvenog luka kao najbogatijim izvorom (20,2 %).

Na slici 24 prikazani su teorijski i izračunati udjeli polisaharida u suhoj tvari pojedinih sekundarnih biljnih sirovina. Teorijski udjel izračunat je indirektno bilanciranjem raspodjele suhe tvari prilikom kiselinske hidrolize i prema tome je dobiven kao razlika mase suhe tvari koja ulazi u hidrolizu i mase ostatka netoljivog u kiselini. Izračunati udjel određen je kao zbroj kvantificiranih monosaharidnih komponenata u neutralnim hidrolizatima. Iz dobivenih rezultata može se vidjeti da je izračunati udjel polisaharida, osim u slučaju ljuske oraha i kore krumpira, niži ili približno jednak teorijskom. To se može objasniti različitom podložnosti pojedine sirovine hidrolitičkim uvjetima, koji su uključivali nisku pH-vrijednost, povišeni temperaturu (121 °C) i povišeni tlak (>1bar nadtlaka). Uzevši u obzir da različiti polisaharidi mogu biti manje ili više otporni na navedene hidrolitičke uvjete, te obzirom na različit polisaharidni sastav sirovina (što je vidljivo iz različitog sastava monosaharida nakon hidrolize), za uzorke koji pokazuju nižu izračunatu vrijednost polisaharida od teorijske, može se pretpostaviti da je tijekom hidrolize pri zadanim uvjetima došlo do daljnje razgradnje oslobođenih monomera, što se posljedično manifestira kao kvantitativni gubitak monosaharida. Budući da se prilikom hidrolize događa adicija molekule vode na mjesu glikozidne veze, suma oslobođenih glikozilnih ostataka ima veću masu

nego odgovarajući polisaharid. Prema tome, kada uvjeti hidrolize ne pridonose stvaranju degradativnih produkata hidrolize monosaharida, njihovom kvantifikacijom na odgovarajući polisaharid se dobiva udjel veći od 100%, u ovom radu vidljivou slučaju sirovina ljuske oraha i kore krumpira. Također, usporedbom teorijskog udjela polisaharida (slika 24) i udjela sirove ugljikohidratne frakcije (slika 15), može se vidjeti da su vrijednosti za udjel sirovih ugljikohidrata veće, što je u skladu s obzirom na rezultate udjela slobodnih ugljikohidrata, koji su uklonjeni prilikom pripreme uzoraka za kiselinu hidrolizu.

6.3. Biološki aktivni spojevi u sekundarnim biljnim sirovinama

Soxhlet ekstrakcija vodom i etanolom provedena je primarno u svrhu izdvajanja slobodnih ugljikohidrata, ali s obzirom na neselektivnost korištenih otapala, izdvojene su i druge polarne komponente. Kao najzanimljivijameđu njima, je skupina polifenolnih spojeva, sekundarnih biljnih metabolita za koje je poznata znakovita biološka aktivnost, u prvom redu kao snažnih antioksidansa. Zbog toga je u vodenim i etanolnim ekstraktima određen udjel ukupnih polifenola, flavonoida i neflavonoida reakcijama s Folin-Ciocalteu reagensom, zatimsastav polifenolnih spojeva HPLC-PDA metodom te antioksidacijski kapacitet ABTS i DPPH metodama.

S obzirom da se radi o spojevima od velike biološke važnosti, ispitane su i druge ekstrakcijske tehnike kako bi poslužile za usporedbu ekstrakcijskih učinkovitosti i utvrdile smjernice za optimizaciju postupka ekstrakcije polifenolnih spojeva iz sekundarnih biljnih sirovina.

6.3.1. Udjeli ukupnih polifenola, flavonoida i neflavonoida

Udjeli ukupnih polifenola, neflavonoida i flavonoida usekundarnim biljnim sirovinama, dobivenih Soxhlet ekstrakcijama, prikazani su u tablici 8.

Najveći udjel ukupnih polifenola koji se ekstrahiraju uzastopnim Soxhlet ekstrakcijama vodom i etanolom određen je u ljusci crvenog luka ($17,5 \pm 1,09$ mg EGK/g s. tv. u vodenom i $49,34 \pm 4,21$ mg EGK/g s. tv. u etanolnom ekstraktu), što je ujedno daleko najveći udjel u odnosu na druge sirovine. Najmanji udjel određen je u pulpi šećerne repe, a poredak ostalih sirovine prema ukupnom udjelu ukupnih polifenola prikazan je padajućim nizom: $MG > LjO \geq KLj > KK$. Obzirom da se prilikom Soxhlet ekstrakcija biljni material ekstrahirao uzastopno, odnosno ekstrakcija etanolom slijedila je nakon ekstrakcije vodom iz istog uzorka, u pravilu su dobivene niže vrijednosti udjela ukupnih

polifenola u etanolnim ekstraktima, s iznimkama ljuske crvenog luka i kore krumpira. Niže vrijednosti nisu neuobičajene obzirom da je sekundarna ekstrakcija provedna na djelomično iscrpljenim uzorcima, međutim, više vrijednosti upućuju na bolju selektivnost etanola kao otapala za ekstrakciju nekih polifenolnih spojeva. Literaturni podaci pokazuju različite vrijednosti udjela ukupnih polifenola u nekim sekundarnim biljnim sirovinama. Tako su Martinez i sur. (2012) odredili 206,67 do 227,00 mg EGK/100 g s. tv. u uzorku kakaove ljuske, dok su Yapo i sur. (2013) u istoj sirovini određivali ukupne polifenole u ekstraktima dobivenima sa četiri različita organska otapala (aceton, kloroform, etanol, metanol) i odredili ukupno 68,93 mg EGK/g s. tv. uzorka. Ukupne polifenole u kori različitih sorti krumpira su određivali Al-Weshahy i Rao (2009) pripremom metanolnih ekstrakata te su dobili rezultate u rasponu od 1,51 do 3,32 mg EGK/g s. tv. uzorka, dok su Mohdaly i sur. (2009) u metanolnim ekstraktima kore krumpira dobili rezultate udjela od 2,91 mg EGK/g s. tv. uzorka te 1,79 mg EGK/g s. tv. uzorka za pulpu šećerne repe. Rezultati dobiveni u ovom radu uglavnom su sukladni rezultatima prethodnih istraživanja, a neka neslaganja, kao u primjeru kakaove ljuske, mogu se pripisati različitim ekstrakcijskim uvjetima te biološkim karakteristikama sirovine i njezinoj pripremi, što zasigurno ima presudnu ulogu u konačnom ekstrakcijskom iskorištenju.

Udjeli ukupnih flavonoida ekstrahiranih vodom i etanolom dobro koreliraju s udjelom ukupnih polifenola te je prema tome najveća vrijednost određena u ljusci crvenog luka (11,79±1,08 mg EGK/g s. tv. za vodeni ekstrakt i 33,39±3,68 mg EGK/g s. tv. za etanolni ekstrakt), što ujedno čini otprilike 68% ukupnih polifenola. Manja odstupanja u korelaciji s ukupnim polifenolima vidljiva su slučaju mahuna graška te ljuske oraha i kakaove ljuske, gdje je u zadnjim sirovinama određen viši udjel ukupnih flavonoida, što govori o većoj zastupljenosti istih u ukupnim polifenolima. Najmanji udjel ukupnih flavonoida određen je u pulpi šećerne repe i kori krumpira. Jednako kao i kod ukupnih polifenola, vodeni ekstrakti pokazuju veće vrijednosti udjela flavonoida, osim za ljusku crvenog luka, što ukazuje na bolju selektivnost etanola kao ekstrakcijskog otapala za izolaciju flavonoida iz ove sirovine.

Budući da su ukupni flavonoidi određeni indirektno iz udjela ukupnih polifenola i ukupnih neflavonoida, odnos između ove 3 veličine direktno je povezan, a obzirom na utvrđenu dobru korelaciju ukupnih flavonoida i polifenola, isti trendovi promjene udjela u ovisnosti o vrsti sirovine mogu se primijeniti i na ukupne neflavonoide (tablica 8).

6.3.2. Antioksidacijski kapacitet

Rezultati antioksidacijskog kapaciteta, određenog ABTS i DPPH metodama u vodenim i etanolnim Soxhlet ekstraktima sekundarnih biljnih sirovina, prikazani su u tablici 8. Iz rezultata je vidljivo da najveći antioksidacijski kapacitet, prema ABTS metodi, ima ljuska crvenog luka i to

238,34±5,68 $\mu\text{mol ET/g s. tv.}$ za etanolni ekstrakt i 98,30±0,75 $\mu\text{mol ET/g s. tv.}$ za vodeni ekstrakt. Isti poredak dobiven je i za rezultate određene DPPH metodom, s vrijednostima 43,52±3,13 $\mu\text{mol ET/g s. tv.}$ za vodeni ekstrakt ljuske crvenog luka i 126,69±6,10 $\mu\text{mol ET/g s. tv.}$ za etanolni ekstrakt ljuske crvenog luka, kao najvećih vrijednosti, te 2,82±0,05 $\mu\text{mol ET/g s. tv.}$ za vodeni ekstrakt pulpe šećerne repe i 2,34±0,10 $\mu\text{mol ET/g s. tv.}$ za etanolni ekstrakt pulpe šećerne repe, kao najmanjih vrijednosti. Općenito, rezultati antioksidacijskog kapaciteta vrlo dobro koreliraju s udjelima ukupnih flavonoida i ukupnih polifenola (tablica 11). Iako su vrijednosti dobivene DPPH metodom nešto niže od onih koje su dobivene ABTS metodom, korištene metode „gašenja“ slobodnih radikala pokazuju jednake trendove promjene antioksidacijskog kapaciteta za različite sirovine. Manje nepravilnosti u korelaciji antioksidacijskog kapaciteta i udjela ukupnih polifenola, mogu se primijetiti za uzorke ljuske oraha i kakove ljuske, gdje je određen veći antioksidacijski potencijal etanolnih ekstrakata iako je u istima određeno manje ukupnih polifenola. Takva odstupanja prvenstveno su uvjetovana kompleksnošću ekstrakata i različitom selektivnošću korištenih reagensa. Prema dostupnim literaturnim podacima vidljiva je sukladnost rezultata dobivenih u ovom radu s prethodnim istraživanjima. Yapo i sur. (2013) određivali su ukupni antioksidacijski kapacitet ABTS metodom u kakaovoj ljusci i dobili rezultate vrlo slične ovom istraživanju, 51,87 $\mu\text{mol ET/g s. tv.}$ uzorka, dok su Martinez i sur. (2012) su u ekstraktima kakove ljuske odredili antioksidacijski kapacitet DPPH metodom u rasponu od 18,40 do 21,37 $\mu\text{mol ET/g s. tv.}$ Al-Weshahy i Rao (2009) su u ekstraktima kore različitih sorti krumpira odredili antioksidacijski kapacitet ABTS metodom u rasponu od 0,28 do 0,55 mmol ET/g s. tv. uzorka.

6.3.3. Sastav i udjel pojedinačnih polifenolnih spojeva i metilksantina

Rezultati HPLC analize ukupno ekstrahiranih polifenolnih spojeva i metilksantina uzastopnim ekstrakcijama vodom i etanolom u aparaturi po Soxhletu, prikazani su u tablici 9.

Najmanja raznolikost i udjel polifenolnih spojeva određena je za uzorak šećerne repe, što je u skladu s najnižim udjelima ukupnih polifenola određenih Folin-Ciocalteu metodom. Od pojedinačnih spojeva identificirane su jedino fenolne kiseline: ferulinska, galna i vanilinska kiselina, od kojih je najviše zastupljena bila upravo galna kiselina (23,63±0,24 $\mu\text{g/g s. tv.}$). Referentni literaturni podaci također pokazuju prisutnost ferulinske (Schieber i sur., 2001) i vanilinske kiseline u ovoj sirovini, s tom razlikom da je vanilinska kiselina određena kao dominantna. Sun i Hughes (1998) također navode prisutnost p-kumarinske kiseline i derivata hidroksibenzojevih kiseline, međutim, u ovom radu ti spojevi nisu detektirani.

U ekstraktima ljuske oraha identificirane su fenolne kiseline i neki flavonoidi (tablica 9). Od fenolnih kiselina određene su: kava kiselina, derivati hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina te

elaginska, galna i protokatehinska kiselina. Detektirani flavonoidi izraženi su kao derivati kvercetina. Iz navedenih rezultata je vidljiva najveća zastupljenost elaginske kiseline, naspram svih spojeva, koja je ujedno pronađena samo u ovom uzorku. Prema literaturi (Oliveira i sur., 2008), ljuska oraha obiluje vanilinskom i ferulinskom kiselinom, koje nisu detektirane u ovom radu, ali su određene kava, elaginska i protokatehinska kiselina, sukladno navedenom istraživanju.

Dominantan polifenolni spoj u kakovoj ljusci je galna kiselina ($374,33 \pm 1,93 \mu\text{g/g s. tv.}$), koja je ujedno i najbogatiji izvor iste među analiziranim sirovinama. Osim galne kiseline, kakaova ljuska sadrži još i kava, klorogensku i protokatehinsku kiselinu. Uzorak kakaove ljuske jedini sadrži metilksantine teobromin i kafein koji su zastupljeni u značajnom udjelu ($6979,60 \pm 108,21 \mu\text{g/g s. tv.}$ teobromina i $821,31 \pm 11,51 \mu\text{g/g s. tv.}$ kafeina). Literaturni podaci navode brojne polifenolne spojeve sadržane u kakaovom plodu, međutim, kakaova ljuska posebno nije dovoljno istražena u tom smislu. Podaci Vriesmanna i sur. (2011) navode prisutnost metilksantina teobromina i kafeina u kakovoj ljusci, a upravo visoki udjel ovih spojeva može biti razlog povećanog antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na udjel ukupnih polifenola (tablica 8). Ljuskacrvenog luka obiluje protokatehinskom kiselinom ($3772,14 \pm 79,97 \mu\text{g/g s. tv.}$) te je najbogatiji izvor flavonoida među analiziranim sirovinama, od kojih se posebno ističe kvercetin ($552,73 \pm 17,11 \mu\text{g/g s. tv.}$) i njegovi derivati ($8117,06 \pm 465,64 \mu\text{g/g s. tv.}$), dok su derivati luteolin zastupljeni u manjem udjelu. Dobiveni rezultati sukladni su referentnim literaturnim podacima (Benitez i sur., 2011; Crozier i sur., 2006) gdje je pronađen veći udjel flavonoida, od toga najviše kvercetina. Od ostalih spojeva, određeni su derivati hidroksibenzojevih kiselina te vanilinska kiselina. Rezultati HPLC analize ljuske crvenog luka koreliraju s najvišim udjelima flavonoida i ukupnih polifenola određenih reakcijom s Folin-Ciocalteu reagensom.

Kora krumpira ima najraznolikiji profil fenolnih kiselina naspram ostalih uzoraka. Od toga je najviše određeno derivata hidroksicimetnih kiselina ($932,87 \pm 15,85 \mu\text{g/g s. tv.}$) te klorogenske kiseline ($872,64 \pm 3,17 \mu\text{g/g s. tv.}$), dok su ostale, poput kava kiseline, ferulinske, protokatehinske kiseline, p-kumarinske i vanilinske kiseline, zastupljene u manjem udjelu. Od flavonoida su određeni jedino derivati kvercetina. Druga istraživanja (Friedman, 1997; Singh i Saldana, 2011) pokazuju također pretežito fenolne kiseline (klorogenska, protokatehinska, kava, galna, kumarinska, ferulinska, vanilinska i p-hidroksibenzojeva kiselina), od kojih su sve određene u ovom radu, osim galne i p-hidroksibenzojeve kiseline.

Mahuna graška ne sadrži visoke udjele polifenolnih spojeva. Međutim, najviše je određeno flavonoida, izraženih kao derivati kvercetina ($124,42 \pm 7,34 \mu\text{g/g s. tv.}$), a od ostalih spojeva uglavnom fenolne kiseline kao što su protokatehinska, p-kumarinska i vanilinska kiselina te derivati hidroksibenzojevih kiselina.

6.3.4. Usporedba konvencionalne i Soxhlet ekstrakcije

U svrhu usporedbe rezultata i određivanja uspješnosti Soxhletekstrakcija, provedena je referentna ekstrakcija vodom (konvencionalna ekstrakcija). Rezultati ukupnih polifenola, flavonoida, neflavonoida te antioksidacijskog kapacitetarazličito pripremljenih ekstrakata sekundarnih biljnih sirovina prikazani su na slikama 25-29.

Iz rezultata je vidljivo da su konvencionalnom ekstrakcijom dobiveni znatno niži udjeli ukupnih polifenola, flavonoida i neflavonoida u svim uzorcima, a sukladno tome, u konvencionalnim ekstraktima određen je znatno niži antioksidacijski kapacitet. Iako su vrijednosti niže, zadržan je relativan odnos udjela za sve sirovine pa je tako i za konvencionalo pripremljene ekstrakte u ljusci crvenog luka određen najviši udjel ukupnih polifenola, flavonoida i neflavonoida te najjači antioksidacijski potencijal, dok je konvencionalo pripremljen ekstrakt pulpe šećerne repe sadržavao najmanje udjele navedenih spojeva i, sukladno tome, pokazivao najniži antioksidacijski kapacitet. Što se tiče ostalih sirovina, jedino konvencionalno pripremljeni ekstrakti kakaove ljuske pokazuju najbližnje vrijednosti Soxhlet ekstraktima. Rezultati analize pojedinačnih polifenolnih spojeva i metilksantina u konvencionalnim ekstraktima pokazuju znatno manji ukupni udjel ukupnih biološki aktivnih spojeva za sve uzorke (tablica 10), s time da neki pojedinačni spojevi nisu niti detektirani u ovim ekstraktima. Rezultati HPLC analiza bili su očekivani obzirom na pokazatelje iz spektrofotometrijskih analiza.

Dobiveni rezultati indiciraju da većoj uspješnosti ekstrakcije, u smislu količine ekstrahiranih biološki aktivnih spojeva, pogoduju kontinuirani uvjeti uz stalnu izmjenu otapala, produljeno trajanje ekstrakcije te primjena različitih otapala. Iako se Soxhlet ekstrakcija pokazala boljom, konvencionalna ekstrakcijska tehnika, obzirom na svoju jednostavnost, ima veliki potencijal za optimizaciju kojom bi se moglo dobiti dobro kompromisno rješenje između utroška energije, otapala i vremena uz zadovoljavajući ekstrakcijski učinak.

6.4. Statistička obrada rezultata

6.4.1. Korelacije rezultata određenih u vodenim i etanolnim ekstraktima (Soxhlet ekstrakcija)

Svi rezultati određivanja ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida i ukupnih neflavonoida te antioksidacijskog kapaciteta ABTS i DPPH metodom pokazuju visok stupanj korelacije (tablica 11). Najviša korelacija vidljiva je između udjela ukupnih polifenola i ukupnih flavonoida (0,9982), dok je najmanja korelacija određena za rezultate DPPH analize određivanja antioksidacijskog kapaciteta

i udjela ukupnih neflavonoida (0,8874). Visoki korelacijski koeficijenti određeni su i za rezultate dobivene analizom konvencionalno pripremljenih ekstrakata (tablica 12); najviši za rezultate ukupnih polifenola i ukupnih flavonoida (0,9997), a najniži za rezultate DPPH analize određivanja antioksidacijskog kapaciteta i udjela ukupnih neflavonoida (0,9892).

6.4.2. Utjecaj određenih parametara sastava ispitivanih sirovina na njihov bioaktivni potencijal određen primjenom analize glavnih komponenti

Kako bi se omogućio bolji uvid u povezanost pojedinih parametara bioaktivnih svojstava ispitivanih sirovina analiza glavnih komponenti (*Principal Component Analysis*, PCA) korištena je kao tehnika za dokazivanje multivarijatne ovisnosti među varijablama (ispitivani parametri). Analiza glavnih komponenti bavi se tumačenjem strukture matrice varijanci i kovarijanci nekog skupa podataka (izvornih varijabli) pomoću malog broja njihovih linearnih kombinacija. Korištenje ove statističke tehnike omogućuje redukciju podataka, otkrivanje povezanosti među podacima i izvođenje jasno definiranih zaključaka iz vrlo velikog seta podataka, kao što je slučaj u ovom istraživanju. Analiza glavnih komponenti dijeli set podataka u određene manje jedinice koje najbolje opisuju njihovu povezanost te na taj način omogućuje interpretaciju rezultata.

Analiza glavnih komponenti ispitivanih sekundarnih sirovina provedena je na temelju udjela pojedinih sastojaka njihovog bioaktivnog sastava. Veći rezultat analize (veća vrijednost pojedinog faktora) ukazuje na bolju povezanost s tom komponentom (faktorom). Tablica 13 numerički prikazuje iznose varijanci koje su opisane svakom od izračunatih glavnih komponenti (faktor 1 - faktor 5). Faktor 1 opisuje 52,76 % ukupne varijance u zadanom setu podataka, faktor 2 opisuje 23,00%, dok su faktori 3, 4 i 5 odgovorni za 18,42 %, 5,43 % i 0,39 % varijance u setu podataka, redom.

Slika 36 grafički prikazuje distribuciju podataka za faktore 1 i 2. Analiza glavnih komponenti pokazala je grupiranje podataka odnosno uzoraka pulpe šećerne repe (PŠR), kore krumpira (KK) i mahune graška (MG), označenih zelenim ovalnim oblikom. Uzorci ljuske oraha (LjO), kakaove ljuske (KLj) i ljuske crvenog luka (LjCL) pokazali su puno veću raspršenost podataka (uzoraka), što je posljedica značajnijih razlika u vrijednostima ispitivanih parametara bioaktivnog sastava. Kao što je vidljivo na slici 36, udjeli suhe tvari i saharoze s najvećim vrijednostima za faktor 1 (tablica 13) bili su najveći za pulpu šećerne repe i ljusku oraha (uzorci s najvećom pozitivnom vrijednosti faktora 1, odnosno uzorci smješteni najviše desno na osi X). Sukladno s time, uzorci ljuske crvenog luka i mahune graška, smješteni najviše lijevo na osi X karakterizirani su najmanjim udjelom suhe tvari. Također, prema rezultatima analize glavnih komponenti, udjel ugljikohidratne frakcije s najvećom vrijednosti za faktor 2 (tablica 13) bio je brojčano najveći za ljusku oraha, uzorak smješten najviše na osi Y, a najmanji

za kakaovu ljusku, smještenu najniže na osi Y. S obzirom da značajan udjel sastava nutrijenata ispitivanih sirovina čine i proteini, može se uočiti da je udjel proteina s najnižom (najnegativnijom) vrijednosti faktora 2 (tablica 13) najveći u uzorku smještenom najniže na osi Y (kakaova ljuska) te sukladno tome, najmanji je u uzorku ljuske oraha smještenom najviše na osi Y. Ovi rezultati potvrđuju rezultate analitičkog određivanja pojedinih bioaktivnih parametara ispitivanih sirovina.

Distribucija uzoraka i njihovo grupiranje prema rezultatima analize glavnih komponenti pokazuju da bioaktivni parametri sekundarnih sirovina primarno ovise o udjelu zastupljenijih sastojaka (nutrijenata), posebice udjela ugljikohidratne frakcije i proteina.



7. ZAKLJUČCI

U provedenom istraživanju određen je kemijski sastav sekundarnih biljnih sirovina, pri čemu su definirani udjeli osnovnih nutrijenata, a poseban naglasak stavljen na detaljnu karakterizaciju ugljikohidratne frakcije te na sastav i udjel biološki aktivnih spojeva, posebice polifenola i antioksidacijski kapacitet. Na osnovu dobivenih rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Analizom udjela osnovnih nutrijenata utvrđeni su značajni udjeli proteina (od 1,3 % suhe tvari kod ljuske oraha do 18,2 % suhe tvari kod kakaove ljuske) i mineralnog ostatka (od 1 % suhe tvari kod ljuske oraha do 9,3 % suhe tvari kod ljuske crvenog luka), dok je udjel masti u svim sirovinama, izuzev kakove ljuske (2,4 %), iznosio manje od 1 % udjela u suhoj tvari. U svim sirovinama najveći udjel suhe tvari odnosi se na ugljikohidratnu frakciju (od 70,3 % za kakaovu ljusku do 97,2 % za ljusku oraha).
2. Karakterizacijom ugljikohidratne frakcije sekundarnih biljnih sirovina enzimskom hidrolizom, udjel netopljivih vlakana bio je višestruko viši u odnosu na udjel topljivih. Najveći udjel netopljivih vlakana određen je u ljusci oraha (93,6 % ukupne sirove ugljikohidratne frakcije), dok se pulpa šećerne repe pokazala najbogatijim izvorom topljivih vlakana (29,6 % ukupne sirove ugljikohidratne frakcije).
3. Analiza sastava slobodnih ugljikohidrata pokazala je prisutnost glukoze, fruktoze i saharoze, kao najzastupljenijih sastojaka u sekundarnim biljnim sirovinama.
4. Najveći udjel ukupnih slobodnih ugljikohidrata sadrži ljuska crvenog luka ($92,25 \pm 1,93$ mg/g s. tv.), a najmanji kakaova ljuska ($5,76 \pm 0,61$ mg/g s. tv.), što odgovara zastupljenosti istih od 11,1 % i 0,8 % u ugljikohidratnoj frakciji. Sve sirovine, osim ljuske oraha i kakaove ljuske, sadrže glukozu koja je u najvišem udjelu ($33,24 \pm 1,54$ mg/g s. tv.) određena u mahuni graška. Fruktoza i saharoza prisutne su u svim sirovinama, pri čemu je najviši udjel fruktoze određen u ljusci crvenog luka ($50,68 \pm 0,84$ mg/g s. tv.), dok je najviši udjel saharoze određen u kori krumpira ($68,91 \pm 3,29$ mg/g s. tv.).
5. Kiselinska hidroliza omogućila je karakterizaciju ugljikohidrata sekundarnih biljnih sirovina određivanjem udjela ostatka netopljivog u kiselini te udjela i monomernog sastava polisaharida. Najviši udjeli ostatka netopljivog u kiselini određeni su u ljusci oraha ($348,18 \pm 2,85$ mg/g s. tv.) i kakaovoj ljusci ($259,12 \pm 17,42$ mg/g s. tv.), što upućuje na visok udjel lignina u ovim sirovinama i ujedno dobro korelira s najvišim udjelima netopljivih vlakana i relativno niskim udjelima polisaharida, budući da se prilikom enzimske hidrolize lignin izdvaja u netopljivoj frakciji.
6. Najviši teorijski udjel polisaharida određen je u pulpi šećerne repe, ljusci crvenog luka i kori krumpira te redom iznosi $811,22 \pm 12,03$; $725,78 \pm 15,37$; $734,78 \pm 8,03$ mg/g s. tv., što je sukladno

rezultatima najnižih udjela ostatka netopljivog u kiselini te relativno visokom udjelu ukupnih vlakana u navedenim sirovinama.

7. Analizom monomernog sastava polisaharida tankoslojnom kromatografijom visoke učinkovitosti, utvrđena je prisutnost glukoze, galaktoze, manoze, arabinoze, ksiloze i galakturonske kiseline, a udjel istih značajno se razlikuje obzirom na vrstu sekundarne biljne sirovine, što upućuje na njihov različit sastav polisaharida.
8. Glukanska, galaktanska i galakturonska frakcija određene su kao stalno prisutni konstituenti u svim analiziranim uzorcima, dok su arabinanska, mananska i ksilanska frakcija prisutne samo u nekima. Glukanska frakcija ujedno je i najzastupljenija u svim sirovinama (od 65,0 % kod pulpe šećerne repe do 95,5 % kod kore krumpira), dok se prisutnost arabinanske frakcije ističe u pulpi šećerne repe (17,3 %), ksilanske u ljusci oraha (20,0 %) te galakturonske frakcije u ljusci crvenog luka (20,2 %).
9. Analizom biološki aktivnih sastojaka najveći udjel ukupnih polifenola ($66,84 \pm 5,29$ mg EGK/g s. tv.), ukupnih flavonoida ($45,18 \pm 4,76$ mg EGK/g s. tv.) i ukupnih neflavonoida ($21,66 \pm 0,54$ mg EGK/g s. tv.) određen je u ljusci crvenog luka.
10. Analizom pojedinačnih polifenolnih spojeva utvrđeno je da visokom udjelu polifenola ljuske crvenog luka najviše doprinose kvercetin i derivati kvercetina ($8669,79$ $\mu\text{g/g}$ s. tv.) te protokatehinska kiselina ($3772,14$ $\mu\text{g/g}$ s. tv.). Ljuska crvenog luka predstavlja bogati izvor vanilinske kiseline ($27,16$ $\mu\text{g/g}$ s. tv.) i derivata luteolina ($219,43$ $\mu\text{g/g}$ s. tv.), dok ljuska oraha predstavlja izvor elaginske kiseline ($563,57$ $\mu\text{g/g}$ s. tv.) i najveći izvor derivata hidroksibenzojeve kiseline ($113,34$ $\mu\text{g/g}$ s. tv.). Kakaova ljuska sadrži najviši udjel galne kiseline ($374,33$ $\mu\text{g/g}$ s. tv.) i, među ispitivanim sirovinama, jedina sadrži metilksantine teobromin ($6979,60$ $\mu\text{g/g}$ s. tv.) i kafein ($821,31$ $\mu\text{g/g}$ s. tv.). U kori krumpira oderedeni su najviši udjeli derivata hidroksicimetne kiseline ($932,87$ $\mu\text{g/g}$ s. tv.), klorogenske kiseline ($872,64$ $\mu\text{g/g}$ s. tv.), kava kiseline ($94,81$ $\mu\text{g/g}$ s. tv.) i ferulinske kiseline ($83,37$ $\mu\text{g/g}$ s. tv.). Mahuna graška predstavlja najbolji izvor *p*-kumarinske kiseline ($8,92$ $\mu\text{g/g}$ s. tv.).
11. Statističkom obradom rezultata ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijskog kapaciteta utvrđen je visok stupanj korelacije između navedenih parametara tesukladno tome, najveći antioksidacijski kapacitet, određen ABTS ($336,64 \pm 0,59$ $\mu\text{mol ET/g}$ s. tv.) i DPPH metodama ($170,21 \pm 9,23$ $\mu\text{mol ET/g}$ s. tv.) karakterizira ljusku crvenog luka.
12. Usporedbom Soxhlet i konvencionalne ekstrakcije polifenolnih spojeva, utvrđena je veća ekstrakcijska učinkovitost Soxhlet ekstrakciju, odnosno pozitivni učinak dulje ekstrakcije u kombinaciji s različitim otapalima.

13. Obzirom na visoki udjel sekundarnih biljnih sirovina nastalih primarnom obradom, njihovu dostupnost i obnovljivu prirodu, ispitivane sekundarne biljne sirovine predstavljaju potencijalno visokovrijedne izvore funkcionalnih sastojaka, posebice ugljikohidrata i polifenola, otvarajući brojne mogućnosti njihove inovativne primjene u razvoju različitih prehrambenih proizvoda.



8. ZAHVALE

Prvenstveno se zahvaljujemo našoj mentorici prof. dr. sc. Draženki Komes na pruženoj prilici, strpljenju i pomoći prilikom pisanja rada. Hvala Vam na brojnim savjetima, usmjeravanju kroz cijeli rad, poticanju naše kreativnosti i želje za učenjem.

Veliko hvala našoj asistentici Aleksandri Vojvodić, dipl. ing. na stručnom vodstvu, velikom trudu, nesebičnosti kod prenošenja znanja i svemu što nas je naučila kroz laboratorijski rad.

Hvala našim asistenticama dr. sc. Ani Belščak-Cvitanović i Arijani Bušić, mag. ing. na otvorenosti, srdačnosti i svojoj pruženoj pomoći tijekom i nakon laboratorijskog rada.

Posebno hvala cijelom Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na ugodnoj atmosferi i na životnom iskustvu koje ćemo dugo pamtiti.

Ovom prilikom zahvaljujemo se svima koji su nam pomogli pri izradi ovog rada.

Hvala lijepa!



9. POPIS LITERATURE

Abdul-Hamid, A., Luan, Y. S. (2000) Functional properties of dietary fiber prepared from defatted rice bran. *Food Chem.* **68**, 15-19.

Al-Weshahy, A., Rao, A. V. (2009) Isolation and characterization of functional components from peel samples of six potatoes varieties growing in Ontario. *Food Res. Int.* **42**, 1062-1066.

Anderson, J. W., Baird, P., Davis, R. H. Jr., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Waters, V., Williams, C. L. (2009) Health benefits of dietary fiber. *Nutr Rev.* **67**, 188-205.

Angulo, J., Mahecha, L., Yepes, S. A., Yepes, A. M., Bustamante, G., Jaramillo, H., Valencia, E., Villamil, T., Gallo, J. (2012) Nutritional evaluation of fruit and vegetable waste as feedstuff for diets of lactating Holstein cows. *J. Environ. Manage.* **95**, 210-214.

Anonymous 1, <<http://www.feedimpex.com/usage-sugar-beet-pellets>>. Pristupljeno 19. travnja, 2014.

Anonymous 2, <<http://www.nordzucker.de/en/business/products/feeds-molasses/sugar-beet-pulp.html>>. Pristupljeno 20. travnja 2014.

Anonymous 3, <<http://www.colourbox.com/image/walnut-shell-isolated-on-white-image-2569159>>. Pristupljeno 25. travnja 2014.

Anonymous 4, <<http://www.groworganic.com/cocoa-mulch-2-cubic-ft.html>>. Pristupljeno 20. travnja 2014.

Anonymous 5, <<http://itsastitchup.co.uk/blog/dyeing-with-onion-skins/>>. Pristupljeno 20. travnja 2014.

Anonymous 6, <<http://www.bakeryandsnacks.com/Processing-Packaging/PepsiCo-aims-to-convert-potato-waste-into-crisp-packaging>>. Pristupljeno 20. travnja 2014.

Anonymous 7, <<http://www.bettycrocker.com/how-to/glossary-page/ingredients/p/pb-pi/pea-pods-snow-chinese>>. Pristupljeno 20. travnja 2014.

AOAC International (1990a) *Fat in Cacao Products*, AOAC- Official Methods of Analysis <<http://www.eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=25801>>. Pristupljeno, 28. travnja, 2014.

AOAC International (1990b) *Loss on Drying (Moisture) for Feeds (at 135 °C for 2 Hours)/Dry Matter on Oven Drying for Feeds (at 135 °C for 2 Hours)*, AOAC- Official Methods of Analysis <<http://www.eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=32601>>. Pristupljeno, 28. travnja, 2014.

AOAC International (1995) *Protein in Fruit Products*, AOAC- Official Methods of Analysis <<http://www.eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=15465>>. Pristupljeno, 28. travnja, 2014.

AOAC International (1997) *Ash of Nuts and Nut Products*, AOAC- Official Methods of Analysis <<http://www.eoma.aoc.org/methods/info.asp?ID=16978>>. Pristupljeno, 28. travnja, 2014.

AOAC International (2012) *Insoluble, Soluble, and Total Dietary Fiber in Foods*, AOAC- Official Methods of Analysis <<http://www.eoma.aoc.org/methods/info.asp?ID=49669>>. Pristupljeno, 28. travnja, 2014.

Asadi, M. (2007) *Beet-Sugar Handbook*. John Wiley & Sons, Inc., New York, str. 99-465.

Barazarte, H., Sangronis, E., Unai, E. (2008) La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.): una posible fuente comercial de pectinas. *Arch. Latinoam. Nutr.* **58**, 64-70.

Belščak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Manojlović, V., Komes, D., Juranović Cindrić, I., Nedović, V., Bugarski, B. (2011) Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Res. Int.* **44**, 1094-1101.

Benitez, V., Molla, E., Martin-Cabrejas, M. A., Aguilera, Y., Lopez-Andreu, F. J., Cools, K., Terry, L. A., Esteban, R. M. (2011) Characterization of Industrial Onion Wastes (*Allium cepa* L.): Dietary Fibre and Bioactive Compounds. *Plant Food for Hum. Nutr.* **66**, 48-57.

Bertin, C., Rouau, X., Thibault, J.-F. (1988) Structure and properties of sugar beet fibres. *J. Sci. Food Agr.* **44**, 15-29.

Borderias, A. J., Sa'nchez-Alonso, I., Pe'rez-Mateos, M. (2005) New applications of fibres in foods: Addition to fishery products. *Trends Food Sci. Tech.* **16** (10), 458-465

Buszewski, B., Noga, S. (2012) Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) - a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.* **402**, 231-247.

Camire, M. E., Flint, S. I. (1991) Thermal processing effects on dietary fiber composition and hydration capacity in corn meal, oat meal, and potato peels. *Cereal Chem.* **68**, 645-647.

Camire, M. E., Violette, D., Dougherty, M. P., McLaughlin, M. A. (1997) Potato peel dietary fiber composition: effects of peeling and extrusion cooking processes. *J. Agr. Food Chem.* **45**, 1404-1408.

Canteri-Schemin, M. H., Fertonani, H. C. R., Waszczynskyj, N., Wosiacki, G. (2005) Extraction of pectin from apple pomace. *Braz. Arch. Biol. Techn.*, **48**, 259-266.

Carocho M., Ferreira I. C. F. R. (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* **51**, 15-25.

- Chapla, D., Divecha, J., Madamwar, D., Shah, A. (2010) Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. *Biochem. Eng. J.* **49**, 361-369.
- Chau, Ch. F., Huang, Y. L. (2003) Comparison of the chemical composition and physicochemical properties of different fibers prepared from peel of *Citrus sinensis* L. Cv. Liucheng. *J. Agr. Food Chem.* **51**, 2615-2618.
- Chong, J., Poutaraud, A., Hugueney, P. (2009) Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci.* **177**, 143-155.
- Corzo-Martínez, M., Corzo, N., Villamiel, M. (2007) Biological properties of onions and garlic. *Trends Food Sci. Tech.* **18**, 609-625.
- Crowe, K. M., Francis C. (2013) Position of the academy of nutrition and dietetics: functional foods. *J. Acad. Nutr. Diet.* **113**, 1096-103.
- Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H. (2006) Plant Secondary Metabolites- Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Blackwell Publishing Ltd., Oxford-Velika Britanija.
- Davidson, M. H., McDonald, A. (1998) Fiber: Forms and function. *Nutr. Res.* **18**, 617-624.
- Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B., Roberfroid, M. B. (1999) Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document. *Brit. J. Nutr.* **81**, 1-27.
- Donkoh, A., Atuahene, C. C., Wilson, B. N., Adomako, D. (1991) Chemical composition of cocoa pod husk and its effect on growth and food efficiency in broiler chicks. *Anim. Feed Sci. Tech.* **35**, 161-169.
- Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., Attia H. (2011) Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chem.* **124**, 411-421.
- FAO (2008) Food and Agriculture Organization of the United Nations – Homepage <<http://www.fao.org/home/en/>>. Pristupljeno, 12. siječnja, 2014.
- FAO (2012) *The State of Food Insecurity in the World 2012*, FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rim, <<http://www.fao.org/docrep/016/i3027e/i3027e.pdf>>. Pristupljeno 13. siječnja, 2014.
- Figueira, A., Janick, J., BeMiller, J. N. (1993) New products from *Theobroma cacao*: seed pulp and pod gum. *News Crops*, **2**, 1-5.

- Fleury, N., Lahaye, M. (1991) Chemical and physico-chemical characterisation of fibres from *Lamiaria digitata* (Kombu Breton): A physiological approach. *J. Sci. Food Agr.* **55**, 389-400.
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (2001) Dietary reference intakes. Proposed definition of dietary fiber. A report of the panel on the definition of dietary fiber and the standing committee on the scientific evaluation of dietary reference intakes. Washington, DC: National Academy Press.
- Friedman, M. (1997) Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *J. Agr. Food Chem.* **45**, 1523-1540.
- Fuss, E. (2003) Lignans in plant cell and organ cultures: An overview. *Phytochem. Rev.* **2**, 307-320.
- Galanakis, C.M. (2012) Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends Food Sci. Tech.* **26**, 68-87.
- Garau, M. C., Simal, S., Roselló, C., Femenia, A. (2007) Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. Canoneta) by-products. *Food Chem.* **104**, 1014-1024.
- Ghanem, K.M., El-Refai, A.H., El-Gazaerly, M.A., (1992) Methane production from beet pulp. *J. Resour. Convers. Recycl.* **6**, 267-275.
- Grigelmo-Miguel, N., Martin-Belloso, O. (1999) Comparison of dietary fibre from by-products of processing fruits and greens and from cereals. *LWT – Food Sci. Technol.* **32**, 503-508.
- Guillon, F., Champ, M. (2000) Structural and physical properties of dietary fiber, and consequence of processing on human physiology. *Food Res. Int.* **33**, 233-245.
- Heredia, A., Jime'nez, A., Ferna'ndez-Bolan'os, J., Guille'n, R., Rodri'guez, R. (2002) *Fibra Alimentaria*, Biblioteca de Ciencias, Madrid, str. 1-117.
- Hurs, W. J. (2008) *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*, 2. izd., Taylor & Francis, London.
- Hutnan, M., Drtil, M., Mrafkova, L. (2000) Anaerobic biodegradation of sugar beet pulp. *Biodegrad.* **11**, 203-211.
- ICCO (2011) Latest quarterly bulletin of cocoa statistics, ICCO- International Cocoa Organization, <<http://www.icco.org/about/press2.aspx?IdLhfb14696>>. Pristupljeno 11. siječnja, 2014.
- Jaime, L., Martín-Cabrejas, M., Mollá, E., López-Andréu, F. J., Esteban, R. M. (2001) Effect of storage on fructans and fructooligosaccharide of onion (*Allium cepa* L.). *J. Agr. Food Chem.* **49**, 982-988.

- Jaime, L., Martínez, F., Martín-Cabrejas, M. A., Mollá, E., López-Andréu, F. J., Waldron, K. W., Esteban, R. M. (2000) Study of total fructan and fructooligosaccharide content in different onion tissues. *J. Sci. Food Agr.* **81**, 177-182.
- Jaime, L., Mollá, E., Fernández, A., Martín-Cabrejas, M. A., López-Andréu, F. J., Esteban, R. M. (2002) Structural carbohydrate differences and potential source of dietary fibre of onion (*Allium cepa* L.). *J. Agr. Food Chem.* **50**, 122-128.
- Jimenez-Escrig, A., Sanchez-Muniz, F. J. (2000) Dietary fibre from edible seaweeds: Chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutr. Res.* **20**, 585-598.
- Kalvatchev, Z., Garzaro, D., Cedezo, F. G. (1998) *Theobroma cacao* L.: un nuevo enfoque para nutrición y salud. *Agroalimentaria*, **6**, 23-25.
- Kar, Y. (2011) Co-pyrolysis of walnut shell and tar sand in a fixed-bed reactor. *Bioresource Technol.* **102**, 9800-9805.
- Kliebenstein, D. J., Osbourn, A. (2012) Making new molecules – evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**, 415-423.
- Klieman, E., Simas, K. N., Amante, E. R., Prudêncio, E. S., Teófilo, R. F., Ferreira, M. M. C., Amboni, R. D. M. C. (2009) Optimisation of pectin acid extraction from passion fruit peel (*Passiflora edulis* flavicarpa) using response surface methodology. *Int. J. Food Sci. Technol.* **44**, 476-483.
- Ko, M.-J., Cheig, C.-I., Cho, S.-W., Chung, M.-S. (2011) Subcritical water extraction of flavonol quercetin from onion skin. *J. Food Eng.* **102**, 327-333.
- Koppar, A., Pullammanappallil, P. (2008) Single-stage, batch, leach-bed, thermophilic anaerobic digestion of spend sugar beet pulp. *Bioresour. Technol.* **99**, 2831-2839.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, H. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. (2002) Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer, *Am. J. Med.* **113**, 71-88.
- Labat, M., Gracia, J.L., Meyer, F., Deschamps, F. (1984) Anaerobic digestion of sugar beet pulps. *Biotechnol. Lett.* **6**, 379-384.
- Mahmood, A. U., Greenman, J., Scragg, A. H. (1998) Orange and potato peel extracts: analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme Microb. Tech.* **22**, 130-137.
- Manas, E. (1994) Source of error in dietary fiber analysis. *Food Chem.* **50**, 331-342.

- Martinez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Alvarez, J. A., Viuda-Martos, M. (2012) Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Res. Int.* **49**, 39-45.
- Mateos-Aparicio, I., Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suarez, M.-J., Zapata-Revilla, M.-A., Tenorio-Sanz, M.-D. (2010) Pea pod, broad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. *LWT-Food Sci. Technol.* **43**, 1467-1470.
- Medina, A., Jakobsen, I., Vassilev, N., Azcón, R., Larsen, J. (2007) Fermentation of sugar beet waste by *Aspergillus niger* facilitates growth and P uptake of external mycelium of mixed populations of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* **39**, 485-492.
- Misi, S. N., Forster, C. F. (2002) Semi-continuous anaerobic co-digestion of agrowastes. *Environ. Tech.* **23**, 45-451.
- Mohdaly, A. A. A., Sarhan, M. A., Mahmoud, A., Ramadan, M. F., Smetanska, I. (2010) Antioxidant efficacy of potato peels and sugar beet pulp extracts in vegetable oils protection. *Food Chem.* **123**, 1019-1026.
- Mohdaly, A. A., Sarhan, M. A., Smetanska, I., Mahmoud, A. (2009) Antioxidant properties of various solvent extracts of potato peel, sugar beet pulp and sesame cake. *J. Sci. Food Agr.* **90**, 218-26.
- Nara, K., Miyoshi, T., Honma, T., Koga, H. (2006) Antioxidative activity of boundform phenolic potato peel. *Biosci. Biotech. Biochem.* **70**, 1489-1491.
- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I. C. F. R., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, J. A. (2009) Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 2326-2331.
- Olson, A., Gray, G. M., Chiu, M. C. (1987) Chemistry and analysis of soluble dietary fibre. *Food Technol.* **41**, 71-80.
- Ough, C. S., Amerine, M. A. (1988) Methods for analysis of musts and wine, 2. izd., John Wiley & Sons, New York.
- Owusu-Domfeh, K. (1972) The future of cocoa and its by-products in the feeding of livestock. *Ghana Jnl. Agric. Sci.* **5**, 57-64.
- Pinheiro, E. R., Silva, I. M. D. A., Gonzaga, L. V., Amante, E. R., Teófilo, R. F., Ferreira, M. M. C., Amboni, R. D. M. C. (2008) Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel

(*Passiflora edulis* flavicarpa) with citric acid by using response surface methodology. *Bioresource Technol.* **99**, 5561-5566.

Polematidis, I., Koppar, A., Pullammanappallil, P.C., Seaborn, S., Chynoweth, D.P., Teixeira, A.A., Legrand, R. (2007) Biogasification of waste stream and byproducts from sugar beet processing. U: *ASABE Annual International Meeting*. Minneapolis Convention Center, Minneapolis, str. 2-15.

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 Rad. Biol. Med.* **26**, 1231–1237.

Ribera, A. E., Zuñiga, G. (2012) Induced plant secondary metabolites for phytopatogenic fungi control: a review. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **12**, 893-911.

Rodriguez de Sotillo, D., Hadley, M., Holm, E. T. (1994) Phenolics in aqueous potato peel extract: Extraction, identification and degradation. *J. Food Sci.* **59**, 649-651.

Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., Rivas, B., Felipe, F.L., Cordovés, C., Mancheño, J. M., Muñoz, R. (2009) Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int. J. Food Mic.* **132**, 79-90.

Roehrig, K. L. (1988) The physiological effects of dietary fiber. *Food Hydrocolloid.* **2**, 1-18.

Roldán, E., Sánchez-Moreno, C., de Ancos, B., Cano, P. (2008) Characterisation of onion (*Allium cepa* L.) by-products as food ingredients with antioxidant and antibrowning properties. *Food Chem.* **108**, 907-916.

Rolin, C. (1993) Pectins. U: *Industrial gums: Polysaccharides and their derivatives* (Whistler, R. L., BeMiller, J. N., ured.), 3. izd., Academic Press, San Diego, str. 257-293.

Rose, P., Whiteman, M., Moore, P. K., Zhu, L. Z. (2005) Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: The chemistry of potential therapeutic agents. *Nat. Prod. Rep.* **22**, 351-368.

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

Sangnark, A., Noomhorm, A. (2003) Effect of particle sizes on functional properties of dietary fibre prepared from sugarcane bagasse. *Food Chem.* **80**, 221-229.

Schieber, A., Saldana, M. D. A. (2009) Potato Peels: A source of nutritionally and pharmacologicannny interesting compounds – A review. *Glob. Sci. Books.* **3**, 23-29.

- Schieber, A., Stintzing, F. C., Carle, R. (2001) By-products of plant food processing as a source of functional compounds-recent developments. *Trends Food Sci. Tech.* **12**, 401 – 413.
- Schneeman, B. O. (1987) Soluble and insoluble fibre-different physiological responses. *Food Technol.* **41**, 81-82.
- Singh, N., Kamath, V., Rajini, P. S. (2005) Attenuation of hyperglycemia and associated biochemical parameters in STZ-induced diabetic rats by dietary supplementation of potato peel powder. *Clin. Chim. Acta*, **353**, 165-175.
- Singh, P., P., Saldana, M., D., A. (2011) Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. *Food Res. Int.* **44**, 2452-2458.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144-158.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. (2008) Determination of structural carbohydrates and lignin-Laboratory analytical procedure. Technical report NREL/TP-510-42618 <<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42618.pdf>>. Pristupljeno, 26. ožujka, 2014.
- Soobrattee, M. A, Neergheen, V. S, Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., Bahorun, T. (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Res.* **579**, 200-213.
- Stalikas, C. D. (2010) Phenolic acids and flavonoids: Occurrence and analytical methods. *Methods Mol. Biol.* **610**, 65-90.
- Sun, R., Hughes, S. (1998) Fractional extraction and physico-chemical characterization of hemicelluloses and cellulose from sugar beet pulp. *Carbohydr. Polym.* **36**, 293-299.
- Surmen, Y., Demirbas, A. (2003) Cofiring of biomass and lignite blends: resource facilities; technological and environmental issues. *Energy Source.* **25**, 175-187.
- Tiwari, B. K., Brunton, N. P., Brennan, C. S. (2013) *Handbook of Plant Food Phytochemicals: Sources, Stability and Extraction*. A John Wiley & Sons, Ltd. Publication, New York.
- Tringalli, C. (2001) Bioactive Compounds from Natural Sources: Isolation, characterisation and biological properties. Taylor & Francis, New York.
- TurkStat (2011) Crop Production Statistics, TurkStat- Turkish Statistical Institute <<http://www.turkstat.gov.tr>> . Pristupljeno 13. siječnja, 2014.

- Virk, B. S., Sogi, D. S. (2004) Extraction and characterization of pectin from apple (*Malus pumila* Cv Amri) peel waste. *Int. J. Food Prop.* **7**, 693-703.
- Voragen, A. G. J., Pilnik, W., Thibault, J.-F., Axelos, M. A. V., Renard, M. G. C. (1995) Pectins. U: *Food polysaccharides and their applications* (Stephen, A. M., ured.), Marcel Dekker Inc., New York, str. 288 – 310
- Vriesmann, L. C., Teófilo, R. F., Petkowicz, C. L. O. (2011) Optimization of nitric acid-mediated extraction of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) using response surface methodology. *Carbohydr. Polym.* **84**, 1230- 1236.
- Waldron, K. (2001) Useful ingredients from onion waste. *Food Sci. Technol.* **15**, 38-41.
- Wang, J., F., Jensen, B., B., Jorgensen, H., Li, D., F., Lindber. J., E. (2002) Ileal and total tract digestibility, and protein and fat balance in pigs fed rice with addition of potato starch, sugar beet pulp or wheat bran. *Anim. Feed Sci. Tech.* **102**, 125-136.
- Wartelle, L. H., Marshall, W. E. (2000) Citric acid modified agricultural by-products as copper ion adsorbents. *Adv. Environ. Res.* **4**, 1-7.
- Yapo, B. M. (2009a) Biochemical characteristics and gelling capacity of pectin from yellow passion fruit rind as affected by acid extractant nature. *J. Agr. Food Chem.* **57**, 1572- 1578.
- Yapo, B. M. (2009b) Lemon juice improves the extractability and quality characteristics of pectin from yellow passion fruit by-product as compared with commercial citric acid extractant. *Bioresource Technol.* **100**, 3147-3151.
- Yapo, B. M., Besson, V., Koubala, B. B., Koffi, K. L. (2013) Adding Value to Cacao Pod Husks as a Potential Antioxidant-Dietary Fiber Source. *Am. J. Food Nutr.* **1**, 38-46.
- Yoo, S. D., Harcum, S. W. (1999) Xanthan gum production from waste sugar beet pulp. *Bioresource Technol.* **70**, 105–109.



10. SAŽETAK

POTENCIJAL SEKUNDARNIH BILJNIH SIROVINA KAO IZVORA FUNKCIONALNIH SASTOJAKA PREHRAMBENIH PROIZVODA

SAŽETAK

Sukladno brojnim izazovima prehrambene industrije u traženju novih izvora funkcionalnih sastojaka, posljednjih nekoliko godina veliki je interes znanstvenika usmjeren na sekundarne biljne sirovine (agro-industrijski otpad). Osim raspoloživosti, cijene i obnovljive prirode, biljno podrijetlo sekundarnih sirovina otvara brojne mogućnosti primjene istih zbog zanimljivog kemijskog sastava. Cilj istraživanja je odrediti udjel osnovnih nutrijenata, sastav ugljikohidrata i polifenola te antioksidacijski potencijal šest sekundarnih biljnih sirovina (pulpe šećerne repe, ljuske oraha, kakaove ljuske, ljuske crvenog luka, kore krumpira i mahune graška). Udjel suhe tvari i osnovnih nutrijenata (masti, proteini, ugljikohidrati i mineralni ostatak) određen je standardnim analitičkim metodama. Analiza ugljikohidrata je uključivala određivanje topljivih i netopljivih vlakna primjenom enzimsko-gravimetrijske metode, određivanje sastava slobodnih ugljikohidrata tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC-RID), određivanje sastava polisaharida tankoslojnom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPTLC) i gravimetrijsko određivanje ostatka netopljivog u kiselini. Udjel ukupnih polifenola i flavonoida određen je spektrofotometrijski, a polifenolni sastav pojedine sirovine HPLC-PDA metodom. Antioksidacijski kapacitet također je određen spektrofotometrijski primjenom ABTS radikal-kationa (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) i DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Rezultati su pokazali dominantni udjel sirove ugljikohidratne frakcije u svim sirovinama, u rasponu od 70,3 % (kakaova ljuska) do 97 % (ljuska oraha) suhe tvari, a sastav iste ovisi o sirovini. U ukupnoj ugljikohidratnoj frakciji određeno je da ljuska oraha sadrži najveći udjel netopljivih vlakana (93,6 %), pulpa šećerne repe predstavlja najbolji izvor topljivih vlakana (29,6 %), dok ljuska crvenog luka (11,1 %) i mahuna graška (11,0 %) imaju najveće udjele slobodnih ugljikohidrata. Iako monomerni sastav polisaharida ovisi o vrsti sirovine, u svima je najzastupljenija glukoza, s najvišim udjelom određenim u kori krumpira (95,5 %). Najveći bioaktivni potencijal s najvećim udjelom ukupnih polifenola (66,84 mg EGK/g s. tv.) i najizraženijim antioksidacijskim svojstvima, određen ABTS (108,94±0,59 μmol ET/g s. tv.) i DPPH (170,21±9,23 μmol ET/g s. tv.) metodama karakterizira ljusku crvenog luka. Među ispitivanim uzorcima, jedini izvor metilksantina jest kakaova ljuska (6979,60±108,21 μg teobromina/g s. tv.). Ispitivane sekundarne biljne sirovine pokazale su značajan potencijal za primjenu istih kao izvora ugljikohidrata i polifenolnih spojeva kao funkcionalnih dodataka prehrambenim proizvodima.

Ključne riječi: antioksidacijski kapacitet, polifenoli, prehrambena vlakna, sekundarne biljne sirovine, ugljikohidrati.



11. SUMMARY

**THE POTENTIAL OF SECONDARY RAW MATERIALS AS A SOURCE OF DIETARY
FUNCTIONAL COMPOUNDS**

SUMMARY

In accordance with the numerous challenges of the food industry regarding the search for new sources of functional ingredients, in the last few years a growing interest of scientists is focused on secondary plant raw materials (agro-industrial waste). Beside their availability, price and renewable nature, plant origin of agro-industrial waste opens vast opportunities for further processing because of the interesting chemical composition. The aim of this work is to evaluate the content of main nutrients, composition of carbohydrates and polyphenols and antioxidant potential of six secondary raw materials (sugar beet pulp, walnut shell, cocoa husk, onion peel, potato peel and pea pod). The content of dry matter and the main nutrients (fats, proteins, carbohydrates and ash) were determined by the standard analytical methods. Analysis of carbohydrates included determination of insoluble and soluble fibre content using enzymatic-gravimetric method, determination of extractable sugars using High performance liquid chromatography (HPLC-RID), determination of the composition of polysaccharides using High performance thin layer chromatography (HPTLC) and gravimetric determination of the residue insoluble in acid. Content of total polyphenols and flavonoids is evaluated spectrophotometrically, and polyphenolic composition of each plant material using HPLC-PDA analysis. The antioxidant capacity is also established spectrophotometrically using the ABTS radical-cation (2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonicacid) and DPPH radical (1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl). The obtained results revealed the predominant content of crude carbohydrate fraction in all samples, in the range of 70.3 % (cocoa husk) to 97 % (walnut shell) on dry matter basis, and the composition of each depends on the raw material. In the crude carbohydrate fraction, walnut shell exhibited the highest insoluble fibre content (93.6 %), sugar beet pulp was the richest source of soluble dietary fibre (29.6 %), while onion peel (11.1 %) and pea pod (11,0 %) exhibited the highest contents of extractable free sugars. Although monomeric composition of polysaccharides depends on the type of raw material, glucose was the most abundant in each material, with the highest proportion determined in potato peel (95.5 %). Onion peel showed predominantly high bioactive potential with the highest total polyphenolic content (66.84 mg GAE/g of sample dry matter) and the most predominant antioxidant potential, determined using ABTS (108.94±0.59 µmol TE/g of dry matter) and DPPH (170.21±9.23 µmol TE/g of dry matter) methods. Among the analyzed samples, the only source of methylxanthines was cocoa husk (6979.60±108.21 mg theobromine/g of sample dry matter). The evaluated secondary raw materials have shown a significant potential for their use as the sources of carbohydrate and polyphenolic compounds as functional ingredients in food products.

Keywords: antioxidant capacity, polyphenols, dietary fiber, secondary raw materials, carbohydrates.